

Tesis Doctoral

Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*

Andrioli, Nancy Beatriz

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Andrioli, Nancy Beatriz. (2011). Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Andrioli, Nancy Beatriz. "Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

"EVALUACIÓN DE AGENTES QUÍMICOS CON POTENCIAL GENOTÓXICO EN
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*"

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Nancy Beatriz Andrioli

Director de Tesis Doctoral: Dra. Marta D. Mudry
Consejero de Estudios: Dra. Marta D. Mudry

Lugar de Trabajo: Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), Dpto. de
Ecología Genética y Evolución, FCEyN, UBA.

Bueno Aires
Argentina
2011

"EVALUACIÓN DE AGENTES QUÍMICOS CON POTENCIAL GENOTÓXICO EN
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*"

RESUMEN:

La toxicidad y genotoxicidad del Metronidazol (MTZ) y Tiabendazol (TBZ) fueron estudiados en raíces de *Allium cepa*. Ambos compuestos, inhibieron el crecimiento de las raíces en el rango de concentraciones 10-500 µg/ml. La exposición a 250µg/ml MTZ, indujo peroxidación lipídica y aumento significativo en los niveles de glutatión reducido en la zona de elongación. En la zona meristemática no se observó peroxidación lipídica y la respuesta antioxidante enzimática como actividad catalasa y superóxido dismutasa y no enzimática como contenido de ascorbato y dehidroascorbato, se incrementaron significativamente. Las células expuestas a 10-250 µg/ml de MTZ no mostraron efectos genotóxicos sugiriendo que las defensas antioxidantes contrarrestaron los radicales libres generados por exposición a MTZ. El TBZ indujo efectos genotóxicos para rango de concentraciones 50-250 µg/ml como inhibición del índice mitótico, alteración de índices de fase e inducción de biomarcadores citogenéticos de genotoxicidad. La inmunodetección de moléculas de tubulina, demostró el TBZ induce daño en las estructuras microtubulares promoviendo anormalidades en la segregación cromosómica y en la citocinesis. Los resultados obtenidos indicaron que la acción del MTZ estaría vinculada con la generación de radicales libres, mientras que el TBZ actuaría interfiriendo con la dinámica de formación de las estructuras microtubulares.

Palabras clave: *Allium cepa*, Metronidazol, Tiabendazol, Daño oxidativo, Microtúbulos.

"EVALUATION OF THE GENOTOXIC POTENTIAL OF CHEMICAL AGENT ON
MERISTEMATIC CELLS OF *Allium cepa*"

ABSTRACT:

The toxicity and genotoxicity of metronidazole (MTZ) and Thiabendazole (TBZ) were studied in of *Allium cepa* roots. Both compounds inhibited the growth of roots for the concentration range 10-500 mg / μ l. 250 μ g/ml MTZ exposure, induced lipid peroxidation and significantly increased of reduced glutathione levels in the elongation zone. In the meristem zone was not observed lipid peroxidation and enzymatic antioxidant response as catalase and superoxide dismutase activity and not enzymatic response as content of ascorbate and dehydroascorbate, increased significantly. Cells exposed to 10-250 μ g / ml of MTZ showed no genotoxic effects, suggesting that antioxidant defenses offset the free radicals generated by exposure to MTZ. The genotoxic effects induced TBZ concentration range 50-250 μ g / ml and inhibition of mitotic index, phase index alteration and induction of cytogenetic biomarkers of genotoxicity. The Immunodetection of tubulin molecules, demonstrated the TBZ induces damage to the microtubule structures and promote abnormalities in chromosome segregation and cytokinesis. The results indicated that the action of MTZ would be linked to the generation of free radicals, while TBZ act by interfering with the dynamics of formation of microtubule structures.

Keywords: *Allium cepa*, Metronidazole, Thiabendazole, Oxidative Damage, Microtubules.

AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires que me brindó el espacio para desarrollar la experimentación que dio lugar al presente trabajo de Tesis y contribuir en mi formación de posgrado.

A la Dra. Marta Dolores Mudry por ofrecerme la oportunidad de hacer posible este trabajo con perseverancia, paciencia y entusiasmo.

A todos los integrantes del GIBE por su consideración y la amistad que me brindaron siempre y por los mates compartidos.

Al Dr. Arturo Wulff por acompañarme en los primeros experimentos y colaborar siempre que fue necesario.

Al Dr. Eduardo Greizerstein por su asesoramiento y colaboración con las técnicas citológicas aplicadas.

A la Dra. Alba Papeschi por haber estado cerca desde el inicio del proyecto con sus ideas y transmitiendo fuerza, conocimiento y entusiasmo.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad de la Plata en la persona del Dr Marcelo Larramendy por brindar los recursos necesarios para la puesta a punto de la inmunolocalización de las tubulinas.

A la Dra. Sonia Soloneski por su predisposición para trabajar en la puesta a punto de la técnica de inmunolocalización de tubulinas en un nuevo modelo y a todo el grupo de trabajo, por la calidez con que siempre me recibieron en su laboratorio.

A la Dra. María del Carmen Ríos por poner a disposición los recursos necesarios para el estudio de daño oxidativo y respuesta antioxidante en el modelo vegetal.

Al Dr. Sebastián Sabatini por su excelente predisposición para colaborar en el análisis de daño oxidativo y respuesta antioxidante.

A David Ávila por el afecto y la comprensión manifestada durante la redacción de esta Tesis.

A mis hijos por comprender mis ausencias.

A mi familia

A mis amigos

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. Toxicología.....	1
1.1.1. Antecedentes históricos y generalidades	
1.1.2. Toxicología Ambiental	
1.1.3. Ensayos Biológicos	
1.2. Genética Toxicológica.....	28
1.2.1. Antecedentes y Generalidades	
1.2.2. Mutagenicidad	
1.2.3. Campos de aplicación e interés	
1.3. Genotoxicidad	43
1.3.1. Biomarcadores	
1.3.2. Niveles de complejidad	
1.3.3. Modelos experimentales	
1.3.4. Plantas superiores	
1.3.4.1. <i>Allium cepa</i>	
1.3.4.2. La raíz como sistema de ensayo	
1.3.4.3. Indicadores de daño	
1.3.4.4. Parámetros	
1.3.5. Análisis de daño	
1.3.5.1. Toxicidad mitótica, Clastogenicidad y Aneugenicidad	
1.3.5.2. Daño oxidativo y disrupción microtubular	
1.4. Imidazoles	71
1.4.1. Metronidazol	
1.4.2. Tiabendazol	

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. ObjetivoGeneral	83
2.2. Objetivos específicos	
2.3. Hipótesis	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	86
3.1.1. Bulbos de <i>Allium cepa</i>	
3.1.1.1. Procedencia de los bulbos	
3.1.1.2. Conservación del material	
3.1.2. Químicos evaluados	
3.1.2.1. Solvente	
3.1.2.2. Control negativo	
3.1.2.3. Control positivo	
3.1.3. Colorantes para cromosomas	
3.1.4. Anticuerpos antitubulina	
3.1.5. Reactivos para medición de daño oxidativo	
3.1.6. Fijadores	
3.1.7. Tampones	
3.2. Métodos	92
3.2.1. Cultivo de bulbos de <i>Allium cepa</i> Valcatorce	
3.2.1.1. Condiciones de cultivo	
3.2.1.2. Temperatura y pH	
3.2.1.3. Luz	
3.2.2. Acondicionamiento y exposición de los bulbos	
3.2.3. Preparación de las soluciones (muestras y controles).	
3.2.4. Determinación de la disponibilidad de oxígeno	
3.2.5. Determinación de la duración del ciclo celular	

- 3.2.6. Evaluación de toxicidad.
 - 3.2.6.1. Medición de las longitudes de las raíces
- 3.2.7. Evaluación de genotoxicidad
 - 3.2.7.1. Obtención de preparados
 - 3.2.7.2. Determinación del índice mitótico
 - 3.2.7.3. Determinación de la frecuencia de micronúcleos
 - 3.2.7.4. Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas
- 3.2.8. Análisis de daño microtubular en células expuestas a TBZ
 - 3.2.8.1. Obtención de los preparados
 - 3.2.8.2. Inmunolocalización de tubulinas
 - 3.2.8.3. Determinación del daño microtubular
- 3.2.9. Respuesta al daño oxidativo en células expuestas a MTZ.
 - 3.2.9.1. Obtención de los homogenatos
 - 3.2.9.2. Determinación de indicadores de daño oxidativo no enzimáticos.
 - 3.2.9.3. Determinación de indicadores de daño oxidativo enzimáticos.
- 3.2.10. Análisis estadístico de los datos

4. RESULTADOS

- 4.1. Caracterización del ciclo celular 111
 - 4.1.1. Marcación de las células
 - 4.1.2. Estimación de la duración del ciclo celular
- 4.2. Determinación de las concentraciones de oxígeno en los medios de cultivo con y sin aireación116
- 4.3. Toxicidad y genotoxicidad por exposición a Metronidazol(MTZ).....119.
 - 4.3.1. Toxicidad
 - 4.3.2. Genotoxicidad

Daño oxidativo y repuesta antioxidante en células expuestas a MTZ

4.4. Toxicidad y genotoxicidad por exposición a Tiabendazol (TBZ)-----	128
4.4.1. Toxicidad	
4.4.2. Genotoxicidad	
4.4.3. Puesta a punto para la evaluación del daño microtubular en células de <i>A. cepa</i> expuestas a TBZ.	
4.4.3.1. Respuesta de <i>A. cepa</i> a la exposición del disruptormicrotubularAzzurro.	
4.4.3.2. Respuesta de <i>A. cepa</i> a la exposición del disruptormicrotubularGriseofulvina.	
4.4.4. Disrupción microtubular por exposición a TBZ	
5. DISCUSIÓN	
5.1. Fuentes de variabilidad en el ensayo de <i>Allium cepa</i>	160
5.1.1. Parámetros de evaluación genotóxica	
5.1.2. Tiempo de duración del ciclo celular en <i>A. cepa</i> Valcatorce	
5.1.3. Influencia del oxígeno en la división celular de las células de <i>A. cepa</i>	
5.2 Toxicidad y genotoxicidad del MTZ vinculado al daño oxidativo y la respuesta antioxidante	164
5.3 Toxicidad y genotoxicidad del TBZ vinculado con el daño microtubular ...	169
5.3.1. Toxicidad y genotoxicidad	
5.3.2. Daño microtubular por exposición a TBZ	
6. CONCLUSIONES	183
7. BIBLIOGRAFÍA	185

I N T R O D U C C I Ó N

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Toxicología

1.1.1. Antecedentes históricos y Generalidades

Los efectos de la interacción de las sustancias químicas con los organismos, es conocido mucho antes del desarrollo alcanzado por la ciencia actual. Históricamente, los venenos han sido utilizados para distintos fines. Existen indicios que ilustrarían que el hombre prehistórico ya conocía las propiedades tóxicas de algunas plantas y las empleaba en la caza de animales impregnando las puntas sus flechas. En el papiro de Ebers (Egipto, 1500 AC) se hallaron las primeras recetas de venenos. Aristóteles (384-322) menciona el uso de venenos de serpientes y Estrabón, el de peces (63-20) Se sabe que Hipócrates (400 AC) contaba con conocimientos de toxicología. Dioscórides (Siglo I), cita el uso del tejo y el eléboro, con efectos tetanizantes e hipotensores, el último también usado por los castellanos con el nombre de “yerba de las ballestas”. Maimónides (1135-1204) escribió un tratado llamado “Los venenos y sus antídotos”.

Actualmente, los bosquimanos de África siguen utilizando para impregnar las puntas de flecha, mezclas de *Amaryllis distichia*, varias especies de *Euphorbium*, y *Aconcanthera* y algunos pueblos utilizan veneno de serpiente o araña. Otras tribus africanas emplean desde hace tiempo semillas de *Stophantus hispídis* y *Stophantus kombe*. Paracelsus (1493-1541) aportó las primeras bases científicas de

la toxicología diferenciando entre propiedades terapéuticas y tóxicas. A partir de esta distinción, surge el concepto de “dosis” como factor determinante para ejercer la acción tóxica (Repetto Jiménez, 2009).

La toxicología estudia los efectos adversos de las sustancias químicas sobre los organismos (Eaton & Klaassen, 2001). Una definición más amplia establece que es la ciencia que se dedica al estudio de la interacción entre agentes químicos y sistemas biológicos, con el objetivo de determinar cuantitativamente, el potencial que tienen los agentes químicos para producir daños en organismos vivos (Ballantyne, 1999). Esta disciplina se ha desarrollado exponencialmente durante los siglos XIX y XX acompañando el incremento de la producción de drogas de uso terapéutico, cosmético, y alimentario, así como pesticidas y agentes químicos industriales. Dicho desarrollo determinó la inclusión de otras disciplinas que realizaron sus aportes en materia de información, diseños de investigación y métodos, como la biología, medicina, epidemiología, química, física y matemática.

Actualmente, el campo de interés de los toxicólogos incluye áreas como la salud pública y ocupacional, la aplicación en clínica humana y veterinaria, así como en agricultura e industria. La toxicología moderna busca establecer el riesgo de la exposición de los individuos, su relación con distintos agentes posibles como ser los agentes químicos y definir límites de tolerancia. Para esto es necesario conocer la naturaleza de la exposición química y su efecto biológico. El desarrollo de la toxicología molecular contribuyó significativamente con la comprensión de los mecanismos involucrados en los efectos adversos de los sistemas biológicos (Gallo, 2001).

Para unificar criterios de interpretación, el vocabulario en uso es fundamental y por esta razón se detallan ciertos conceptos y expresiones. Se toma como una exposición, la situación en la cual un agente puede incidir sobre una población, organismo, órgano, tejido o célula en determinadas concentraciones o dosis, durante un determinado tiempo. La dosis se define como la cantidad de xenobiótico que ingresa al organismo expresada en unidad del xenobiótico /peso corporal. La concentración del xenobiótico es la cantidad de sustancia aplicada en el medio, expresada como unidad de peso o volumen / volumen del medio, la que se conoce también como dosis de exposición. La dosis absorbida es la cantidad presente en el cuerpo en un determinado momento mientras que la dosis tisular es la dosis en un tejido determinado. El concepto de dosis suele incorporar el elemento temporal que cobra importancia para comprender los efectos de las exposiciones crónicas ya sean reiteradas o continuas y las agudas que se producen una única vez. Ambas están asociadas a efectos crónicos y agudos respectivamente. Cuando un organismo se expone a dos o más agentes tóxicos pueden producirse efectos variados, un efecto aditivo tiene lugar cuando el efecto total de la combinación de los agentes es igual a la suma de los efectos individuales, en cambio cuando resulta más tóxico es un efecto sinérgico. Por el contrario, cuando la toxicidad es menor el efecto es antagónico. La potenciación ocurre cuando una sustancia no tóxica aumenta la toxicidad de otro químico cuando se administran simultáneamente (Eaton & Kleaasen, 2001).

El efecto de la exposición a un agente tóxico es observable a nivel de individuo y es referido como relación dosis efecto o concentración efecto. La

respuesta está referida al porcentaje de la población en la que se observa un mismo efecto.

La eliminación de una sustancia ocurre ya sea por excreción o transformación y así ésta deja de estar presente en el organismo. Cada sustancia presenta un valor de vida media en cada tipo de organismo, que se caracteriza por una curva concentración-tiempo dentro de dicho organismo. La vida media biológica (o vida media) de una sustancia dada es el tiempo que se necesita, a partir del momento en que cesa la exposición, para reducir a la mitad la cantidad de dicha sustancia presente en el organismo. La biodisponibilidad es la fracción de una dosis administrada que entra en la circulación sistémica y depende de la velocidad de eliminación. La eliminación se puede dar antes de ingresar al sistema por transformación previa. Una vez que ingresa al organismo, la eliminación dependerá de la biotransformación de Fase 1 (Holmberg et al., 2001). Cuando un xenobiótico ingresa a un sistema biológico puede seguir varios caminos. Uno es el que se elimine sin sufrir transformación, otro es que se lleve a cabo un proceso de biotransformación. En este caso las transformaciones facilitan su eliminación o llevan a modificaciones estructurales que aumentan, disminuyen o cambian su actividad tóxica lo que determina que exista una relación compleja entre biotransformación y toxicidad, La biotransformación de xenobióticos impide que éste se acumule en el organismo, sin embargo se puede producir bioactivación o activación metabólica, es decir formación de productos intermedios más tóxicos que la sustancia de origen. Contrariamente, se puede producir la desactivación metabólica cuando el metabolito es menos reactivo que el xenobiótico de origen (Holmberg et al., 2001).

En la biotransformación, dependiendo de las características estructurales de la sustancia se pueden considerar distintas fases que según Williams (1969) constituyen dos grupos:

Fase 1 o de primer paso: son biotransformaciones que aumentan la solubilidad del tóxico mediante la introducción de grupos polares como OH⁻, NH₂, COOH o SH, que además de ser más reactivos, facilitan el paso a la Fase 2. En general consisten en reacciones de hidrólisis, oxidación y reducción, catalizadas por enzimas.

Fase 2 o segundo paso: La biotransformación de xenobióticos puede estar precedida o no por la biotransformación en la Fase 1. Las reacciones involucradas incluyen, conjugación; en las que grupos reactivos (oxidrilos, amino, carboxilo, epóxidos, halogenuro, por citar algunos) del xenobiótico se unen a sustancias endógenas para originar compuestos más fácilmente eliminables. Los compuestos endógenos son iones ácidos como el glucuronato, sulfato, acetato, y diversos tipos de aminoácidos, además del glutatión, también se producen reacciones de alquilación, preferentemente metilación en átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre presentes en el xenobiótico. Las conjugaciones son reacciones que consumen energía, lo que exige que uno de sus reactivos sea activado con el consumo de ATP, requiriendo la acción de enzimas transferasas.

Hemos visto entonces que la toxicología analiza los mecanismos de acción de todos los agentes, en particular en lo que a agentes químicos se refiera, tanto de los naturales como de los manufacturados por el hombre, considerando los rangos de exposición cuando se encuentra como componente ambiental o por exposición durante las actividades de síntesis, producción industrial, transporte,

uso y disposición.

1.1.2. Toxicología ambiental

La perturbación ambiental producida por el desarrollo humano comenzó a tener relevancia en el momento en que la magnitud de la misma superó la capacidad de los procesos naturales para asimilarla. El crecimiento poblacional de la segunda mitad del siglo XX se caracterizó por la tendencia hacia el gigantismo urbano. Se estima que en el período de 1950 a 1975 las poblaciones con más de 5 millones de habitantes duplicaron su participación en la población urbana total (Bramwel, 1977). Si consideramos que la densidad poblacional mundial es de 20 habitantes por km² y que la densidad urbana presenta más de 2 órdenes de magnitud, es comprensible que los problemas ambientales estén asociados al suministro de agua y alimentos, la generación de desperdicios y la necesidad de viviendas y transporte.

Los impactos ambientales causados por la urbanización, se reducen a la magnitud y concentración del uso de recursos y la de los desechos generados. El comienzo de la industrialización en el siglo XIX, trajo aparejado una búsqueda de mejores condiciones de vida que de la mano con los avances científicos y tecnológicos, incrementó y complejizó el impacto ambiental como consecuencia de los cambios en la dinámica natural de la materia en los ciclos biogeoquímicos y el contacto de los organismos con nuevas sustancias químicas.

El objetivo principal de la toxicología ambiental es evaluar los impactos que produce la exposición de la población a los tóxicos ambientales presentes en un

sitio, transporte, destino y procesos de transformación en el medio abiótico (Bordeau et al., 1989). La toxicología ambiental abarca tanto el estudio de los efectos tóxicos de los xenobióticos sobre los ecosistemas como la presencia en el ambiente humano y el origen ambiental de las enfermedades, es decir que considera tanto las poblaciones humanas como la biota (Peña et al., 2001) y se propone producir conocimientos que permitan predecir los riesgos de las poblaciones humanas ante la exposición a condiciones de vida dadas por el ambiente que a su vez es consecuencia del triángulo naturaleza-cultura-política. El conocimiento y caracterización de enfermedades humanas y la relación con la exposición a nuevas sustancias que se incorporan a la vida diaria y las mezclas complejas mencionadas, han dado lugar a la necesidad de establecer los niveles de riesgo a estas exposiciones. Los medicamentos, los residuos de biocidas utilizados en la producción agrícola y los aditivos alimentarios, son fuentes de exposición directa en las personas, mientras que las mezclas ambientales complejas presentan un carácter de exposición indirecta y accidental. En este contexto, la toxicología ambiental adquiere relevancia, debido fundamentalmente a 3 causas:

- La considerable expansión industrial y los residuos generados por los procesos.
- El desarrollo de las ramas de la química industrial, del plástico, de las resinas, alimentaria, farmacéutica, agrícola y nuclear responsables de la presencia en el medio de nuevas sustancias.
- El reconocimiento de los riesgos de la exposición de las personas, por exposición laboral y ambiental, a los tóxicos industriales.

La contaminación ambiental es considerada como la presencia o introducción de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dicho sustratos, por un tiempo suficiente, y bajo condiciones tales, que esas sustancias interfieren con la salud y el confort de las personas, dañando los recursos naturales o alterando el equilibrio ecológico de la zona (Albert, 1997).

Los contaminantes ambientales se presentan en los ecosistemas como mezclas complejas, de difícil caracterización, tratamiento y disposición final. El análisis de estas mezclas incluye técnicas cuali-cuantitativas para conocer su composición, así como estudios en organismos modelo para establecer la toxicidad. Sin embargo, los datos de las sustancias individuales no son suficientes para conocer el efecto de la mezcla sobre los seres vivos y los ecosistemas. Así surge la necesidad de estudiar el efecto tóxico de las mezclas sobre organismos modelo y la dinámica de los contaminantes en los sistemas biológicos.

1.1.3. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos conocidos como bioensayos se basan en metodologías para determinar el efecto de agentes físicos, químicos u otros sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales controladas. Los bioensayos fueron desarrollados con la aplicación de diferentes pruebas en el campo de la toxicología acuática y terrestre (Hoffman et al., 1995) Estas pruebas consideran diferentes tiempos de exposición y diferentes especies y estadíos del ciclo de vida. La medida de la toxicidad se establece a partir de efectos

observables, denominados puntos finales (del inglés “*end points*”). Estos efectos se pueden establecer en diferentes niveles de organización biológica, desde el subcelular o molecular, hasta el de organismos completos, poblaciones o comunidades. Es así que se incluye el estudio de procesos como muerte, crecimiento, comportamiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, genéticos, cromosómicos, fisiológicos o histológicos. Los bioensayos se realizan sobre diferentes matrices como agua, suelo, sedimentos, elutriados, o sustancias con diferente grado de solubilidad en agua. A partir de la cuantificación de los efectos se obtienen los parámetros que permiten por medio de pruebas estadísticas establecer la toxicidad de la muestra evaluada. Por lo tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto adverso sobre un sistema biológico y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo (Ronco et al, 2004). La toxicidad también es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico y los resultados de los bioensayos se vinculan a los organismos utilizados como modelo de prueba. Cabe considerar en este contexto que los ensayos biológicos no reproducen la realidad de una exposición en condiciones naturales.

Los test de toxicidad que se basan en bioensayos son experimentos que permiten estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material mediante la reacción de la materia viva. Los bioensayos son útiles para detectar efectos potencialmente tóxicos en organismos e identificar los agentes que causan el efecto adverso. Estos experimentos presentan requerimientos de validación: deben estar aceptados por la comunidad científica, presentar sustento estadístico, ser

cuantificables, predictivos, reproducibles, robustos, realizables, económicos sensibles y útiles para las evaluaciones de riesgo.

Según el tiempo de exposición los bioensayos se clasifican en:

Agudos: el tiempo de exposición es corto en relación con el ciclo biológico evaluado. Crónicos: el tiempo de exposición es prolongado y abarca un ciclo de vida completo o una etapa de desarrollo completa.

Subcrónico: se focaliza en etapas más sensibles del ciclo de vida del organismo expuesto y en evaluación.

Los efectos pueden ser letales o subletales. En el primer caso se aplican pruebas de supervivencia. En las pruebas aplicadas para analizar efectos subletales se utilizan niveles de distinta complejidad, desde tejidos hasta ecosistemas. El tiempo de exposición es variable y los “*end points*” están constituidos por parámetros bioquímicos, genéticos, morfológicos o comportamentales.

En el marco de la evaluación de contaminación ambiental, la realización de un bioensayo presenta al menos 3 abordajes básicos: en condiciones controladas en el laboratorio; sobre ecosistemas experimentales y sobre ecosistemas naturales. En cuanto a las especies utilizadas, los bioensayos pueden ser “uniespecíficos” en los que se obtiene información sobre el efecto dosis/ concentración y respuesta, se realizan en laboratorio y los resultados no son extrapolables a otras especies. Multiespecíficos cuando evalúan los cambios estructurales y funcionales de un meso o microcosmos. Los ensayos uniespecíficos presentan metodologías más sencillas, sin conocimientos de taxonomía y son más estandarizables. Como

contrapartida, no reflejan el efecto a nivel ecosistema y no son extrapolables a otras especies ya que las sensibilidades son diferentes para los distintos taxa. Los multiespecíficos reproducen el efecto sobre la comunidad y presentan mayor aplicación ecológica y aunque no se debe extrapolar sin restricciones, si bien presentan una evaluación acotada, ésta es más realista. Las metodologías de evaluación son más complejas que las utilizadas en los bioensayos uniespecíficos y requieren conocimiento taxonómico, son difíciles de reproducir y la evaluación requiere procedimientos de estadística multivariada.

El diseño de un bioensayo debe contemplar aspectos tales como:

Controles adecuados. El control negativo es imprescindible y en el caso de bioensayos de laboratorio debe ser un medio de exposición libre del xenobiótico analizado y de otros que interfieran en la comparación de los efectos causados por éste. En general se utiliza agua con elementos básicos que permitan el crecimiento adecuado de los organismos expuestos. En el caso de un monitoreo de sitios potencialmente contaminados un blanco puede ser un sitio de muestreo que fehacientemente se sabe que no presenta contaminación.

Otro tipo de controles son el control positivo, en el que se utiliza un agente de acción conocida que permita verificar la respuesta del organismo de prueba. Este control no es imprescindible en todos los casos. Se utiliza en el proceso de validación de un bioensayo para analizar la sensibilidad de un organismo de prueba. Otros casos en los que el control positivo es necesario, es cuando se utilizan metodologías que pueden mostrar datos falsos negativos por cuestiones técnicas. Algunos controles positivos utilizados en toxicología son: Dodecil Sulfato

de Sodio; clorofenol; Fenol, Cloruro de Cadmio; Dicromato de potasio; Cloruro de potasio, Cloruro de sodio; Nitrato de plata; Cloruro de Zinc; Sulfato de Zinc, Para evaluación de efectos genotóxicos pueden incluirse Beomicina; Ciclofosfamida, Metilmetanosulfonato y Griseofulvina

El control solvente se utiliza cuando es necesario utilizar un vehiculizante en el caso que la sustancia a evaluar sea poco soluble o insoluble en agua. Para seleccionar la concentración del solvente utilizada como control positivo se aplica la concentración más alta utilizada en la dilución de la sustancia a evaluar.

Los solventes más utilizados son: Formamida; Acetona; Dimetil sulfóxido; Trietilen glicol.

La elección de organismos de prueba para las aplicaciones de los bioensayos siguen los siguientes criterios:

- Amplio rango de sensibilidad
- Disponibilidad o amplio rango de distribución y Abundancia.
- Factibilidad de mantenimiento en el laboratorio
- Factibilidad de uso
- Conocimiento de la biología del organismo
- Todos los organismos de prueba deben provenir de la misma fuente ya sea de origen comercial o de sitios no contaminados.

1.2. Genética toxicológica

La *genética toxicológica* es la rama de la toxicología que analiza los efectos de los agentes químicos y físicos sobre el material hereditario y sobre los procesos de la genética de las células (Preston & Hoffman, 2001). Es un área de conocimiento que se ocupa del estudio del efecto mutagénico que pueden producir los agentes químicos, físicos, biológicos u otros sobre los organismos en general (Carballo, 2006). Se denominan agentes mutagénicos a aquellos capaces de interactuar con la cadena de ADN y producir cambios en su secuencia de bases. Los agentes llamados genotóxicos incluyen a los antes mencionados y también a aquellos que inducen cambios en cualquier proceso relacionado con la transmisión de la información genética.

1.2.1 Antecedentes y generalidades

Los primeros estudios realizados sobre mutagénesis inducida datan del año 1927 con los trabajos de Müller sobre las mutaciones causadas por rayos X en *Drosophila* capaces de producir rearrreglos lineales en el orden de los genes. Estos experimentos llevaron a una rápida proliferación en estudios sobre el conocimiento de la acción de los agentes mutagénicos y nuevas teorías, métodos y postulados que dieron origen a la genética toxicológica. Stadler (1928) demostró que las mutaciones podían ser inducidas en cebada usando rayos X y radio, en 1938 Sax, publicó los efectos de los rayos X sobre los cromosomas de *Drosophila* y

Tradescantia y en 1940, sugirió que la rotura cromosómica da origen a la formación de las aberraciones cromosómicas sin tener conocimiento alguno sobre la arquitectura molecular del cromosoma eucariótico. Sax también demostró el incremento lineal de aberraciones con respecto a la dosis del agente aplicado. Posteriormente Lea y Catcheside en 1945 y 1946, mostraron que la energía de la radiación determina la frecuencia de aberraciones cromosómicas, al observar que la radiación de baja energía presentaba un efecto débil sobre los cromosomas de *Tradescantia*.

En 1941, Auerbach y Robson estudiaron el efecto del gas mostaza utilizado durante la 2º Guerra mundial en Reino Unido y observaron que los daños dermatológicos eran iguales a los producidos por las radiaciones. Estos estudios, encontraron que este compuesto tenía efectos deletéreos en *Drosophila*.

En la década del 40' la mutagénesis química era un tema de interés y desarrollo en el área de la genética, debido a la demostración del efecto mutagénico de compuestos como el uretano, óxido de etileno, dietil sulfato, entre otros (Allen et al, 1986). En la década del 60' Cattnach y Russell, demostraron en mamíferos cambios genéticos por efecto de la radiación y agentes químicos. Estos trabajos promovieron la idea de que algunas enfermedades hereditarias podrían ser inducidas por el ambiente.

La citogenética humana nace con el hallazgo del número cromosómico en las células humanas, por Tjio y Levan in 1956 y la confirmación de la presencia de 23 cromosomas bivalentes en meiosis por Ford y Hamerton en el mismo año. El desarrollo de técnicas de extendidos cromosómicos descripta por Hsu en 1952 hizo posible la observación de cromosomas humanos y al estudio de ciertos

síndromes de origen genético con compromiso cromosómico.

En la década de 1960 el desarrollo de la citogenética humana dio cuenta de la existencia de desórdenes cromosómicos responsables de patologías tales como anomalías congénitas, retardo mental, abortos espontáneos y neoplasias. Concomitantemente, surgió la preocupación desde la toxicología por los efectos de la exposición humana a nuevos agentes químicos que se originaban como consecuencia del desarrollo industrial, innovación en la síntesis y aplicación de nuevos compuestos en los quehaceres de la vida diaria.

En 1959, se describieron las anormalidades citogenéticas para caracterizar y diagnosticar el síndrome de Down (Lejeune et al., 1959), Klinefelter (Jacob et al., 1959) y Turner (Ford et al., 1959). Un año más tarde se describió un cromosoma de tamaño pequeño, al que llamaron "Filadelfia" atribuyéndole a la leucemia mieloide crónica este cromosoma marcador y por ello de valor diagnóstico en la patología hematológica, hecho que dio origen a la citogenética del cáncer (Nowell y Hungerford, 1960).

En el año 1960 aparece la primera publicación sobre aberraciones cromosómicas caracterizadas en el hombre y atribuidas a la radiación (Tough et al., 1960). En ella se describen aberraciones cromosómicas (AC) en sangre de individuos que habían recibido radioterapia para el tratamiento de espondilitis anquilosante. Más tarde otros autores describieron efectos similares en cromosomas humanos inducidos por radiación ionizante (Stewart et al., 1960; Bender y Gooch, 1962; Conen et al., 1963; Bender y Gooch., 1963; Bloom y Tjio,

1964; Court-Brown et al., 1965; Boyd et al., 1966) y se realizaron numerosos estudios sobre personas que estuvieron expuestas a radiación masiva como el caso de los sobrevivientes de Hiroshima y Nagasaki. (Awa et al., 1968; Sofuni et al., 1978).

Hamper y Ellison en 1961, descubrieron las AC inducidas por virus y Conen and Lansky describieron AC en linfocitos de individuos tratados con nitrógeno mostaza. Un año más tarde se describió la presencia de AC en pacientes que recibían tratamiento con citostáticos. (Arrighi et al., 1962). Siguiendo esa línea de trabajo otros citostáticos y drogas antineoplásicas fueron evaluadas en cuanto a caracterizar su potencial mutágeno con resultados positivos para arabinosina, azatioprina, metotrexato, y 6- mercaptopurina. (Bischoff y Holtzer, 1965; Jensen 1967). Otros trabajos reportan genotoxicidad de amsacrina y carboplatino (Larripa et al., 1984; González Cid et al., 1995). También se estudiaron antibióticos que actúan sobre la replicación de DNA como el streptonigrina o daunomicina (Cohen et al, 1963; Vig et al., 1968). La genética toxicológica se expandió y se comenzó con estudios de grupos de trabajadores de la industria química. Los primeros trabajos fueron publicados sobre el estudio de los efectos mutagénicos del benceno (Pollini y Colombi, 1964; Vigliani y Saita 1964). Los análisis en trabajadores de la industria plástica tuvieron relevancia ya que se demostró que el cloruro de vinilo es un potente agente mutagénico y carcinogénico (Ducatman et al., 1975; Funes-Cravioto et al., 1975).

Al final de la década del 60 el listado de agentes químicos mutagénicos incluía más de 200 sustancias capaces de inducir AC en humanos (Auerbach 1967;

Evans, 1970, Shaw, 1970). En ese momento se propuso el término clastogénico en referencia a los agentes capaces de causar AC. Otro hallazgo importante en la historia de la mutagénesis inducida fue comprobar que algunos agentes son capaces de alterar el proceso de segregación con el subsecuente desbalance cromosómico en la progenie de los sujetos expuestos a dichos mutágenos. En 1932, Patterson fue el primero en relacionar la segregación cromosómica anormal con la exposición a rayos X en hembras de *Drosophila*.

En la década de los 60s se estableció la relación entre agentes mutagénicos, en particular radiación ionizante, con anormalidades cromosómicas causadas por no disyunción en niños recién nacidos dando lugar a la primera publicación sobre un estudio epidemiológico prospectivo y retrospectivo realizado por Uchida y Curtis in 1961, revisado en 1979. Experimentalmente este proceso fue demostrado *in vitro* analizando mitosis en humanos (Uchida et al., 1975) e *in vivo*, en mitosis de ratón (Uchida y Lee, 1974). Dada la importancia del tratamiento de la genotoxicología y la citogenética asociadas en término de grupos de trabajo y publicaciones, es que en 1964, nace la revista *Journal Mutation Research* . en 1969 se crea la *Environmental Mutagen Society* en EEUU y en 1970 la *European Environmental Mutagen Society (EEMS)* .

Las investigaciones desarrolladas entre los años 1953 y 1968, sobre los mecanismos de replicación del ADN, su estructura, el código genético, la síntesis proteica y los mecanismos de reparación aportaron una importante base conceptual que sentaron los pilares teóricos y alcances de la genética toxicológica (Brusik, 1980). En 1962 Joshua Lederberg propuso la realización de ensayos de

mutagénesis que permitieran detectar el potencial mutagénico de las sustancias químicas. Estas pruebas se deberían sumar a las pruebas toxicológicas previas a la comercialización masiva de toda sustancia química que saliera al mercado del consumo, como medida protectora. Esta medida fue adoptada por muchos países desarrollados y dio lugar a la necesidad de estandarizar los métodos de ensayo e investigar nuevos modelos de prueba.

La *genética toxicológica* es reconocida como disciplina en el año 1969. La Sociedad de Mutagénesis Ambiental (del inglés “Environmental Mutagen Society” “EMS”) fue fundada por Alexander Hollaender y otros genetistas que decidieron dedicarse al estudio de los efectos mutagénicos relacionados con agentes físicos, químicos y biológicos y las consecuencias sobre los seres vivos expuestos a los mismos. Los avances en genética molecular, tanto desde el punto de vista conceptual como metodológico, permitieron comprender los mecanismos que establecieron una correlación entre mutagénesis y carcinogénesis. Si bien tal relación fue difícil de demostrar al comienzo de su surgimiento, la identificación de oncogenes en el genoma de mamíferos y la presencia de mutaciones en formas activadas confirmaron esa relación.

La *genética toxicológica* se ha constituido en una disciplina, que busca implementar y regular pruebas de evaluación de riesgo e indagar acerca de los mecanismos involucrados en la carcinogenicidad asociada a ciertas sustancias químicas, permitiendo establecer un riesgo potencial a través de ensayos de genotoxicidad. En conclusión, la genética toxicológica surge de la mano del avance de los conocimientos en genética y del interés por caracterizar el impacto

ambiental antropogénico. La genética toxicológica emplea un vocabulario que si bien toma conceptos de la genética y de la toxicología, en sus aplicaciones posee una interpretación propia, es decir, que esta disciplina tiene carácter transdisciplinario. Los alcances son más amplios que las dos disciplinas aisladas y las metodologías y protocolos de análisis que se emplean son propios, al igual que el marco teórico y las conclusiones que elabora en base a sus hallazgos y análisis posteriores.

1.2.2. Mutagenicidad

Las bases biológicas de la herencia se basan en la distribución del material genético, de manera que las células hijas portan la misma información que las células progenitoras. Cuando la fidelidad de la información se ve afectada, es entonces cuando se producen las mutaciones. Cuando las células portadoras de la mutación proliferan por mitosis, dan lugar a un clon de células mutantes. Si estos cambios son perjudiciales para la célula, es posible que den origen a un fenotipo disfuncional. Se entiende por mutación todo cambio heredable en el ADN no generado por recombinación genética. Las mutaciones son la materia prima de la evolución y el origen de las formas alélicas de los genes. El término abarca los cambios a nivel de los genes o mutaciones génicas y modificaciones a nivel de los cromosomas llamadas aberraciones cromosómicas o mutaciones cromosómicas. Mutaciones que involucran conjuntos (del inglés "set") completos de cromosomas se denominan mutaciones genómicas. Las mutaciones espontáneas se originan por cambios que se producen en la molécula de ADN como consecuencia de alteraciones en la replicación celular. En la inducción de este tipo de mutaciones

juega un rol preponderante la tautomería de las bases nitrogenadas que, al modificar de manera espontánea su estructura química, pueden originar uniones ilegítimas G-T o A-C produciendo transiciones o transversiones en el ADN. Se entiende por transiciones la sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra en la molécula de ADN. En las transversiones, en cambio, se sustituyen purinas por pirimidinas o viceversa. Durante la duplicación del ADN pueden surgir fenómenos conformacionales (en inglés “*looping out*”) que inducen errores en la lectura de la hebra de ADN patrón provocando inserciones o deleciones de bases nitrogenadas. Este tipo de modificaciones puede tener efectos drásticos a nivel genético ya que se modifica el marco de lectura de la información determinando una incorrecta inserción de aminoácidos a nivel traduccional e incluso la temprana interrupción de la cadena polipeptídica por la lectura de un triplete de terminación anormal.

Las mutaciones espontáneas pueden también resultar de procesos de desaminación o depurinación en el ADN que cambian el patrón de apareamiento de bases, en el primer caso o que favorecen la incorporación de bases incorrectas, en el segundo.

Los agentes inductores de mutaciones se pueden globalmente dividir en: a) análogos de bases nitrogenadas; b) agentes modificadores de bases nitrogenadas; c) agentes alquilantes; d) agentes intercalantes; e) radiaciones y partículas ionizantes (alfa, beta, gamma, neutrones); f) radiaciones no ionizantes (UV); g) agentes químicos (con diferente mecanismo de acción que a-d y; h) agentes biológicos (procariontes, eucariontes unicelulares o multicelulares parásitos); i) otros agentes (virus, transposones). Los análogos de base (5- bromo-uracilo; 2-aminopurina) inducen mutaciones debido a que presentan cambios tautoméricos

con una mayor frecuencia que las bases nitrogenadas normales. Los agentes modificadores (ácido nitroso, hidroxilamina) cambian la estructura química de las bases nitrogenadas mediante procesos de desaminación, hidroxilación, entre otros. Los agentes alquilantes introducen grupos metilo o etilo en las bases del ADN. El efecto mutagénico de los agentes modificadores y alquilantes se produce como consecuencia del cambio del patrón de apareamiento de bases. Los agentes intercalantes son moléculas planas que se introducen entre los pares de bases distorsionando la copia complementaria de bases durante la replicación generando inserciones y deleciones de bases. Las radiaciones ionizantes inducen diferentes tipos de alteraciones en el ADN que incluyen: rupturas de cadena simple y doble, daño de bases y puentes ADN-proteína. La radiación ultravioleta origina dímeros de pirimidina y 6-4 fotoproductos intra e intercatenarios. Finalmente, los agentes biológicos y otros tales como virus y transposones, producen en general cambios macromoleculares e implican la inserción o reubicación de segmentos considerables de ADN en el material hereditario.

Ya sean de tipo espontáneo o inducido, los cambios en las bases nitrogenadas pueden producir los siguientes tipos de mutaciones: a) sin sentido, generando codones de terminación (UAA, UAG o UGA); b) con sentido, donde se sustituye un aminoácido por otro diferente; c) neutrales, en las cuales se sustituye un aminoácido por otro similar; d) silenciosas, donde no existe cambio de aminoácido por originarse un codón sinónimo; y e) "*readthrough*" en las cuales se produce el cambio de un triplete de terminación por otro con sentido (en este caso se originan cadenas polipeptídicas de mayor longitud que lo normal).

Es interesante destacar que existen mutaciones supresoras que compensan el efecto deletéreo de mutaciones inducidas previamente. Se conocen tres tipos de mutaciones supresoras: a) intracodón: la 2ª mutación ocurre en el mismo codón que la mutación original; b) intragénica: la mutación supresora se localiza en otro triplete codificante del mismo gen; y c) intergénica: la 2ª mutación surge en un gen de ARNt que permite la lectura del codón mutado (habitualmente un codón de terminación). Las mutaciones dinámicas son las responsables de un conjunto de alteraciones que en el ser humano, se caracterizan por amplificación anormal de trinucleótidos (CAG, CGG, GCC, CTG o GAA, de acuerdo a la enfermedad). A partir de un estado inicial de portador con amplificación moderada de los trinucleótidos se alcanza una expansión anormal de los mismos en las generaciones siguientes que da origen a enfermedades. Existen mutaciones que por sus características se pueden denominar somáticas (no se transmiten a la descendencia) o gaméticas (se transmiten a la prole) y de tipo autosómico dominante o recesivo o ligado al cromosoma X, morfológicas, nutricionales, condicionales (por ejemplo sensibles a la temperatura), letales y comportamentales, entre otras.

Cuando las mutaciones se producen en células germinales pueden dar origen a malformaciones o disfunciones al nacimiento del nuevo individuo al que dieron origen, enfermedades genéticas o abortos espontáneos. Cuando, en cambio se producen en células somáticas, el riesgo se asocia a enfermedades degenerativas y cáncer. La relación causal entre mutaciones y carcinogénesis fue establecida en 1980 y 1990 por diferentes hallazgos:

- La presencia de cambios cromosómicos en leucemias y tumores sólidos (Kallioniemi et al, 1992; El-Naggar et al., 1999; Albertson, 2003)

- La inducción de mutaciones *in vitro* e *in vivo* en animales por agentes de conocida acción carcinogénica (Barbacid, 1986; Guerrero, 1987)
- Procesos de carcinogénesis experimental *in vivo* que se caracterizan por mutaciones y cambios epigenéticos, en particular en cáncer de hígado y piel en rata y ratón. (Herens et al., 1992; Watson y Goodman, 2002; Moggs y Orphanides, 2004)
- Demostración de la necesidad de más de una mutación para inducir cáncer de colon. (Baker, 1990; Arribas et al., 1997; Abdel-Rahman et al, 2001;)
- Propensión a desarrollar cáncer en individuos con mecanismos de reparación deficientes (Marx, 2002)
- Activación de oncogenes por mutación genética, amplificación y cambios cromosómicos estructurales. (Lengauer 1998)

Las células que sufren daños en el material genético pueden ser ineficaces al reparar las lesiones provocadas en el ADN, ya sea por deficiencia en los mecanismos de reparación o por reparaciones erróneas o incompletas. La pérdida en la integridad del ADN podría expresarse y transmitirse a la descendencia celular; lo que puede aumentar el riesgo de padecer cáncer y la posibilidad de desarrollar inestabilidad genómica o envejecimiento celular. algunos agentes genotóxicos pueden actuar sobre genes supresores de tumores, en los proto-oncogenes y en los genes involucrados en los mecanismos de reparación (Blasiak et al. 1999).

Un agente se considera **mutagénico** cuando interactúa con la secuencia de

bases del ADN provocando un cambio permanente en la misma. Estas interacciones pueden ser micromutaciones, que abarcan unas pocas bases y afectan un sólo gen e incluyen sustituciones o deleciones en la secuencia de bases. Los agentes **clastogénicos** producen macromutaciones que afectan a genes que pertenecen a un grupo de ligamiento. En este caso la mutación puede ser de origen estructural o numérico. A continuación se indican los tipos de mutaciones mencionados:

- Mutaciones génicas: las deleciones de una o más bases, las sustituciones, los cambios en el marco de lectura por inserción o deleción de bases.
- Mutaciones cromosómicas
 - Estructurales: rupturas cromosómicas, inversiones, duplicaciones y deleciones, trasposiciones e intercambios de cromátidas, fisiones y fusiones
 - Numéricas: aneuploidías, poliploidías, ganancia o pérdida de cromosomas enteros.

Los daños en el ADN producidos por efectos genotóxicos están relacionados con la inducción de mutaciones y subsecuentemente con la etiología del cáncer. Las células que sufren daños en el material genético pueden ser incapaces de reparar las lesiones provocadas en su ADN, ya sea por deficiencia en los mecanismos de reparación o por reparaciones erróneas o incompletas. Por ejemplo, algunos plaguicidas pueden actuar sobre genes supresores de tumores, en los proto-oncogenes y en los genes involucrados en los mecanismos de reparación (Blasiak et al. 1999).

La probabilidad de ocurrencia de las mutaciones se puede expresar como la tasa de mutación y es la probabilidad de ocurrencia en función del tiempo. Se expresa como N° de mutaciones por par de nucleótidos o por gen y por generación. También se puede expresar como la frecuencia indicada como el N° de mutaciones en una población de células o individuos. Un ejemplo sería el N° de mutaciones cada 1000 células o cada 100000 organismos, o cada millón de gametas. Los daños que pueden ocurrir sobre el ADN son de tipo endógeno (espontáneo) o exógeno (inducido). Una vez que el daño se produjo éste puede ser reparado o permanecer y dar lugar a una mutación al pasar por la fase S o de duplicación del ADN.

Las rupturas que se observan a nivel del ADN pueden ser producto de: (a) La acción directa de una sustancia en el material genético, (b) La activación de mecanismos de reparación en las células y (c) Los procesos normales de apoptosis, necrosis y duplicación celular.

1.2.3 Campos de aplicación e interés

La *genética toxicológica* llega a aplicar ciertas metodologías que fueron desarrolladas para otros propósitos. Un ejemplo de esto es la transferencia de tecnologías aplicadas al mejoramiento genético en plantas y animales de producción. Otro ejemplo es la implementación del test de Ames, originado a partir de las investigaciones en la síntesis bacteriana de histidina. La búsqueda del conocimiento acerca de la regulación del ciclo celular y los puntos de control del mismo, como así, las proteínas implicadas en los procesos de reparación, son la

base de ciertos desarrollos y actual campo de interés de la genética toxicológica.

La necesidad de establecer regulaciones, requiere del aporte de la toxicología para comprender los mecanismos moleculares que originan la toxicidad, así, en la práctica, se establecen nuevas disciplinas como la genética toxicológica que abarcan incluso análisis de procesos tales como teratogénesis y carcinogénesis.

Los costos financieros y éticos que conlleva la experimentación con animales a medida que aumenta el número de sustancias químicas que entran en contacto con el hombre, ha generado la necesidad de encontrar métodos de prueba que no utilicen animales y que establezcan los riesgos potenciales de los agentes involucrados (De Marini, 2001; Rodríguez Yunta, 2007). De lo anterior se desprende que los principales campos de investigación de la genética toxicológica son los siguientes:

1. Mecanismos de mutagenicidad en sistemas experimentales.
 2. Tipificación de desórdenes hereditarios.
 3. Desarrollo y aplicación de sistemas de prueba para detectar y caracterizar agentes genotóxicos.
 4. Establecimiento de los criterios para la determinación de riesgo genotóxico.
 5. Elucidación de la relación entre genotoxicidad, mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad.
- 1.3.** Estudio de los mecanismos de reparación y de la acción de agentes

antigenotóxicos o protectores.

1.4. Genotoxicidad

El concepto de *genotoxicidad* se amplía para abarcar todos los eventos relacionados con el daño que directa o indirectamente afectan al ADN (Mudry et al, 1995). Así, además de los mutágenos son considerados genotóxicos los agentes que pueden interferir en otros mecanismos vinculados a la herencia genética. Un claro ejemplo de lo anteriormente enunciado es la mala segregación de las cromátidas hermanas causada por mitosis multipolares con afectación de los centríolos, no disyunción por disrupción de la formación del huso mitótico o fallas en el anclaje cinetocoro-microtúbulo (Seoane, 2000). Estos defectos podrían producir pérdida o ganancia de cromosomas, conocidas como aneuploidías y polisomías, responsables de algunas enfermedades humanas como el síndrome de Down (trisomía del par 21), Turner (45 X0) Klinefelter (47, XXY), Patau (Trisomía par 13) y Edwards (trisomía par 18). (Lejeune et al., 1959; Jacobs y Strongl., 1959, Ford et al., 1959; Nowel y Hungerford, 1960). La caracterización de los agentes aneuploidizantes reviste interés dado que este tipo de mutaciones presenta relación con algunas formas de cáncer. (Kirsh-Volders et al, 2002),

1.3.1. Biomarcadores

Un *biomarcador* de toxicidad es una variable bioquímica, fisiológica o anatómica que al ser detectada en un organismo, pone en evidencia la presencia de un agente tóxico. La exposición a sustancias tóxicas puede dar origen a alteraciones tempranas, previas al desarrollo de una enfermedad y que podrían estar correlacionadas con efectos a largo plazo. Estos cambios tempranos pueden ser evaluados en modelos experimentales o en individuos expuestos. Estos son indicadores o marcadores biológicos que, en genética toxicológica, son elementos que permiten poner de manifiesto en los seres vivos, aspectos genéticos o celulares relacionados con la respuesta a la exposición a un dado agente.

En el marco de la toxicología ambiental, la primera Conferencia Europea de biomarcadores se llevó a cabo en 1993, (*Biomarkers of chemical exposure*, 1994). Estos marcadores son considerados como situaciones mensurables que se observan en los sistemas biológicos (*Committe on Biological Markers*, 1987; Grandjean et al., 1994) y se interpreta como un reflejo de un estado general o como la expectativa de vida de un organismo (*Committe on Biological Markers*, 1987; Hulka y Wilcosky, 1988). Los biomarcadores son útiles para: detectar una exposición; determinar consecuencias biológicas de una exposición; detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico; identificar individuos sensibles en una población; fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Los biomarcadores representan cambios en un organismos o en una célula

que pueden ser medidos según los sistemas biológicos que se estudien (NRC, 1987, 1991; Wogan, 1992). Para la elección de un biomarcador se deben considerar los siguientes aspectos: la especificidad que se basa en la información que aporta ya sea sobre el agente al que se expone el organismo o el tipo de efecto que se manifiesta, por ejemplo clastogénesis, aneugénesis, daño oxidativo, entre otros. Algunos marcadores son específicos y aportan información sobre la presencia de un agente particular; otros son generales y proveen evidencia de un efecto general producto de múltiples exposiciones (Grandjean, 1995; ATSDR,1994). La sensibilidad del biomarcador permite que el mismo responda dando información temprana de los riesgos de la exposición al agente en estudio.

En general se aceptan 3 tipos de biomarcadores, de exposición, de susceptibilidad y de efecto (*Committe on Biological Markers*. 1987; Hulka y Wilsosky, 1988;). Un biomarcador de exposición indica la presencia de una sustancia exógena, o de algún metabolito o del producto de la interacción de un agente con una molécula o célula blanco (Rutstein et al., 1983; Hulka y Wilsosky, 1988; WHO, 1993). Las mediciones son farmacocinéticas, como las concentraciones circulantes, las dosis acumuladas y la vida media del compuesto en el plasma. Un ejemplo son los aductos del ADN o de la hemoglobina que señalan la presencia de una sustancia xenobiótica y su interacción con la macromolécula (Shibutani et al, 1999). Los biomarcadores de susceptibilidad manifiestan la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a la exposición a distintos agentes. Una condición intrínseca o una enfermedad, pueden amplificar el daño sobre el tejido blanco. Un marcador biológico de efecto puede ser cualquier cambio cuantitativo que sea predictivo del daño que resulta de

la exposición a un agente exógeno.

Los biomarcadores de exposición permiten la detección temprana de la presencia de agentes tóxicos, antes que el efecto se manifieste. Los biomarcadores de efecto utilizados en genética toxicológica pueden ser evaluados a través de ensayos de corto plazo (ECP), en contraposición con los ensayos de largo plazo realizados en modelos animales que presentan la desventaja de ser prolongados y costosos. Los ECP permiten una evaluación rápida de posibles efectos mutagénicos, estos conforman una batería de ensayos con modelos de diferentes niveles. Así se desarrollaron modelos experimentales en distintos niveles de complejidad: procariontes, eucariontes unicelulares, plantas superiores y animales invertebrados o vertebrados.

Los biomarcadores utilizados en genética toxicológica son indicadores de daño genético a nivel de ADN, cromatina, así como a nivel de otros eventos relacionados con la división celular, entre ellos cabe mencionar: frecuencia de aberraciones cromosómicas (Preston et al., 1981; Eizondo et al, 1996), frecuencia de Intercambio de cromátidas hermanas (Taylor, 1958, Perry y Wolf; 1974; Cleaver 1981); frecuencia de Micronúcleos (Fenech, 2000); ruptura de simple y doble hebra por ensayo Cometa (Wogan, 1992). La inhibición en la actividad mitótica evidencia citotoxicidad (Linnainmaa et al., 1978). Los índices de fases y la cinética de proliferación celular están considerados marcadores de citotoxicidad o citostaticidad (Gonsebatt et al., 1997; Freshney, 1987).

1.3.2 Niveles de complejidad

Cuando se realiza una evaluación de la potencial actividad genotóxica de un agente es poco factible someterla a todos los ensayos de corto plazo, por lo tanto se busca establecer una batería mínima de ensayos que involucre diferentes niveles de complejidad que permitan caracterizar el agente en cuestión. Las técnicas aplicadas en la evaluación de genotoxicidad de agentes químicos no aportan por si solas la información suficiente para establecer los niveles de riesgo. Para esto es necesario implementar una batería de ensayos (Brusick, 1987). Diferentes recomendaciones de expertos y sociedades científicas en relación a las pruebas que deben constituir la mencionada batería (Bishun et al., 1973; Loprieno et al., 1974; Madle and Obe, 1980) han sido vertidas hasta el presente. Las recomendaciones para realizar una batería de pruebas consideraron diferentes variables como costo y tiempo, capacidad para detectar mutaciones puntuales y cromosómicas, potencialidad para demostrar actividad mutagénica en mamíferos, reproducibilidad y relación dosis respuesta. En 1976, Bochkov et al., recomendaron usar una bacteria con 4 pruebas a saber; microorganismos con activación metabólica, letal dominante, citogenética médula ósea de mamíferos y daño cromosómico en linfocitos humanos. En 1984 el subcomité de la Environmental Mutagenesis Society (UKEMS) del Reino Unido recomendó una batería con 5 ensayos: la prueba de mutación puntual en sistemas bacterianos, daño cromosómico en células de mamíferos *in vitro*, mutación en células de mamífero o letal recesivo en *Drosophila* y daño cromosómico en mamíferos *in vivo*, como micronúcleos en médula ósea de ratón. El cuerpo regulatorio internacional del OECD en 1981, la EPA en Estados Unidos de Norteamérica en 1982 y el EEC de la

Unión Europea, propusieron las pruebas de genotoxicidad sobre organismos y sistemas dependiendo el tipo de agente y su contacto o consumo por parte de los humanos. Más recientemente se revisaron las estrategias de los cuerpos regulatorios nacionales e internacionales concluyendo que 3 pruebas deberían ser usadas como mínimo en el monitoreo de un agente de potencial mutagenicidad: una prueba de mutación en bacterias, una prueba en mamíferos *in vitro* para mutación y aberraciones cromosómicas y una prueba para daño cromosómico *in vivo*.

En este contexto de la propuesta de la batería mínima los niveles de complejidad creciente para estos estudios que se consideran son 4:

Nivel I (primario): bacteriano o molecular. permite detectar mutaciones puntuales utilizando organismos procariontes o eucarionte unicelulares a través de la detección de mutaciones y retromutaciones. Los organismos más frecuentemente utilizados son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* además, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *A. nidulans* permiten la detección de deleciones, no disyunción y recombinaciones. Los estudios de reversión cobran importancia por presentar correlación entre el potencial carcinogénico de las sustancias químicas y la inducción de revertantes microbiológicos (Mc Cann y Ames, 1975). Uno de los más frecuentemente utilizados es el test de Ames (Ames et al., 1975) B. Ames desarrolló cepas bacterianas de *S. typhimurium* auxótrofas para histidina, para evaluar la retromutación a histidina (+) por reversión, retromutación por mutación intragénica y retromutación por mutación intergénica. Al finalizar el ensayo se

obtiene para cada dosis ensayada el número de revertantes por placa (triplicado), cuando el número de revertantes por placa duplica el número de las observadas en los controles negativos, en al menos una de las concentraciones de prueba, el ensayo se considera positivo. Cuando no se observa un incremento reproducible con relación a la dosis en el número de revertantes en, por lo menos, dos ensayos consecutivos, el ensayo se considera negativo. Otros ensayos de aplicación con microorganismos son el Cromotest (SOS), que monitorea los niveles de enzima B-galactosidasa en *E. coli*. Este gen actúa como reportero ya que el operón sul A presenta inserto el gen lac Z La síntesis de B-galactosidasa se mide por actividad colorimétrica y da un estimado de la inducción de funciones SOS en presencia de la sustancia monitoreada. Ensayos de toxicidad basados en la reducción de la intensidad luminosa de bacterias luminescentes presentan variantes para evaluar mutagenicidad. El ensayo Mutatox utiliza una variante oscura de *V. fischeri* de modo que la reversión de la mutación recupera la luminiscencia. El ensayo Vitotox utiliza cepas de *S. typhimurium* con un gen reportero de luciferasa que se expresa por activación de SOS. Los ensayos de mutagenicidad y recombinación utilizan *S. cerevisiae* por ser un organismo eucarionte unicelular con fase haploide y diploide. Permite evaluar la recombinación mitótica Recombinación mitótica: adenina, conversión génica: triptófano (trp5-12 y rp5-27), recombinación intragénica, mutación reversa: isoleucina e inducción de mutaciones citoplasmáticas petit. Las cepas utilizadas son Cepas: D3, D5, y D7 para recombinogénesis, y D4 para conversión génica.

Nivel II (secundario): celular, *in vitro*.

Se basa en el análisis de linfocitos de sangre periférica, Líneas celulares,

fibroblastos y mucosas. Utiliza cultivos celulares eucariontes ya sea en monocapa o en suspensión, con el objeto de caracterizar daño a nivel cromosómico o alteraciones en la cinética de proliferación celular. Entre los cultivos celulares en monocapa se encuentran las líneas celulares establecidas, como la línea Hela proveniente de un carcinoma cervical de Henrietta Lacks (de ahí el nombre de la línea) cuyo número modal es $2n=82$ (4 copias del cromosoma 12 humano y 3 copias de los cromosomas 6, 8, y 17 humanos); la línea CHO, proveniente de ovario de hamster chino (del inglés, *Chinese Hamster Ovary* y de ahí su nombre) que tiene un número modal $2n=22$ y varias otras líneas con origen similar en cuanto al taxon como son: la línea V79 proveniente de fibroblastos de pulmón de hamster chino (macho) utilizada en estudios de radiación, mutagénesis y genética con $2n=22$ y la línea CHO-AA8, sub línea CHO-K1 que se utiliza para el aislamiento de mutantes deficientes en genes de reparación.

En el caso de otros cultivos *in vitro* como el caso de los cultivos de sangre periférica, estos pueden ser de origen humano o de otros vertebrados (aves, reptiles, anfibios, peces) teniendo en cuenta las particularidades celulares de cada caso, en unos se usarán los linfocitos como fuente de células nucleadas a analizar y en otros, como aves y reptiles, serán los eritrocitos, por ser estos los nucleados. Los ensayos que pueden ser realizados en este nivel son: Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH=SCE, del inglés "*Sister Chromatid Exchange*"), la Cinética de Proliferación Celular (CPC=CPK del inglés "*Cell Proliferation Kinetics*"), Aberraciones Cromosómicas (AC), Retardo en Anafase-Telofase (AT), Micronúcleos (Mn), Electroforesis de una sola o Ensayo Cometa (SCGE del inglés "*Single Cell Gel Electroforesis Assay*").

Nivel III: nivel de ensayos *in vivo*

En los estudios en este nivel se incluyen los modelos que utilizan organismos eucariontes pluricelulares. En los modelos vegetales, las especies más utilizadas son *Tradescantia*, *Allium cepa* y *Vicia faba*. Entre los modelos animales, cuando de mamíferos se trata, los más frecuentemente utilizados son las diferentes cepas de ratón, hámster y rata criados en bioterio. Otros vertebrados también son de aplicación para este nivel con costos más llevados tanto por su mantenimiento como por su manejo (perros, conejos, monos). En el Nivel III incluye los mismos ensayos que el Nivel 2 como es el caso del sistema de sangre periférica sólo que el ensayo se realiza utilizando la sangre de los modelos experimentales expuestos previamente al agente a evaluar. De ahí que sea un nivel de análisis *in vivo*. En este nivel se agregan otros dos sistemas de evaluación, el ensayo de Micronúcleos en médula ósea de ratón y el ensayo de Micronúcleos en mucosa bucal o en orina.. En los modelos de invertebrados, se incorpora la posibilidad de aplicar el ensayo de Mutagénesis y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* SMART (del inglés "*Somatic Mutation and Recombination Test*") que se basa en que los individuos desde el estadio de larva estén expuestos a los agentes a evaluar. Existen dos tipos de ensayo según el órgano blanco en el que se mida la exposición y el efecto atribuible al agente de exposición: ojos o alas y según así sea, utilizan diferentes líneas de moscas. El ensayo en ojo, utiliza líneas salvajes y analiza manchas de células mutantes w (del inglés "*White*"). El ensayo en alas utiliza dos mutantes mwh (del inglés "*multiple wing hair*") y flr (del inglés "*flare*"). En ambos casos grandes poblaciones de células en división en los primordios se encuentran expuestas a los agentes a evaluar. Cada mancha o (del inglés "*spot*") indica que un

clon de células se encuentra mutado. Este ensayo permite detectar mutaciones de punto, deleciones, no disyunción, conversión génica, recombinación mitótica.

Nivel IV: nivel epidemiológico

Los ensayos realizados en este nivel son los referidos anteriormente en el Nivel III y son considerados de Nivel IV sólo cuando los estudios se realizan en poblaciones expuestas a agentes de manera ocupacional, ambiental, accidental, por estilos de vida o terapéutica. Estos estudios permiten realizar análisis prospectivos y retrospectivos para las poblaciones analizadas, es un nivel de análisis poblacional ya sean humanas como de la fauna o de la flora. Estos últimos como excelentes monitores ambientales de contaminación o en caso de accidentes originados por presión antrópica en ambientes silvestres con motivo del avance de la industrialización y urbanización en general.

1.3.3 Modelos experimentales

La elección de los modelos experimentales se fundamenta en varios elementos que incluyen, el sustrato biológico, el plan de exposición, los indicadores evaluados y el modelo predictivo. El sustrato biológico es el material orgánico, sobre el que se aplica el xenobiótico siguiendo un plan de exposición y cuyas respuestas ante dicho estímulo se desea estudiar. Las alteraciones se valoran por medio de los biomarcadores de toxicidad. La validez del modelo experimental dependerá de la conjunción entre el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados. También influyen las pautas de exposición y el procedimiento estadístico empleado para la evaluación de la significación de las observaciones. Si

bien, se denomina “modelo” al sustrato biológico es más adecuado referirse a éste como “sistema”, ya que el modelo experimental incluye el diseño experimental. Así el mismo “sistema biológico” se puede usar en más de un modelo experimental y aplicando distintos diseños experimentales. El diseño experimental tiene en cuenta, la disposición de las unidades experimentales, las réplicas y las repeticiones, el plan de exposición, las concentraciones, el tiempo y la elección de indicadores. (Festing et al, 2002). El sustrato biológico puede ser un organismo completo o parte del mismo como un cultivo celular. Los ensayos de genotoxicidad en modelos experimentales son ensayos de corto plazo y permiten detectar mutaciones puntuales, daño al ADN, mutaciones cromosómicas, y alteraciones en el proceso de recombinogénesis (Mudry y Carballo, 2006).

Muchos de los modelos empleados para evaluar el potencial genotóxico de distintos agentes son mamíferos como rata, ratón, cobayo y conejo. La preferencia por estos modelos se basa en que pertenecen a la misma Clase en el marco taxonómico que los humanos, aun cuando se sostiene y hay acuerdo científico en que los efectos que un agente produce en una especie no son extrapolables a otras. En este sentido, se sabe que la misma exposición puede no producir la misma respuesta, no obstante, aunque es imposible extrapolar directamente datos animales a los seres humanos, también existe amplia evidencia de los beneficios que ha traído la experimentación en animales para la biomedicina y disciplinas afines (Rodríguez Yunta, 2007). Cobra valor el aclarar que, si bien dentro de los campos de interés de la genética toxicológica se encuentra la salud humana, también es cierto que los efectos genotóxicos alcanzan a todos los seres vivos expuestos por lo cual los efectos sobre la biota presentan un interés particular en el

campo de la ecotoxicología y orientan la evaluación de daños ecosistémicos (Shugart et al., 2003).

Más allá de los cuestionamientos éticos en el uso de animales de experimentación (Riva, 1991; Tsuda et al., 2001; Rodríguez Yunta, 2007), el empleo de bacterias, invertebrados y plantas como modelos en genética toxicológica, presenta interés por tener menores costos y tiempos generacionales más cortos. Estas características hacen que estos modelos tengan mayor factibilidad en estudios de genética toxicológica. Es pertinente considerar que el estado conservado del material genético desde el punto de vista evolutivo así como de los mecanismos asociados a la división celular, confieren validez a los ensayos biológicos. Las baterías de ensayos consideran el uso de varios modelos y niveles *in vivo* e *in vitro* con el fin de abordar un espectro de procesos que pueden ser diferenciales en cada uno de los sistemas y modelos.

1.3.4. Las plantas vasculares como monitores de genotoxicidad

1.3.4.1. Antecedentes

Los bioensayos de genotoxicidad empleando plantas como indicadores han demostrado su utilidad en la evaluación de agentes mutagénicos a través de la detección de aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (Fiskesjo, 1985). Levan en 1938 utilizando *Allium cepa* determinó los efectos de la colchicina y posteriormente en 1943 y 1945, las reacciones citológicas inducidas por sales

inorgánicas y series orgánicas dando inicio, en la era de la mutagénesis química, al uso del biomonitoreo con plantas. Desde los años 70, los bioensayos con plantas superiores son recomendados para su uso en monitoreo de posibles genotóxicos. El uso de plantas fue indicado y validado por varias agencias tales como “*United Nations Environmental Program (UNEP)*”, “*World Health Organization (WHO)*” y “*US Environmental Protection Agency (USEPA)*” (Ma et al, 1995). En 1978 se realizó el seminario “*Higher Plants Systems as Monitors of Environmental Mutagens*” patrocinado por el “*US National Institute of Environmental Health Sciences*”, el “*Gene-Tox Program*” de la “*US Office of Toxic Substances de la US Environmental Protection Agency (EPA)*” con el fin evaluar el estado de los bioensayos en genética toxicológica (en microorganismos, animales y plantas). Los resultados se publicaron en 1988.

Los ensayos en plantas demostraron ser apropiados para evaluar riesgos en compuestos químicos. El análisis de los datos demostró una alta concordancia entre los ensayos en plantas y mamíferos (Ennever et al., 1988). Por este motivo, las plantas comenzaron a ser consideradas como modelos altamente fiables en su utilización para evaluar el riesgo por exposición a compuestos químicos. Las variaciones inter-laboratorios encontradas estaban en el rango de las halladas para otros estudios de evaluación de compuestos químicos *in vivo* o *in vitro*. En el siguiente cuadro se presentan los ensayos realizados en las distintas especies “*EPA’s Gene-Tox 1982*”.

1. *Allium cepa*, aberraciones cromosómicas,
2. *Arabidopsis thaliana*, mutaciones génicas,

3. *Glycine max* (soja), mutaciones génicas,
4. *Hordeum vulgare* (cebada), aberraciones cromosómicas,
5. *H.vulgare*, mutaciones génicas (clorofila),
6. *Tradescantia*, ensayo para mutágenos gaseosos,
7. *Tradescantia*, ensayos citogenéticos,
8. *Vicia faba* (habas) aberraciones cromosómicas,
9. *Zea mays* (maíz), mutaciones génicas,

En 1992, Te-Hsiu Ma, inicia el programa IPPB (“*International Program on Plant Bioassays*”) que se establece oficialmente en 1993 bajo el auspicio del Programa Ambiental de las Naciones Unidas (del inglés “*United Nations Environment Program*”). Este programa se ocupó de promover el uso de ensayos en plantas para monitoreo y detección de mutágenos en el ambiente, considerando que las plantas eran las únicas que podrían ser útiles como monitores *in situ* de genotóxicos ambientales, ya sea que estuvieran en forma simple o en la forma de mezclas complejas. De los siete ensayos revisados por la EPA (del inglés “*US Environmental Protection Agency*”) en el Programa “*Gene-Tox* (1980)”, el ensayo de aberraciones cromosómicas en meristemas de raíz de *Allium cepa*, fue uno de los adoptados por el IPPB para monitorear genotoxicidad de origen ambiental y su protocolo fue estandarizado (Fiskesjo, 1985).

Las pruebas que utilizan plantas superiores son capaces de detectar la genotoxicidad de compuestos químicos y de monitorear *in situ* toxicidad y

genotoxicidad de contaminantes ambientales, sin necesidad de concentrar las muestras ni realizar tratamientos previos a la exposición (Grant 1982, 1994). Las plantas constituyen un material adecuado para monitoreo ambiental de sitios contaminados. Los bioensayos con plantas están considerados como más sensibles y fáciles de aplicar en comparación con bioensayos que se aplican en especies animales [Ma et al., 1995].

1.3.4.2. *Allium cepa*

La cebolla (*Allium cepa*) es una planta vascular del género de las liliáceas, que desde las primeras décadas del siglo XX ha sido utilizada para estudios fisiológicos y citogenéticos. Otras especies del género *Allium* incluyen, *A. sativum*, *A. fistulosum*, *A. carinatum*, *A. cepa* var. *Proliferum*, fueron utilizadas para estudios de mutagénesis aunque menos ampliamente que *A. cepa*. Los protocolos para el estudio de los indicadores citológicos y citogenéticos se desarrollaron mediante la exposición de raíces adventicias obtenidas de bulbos o de semillas. El cariotipo de *Allium cepa* fue descrito por Mensinkai en 1939. El complemento completo consiste en 8 pares de cromosomas, con 5 pares de cromosomas metacéntricos (pares 1, 2, 3, 5 y 8) y 3 pares submetacéntricos correspondiendo a los cromosomas 6 y 7 y un par de cromosomas con un satélite en el telómero del brazo corto., cromosoma 4. Dependiendo del procedimiento de preparación, el tamaño de los cromosomas varía entre 8 y 16 μm .

La duración del ciclo mitótico en *Allium cepa* fue determinado por varios

autores con distintos valores tales como 20,5 hs. (Nutti Ronchi y Acara, 1967), 18.8 a 20 °C (López Saez et al., 1966) y 23 horas a 21 ° C (Matagne, 1968). 13,5 h de las cuales 11,2 h corresponden a mitosis y 2,3 a interfase (González Fernández et al, 1966). En 1968, Matagne determinó una duración de 4 horas para la mitosis y 18 para la interfase, a 20 ° C. Las diferencias en los resultados se pueden deber a diferencias de temperatura (Grant, 1982) sin embargo otras condiciones experimentales tales como la concentración de oxígeno y la composición del agua en la que crecen las raíces, hoy se sabe que constituyen factores de influencia.

Entre las pruebas de genotoxicidad realizadas en plantas, el ensayo con *A. cepa* es bien conocida y frecuentemente usada en muchos laboratorios con un amplio rango de aplicaciones. Los ensayos de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en raíces de *A. cepa* son ampliamente aplicados para la evaluación de genotoxicidad de muchos compuestos químicos y contaminantes ambientales. Estas pruebas son métodos sensibles para monitoreo de efectos clastogénicos y aneugénicos (Grant 1982; Ma et al. 1995; Rank and Nielsen 1993). Además de sustancias químicas aisladas se estudiaron por este método mezclas complejas, muestras de ríos y lagos, agua de bebida, efluentes industriales, lixiviado de rellenos sanitarios, muestras y extractos de suelo, entre otros. (Fiskesjo 1985; Steinkellner et al. 1998; Cabrera y Rodríguez, 1999; Grover and Kaur 1999; Monarca et al., 2003).

La ventaja de los ensayos en *A. cepa* es que es económico, fácil de implementar, y que ofrece resultados confiables teniendo alta concordancia con otros test realizados en sistemas de mamíferos (Grover et al., 1999) como linfocitos

humanos, líneas celulares como las líneas CHO, y otros a nivel de organismos tales como peces, crustáceos y algas (Fiskesjo, 1985).

1.3.4.3. La raíz como sistema de ensayo

Las células meristemáticas de las raíces se han constituido en sistemas de ensayo por ser un tejido proliferante que permite analizar los efectos de agentes con potencialidad genotóxica. Las raíces provenientes de la base del bulbo son de tipo adventicia y presentan zonas diferenciales. En el extremo del ápice se encuentra la caliptra, una capa delgada de células esclerosadas y no proliferantes, contiguamente se hallan las células meristemáticas, en activa división celular y son el sustrato para realizar evaluaciones de genotoxicidad. A medida que las células se reproducen, parte de ellas se diferencian en células de elongación formando un tejido más proximal a la base del bulbo. Este tejido es responsable del crecimiento en longitud de las raíces, por medio de un proceso regulado de debilitamiento de las uniones de celulosa de la pared que permite que el citoplasma adquiera forma alargada. Cobra importancia establecer algunas consideraciones relacionadas con este órgano con el fin de comprender sus potencialidades como sistema de ensayo en evaluaciones aplicadas a la toxicología y a la genética toxicológica.

Durante las primeras décadas del siglo XX se realizaron estudios fisiológicos que confirmaron la polaridad eléctrica y las diferenciales demandas de oxígeno analizando separadamente la zona del meristema, la zona de elongación y la zona

de diferenciación (Berry y Brock, 1943). En estudios recientes, se realiza el mismo análisis diferencial (Córdoba Pedregosa et al, 2003) y se establece la actividad enzimática que determina los estados de óxido reducción de las moléculas que regulan las funciones asociadas a cada tejido. Así, es posible dilucidar efectos condicionados a estados redox como es el daño oxidativo y la respuesta antioxidante. Dado que el potencial genotóxico de algunos agentes depende de su biotransformación a diferentes estados redox, que a su vez depende de las presiones de oxígeno del tejido expuesto, este modelo podría permitir detectar estos efectos cuando los mismos sean específicos de tejidos. Esto se puede poner en evidencia a partir de parámetros morfológicos, enzimáticos y citogenéticos. En *A. cepa*, los estudios de actividad enzimática y niveles no enzimáticos relacionados con los procesos oxidativos son útiles como biomarcadores de daño oxidativo y repuesta antioxidante (Fatima, 2005). Con el análisis detallado de sus valores se complementan los estudios de genotoxicidad. Cabe tener en cuenta que la actividad de enzimas involucradas en estos procesos no es regular a lo largo de la raíz, por lo tanto un análisis que involucre zonas de la raíz alejadas del meristema podrían aportar información errónea debido a las diferencias en la respuesta antioxidante de cada tejido radicular. Es conveniente aislar las zonas de la raíz para una mayor comprensión de los procesos oxidativos involucrados. Por ejemplo, las enzimas Guaiacol peroxidasa, Ascorbato peroxidasa, Monodehydroascorbato oxidoreductasa, Dihydroascorbato reductasa, Catalasa y Glutación reductasa muestran patrones de actividad diferencial dependiendo de la zona de la raíz (Córdoba-Pedregosa et al., 2003). La actividad peroxidasa *in vivo* revela un patrón de distribución específica a lo largo de la raíz. El control en el balance de esas moléculas parece existir a lo largo del eje de la raíz y puede ser relacionado

directamente con los mecanismos involucrados en la elongación y la división celular. El rol del ascorbato sobre el crecimiento y desarrollo es discutido. Los bulbos tratados con precursores de ácido ascórbico o precursores inmediatos, revelan una estimulación en la tasa de elongación de la raíz acompañada de un incremento en la acumulación de ascorbato y dehidroascorbato a lo largo del eje radicular. Sin embargo, la distribución de esas formas redox no es uniforme, y las mismas se acumulan en zonas de metabolismo más activo. Por otro lado, el ascorbato y su precursor inmediato, la L-galactona-c-lactona también estimulan la actividad de la glucosa- 6-phosphato e inhiben la actividad peroxidasa, que es responsable de mantener la rigidez de la pared celular (Córdoba Pedregosa et al., 2005), Estos resultados son compatibles con la idea de que el ascorbato estimula el crecimiento de la raíz incrementando su metabolismo. Por lo tanto, los estudios de daño oxidativo y respuesta antioxidante permiten establecer junto con los ensayos de genotoxicidad, los niveles de riesgo asociados a la exposición de los diferentes agentes químicos.

Otra característica para considerar en el sistema que utiliza la raíz para la evaluación genotóxica de agentes es la dinámica de formación de estructuras microtubulares presentes en las células de las plantas superiores. En las plantas los microtúbulos desempeñan un rol fundamental en la morfogénesis y en la división celular (Kost et al., 1999; Kost y Chua, 2002). Las células meristemáticas, en particular, durante el ciclo de división presentan cuatro organizaciones de los microtúbulos principales asociados a las funciones de cada estadio (Goddard et al., 1994). Durante la interfase, los microtúbulos se encuentran ordenados en estructuras paralelas orientados de manera perpendicular al eje de expansión de la

célula y dirigen la deposición de celulosa (Cyr, 1994; Wymer et al., 1996). En el inicio de la mitosis, estos microtúbulos se organizan en un anillo llamado banda preprofásica (BPP) y que rodea al núcleo donde define el plano de división y determina la ubicación de la placa celular formada durante la citocinesis (Mineyuki, 1999). La BPP es posteriormente reemplazada por la formación del huso mitótico (HM) que cuando se une con el cinetocoro de los centrómeros permite la segregación de las respectivas cromátidas a dos polos distribuyendo la información genética en las células hijas (Yu et al., 2000). Finalmente el fragmoplasto (Fg) es una densa estructura derivada del HM, por reordenamiento de los microtúbulos que está constituida por dos anillos microtubulares orientados opuestamente en el centro de la célula y que dirigen las vesículas que llevan material para la formación de la pared celular en el plano de división (Otegui and Staehelin, 2000; Verma, 2001; Jurgens, 2005). Aunque el Fg contiene una cierta cantidad de actina, diferente a lo que ocurre con la citocinesis en animales, la misma no está relacionada con la formación de un anillo contráctil y la placa de división crece centrífugamente. Tanto el cuerpo medio del HM como el Fg contienen un número de proteínas asociadas a los microtúbulos y kinesinas que estabilizan la estructura (Jurgens, 2005).

Desde el punto de vista evolutivo es interesante referir que en las algas rojas relacionadas filogenéticamente con las plantas verdes, se reportó la presencia de un anillo contráctil (Broadwater, 1999), sugiriendo que el Fg sería una estructura derivada. En algas verdes se encuentran situaciones diversas e intermedias (Verma, 2001, López Bautista et al., 2003). Otras funciones vitales de los microtúbulos en las plantas están asociadas con los procesos de morfogénesis

durante el desarrollo del embrión (Steinborn et al., 2002), formación de órganos (Whittington et al., 2001), duplicación de órganos (Thitamadee et al., 2002), desarrollo de los tricomas (Kost et al., 1999), mantenimiento de la dirección durante el crecimiento de las células de elongación de la raíz (Bibikova et al., 1999), organización del tubo polínico (Taylor and Hepler, 1997), y movimiento de los estomas (Marcus et al., 2001). Todos estos procesos involucran cambios conformacionales microtubulares en espacio y tiempo y un comportamiento dinámico de crecimiento por polimerización y acortamiento por despolimerización, conocido como “inestabilidad dinámica” que es la base de los cambios en la conformación microtubular (Desai y Mitchison, 1997).

La inestabilidad dinámica se caracteriza por cuatro parámetros: tasa de crecimiento (1) , tasa de acortamiento (2), transición de 1 a 2 o frecuencia de catástrofe y transición de 2 a 1 o frecuencia de rescate. (Mitchison and Kirschner, 1984). La alteración en la inestabilidad dinámica lleva a que la célula responda regulando la morfogénesis y el control de la división celular (Kirschner & Mitchison, 1986; Belmont et al., 1990; Desai y Mitchison, 1997). La transición de la con formación de BPP a HM es un punto clave en el ciclo por marcar el plano de división de la célula y organizar el eje del HM. Las células con BPP afectada o ausente están severamente dañadas (Traas et al., 1995; McClinton y Sung, 1997). Muchos estudios se han orientado a analizar la formación de las PPB (Mineyuki, 1999; Granger y Cyr, 2001), aunque los mecanismos aún son poco claros por lo que son motivo para investigar la inestabilidad dinámica *in vivo*, con especial atención al comportamiento de las BPP (Dhonukshe & Gadella, 2003).

Otro aspecto a considerar en relación a los microtúbulos de las plantas vasculares es que éstas no presentan un centro de organización microtubular (MTOC) comparable a los centrosomas, sino sitios de nucleación para microtúbulos distribuidos en el citoplasma y en las endomembranas, como las observables en el retículo endoplásmico, las envolturas nucleares o los plástidos. Los MTOC en las plantas con semilla son difusos y migratorios lo que hace que sean difíciles de identificar a diferencia de los MTOC asociados a centrosomas de células animales (Palevitz, 1993). En las Bryophyta, considerado un linaje pivotal en la evolución de plantas vasculares, las organizaciones microtubulares mencionadas previamente están presentes, aunque presentan un MTOC bien definido y los HM se organizan desde una estructura esférica acentriolar descrita como organizada polar o centrosoma. Este aparato mitótico es considerado transicional entre las algas verdes y las plantas con semilla (Brown and Lemmon, 1990). Diferentes estudios indican que, en plantas vasculares, la γ - tubulina está presente de manera ubicua en sitios de nucleación microtubular formando una entidad que migra durante el ciclo celular de manera específica y se asocia con organelas y sistemas de endomembranas. Los MTOC en plantas pueden ser reconocidos por la presencia de la γ - tubulina y existen estados transicionales en plantas actuales que indican una evolución de un centrosoma corpuscular centriolar presente en algas y células animales, a una asociación difusa con la envoltura nuclear; observable en las plantas vasculares.

El conocimiento de los procesos involucrados en la función del sistema de ensayo que son blanco de ataque de los agentes a evaluar, es fundamental a la hora de interpretar los resultados y establecer las conclusiones.

1.3.5. Indicadores de daño

Los indicadores de daño se pueden diferenciar según el proceso subyacente en: indicadores de toxicidad, indicadores de citotoxicidad e indicadores de genotoxicidad. Los estudios de toxicidad son realizados midiendo las longitudes de las raíces expuestas y cuantificando la inhibición en el crecimiento de dichas raíces expuestas, así como cambios en las características morfológicas de las mismas (Fiskesjo, 1985).

Entre las plantas utilizadas para biomonitoreo, *A. cepa* mostró ser eficiente para tales estudios especialmente cuando se la utiliza para ensayos de inducción de aberraciones cromosómicas y Micronúcleos (Constantin y Owens, 1982; Grant, 1999). En el año 1985 se publicó el primer protocolo propuesto por Fiskesjo. Posteriormente otros autores implementaron modificaciones al protocolo original en cuanto al número de bulbos utilizado, el tiempo de exposición y la cantidad de células contadas (Rank y Nielsen, 1993). Fiskesjo presenta en 1993 un protocolo estandarizado para la aplicación del test de *Allium cepa* para evaluación de toxicidad (método 1) y genotoxicidad (método 2). En el primero se considera como indicador de toxicidad a la inhibición en el crecimiento de las raíces, estableciendo que la concentración efectiva 50 (EC 50) es el parámetro de referencia, es decir la concentración del agente que pone en evidencia el valor de longitud correspondiente al 50 % respecto de la longitud observada en el control. En el segundo, considera la fracción de células en división y el daño por rotura cromosómica como los indicadores de genotoxicidad y como indicadores de

pérdida o ganancia de cromosomas. Las alteraciones cromosómicas como C-metafases, anafases multipolares, cromosomas rezagados o vagabundos, anafases desorganizadas, pérdida cromosómica y células poliploides, podrían indicar problemas en la formación del huso mitótico por disrupción o mala formación, determinando una mala segregación de las cromátidas y alterando la distribución de la información genética en las células hijas (Saunders et al., 2000). Entre las aberraciones cromosómicas que indican rotura de la cromatina se pueden mencionar, los fragmentos acéntricos, puentes anafásicos o telofásicos y cromosomas pegoteados. Los Micronúcleos se pueden producir espontáneamente si bien su inducción aumentada respecto de un control no expuesto es indicio de exposición a agentes genotóxicos (Heddle et al., 1983). La prueba de Micronúcleos está considerada útil para estudios de genotoxicidad, por ser eficiente, simple y rápida (Cardozo et al., 2006). La presencia de Micronúcleos, de acuerdo con varios autores,, es interpretada como indicador de efectos clastogénicos o aneugénicos (Walker et al., 1996; Çavas y Ergene-Goçukara, 2005).

1.3.5.1. Toxicidad mitótica, Clastogenicidad y Aneugenicidad.

Lo parámetros utilizados para evaluar genotoxicidad son un conjunto de índices y variables mensurables en distintos ensayos que se detallan a continuación:

Índices de genotoxicidad :

- Índice mitótico (IM): se calcula como el número de células en división mitótica de 1000 células totales contadas.

$IM = \frac{N^{\circ} \text{ células en mitosis}}{1000 \text{ células}}$.

Cuando las células se someten a un tratamiento con colchicina el IM= N°de metafases / 1000 células

Los valores de IM permiten evaluar el efecto inhibitorio sobre la división celular somática relacionada con la presencia de los agentes a los que se expone el sistema de ensayo interpretado como toxicidad mitótica. La disminución en este índice puede ser también indicio de genotoxicidad debido a que las mutaciones son detectadas por los sistemas de chequeo y reparación, aumentando la duración de la interfase. Para sustentar esta explicación son necesarios. Incorporar al análisis a otros parámetros de genotoxicidad

- Índices de fase: calculado a partir de la cantidad de células (N° de células) en cada estadio de división del N° total de células contadas en mitosis.

Índice de profase (P)= N° de profases/ N° de células totales en mitosis

Índice de metafase (M)= N° de profases/ N° de células totales en mitosis

Índice de anafase (A)= N° de profases/ N° de células totales en mitosis

Índice de telofase (T)= N° de profases/ N° de células totales en mitosis

El análisis de estos índices comparados con los controles puede evidenciar retraso en estadios como la anafase cuando la segregación cromosómica se dificulta por ejemplo, por exposición a sustancias que interfieren en la dinámica de polimerización y despolimerización del huso mitótico. Un aumento en las metafases puede ser interpretado como un control del ingreso a anafase por detectar falencias en el anclaje del cinetocoro-microtúbulo.

Ensayos:

Aberraciones cromosómicas en anafase-telofase (AC). Se calculan como el total de aberraciones observadas en 100 anafases-telofase totales. Las aberraciones contabilizadas son de tipo puentes, fragmentos acéntricos, cromosomas rezagados,

anafases desorganizadas, anafases tripolares o multipolares, anillos y se incluyen las C-metafases y las células poliploides. Según la clase de aberraciones es posible inferir el efecto del agente como clastogénico, aneugénico o con ambos efectos. Para calcular la frecuencia de las aberraciones cromosómicas inducidas por el agente se suman todas las aberraciones y los resultados se expresan como porcentajes

AC: $(\text{Aberraciones} / 100 \text{ anafase - telofases}) \times 100$.

Micronúcleos: los micronúcleos se forman como resultado de cromatina proveniente de fragmentos o de cromosomas enteros que quedan fuera del sistema de segregación durante la interfase siendo los micronúcleos expulsados del núcleo, por lo tanto la contabilización de micronúcleos se realiza en células interfásicas. La frecuencia de micronúcleos analizada sobre las células meristemáticas se expresa como:

Frecuencia de micronúcleos (Mn): $N^{\circ} \text{ Mn} / 1000 \text{ núcleos interfásicos}$.

Células binucleadas. Las mismas se forman cuando está bloqueado el proceso de citocinesis y como resultado se forman células binucleadas. Cuando esta disrupción se debe a dificultades en la formación de los microtúbulos del fragmoplasto probablemente la afectación del huso produzca células poliploides. Las células binucleadas se contabilizan cada 1000 células totales en cualquier estadio.

Células binucleadas (Bn): $Bn / 1000 \text{ células totales observadas}$.

1.3.5.2. Daño oxidativo y Disrupción microtubular

TBARS ($\mu\text{mol/mg prot}$). Medición de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). La concentración de TBARS se estimó mediante el

coeficiente de extinción del complejo MDA-ácido tiobarbitúrico ($156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Los resultados se expresan como

nmol TBARS / mg proteínas.

Parámetros enzimáticos:

Actividad Superóxido dismutasa (SOD). Estimación indirecta de las unidades de SOD por medición fotoquímica de azul de formazán, que se puede cuantificar por la lectura de su absorbancia a 560 nm. Se mide la actividad SOD sobre la base de la capacidad de la enzima para dismutar al anión superóxido e inhibir de esta manera la reducción fotoquímica del nitro blue tetrazolium (NBT) (o sea la formación del azul de formazán). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % la velocidad de reducción del NBT.

Los resultados se expresan como

unidades SOD/mg de proteínas (U SOD/ mg prot).

Actividad Catalasa (CAT). Dado que el peróxido de hidrógeno en solución presenta un máximo de absorción al UV entre 230 y 250 nm, su descomposición se puede medir espectrofotométricamente como la disminución de la absorbancia en el intervalo experimental (Chance, 1954). Una unidad CAT se define como la cantidad de enzimas que transforman 1 mmol de H_2O_2 por minuto.

Los resultados se expresan como

unidades CAT /mg proteínas (U CAT/ mg prot).

Parámetros no enzimáticos.

Contenido de Glutation reducido (GSH). El ácido di-tio-nitrobenzoico (DTNB) oxida al GSH generando un compuesto coloreado, el ácido 5 tio-2-nitrobenzoico (TNB) que se monitorea espectrofotométricamente a 412 nm.

Los resultados se expresan como

milimoles de GSH / mg prot. (umol GSH /mg prot)

Contenido de Ácido ascórbico (AA) y Dehidroascórbico (DHA) y relacion AA/DHA

Se mide por el valor de absorbancia en 525 nm después de la incubación de 1 h a 37°C y se refiere a la curvade calibración (0 a160 nmoles of AA). El mismo proceso se aplica al homogenato previamente reducido con 100 mM ditioneitol (1 h a T° ambiente). La concentración de ácido monodehidroascorbico (DHA) se calcula por diferencia entre la absorbancia del homogenato reducido y no reducido. Los resultados se expresaron como

mmol de AA o DHA / mg de proteína (umol AA /mg prot), (umol DHA / mg prot)

Disrupción microtubular

Las estructuras microtubulares detectadas por inmunolocalización de las β -tubulinas se discriminan como bandas preprofásicas (BPP), husos mitóticos (HM) y fragmoplastos (Fg). Se calculan los índices a partir de las estructuras totales normales y anormales encontradas cada 1000 células observadas.. El porcentaje de de estructuras anómalas o ausentes sobre las estructuras totales observadas. El índice de cada clase de estructura y el porcentaje de estructura anormal de cada clase.

Índice MTN = Estructuras normales/ 1000 células

Índice MTA= Estructuras anómalas / 1000 células

MTA= (MT anormales / totales) x100

BPP= BPP/1000 células totales

HM= HM/1000 células totales

Fg= Fg/1000 células totales

$\% \text{ BPPA} = (\text{BPP anormales} / \text{BPP totales}) \times 100$

$\% \text{ HMA} = (\text{HM anormales} / \text{BPP totales}) \times 100$

$\% \text{ FgA} = (\text{Fg anormales} / \text{BPP totales}) \times 100$

1.4. Imidazoles

Los compuestos azólicos son sustancias químicas sintéticas constituidas por diferentes anillos fenólicos, cuya característica común es la presencia de uno o más anillos de cinco elementos en cuya estructura están presentes un átomo de nitrógeno y otro que puede ser azufre, oxígeno o nitrógeno. Los compuestos imidazólicos son aquellos que en su estructura química presentan un imidazol, es decir un anillo aromático heterocíclico con dos átomos de nitrógeno y que puede presentar variantes en los sustituyentes según el efecto deseado con su aplicación. El imidazol es un anillo planar soluble en agua y solventes orgánicos y se encuentra incorporado en diferentes moléculas de importancia biológica como el aminoácido histidina y la histamina. Diferentes drogas farmacológicas conteniendo el anillo imidazólico presentan aplicaciones bactericidas, antifúngicas y antiparasitarias (Godefroi et al., 1969). La aparición del antecesor de los derivados azólicos con capacidad antimicrobiana tuvo lugar en los años 40, con las investigaciones sobre benzimidazoles. A partir de este momento, y de forma simultánea, dos casas farmacéuticas: Bayer AG y Janssen Pharmaceutica, investigaron diferentes clases de azoles con aplicación clínica durante los años 50 y 60, hasta el auténtico inicio de la era de los imidazoles que se puede considerar en el año 1969 (Plempel et al., 1969)

El principal mecanismo de acción de los imidazoles fue demostrado por primera vez por Vanden Bossche en 1983. Este autor comprobó que concentraciones bajísimas de miconazol eran capaces de bloquear la síntesis de ergosterol en *Candida albicans*, lo que producía la acumulación de diferentes 14-a-metil-esteroles a nivel celular. Los imidazoles alteran la composición de los esteroides de la membrana fúngica mediante inhibición del citocromo p-450 (Vanden-Bossche ,1978; Sonino, 1987).

1.4.1. Genotoxicidad del Metronidazol (Flagyl®),

El metronidazol (MTZ) 1-(hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, es un agente terapéutico, utilizado en el tratamiento de tricomoniasis, amebiasis y giardiasis. Así mismo, es de uso frecuente, tanto en procesos asociados a bacterias anaerobias como para aumentar la efectividad de radiaciones ionizantes en el tratamiento antitumoral (Anderson, 1981). Su uso se ha descrito como eficiente en combinación con agentes alquilantes y bajo condiciones de hipoxia, ya que incrementa la eficacia terapéutica antitumoral de los mismos (Stratford and Adams 1982). El MTZ es una de las drogas más estudiadas en humanos y se encuentra aprobada por la “US Food and Drugs Administration (FDA)”.

Las parasitosis son frecuentes en los países tropicales y subdesarrollados, donde existe una población humana numerosa, susceptible y desfavorecida por las condiciones climáticas, económicas y sociales que facilitan la proliferación, persistencia y permanencia de las enfermedades parasitarias (Reyes Romero y Navarro Rojas, 1998). Los riesgos toxicológicos potenciales derivados de la

utilización de las drogas indicadas para el tratamiento de estas afecciones, deben considerar su relación costo-beneficio, teniendo en cuenta que estas enfermedades infecciosas están directamente asociadas a los estilos de vida y a las condiciones de pobreza y marginalidad que favorecen su diseminación.

El estudio del MTZ y de otros imidazoles cobra importancia en este marco de referencia por su amplio uso y su comprobada utilización como automedicación por ser componente de numerosos fármacos de venta libre. Dada la naturaleza química del MTZ, su biotransformación podría seguir vías oxidativas o reductoras mediadas por el sistema de citocromos P 450. Las primeras, darían lugar a grupos hidroxilo o ácido acético por oxidación de la cadena alifática. El 1-(2-hidroxietil)-hidroximetil-5-nitroimidazol es el metabolito más abundante en la orina de mamíferos acompañado por el 2- metil-5-nitroimidazol-1-il ácido acético y 1-(2-hidroxietil)-2-carboxil-5-nitroimidazol (Templeton, 1977). La vía reductiva de metabolización está asociada con el efecto terapéutico de los nitroimidazoles, así como de otros compuestos con un sustituyente nitro, que origina una hidroxilamina de corta vida y posteriormente una amina primaria (Muller, 1981). Al ser las hidroxilaminas metabolitos que reaccionan con biopolímeros nucleofílicos, los compuestos producidos por la senda reductora en la biotransformación del MTZ, son de especial importancia en genética toxicológica, dado que se pueden unir covalentemente a varias macromoléculas incluyendo la molécula de ADN. (Edwards, 1986; Kedderis y Miwa, 1988). Otro mecanismo propuesto es aquel que considera que el ingreso del MTZ a la célula anaeróbica es seguido de la activación bioreductiva del mismo y la formación de un nitro anión debido al gradiente de electrones que se genera a través de componentes con

suficiente potencial redox negativo como para transferirlos. Este mecanismo da lugar a la formación de radicales libres, los que dañan el ADN, así como a otros componentes celulares (Raheter y Hanel, 2003).

Al revisar la literatura sobre la aplicación de monitoreos de corto y largo plazo en poblaciones expuestas terapéuticamente al MTZ se detectan resultados controvertidos (IARC, 1977; Rustia et al., 1979; Roe, 1983, Dobias et al., 1994; Mudry de Pargament et al., 1994; Lopez Nigro et al. 2003; Mudry et al., 2007; Buschini et al., 2009). Los modelos *in vitro* en algunos casos evidencian genotoxicidad, según diferentes parámetros que dan cuenta de alteraciones tanto en la cinética de la división celular como en la estabilidad cromosómica. Esto se refleja en trabajos realizados en cultivos de células CHO (Mudry de Pargament et al., 1994), en linfocitos de sangre periférica (Elizondo et al., 1994; Menéndez et al., 2002; López Nigro et al., 2003; Carballo et al., 2004; Gómez Arroyo et al., 2004) y con Electroforesis de células individuales o Ensayo de Cometa (Rodríguez Ferreiro et al., 2002). En otras publicaciones, se estableció una relación inversa entre concentración plasmática del MTZ y daño al ADN, atribuyendo este daño a un metabolito (Elizondo et al., 1996; Menéndez et al., 2001). Por otra parte, entre los estudios en los que el MTZ puso en evidencia otros resultados, incluso algunos negativos en cuanto a la caracterización de su potencial efecto genotóxico, se encuentran ensayos con líneas celulares de mamíferos en los que el efecto genotóxico se registró sólo en condiciones de hipoxia (Korbelik y Horvarth, 1980) y ensayos de corto plazo (ECP) con linfocitos de sangre periférica (Hartley-Asp, 1979; Akiol et al., 2000; Fahrig y Engelke, 1997). En cuanto a los trabajos desarrollados en modelos *in vivo*, estudios de los últimos años realizados en

distintas cepas de ratón atribuyen a la acción del MTZ el aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos (Abrevaya et al, 2004; el-Nahas y el-Ashmawy, 2004). Publicaciones previas atribuyen efectos genotóxicos al MTZ, si bien, en algunos casos, el estudio del mismo está condicionado a algún estadio del desarrollo. En *Neurospora crassa* y en *Saccharomyces cerevisiae*, la mutagenicidad se evidenció sólo en células vegetativas (Ong y Slade, 1978; Ong et al., 1979; Mhon et al., 1970). El ensayo del letal recesivo en *Drosophilla melanogaster* no mostró efecto genotóxico (Kramers, 1982) sin embargo se encontraron efectos teratogénicos para el mismo modelo en otros diseños experimentales y con otros ensayos (Palermo et al., 2004.)

Diferentes pruebas de mutagenicidad en procariontes revelaron efecto mutagénico en bacterias con actividad nitroreductasa, y efecto no mutagénico en las variantes donde esta actividad enzimática está ausente. Esto permitiría considerar que el MTZ se activaría cuando se produce la reducción metabólica intracelular mediada por reductasas. (WHO, 1989; Adams ,1992). La mutagenicidad de orina de ratones y humanos tratados con MTZ también fue demostrada, dado que en mamíferos el 80% del MTZ metabolizado se elimina como hidroximetronidazol (Loft, 1990), esto concuerda con los resultados obtenidos al analizar en sistemas bacterianos, los metabolitos oxidados 1-(2-hidroxietyl)-hidroximetil-5-nitroimidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol-1-yl ácido acético, que presentaron mayor potencial mutagénico que el MTZ original (Connor, et al., 1977; Voogd et al 1979). El hidroximetabolito del MTZ indujo una relación dosis respuesta en el incremento de la frecuencia de Mn en líneas celulares con actividad del gen p53 (Menéndez 2002). Estudios en sangre periférica humana demostraron un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y disminución en el índice mitótico (IM) e índice de

replicación (IR) (Ccedilelik y Atescedil, 2006)

Ante estos hallazgos, diferentes autores refieren que no se puede descartar la carcinogenicidad del MTZ y sus hidroximetabolitos, ya que la mutagenicidad podría originar un proceso carcinogénico en individuos susceptibles. Hasta el presente los estudios de carcinogenicidad son contradictorios, si bien, en estudios en animales se detecta el desarrollo de tumores ante la exposición a dosis subtóxicas de MTZ. (Chacko and Bhide, 1986), no existen evidencias de incremento de riesgo de cáncer en humanos tratados con dosis terapéuticas de MTZ u otros 5-nitroimidazoles. (Roe 1983, Lau et al., 1992; Tracy y Webster, 2001).

1.4.2. Genotoxicidad del Tiabendazol:

El 2-(4 thiazolyl) benzimidazole o tiabendazol (TBZ) es un químico utilizado como antihelmíntico en medicina humana y veterinaria y como fungicida para el control pre y post cosecha de frutas y hortalizas durante el transporte y almacenamiento (Grover et al. 2001; Lankas et al., 2001). Los datos farmacocinéticos indican que el TBZ es absorbido rápidamente por ingestión oral y alcanza picos de concentración en plasma una hora después de ingerido (Goodman y Gilman et al., 1997).

Algunos pesticidas son considerados pro-benzimidazoles ya que si bien no contienen un anillo benzimidazólico en su molécula son metabolizados *in vivo* a benzimidazoles. La toxicidad del TBZ fue ampliamente estudiada en una variedad de especies. Estos estudios mostraron que el TBZ no evidenció efectos

teratogénicos ni fetotóxicos en ratas y conejos (Robinson, et al., 1965; Delatour et al., 1974; Lankas y Wise, 1993) ni efectos reproductivos en ratas (Wise et al., 1994).

El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en la unión a β -tubulinas libres en el sitio de unión de la colchicina inhibiendo la polimerización de los microtúbulos e interrumpiendo la mitosis (Friedman y Platzer, 1978; Davidse, 1986,1987; Lacey, 1990; Hollomon et al., 1998; Hess y Nakai, 2000). Algunos benzimidazoles mostraron capacidad para inhibir la polimerización de microtúbulos y efectos aneugénicos *in vivo*. Cuando se aplican para tratamiento terapéutico de endoparasitosis humanas y animales o como fungicidas, se considera que la unión a las tubulina tanto en helmintos como en hongos, sería un indicador pobre del potencial efecto aneugénico en mamíferos. Sin embargo existe una buena correlación para esos compuestos en las células de mamíferos, entre la inhibición de la tubulina y las evidencias de aneugenicidad *in vitro* y de ésta, con respecto a la aneugenicidad *in vivo*. Los aneunógenos podrían ser también clastógenos o producir metabolitos que actúan como clastógenos.

Benzimidazoles tales como el Carbendazim o el Benomyl mostraron efectos adversos genéticos y reproductivos (Szabo et al., 1974; Seiler, 1975; Delatour y Richard, 1976). Estos efectos adversos están asociados a benzimidazoles que poseen o metabolizan a través de carbamatos (Tocco et al., 1964). Se sabe que los benzimidazoles carbamato derivados presentan una débil actividad aneugénica en células somáticas y germinales (Lankas et al. 2001; Mailhes et al. 1997).

Los datos de genotoxicidad reunidos hasta la fecha para benzimidazoles son suficientes para explicar los efectos mutagénicos observados. Cinco fungicidas

benzimidazólicos fueron ensayados en meristemas de *A. cepa* para caracterizar clastogenicidad : benomyl, carbendazim metil-tiofanatot, tiabendazol y fuberidazol. Sólo el benomyl y el carbendazim exhibieron efectos clastogénicos en todos los sistemas con relación dosis respuesta (Sahu, 1983). Más recientemente el efecto del benomyl fue probado sobre el crecimiento y mitosis en meristemas de raíces de *A. cepa*, encontrando que el mismo ejerce efectos negativos sobre la división celular (Dane, 2005). Dado que el TBZ no pertenece a ese grupo de benzimidazoles se espera que esta molécula no presente unión a las tubulinas y esto fuera consistente con la falta de efecto tóxico en crecimiento y diferenciación de células cultivadas de embriones de ratas (Friedman and Platzer, 1978; Witthaker y Faustman, 1992) y en los estudios mencionados anteriormente. Sin embargo otros estudios *in vitro* atribuyen al TBZ capacidad de unión a β - tubulina, y efectos disruptores en la formación de microtúbulos (Prichard, 1994) así como no disyunción en células en división (Mudry de Pargament et al., 1987; Mc.Carrol et al., 2002, Carballo, 2006).

Diferentes publicaciones ha comunicado el efecto genotóxico de TBZ sobre sistemas procariontes y eucariontes. Así, se reportó la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón (Barale et al., 1993; Marrazini et al., 1994). Natarajan (1993) describió perturbaciones en el aparato mitótico y disturbios en el huso en líneas CHO, si bien encontró que el TBZ induce micronúcleos cinetocoro negativos en fibroblastos humanos indicando aneugenicidad negativa a diferencia de lo observado en células Cl-1(Antoccia et al., 1991). Otros autores demostraron que no induce micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana, con y sin S9 –

Mix (Holden et al., 1980; Migliore y Neri, 1991; Van Hummelen et al., 1995) y no induce micronúcleos en células Luc2 de Hamster chino (Lynch y Parry, 1993) mientras que estudios recientes reportan la inducción de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana para el rango concentraciones de 0,5-50 ug/ml (Santovito et al., 2010). Adler (1991) realizó estudios en medula ósea y espermatoцитos de ratón encontrando resultados contradictorios (Aardema et al., 1998). El Ensayo Cometa se utilizó con ratones ddY y CD-1, a los que se les suministraron dosis orales de TBZ (200–2000 mg/kg) para determinar el daño al ADN en varios órganos como el estómago, hígado, pulmón, entre otros, y se encontraron incrementos significativos en la longitud del cometa (Sasaki et al. 1997). Otros ensayos *in vivo* analizaron aberraciones cromosómicas, carcinogénesis en mamíferos y mutagenicidad en bacterias (Lankas *et al.* 2001, Tada *et al.* 2001). Watanabe-Akanuma *et al.* (2003) no observaron efectos mutagénicos en bacterias expuestas a TBZ, aunque, informaron sobre su capacidad mutagénica cuando es foto activado con luz UV. Estudios realizados en diferentes modelos concuerdan con que la genotoxicidad del TBZ está asociada con la alteración del proceso de migración de los cromosomas a los polos causado por ausencia o interrupción del huso mitótico, evento que puede llevar a aneuploidía o poliploidía (Elhajouji et al., 1998; Tsuiki et al., 2001). Trabajos más recientes demostraron que TBZ induce el incremento de la frecuencia de intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica con y sin S9 –Mix. para las concentraciones 50 y 100 ug/ml. e incrementa significativamente las anomalías del huso mitótico en células CHO-K1. (Carballo et al., 2006)

A continuación se hace referencia a los sistemas en los que se evaluó el TBZ y los efectos genotóxicos registrados hasta el momento de redacción del presente trabajo de Tesis.

Sistema	Efecto genotóxico	Referencias
Levaduras	Aneugenicidad	Parry y Sors, 1993
<i>Aspergillus nidulans</i>	Aneugenicidad	Kappas et al, 1974
Rata	C-mitosis y mitosis aberrantes	Styles et al, 1973.
Línea celular CHO	Puentes anafásicos y husos multipolares	Mudry et al., 1987
Células embrionarias CHO	Disturbios en la segregación	Natarajan et al., 1993
Linfocitos humanos	Micronúcleos	Warret al., 1993
Oocitos de ratón	Micronúcleos Cyt B	Lynch y Parry ,1993
Espermatocitos de ratón	Aneuploidía	Mailhes etal., 1997
Hepatocitos de rata	Aneuploidía	Pacchierotti et al., 1982
Órganos de ratón	Citotoxicidad	Leopardi et al., 1993
Linfocitos humanos	Ensayo de cometa positivo	Nagatawa y Moore,1995
Hep G2 humanos	Micronucleo Cyt B	Sasaky et al., 1995
Línea celular linfoblastoide	Inducción de Cyt P4501 A1	Delescluse et al., 2001
Línea celular linfoblastoide	Daño al ADN	Delescluse et al 2001
Órganos de Ratón	Incremento en la longitud edl cometa	Sasaky et al.,2002
CHO	Incremento de los ICH Anormalidades del huso mitótico	Carballo et al., 2006
Linfocitos de Sangre Periférica Humana	Incremento de ICH y CPC	Carballo et al., 2006

Estudios recientes sugieren que el TBZ afecta la dinámica de los microtúbulos despolimerizando y alterando el balance entre el conjunto de monómeros de tubulina y microtúbulos polimerizados inhibiendo la síntesis de tubulinas por control autoregulatorio (Pisano et al., 2000; Carballo et al., 2006). Las estructuras microtubulares son esenciales para una mitosis funcional y esto requiere un perfecto balance entre el ensamblaje y desensamblaje de las moléculas de tubulina (Sammak y Borisy 1988; Cassimeris et al., 1988). El efecto disruptor microtubular despierta interés dado el uso terapéutico del TBZ y por ser veneno mitótico que inhibe la polimerización de los microtúbulos, se constituyen en compuestos químicos de interés para ser utilizados en la investigación de los procesos que involucran la formación de los microtúbulos (Riffell et al., 2009).

O
B
J
E
T
I
V
O
S

E

H
I
P
Ó
T
E
S
I
S

OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivo general:

Evaluar el potencial genotóxico de los agentes químicos Metronidazol y Tiabendazol por medio de ensayos realizados en *Allium cepa* variedad Valcatorce

Objetivos específicos:

- 1- Evaluar la información aportada por el sistema de ensayo acerca de los mecanismos de acción genotóxica de agentes químicos pertenecientes al grupo imidazólico.
- 2- Ampliar el conocimiento del sistema de ensayo *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad
- 3- Aplicar las metodologías de análisis de daño microtubular utilizadas en otros modelos, en *A. cepa* y generar parámetros de evaluación
- 4- Caracterizar y evaluar los posibles daño oxidativo y respuesta antioxidante en el sistema de raíz de *A. cepa* por exposición a MTZ.
- 5- Integrar los nuevos hallazgos sobre efecto genotóxico de compuestos imidazólicos en la raíz de *A. cepa*, con los conocimientos producidos por el grupo de investigación en distintos modelos experimentales animales *in vivo* e *in vitro*.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS 1:

H₀: El metronidazol (MTZ) en su formulación comercial Flagyl® no ejerce acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

H_a: MTZ en su formulación comercial Flagyl® ejerce acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

HIPÓTESIS 2:

H₀: MTZ en su formulación comercial Flagyl® no produce daño oxidativo ni respuesta antioxidante en la raíz de *Allium cepa* (Valcatorce)

H_a: MTZ en su formulación comercial Flagyl® produce daño oxidativo y respuesta antioxidante en la raíz de *Allium cepa* (Valcatorce)

HIPÓTESIS 3:

H₀: El Tiabendazol (TBZ) en su formulación comercial Foldan® no ejerce acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

H_a: TBZ en su formulación comercial Foldan® ejerce acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

HIPÓTESIS 4:

H₀: TBZ en su formulación comercial Foldan® no induce daño en los microtúbulos de las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

H_a: TBZ en su formulación comercial Foldan® induce daño en los microtúbulos de las células meristemáticas de *Allium cepa* (Valcatorce)

M
A
T
E
R
I
A
L
E
S

Y

M
É
T
O
D
O
S

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Bulbos de *Allium cepa*

Para el presente trabajo se utilizaron bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) como modelo experimental en plantas vasculares. En este sistema de ensayo, los tejidos meristemáticos y de elongación, que forman parte de la raíz en crecimiento, se exponen a las sustancias cuyo efecto se desea evaluar, con el fin de analizar indicadores toxicológicos, como la elongación de la raíz, y genotoxicológicos como la inhibición en la división mitótica, alteraciones en la duración de las fases del ciclo celular y aberraciones cromosómicas inducidas en anafase-telofase.

La utilización de esta especie vegetal como modelo experimental, presenta como ventajas la disponibilidad del material de estudio, su bajo costo y la baja complejidad de su implementación (Grant, 1982). Otras características de interés están relacionadas con la posibilidad de exposición directa del ápice, un tejido altamente proliferante que mantiene intactos los procesos celulares y se constituye como un modelo in vivo y como tal, corresponde al Nivel 3 de análisis de genotoxicidad (Mudry y Carballo, 2006).

3.1.1.1. Procedencia de los bulbos

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una especie cultivada en Argentina en San Juan, Mendoza y sur de Buenos Aires. Taxonómicamente, pertenece a la familia de las Liliáceas y como característica de comercialización, representa el 16% de las exportaciones de hortalizas. Como particularidades de su fisiología, la cebolla cumple un ciclo bienal, forma el bulbo en el primer año y florece en el segundo. Los bulbos, después de cosechados y antes de su acondicionamiento, se seleccionan de acuerdo a las características de la variedad en cuanto a la forma, el color, el tamaño y la sanidad. La conservación en cantidad después de la cosecha se puede hacer a campo o en depósitos techado en contenedores (Gaviola, 1997)

El valle bonaerense del Río Colorado es la principal zona productora de cebolla de la Argentina. La bulbificación es inducida por la interacción entre el largo del día y la temperatura, y esta interacción determina los límites de adaptación para las diferentes variedades. El fotoperíodo es el factor más importante en la formación del bulbo, de este modo las variedades se pueden clasificar como de día corto, intermedio o largo. Las de día corto corresponden a la “valencianita”, las de intermedio a la “torrentina” y las tardías a las “valencianas”, entre éstas se destaca la variedad “valcatorce” que es una variedad de día largo. Para bulbificar necesita una duración del día de más de 16 horas. Esta variedad abarca el 90 % de la superficie cultivada en la Argentina. El resto se reparte entre “cobriza” INTA, “valuno” INTA y “grano de oro” (Izcovich, 1999). La variedad “valcatorce” (Fig. 1) fue desarrollada originalmente en la región cuyana. Es el cultivar que se comporta más satisfactoriamente en cuanto a rendimiento y en

conservación post-cosecha (Galmarini, 1997).

En el presente trabajo de Tesis se utilizó la variedad “valcatorce” desarrollada por el INTA, por ser la de mayor disponibilidad, rendimiento y conservación post-cosecha en el período comprendido entre abril y septiembre de cada año y en el que se realizaron los experimentos de laboratorio.



Fig.1 Cosecha de bulbos “valcatorce” en el valle del río Colorado (Escala 1:25)

3.1.1.2. Conservación del material

Los bulbos utilizados en este diseño experimental, correspondieron a la cosecha de cada año en curso (2004, 2005, 2006 y 2007). Los mismos se recibieron entre marzo o abril de cada año provenientes de cultivares del sudeste de la provincia de Bs. As. Una vez recibidos, los bulbos se conservaron en heladera a 4°C hasta su utilización dentro del mismo período anual.

3.1.2. Agentes químicos evaluados

Para el desarrollo de las investigaciones del presente trabajo de Tesis se utilizaron las siguientes formulaciones farmacéuticas y comerciales conteniendo principios activos y excipientes.

-Flaglyl[®] suministrada por Lab. Phrone-Poulenc Rorer (MTZ 500 mg, Excipientes c.s.). Principio activo: Metronidazol (1-(hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol). Fórmula química: C₆H₉N₃O₃. Peso molecular: 171,15. CAS RN 443-48-1.

-Foldan[®] suministrado por laboratorios Andrómaco (TBZ 500 mg, Excipientes c.s.). Principio activo: Tiabendazol; (2-(tiazol-4-il)-benzimidazol). Fórmula química: C₁₀H₇N₃S. Peso molecular: 201,2. CAS RN 48-79-8.

-Azzurro[®] suministrado por laboratorios Chemiplant (zineb 70%, excipientes 30%) Principio activo: zineb; etilen-bis-ditiocarbamato de zinc. Fórmula química: C₄H₆N₂S₄Zn. Peso molecular: 275,78. CAS RN 12 122-67-7. Se utilizó para la puesta a punto de la técnica de inmunolocalización de microtúbulos.

3.1.2.1. Solvente

-Dimetil sulfóxido, suministrado por Laboratorios Baker. (DMSO). Fórmula química: C₂H₅SO. Peso molecular: 78,13 CAS RN: 67-68-5. Se utilizó como solvente para vehicular los compuestos a evaluar.

3.1.2.2. Control negativo

Para todos los experimentos, el control negativo fue el agua utilizada para realizar las diluciones de los compuestos que consistió en agua corriente filtrada con filtros SPA®.

3.1.2.3. Control positivo

-Grisovin® suministrado por laboratorios Glaxo (TBZ 500 mg, Excipientes c.s.). Principio activo: griseofulvina: ácido-2- (acetiloxi) benzoico. Fórmula química: C₁₇H₁₇ClO₆. Peso molecular: 352,76 g/mol CAS RN126-07-8 utilizada como control positivo en los ensayos con TBZ por su demostrado efecto como disruptor microtubular e inductor de aberraciones cromosómicas.

3.1.3. Colorantes para cromosomas

-Orceína acética

-Orceina BioPack. (CAS N° 1400-62-0). Diclorhidrato de 4',6-diamidino

-2-fenilindol (DAPI), Merck.

-Ioduro de propidio, Sigma

-Medio de montaje con “*antifading*” (Vectashield mounting medium H1000 Vector Laboratories, Burlingame , CA, USA).

3.1.4. Anticuerpos anti β -tubulina

-Fluoresceína isocianato (FITC) conjugado con anticuerpo monoclonal anti β -tubulina, Sigma

3.1.5. Reactivos para medición de daño oxidativo

-Inhibidores de la proteasa benzamidina 0,2 mM y fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0,5 Mm

-buffer fosfato 50mM, pH 7-8, metionina 13mM, EDTA 0,1mM.

-Actividad superóxido dismutasa (SOD): Nitro Blue Tetrazolium NBT.

-Actividad catalasa (CAT): peróxido de hidrógeno. Fórmula química: H₂O₂.

-Glutatión reducido (GSH): 5, 5-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB).

-Peroxidación lipídica (TBARS): ácido tiobarbitúrico (TBA).

-Ácido Ascórbico y dehidroascórbico (ASC, DHA): ácido tricloroacético, ácido ortofosfórico, α,α' -dipiridil, cloruro férrico.

3.1.6. Fijadores

Fijador para tinción estándar:

-Ácido acético glacial, Merck (CAS N°: 64-19-7). Fórmula química: CH₃COOH/C₂H₄O₂. Peso molecular: 60,1.

-Etanol, Merck (CAS N° 64-17-5). Fórmula química: CH₃CH₂OH. Peso molecular: 46,1.

-Fijación para inmunolocalización (pH= 8,2)

-Para-formaldehído, Merck (CAS N° CAS 30525-89-4). Fórmula química: (CH₂O)_n

Peso molecular: 30

3.1.7. Tampones

-Buffer estabilizador de microtúbulos (MSB) (Inmunolocalización)

-PIPES Piperazine.1, 4-bis (ácido etanosulfónico), 1.5 Sodio. Merck (CASN° 5625-37-6). Fórmula química: C₈H₁₈N₂O₆S₂. Peso molecular: 302,35.

-EGTA ácido etilenglicol-bis-(β-aminoeti) tetraacético (CAS No.: 67-42-5) Fórmula química: C₁₄H₂₄N₂O₁₀. Peso molecular: 380,35

-Sulfato de magnesio

-Buffer para homogenatos (daño oxidativo)

-Fosfato de Sodio (CAS N°7558-79-4). Fórmula Química: Na₂HPO₄.Peso Molecular: 141,96

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético (CAS N°60-00-4). Fórmula Química: C₁₀H₁₆N₂O₈. Peso Molecular: 294

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo de bulbos de *Allium cepa* Valcatorce

Los bulbos de *Allium cepa* Valcatorce fueron utilizados para inducir el crecimiento de las raíces adventicias que surgen del primordio ubicado en el disco inferior de los mismos. Para los ensayos se eligieron bulbos de tamaño parejo y pequeños. Como máximo se sumergen en el líquido La 2/3 partes inferiores del

bulbo. El ingreso de agua a las células del primordio induce el crecimiento de raíces adventicias. Estas raíces crecen en el medio líquido que puede ser suplementado con agentes químicos o mezclas complejas para evaluar el efecto sobre varios aspectos relacionados con el proceso de crecimiento. El crecimiento de la raíz se produce por la contribución de 2 procesos. La división celular que ocurre en la región meristemática de la raíz que es el extremo distal con respecto al bulbo y la elongación de las células que se originan a partir de las meristemáticas formando en la región proximal contigua a la meristemática la zona de elongación. En la región proximal al bulbo la raíz presenta células más diferenciadas. Los aspectos evaluados por la exposición de agentes son la inhibición de la elongación de la raíz considerado un parámetro macroscópico e indicador de toxicidad y los cambios citológicos y citogenéticos, por efectos sobre la división celular, parámetros microscópicos indicadores de genotoxicidad. La exposición se realizó siempre después de permitir el surgimiento de las raíces hasta aproximadamente 1 cm (24 horas, para asegurar que el bulbo produjera raíces). Una vez finalizada la exposición de las raíces, las mismas se utilizan como sistema de estudio.

3.2.1.1. Condiciones de cultivo

Las condiciones en que se realizaron los cultivos se determinaron a partir de los métodos de la literatura. La metodología para el suministro de oxígeno y el tiempo de exposición se determinaron después de realizar ensayos para estudiar la variación de oxígeno durante el crecimiento de las raíces en función de la necesidad de aportar aire exterior.

El tiempo de exposición se determinó a partir de estimar el tiempo que

transcurre en un ciclo celular para las células meristemáticas de *A. cepa* var. Valcatorce.

3.2.1.2 Condiciones de temperatura y pH

La temperatura es un factor condicionante para los procesos biológicos y en el caso de la división celular, es sabido que dentro de cierto rango fisiológico no interfiere en los procesos aunque puede modificar la velocidad del ciclo. En diferentes estudios se intentó establecer la duración del ciclo celular en *Allium cepa*, para diferentes valores de la temperatura (Nutti Ronchi y Arcara, 1967; López Sáez et al, 1966; Matagne, 1968) sin embargo los resultados hallados hasta la redacción de este trabajo de Tesis, no son conclusivos y las diferencias también pueden ser explicadas por otros factores relacionados con las condiciones experimentales. Durante el desarrollo de la presente Tesis se mantuvieron las condiciones de temperatura entre 22 y 23 °C. Durante los ensayos, el pH se mantuvo cercano a 7 y el mismo se midió y controló con Ph metro Checker® (Hanna instruments).

3.2.1.3. Condiciones de luz-oscuridad

Durante el tiempo en que transcurrieron los ensayos, los bulbos de cebolla se mantuvieron en una estufa de cultivo que funcionó como cámara oscura, con el fin de no interferir con el crecimiento de las raíces.

3.2.2. Acondicionamiento y exposición de los bulbos.

Para todos los experimentos realizados, los bulbos fueron preparados quitando las catáfilas exteriores y las raicillas del disco de crecimiento evitando dañarlo. Una vez enjuagados por 1 hora con abundante agua corriente, se colocaron en los recipientes conteniendo agua filtrada con el objetivo de estimular el crecimiento de las raíces durante 24 hs. Al finalizar este período se eligieron los bulbos de cada recipiente que cumplieran con la condición de haber comenzado el crecimiento de las raíces y que éstas tuvieran una longitud pareja entre 0,5 y 1 cm. Para el crecimiento de las raíces a partir de los bulbos se diseñaron recipientes de vidrio en forma de cubeta de 500 cm³ de capacidad. Los recipientes se colocaron en una estufa de cultivo 23 °C en la que se colocaron 10 bocas de suministro de aire. Ambas se conectaron por un orificio a 2 compresores ubicados en el exterior de la cámara. Por este medio se suministró aire a cada recipiente por burbujeo continuo. (Fig. 2).



Fig 2. Vista interior de la estufa que operó como cámara oscura donde se observan los bulbos de *Allium cepa* en las cubetas de cultivo con las respectivas bocas de aireación individuales (escala 1:7)

3.2.3. Preparación de las soluciones (muestras y controles)

Un comprimido conteniendo 500 mg de MTZ (Flagyl®), TBZ (Fodan®) o GSF (Gisovin®) fue diluido en 10 ml de DMSO para preparar la solución madre a partir de la cual se realizarían las diluciones de los agentes químicos a evaluar. Las diluciones se realizaron con agua filtrada que se utilizó como control negativo. Se prepararon concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 ug/ml. Las mismas se seleccionaron en base a trabajos previos en otros modelos (Rodríguez Ferreiro et al., 2002; Lopez Nigro et al., 2003). La concentración máxima del solvente DMSO en las soluciones de ensayo alcanzó el 1%. Se utilizó esa concentración para el control del solvente.

Para la puesta a punto de la técnica de inmunolocalización de tubulinas se utilizó la formulación de Zineb (Azzurro) 1 ug/ml y 10 ug/ml, como referencia a las concentraciones previamente utilizadas para el análisis en células de cultivo CHO en la Cátedra de Citología de la Universidad de la Plata, lugar donde se puso a punto la técnica de marcado con anticuerpos contra β -tubulina. Para preparar las soluciones de Azzurro (concentración aproximada de Zineb 70% p/p) se disolvieron 10 mg de la formulación en 1 ml de DMSO y se realizaron las diluciones hasta alcanzar las concentraciones 1 y 10 ug/ml de Azzurro.

3.2.4. Disponibilidad de oxígeno en las condiciones de cultivo

El porcentaje de saturación del oxígeno disuelto depende de la

temperatura del agua. La presencia de algunos minerales en una solución reduce la solubilidad de los gases debido a que las sales disueltas en agua reducen los espacios intermoleculares disponibles para la disolución del oxígeno. Los valores de solubilidad del oxígeno obtenidos en las condiciones de cultivo a la temperatura de trabajo, se encuentran condicionados por el suministro de aire, la salinidad de la muestra y el consumo biológico. Para garantizar la disponibilidad del oxígeno se han propuesto dos métodos. La aireación permanente o el recambio de la solución de trabajo cada 24 hs. Con el fin de evaluar la eficacia de ambas metodologías de suministro de oxígeno, se procedió a colocar los bulbos durante 24 horas con aireación constante y posteriormente, se procedió a retirar la aireación sólo a un grupo de bulbos. A partir de ese momento se midió la concentración de oxígeno con un oxímetro H19143 Hanna ® portable electronic meters, durante el tiempo que transcurrió el experimento a partir del inicio del ensayo. Dado que en el transcurso de las 24 hs, la depleción de oxígeno fue muy elevada en los grupos de bulbos sin aireación, se decidió utilizar la aireación constante como método de suministro de oxígeno para todos los experimentos.

3.2.5. Determinación de la duración del ciclo celular

El ciclo celular en *Allium cepa* determinado por González Fernández en 1966 es de 13,5 hs, la duración de la interfase en esas células es de 11,2 hs y la mitosis de 2,3 hs, con la profase de 64 min, la metafase de 18 min, anafase de 13 min y telofase de 42 min de duración. Estos valores pueden variar dependiendo de factores tales como la temperatura de cultivo, la disponibilidad de oxígeno del medio y la presencia de agentes tóxicos. Para el diseño de los experimentos

desarrollados en este trabajo de Tesis fue necesario conocer el tiempo aproximado del ciclo celular en la variedad utilizada para luego poder establecer el tiempo de la exposición de las raíces a los agentes en estudio. Para establecer la duración del ciclo celular en las células de *Allium cepa* variedad “valcatorce” se utilizó el método de marcación por inhibición de la citocinesis con cafeína desarrollado por Giménez Martin en 1965. El carácter binucleado es la condición de marcado de estas células. Los bulbos de *Allium cepa* se pusieron a germinar en agua corriente filtrada con aireación continua y a 23 °C durante 24 horas, tiempo en el que las raíces alcanzaron una longitud aproximada de 1 cm. Posteriormente, se agregó una solución de cafeína 5 mM (0,1%) obtenida de una solución stock 10x. Las raíces se expusieron durante 1 hora a la cafeína. La concentración de cafeína utilizada indujo la inhibición irreversible de la citocinesis, sin presentar efectos adversos ni detener el ciclo celular. El momento de acción de la cafeína representa el 1% de la duración total del ciclo y tiene lugar en la telofase tardía. La observación del tejido meristemático tratado permite seguir las células binucleadas hasta que las mismas vuelvan a ingresar a la mitosis y de este modo se obtiene el tiempo de duración del ciclo celular. A la estimación realizada se le sumaron dos horas considerando que las exposiciones pueden retrasar el ciclo celular.

3.2.6. Evaluación de toxicidad

Para la evaluación de toxicidad se siguió el protocolo propuesto por Fiskesjo (1985, método I). El mismo consistió en dejar crecer las raíces expuestas con los compuestos a evaluar y dos grupos que se dejaron crecer en agua (control) y solución con solvente dimetilsulfóxido al 1% durante 72 horas

respectivamente. La inhibición en el crecimiento es indicador de toxicidad para los procesos involucrados en el mismo. La evaluación de toxicidad permite seleccionar las concentraciones para la evaluación de genotoxicidad ya que aquellas concentraciones que inhiben el crecimiento de las raíces en más del 50 % con respecto al control son descartadas para dicho análisis.

3.2.6.1. Medición de las longitudes

Una vez que Los bulbos se retiraron del recipiente las raíces fueron medidas tomando 20 raíces de cada bulbo y calculando el promedio por concentración. Otra forma de medir las raíces es tomando la medida del “mechón” de raíces de cada bulbo para cada concentración. La inhibición del crecimiento se relativiza con el crecimiento de las raíces expuestas al control tomando éste como el 100%. A partir del porcentaje de inhibición del crecimiento se estableció la concentración efectiva 50 (CE₅₀) como la concentración que presenta valores por debajo del 50 % de los valores observados en el control.

3.2.7. Evaluación de genotoxicidad

Para la evaluación de genotoxicidad, la exposición de las raíces a los agentes estudiados correspondió a dos ciclos de división. En cada recipiente se colocaron 5 bulbos con el disco del primordio sumergido en agua. Una vez finalizada la exposición, las raíces se cortaron con una longitud de aproximadamente 2 cm desde el ápice y se fijaron en 3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético, durante 24 hs, en heladera. Posteriormente se transfirieron a una solución de

etanol 70% hasta el momento de la realización de preparados. El efecto genotóxico de cada agente a evaluar se midió a través de la cuantificación de indicadores de alteraciones inducidas en el ciclo celular, daño cromosómico y anomalías en la segregación de las cromátidas y de la citocinesis.

Los biomarcadores vinculados a dichos eventos son los siguientes:

Alteraciones en el ciclo: Inhibición del índice mitótico.

Alteraciones en los índices de fase.

Daño cromosómico o clastogénesis: Fragmentos acéntricos, puentes anafásicos o telofásicos, anillos, micronúcleos.

Anomalías en la segregación de las cromátidas y citocinesis: Cromosomas rezagados, C-metafases, poliploides, Husos tripolares o multipolares, Anafases desorganizadas, Micronúcleos, Células binucleadas, Minicélulas.

3.2.7.1. Obtención de preparados

Las raíces se colocan durante 10 minutos en una solución de ácido clorhídrico 1 N, para disgregar la pared celular y permitir el ingreso del colorante al interior de la célula. Al finalizar la digestión de la pared celular se separa el ápice de la raíz y se coloca sobre un portaobjetos con una gota de orceína acética. Con aguja de disección se disgrega el material y se coloca un cubreobjetos aplicando la técnica de aplastado. Para la observación de las células se utiliza microscopio de campo claro en 400 y 1000 aumentos (Leica DMLB).

3.2.7.2. Determinación del índice mitótico y de fases

El índice mitótico (IM) se calculó como el número de células en división cada 1000 células totales observadas.

Los índices de fases (P, M, A, T) se calcularon como el número de células en cada fase / células totales en división.

3.2.7.3. Determinación de la frecuencia de Micronúcleos

Los Micronúcleos pueden ser considerados como aberraciones de los núcleos interfásicos y se calcularon como número de micronúcleos sobre 1000 núcleos interfásicos. Las minicélulas y las yemas nucleares (del inglés, " *nuclear bud*" o "*Buds*") fueron contabilizados de la misma forma en el casos de haber sido observados.

3.2.7.4. Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas

Aberraciones anafase –telofase: Se calcularon las frecuencias de cada uno de los indicadores de daño cada 100 anafases – telofases, expresando los resultados como porcentaje de mitosis anormales totales. Las células binucleadas, dado que se pueden observar en interfase o en división, se calcularon sobre 1000 células totales observadas.

3.2.8. Análisis de daño microtubular en células expuestas a TBZ

Una vez finalizada la exposición a TBZ, siguiendo el mismo protocolo aplicado para evaluar la genotoxicidad, las raíces fueron fijadas durante 45 minutos a temperatura ambiente en una preparación de para-formaldehído al 4% en tampón estabilizador de microtúbulos (MTBS).

3.2.8.1. Obtención de los preparados

Finalizada la fijación, se realizaron 3 lavados de 45 minutos en MTBS, se quitó todo el volumen posible del buffer con pipeta de 200 ul cuidando de no dañar los ápices y se añadieron 10 ul de mezcla de enzimas durante 20 minutos a 37^a C, para digerir la pared celular. La mezcla enzimática se compone de dos soluciones: Solución A: Celulasa 2% P/V – Pectinasa 20 % V/V en MTBS. Solución B: Celulasa Ozonuka 2% P/V – Pectinasa 20 % V/V en MTBS. Para preparar la solución de trabajo: se colocan 4 partes de solución A y 1 parte de solución B. Seguidamente, se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno en MTBS. Se coloca el material sumergido en MTBS en hielo y se separan los ápices para el aplastado sobre portaobjetos. Se coloca el cubreobjetos y se repiquetea sobre el mismo aplastándolo con papel absorbente. Posteriormente se coloca en hielo seco hasta su congelamiento y se hace saltar el cubre con un bisturí. Una vez descongelado se coloca en un vaso de Koplín con MTBS para evitar la formación de los cristales de hielo.

3.2.8.2. Inmunolocalización de tubulinas

Los portaobjetos conteniendo las células se colocaron en metanol (Merck K

GaA, Darmstad, Germany) a $-20^{\circ}\text{C}^{\circ}$ para su fijación. Seguidamente, se realizaron 2 lavados de 15 min en MTBS. Para la marcación, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal antitubulina conjugado con FITC. El anticuerpo se diluyó 1:50 en MTBS conteniendo 3 % de albúmina bovina (Sigma). Se colocan 50 ul del anticuerpo en cada preparado. Se les coloca un cubreobjetos y se deja incubando en estufa ,en oscuridad, a 37^{a} durante 3 horas. Al finalizar la incubación, , se quita con cuidado el cubreobjeto y se realizan lavados con MTBS de 5 min cada uno. Para la contratinción de la cromatina, los preparados se colorearon con Ioduro de propidio (0,1 ug/ml, 10 minutos, Sigma) en la primer serie de experimentos y en las siguientes, con solución DAPI 2,5 mg/ml. con el colorante diluido al 0,05 % V / V.

3.2.8.3. Determinación del daño microtubular

Se analizaron las siguientes estructuras microtubulares: Bandas preprofàsicas (BPP), husos mitóticos (HM) y fragmoplastos (Fg). Se registró la presencia de estructuras normales y anormales (entre ellas ausentes o no formadas). Como figuras anormales se consideraron los husos mitóticos incompletos o desorientados, husos tripolares, bandas preprofàsicas incompletas, fragmoplastos no conformados o ausentes y figuras aberrantes en las que los microtúbulos se encontraran sin una clara morfología. Los registros se realizaron sobre 1000 células.

3.2.9. Respuesta al daño oxidativo en células expuestas a MTZ.

Las células expuestas a 250 ug/ml de MTZ se sometieron a estudios de daño oxidativo y respuesta antioxidante. Esta concentración se eligió por ser la más alta que se utilizó para los estudios de evaluación de genotoxicidad de MTZ.

3.2.9.1. Obtención de los homogenatos

Una vez finalizada la exposición las raíces tratadas con MTZ y las no tratadas, fueron cortadas en piezas de 2 mm para obtener la zona meristemática y la zona de elongación separadamente. El tejido para la preparación de cada homogenato fue pesado hasta alcanzar 200 mg. Los tejidos fueron colocados en tubos cónicos descartables de 2ml(Eppendorf) (que fueron mantenidos permanentemente en hielo) con buffer fosfato 50 mM a pH 7 conteniendo 1 mM de EDTA. Como inhibidores de proteasas se utilizaron benzamidina 0,2 mM y PMSF 0,5 mM. El tejido fue macerado durante 20 minutos y el extracto fue centrifugado con centrífuga refrigerada a 4°C en 8000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante se le agregaron inhibidores de la proteasa: benzamidina 0,2 mM y fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0,5 mM. Los sobrenadantes se utilizaron como fuente enzimática.

3.2.9.2. Determinación de indicadores de daño oxidativo no enzimáticos.

Para la medición del daño oxidativo se utilizaron como marcadores no enzimáticos el contenido de malóndialdehído (MDA) mediante la técnica del TBARS, sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (Vavilin et al.,1998), los

niveles de glutatión (GSH), por reacción con el ácido di-tio-nitrobenzoico (DTNB) (Anderson, 1958) y el contenido de ácido ascórbico (AA) que se estima usando el método de biperidil (Knorz et al., 1996) y dihidroascórbico (DHA) por medio de la reducción a ácido ascórbico por incubación con ácido ditiotreitól (Okamura, 1980). Como marcadores enzimáticos se utilizaron la actividad Superóxido Dismutasa (SOD) dada la capacidad de inhibir la reducción fotoquímica del NBT(nitro blue tetrazolium) (Beauchamp y Fridovich, 1971) y la actividad Catalasa (CAT) que se mide por el incremento en la concentración de H₂O₂ por registro de absorbancia en 240 nm (Claiborne, 1985). El contenido de proteínas solubles totales se midió por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Los resultados se expresaron como microgramos de proteína por ml de homogenato.

Determinación de peróxidos lipídicos

Los productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peróxidos de lípidos) reaccionan con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido a temperatura, para dar malondialdehído (MDA), compuesto coloreado (rosado) que se puede medir espectrofotométricamente por su pico de absorción a 532 nm (Janero, 1990). 11g del sobrenadante obtenido del homogenato total fue mezclado con una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) seguido de incubación a 95 - 100 °C durante 15 min. Cuando se enfrió, la mezcla de reacción fue centrifugada y se determinó la absorbancia del sobrenadante en 535 nm. La concentración de TBARS fue estimada usando el coeficiente de extinción del complejo MDA-ácido tiobarbitúrico.

Determinación del contenido de Glutación reducido (GSH)

Se determinó el contenido de glutación reducido mediante el método de Anderson (1985) en presencia de ácido di-tio- nitrobenzoico (DTNB).

Dado que $2\text{GSH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{GSSG} + \text{TNB}$ donde el DTNB oxida al GSH generando un compuesto coloreado, el TNB (tio-nitrobenzoico), que se monitorea a 412 nm.

El homogenato celular se desproteinizó utilizando ácido sulfosalicílico al 10% durante 30 min y luego se centrifugó durante 10 min a 8000 rpm. En cada tubo se colocaron 80 uL de muestra, 335 uL de ácido 5, 5-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico y 585 uL de buffer fosfato de Sodio 0,143M, a pH 7,5, conteniendo 6,3 mM de EDTA. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 412 nm. Para determinar el contenido de GSH reducido en las muestras se utilizó una curva estándar. Los resultados se expresaron como nmol GSH por mg de proteínas

Determinación de ácido ascórbico (AA) y dihidroascórbico (DHA)

El contenido de AA fue estimado utilizando el método de dipiridil. Muestras de homogenato fueron preincubadas en 0,5 mM de ditioneol (DTT) para reducir el DHA y posteriormente medir el AA total. La concentración de DHA fue estimada por diferencia entre el valor de AA obtenido después de la preincubación con DTT menos el contenido de AA medido sin preincubación con DTT.

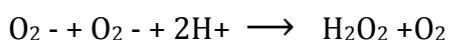
3.2.9.3. Determinación de indicadores de daño oxidativo enzimáticos.

Superóxido dismutasa (SOD)

Se determinó la actividad SOD midiendo la habilidad para inhibir la reducción del Nitro Blue Tetrazolium (NBT) mediante la utilización de la técnica de Beauchamp y Fridovich, 1971.

El ensayo consiste en generar anión superóxido (O_2^-) a partir de la reducción de riboflavina y mediante el NBT, detectar el radical a través de una reacción colorimétrica que se puede cuantificar a 560 nm.

Riboflavina + luz \rightarrow O_2^- + NBT Azul de formazán (color azul)

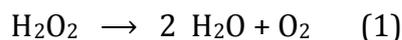


SOD

Se midió la actividad enzimática sobre la base de la capacidad de la enzima para inhibir la reducción de la fotoquímica nitroblue tetrazolio (NBT). Se agregó buffer fosfato 50mM, pH 7,8, metionina 13mM, EDTA 0,1mM, NBT y 0-8 uL (0, 2, 4 y 8) de extracto enzimático. Por último se agregaron 46 uL de riboflavina, llegándose a un volumen final de 3mL. Los tubos se mezclaron y se colocaron a 30 cm de 2 tubos fluorescentes de 15W durante 15 minutos. Luego se procedió a la lectura en espectrofotómetro a 560 nm. Los resultados se expresaron como unidades de SOD por mg de proteínas. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzimas necesarias para inhibir el 50% de reducción de la tasa de NBT.

Catalasa (CAT)

La enzima catalasa interviene en la siguiente reacción:



Catalasa

La medición de la actividad enzimática en condiciones de saturación de sustrato es imposible dado que la enzima se inactiva por concentraciones de peróxido de hidrógeno mayores que 0.1 M (Aebi, 1984). Sin embargo, la descomposición del peróxido de hidrógeno responde a una reacción de primer orden, siempre que se utilicen intervalos de reacción cortos y concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 0,01 y 0,05 M (Lück, 1963).

Metodología: A una cubeta de cuarzo con 1 ml de buffer K-fosfato 40 mM pH 7,5, se agregaron de 30 a 40 μl de homogenato celular, tomando la lectura del valor de absorbancia a 240 nm como línea de base (blanco). La acción catalítica se inició con el agregado de 10 μl de H_2O_2 3 M. Se tomaron lecturas de los valores de absorbancia a 240 nm cada 5 segundos entre los 0 y 60 segundos (intervalo en el que se obtuvo la estabilización de la pendiente). Los resultados se expresaron como unidades CAT por mg de proteínas. Una unidad CAT se define como la cantidad de enzimas que transforman 1 mmol de H_2O_2 por min.

3.2.10. Análisis estadístico de los datos

La prueba "t" de Student para muestras independientes fue aplicada para las comparaciones estadísticas de los datos de longitudes de las raíces, índice mitótico, aberraciones cromosómicas anafase-telofase y células binucleadas así como en la evaluación de genotoxicidad y la frecuencia de estructuras microtubulares normales y anormales. Se compararon los datos obtenidos en los diferentes

tratamientos con respecto a los controles negativos. Para las pruebas "t" de Student se utilizó el programa Statistica (1999).

Los resultados para las variables vinculadas al daño oxidativo y la respuesta antioxidante se compararon estadísticamente utilizando la prueba de t-Student. Los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza se probaron con las pruebas Lillieford y Bartlett, respectivamente. Para el análisis estadístico se utilizó el software Graph Pad Prism 3.

**R
E
S
U
L
T
A
D
O
S**

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del ciclo celular

Los estudios de toxicidad y genotoxicidad utilizando *Allium cepa* como modelo experimental, se iniciaron con la puesta a punto de la caracterización de su ciclo celular. Los estudios referidos fueron realizados después de estudiar la duración del ciclo celular para la variedad Valcatorce en las condiciones en las que fueron realizados los ensayos. Para ello se utilizó el método de marcación por inducción de células binucleadas propuesto por Giménez Martín (1965). Tal como se detalló en Materiales y Métodos, se empleó cafeína como bloqueador de la citocinesis poniendo en evidencia la formación de células binucleadas. El estudio de meristemas en activa división, permite establecer el número relativo de células en cada fase del ciclo y así determinar la duración absoluta de cada una de esas fases. El análisis de fases se realizó a partir de la observación de células en división mitótica con tinción estándar.

4.1.1. Marcación de las células

La acción de la cafeína se produce durante el final de la telofase por lo tanto, el seguimiento en el tiempo de las células binucleadas permite detectar el ingreso a la mitosis subsiguiente y así medir el tiempo transcurrido durante la interfase. Para esto es necesario realizar fijaciones periódicas de las raíces desde el tiempo cero, que es el momento en que se agrega cafeína al medio de cultivo, hasta que se

observan las primeras células binucleadas en profase (biprofases). Los intervalos en el que se realizaron las fijaciones fueron 6, 8, 9, 12 y 13 hs. En cada intervalo se extrajeron entre 5 y 10 raíces para realizar la fijación y el resto se dejó en el medio de cultivo. Posteriormente se realizaron los preparados para su observación al microscopio óptico utilizando las raíces correspondientes a cada intervalo. Los datos obtenidos de las muestras correspondientes a los intervalos entre 0-12 hs fueron considerados como los valores de Índice mitótico y del porcentaje de células binucleadas. (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de células en división y binucleadas en raíces meristemáticas de *Allium cepa* tratadas con cafeína.

Tiempo hs	(%)Céls en división X±DS	(%)Céls binucleadas X±DS
0	7,64±1,46	-
6	7,77±1,50	2,70±0,64*
8	7,26±0,69	2,67±0,71*
9	7,03±1,59	2,29±0,77*
12	7,34±1,48	2,24±0,67**

Los porcentajes de células en división y binucleadas se calcularon sobre 1000 células totales observadas.

* Células interfásicas

**Células en interfásicas y profásicas.

Para los intervalos de 12 y 13 horas se calcularon las células binucleadas en división mitótica con respecto al total de células observadas y los porcentajes de células binucleadas en división con respecto al total de células binucleadas. En la hora 12 se observó que una fracción de células binucleadas se encontraba en

profase mientras que a las 13 horas el aumento de células binucleadas en diferentes estadios de mitosis aumentaba considerablemente (Tabla 2)

Tabla 2. Células binucleadas en división en meristemas de raíces de *Allium cepa* a las 12 y a las 13 hs. de exposición a cafeína

hs	(%) Cél. binucleadas en división / células. totales	(%) Cél. binucleadas en división/ células. binucleadas totales
12	0,22±0,14	9,19±3,41
13	1,31±0,39	59,11±3,31

Al observar un preparado de meristemas de raíces de *Allium cepa* en el microscopio óptico, la probabilidad de encontrar una célula en un dado estadio del ciclo celular es función del tiempo que ésta permanece en el mismo. Por lo tanto, el porcentaje de células observadas en mitosis bajo condiciones normales de crecimiento es proporcional al tiempo de duración de la mitosis.

Las primeras células binucleadas en profase (biprofases) se detectaron en la muestra de 12 horas. La división mitótica para esas células marcadas (por su condición de binucleadas) ocurrió en los momentos previos de cumplidas las 12 horas. Siguiendo el mismo razonamiento, la fracción de células en un estadio, es proporcional al tiempo en que se encuentran en el mismo, por lo tanto el porcentaje de biprofases será proporcional al porcentaje del tiempo que esas células se encuentran en profase. El valor correspondiente a ese porcentaje se resta entonces de las 12 horas y es el tiempo que corresponde a la interfase.

4.1.2. Estimación de la duración del ciclo celular

El porcentaje de células en interfase se calcula por diferencia con el valor de IM expresado en %. Considerando que ese valor porcentual corresponde a la interfase y que el 100% corresponde a la totalidad del ciclo, se realiza el siguiente cálculo en el que se obtiene el tiempo correspondiente al transcurso de un ciclo celular.

$$T_c \text{ (hs)} = T_i \times 100\% / (100 - IM)\%$$

Donde :

T_c: Tiempo correspondiente al ciclo celular

T_i: tiempo correspondiente a la interfase

100-IM es el porcentaje de las células correspondiente a la interfase.

Finalmente restando al tiempo total, el tiempo de la interfase, se conoce el tiempo correspondiente a la mitosis T_m.

$$T_m = T_c \times IM / 100$$

Conociendo las fracciones relativas a cada fase de la mitosis y por medio de los valores del índice de fases se infiere el tiempo que corresponde a cada una de las fases del ciclo celular (Tabla 3). En síntesis, la observación en el microscopio de las células meristemáticas de *Allium cepa* permite medir el tiempo en el que transcurre la interfase, el porcentaje de células en mitosis y de cada fase mitótica. Una vez obtenidos estos datos se estiman, el tiempo que transcurre durante el ciclo total, la mitosis y el tiempo que toma cada fase de la mitosis.

Este análisis se realizó para 3 muestras independientes obteniendo así valores promedio y desvío estándar de cada uno de los valores mencionados.

Tabla 3. Índice mitótico, índice de fases (P, M, A, T) y duración en minutos de la mitosis y de cada fase, obtenidos a partir de células meristemáticas de *A. cepa* (cultivo de 12hs)

	X± DS	Duración (min)
IM	7,34±1,48	56±7,74
P	67,69± 4,53	38,50±7,58
M	9,95± 6,56	5,61±0,60
A	14,61± 3,06	8,08±0,73
T	7,33± 0,54	4,34±0,33

P: Profase; M: Metafase; A: Anafase; T: Telofase

La duración aproximada del ciclo celular de *A. cepa* variedad Valcatorce es de 13 hs. Las muestras obtenidas a las 12 horas fueron utilizadas para estimar la duración de la mitosis y de cada fase ya que de las mismas se infiere el valor del tiempo correspondiente a la interfase (Tabla 4).

Tabla 4. *A. cepa*: Tiempo del ciclo celular, la mitosis y la interfase

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio±DS
Tc (hs)	12,78	13,16	12,87	12,94±0,20
Tm (hs)	0,79	1,16	0,87	0,94±0,19
Ti (hs)	11,98	11,95	11,98	11.79±0,02

Tc: Tiempo transcurrido durante el ciclo celular. Tm: tiempo transcurrido durante la mitosis. Ti: Tiempo transcurrido durante la interfase. hs: horas

Teniendo en cuenta la variabilidad y considerando que la exposición a agentes puede incidir sobre la duración del ciclo celular, se determinó que la exposición

de las raíces durante 30 hs. es un tiempo adecuado para asegurar el paso por dos ciclos de división para la variedad INTA Valcatorce y que permitía evaluar el efecto de los agentes estudiados sobre el ciclo celular y las distintas fases y estructuras comprometidas en el mismo.

4.2. Determinación de las concentraciones de oxígeno en los medios de cultivo con y sin aireación

Los valores de concentración de oxígeno en las soluciones se determinaron en condiciones de suministro de aire con burbujeo continuo y sin suministro de aire. El objetivo fue conocer la variación de la concentración de oxígeno en un ensayo de 48 horas en ambas situaciones. Al realizar mediciones de oxígeno a las 24, 30 y 48 hs se demostró que cuando no se suministra aire, a las 24 horas de iniciada esta quita, los valores de la concentración de oxígeno disminuyen y a las 48 hs, alcanzan valores cercanos a cero (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de oxígeno en el medio de crecimiento de las raíces con y sin aireación para 0, 24, 30 y 48 horas.

Tiempo hs	O ₂ (ppm)	
	Aireación	Sin aireación
0	7,72±0,01	7,60±0,32
24	7,25±0,10	2,76±0,60***
30	6,93±0,12	1,64±0,20***
48	6,25±0,17	0,44±0,05***

Student t-test;*** p<0,001. ppm: partes por millón

Las raíces que crecieron en ambos medios, con y sin aireación, se diferenciaron por su tasa de crecimiento. El cálculo del porcentaje de crecimiento de la raíz para cada intervalo demostró que la depleción del oxígeno interfiere negativamente en el ritmo de crecimiento de la raíz. Este resultado es concordante con la inhibición en el índice mitótico (IM) de las células sometidas a hipoxia cuando se la compara con el de las que crecieron con suministro de aire (Tabla 6).

Tabla 6. Crecimiento diferencial de las raíces de *A. cepa* en relación a la variación de O₂

Intervalo (hs)	Depleción de O ₂ (ppm)		Crecimiento de la raíz (%)		IM (%)	
	C/aireación	S/aireación	C/aireación	S/aireación	C/aireación	S/aireación
0-24	-0,50±0,10	-4,80±0,90	64±20	50±15**		
24-48	-0,70±0,20	-2,30±0,60	36±30	19±3**	7,78±2,59	4,59±0,20*

Student t-test * p<0,05; **p<0,01. C/: con; S/: sin; hs: horas; O₂: Oxígeno

El análisis citogenético de las células meristemáticas para 48 horas de cultivo sin aireación, indica efectos deletéreos manifestados como un aumento significativo del efecto C-mitosis, condensación cromosómica, citoplasmas voluminosos y redondeados, e inducción de micronúcleos (Tabla 7, Figura 3).

Tabla 7. *A. cepa*: Porcentaje de C- metafases, Fragmentos y Frecuencia de Micronúcleos (Mn) después de 48 horas de ensayo.

Condiciones del cultivo	C- mitosis	Fragmentos	Mn
Con aireación	1,04±1,61	-	-
Sin aireación	20,28±8,19**	1,98±3,46*	13,8±2,7***

Student t-test,* p<0,05; **P<0.01;***p<0,001. Aberraciones cromosómicas cada 100 anafases telofases. Micronúcleos cada 1000 células en interfase.

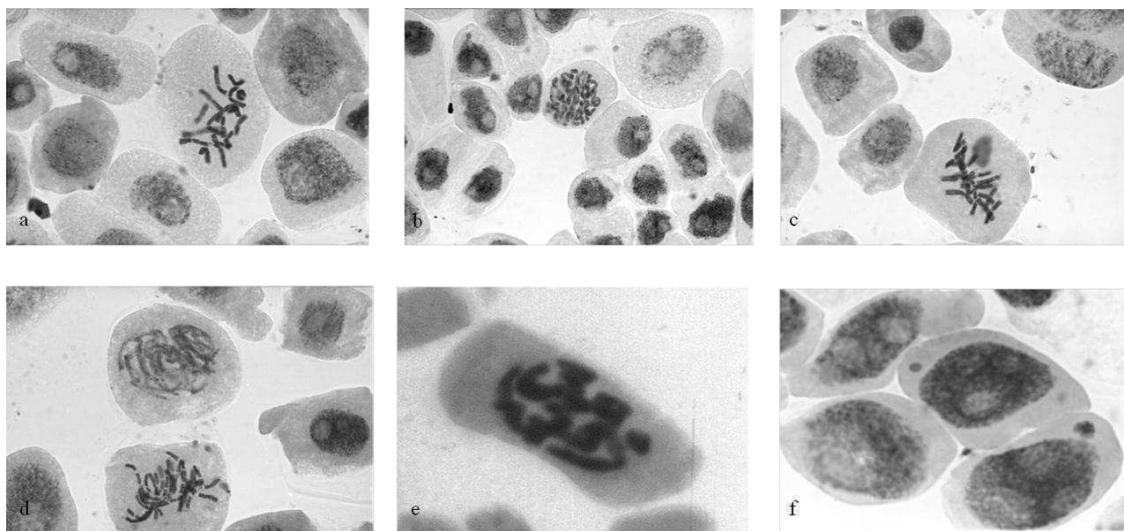


Figura 3. Células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a condiciones de hipoxia. a) metafase con cromosomas no alineados en la placa metafásica, se observa el citoplasma redondeado y voluminoso. b) Micronúcleos en interfase y profase con cromatina condensada de manera no uniforme, algunos núcleos se observan deformados. c) metafase con cromosomas ubicados con una orientación oblicua, no alineados, se observan los límites entre las dos cromátidas. d) prometafase con cromatina fragmentada. e) cromosomas altamente condensados. f) Micronucleos en interfase. (1000X)

4.3.Toxicidad y genotoxicidad por exposición metronidazol (MTZ)

4.3.1. Toxicidad

Las raíces expuestas a concentraciones crecientes de MTZ mostraron inhibición estadísticamente significativa en el crecimiento para el rango de concentraciones 10- 500 ug/ ml comparadas con los controles (Tabla 8, Figura 4). Este resultado es indicador de efectos tóxicos sobre los procesos involucrados en el crecimiento longitudinal de la raíz.

Tabla 8. Crecimiento de raíces de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de MTZ y controles (0 y DMSO 1%).

Concentración (ug/ml)	Longitud de raíces (cm)	Crecimiento (%)
MTZ 0	8,11±1,17	100
DMSO (1%)	8,49±1,12	105
MTZ 10	7,71±0,67*	86
MTZ 50	7,32±1,16**	78
MTZ 100	6,85±0,99***	69
MTZ 250	5,48±1,27***	58
MTZ 500	4,07±0,72***	43*

Student t-test *p<0,05** p<0,01 ***p<0,001

• Concentración < EC50

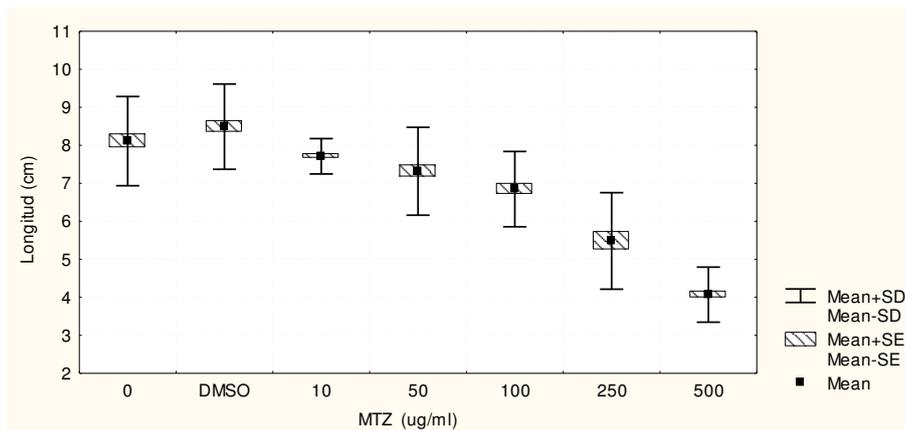


Figura 4. Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE) de la longitud de las raíces de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de MTZ y controles.

Estos resultados indican que la exposición a MTZ , dentro del rango de concentraciones ensayado, es tóxica para los procesos involucrados en el crecimiento de las raíces de *A. cepa*. Siguiendo el criterio de toxicidad propuesto por Fisjesko (1993), las raíces tratadas con 500 ug/ml de MTZ fueron descartadas para los estudios de genotoxicidad debido a que la inhibición superó el 50 % del crecimiento respecto del control (Figura 5). Los análisis citogenéticos fueron realizados entonces, en exposiciones que abarcaron el rango de concentraciones de 10-250 ug/ml y comparados con los controles respectivos.

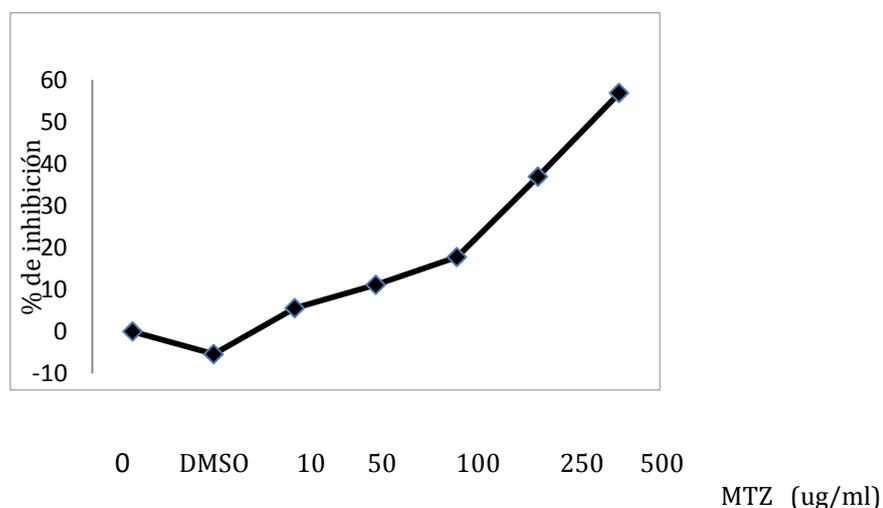


Figura 5. Inhibición del crecimiento de las raíces expuestas a concentraciones crecientes de MTZ.

El análisis estadístico mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre las longitudes registradas para las raíces expuestas a cada una de las concentraciones de MTZ con una relación concentración-respuesta. En la Figura 6, se puede observar el efecto sobre el crecimiento de las raíces que fueron expuestas a diferentes concentraciones de MTZ.



Figura 6 . Inhibición del crecimiento de la raíz de *A. cepa* mostrando efectos tóxicos del MTZ para el rango de concentraciones 10- 500 ug/ml. Escala 1:10

4.3.2. Genotoxicidad

El análisis de las células meristemáticas de raíces de *A. cepa* muestra que los valores de IM no presentan diferencias estadísticamente significativas. Lo observado permite aseverar que la proliferación de las células no se ve afectada por la exposición a MTZ en las condiciones del ensayo. Lo mismo se puede decir para las aberraciones cromosómicas (AC) en anafase –telofase, la frecuencia de Micronúcleos y de células binucleadas. (Tabla 9).

Tabla 9. Índice mitótico (IM), aberraciones en anafase – telofase en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a MTZ y los respectivos controles(0 y DMSO 1%).

Concentración (ug/ml)	IM± DS (%)	Anafases –telofases anormales			AC totales ±DS (%)
		Fg	C-met	An.Des	
MTZ 0	7,46±2,15	-	-	4	1,33±0,57
DMSO (1%)	6,35±1,92	-	1	7	2,33±1,15
MTZ 10	6,08±1,41	-	-	2	0,66±1,15
MTZ 50	5,86±2,18	-	-	5	1,66±1,52
MTZ 100	6,32±1,13	-	-	7	2,33±0,57
MTZ 250	6,33±0,47	1	-	5	1,66±1,52

Student t-test $p > 0,05$ para AC: aberraciones cromosómicas. Ds: Desvío estándar; Fg: fragmento; C-met: C-metafase; An. Des: anafases desorganizadas; IM: sobre 1000 células. Aberraciones cada 100 anafases telofases .

Los valores correspondientes a los Índices de fase no presentaron diferencias estadísticamente significativas comparados con los observados en los controles, indicando que el ciclo celular en *A. cepa*, no se altera por la exposición a MTZ, en las condiciones del ensayo aplicadas en este trabajo de Tesis (Tabla 10).

Tabla 10. Índices de fase en células meristemáticas de raíces de *A. cepa* expuestas a distintas concentraciones de MTZ y controles (0 y DMSO 1%).

Concentración (ug/ml)	P	M	A	T
MTZ 0	7,78±1,41	1,07±0,20	0,52±0,41	0,95±0,37
DMSO (1%)	7,98±0,69	0,98±0,40	0,62±0,20	0,91±0,13
MTZ 10	7,20 ±1,33	1,37±0,24	0,67±0,36	0,78±0,17
MTZ 50	6,68±1,02	1,05 ±0,10	0,69± 0,13	1,30± 0,40
MTZ 100	6,44±3,72	1,45±0,85	0,96±0,48	1,50±0,69
MTZ 250	6,00±4,21	0,67±0,67	0,74±0,53	1,0±0,20

Student t-test $p > 0,05$. MTZ: Metronidazol; P: profase, M: metafase, A: anafase, T: telofase

4.3.3. Daño oxidativo y repuesta antioxidante en células expuestas a MTZ

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la toxicidad del MTZ sobre la raíz de *A. cepa*, se llevaron a cabo estudios para evaluar el daño oxidativo y la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática de las células expuestas a 250 ug/ml de MTZ. Se eligió esta concentración por ser la mayor concentración utilizada en estudios de genotoxicidad y que presenta inhibición en el crecimiento estadísticamente significativa ($p < 0,001$) y no supera el 50% respecto del control. Los ensayos se realizaron sobre homogenatos preparados a partir de dos fracciones, una correspondiente al tejido meristemático y otra al tejido de elongación, ambos de las mismas raíces de *Allium cepa* que previamente estuvieron expuestas durante 30 hs a 250 ug/ml de MTZ.

Las mediciones realizadas sobre los homogenatos mostraron diferencias estadísticamente significativas para daño oxidativo (TBARS) en el tejido de elongación

expuesto a MTZ (MTZ E) respecto de los controles mientras que no se observaron diferencias en el tejido meristemático (MTZ M). La respuesta antioxidante GSH se observó aumentada para ambos tipos de tejidos, mientras que SOD, CAT, aumentaron con diferencias estadísticamente significativas en el tejido meristemático. Mientras que AA y DHA no mostraron diferencias significativas para ambos tejidos, la relación AA/HA se modificó para MTZ M (Tabla 11).

Tabla 11. Daño oxidativo y respuesta antioxidante en tejido de elongación y meristemático de *Allium cepa* expuestos a 250 ug/ml de MTZ

Ensayo	C(E)	MTZ (E)	C(M)	MTZ(M)
TBARS (umol/mg prot)	8,69±1,89	19,06±6,39*	3,71±0,38	5,52±1,56
SOD (U SOD/ mg prot)	186,2±28,68	290,7±113,5	49,23±4,858	282,6±74,24*
GSH(umol/mg prot)	182,60±11,65	391,10±80,76**	176,40±5,93	355,40±72,73
CAT (U CAT/ mg prot)	29,2±5,342	48,38±17,21	13,97±4,64	72,16±6,9**
AA (umol/mg prot)	137,0343,65	275,36152,83	97,32±9,31	122,68±29,36
DHA (umol/mg prot)	104,36±25,89	200,16±105,34	59,21±3,71	98,41±22,21
AA/DHA	1,30±0,09	1,36±0,11	1,64±0,05	1,24±0,04**

C(E): tejido de elongación expuesto a control (E): tejido de elongación expuesto a 250ug/ml de metronidazol; C(M) tejido meristemático expuesto a 250ug/ml de metronidazol; MTZ(M): tejido meristemático expuesto a 250ug/ml de metronidazol. TBARS: Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúlico. SOD: Superóxido dismutasa. GSH: Glutacion reducido. CAT: Catalasa. AA: Ácido ascórbico. ADH: Ácido dihidroascórbico. uUmol/mg prot: Micromol/ miligramos de proteína total. U CAT: Unidades de Catalasa. U SOD: Unidades de Superóxidodismutasa.

Los resultados obtenidos en los ensayos de daño oxidativo indicarían que el tejido de elongación en las raíces de *Allium cepa*, presenta peroxidación lipídica compatible con daño en las membranas celulares y probable daño en la función celular como respuesta a la exposición a MTZ, mientras que la misma exposición no induciría peroxidación lipídica en el tejido meristemático en las condiciones en las que se realizaron los ensayos (Figura

7). Estos resultados serían compatibles con la inhibición en la elongación de la raíz sin daño en las células meristemáticas.

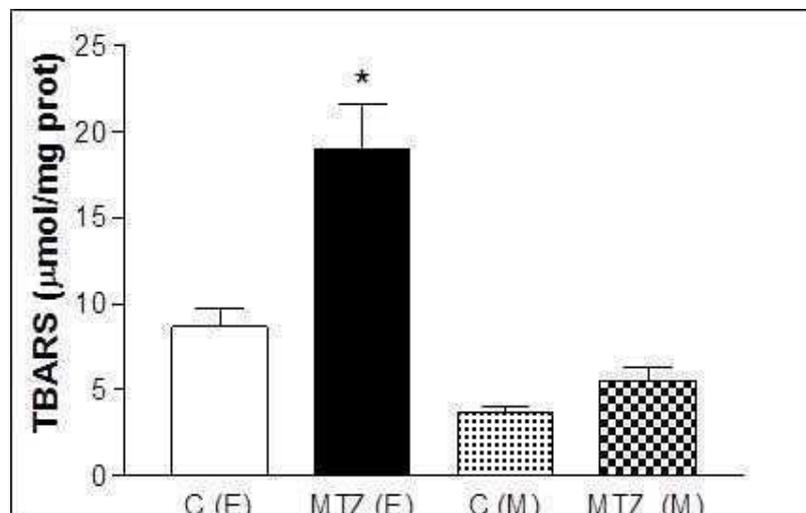


Figura 7. Niveles de peroxidación lipídica medidos como sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de elongación expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristemático expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M) Student t-test * $p < 0,05$

Los resultados obtenidos al analizar la respuesta antioxidante de tipo enzimáticas por medición de las actividades Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD) arrojan un aumento estadísticamente significativo para ambas enzimas en las mediciones realizadas sobre el tejido meristemático. Las mismas mediciones indican que el tejido de elongación no presenta diferencias significativas con respecto al control (Figuras 8 y 9). Estos resultados indicarían que las células meristemáticas contrarrestaron la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por la exposición a MTZ, impidiendo el daño oxidativo.

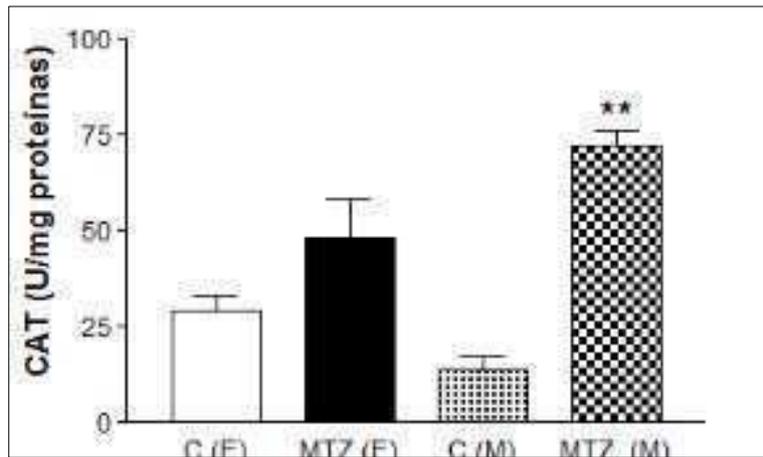


Figura 8. Medición de la actividad catalasa (CAT) en tejido de elongación expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristemático expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M). . Student t-test ** p<0,01

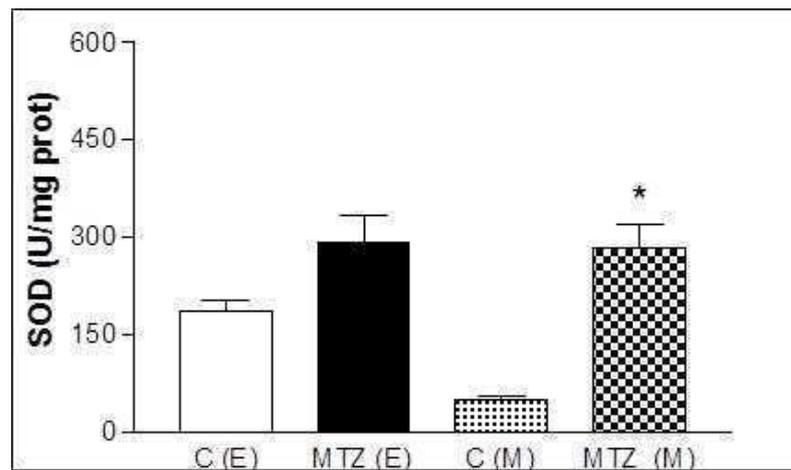


Figura 9. Medición de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) en tejido de elongación expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristemático expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M). . Student t-test *p<0,05

En cuanto a la respuesta antioxidante no enzimática, la exposición a 250ug/ml de MTZ, produce en ambos tejidos un aumento estadísticamente significativa del contenido de Glutación reducido con mayor significancia estadística en el tejido de elongación (Figura 10).

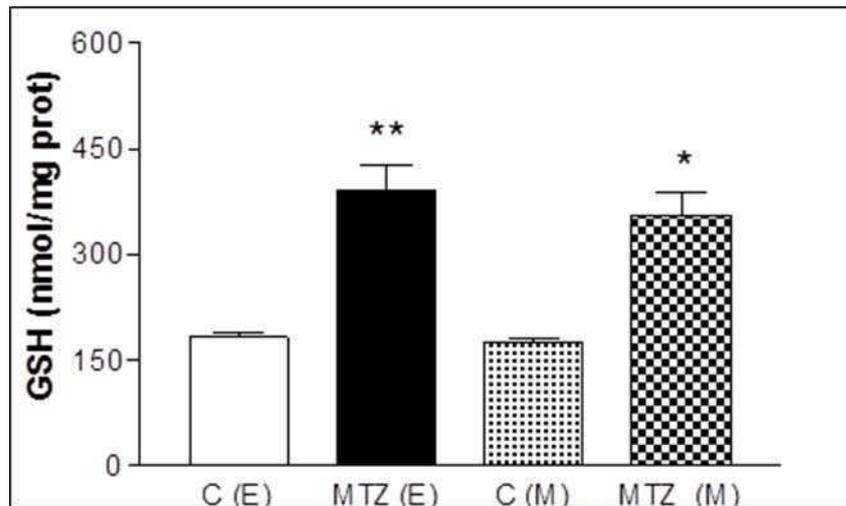


Figura 10. Contenido de Glutati3n reducida (GSH) en tejido de elongaci3n expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristem3tico expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M). . Student t-test * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Otro tipo de respuesta antioxidante no enzim3tica, es el aumento en el contenido del Ascorbato (ASC) reducido. Esta mol3cula se presenta tambi3n en estado oxidado como Dehidroascorbato (DHA). Tanto el tejido meristem3tico como el de elongaci3n no presentan diferencias estad3sticamente significativas con respecto al control por exposici3n al MTZ (Figura 11) para ninguna de las dos especies moleculares.

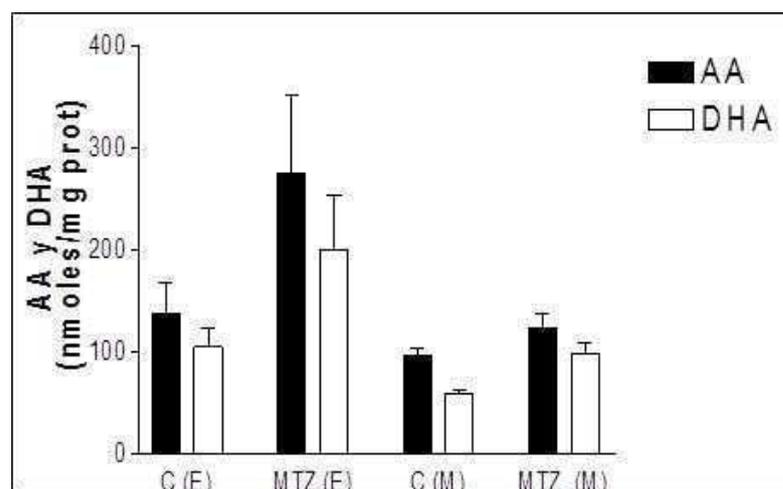


Figura 11. Medici3n de ascorbato (AA) y dehidroascorbato (DHA) en tejido de elongaci3n expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristem3tico expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M).

La relación AA/DHA depende del estado REDOX de los tejidos en la raíz de *A. cepa*. La misma se observó modificada para la zona meristemática después de la exposición a MTZ. Este resultado podría indicar que bajo las condiciones del ensayo la exposición a MTZ alteró las condiciones REDOX en el tejido meristemático (Figura 12).

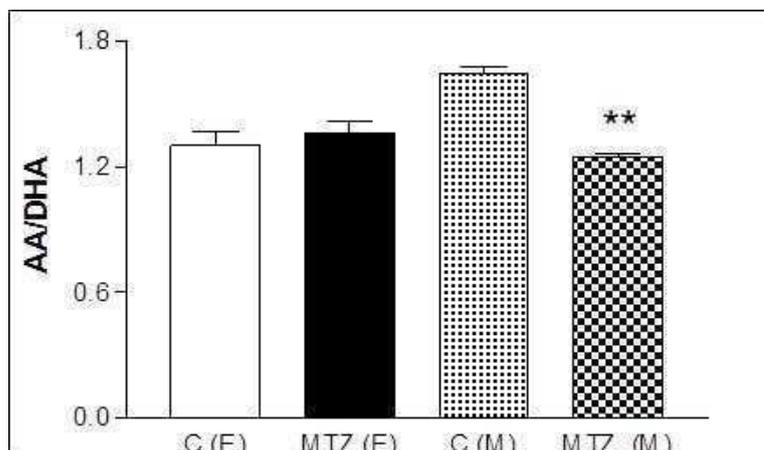


Figura 12. Medición de la relación ascorbato/ dehidroascorbato (AA)/(DHA) en tejido de elongación expuesto a control: C(E) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (E), tejido meristemático expuesto a control: C(M) y a 250 ug/ml de MTZ: MTZ (M). . Student t-test ** p<0,01

4.4 Toxicidad y genotoxicidad por exposición a Tiabendazol (TBZ)

4.4.1 Toxicidad

Las raíces de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ mostraron inhibición en el crecimiento para el rango de concentraciones 50-250 ug/ml.

El análisis estadístico considerando las longitudes correspondientes a cada categoría de exposición indican que la concentración 50 ug/ml presenta toxicidad equivalente a los 100 ug/ml. Mientras que la toxicidad aumenta con la concentración 250 y 500 ug/ml. Estas dos últimas concentraciones no presentan diferencias significativas entre si por lo que en el rango estudiado la relación concentración respuesta solo se cumple dentro del rango 100 y 250 Ug/ml (Tabla 12; Figura 13)

Tabla 12. Crecimiento de raíces de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ y controles (0 y DMSO 1%).

Concentración (ug/ml)	Longitud de raíces (cm)	% Crecimiento
TBZ 0	8,57±0,51	100
DMSO (1%)	9,37±0,57	110
TBZ 10	8,03±0,57	93
TBZ 50	7,07±0,70*	80
TBZ 100	6,60±0,20**	74
TBZ 250	5,73±0,25**	63
TBZ 500	4,40±1,35**	45

Student t.test *p<0,05** p<0,01

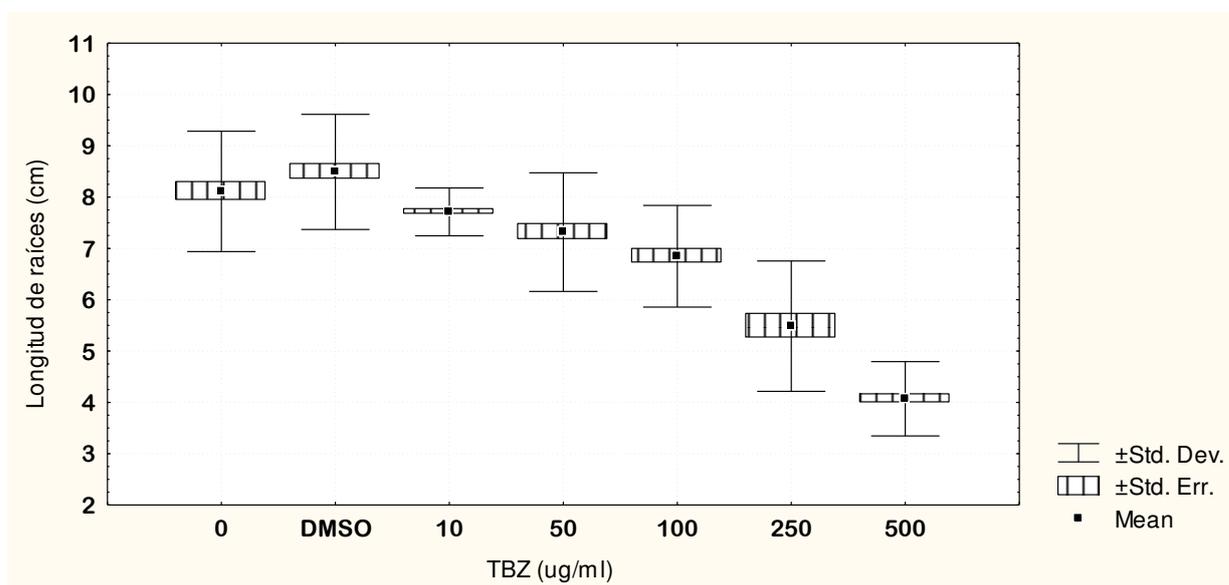


Figura 13. Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE) de la longitud de las raíces de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ y controles (0 y DMSO 1%).

La concentración 500 ug/ml se descartó para ensayos de genotoxicidad por inducir una inhibición del crecimiento celular mayor al 50% con respecto al control,

4.4.2. Genotoxicidad

Cuando se analizaron los indicadores de genotoxicidad, se pudo detectar que la exposición de las células de *A. cepa* a concentraciones crecientes de TBZ produjo inhibición en el índice mitótico (IM) de las mismas para el rango entre 50-250 ug/ml de TBZ con respecto al control (Figura 14).

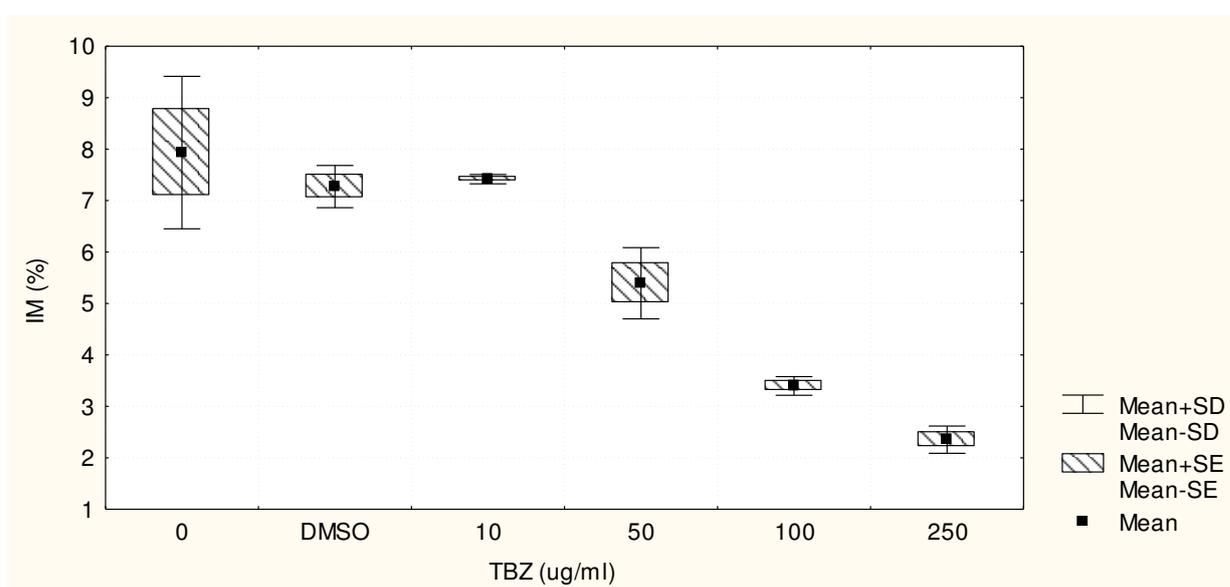


Figura 14. Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE) del IM en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ y controles (0 y DMSO 1%).

La inducción de divisiones anormales se observó en el rango 10- 250 ug/ml incluyendo incremento en la frecuencia de micronúcleos, células binucleadas y aberraciones en anafase-telofase. El Índice Mitótico (IM) es inversamente proporcional a la concentración de TBZ a la vez que la frecuencia de Micronúcleos (Mn) y de Células Binucleadas (BN) son directamente proporcionales. En cambio la frecuencia de las aberraciones anafase – telofase no muestran proporcionalidad con las concentraciones de TBZ ensayadas (Tabla 13, Figura 15).

Tabla 13. Índice mitótico (IM), frecuencia de Micronúcleos (Mn) , Células binucleadas (Bn) y Aberraciones en anafase – telofase en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a TBZ.

Concentración (µg/ml)	IM ± DS (%)	Mn ± DS	Bn ± DS	Aberraciones cromosómicas en anafases -telofases				AC± SD (%)
				Rez	C-met	An. des	Polip	
TBZ 0	7,82±1,29	1,00±0,50	-	-	1	1	-	1,92±0.93
DMSO 1%	7,28±0,41	1,00±0,40	-	-	1	1	-	1,87±1,32
TBZ 10	7,42±0,09	5,9±2.5**	2,30±1,4*	1	1	3	1	5,22±1.83**
TBZ 50	5,40±0,69*	10,50±0,16**	2,70±0,9*	5	12	17	14	46,28±14.38**
TBZ 100	3,40±0,18**	22,8±3,33**	7,7±2,5**	4	9	19	17	48,82±7.39**
TBZ 250	2,36±0,27**	38,6±6,00**	13,2±7,4**	3	10	18	14	47,48±18.86*

Student, t-test * p< 0,05; ** p< 0,01 Ptes: puentes anafase; An: Anafases; Rez: cromosoma rezagado; C-met: C- metafase; An. Des: anafases desorganizadas; Polip: células poliploides; AC:Aberraciones cromosómicas. IM: sobre 1000 células. Aberraciones cada 100 anafases telofases .

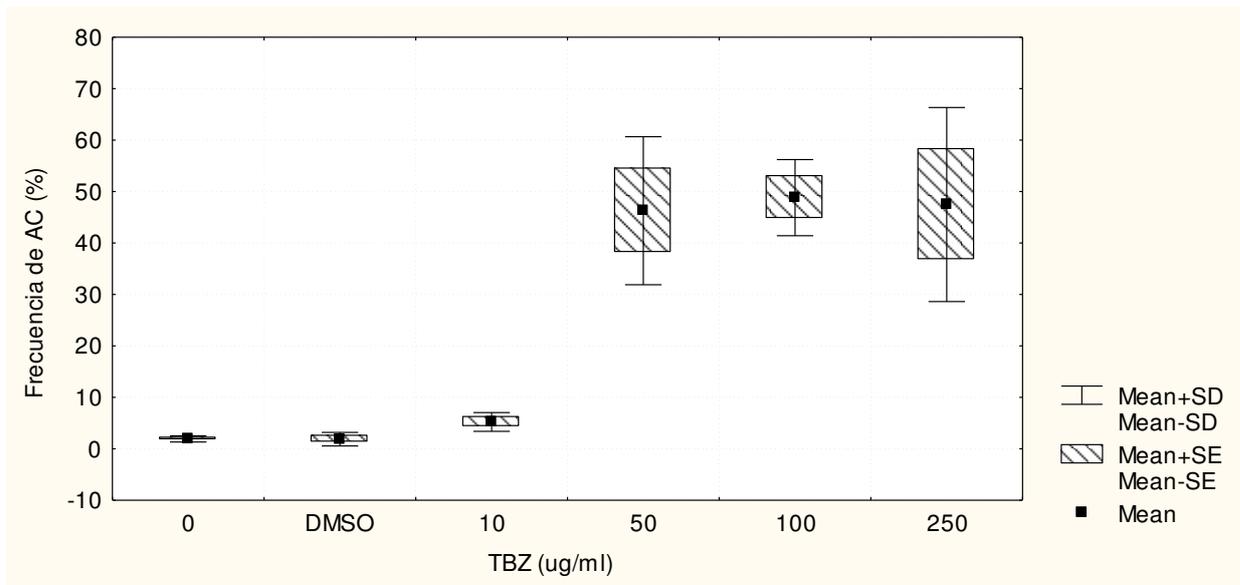


Figura 15. Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE) de las Aberraciones anafase-telofase (AC) en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ y controles (0 y DMSO 1%).

Las aberraciones detectadas están asociadas con dificultades en la migración y segregación de las cromátidas, efecto que se pone en evidencia por la presencia de cromosomas rezagados, anafases desorganizadas, C- mitosis y células poliploides y en la citocinesis evidenciado por la presencia de células binucleadas (Figura 16). Los índices de fase pusieron de manifiesto este efecto por incremento en el índice de metafase probablemente porque la mitosis se detiene o se retarda en este punto, acumulando células en este estadio (Tabla 14). Los resultados muestran que la exposición a TBZ interfiere en el ciclo celular disminuyendo las células que ingresan a la mitosis y retrasando el avance de la misma entre la metafase y la anafase. En base a los resultados obtenidos por el análisis citológico, podríamos atribuir efectos genotóxicos al TBZ en las concentraciones ensayadas sobre las células meristemáticas de *A. cepa* por inducción de biomarcadores de interrupción de la segregación de las cromátidas y la citocinesis.

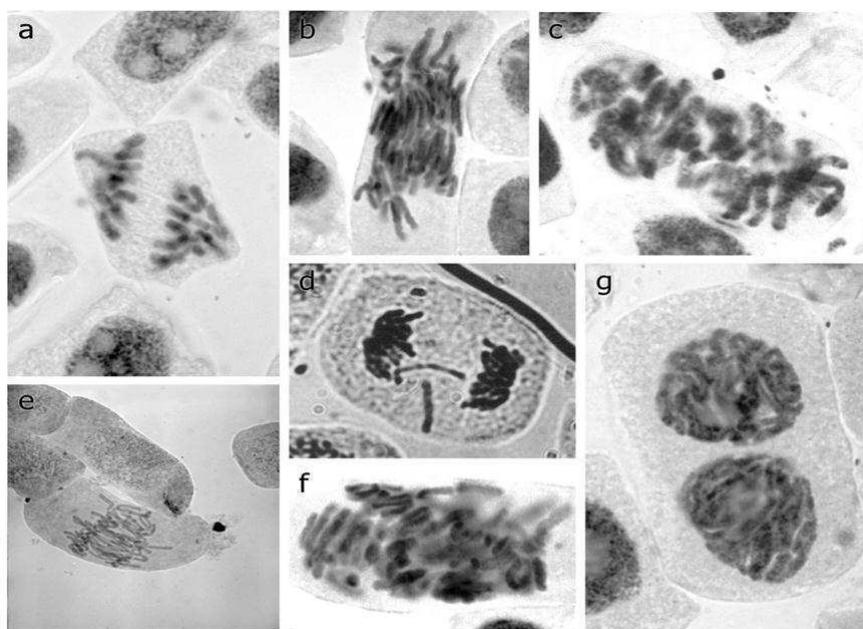


Figura 16. Células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a concentraciones crecientes de TBZ: Anafase con plano de división oblicuo. b) Célula poliploide en la que se observan cromosomas con agrupamientos desorganizados. c) Célula binucleada en prometafase. d) Cromosomas rezagados en anafase e) Anafase desorganizada en la que lo brazos cromosómicos aparecen laxos y pegoteados f) Célula poliploide con cromosomas desorganizados. g) Célula binucleada (1000 X).

Tabla 14 Índices de fase, en células meristemáticas de raíces de *A. cepa*.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Índices de fase			
	P	M	A	T
TBZ 0	0,58 \pm 0,09	0,13 \pm 0,02	0,10 \pm 0,04	0,19 \pm 0,06
DMSO (1%)	0,52 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,16 \pm 0,04	0,21 \pm 0,05
TBZ 10	0,49 \pm 0,07	0,21 \pm 0,08	0,10 \pm 0,04	0,20 \pm 0,06
TBZ 50	0,35 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02*	0,21 \pm 0,05*	0,20 \pm 0,04
TBZ 100	0,36 \pm 0,10	0,30 \pm 0,02*	0,12 \pm 0,06	0,22 \pm 0,08
TBZ 250	0,31 \pm 0,12	0,27 \pm 0,08*	0,20 \pm 0,11	0,22 \pm 0,06

Student, t-test. * $p < 0, 05$. TBZ: Tiabendazol; P: profase, M: metafase, A: anafase, T: telofase

4.4.3. Puesta a punto para la evaluación del daño microtubular en células de *Allium cepa* expuestas a TBZ

4.4.3.1. Respuesta de *Allium cepa* a la exposición del disruptor microtubular

Azzurro®

La puesta a punto de la técnica de inmunolocalización de tubulinas se realizó utilizando un agente químico de conocida acción disruptora de los microtúbulos, el Zineb en su formulación comercial Azzurro®. Se eligió este compuesto por su condición de disruptor microtubular referida en la literatura. Las concentraciones de Azzurro® utilizadas fueron las utilizadas en trabajos previos en la línea celular CHO (Soloneski, 2003) y se refieren a la concentración de la formulación comercial y no del principio activo Zineb, el cual se encuentra en el Azzurro® en una concentración aproximada del 70%. Dichas concentraciones de Azzurro® se emplearon tanto para el ensayo de *Allium cepa* con tinción estándar como para la inmunolocalización de tubulinas. Los resultados obtenidos en el análisis citogenético con tinción convencional muestran que la concentración 10 ug/ml inhibe el IM y ambas concentraciones inducen aberraciones cromosómicas en anafase-telofase. La frecuencia de Micronúcleos no presentó diferencias significativas con respecto al control indicando que la exposición a Azzurro® no induce su formación (Tabla 15).

Tabla 15. Índice mitótico (IM), Micronúcleos (Mn) , Células binucleadas (Bn), Aberraciones en anafase - telofase en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Azzurro®.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	IM \pm DS (%)	Mn \pm DS (%)	Aberraciones cromosómicas en anafase -telofase					AC \pm DS %
			Ptes.	An	Rez	C-met	Ana des	
Azzurro 0	7,50 \pm 1,80	0,54 \pm 0,47	-	-	-	1	2	1,32 \pm 0,32
DMSO (1%)	7,53 \pm 1,09	0,97 \pm 1,00	-	-	-	1	1	1,17 \pm 0,47
Azzurro 1	6,50 \pm 1,30	1,0 \pm 0,42	1	1	2	3	7	12,85 \pm 4,37*
Azzurro 10	3,80 \pm 0,20*	1,12 \pm 0,42	1	1	1	3	3	8,46 \pm 1,54*

Student, t-test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Fg: fragmento; Pte: puente anafase; Rez: cromosoma rezagado; C-met: C-metafase; An. Des: anafases desorganizadas. IM: sobre 1000 células. Aberraciones cada 100 anafases telofases .

El IM obtenido por análisis de células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a 10 $\mu\text{g/ml}$ de Azzurro arroja valores que indican toxicidad mitótica. Este resultado explicaría que la frecuencia de aberraciones anafase- telofase sean menores para esta concentración que para 1 $\mu\text{g/ml}$ que no inhibe significativamente el IM (Figuras 17 y 18). Probablemente la concentración mas elevada produzca un daño en las células impidiendo su ingreso a la profase o bien porque se dirigen a la muerte celular o quedan detenidas en los puntos de control (*check point*) de la mitosis.

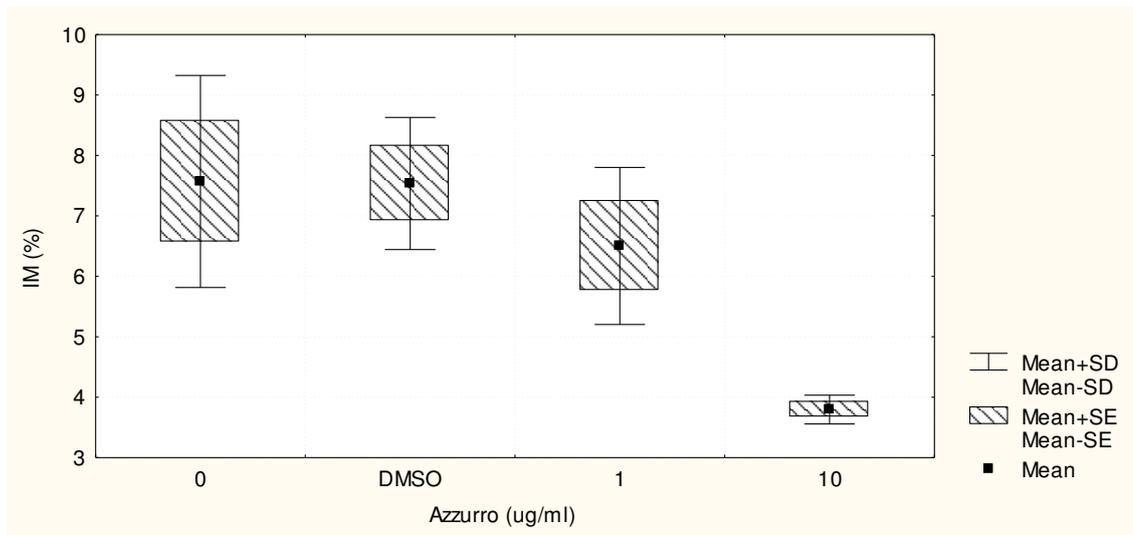


Figura 17. Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE) en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Azzurro® y a los respectivos controles (0 y DMSO).

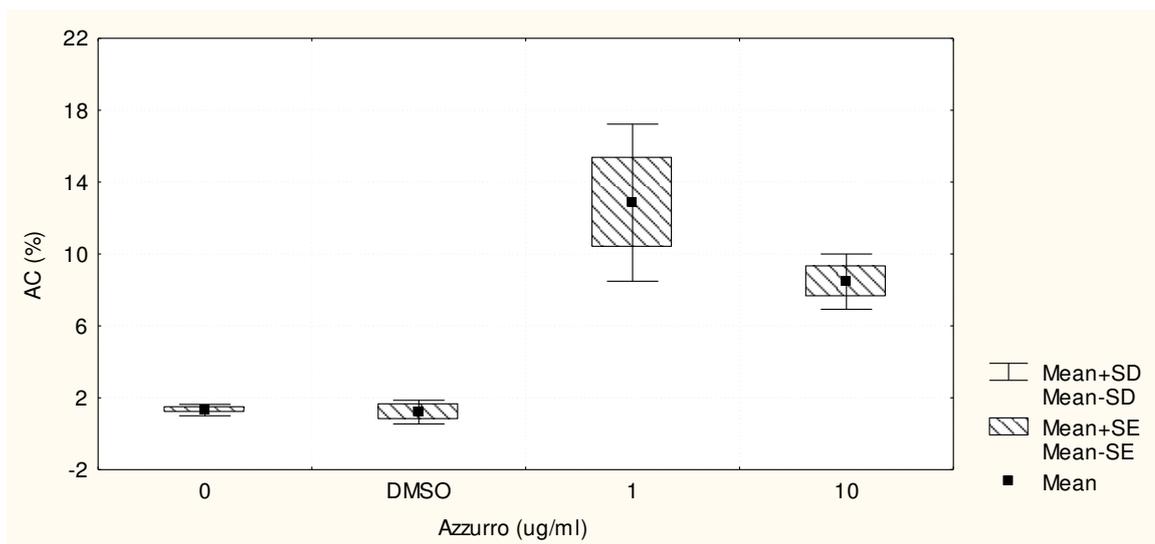


Figura 18. Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE) de las Aberraciones cromosómicas (AC) en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Azzurro® y a los respectivos controles (0 y DMSO).

Las aberraciones cromosómicas más frecuentes, son compatibles con efectos a nivel de microtúbulos caracterizados por anafases anormales y C- mitosis y en menor frecuencia, anillos, puentes y cromosomas rezagados (Figura 19)

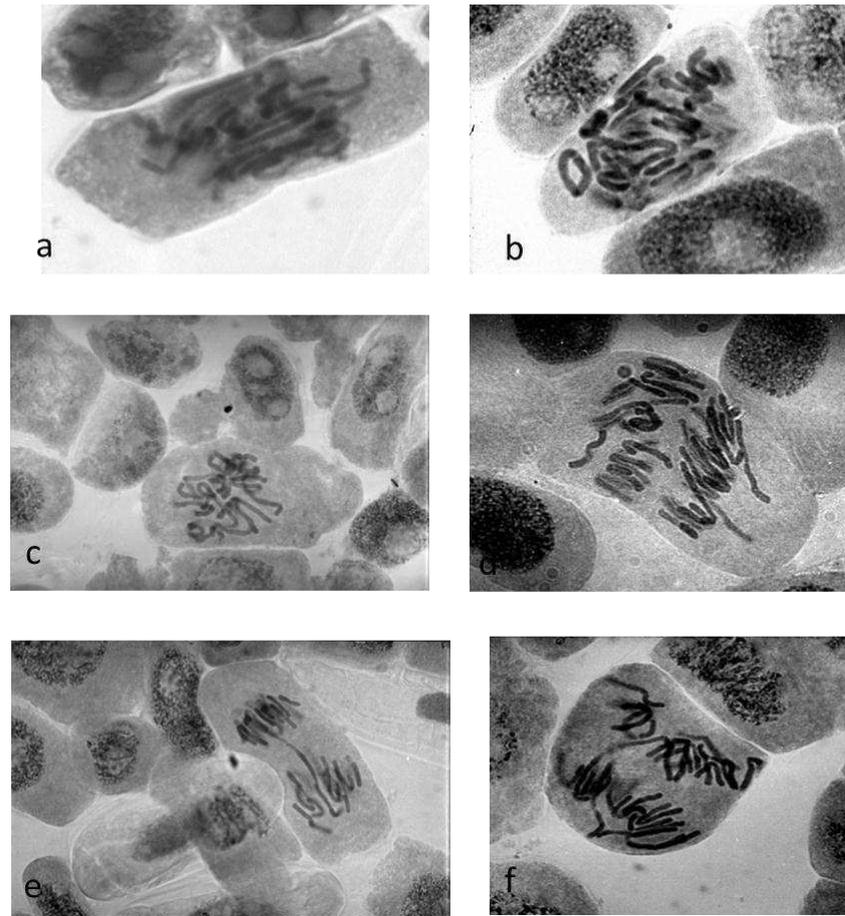


Figura 19. Células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Azurro®. a) Anafase desorganizada y cromosomas pegoteados b) Agrupación anómala de cromosomas con anillo c) C-metafase d) Anafase con cromosomas desordenados y anillo. e) Puente en telofase f) Anafase desorganizada con puente (1000 X).

4.4.3.2. Respuesta de *A. cepa* a la exposición del disruptor microtubular Griseofulvina

La Griseofulvina (GSF) en su formulación Griseovin® fue utilizado como control positivo para comparar los resultados obtenidos con TBZ en los estudios de inmunolocalización de tubulinas ya que se trata de un compuesto de conocida acción como disruptor microtubular que induce todo tipo de aberraciones cromosómicas. Estos efectos se manifiestan tanto en modelos animales como de plantas vasculares (Voutsinas et al., 1997). La concentración de GSF a utilizar como control positivo en los estudios de inmunolocalización de tubulinas en las células meristemáticas se determinó al realizar ensayos convencionales en *Allium cepa*.

Con el diseño experimental propuesto se buscaba conocer la respuesta de las células meristemáticas a la exposición a concentraciones crecientes de GSF (10, 50, 100 y 250 ug/ml). En estos ensayos se observó que la GSF inhibía el IM en todo el rango de concentraciones ensayado, exhibiendo valores de elevada toxicidad mitótica para las dosis 250 ug/ml. Las aberraciones cromosómicas en anafase telofase se incrementaron en las células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a GSF para todas las concentraciones ensayadas. Otras alteraciones se observaron en los núcleos interfásicos de las células meristemáticas expuestas a GSF en los que pudieron observarse núcleos deformados, yemas nucleares (del inglés nuclear buds, NB), Minicélulas (MC) frecuentemente adyacentes a otras células de tamaño normal y Micronúcleos (Mn). Todas las anormalidades de los núcleos interfásicos se encontraron en las células expuestas a todas las concentraciones de GSF ensayadas, aunque las MC no presentaron diferencias estadísticamente significativas para 10 ug/ml de GSF (Tabla 16).

Tabla 16. Índice mitótico (IM), Micronúcleos (Mn), Minicélulas (MC), Yemas nucleares (del inglés “nuclear buds”: NB) y Aberraciones en anafase – telofase en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Gtieofulvina (GSF), expresados como promedio \pm desviación estándar (DS).

Concentración (mg/ml)	IM \pm DS (%)	MC \pm DS (%)	Mn \pm DS	NB \pm DS (%)	Aberraciones cromosómicas en anafases -telofases (%)							
					Fg	Pte	An	Rez	C-met	Multipol	An. Des	AC \pm SD
GSF 0	8,50 \pm 0,66	-	1,64 \pm 0,32	-	-	-	-	-	-	-	2	1,98 \pm 0,87
DMSO (1%)	8,02 \pm 0,84	-	1,17 \pm 0,57	-	-	-	-	-	-	-	1	1,32 \pm 0,52
GSF 10	5,67 \pm 0,61**	1,17 \pm 1,01	7,27 \pm 3,35*	1,20 \pm 0,37**	1	1	-	1	2	1	1	6,10 \pm 0,91***
GSF 50	5,37 \pm 0,14**	12,84 \pm 0,31*	9,62 \pm 0,2,47**	6,07 \pm 1,95*	2	3	-	4	4	4	8	25,62 \pm 2,43***
GSF 100	4,52 \pm 0,24***	12,47 \pm 6,82**	16,46 \pm 3,77**	12,53 \pm 3,64**	2	5	2	2	7	8	9	39,03 \pm 7,62***
GSF 250	3,50 \pm 0,62***	15,56 \pm 3,17**	36,87 \pm 14,66**	20,54 \pm 8,20*	5	-	-	-	-	5	-	5,48 \pm 5,07**

Test de Student *p<0, 05**, p<0, 01 ***; p<0,001. GSF vs los respectivos controles (0 y DMSO) Fg: fragmento; Pte: puente; An: anafase; Rez: cromosoma rezagado; C-met: C- metafase; Multipol: husos multipolares; An. Des: anafases desorganizadas. IM: sobre 1000 células. Aberraciones cada 100 anafases telofases.

La inducción de MC para el rango de concentraciones 50-250 ug/ml, no presenta relación concentración respuesta pudiendo alcanzar valores semejantes en las 3 concentraciones. (Figura 20).

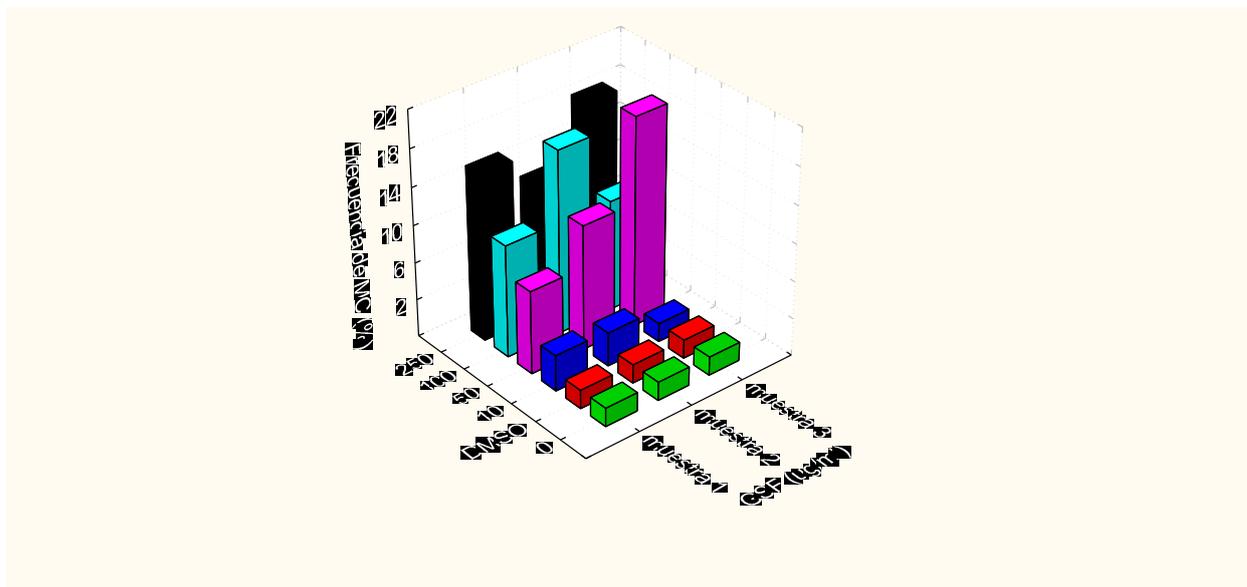


Figura 20. Micicélulas (MC) inducidas en meristemas de *Allium cepa* expuestos a GSF

La inducción de Mn manifiesta una relación concentración respuesta entre las siguientes concentraciones ensayadas: 0 y el rango 10-250 ug/ml; 10 ug/ml y el rango 100- 250 ug/ml y entre 50 y 250 ug/ml (Figura 21).

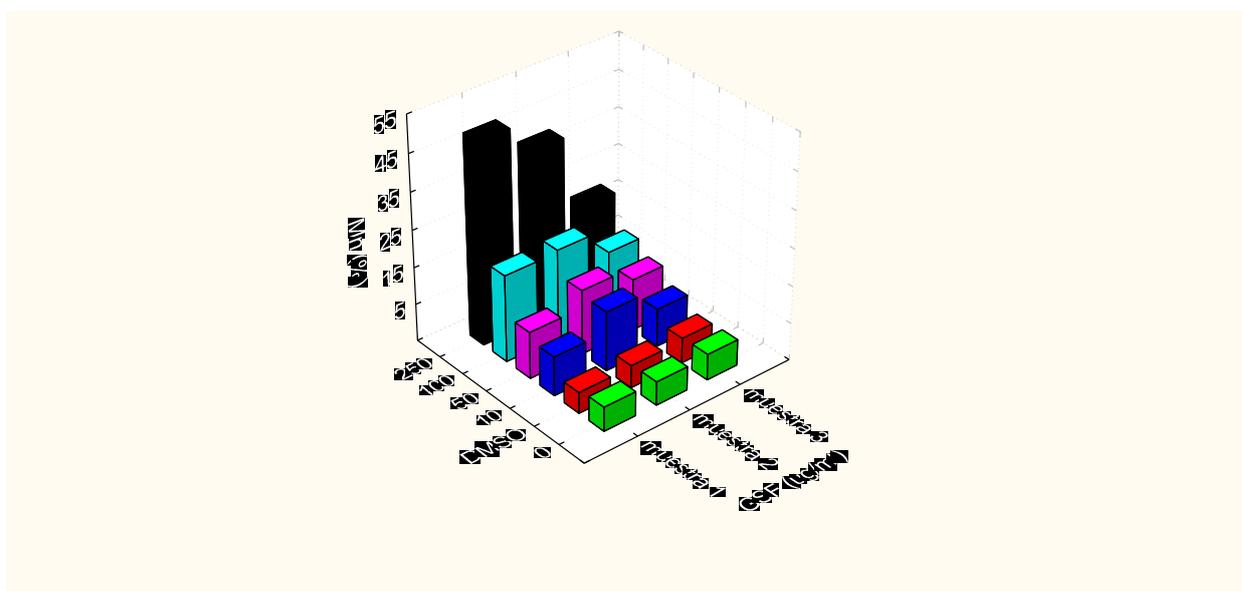


Figura 21. Micronúcleos (Mn) inducidos en meristemas de *Allium cepa* por exposición a GSF

El incremento de Yemas nucleares (NB, del inglés Nuclear Buds) manifiesta una relación concentración respuesta más marcada que el incremento de los Mn. Existe diferencias entre 0 y todas las concentraciones; 10 y el rango 50-250 ug/ml y 50 y 250 ug/ml (Figura 22).

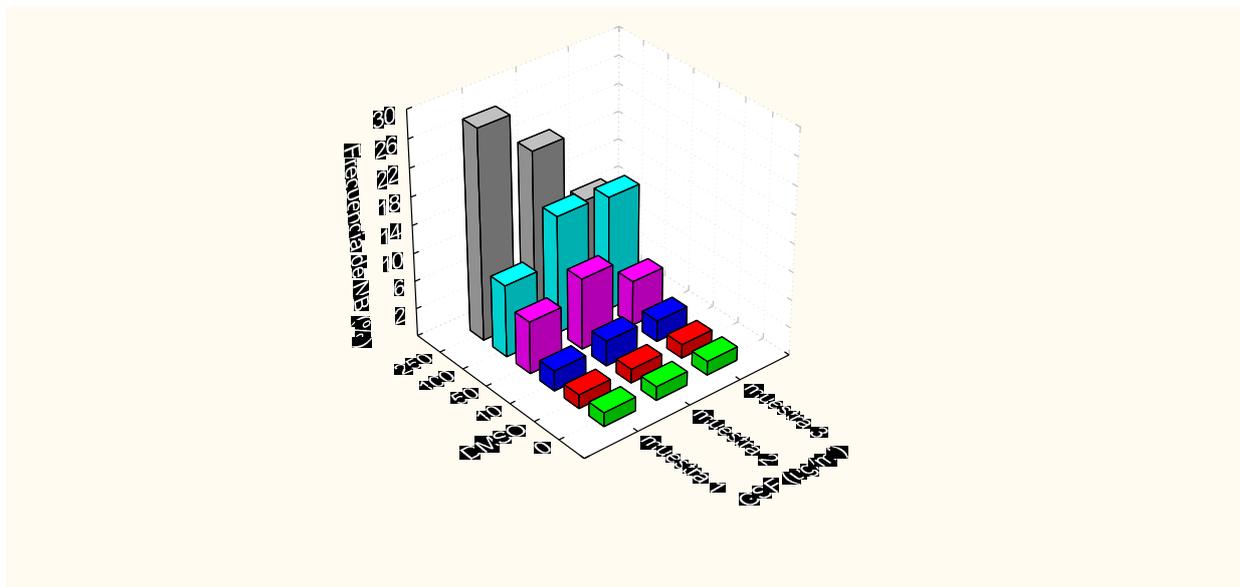


Figura 22. Yemas nucleares (Nuclear Buds, NB) en meristemas de *Allium cepa* inducidas por exposición a GSF

Las alteraciones en los núcleos interfásicos se pueden observar en la Figura 23 (a-e) , los mismos se encuentran acompañados por aberraciones cromosómicas observadas en anafase- telofase. Algunas indican un efecto a nivel de segregación inferido por la presencia de husos tripolares, anafases anormales, cromosomas rezagados y C-metafases y otras figuras anormales que son indicadoras de clastogénesis, como los fragmentos acéntricos y los puentes (Figura 23 g-l).

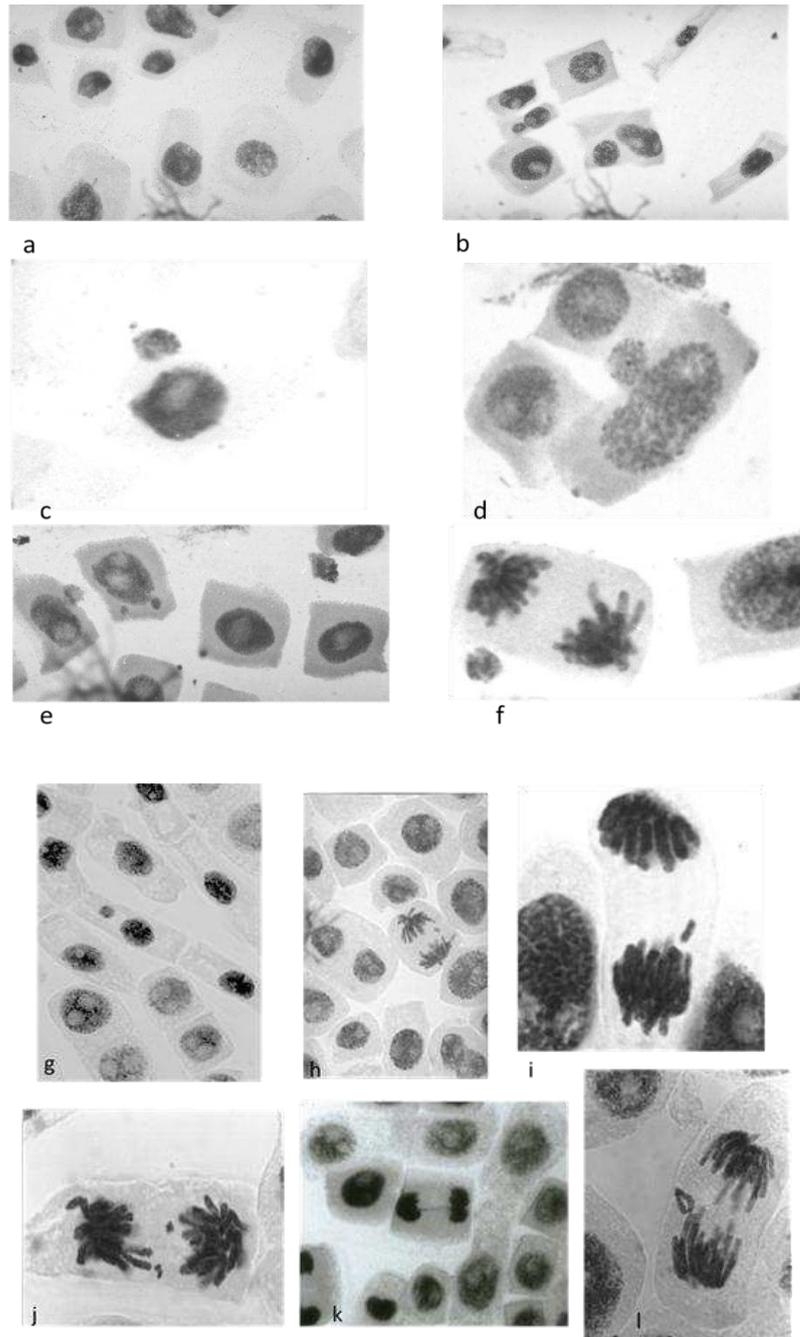


Figura 23. a - e) Núcleos deformados, micronúcleos, nuclear buds y minicélulas. f) Anafase con plano de división oblicuo con minicélula adyacente. g) Células alargadas con micronúcleo grande. h-j) Fragmentos acéntricos en telofase. k) Puente en telofase l) Anillo en anafase (1000X).

Las Aberraciones en anafase telofase totales disminuyen ante la exposición de la concentración de 250 ug/ml. de GSF. La disminución de las aberraciones anafase-telofase y del IM para esta concentración es una manifestación de daño celular (Figuras 24 y 25).

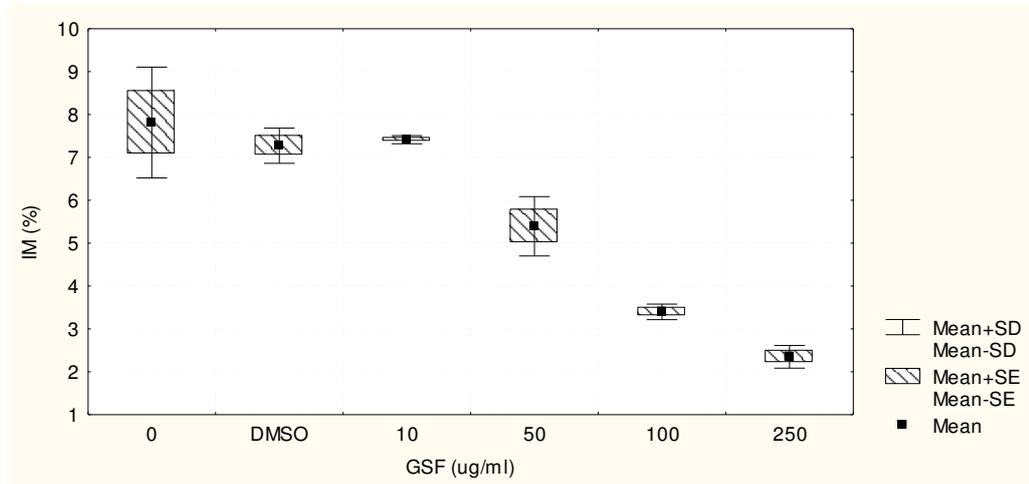


Figura 24. Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE) del IM en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a concentraciones crecientes de GSF y controles respectivos (0 y DMSO (1%)).

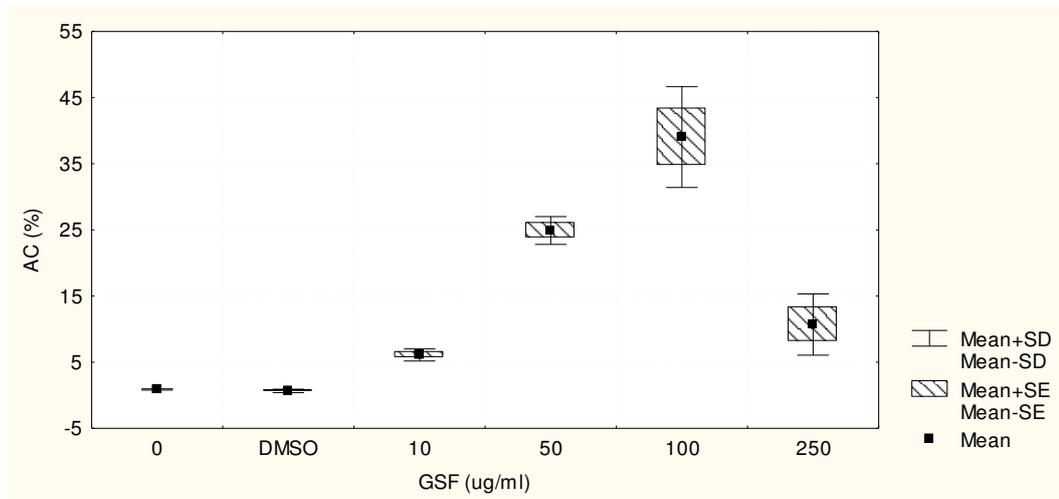


Figura 25. Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE) de las AC en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a concentraciones crecientes de GSF y controles respectivos (0 y DMSO (1%)).

La utilización de GSF como control positivo en los ensayos de inmunolocalización microtubular por exposición a TBZ es adecuada, particularmente con las concentraciones 50 y 100 ug/ml. dado que en esas concentraciones el Índice mitótico se encontró en valores

que permitieron detectar biomarcadores de daño genotóxico en las células meristemáticas de *Allium cepa*.

4.4.3.3. Inmunolocalización de tubulinas en células meristemáticas de *A. cepa*

En la puesta a punto de la técnica de inmunolocalización de tubulinas, la detección de la marca se realizó primero en células meristemáticas de *Allium cepa* libres de exposición a agente químico alguno, con el fin de reconocer las estructuras microtubulares más frecuentemente observables en condiciones normales. En esta oportunidad se detectaron organizaciones de los microtúbulos compatibles con lo publicado en la literatura. Microtúbulos corticales (Figura 26 a), bandas preprofásicas (Figura 26 b), husos mitóticos (Figuras 26 c-d) y fragmoplastos (Figuras 26 e-f) que fueron observados con inmunolocalización sin contratinción. La contratinción con Ioduro de propidio o con DAPI fue aplicada para poder relacionar las estructuras asociadas con cada estadio reconocible de la mitosis (Figuras 27 y 28)

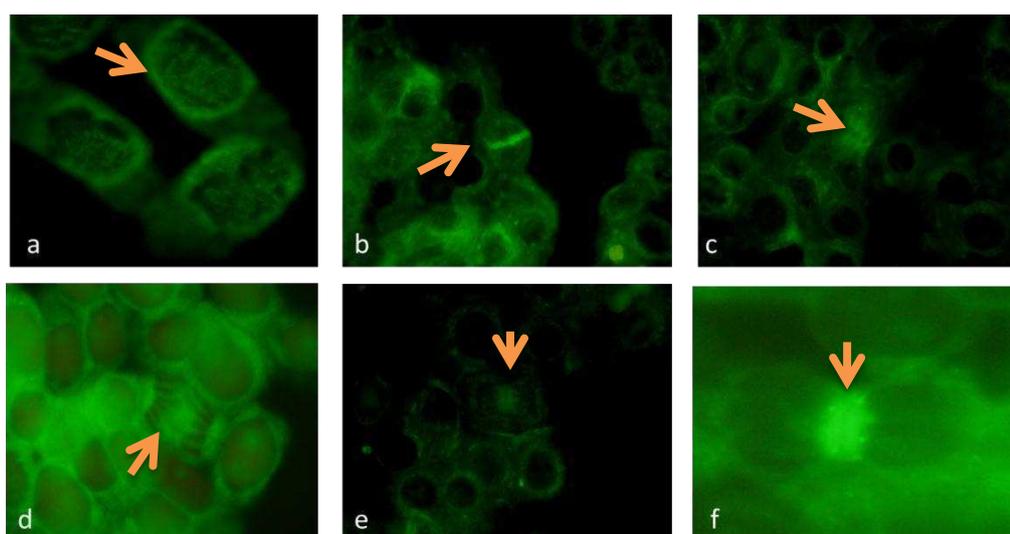


Figura 26. Estructuras microtubulares localizadas con antitubulina en células meristemáticas de *Allium cepa*. Las flechas indican: a) Microtúbulos corticales en interfase. b) Bandas preprofásicas. c-d) Huso mitótico. e-f) Fragmoplasto. (1000X)

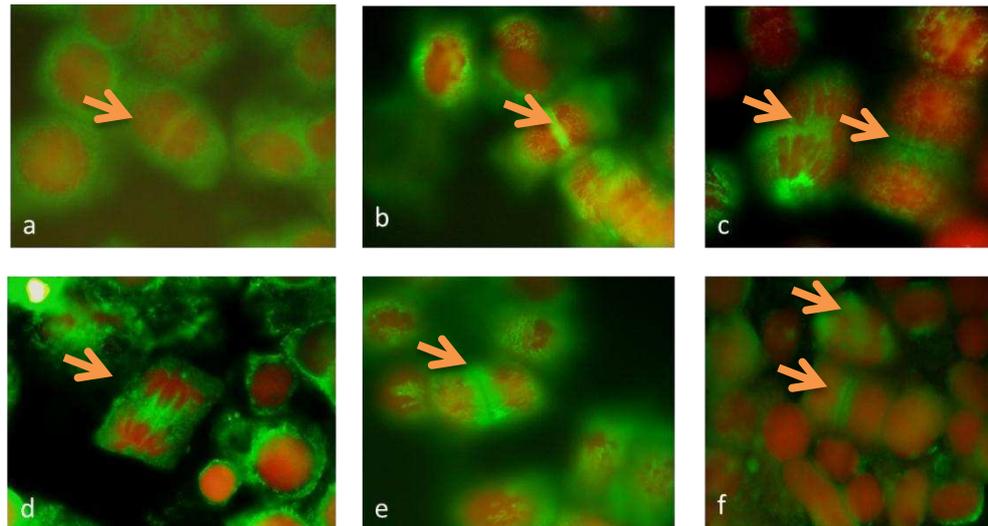


Figura 27. Estructuras microtubulares localizadas con antitubulina más tinción celular con Ioduro de propidio en células meristemáticas de *A. cepa*. Las flechas indican: a-b) Bandas preprofásicas c) Huso mitótico y Fragmaoplatso d) Huso mitótico e) Fragmaoplatso f) Huso mitótico y Fragmaoplatso. (1000X)

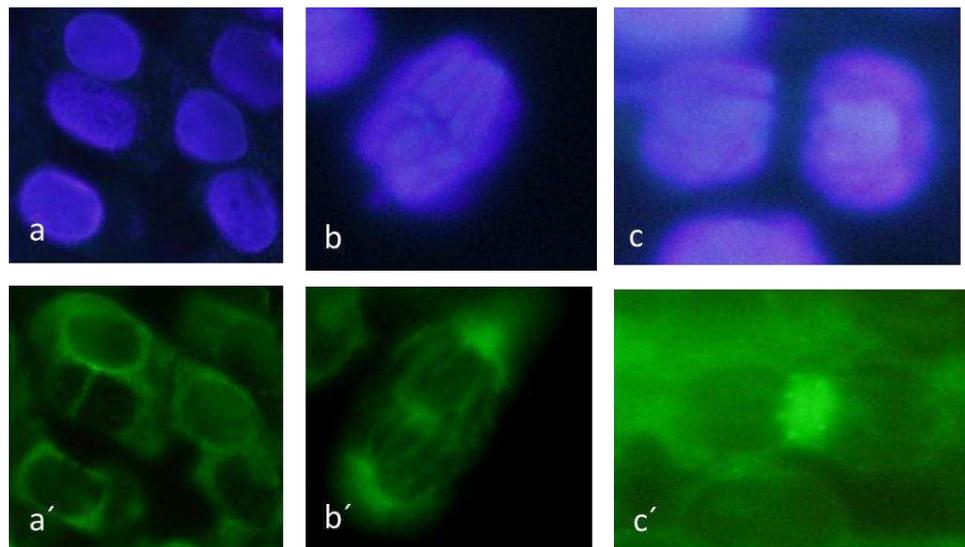


Figura 28. Células meristemáticas de *Allium cepa* a-c) Células con tinción DAPI. a'-c') Las mismas células con inmunolocalización para tubulinas. Estructuras microtubulares localizadas con antitubulina : a) interfase b)Anafase c) Telofase a') BPP b') HM c') FG. (1000X)

4.4.3.4. Detección de anomalías en los microtúbulos por exposición a Azzurro®

La exposición a Azzurro® tuvo como objetivo fin reconocer figuras anormales o detectar la ausencia de figuras normales que deberían estar presentes en ese estadio. Con la exposición

a 1 ug/ml de Azzurro® se detectó una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de HM y Fg pero la disminución no fue significativa para BPP, mientras que la concentración 10 ug/ml indujo una inhibición estadísticamente significativa en la formación de las 3 estructuras. La frecuencia de BPP anormales arrojó valores significativos para la concentración de Azzurro® 1 ug/ml pero no para 10 ug/ml. Los HM y los Fg anormales se indujeron de manera estadísticamente significativa en ambas concentraciones aun cuando en la concentración más elevada los valores fueron menores. Este efecto es concordante con la disminución en la formación de las organizaciones microtubulares (Tabla 17).

Tabla 17. Estructuras microtubulares normales y anormales/1000 células meristemáticas de raíces de *A. cepa* expuestas a Azzurro®.

Concentración (ug/ml)	BPP		HM		Fg	
	Normal	Anormal	Normal	Anormal	Normal	Anormal
0	32,67± 4,04	1,33±1,15	21,00±1,73	-	10,33±1,53	0,33±0,58
Azzurro 1	25,00±2,65	6,67±1,53**	12,33±1,53**	5,33±0,58***	6,67±1,53*	4,00±1,00**
Azzurro 10	9,33±2,52**	2,67±0,58	6,33±1,53***	1,33±0,58*	5,67±0,58**	3,00±1,00*

Student t-test *p<0, 05 **; p<0, 01 ***,p<0,001. BPP: Banda preprofásica; HM:Huso mitótico; Fg: Fragmoplasto

Los porcentajes de estructuras anormales sobre las totales observadas de cada categoría (BPP, HM y Fg), arrojan como resultado un incremento significativo de todas las estructuras anormales comparadas con el control. Se observa que para las BPP y para los Fg, los porcentajes de daño presentan valores similares (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de estructuras microtubulares anormales/ 100 totales en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a Azzurro®.

Concentración ug/ml	BPP	HM	FG
0	3,86±3,41	-	3,03±5,25
Azzurro 1	21,17±5,52**	30,30±3,60***	37,64±7,26***
Azzurro 10	22,41±2,51**	17,59±6,99***	34,17±8,04***

Student- t test *p<0, 05**, p<0, 01 ***; p<0,001. BPP: Banda preprofásica; HM:Huso mitótico; Fg: Fragmoplasto.

El análisis de las células que se encuentran en división mitótica a partir de la presencia de organizaciones microtubulares propias de los estadios de mitosis permiten estimar un valor de IM. Los resultados indican que el IM disminuye con la concentración de Azzurro® más elevada indicando toxicidad mitótica que explica que los valores de las estructuras microtubulares totales no presenten una relación concentración respuesta (Tabla 19).

Tabla 19. Índice mitótico (IM) y microtúbulos aberrantes en células meristemáticas de *A. cepa*.

Concentración (ug/ml)	Índice Mitótico /1000 céls.	MT Aberr. (%)
0	65,67±7,02	2,55±0,93
Azzurro 1	60,00±1,73	26,00±2,39***
Azzurro 10	28,33±3,06**	24,39±3,75***

Test de Student- *p<0,05**, p<0,01 ***; p<0,001. MT Aberr: Microtúbulos aberrante.

En la Figura 29 se puede apreciar como se modifican los porcentajes de BPP por exposición a Azzurro evidenciando que no existe relación dosis respuesta para el daño inducido en la proporción de BPP formadas.

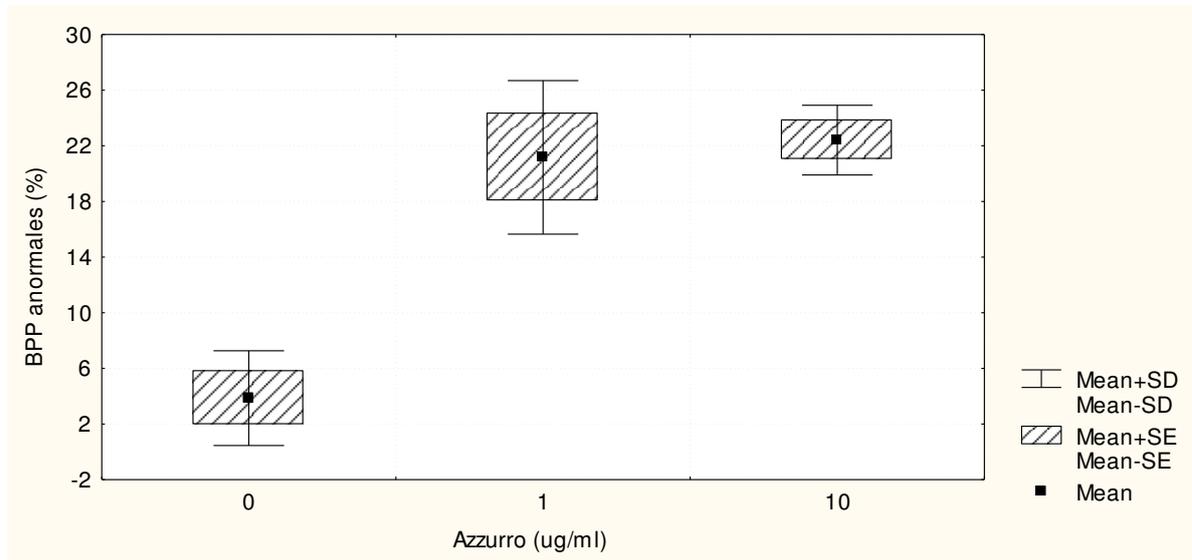


Figura 29. BPP en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro® y al respectivo control (0) Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE)

El porcentaje de HM anormales se encuentra incrementado significativamente en las células meristemáticas para ambas concentraciones de Azzurro®, si bien se observa disminución en el porcentaje correspondiente a la concentración de 10 ug/ml (Figura 30).

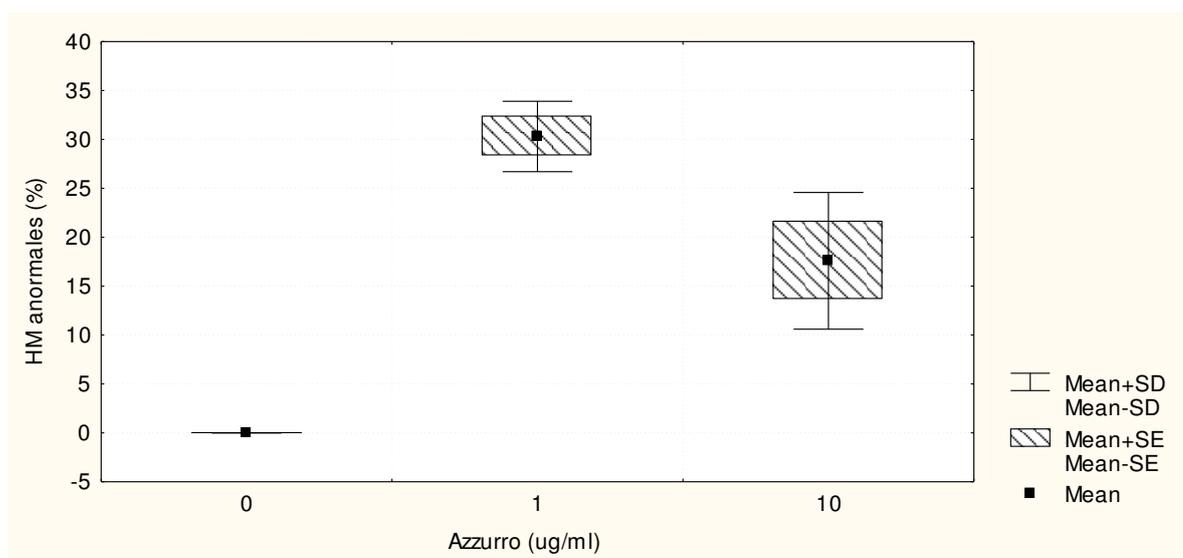


Figura 30. HM en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro y control respectivo (0) Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE).

El incremento en el porcentaje de Fg anormales presenta valores estadísticamente significativos para las 2 concentraciones de Azzurro® y del mismo modo que las BPP y los HM, no muestra relación concentración respuesta (Figura 31).

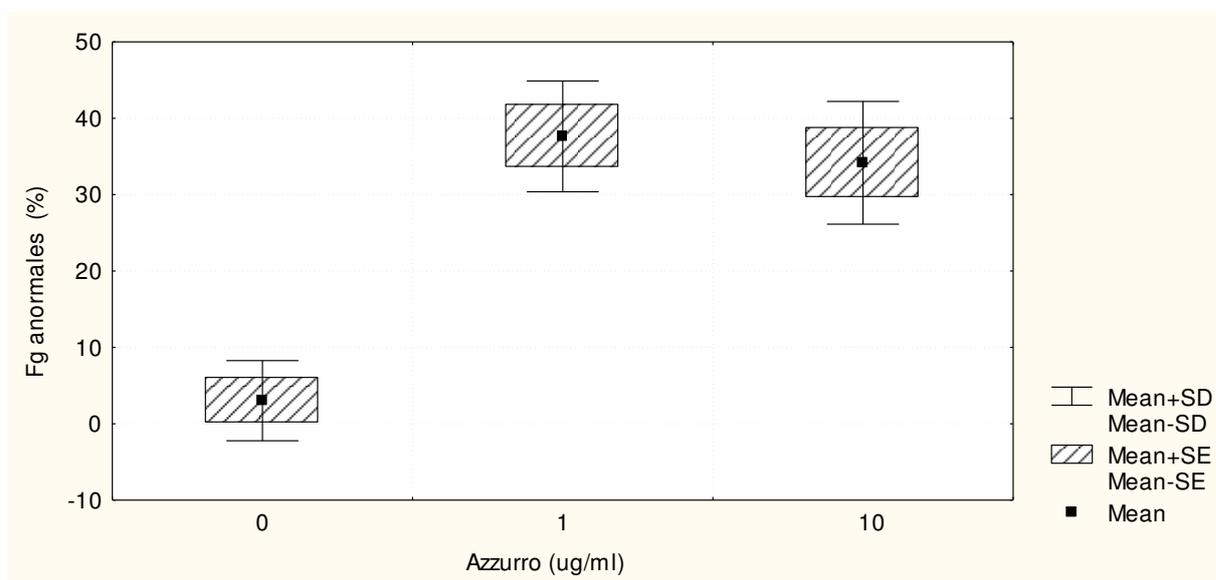


Figura 31. Fg en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro® y al respectivo control (0) Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE).

La inmunolocalización de tubulinas sin contratinción permitió observar algunas anomalías relacionadas con la presencia de Bandas Preprofásicas (BPP) (Figura 32), si bien subestimó el daño al impedir detectar la ausencia de ciertas estructuras. La técnica con contratinción demostró ser más precisa para detectar las anomalías (Figuras 33 y 34).

Las figuras anormales se pudieron observar como BPP despolimerizadas (Figuras 32 a.c; 33 a, c y e). Los HM despolimerizados fueron reconocidos más fácilmente cuando las células se observaron con contratinción DAPI (Figuras 33 ay c). Los Fragmoplastos (Fg) se pudieron observar como anormales y los fragmoplastos ausentes o incompletos se consideraron como anormales (Figuras 33 f; 34 b y 34 d).

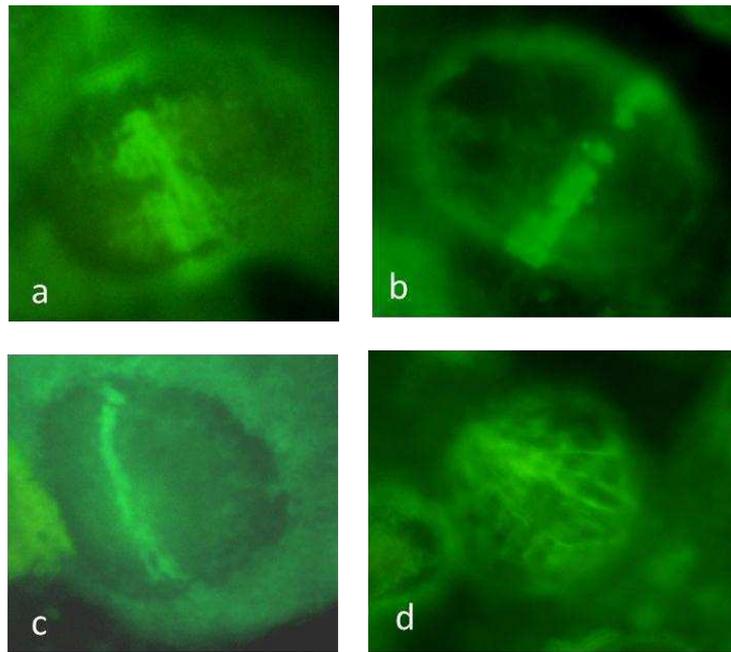


Figura 32. Microtúbulos despolimerizados en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro®. a-c). BPP anormales. d) Microtúbulos desorganizados. (1000 X).

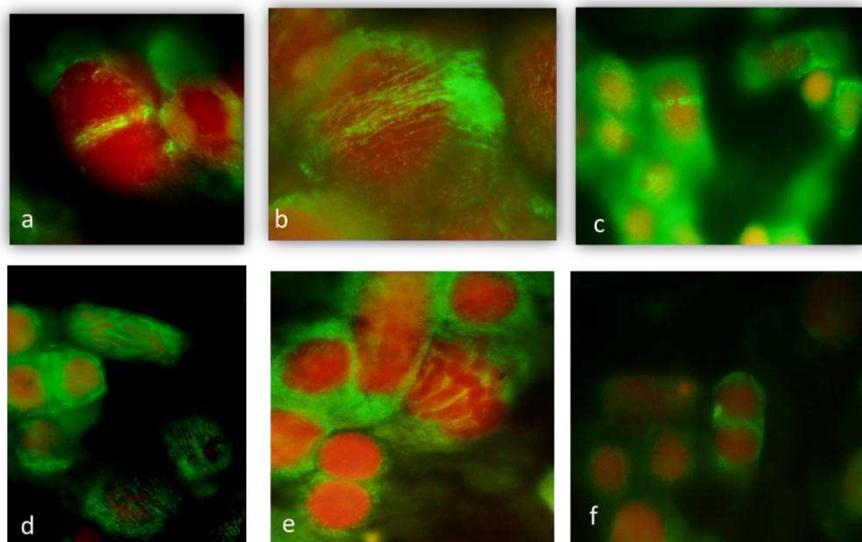
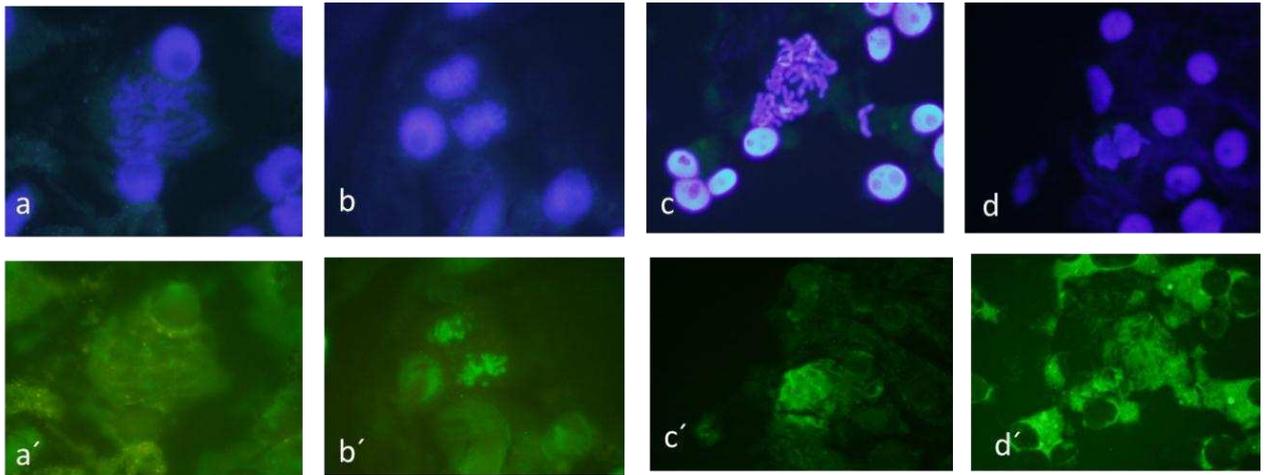


Figura 33. Estructuras microtubulares anómalas en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro®. a-c y e) BPP d) HM f) Fg (1000X)



Figuras 34. a-d) células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a Azzurro® con tinción DAPI. a' - d') las mismas células con inmunolocalización antitubulina. (1000 x). a) Anafase desordenada. a') Ausencia del HM organizado. b) Célula en telofase b') Los microtúbulos se localizan en la zona correspondiente a un estadio de anafase temprana en el HM. No se observa organización de la Fg asociada al estadio de telofase. c) Anafase desordenado con cromosoma vagabundo. c') Se observan microtúbulos dispersos sin organización del HM. d) Telofase d') Ausencia de FG. (1000 X)

4.4.4. Disrupción microtubular por TBZ

La exposición a TBZ mostró resultados que indican disminución en la formación de las estructuras microtubulares junto con inducción de anomalías en parte de esas estructuras para todas las concentraciones ensayadas en el diseño realizado en este trabajo de Tesis (Tabla 20). Tanto la inhibición en la formación de los procesos microtubulares como el daño observado no parece presentar una relación con el incremento de las concentraciones ensayadas.

Tabla 20. Estructuras microtubulares observadas en meristemas de raíces de *Allium cepa* tratadas con TBZ..

Concentración ug/ml	BPP		HM		Fg	
	N	A	N	A	N	A
TBZ 0	43,66±2,52	0,67±1,15	20,67±4,62	0,33±0,58	15,67±1,15	0,33±0,58
DMSO	41,67±2,52	0,67±1,15	21,37±3,61	-	14,33±2,51	0,33±0,58
TBZ 10	22,33±7,23**	6,67±1,53**	12,33±1,53*	5,33±0,58***	6,67±1,53**	4,00±1,00**
TBZ 50	16,57±2,52***	5,33±1,15**	13,33±1,15	5,33±1,15**	6,67±0,58**	3,67±0,58**
TBZ 100	14,00±2,00***	5,33±3,06	9,67±1,15*	5,00±1,00**	4,67±0,58***	3,67±0,58**
TBZ 250	8,33±2,51***	3,33±0,58*	10,00±2,00*	5,00±2,65*	7,00±1,00***	4,67±1,15**
TBZ GSF	11,00±3,61***	5,33±0,58**	10,67±4,73*	5,67±2,08*	8,33±3,21**	5,00±1,73**

Student t.test *p<0, 05** p<0, 01 ***p<0,001 N: Normales; A: Anormales; BPP: Banda preprofásica; HM:Huso mitótico;

Fg: Fragmoplasto; GSF: Griseofulvina. 1000 células observadas.

Al analizar la proporción de estructuras anormales en relación con las normales se observa que para todas las concentraciones ensayadas hay un aumento estadísticamente significativo en la proporción de BPP, HM y Fg anormales. Sin embargo los valores obtenidos indicarían que el aumento de las concentraciones de TBZ no produjeron un incremento proporcional en la respuesta si consideramos la inducción de anormalidades observables (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje de estructuras microtubulares anormales observadas en células meristemáticas de *A. cepa* tratadas con TBZ

Concentración (ug/ml)	BPP	HM	Fg
TBZ 0	1,55±2,69	1,23±2,14	1,85±3,21
DMSO (1%)	3,08±2,68	-	3,03±5,25
TBZ 10	24,40±10,73**	30,30±3,60***	37,64±7,25**
TBZ 50	25,15±6,19***	28,33±2,89***	35,45±5,06***
TBZ 100	26,59±13,76***	33,93±2,74***	43,98±6,26***
TBZ 250	28,44±2,02***	32,24±10,63**	39,74±3,25***
GSF (100 ug/ml)	33,73±8,94***	35,14±1,60***	37,74±1,98***

Student t test *p<0, 05** p<0, 01 ***p<0,001. BPP: Banda preprofásica; HM: Huso mitótico; Fg: Fragmaoplasto; GSF: Griseofulvina.. 100 estructuras observadas.

Los resultados obtenidos para la inducción de BPP anormales/ totales muestra un incremento estadísticamente significativo para todas las concentraciones ensayadas y para el control positivo (GSF 100 ug/ml) comparados con el control. la respuesta de la exposición a las concentraciones de TBZ no muestra una relación concentración respuesta (Figura 35).

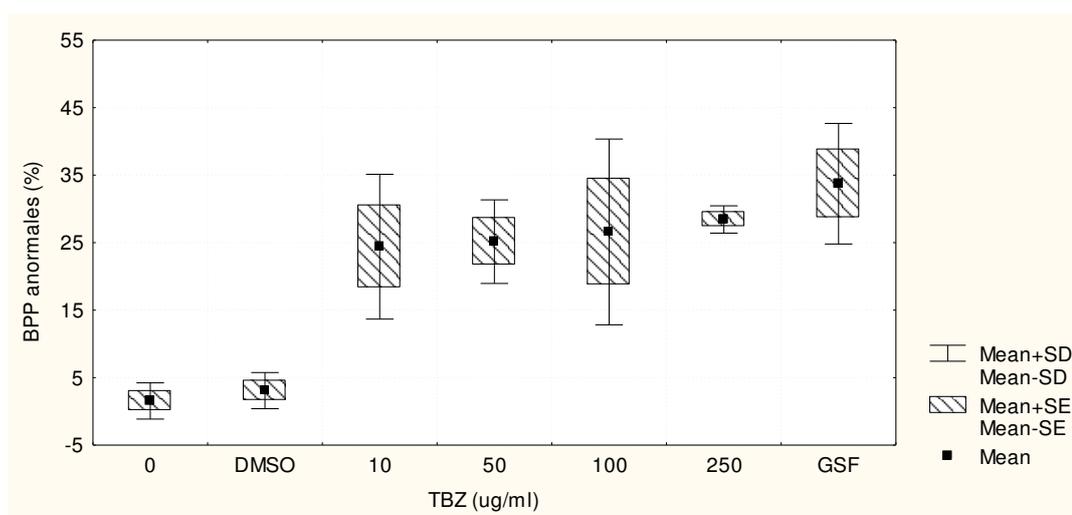


Figura 35. BPP anormales inducidas en meristemas de *Allium cepa* por exposición a TBZ Promedio (Mean), desviación estándar (SD.) y error estándar (SE).

Los porcentajes de HM también aumentan con la exposición a las concentraciones de TBZ ensayadas y al control positivo sin manifestar relación concentración respuesta (Figura 36).

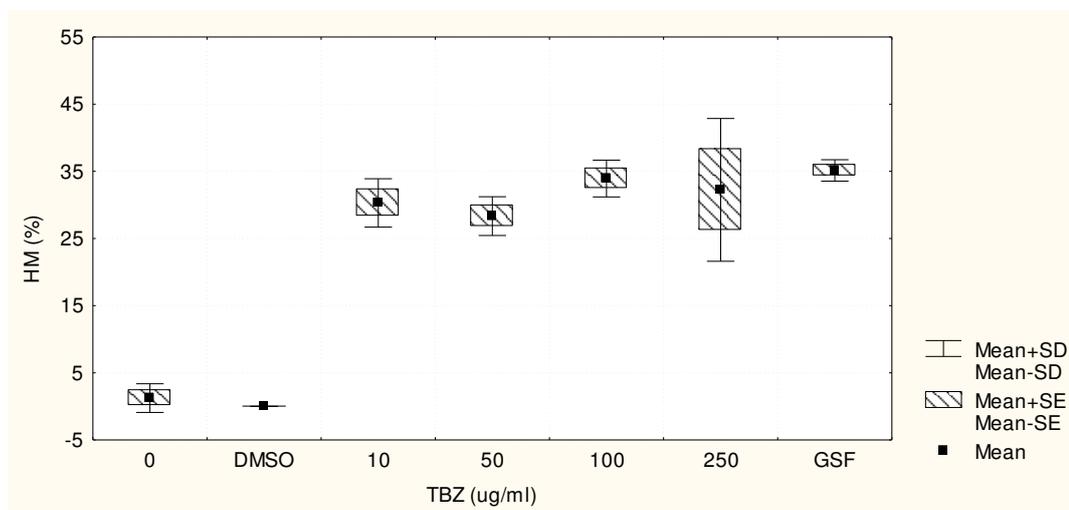


Figura 36. HM en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a TBZ y controles Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE)

Los resultados obtenidos para el porcentaje de Fg anormales presenta el mismo esquema que la inducción de BPP y HM anormales (Figura 37)

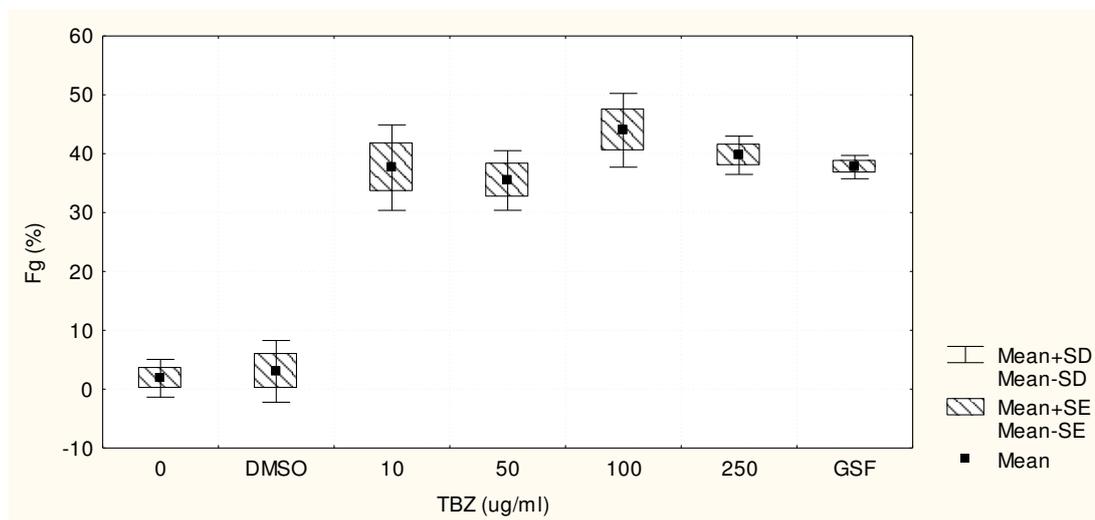


Figura 37. Fg en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a TBZ y controles Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE)

Del análisis de las estructuras microtubulares totales se desprende que la exposición a TBZ disminuye la frecuencia de figuras normales a la vez que induce la presencia de figuras anormales (Tabla 22; Figuras 38 y 39).

Tabla 22. Estructuras microtubulares (MT) totales cada 1000 células observadas y microtúbulos aberrantes cada 100 estructuras observadas en células meristemáticas de *A. cepa* tratadas con TBZ..

Concentración ug/ml	MT /1000	MT aberrantes (%)
TBZ 0	81,33±8,39	1,61±1,41
DMSO (1%)	75,67±5,13	2,17±0,64
TBZ 10	57,33±6,35*	28,27±5,03***
TBZ 50	50,33±3,79**	28,57±2,02***
TBZ 100	42,33±1,53**	33,04±6,90**
TBZ 250	38,33±6,51**	33,40±5,83***
GSF(100 ug/ml)	46±14,93**	35±4,16***

Student t.test *p<0, 05** p<0, 01 ***p<0,001

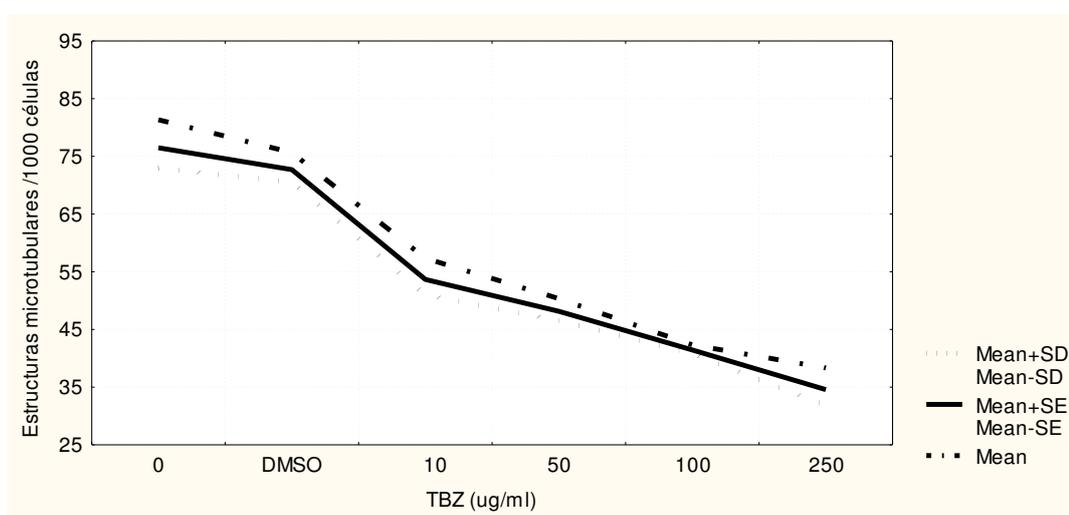


Figura 38. Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE) de las estructuras microtubulares en células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a TBZ y controles

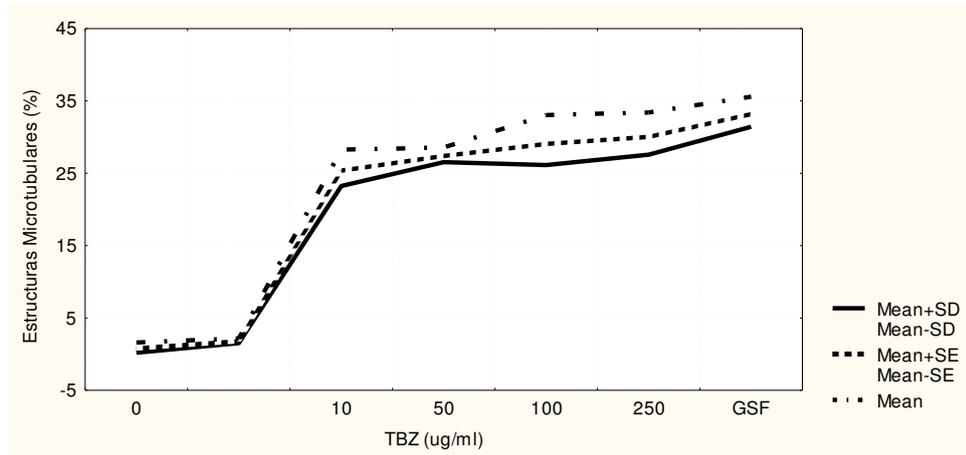


Figura 39. Promedio (Mean), desviación estándar (SD) y error estándar (SE) de la frecuencia de estructuras microtubulares anormales sobre totales en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a TBZ y controles.

Las figuras analizadas con inmunolocalización de tubulinas y contratinción con Ioduro de propidio o con tinción DAPI manifiestan BPP dañadas o ausentes (Figuras 40 a y d, 41 a), HM aberrantes (Figuras 40 b y c ; 41 b-e) y Fg aberrantes o ausentes (Figuras 40 d-f; 41 f).

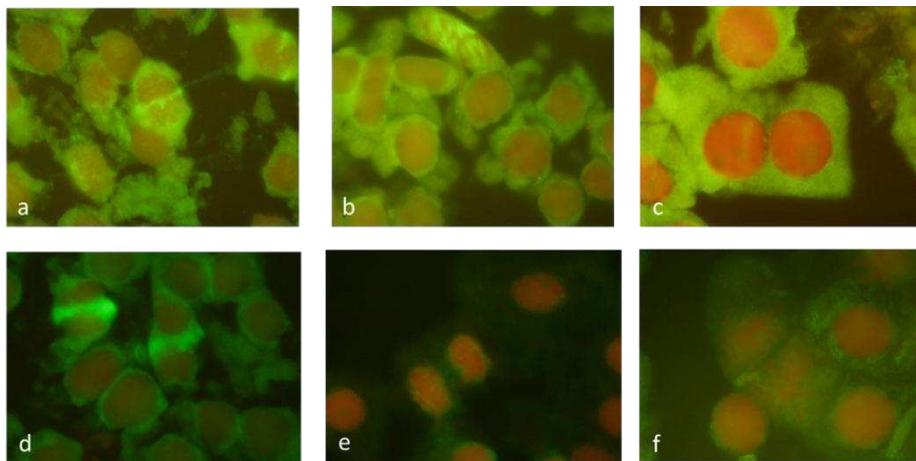


Figura 40. Estructuras microtubulares anómalas en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a TBZ. a) BPP. b) HM. c) Célula binucleada (Fg ausente) d) BPP y Fg e) Fg ausente f) huso despolimerizado. 1000X.

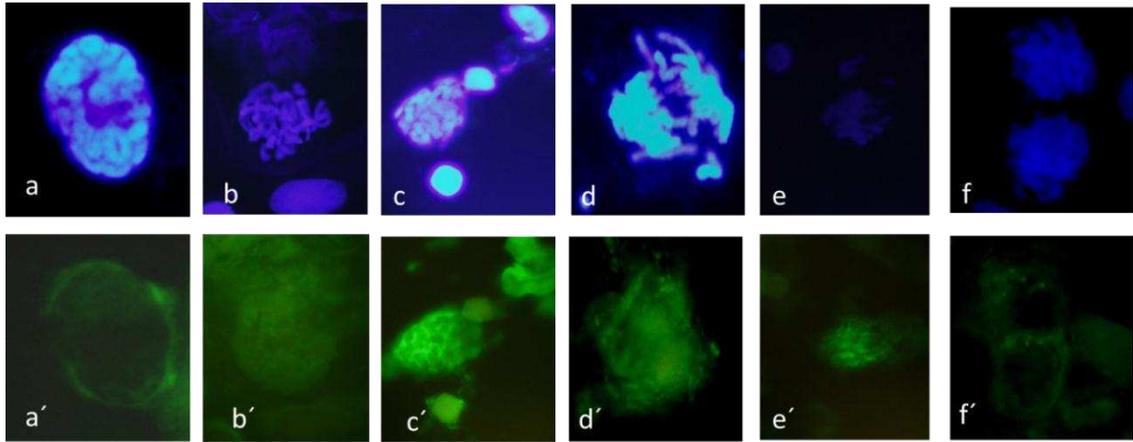


Fig. 41. a-d) células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a TBZ con tinción DAPI. a'-d') las mismas células con inmunolocalización antitubulina. (1000 x). a) Profase. a') No se observa BPP. b) C-metafase. b') Tubulina despolimerizada c) C- metafase. c') Microtubulos desordenados. d) Anafase con varios cromosomas rezagados d') se observan microtubulos dispersos sin organización del HM. e) metafase con cromosomas no alineados y vagabundos. e') Microtúbulos no organizados en HM. f) telofase. f') Fg aberrante. (1000X)

Los resultados obtenidos por exposición a 100 ug/ml GSF (Control positivo) indican que hubo un incremento estadísticamente significativo de las anomalías en las BPP, HM y Fg. También se observa que los puentes en telofase presentaron anomalías en el HM (Figura 42 a - a'), inducción de Husos tripolares (Figura 42 b - b') y MC con Microtúbulos su interior a diferencia de los Mn en los que estos no se detectan (Figuras 42 c-c' y d-d').

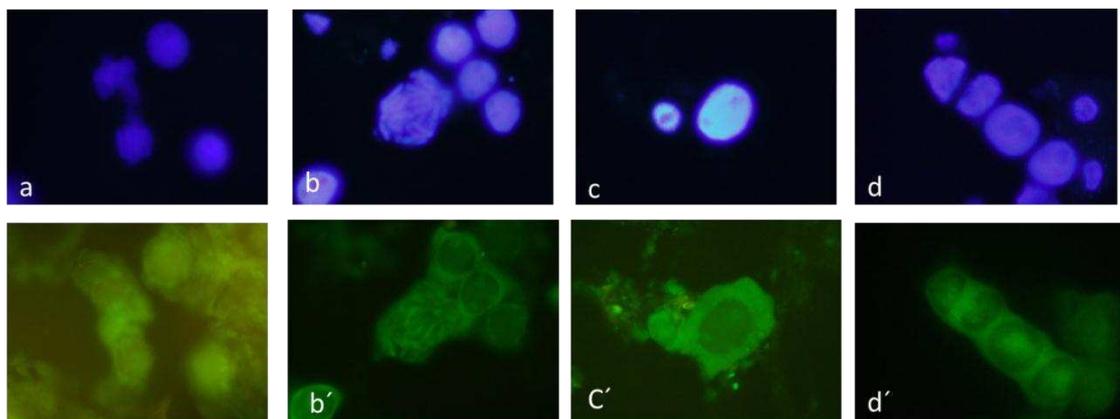


Fig. 42. a-d) Células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a GSF 100ug/ml con tinción DAPI. a'-d') las mismas células con inmunolocalización antitubulina. a) Puente en telofase. a') Microtúbulos desorganizados b Segregación tripolar y micronúcleo . b') Huso tripolar c) minicélula. c') Se observan los microtúbulos en la MC d) Mn adyacente a telofase y MC, d') no se observan microtúbulos en el interior del Mn. . (A: 1000)

Si se comparan los resultados obtenidos para la exposición de las células meristemáticas de *Allium cepa* a los disruptores microtubulares Azz, TBZ y GSF, es posible reconocer que el efecto sobre los procesos microtubulares presenta diferencias sustanciales. Mientras que TBZ induce Bn y la observación microscópica permite detectar telofases en los que el FG no está presente, GSF no induce células Bn y los Fg anómalos aparecen incompletos o con formas difusas sin embargo, no se detecta ausencia de los mismos. Por otro lado, GSF indujo formación de Husos tripolares, MC y alteraciones en los núcleos interfásicos mientras que TBZ no indujo tripolares ni MC. Ambos disruptores a su vez, se diferencian de los resultados obtenidos en los ensayos con Azzurro®, que no induce ni tripolares ni Bn.

D I S C U S I Ó N

5. DISCUSIÓN

5.1. Fuentes de variabilidad en el ensayo de *Allium cepa*

5.1.1. Parámetros de evaluación genotóxica

El uso de plantas vasculares como modelos experimentales *in vivo* (Nivel III) (Mudry y Carballo, 2006) tanto en toxicología como en genética toxicológica, aporta información acerca de los efectos producidos por la exposición a agentes xenobióticos pudiendo las respuestas ser variables según la especie utilizada (Grant, 1978; Ma et al., 1995; Cotelle et al., 1999; Abdel Migid, 2007).

La prueba de *Allium cepa* se aplica con métodos estandarizados tanto para toxicidad como para genotoxicidad y constituye en la prueba de elección para este tipo de monitoreo entre las diferentes posibilidades que utilizan plantas vasculares (Fiskesjo, 1993). Al analizar la literatura, se puede apreciar que los valores basales, propios de los controles para distintos parámetros evaluados mediante la prueba de *Allium cepa*, tales como el índice mitótico (IM), la frecuencia de aberraciones cromosómica (AC) y frecuencia de micronúcleos (Mn), presentan una importante variabilidad (Tabla 22). Esta variabilidad es el reflejo de las diferentes condiciones en las que se realizan los ensayos. La fuente de variabilidad en los resultados tiene su origen en las condiciones experimentales incluyendo variables tan

disparas como la temperatura, disponibilidad de oxígeno y calidad del agua utilizadas para el control negativo, el tiempo de exposición y el número de células contadas para el cálculo del IM, la variedad de *Allium cepa* empleada y el tiempo que transcurre desde el momento de la cosecha hasta la utilización del bulbo.

Tabla 22. Valores obtenidos, condiciones experimentales, referencia y origen del laboratorio en el que se realizó el ensayo con *Allium cepa*.

IM %	AC %	MN	N	T	T (hs)	Control	Origen y referencia
6.46±1.69	1.6	SD	500		48	Agua formulada	Rank et al., 2002. Hereditas 136: 13-18 (Dinamarca - Argentina)
5.13±1.24	1.04	SD					
7.44±1.21	0.2	SD					
5.07±0.89	0.49	SD					
6.06±0.73	0	SD					
4.03±0.63	0.17	SD					
80		SD			SD		Ateeq et al., 2002. Toxicology genetics and environmental mutagenesis Vol 514(1-2) 105-113 (India)
7.32	2.9	0	23536		48	Agua corriente	Amat et al, 2002 Acta Farm. Bonaerense 21(1):37-42 (Argentina)
16.8	0	0.18				Agua corriente	Franco de Diana et al, 2000 Revista de Ciencia y Tecnología-UNA V 37. (Paraguay)
12.01 ±2.10	0	SD		25±5°C		Agua filtrada	Mercano et al, 1999 Rev. Fac. Agron(LUZ) 16:476-487 (Venezuela)
2.3±0.6		0	9000	22±2°C	30	Solución Hoagland	Cotelle et al, 1999 Mutation Research 426 167-171 (Francia)
3.4±0.5		0.1±0.3				SD	
4.94±0.48	1.6±0.9	SD	2000-500	22°C	2° ciclo ?		Kovalchuc et al (1998) Mutation Research 415 47-57 (Ucrania)
5±1.5	0.2±0.4	0.4±0.9	1000-500		48	Agua corriente	Rank and Nielsen (1996) Mutation Research 390 121-127 (Dinamarca)
5.3±1.0	1.4±1.0	0.8±0.7					
7.5±0.13	0.2±0.4	0.8±1.0					
7.1±0.40	2.4±1.4	1	8000	19-21°C	120	Agua corriente	Vesna Smaka-Kincl et al (1996) Mutation Research 368 171-177 (Slovenia)
5.95±0.7	1.4±1.4	SD	1000-100	SD	24	Agua corriente	Rank and Nielsen (1994) Mutation Research 312 17-24 (Dinamarca)
8.5±1.35	1.2±1.2	SD					
7.88±0.44	20±0.6	SD					
5.0±0.76	1.2±0.7	SD					
5.75±0.89	1.8±0.7	SD					
4.9		SD			SD	Agua corriente	Fisjesko (1994) Environmental Toxicology and Water Quality: International Journal, Vol. 9 235-241 (Suiza)
7.66±0.78	1.9±0.9	0	400-1000	SD	24	Agua corriente	Rank and Nielsen (1993) Hereditas 118:49-53 (Dinamarca)

IM: Índice mitótico. AC: aberraciones cromosómicas. MN: micronúcleos. N: Número de células contadas. T: temperatura del ensayo. T: tiempo de exposición en horas. SD: sin datos.

Los ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral mantuvieron las mismas condiciones detalladas en el apartado 2 (Materiales y métodos). Cuando analizamos los valores obtenidos de IM en estos ensayos para todos los experimentos realizados, el valor promedio obtenido es 7,64±1,36 es decir, con un máximo de 9,25 y un mínimo de 6,57. Los ensayos se realizaron minimizando la fuente de variación por causas experimentales, de

modo que la variabilidad observada puede ser atribuida, en su mayor parte, a las características del sistema de ensayo.

5.1.2. Tiempo de duración del ciclo celular en *A. cepa* Valcatorce

La duración del ciclo celular en *A. cepa* presenta en la literatura una variación que va desde 13,5 h hasta 23 h con una duración entre 2 y 4 horas para la mitosis de acuerdo a las diferentes condiciones de temperatura. (López Sáez et al., 1966; González Fernández et al., 1966; Nuti Ronchi y Acara, 1967; Matagne, 1968).. Trabajos más recientes, en los que se utiliza *A. cepa* variedad Francesa para estudios de ciclo celular, establecen el ciclo en 14 h (Pelayo et al., 2003). El método que utilizamos para estimar el tiempo que transcurre en un ciclo celular para la variedad Valcatorce depende de los valores obtenidos para el IM, y de la frecuencia observada de células binucleadas. Considerando la variabilidad que presentan ambos valores y el retardo en el ciclo celular que podría provocar la exposición a los agentes en estudio, el tiempo de 13 horas se sobreestimó en 15 horas para cada ciclo. Los ensayos se realizaron durante 30 horas, permitiendo la exposición al agente durante dos ciclos de división celular, tiempo suficiente para que la acción asociada a la exposición fuera detectada por medio de biomarcadores de efecto.

5.1.3. Influencia del oxígeno en la división celular de las células de *A. cepa*

Como mencionamos previamente, la disponibilidad de oxígeno es un factor que varía en los ensayos dependiendo del método que se utilice para suministrar aire a las soluciones. En el

reporte de US Environmental Protection Agency del programa Gene-Tox. Grant (1982) en la que se valida el modelo *Allium cepa*, se menciona la aireación continua como una de las condiciones de cultivo de los bulbos.

En el método estandarizado por Fiskesjo (1993), así como en varias publicaciones posteriores, no se menciona la aireación como la metodología para mantener los niveles de oxígeno en las soluciones del ensayo. En el referido método de Fiskesjo, este autor propone, para mantener frescas las soluciones, el recambio de las mismas cada 24 horas,. Los resultados obtenidos al analizar los experimentales cuando no se mantiene la aireación indican que la práctica de recambio de soluciones propuesto por Fiskesjo (1985), sin aireación, no es adecuada ya que la depleción de oxígeno es muy rápida y en 24 horas se produce hipoxia. El recambio de las soluciones restablecería las concentraciones de oxígeno promoviendo la formación de radicales libres con el consecuente daño celular (Laderoute & Webster, 1997, Lushchak, 2005, Dhar-Mascareño, 2005).

Los ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral, demostraron que las células meristemáticas que crecieron en condiciones de hipoxia dan lugar a alteraciones celulares preletales que son semejantes a las lesiones ya descritas para tejidos animales y denominadas oncosis, (derivado del griego onkos, “hincharse”). En este proceso la célula empieza a aumentar de tamaño por incremento de los cationes de sodio en el agua intracelular debido a la falta de producción de ATP, que impide mantener el control del volumen celular. En este tipo de alteración preletal, la cromatina se condensa y en última instancia, se degrada. (Majno & Joris, 1995). El efecto observado en condiciones de hipoxia evidencia claramente que las células meristemáticas de *A. cepa* presentan un metabolismo aeróbico y por lo tanto la disponibilidad de oxígeno es una variable condicionante para el funcionamiento del ciclo celular normal. Los efectos de las variaciones en el oxígeno,

interferirían en las evaluaciones de los agentes de elección por alterar los parámetros indicadores en los estudios de genotoxicidad, por lo tanto para todos los ensayos se mantuvo la aireación permanentemente.

5.2 Toxicidad y genotoxicidad del MTZ vinculado al daño oxidativo y la respuesta antioxidante

Los resultados obtenidos por la exposición de las raíces de *Allium cepa* a MTZ en su formulación farmacéutica Flagyl® dan cuenta del efecto tóxico de este compuesto sobre los procesos de crecimiento de la raíz mostrando una relación dosis respuesta. La concentración de 500 ug/ml de MTZ inhibe el crecimiento de la raíz en más del 50 % con respecto al control. Las concentraciones que superaron dicha inhibición fueron descartadas para los ensayos de genotoxicidad (Rank, 1997). Este criterio se tiene en cuenta para realizar los ensayos dentro de un rango de toxicidad tal que permite analizar el proceso de división celular. A medida que las células meristemáticas se dividen, parte de éstas pasan a formar el tejido de elongación. En dicho tejido, las células ya no se dividen y se alargan por debilitamiento de la pared celular y ordenamiento de microfibrillas de celulosa (Córdoba Pedregosa et al., 2003). Es así que la raíz crece por contribución de 2 procesos, la división mitótica en el meristema, que permite la proliferación de las células y el aporte a los nuevos tejidos y el alargamiento de las células, cuando pasan a formar el tejido de elongación.

En la exposición a MTZ en el rango 10-250 ug/ml, el análisis genotóxico sobre las células meristemáticas indica que la división celular no se encuentra afectada por la exposición al MTZ en las concentraciones y el tiempo ensayados en el diseño experimental propuesto. La

ausencia de efecto puede tener explicación tanto en la naturaleza química del MTZ, como en las características metabólicas de las células meristemáticas de *Allium cepa*.

El MTZ es un compuesto ampliamente estudiado en diferentes modelos experimentales en todos los niveles de ensayo, con resultados controvertidos como se menciona en el apartado 1 (Introducción). Se conoce que la metabolización del MTZ en mamíferos ocurre por la vía oxidativa por medio del sistema de Citocromo P450 (CYP), formando metabolitos hidroxilados y acetilados mediante la oxidación de la cadena alifática (Templeton, 1977). Varios estudios indican que estos compuestos oxidados muestran efectos genotóxicos al aplicar el Ensayo Cometa (Elizondo 1996; Menéndez, 2001; Rodríguez Ferreiro et al., 2002), también en sistemas bacterianos (Connor, et al., 1977; Voogd et al 1979; Loft, 1990) y en líneas celulares (Menéndez, 2002).

En este contexto, cabe considerar que en las plantas vasculares, el sistema de citocromos P450 se encuentra involucrado en procesos de detoxificación (Werc et al., 1990; Sanderman, 1992; Guencheva and Pêgas Henriques, 2003) y los metabolitos oxidados se podrían formar, aunque como se mencionó previamente, en los ensayos realizados en *Allium cepa* no se detectaron los efectos genotóxicos mencionados en la literatura.

Es ampliamente aceptado que la reducción del grupo nitro es responsable de la actividad terapéutica del MTZ (Stratford and Adams, 1982) sin embargo la vía reductiva de metabolización del MTZ requiere la presencia de un sistema de transporte de electrones con bajo potencial redox (Rasoloson et al., 2002). Como ya fue demostrado, el oxígeno es condicionante en el funcionamiento de las células meristemáticas de *Allium cepa* evidenciando que las mismas presentan un metabolismo aeróbico y en condiciones de aerobiosis, la bio-reducción de sustancias con bajo potencial redox se encuentra desfavorecida. (Moreno et al., 1983; Raheter y Hanel, 2003). El bajo potencial redox del

grupo nitro en el MTZ es responsable de que la vía bioreductiva sea improbable en células oxigenadas como las meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* (Schmid y Smichd, 1999; Abreu, 2002). La activación bioreductiva es mediada por la actividad nitroreductasa (Adams, 1992), sensible ante la presencia de oxígeno, lo que explicaría que la toxicidad del MTZ fuera menor en células oxigenadas que en células hipóxicas (Peterson et al., 1979). En los organismos anaerobios el grupo nitro del MTZ se reduce dando un radical nitroanión con adición de 6 electrones por molécula (Freeman et al., 1997; Gardner y Hill, 2001), que por sucesivas reducciones enzimáticas conducen a la formación de hidroxilamina y amina primaria (Edwards, 1993). Se forman radicales tóxicos capaces de reaccionar directamente con componentes celulares esenciales incluido el ADN (Raether y Hänel, 2003). Si este proceso de bioreducción completa ocurriera, se esperarían efectos tóxicos y genotóxicos producidos por la hidroxilamina que es el intermediario más reactivo de la vía bioreductiva del MTZ. Estos metabolitos reaccionan con biopolímeros nucleofílicos, dado que se pueden unir covalentemente a varias macromoléculas, incluyendo el ADN (Edwards, 1986; Kedderis y Miwa, 1988).

No existen antecedentes de ensayos de evaluación de efecto realizados con MTZ en modelos que utilicen plantas vasculares, aunque sí hay bibliografía que refiere ensayos con hidroxilamina, que arrojan como resultado un porcentaje elevado de aberraciones cromosómicas sobre las células del meristema de *Allium cepa* (Kaul y Choudhary, 1975). Tomando en consideración este dato extraído de la literatura y sabiendo que es improbable que ocurra la bioreducción completa por las razones anteriormente referidas, la ausencia de genotoxicidad en las células meristemáticas expuestas a MTZ podría ser un indicio de que la hidroxilamina no se produjo por bioreducción del MTZ, en las condiciones en que se realizaron los ensayos.

En condiciones aeróbicas la reducción podría tomar parte, con la adición de un solo electrón hacia el radical nitro anión que es oxidado en presencia de oxígeno recomponiendo la molécula original y con la formación de un anión superóxido. Este ciclo fútil genera especies reactivas del oxígeno (ROS) sin pérdida de la molécula original. Varios autores coinciden en que la generación de radicales nitroanión por bio-reducción del MTZ es difícilmente detectable en células aeróbicas, ya sea porque el radical nitroanión reacciona con el oxígeno en el mencionado ciclo fútil o por que el MTZ compite con el oxígeno por los electrones (Moreno et al., 1983).

Una forma de evaluar si los tejidos estuvieron expuestos a ROS es analizar la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática y el daño oxidativo (Offord et al., 2000). Con este objetivo se realizaron los ensayos sobre el tejido meristemático y sobre el de elongación de las raíces de *Allium cepa* expuestas a 250 ug/ml de MTZ. Los resultados obtenidos dan cuenta de que las exposiciones a MTZ, en concentraciones que afectan el crecimiento de la raíz, presentan en el tejido meristemático, respuesta antioxidante principalmente enzimática, por aumento de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) y no enzimática, por incremento del glutatión reducido (GSH) y la relación ascorbato reducido/ ascorbato oxidado (AA/ADH). El ascorbato ASC es una molécula muy importante en las plantas vasculares. Se encuentra involucrada en varios mecanismos antioxidantes y en la regulación de la elongación de la raíz, en la división celular y en la proliferación (Córdoba y González Reyes, 1994; González Reyes et al., 1998; Arrigoni, 1994; Potters et al., 2002). El ascorbato reducido se oxida a monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA) y en las plantas existen mecanismos que regulan las concentraciones de esos metabolitos en diferentes tejidos dando lugar a una relación AA/DHA adecuada al estado metabólico (Horeman et al., 2000; Pacciolla 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, para la fracción meristemática de *Allium cepa*, indicarían que se indujo la generación de ROS y que fue contrarrestada por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las ROS son constantemente producidos en las células (Gutteridge, 1994) y el principal origen de los ROS endógenos es el metabolismo oxidativo en la mitocondria y procesos como la inflamación. Durante el proceso de producción de energía por la cadena respiratoria mitocondrial 4 electrones son adicionados al oxígeno molecular dando como resultado la formación de dos moléculas de agua. Se estima que entre el 1 y 4 % del oxígeno que ingresa a la célula forma alguna de las siguientes especies: anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas reaccionan con otras no radicales. La cadena respiratoria es la mayor fuente de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que por dismutación genera H_2O_2 por una reacción mediada por la familia de las superóxido dismutasas (SOD). El H_2O_2 puede formar el radical OH^{\cdot} altamente reactivo. El H_2O_2 es detoxificado por el sistema de enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Brazilai et al., 2002). La respuesta antioxidante aumentada por la exposición a MTZ sería compatible con las especies formadas por reacción del MTZ con el oxígeno en el ciclo fútil.

El tejido de elongación no presenta la respuesta enzimática pero sí aumentan significativamente la respuesta no enzimática GSH y los compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicador de peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es un proceso en el que los lípidos son oxidados (Sevanian & McLeod, 1997) por el radical hidroxilo y otras especies radicalarias, llevando a la formación de radical hidroperóxido que ataca los ácidos grasos poliinsaturados, reiniciando el proceso y estableciendo una cadena de propagación de daño peroxidativo (Martinez-Cayuela, 1998).

La diferencia en la respuesta de los tejidos meristemático y de elongación observada en *A. cepa*, da cuenta de las diferencias en el metabolismo y en las condiciones redox de ambos tejidos. Dado que estamos frente a un ensayo agudo, el tiempo de la exposición no permite conocer si estas lesiones son reversibles y de qué forma un mayor tiempo de exposición afectaría a las células meristemáticas. Las concentraciones de oxígeno del ensayo corresponden a valores cercanos a la saturación, podría ser que menores tenores de oxígeno, dentro de niveles que no afecten el funcionamiento de la célula, pudieran modificar los resultados.

En este contexto, son necesarios estudios más completos para evaluar estos factores que podrían arrojar luz sobre los mecanismos de acción del MTZ. Los resultados controvertidos referidos en la literatura, podrían entonces estar vinculados con las características de los tejidos expuestos, el tipo de sistema utilizado, la disponibilidad de oxígeno y la capacidad antioxidante de las células y en conclusión, el potencial genotóxico del MTZ dependería de las condiciones metabólicas del tejido expuesto.

5.3 Toxicidad y genotoxicidad del TBZ: vinculación con el daño microtubular

5.3.1. Toxicidad y genotoxicidad

Como se describió en el apartado 1.2.1., el potencial genotóxico del TBZ es discutido, ya que las investigaciones realizadas describen resultados tanto negativos como positivos al analizar el potencial efecto deletéreo tanto para diferentes sistemas *in vivo* como *in vitro*.

Se ha sostenido que la polaridad del anillo imidazólico podría favorecer la unión de estos compuestos al ADN, lo que llevaría a la formación de aductos en la molécula. Algunos trabajos concluyen que el tiabendazol no provoca daños genotóxicos significativos, debido a que no posee posibilidad de generar carbamatos; ni es metabolizado a este tipo de sustancias, a diferencia de otros compuestos químicamente similares como el benomil y el carbendazim (Lankas et al., 2001).

Acorde a este concepto, un ensayo realizado en *Allium cepa* en el que se evalúa la clastogenicidad de 4 compuestos imidazólicos, benomyl, carbendazim metil-tiofanate, tiabendazol y fuberidazol, muestran efectos genotóxicos de tipo clastogénico sólo para el benomil y el carbendazim (Sahu et al., 1983)

Sin embargo, otras investigaciones demostraron que el tiabendazol inhibe el ensamblaje de los microtúbulos lo que explica su capacidad para provocar aneuploidías (Mailhes et al. 1997).

Las células meristemáticas de *Alium cepa* expuestas a las concentraciones de TBZ estudiadas por exposición a la formulación farmacéutica Foldan® con el diseño experimental propuesto en este trabajo de Tesis Doctoral, muestran efectos tóxicos evidenciados en la inhibición de la elongación de la raíz.

A diferencia del MTZ que presentó un correlato en los efectos sobre la división celular ya que produjo la inhibición en el IM e indujo aberraciones cromosómicas anafase-telofase y micronúcleos, al evaluar TBZ, los biomarcadores de genotoxicidad tales como C-metafases, anafases desorganizadas, cromosomas rezagados, células poliploides, binucleadas y micronúcleos son indicadores de efecto genotóxico vinculado con disrupción de los sistemas microtubulares. Cabe aclarar que la elongación de la raíz depende de la organización de los

microtúbulos corticales que dirigen las microfibrillas de celulosa en la dirección de crecimiento de la célula, por lo tanto la disrupción microtubular también podría afectar este proceso de elongación meristemática.

Entre los mecanismos que se que podrían ver afectados por agentes disruptores de los microtúbulos se encuentran el balance entre el ensamble y desensamble de los monómeros de tubulina (Cassimeris et al., 1988), la inestabilidad dinámica de los microtúbulos en metafase-anafase (Taylor et al., 2004) y la regulación y control de la transición metafase-anafase por los complejos proteicos (Crane et al. 2004; Meraldi et al., 2004; Vangareli et al., 2004).

La inhibición en el IM, la frecuencia de Mn y de BN presentan una relación concentración-respuesta y si bien la frecuencia de aberraciones anafase-telofase se encuentra estadísticamente aumentada de forma significativa en todas las concentraciones para el rango 50-250 ug/ml de TBZ ensayadas, no se manifiesta la relación concentración - respuesta, antes referida para los otros biomarcadores. Este resultado se puede interpretar considerando que muchas células aberrantes mueren o quedan detenidas en interfase y que ello se refleja en la inhibición del IM. Dado que los resultados se expresan como número de aberraciones cada 100 anafases y telofases, parte de las células dañadas que no ingresan a mitosis no contribuyen a la contabilización de células aberrantes. Cuando la fracción de células que no ingresan a mitosis es muy alta (toxicidad mitótica elevada), los valores de frecuencia de aberraciones anafase-telofase pueden disminuir si se incrementa la concentración del tóxico. Este tipo de respuestas las hemos observado como efecto de la exposición en las concentraciones más elevadas de Azzurro y de Griseofulvina, agentes de caracterizada acción disruptora de microtúbulos .

El aumento de la frecuencia de micronúcleos es un indicio de que las células se desprendieron de parte del material genético. En el contexto de los resultados obtenidos, el material genético contenido en los micronúcleos podría estar constituido por cromosomas rezagados o por ADN en exceso que es extruido de la célula (Lindberg et al., 2007; Fernández et al., 2007).

Las células binucleadas aumentan su frecuencia con la concentración y se encuentran mayoritariamente en interfase, algunas en profase y sólo una, se observó en prometafase. El paso de una fracción de Bn a mitosis se pone en evidencia por la presencia de células poliploides que sumaron a la condición de binucleadas la disrupción del huso mitótico (Giménez Abián et al., 2004).

Como se mencionó en el apartado 1.2.1. (Introducción) los resultados que presenta la literatura en cuanto a la genotoxicidad de TBZ para diferentes sistemas de ensayo coinciden en que este compuesto induce disrupción en los microtúbulos, aunque ensayos realizados en plantas arrojan resultados negativos en la evaluación de genotoxicidad (Sahu, 1983) y en la evaluación de daño microtubular (Voutsinas et al., 1997). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral son concordantes con el efecto disruptor de las organizaciones microtubulares en cuanto al tipo de aberraciones anafase- telofase asociadas a un probable efecto deletéreo sobre el huso mitótico.

También observamos otros aspectos citológicos tales como las células binucleadas que podrían ser producidas por mala formación del fragmoplasto (Mineyuky et al., 1988) y los planos de división oblicuos, que podrían estar relacionados con daño en las Bandas Preprofásicas que imprimen esta característica para cada evento de mitosis (Giménez Abián, 1998).

Cuando se compara la respuesta de *A. cepa* a partir de los resultados obtenidos para los otros compuestos de conocida acción disruptora de los microtúbulos analizados en la presente Tesis Doctoral, como son el Azzurro y la Griseofulvina, se encuentran diferencias en la inducción de algunas de las aberraciones anafase- telofase como en las alteraciones de núcleos interfásicos. La inducción de células poliploides y binucleadas fue observada diferencialmente en las raíces expuestas a TBZ, mientras que la exposición a Azzurro indujo prioritariamente anafases desorganizadas como indicadores de ruptura del huso mitótico. Otros indicadores de ruptura de cromatina como los anillos y los puentes también se observaron por exposición Azzurro y a Griseofulvina. En esta última se agregó la inducción de células tripolares o multipolares junto con alteraciones en los núcleos interfásicos como Minicélulas y Yemas nucleares.

Mientras que la exposición de células meristemáticas de *Allium cepa* a TBZ y GSF indujo un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de Mn, Azzurro no presentó inducción significativa de este biomarcador. La exposición a Azzurro para las concentraciones ensayadas tampoco indujo células binucleadas ni poliploides. La presencia de anillos y puentes daría cuenta de otros efectos genotóxicos que contribuyen a detener o retrasar el ingreso a la mitosis. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en otros sistemas *in vitro*, como son la exposición de linfocitos de sangre periférica a las concentraciones ensayadas en la presente Tesis Doctoral, que son 1 y 10 ug/ml de Azzurro, las que si bien indujeron aberraciones cromosómicas e inhibición del IM, no produjeron incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos hasta la concentración 25ug/ml, (Soloneski et al., 2001, 2002 a). Los ensayos realizados por otros autores en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) para las mismas concentraciones de Azzurro demostraron que inhiben significativamente el IM y no inducen daño celular al realizar el Ensayo Cometa con dosis mayores que 50 ug/ml (Soloneski et al., 2002 b).

En *A. cepa* las aberraciones anafase-telofase más frecuentemente inducidas son las anafases desorganizadas que probablemente se resuelvan sin pérdida ni ganancia de cromosomas. El efecto más notable para este rango de concentraciones de Azzurro® y en las condiciones del diseño experimental utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral es la toxicidad mitótica, manifestada por la inhibición del IM. Los resultados obtenidos en los diferentes sistemas de ensayo para las concentraciones utilizadas en la presente Tesis, se podrían explicar por mecanismos de acción indirecta a través de ciertos productos de la metabolización del Azzurro como sería por ejemplo la formación de radicales libres y de especies reactivas del oxígeno (ROS) en coincidencia con lo descrito en otros niveles de complejidad para monitoreo de agentes químicos (Solonesky et al., 2002 b). La concordancia de los resultados obtenidos en *A. cepa* por la exposición a Azzurro®, con los obtenidos en otros sistemas *in vitro* indicarían que los procesos involucrados estarían presentes en ambos tipos de sistemas.

Las células meristemáticas sometidas a tratamiento con GSF mostraron varios tipos de aberraciones asociadas a ruptura de la cromatina y a disrupción microtubular. La GSF es una sustancia derivada de la coumarina, utilizada como eficaz agente antifúngico y que es ampliamente usada en ensayos genotóxicos como control positivo debido a su característica acción sobre el huso mitótico con inducción de C-metafasas y mala segregación hasta una completa desorganización del huso mitótico y generación de poliploidía (Voutsinas et al., 1997). También produce una fuerte inducción de micronúcleos (Kalweit et al., 1999). A diferencia del TBZ y del Azzurro, GSF indujo presencia de núcleos tripolares en las células meristemáticas de *Alliu cepa* pero no células poliploides. Además, la exposición a GSF indujo la deformación de los núcleos interfásicos y la presencia de minicélulas, yemas nucleares, células multinucleadas y Micronúcleos.

Analizando los resultados comparativamente para los compuestos TBZ, Azzurro y GSF, se puede concluir que si bien los 3 inducen aberraciones compatibles con el daño a nivel de los microtúbulos, presentan diferencias que se permitirían arriesgar distintas interpretaciones.

En primer término, una diferente afinidad de los compuestos por las tubulinas o una diferente capacidad para el ingreso a la célula. Otra explicación sería la que surge cuando ponemos la atención en que los mecanismos vinculados podrían presentar diferentes blancos de ataque en las células. El modo de acción propuesto para el TBZ es la inhibición en la polimerización de las tubulinas por unión covalente (Prichard 1994) sin embargo, estudios recientes sugieren que más que impedir la polimerización, afecta la dinámica de polimerización y el balance entre las tubulinas libres y las polimerizadas, inhibiendo el control autoregulatorio de la síntesis de tubulinas (Pisano et al., 2000; Carballo et al., 2006).

El efecto sobre los microtúbulos ejercido por la exposición a GSF se atribuye al bloqueo de la producción de los microtúbulos por unirse a proteínas asociadas. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral para los 3 compuestos son concordantes con los reportados en otros sistemas de ensayo *in vitro*, indicando que *A. cepa* es un modelo experimental que permitiría evaluar la genotoxicidad por disrupción microtubular, como se detalla a continuación.

5.3.2. Daño microtubular por exposición a TBZ

Como se expuso en el apartado 1.4.3., los microtúbulos se organizan en estructuras secuenciales siguiendo las fases de la mitosis. Esta secuencialidad se encuentra condicionada al adecuado intercambio de monómeros de tubulinas durante la división celular

determinado por el comportamiento dinámico de los microtúbulos que es la base fundamental de la conformación microtubular (Dhonukshe & Gadella, 2003). Los resultados obtenidos por exposición a TBZ indican que todos los procesos microtubulares asociados a la mitosis en las células meristemáticas de *A. cepa* se encuentran afectados por esta exposición. Este efecto se evidencia por la disminución de estructuras asociadas tanto a la mitosis como las BPP, HM y Fg como al incremento del daño en las mismas. La disminución en las estructuras por exposición a TBZ se podría vincular con la disminución observada del índice mitótico, que como se mencionó previamente, podría ser consecuencia de la detención de las células con daño genético en la interfase.

Otra explicación es que la disrupción de la dinámica de formación de estas estructuras impidiera el comienzo de la mitosis aún cuando las células no presentaran alteraciones genéticas. El análisis de los resultados obtenidos al aplicar la técnica de inmunolocalización de tubulinas concuerda con los obtenidos en el análisis con la tinción cromosómica convencional, en el hecho de que el rango de concentraciones 50-250 ug/ml de TBZ es equivalente con la inducción del daño. Este efecto podría reflejar que parte de las células dañadas no ingresan a mitosis por quedar detenidas en interfase.

Otra interpretación de estos resultados podría estar dada por el efecto del TBZ sobre la dinámica microtubular que podría impedir observar una relación concentración efecto, por estar afectada la dinámica de polimerización y despolimerización basada en el control autoregulatorio de la síntesis de tubulinas como proponen en algunas publicaciones Pisano et al., (2000). Al comienzo de la mitosis las PPB se forman determinando la orientación del plano de división de las células meristemáticas, este proceso comprende la conexión entre las tubulinas de las BPP y las de los HM durante la prometafase (Wick et al., 1983; Gimenez Abián et al., 1998, Mineyuky, 1999). Subsecuentemente, las fibras de los microtúbulos dan

lugar al HM que se orienta perpendicular a este plano y guía la segregación de las cromátidas a los polos de las células a través de la unión cinetocoro-microtúbulo (Wick y Duniec, 1984; Yu et al., 2000). En el comienzo de la telofase, las tubulinas que forman parte de la zona media del HM forman el Fg, el que una vez formado, crece centrifugamente y guía las vesículas con material durante el proceso de citocinesis, para la formación de la nueva pared celular (Baluska et al., 1997b; Otegui & Staehelin, 2000; Dhonuskshe y Gadella 2003).

La complejidad del proceso descrito está vinculada a la inestabilidad dinámica de los microtúbulos, basada en 4 parámetros que son: la tasa de alargamiento, la tasa de acortamiento, la frecuencia de catástrofe (transición entre el alargamiento y el acortamiento) y la frecuencia de rescate (transición entre el acortamiento y el alargamiento). La interferencia con este proceso produce desarreglos en la red microtubular y la respuesta a ese estímulo es el control de la división celular (Desai & Mitchison, 1997). La regulación de la dinámica microtubular está a cargo de varias proteínas incluyendo el complejo ciclina quinasa, el que al fosforilar las proteínas que estabilizan los microtúbulos (inhiben la catástrofe), las inactivan y las proteínas que las desfosforilan las activan (Belmont et. al., 1990, Verde et al., 1992). Los parámetros mencionados se modifican de acuerdo a la organización de los microtúbulos. Por ejemplo, se sabe que los microtúbulos que forman las BPP son más dinámicos y cortos, con una frecuencia de catástrofe mayor que los microtúbulos corticales (Dhonuskshe & Gadella, 2003). Los microtúbulos corticales se despolimerizan aumentando la cantidad de tubulinas libres que son utilizadas para la formación de nuevos microtúbulos que forman parte de las BPP sin síntesis de nuevas tubulinas. Si estas tubulinas libres presentan afinidad con el TBZ, la polimerización se verá afectada, pero también se verá afectado el control autoregulatorio de la síntesis de nuevas tubulinas.

También se sabe que estos parámetros son diferentes para plantas que para mamíferos, resultando en plantas en una mayor tasa de recambio de tubulinas (Hush et al., 1994). La inhibición de la síntesis de tubulina mostró una relación concentración- respuesta en CHO, para 10 ug/ml y 25 ug/ml así en esta última concentración se pudo observar un 80 % de inhibición (Pisano et al, 2000). Este resultado de la literatura es acorde con los hallazgos del presente estudio en el sentido de que existe un límite para el efecto observado que es función de las concentraciones ensayadas, posiblemente porque existe saturación de moléculas de TBZ que se puedan unir a las tubulinas libres. En el mismo trabajo de la bibliografía, los autores refieren que el TBZ presenta un afinidad mayor por tubulinas acetiladas, concepto que también podría explicar los límites en la afinidad con las tubulinas con diferente estado transicional (Pisano et al., 2000).

El control de la síntesis de tubulinas es a nivel transcripcional y la expresión de cada familia génica α - y β -tubulinas dependerá de condiciones intrínsecas de la célula y de estímulos externos. La disponibilidad de monómeros α y β puede depender también de mecanismos que controlan la estabilidad del RNAm y la síntesis de proteínas. La subregulación de la síntesis de tubulinas por incremento de dímeros de tubulinas no polimerizadas y monómeros depende de por lo menos 2 mecanismos descritos en células animales. Uno opera sobre la cadena nascente de la cadena polipeptídica de β -tubulina, dímeros de tubulina no polimerizados se unen al motivo MREI del extremo N-terminal común a las β tubulinas y causa la inactivación de una RNAsa que degrada específicamente RNAm de tubulinas.

Si bien hasta ahora no se demostró que este tipo de mecanismo autoregulatorio exista en plantas, sí existen evidencias indirectas dado que muchas β -tubulinas en las mismas contiene MREI como tetrapéptido inicial. Otras evidencias fueron obtenidas en cultivos de células de soja (Ebel et al. 2001) y de arroz (Giani et al. 2002).

Experimentos realizados con un mutante de *Aspergillus nidulans* con microtúbulos hiperestables a 37°C, demostraron que la exposición a TBZ permitía el crecimiento de la colonia por inducir la despolimerización, posiblemente por unirse a tubulinas libres e inducir en los procesos regulatorios, una tendencia a liberar las tubulinas polimerizadas como respuesta más rápida a la síntesis *de novo*.

Los resultados obtenidos con Azzurro® y GSF no difieren de los obtenidos con TBZ en cuanto a que afectan los 3 tipos de estructuras, sin embargo Azzurro presenta alta toxicidad mitótica para la concentración ensayada de 10 ug/ml y que se ve reflejada en la disminución de estructuras normales y anormales, este resultado es acorde con lo reportado en la literatura para la exposición de células de la línea CHO en las que los autores refieren que concentraciones superiores a 25 ug/ml presentan inviabilidad celular, sugiriendo que otros mecanismos diferentes a la disrupción de los microtúbulos estarían actuando en la toxicidad del Azzurro (Soloneski et al., 2002).

La GSF utilizada como control positivo en este trabajo de Tesis Doctoral, indujo también daños a nivel microtubular para la concentración 100 ug/ml ya que registramos inducción de husos tripolares, no observados en la exposición a Azzurro ni a TBZ. Cuando se comparan los resultados obtenidos en la caracterización de efecto mediante la técnica de inmunolocalización con los obtenidos con la tinción convencional, se puede apreciar que los valores de elevada toxicidad mitótica para el TBZ no disminuyen la frecuencia de aberraciones cromosómicas como sí ocurre con la exposición a Azzurro y GSF y tampoco en cuanto a la formación de los microtúbulos aberrantes. Estos hallazgos permiten sugerir que Azzurro y GSF producirían efectos tóxicos por mecanismos diferentes que el del daño microtubular. Esta hipótesis tendría sustento al proponer que la GSF induce otros tipos de aberraciones indicadores de clastogénesis y núcleos interfásicos aberrantes y que el Azzurro

no muestra aberraciones anafase-telofase acordes al daño microtubular observado, permitiendo proponer que una fracción de las células mueren o se detienen en interfase.

El análisis con tinción convencional de las células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a las concentraciones ensayadas de TBZ presenta efectos tóxicos y genotóxicos que concuerdan con los efectos observados en el análisis de inmunodetección de tubulinas, sugiriendo que el mecanismo de acción más importante se explica por la unión de TBZ a las tubulinas. Los resultados obtenidos para la exposición a Azzuro y GSF podrían indicar otros mecanismos relacionados tanto con la toxicidad como con la genotoxicidad que se suman a la disrupción microtubular.

La inducción de husos tripolares fue reportada en CHO tanto para Azzuro (Soloneski, 2002) como para Tlabendazol (Pisano et al., 2000; Carballo et al., 2006). En las células meristemáticas de *A. cepa* este tipo de daño no se observó para ninguno de los dos agentes evaluados. La GSF induce tripolares en distintos sistemas sugiriendo otro mecanismos de toxicidad micortubular que TBZ y Azzuro®. Este resultado podría dar cuenta de las diferencias descritas en el apartado de 1.3.4.3 en cuanto a la diversidad en los centros de organización microtubular para células animales y plantas vasculares que comprenden aspectos estructurales, espaciales y moleculares distintos.

5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS:

-Los ensayos realizados para la presente Tesis Doctoral aportaron información original sobre el potencial genotóxico de los agentes estudiados, si bien más estudios cambiando los tiempos de exposición podrían informar acerca de la reversibilidad de los efectos. Por ejemplo el daño oxidativo y la respuesta antioxidante observados en la exposición a MTZ, durante 30 h se podría ensayar a nuevo incorporando a la batería de análisis un tiempo de

exposición mayor, variable a incluir en futuros análisis. Otra variable que podría influir en los resultados son los niveles de oxígeno disponible dentro del rango de tolerancia fisiológica para las células meristemáticas ya que como se mencionó previamente, el oxígeno está involucrado en reacciones de reducción del MTZ y las diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno podrían dar lugar a resultados diferentes en cuanto a la genotoxicidad del MTZ. En la presente Tesis Doctoral se demuestra que los ensayos realizados en raíces meristemáticas de *Allium cepa* analizando simultáneamente la genotoxicidad y el estrés oxidativo, aportan indicios de exposición a ROS y nueva información acerca de los posibles mecanismos involucrados en el metabolismo del MTZ dando real dimensión al valor del estudio realizado.

-Cuando las células se exponen a un agente genotóxico, éste puede producir toxicidad mitótica cuya dimensión podrá depender o no, de la dosis del agente involucrado. Se espera que a dosis mayores se incremente la toxicidad mitótica, a la vez que disminuye la genotoxicidad relativa ya que muchas células dejan de ingresar a mitosis y no contribuyen con la fracción de células que permiten detectar el daño genético. La fracción de células no dañadas que ingresan a mitosis será relativamente mayor disminuyendo entonces la probabilidad de generar un conjunto de células genéticamente afectadas. Cuando los mecanismos de toxicidad mitótica son otros diferentes a la inducida por daño genético, el riesgo de establecer líneas celulares mutadas dentro del tejido sería aún menor. Podría ser que los riesgos de daño genético permanente asociados con la exposición a agentes genotóxicos presenten riesgos diferentes asociados con la relación entre estas dos variables Toxicidad / Genotoxicidad. En este contexto de reflexión surge el interés en ampliar el conocimiento sobre la relación entre toxicidad mitótica y genotoxicidad a la luz de evaluar

los riesgos de amplificación del daño producido por genotoxicidad, que resulta en mutaciones permanentes, con el potencial riesgo de establecer en el tejido estirpes celulares transformadas.

-Las investigaciones llevadas a cabo sobre los procesos relacionados con la dinámica de los microtúbulos y la regulación de la formación de los mismos dio lugar al advenimiento de la Tubulonomía, que es actualmente un campo de investigación con potencial aplicación en diferentes disciplinas, en particular en medicina ya que muchas enfermedades humanas se encuentran asociadas a mutaciones en genes involucrados con estos procesos que afectan la formación de dímeros de tubulinas y microtúbulos (Kortazar et al., 2006). Por otro lado, las drogas que previenen la formación de los husos mitóticos presentan interés por ser varias de las más frecuentemente utilizadas en las terapias contra el cáncer como la vinblastina, vincristina y taxol (Iwasaki, 1998). Otro punto de interés, es la exposición accidental o terapéutica de los organismos a agentes disruptores de los microtúbulos como es el caso de los agentes estudiados en la presente Tesis Doctoral, ya que por su potencialidad aneugénica, se encuentran vinculados con la etiología de enfermedades como el cáncer y otras afecciones de origen genético. Nuevamente la relación entre genotoxicidad y toxicidad mitótica podría esclarecer la diferencia entre el riesgo asociado a la exposición de los organismos a estos agentes respecto de la capacidad de estos para ser aplicados en las terapias de tratamiento del cáncer por su toxicidad mitótica.

En la presente Tesis se demuestra que la exposición a disruptores microtubulares puede ser puesta en evidencia con técnicas de inmunodetección de tubulinas. Sin embargo los mecanismos involucrados en el efecto sobre estas estructuras parecen presentar características diferentes, ya que parte del daño inducido es propio y característico de la estructura de cada agente. Investigaciones más detalladas se podrían realizar para ampliar el

conocimiento de los mecanismos involucrados en el daño microtubular y la potencialidad aneugénica de los agentes involucrados. Estos estudios incluyen aplicación de técnicas de colocalización de tubulinas y proteínas involucradas en la formación de los microtúbulos, así como el estudio de aspectos de la regulación de la dinámica microtubular y de la regulación genética de la síntesis de tubulinas.

.

6. CONCLUSIONES

1- Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis permitieron evaluar la información aportada por el sistema de ensayo acerca de los mecanismos de acción genotóxica de agentes químicos pertenecientes al grupo imidazólico, indicando que la acción del MTZ estaría vinculada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la generación de radicales libres como fuera referido en otros trabajos y sugiriendo que el potencial genotóxico depende de las condiciones redox de las células expuestas y de la disponibilidad de oxígeno en las condiciones en las que se realiza el ensayo. Este aspecto, podría ser el origen de los resultados controvertidos referidos en la literatura como consecuencia de las diferencias presentadas en los diferentes tejidos en los que se aplica la evaluación genotóxica en los diferentes sistemas de ensayo. Los estudios de inmunolocalización de tubulinas permitieron detectar el daño producido por el TBZ en las estructuras constituidas por microtubulos. La ausencia de la relación concentración respuesta podría ser indicio de alteración en la dinámica microtubular más que un efecto despolimerizador en concordancia con resultados presentados en otras publicaciones.

2- Los resultados obtenidos permitieron ampliar el conocimiento del sistema de ensayo constituido por la raíz de *Allium cepa* al confirmar la respuesta diferencial de las regiones meristemáticas y de elongación en cuanto al daño oxidativo y la respuesta antioxidante por exposición a MTZ, indicando que las células meristemáticas presentan una respuesta más eficiente frente a la producción de radicales libres.

3- La aplicación de la metodología para evaluar el daño microtubular, confirmó los resultados obtenidos para la exposición a TBZ y Azzurro® reportados en células CHO. Sin embargo, se encontraron diferencias en algunos indicadores de daño. *Allium cepa*, no mostró la presencia de husos tripolares o multipolares inducidos en CHO por TBZ y Azzurro, mientras que la inducción de células binucleadas en *Allium cepa* por exposición a TBZ no se observa en CHO, sugiriendo que los procesos involucrados en la formación de esas figuras de daño difieren en ambos modelos y tendrían un correlato con las diferencias conocidas en los procesos de formación de los centros de organización microtubular (MTOC) y de la citocinesis respectivamente.

3-El modelo *Allium cepa* es un recurso valioso en toxicología y genotoxicidad, ya que permite caracterizar el daño y realizar en un mismo ensayo y utilizando las raíces provenientes de un mismo individuo estudios complementarios de daño oxidativo, genotoxicidad e inmunodetección, como ensayos de corto plazo. A las técnicas antemencionadas y utilizadas en la presente tesis, se podrán incorporar otras como FISH y colocalización de proteínas vinculadas con los microtúbulos.

4- Los efectos observados en las células meristemáticas por estar sometidas a condiciones de hipoxia son compatibles con los observados en las células de otros organismos y responden

a los procesos descritos en otros modelos. Los procesos genéticos involucrados por la respuesta a hipoxia han despertado interés en los últimos años y los resultados indican que las células meristemáticas podrían ser un buen modelo para estos estudios.

**B
I
B
L
I
O
G
R
A
F
Í
A**

1. Aardema MJ, Albertni S, Arni P, Henderson LH, Kirsh-Volders M, Mackey JM, Sarrif AM, Stringer DA, Aalman RDF (1998) Aneuploidy: A report of an ECETOC task force. *Mutat. Res.* 41: 3-79.
2. Abdel Migid HM, Azab YA, Ibrahim WM (2007) Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 66: 57–64
3. Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH, Edwards PA (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2538–2543.
4. AbreuFC, Ferraz PA, Goulart MOF(2002), Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Propierties. *J. Braz. Chem. Soc.* 13: 19-35
5. Abrevaya XC, Mudry MD , Carballo MA (2004) El test de micronúcleos en Médula ósea de ratón para evaluar sensibilidad de cepas ante potenciales agentes genotóxicos. *Basic & Applied Genetics (Formerly Mendeliana) Actas XXXIII Congreso Argentina de Genética.* 60 pp.
6. Adams GE, Stratford LJ, Bremmer JCM, Cole S, Edwards HS, fielden EM (1991) Nitroheterocyclic compounds as radiation sensitizers and bio-reductive drugs. *Radiother.Oncol.Suppl.* 20;85-91.
7. Adler ID, Kliesch U, Van Hummelen P (1991) Micronucleus test whit knows and suspect spindle poison: results from two laboratories. *Mutagenesis.* 6: 47-53.
8. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
9. Akiol D, Mungan T, Baltaci V (2000) Comparative study of genotoxicity effects in the

- treatment of trichomonas vaginalis infection: metronidazole or nalidixic acid. Arch. Gynecol.Obstet. 264(1): 20-23.
10. Albert LA (1997) Desarrollo e importancia de la Toxicología Ambiental en: Introducción a la Toxicología Ambiental. Albert LA (Eds) OPS. pp: 11-18.
 11. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW (2003) Nature Genetics. 34 (4).
 12. Allen JW, Liang JC, Carrano AV, Preston RJ (1986) Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian germ cells. Mutat. Res. 167:123-137.
 13. Ames BN (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. Mutat Res 31: 347-364.
 14. Anderson KE (1981) Pharmacokinetics of nitroimidazoles. Spectrum of adverse reactions. Scan J. Infect.Dis. 26:60-67.
 15. Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth. Enzymol. 113: 548-553.
 16. Antoccia A, Degrossi F, Battistoni A, Ciliutti P, Tanzarella C (1991) In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. Mutagenesis. 6(4):319-324.
 17. Arribas R, Capella G, Tortola S, Masramon L, Grizzle WE, Perucho M, Peinado MA (1997) Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications. J. Clin. Oncol. 15: 3230-3240.
 18. Arrighi FE, Hsu TC, Bergsagel DE (1962) Chromosome damage in murine and human cells following cytoxan therapy. Tex. Rep. Biol. Med. 20: 545-549.
 19. Arrighi O (1994) Ascorbate system in plant development. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 26: 407-419.
 20. Auerbach C (1967) The chemical production of mutations. The effect of chemical mutagens on cells and their genetic material is discussed. Science. 158: 1141-1147.

21. Auerbach C, Robson JM (1946) Chemical production of mutations. *Nature*. 157: 302.
22. Awa AA, Bloom AD, Yoshida MC, Meriishi S, Archer PG (1968) Cytogenetic study of the offspring of atom bomb survivors. *Nature*. 218: 367–368.
23. Baker SJ , Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC Jessup, JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF Nakamura, Y, White R, Vogelstein B (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 50: 7717–7722.
24. Ballantyne B (1999) *General and Applied Toxicology*. Marrs T, Syversen T Eds. Wiley
25. Baluska F, Volkmann D, Barlow PW, (1997b) Nuclear components whit microtubule organizing properties in multicellular eukariotes: Functional and evolutionary considerations. *Int. Rev. Cytol*. 175: 91-135.
26. Barale R, Scapoli C, Meli C, Casini D, Minunni M, Mirrazzini A.Loprieno N, Barraï L (1993) Cytogenetics effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. *Mutat. Res*.300: 15-28.
27. Barbacid, M (1986) Oncogenes and human cancer: cause or consequence? *Carcinogenesis* 7:1037-1042.
28. Beauchamp C, Fridovich, I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*. 44: 276-286.
29. Belmont LD, Hyman AA, Sawin KE, Mitchison TJ (1990) Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*. 62: 579–589.
30. Bender MA, Gooch PC (1962) Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. *Radiat. Res*. 16: 44–53
31. Bender MA, Gooch PC (1963) Chromatid-type aberrations induced by X rays in human leukocyte cultures. *Cytogenetics*. 85: 107–116.

- benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures. *Environ. Mutagen.* 2:67-73.
32. Berry LJ, Brock MJ (1946) Polar distribution of respiratory rate in the onion root tip. *Plant Physiol.* 21(4): 542–549.
 33. Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S. (1999) Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17: 657–665.
 34. Bischoff R, Holtzer H(1967) The effect of mitotic inhibitors on myogenesis in vitro. *J.Cell Biol.* 36: 111–127.
 35. Bishun NP, Williams DC, Mills J, Lloyd N, Raven RW, Parke DV(1973) Chromosome damage induced by chemicals. *Chem. Biol. Interact.* 6: 375–392.
 36. Blasiak JP, Jaloszynski, A, Trzeciak, K, Szyfter (1999) In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mut. Res.* 445: 275-283.
 37. Bloom AD, Tjio JH (1964) In vivo effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes, *N. Engl. J. Med.* 270: 1341–1344.
 38. Bochkov NP, Sram RJ, Kuleshov NP, Zhurkov VS (1976) System for the evaluation of the risk from chemical mutagens for man: basic principles and practical recommendations. *Mutat. Res.* 38: 191–202.
 39. Bordeau P, Haine J, Klein W, Murti K (1989) *Ecotoxicology and climate*. IPCS. Joint Symposia. Chichester. Wiley
 40. Boyd JT, Brown WM, Vennart J, Woodcock GE (1966) Chromosome studies on 3 women formerly employed as luminous-dial painters. *Br. Med. J.* 5484: 377–382
 41. Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
 42. Broadwater ST (1992) Cytoskeleton and mitotic spindle in red algae. In: Menzel D

- (ed) Cytoskeleton of the algae. CRC Press. 93–112
43. Brown RC, Lemmon BE (1990). Polar organizers mark division axis prior to preprophase band formation in mitosis of the hepatic *Reboulia hemisphaerica* (Bryophyta). *Protoplasma* 156: 74-81.
 44. Brusick D (1987) *Principles of Genetic Toxicology*, Plenum Press, New York and London.
 45. Buschini AM, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet de Albuquerque C, Araujo Domingues Zucchi TM, Poli P(2009) Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole and Metronidazole. *Journal of Parasitology Research*. pp 11.
 46. Cabrera GL. Rodriguez DM (1999) Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat. Res.* 426 (2)211-214.
 47. Carballo MA (2006) Surgimiento de la genética Toxicológica en Genética Toxicológica Mudry MD; Carballo MA (Eds) 1° Ed. De los Cuatro Vientos. pp: 672.
 48. Carballo MA, Hick AS, Solonesky S, Larramendy ML, Mudry MD (2006) Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *J. Appl. Toxicol.* 26: 293-300.
 49. Carballo MA, Palermo AM Mudry MD (2004) Toxicogenetic evaluation of metronidazole in the treatment of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 98 (9):139-147.
 50. Cardoso, CRP, Colus IMS, Bernardi CC, Sannomiya M, Vilegas W,Varanda EA (2006) Evaluation of the mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 225:55–63.
 51. Cassimeris L, Pryor Nk, Salmon ED (1988) Real-time observations of microtubules dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107: 2223-2231.
 52. Ccedilelik A, Nurcan AA (2006) The Frequency of Sister Chromatid Exchanges in

- Cultured Human Peripheral Blood Lymphocyte Treated with Metronidazole in Vitro
Drug and Chemical Toxicology 29(1): 85-94.
53. Chacko M, Bhide SV (1986) Carcinogenesis, perinatal carcinogenicity and teratogenicity of low dose metronidazole (MNZ) in Swiss mice. *J. Cancer Clin. Oncol.* 112:135-140.
 54. Chance B (1954) Spectrophotometry of Intracellular Respiratory Pigments *Science.* 120 (3124): 767-775.
 55. Claiborne, A (1985) Catalase activity. In: R. A. Greenwald (ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp. 283-284. CRC Press.
 56. Cleaver JE (1981) Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes *1: A model for the mechanism of SCE production. *Experimental Cell Research.* 136: 27-30.
 57. Cohen MM, Shaw MW, Craig AP (1963) The effects of streptonigrin on cultured human leukocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50: 16-24.
 58. Conen PE, Bell AG, Aspin N (1963) Chromosomal aberration in an infant following the use of diagnostic X-rays, *Pediatrics* 1:72-79.
 59. Connor, T.H., M. Stoeckel, J Evrard and M.S. Legator (1977) The contribution of metronidazole and Two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated. *Cancer Research.* 629-633.
 60. Constantin MJ, Owens ET (1982), Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays, *Mutation Research* 99: 1-12.
 61. Córdoba F, González-Reyes JA (1994) Ascorbate and plant cell growth. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26:399-405.
 62. Córdoba-Pedregosa MC, Córdoba F, Villalba JM, González Reyes JA (2003) Zonal Changes in Ascorbate and Hydrogen Peroxide Contents, Peroxidase, and Ascorbate-

- Related Enzyme Activities in Onion Roots. *Plant Physiology* 131: 697-706.
63. Córdoba-Pedregosa MC, Córdoba F, Villalba JM, González Reyes JA (2005) Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*. 56 (412): 685–694.
 64. Cotellet S, Masfaraud JF, Ferard JF (1999) Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat Res*. 426: 167– 71.
 65. Court-Brown WM, Buckton KE, McLean AS (1965) Quantitative studies of chromosome aberrations in man following acute and chronic exposure to X-rays and gamma rays. *Lancet* 1: 1239–1241.
 66. Crane R, Gadea B, Littlepage L, Wu H, Ruderman JV (2004) Aurora A meiosis and mitosis. *Biol. Cell*. 96(3): 215-229.
 67. Cyr RJ (1994) Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. *Annu. Rev. Cell Biol*. 10: 153–180.
 68. Dane F, Dalgıç Ö (2005) The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem. *Acta Biologica Hungarica*. 56 (1-2): 119-128.
 69. Davidse LC, Flach W (1978) Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochim. Biophys. Acta*. 543: 82-90.
 70. De Marini DM, Huff J (2001) Evaluación de la toxicidad genética en Herramientas y enfoques. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, Cap 33. Eds. Ellen K. Silbergeld
 71. De Serres FJ (1975) The utility of short-term tests for mutagenicity in the toxicological evaluation of environmental agents, *Mutat. Res*. 33: 11–15.

- degradation of two beta-tubulin isoforms correlates with cytosolic Ca²⁺ changes in
72. Delatour P, Lorgue M, Deschanel jp (1974) Embryotoxic properties of residues of 3 anthelmintic benzimidazole derivatives Bulletin de la Societe des Sciences Vetrerinaires et Medicales. 76: 147-154.
 73. Delatour P, Richard Y (1976) Embryotoxic and antomitotic proprieties of a series of benzimidazoles. Therapie. 31: 505-515.
 74. Desai A, Mitchison TJ (1997). Microtubule polymerization dynamics. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 83–117.
 75. Dhar-Mascareño M, Cárcamo M., Golde DW (2005) Hypoxia–reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C Free Radical Biology and Medicine. 38(10): 1311-1322.
 76. Dhonukshe P, Gadella TW Jr. (2003) Alteration of Microtubule Dynamic Instability during Preprophase Band Formation Revealed by Yellow Fluorescent Protein–CLIP170 Microtubule Plus-End Labeling. The Plant Cell. 15: 597–611.
 77. Dobias L, Cerná M, Rossner P, Srám R (1994) Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. Mutation Res. 317: 177-194.
 78. Ducatman A, Hirschhorn K, Selikoff IJ (1975) Vinyl chloride exposure and human chromosome aberrations. Mutat. Res. 31: 163–168.
 79. Eaton DL; Klaasen CD (2001) Principles of Toxicology in Casarett LJ; Doull's J Toxicology: the basic science of poisons. 6 thKlaassen, CD, Amdus MO, Dowll J (Eds) Macmilln Publishing Company.
 80. Ebel C, Gomez LG, Schmit AC, Neuhaus-Url G, Boller T (2001) Differential mRNA Degradation of Two β -Tubulin Isoforms Correlates with Cytosolic Ca²⁺ Changes in Glucan-Elicited Soybean Cells. Plant Physiology. 126(1): 87-96
 81. Edwards DI, (1986) Reduction of Nitroimidazoles in vitro and DNA damage. Biochem. Pharmacol. 35: 53-58.

82. EEC (European Economic Community)(1983)Official Journal of the European Communities, 6th Admendment to Directive 67/548/EEC, Toxicological Methods of Annex VIII.
83. Elhajouji A, Santos AP, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M (1994)Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte culturesfor micronucleus (MN) induction by cydophosphamide and benzo[a]pyrene. *Mutagenesis*. 9: 307-313.
84. Elizondo G, Montero R, Herrera JE, Hong E, Otrrosky-Wegman P (1994) Lymphocyte proliferation Kinetics and sister-chormatid Exchanges in individual trated whit metronidazole. *Mut. Res.* 305(2): 133-7.
85. Elizondo G., Gonsebatt ME, Salazar AM, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Otrrosky-Wegman P (1996) Genotoxic effects of metronidazole. *Mut. Res.* 370(2): 75-80.
86. El-Naggar AK, Dinh M, Tucker SL, Swanson D, Steck K, Vielh P (1999) Numerical chromosomal changes in DNA hypodiploid solid tumors: restricted loss and gain of certain chromosomes. *Cytometry* 37(2):107-12.
87. El-Nahas AE, IMEl-Ashmawy (2004) Reproductive and Cytogenetic Toxicity of Metronidazole in Male Mice. *Basic &Clinical Pharmacology & Toxicology* .94,226-231.
88. Ennever EK, Andreano G, Rosenkranz HS (1988) The ability of plants genotoxicity assays to prdict arcinogenecity. *Mutat. Res.* 205: 99-105.
89. EPA (Environmental Protection Agency)(1982) Office of Pesticides and Toxic Substances, Health Effects Test Guidelines, Springfield, Virginia.
90. Evans HJ (1970) Populations cytogenetics and environmental factors, in: P.A. Jacobs, Price, Low (Eds.), *Human population cytogenetics*, Edinburgh University Press, Edinburgh. 191–216.
91. Fahrigr R,Engelke M (1997) Reinvestigation of in vivo genotoxcity studies in man. I. No induction of DNA strand break in pheripheral lymphocytes after metronidazole

- therapy. Mut. Res. 312(2-3):215-21.
92. Fatima RA, Ahmad M (2005) Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. Science of the Total Environment 346: 256–273.
 93. Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. Mutat. Res. 455: 81-95.
 94. Fernandez TCC, Mazzeo DE, Marin-Morales M (2007) Mechanism of micronuclei formation in poliloidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pest. Biochem. Physiol. 88: 252-259.
 95. Festing MFW, Overend P, Gaines Das R, Cortina-Borja M, Berdoy M (2002) The design of animal experiments: Reducing the use of animals in research through better experimental design. Laboratories Animals Limited: Vol.1. (1 ed.). The Royal Society of Medicine Press Limited: London.
 96. Fiskejo G (1985) The Allium test as an alternative in environmental studies: The relative Toxicity of metal ions. Mutat. Res. 197: 243-260.
 97. Fiskesjo G (1985) The Allium test as a standard in environmental monitoring. Hereditas.102: 99– 109.
 98. Fiskesjö G (1993) The allium test in wastewater monitoring. Environmental Toxicology and Water Quality. 8: 291–298.
 99. Ford CE, Hamerton JL(1956) The chromosomes of man, Acta Genet. Stat. Med. 6: 264–266.
 100. Ford CE, Jones KW, P.E. Polani, De Almeida, JC, Briggs JH(1959) A sex-chromosome Framework for Aquatic Protection, *Proceedings for the Alliston Workshop*, National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).
 101. Freeman, C. D., N. E. Klutman, and K. C. Lamp. 1997. Metronidazole: a therapeutic review and update. Drugs 54:679–708

102. Freshney RI (1987) Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2a. edición.
103. Friedman PA, Platzer EG (1978). Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 544: 605-614.
104. Funes-Cravioto F, Lambert B, Lindsten J, Ehrenberg L, Natarajan AT, Osterman- Golkar S (1975) Letter: chromosome aberrations in workers exposed to vinyl chloride. *Lancet.* 1: 459. 1168
105. Gallo M (2001). History and scope of toxicología in Casarett LJ and Doull's J. *Toxicology. The Basic Science of Poisons.* Klaassen CD (Eds) McGraw-Hill 6°Edición.
106. Galmarini, CR (1997) Obtención de cultivares en Argentina. Manual de cultivo de la cebolla. INTA Regional Cuyo.pp P23-25.
107. Gardner T B, Hill DR (2001) Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews,* 14(1): 114-128.
108. Gaviola JC (1997) Efectos del método de producción sobre la calidad y el rendimiento de semillas en cebolla cv Valcatorce INTA. *Revista de la Asociación Argentina de Horticultura.* 16(40-41): 43-52.
109. Giani S, Campanoni P, Breviario D (2002) A dual effect on protein synthesis and degradation modulates the tubulin level in rice cells treated with oryzalin. *Planta* 214: 837-847.
110. Giménez Abián MI, GiménezAbián JF, Utrilla L, De la Torre C (2004) Nuclear ploidy is contingent on the microtubular cycle responsible for plant cytokinesis. *Protoplasma* 224: 41-7.
111. Giménez Abián MI, Utrilla L, Cánovas JL, Giménez Martin G, Navarrete MH, De la Torre C (1998) The positional control of mitosis and cytokinesis in higher plant cells. *Planta.* 204: 37-43.
112. Gimenez Martin G, González Fernández A, López Sáez JF (1965) A new method of labeling cells. *J. Cell Biol.* 26: 305-309.

113. Goddard, RH, Wick SM, Silflow CD, Snustad DP (1994) Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol.*104: 1–6.
114. Godefroi EG, Heeres J, Van Cutsem JM, Janssen PAJ (1969) The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenethylimidazole. *J Med Chem.*12:784-791.
115. Gomez Arroyo S, Castro-Melchor S, Villalobos Pietrini R, Camargo EM, Salgado-Zamora H, Campos Aldrete ME (2004) Role of functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolites. *Toxicology in Vitro* 18(3): 319-324.
116. Gonsbatt, ME, Vega L, Salazar AM, Montero R, Guzmán P, Blas J, Del Razo LM, García Vargas G, Kelsh M, Ostrosky-Wegman P (1997) Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat.n Res.*74: 2-11.
117. Gonzalez Cid M, Mudry M, Larripa I (1995) Chromosomal damage induced by Carboplatin (CBDCA). *Toxicology letters.* 76: 97-103.
118. González- Fernández A, López –Sáez JF, Giménez-Martín G (1966) *Exp. Cell. Res.* 43:255-267.
119. González-Reyes JA, Alcaín FJ, Caler JA, Serrano A, Córdoba F, Navas P (1995) Stimulation of onion root elongation by ascorbate and ascorbate free radical in *Allium cepa* L. *Protoplasma.* 1884:31–35.
120. Goodman, LS, Gilman AG (1997) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* 9º ed., Editora Mc Graw Hill. Rio de Janeiro. pp 1436.
121. Grandjean P (1995) Biomarkers in epidemiology. *Clin. Chem.* 41(12): 1800-1803.
122. Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Young DS (1994) Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clin. Chem.* 40: 1360-1362.
123. Granger CL, Cyr RJ (2000) Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination. *J. Cell Sci.* 114: 599-607.

124. Grant WF (1978). Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. Environ. Health Perspect. 99: 273–291.
125. Grant WF (1982) Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene–Tox Program. Mutat. Res.99: 273– 91
126. Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutat. Res. 310: 175-185.
127. Grover JK, Vats V, Uppal G, Yadav S (2000) Antihelminthics: A review, Trop. Gastroenterol. 22: 180-189.
128. Grover SI, Kaur S (1999) Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. Mutat. Res. 426(2): 183-188.
- guardians of the cell cycle, partners in crime? Plant Physiol Biochem 40: 537–548
129. Guencheva TN, Pegas Henriques JA (2003) Metabolismo de Xenobióticos. Citocromo P450. En Da Silva J, ErdtmanB, Pegas Henriques JA (eds.), GenéticaToxicológica, Brasil: Alcance. Pp: 225-243
130. Guerrero I, Pellicer A (1987) Mutational activation of oncogenes in Animal models system of carcinogenesis. Mutat. Res. 185: 293-308.
131. Gutteridge JMC, Halliwell B (1999) Antioxidant protection and oxygen radical signaling. In: Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Gilbert DL Colton CA (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Press, New York. Pp, 189-218.
132. Hamper B, Elison SA (1961) Chromosomal aberrations induced by animal virus. Nature. 192:145-147.
133. Hartley-Asp B (1979) Absence of chromosomal damage in the lymphocytes of patients treated with metronidazole for trichomoniasis vaginalis. Toxicol. Lett.4: 15-19.
134. Heddle JA, Hite M, Irkhart B, Macgregor JTE, Salamone MF (1983) The induction of

- micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program, *Mutat. Res.* 123: 61–118.
135. Herens C, Alvarez Gonzalez ML, Barbason H (1992) Cytogenetic changes in hepatocarcinomas from rats treated with chronic exposure to diethylnitrosamine. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 60 (1): 45-52.
136. Hess RA, Nakai M (2000) Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol. Histopathol.* 15: 207-224
137. Hoffman D, Rattner B, Burton GJr, Cairn JJr. (1995) "Handbook of Ecotoxicology". Lewis Publishess. Boca Ratón. U.S.A (54,58,243-265, 523).
138. Holden HE, Crider PA, Wahrenburg MG (1980) Mitotic arrest by benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures. *Environmental Mutagenesis*
139. Hollomon DW, Butters JA, Barker H, Hall L (1998). Fungal β -tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2171-2173
140. Holmberg B, Högberg J, Johanson G (2001) Principio Generales de la Toxicología. Herramientas y enfoques. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.* Ellen K. Silbergeld (Eds) Cap 33. pp 74.
141. Horemans N, Foyer CH, Asard H (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science.* 5: 263–267.
142. Hsu TC (1952) Mammalian chromosomes in vitro. 1. The karyotype of man. *J. Hereditas* 42:1–6.
143. Hulka BS, Wilcosky T (1988) Biological markers in epidemiologic research. *Arch. Environ. Health* 43:83-89.
144. Hush JM, Wadsworth P, Callaham DA, d Hepler PK (1994) Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after

- photobleaching. *J. Cell Sci.* 107:775–784.
- hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene.* 20:420-429.
145. IARC (1978). 7: 250-251.
146. Izcoviz P (1999) Producción de cebolla en el Valle Bonaerense del Rio Colorado. En: *Memorias de la Reunión Científica de Cebolla del Mercosur, Salto, Uruguay.* Pp:3-20
147. Jacobs PA, Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism, *Nature* 183: 302–303.
148. Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 9(6): 515-540.
149. Jensen MK (1967) Chromosome studies in patients treated with azathioprine and amethopterin. *Acta Med. Scand.* 182: 445–455.
150. Jurgens G (2005) Cytocinesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology.* 56: 281-299.
151. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818–821.
152. Kalweit S, Utesch D, Von der Hude W, Madle S (1999) Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test procedures. *Mutat. Res.* 439 (2): 183–190.
153. Kaul BL y ChoudaryDK (1975) Thiol modification of the biological damage of some non-alkylating mutagens. *Science and Culture* 41 (2): 81-85.
154. Kedderis, G.L. and Miwa G.T. (1988) The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metab. Rev.*19: 33-62.

155. Kirschner M, Mitchison T(1986) Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell*. 45: 329–342.
156. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De BM, Decordier I(2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat. Res*. 504: 137–148.
157. Knörzer OC, Burner J, Boger P (1996) Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 97: 388–396.
158. Korbelik M, Horvarth D (1980) the mutagenicity of nitroaromatics drugs. Effects of metronidazole after incubation in hypoxia in vitro. *Mutation Res*. 78: 201-172.
159. Kost B y Chua NH (2002). The plant cytoskeleton: Vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* 108: 9–12.
160. Kost B, Mathur J, Chua NH (1999). Cytoskeleton in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2: 462–470
161. Kramers PGN (1982) Studies on the induction of sex-linked resessive lethal mutation in *Drophila melanogaster* by nitroheterocyclic compounds. *Mutation Res*. 101: 209-236.
162. Lacey E (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6: 112-115
163. Laderoute KR, Webster K A (1997) Hypoxia/Reoxygenation Stimulates Jun Kinase Activity Through Redox Signaling in Cardiac Myocytes *Circulation Research*. 80: 336-344.
164. Lankas GR, Nakatsuka T, Ban Y, Komatsu T, Matsumoto H (2001) Developmental toxicity of orally administered thiabendazole in ICR mice. *Food.Chem. Toxicol*. 39: 367-374.
165. Lankas GR, Wise DL (1993) Developmental toxicity of orally administered thiabendazole in Sprague—Dawley rats and New Zealand white rabbits *Food and Chemical Toxicology*. 31(3): 199-207.
166. Larripa I, Mudry de Pargament MD, Labal de Vinuesa L (1984) In vivo and in vitro

- cytogenetic effects of the antitumoral agent Amsacrina (AMSA). *Mutat. Res.* 138 (1): 87-91.
167. Lau AN, Lam NP, Piscitelli SC, Wilkes L, Danzinger LH (1992) Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazoles anti-infectives. *Clin. Pharmacokinetics.* 23: 328-364.
168. Lea DE, Catcheside DG (1945) The relation between recessive lethals, dominant left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417: 193-196.
169. Lejeune J, Gautier M, Turpin R (1959) Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children, *CR Hebd. Seances Acad. Sci.* 248: 1721-1722.
170. Lengauer C, Kinzler K W, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
171. Lindberg H.K., Wang X., Järventaus H., Falk G.C-M., Norpa H., Fenech M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res.* 617 (1-2): 33-45.
172. Linnainmaa K, Wolff S (1982) Sister chromatid exchange induced by short-lived monoadducts produced by the bifunctional agents mitomycin C and 8-methoxypsoralen. *Environmental Mutagenesis.* 4(3): 239-247.
173. Loft S (1990) Metronidazole and antipyrina as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol Toxicol.* 66: 3-31.
174. Lopez Nigro MM, Palermo AM, Mudry MD and Carballo MA (2003) Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicol in Vitro* 17:35-40.
175. López-Bautista JM, Waters DA, Chapman RL (2003) Phragmoplastin, green algae and the evolution of cytokinesis. *53 (6):* 1715
176. López-Sáez JF, Giménez-Martin G., Gonzalez-Fernández A (1966). Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature. *Cell and Tissue Research* 75(3):

591-600.

177. Loprieno N, Barale R, Bauer C, Baroncelli S, Bronzetti G, Camellini A, Cinci A, Corsi G, Leporini C, Nieri R, Nozzolini M, Serra C (1974) The use of different test systems with yeasts for the evaluation of chemically induced gene conversions and gene mutations, *Mutat. Res.* 25:197–217.
178. Lushchak VI, Bagnyukova TV, Lushchak OV, Storey JM, Storey KB (2005) Hypoxia and recovery perturb free radicals processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(6): 1319-1330.
179. Lynch AM, Parry JM (1993) The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneugens. *Mutat. Res.* 287: 71-86.
180. Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* 334: 185–195.
181. Madle S, Obe G (1980) Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/ carcinogens in eukaryotic cells, *Hum. Genet.* 56: 7–20.
182. Mailhes JB, Young D, Aardema M, London S (1997) Thiabendazole-induced cytogenetics abnormalities in mouse oocytes. *Environm. Mol. Mut.* 29: 367-371.
183. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146 (1): 3–15.
184. Marcus AI, Moore RC, Cyr RJ (2001) The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiol.* 125: 387–395.
185. Marrazini A, Betti C, Bernacchi F, Barraie I, Barale R (1994) Micronúcleos test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis.* 9: 505-515.

186. Martínez Cayuela M (1998) Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39 (1);5-18.
187. Marx J (2002) Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science*. 297: 544–546.
188. Matagne R (1968) Chromosomal aberrations induced by dialkylating agents in *Allium cepa* root-tips and their relation to the mitotic cycle and DNA synthesis. *Radiation Botany* 8(6): 489-492.
189. Mc Carroll NE, Protze IA, Ioannou Y, Frank Stack HF, Jackson MA, Water MD, Dearfield KL (2002) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat. Res.* 512: 1-35.
190. McCann J, Ames BN 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test : Assay for 300 chemicals, discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 950–954
191. McClinton RS, Sung ZR (1997) Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta* 201: 252–260.
192. Menendez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Otrsky-Wegman P (2002) Role of P35 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroximetabolite. *Mutat. Res.* 501(1-2): 57-67.
193. Menéndez D, Rojas E, Herrera LA (2001) DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutat. Res.* 478 (1-2): 153–158.
194. Menendez, D., A.Bendesky, E.Rojas, F. Salamanca P. Otrsky-Wegman (2002) Role of P35 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroximetabolite. *Mutat. Res.* 501(1-2): 57-67.
195. Meraldi P, Driviam VM, Sorger PK (2004) Timing and checkpoint in the regulation of mitotic progression. *Develop. Cell.* 7(1): 45-60.

196. Mhon GR, Ong TM, Callen DF, Kramers PGN, Aaron C.A. (1970) comparison of the genetic activity of 5-nitroimidazoles derivatives in *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Environ Pathol. Toxicol.* 2: 657-670.
197. Migliore L, Neiri M (1991) Evaluation of twelve potential aneuploidogenic chemicals by the in vitro human lymphocyte micronucleus assay. *Toxicology in Vitro.*
198. Mineyuki Y (1999) The preprophase band of microtubules: Its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 187: 1-49.
199. Mineyuky Y, Wick SM, Gunning BES (1988) Preprophase bands of microtubules and the cell cycle: Kinetics and experimental uncoupling of their formation from the nuclear cycle in onion root tip cells, *Planta.* 174: 518-526.
200. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242.
201. Moggs JG, Orphanide G (2004) The Role of Chromatin in Molecular Mechanisms of Toxicity. *Toxicol. Sci.* 80: 218-224.
202. Monarca S, Rizzoni M, Gustavino B, Zani C, Alberti A, Feretti D, Zerbini I (2003) Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 41(5): 353-359.
203. Moreno SNJ, Mason RP, Muniz RP A, Cruz FS, Docampo R (1983) Generation of Free Radicals from Metronidazole and Other Nitroimidazoles by *Tritrichomonas foetus* The journal of Biological Chemistry. 258 (7): 4051-4054.
204. Mudry de Pargament MD, Labal de Vinuesa M, Larripa I (1987) Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs, Thiabendazole (TBZ), *Mutat. Res.* 188: 1-6.
205. Mudry MD, Carballo MA (2004). El test de micronúcleos en Médula ósea de ratón para evaluar sensibilidad de cepas ante potenciales agentes genotóxicos. *Basic & Applied Genetics (Formerly Mendeliana).* Actas XXXIII Congreso Argentina de Genética. 60 pp.

206. Mudry MD, Carballo MA (2006) *Genética Toxicológica*. 1º edición. Ed. De los cuatro vientos. Pp: 669.
207. Mudry MD, Carballo MA, Labal de Vinuesa M, Larripa I (1994) Mutagenic Bioassay of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ) *Mutat. Res.* 305:127-132.
208. Mudry MD, Gadano A, Gonzalez M, Carballo MA (1995) Mutagénesis Química: Riesgo y beneficio en el consumo de antiparasitarios. *Interciencia.* 20(4): 204-211.
209. Mudry MD, Gadano A, Gonzalez M, Carballo MA (1995) Mutagénesis química. Riesgo y beneficio en el uso de antiparasitarios. *Interciencia.* 20(4): 204-211.
210. Mudry MD, Labal de Vinuesa M and Larripa I (1987) Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: I. Thiabendazole (TBZ). *Mutat Res.* 188:1-6.
211. Mudry MD, Palermo AM, Merani MS and Carballo MA (2007) Metronidazole induced alterations in murine spermatozoa morphology. *Reprod Toxicol* 23:246-252.
212. Muller M (1981) Action of clinically utilized 5-Nitroimidazoles on microorganisms. *Scan J. Infect.Dis.*26: 31-41.
213. Natarajan AT, Duivenvoordenb WCM, Meijersa M, Zwanenburgb TSB (1993) Induction of mitotic aneuploidy using Chinese hamster primary embryonic cells. Test results of 10 chemicals. *Mutat.Res.* 287: 47-56
214. Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes, *J. Natl. Cancer Inst.* 25: 85–109.
215. Nuti Ronchi V, Arcara PG (1967) The chromosome breaking effect of 6-methylcoumarin in *Allium cepa* in relation to the mitotic cycle. *Mutat. Res.*4(6): 791-796.
216. OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (1981) *Guidelines for Testing of Chemicals*.
217. Offord E, van Poppel G, Tyrrell R (2000) Markers of oxidative damage and antioxidant

- protection: current status and relevance to disease. *Free Radic. Res.* 33: 5-19.
218. Okamura M (1980) An improved method for determination of -ascorbic acid and -dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clinica Chimica Acta.* 103: 259-268.
219. Ong T, Slade B (1978) Mutagenicity and mutagenic specificity of metronidazole and niridazole in *Neurospora Crassa*. *J. Toxicol. Environ. Healt.* 815-824.
220. Ong TB, Slade FJ, De Serres (1979) Mutagenicity and mutagenic specificity of metronidazole and niridazole in *Neurospora Crassa*. *J. Environ Pathol. Toxicol.* 2: 1109-1118
221. Otegui M, Staehelin LA (2000) Cytokinesis in flowering plants: More than one way to divide a cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 493-502.
222. Paciolla C, De Tullio MC, Chiappetta A, Innocenti AM, Bitonti MB, Liso R, Arrigoni O (2001) Short- and long-term effects of dehydroascorbate in *Lupinus albus* and *Allium cepa* roots. *Plant Cell Physiol.* 42: 857-863.
223. Palermo AM, Reynoso AS, López Nigro M, Carballo MA and Mudry MD (2004) Teratogenic evaluation of Metronidazole and Ornidazole using *Drosophila melanogaster* as an experimental model. *Birth Def Res (Part A)* 70:157-162.
224. Palevitz BA (1993) Morphological plasticity of the mitotic apparatus in plants and its developmental consequences. *Plant Cell.* 5: 1001-1009.
225. Peña CE, Carter D E, Ayala-Fierro F (2001). *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
226. Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158
227. Peterson F J, Mason R P, Hovsepian J, Holtzman J L (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *The*

Journal of Biological Chemistry, 254: 4009-4014.

228. Pisano C, Battistoni A, Dagrasi F, Tanzarella C (2000) Changes in microtubule organization after exposure benzimidazole derivative in Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 15: 507-515.
229. Plempel M, Bartmann K, Buchel KH, Regele E (1969) Bay b5097, a new orally applicable antifungal substance with broad spectrum activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1969: 271-274
230. Pollini G, Colombi R (1964) Il danno cromosomico dei linfociti nell' emopatia benzinica. *Med. Laboro.* 55: 641-654.
231. Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N (2002) Ascorbate and glutathione:
232. Preston J (1981) X-ray-induced chromosome aberrations in down lymphocytes: An explanation of their increased sensitivity. *Environmental Mutagenesis.* 3(1):85-89.
233. Preston J, Hoffman G. *Genetic Toxicology.* En : Casarett LJ y Doull's J (2001) *Toxicology: the basic science of poisons.* 6 th Klaassen, CD, Amdus MO, Dowll J (Eds) Macmilln Publishing Company
234. Prichard R (1994) Antihelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 54: 259-268.
235. Raheter W, Hanel H (2003) Nitroheterocyclic drugs whit broad spectrum activity. *Parasitology research.* 90: 19-39
236. Rank J, M.H. Nielsen (1993) A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixture. *Hereditas,* 118: 49-53.
237. Rank J, M.H. Nielsen (1994) Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.* 312: 17-24.
238. Rank J, M.H. Nielsen (1998) Genotoxicity of wastewater sludge using the Allium cepa anaphase-telophase chromosome aberrations assay. *Mutat. Res.* 418: 113-119
239. Rasoloson D, Vanacova S, Tomkova E, Razga J, Hrdy I, Tachezy J, Kulda J (2002)

- Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* 148: 2467-2477.
240. Repetto Giménez M, Repetto Khun G (2009) *Toxicología Fundamental*. Ed Díaz de Santos. 4º Edición. Pp: 587.
241. Reyes Romero H, Navarro Rojas (1998) *Infecciones Parasitarias*. Caracas. Disinlimed 196 pp.
242. Riffell JL, Zimmerman C, Khong A, Mc Hardy LM, Roberge M (2009) Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle*. 8 (18): 3029-3042.
243. Riva MC (1991) Nociones y planteamientos en la preservación del medioambiente acuático *Bol. Intexter*. 99: 63-83
244. Robinson HJ, Stoerk HC, Graessle OE (1965) Studies on the toxicologic and pharmacologic properties of thiabendazole. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 7 (1): 53-63
245. Rodriguez Ferreiro G, Cancino Badías L, Lopez-Nigro M, Palermo A, Mudry M, Prieto González E, Carballo MA (2002) DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives, *Toxicology Letters*. 132(2): 109-115.
246. Rodriguez Yunta E (2007) Ética de la Investigación de Enfermedades Humanas en Modelos Animales. *Acta bioeth.* [online] 13 (1).
247. Roe, F.J.C. (1983) Toxicology evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic and teratogenic potential. *Surgery*. 93: 158-164.
248. Ronco A, Díaz Báez MC, Pica Granados Y (2004) Conceptos Generales. 1: 17-23 en Castillo Morales, Gabriela (Eds.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y*

aplicaciones/Gabriela Castillo (ed.). - México: IMTA,. Canadá: IDRC.pp: 189

249. Rustia M, P Shubik (1979) Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 721-729.
250. Rutstein DD, Mullan RJ, Frazier TM, Halperin WE, MeliusJM, Sestito JP (1983) Sentinel health events (occupational): a basis for physician recognition and public health surveillance. *Am J Publ Health.* 73:1054-62.
251. Sahu RK,. Behera BN Sharma CBSR(1983) Cytogenetic effects from agricultural chemicals-V. Clastogenic effects of some benzimidazole fungicides on root meristems, *Environmental and Experimental Botany.* 23(1): 79-83,
252. Sammak PJ, Borisy GG (1988)Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 332: 724-726.
253. Sanderman H., (1992) Plants metabolism of Xenobiotics..*Trends biochem.Sci.* 17: 82-84.
254. Santovito A, Cervella P, Delpero (2010) In vitro aneugenic effects of the fungicide thiabendazole evaluated in human lymphocytes by the micronucleus assay. *Genotoxicity and carcinogenicity. Archives of Toxicology.* DOI: 10.1007/s00204-010-0606-9
255. Sasaki, YF, Saga A, Akasaka M, Yoshida K, Nishidate E, Su YQ, Matsusaka N, Tsuda S (1997) In vivo genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs bythe alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mut. Res.* 395: 189-198.
256. Saunders WS, Shuster M, Huang A, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, Gollin SM(2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America.* 97: 303–308.
257. Sax K (1940), An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*.

- Genetics. 25: 41–68.
258. Schmid, A, Smichd H (1999) Pharmaco-Toxicological mode of Action of Anticicrobial 5-Nitroimidazole Derivates. *J.Vet.Med.* 46: 517-522.
 259. Seiler JP (1975) Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. *Mutat. Res.* 32:151.
 260. Seoane AI, Güerci AM, Dulout FN (2000) Mechanisms involved in the induction of aneuploidy: the significance of chromosome loss. *Genetics and Molecular Biology.* 23 (4): 1077-1082.
 261. Sevanian A, McLeod L (1997) Formation of biological reactivity of lipid peroxidation products. Taylor and Francis, Washington DC.47-70.
 262. Shaw MW (1970) Human chromosome damage by chemical agents, *Annu. Rev.Med.* 21: 409–432
 263. Shibutani S, Suzuki N, Terashima I, Sugarman SM, Grollman AP, Pearl ML (1999) Tamoxifen–DNA Adducts Detected in the Endometrium of Women Treated with Tamoxifen *Chemical Research in Toxicology* 12 (7): 646-653.
 264. Shimamura M, Brown RC, Lemmon BE, Akashi T, Mizuno K, Nishihara N, Tomizawa K, Yoshimoto K, Deguchi H, Hosoya H, Horio T, Mineyuki Y (2004) Tubulin in Basal Land Plants: Characterization, Localization, and Implication in the Evolution of Acentriolar Microtubule Organizing Centers. *Plant Cell.* 16(1): 45–59.
 265. Shugart LR, Theodorakis CW, Bickham JW (2003) Genetics Effects of Contaminants Exposure and Potential Impacts on Animal Populations. In DJ Hoffman, BA Rattner, GA Burton Jr, Cairn Jr (Eds), *Handbook of Ecotoxicology* (2° ed)41: 1129-1147
 266. Sofuni T, Shimba H, Ohtaki K, Awa AA (1978) A cytogenetic study of Hiroshima atomic- bomb survivors, in: H.J. Evans, D.C. Lloyd (Eds.) *Mutagen-induced chromosome damage in man*, Edinburgh University Press, Edinburg. 108–114.

267. Soloneski S, Reigosa MA, Larramendy M (2002) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. II. micronucleus induction in immunophenotyped human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 40(1): 57-62.
268. Soloneski S, González M, Piaggio E, Apezteguía M, Reigosa MA, Larramendy M (2001) Effect of the dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed in vitro. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 8(3): 239–351.
269. Soloneski S, González M, Piaggio E, Reigosa MA, Larramendy M. (2002) Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro: III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* 514 (1-2): 201-212.
270. Sonino N (1987) The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production. *N Engl J Med*; 317: 812-818.
271. Stadler LG (1928) Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68: 186-187.
272. Steinborn K, Maulbetsch C, Priester Trautmann BS, Pacher T, Geiges B, Küttner F, Lepiniec L, Stierhof YD, Schwarz H, Jürgens G, Mayer U (2002) orthologs required for cell division but not cell growth The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor. *Genes Dev*. 16: 959-971
273. Steinkellner H, Mun-Sik K, Helma C, Ecker S, Ma TH, Horak O, Kundi M, Knasmüller S (1998) Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 31(2): 183–191.
274. Stewart JS, Sanderson AR (1961) Chromosomal aberration after diagnostic X irradiation. *Lancet* 1: 978–979.

275. Stratford IJ, Adams GE (1982) Nitroimidazoles as hypoxia-mediated drugs in cancer chemotherapy. In: Breccia A., Cavalleri B, Adams G.E. (eds) Nitroimidazoles (chemistry, pharmacology and clinical application) Plenum Press, New York London. pp 91-104.
276. Szabo KT, Miller CR, Scott GC (1974) The effect of Methyl-5(6)-butyl-2-benzimidazolecarbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals 11. Teratological Study in Ewes in the United States. *Cornell Veterinarian* 64(4):41
277. Taylor H (1958) Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes *Genetics*. 43(3): 515-29.
278. Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 48: 461-491
279. Taylor SS, Scott IF, Holland AJ (2004) The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chrom. Res.* 12: 599-616.
280. Templeton R (1977) Metabolism and Pharmacokinetics of Metronidazole. In: Finegold SM (Ed), *Metronidazole Excerpta Medica*, Amsterdam. pp 28.
281. Thitamadee S, Tsuchihara K, Hashimoto T (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417: 193-196
282. Tjio JH, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6.
283. Tocco DJ, Buhs RP, Brown HD, Mtuzak AR, Mertel HE, Harman RE, Trenner NR (1964) The metabolic fate of thiabendazole in sheep. *Journal of Medicinal Chemistry*. 7: 399-405.
284. Tough IM, Buckton KE, Baikie AG, Court-Brown WM (1960) X-ray-induced Chromosome damage in man. *Lancet*. 2: 849-851
285. Traas J, Bellini C, Nacry P, Kronenberger J, Bouchez D, Caboche M (1995) Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature*

375: 676–677.

286. Tracy JW, Webster T Jr (2001) Drugs used in the chemotherapy of parasitic infections. In Godman, Gilman's (consult eds), Hardman J.G., Limbird L.E. (eds) The pharmacological basis of therapeutics, 10th int. edn. Mc Graw-Hill, New York. pp 1059-1140.
287. Tsuda E, Okamura Y, Otsuka H, Komatsu T, Tokuya S (2001) Direct Evidence of the Anterior Cruciate Ligament-Hamstring Reflex Arc in Humans. *Am J Sports Med.* 29 (1): 83-87.
288. Tsuiki H., Nitta, M., Tada, M., Inagaki, M., Ushio, Y., and Saya, H. (2001). Mechanism of
289. Uchida IA (1979) Radiation-induced nondisjunction. *Environ. Health Perspect.* 31: 13–17.
290. Uchida IA, Curtis EJ (1961) A possible association between maternal radiation and mongolism. *Lancet* 2: 848–850.
291. Uchida IA, Lee CP (1974) Radiation-induced nondisjunction in mouse oocytes. *Nature* 250: 601–602.
292. Uchida IA, Lee CP, Byrnes EM (1975) Chromosome aberrations induced in vitro by low doses of radiation: nondisjunction in lymphocytes of young adults, *Am. J. Hum. Genet.* 27: 419–429.
293. Van Hummelen P, Elhajouji A, Kirsch-Volders M (1995) Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the in vitro micronucleus test using human lymphocytes. *Mutagenesis.* 10 (1): 23-29.
294. Vanden-Bossche H, Warnock DW, Dupont B (1994) Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol.* 32: 189-202.
295. Vangareli P, Earnshaw WC (2004) Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113: 211-222.

296. Vavilin DV, Ducruet JM, Matorin DN, Venediktov PS, Rubin AB (1998) Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Photochem. Photobiol.* 42: 233-239.
297. Verde F, Dogterom M, Stelze, E, Karsenti E, Leibler S (1992) Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 118: 1097–1108.
298. Verma DPS (2001). Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 751–784.
299. Vig BK, Kontras SB, Paddock EF, Samuels LD(1968) Daunomycin-induced chromosomal aberrations and the influence of arginine in modifying the effect of the drug, *Mutat. Res.* 5: 279–287.
300. Vigliani E., Saita G (1964)Benzene and leukemia. *N. Engl. J. Med.* 271: 872–876.
301. Voogd CE, Van Der StelJJ, Jacobs JA (1979) The mutagenic action of nitroimidazoles . IV. A comparison of the mutagenic action of several nitroimidazoles and some imidazoles. *Mutat. Res.*66(3): 207-221
302. Voutsinas G, Zarani FE, Kappas A (1997) The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biol Int.* 21(7): 411-8.
303. Walker JA, Boreham DR, Unrau P, Duncan AMV(1996) Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei. *Mutagenesis.*11: 419–424.
304. Watanabe- Akanuma M, Ohta T, Yamagata H (2003) Photomutagenicity of thiabendazole, a postharvest fungicide, in bacterial assays. *Environm. Mol. Mut.*41: 92- 98.
305. Watson RE, Goodman JI (2002) Epigenetics and DNA Methylation Come of Age in *Toxicology Toxicol. Sci.* 67 (1): 11-16

306. Werc RD, Gabriac B, Teustsch H, Durst F (1990) Two cytochrome P450 isoforms catalyzing O-deethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresorufin in higher plants. *Biochem. J.* 270:729-735.
307. Whittaker SG, Fautsman EM (1992) Effects of benzimidazole analogs on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 113: 144-151.
308. Wick SM, Duniec J (1983) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule Arrays in plant cells. I. Preprophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope- associate tubulin. *J Cell Biol* 97: 235-243.
309. Wick SM, Duniec J (1984) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule Arrays in plant cells. II. Transition between the preprophase band and the mitotic spindle. *Protoplasma* 122: 45-55.
310. Wise LD, Cartwright ME, Seider CL, Sachuk LA, Lankas GR (1994) Dietary two-generation reproduction study of thiabendazole in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 32 (3): 239-246.
311. Wogan GN (1992) Aflatoxins as Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in Humans *Cancer Res* (1): 52: 2114s.
312. World Health Organization (1989) Evaluation of certain veterinary drugs residues in food. 34 th report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. World health Organ. Tech. Rep. Ser. 788.
313. Wymer CL, Wymer SA, Cosgrove DJ, Cyr RJ (1996) Plant cell growth responds to external forces and the response requires intact microtubules. *Plant Physiol.* 110: 425-430.
314. Yu HG, Hiatt EN, Dawe RK (2000) The plant kinetochore. *Trends Plant Sci.* 5: 543-547

