

CAPÍTULO 7

Genotoxicidad y carcinogénesis

*Celeste Ruiz de Arcaute, Milagros Laborde,
Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy*

La Genética Toxicológica –también conocida como Genotoxicología- es una disciplina que surge como resultado de la integración de la Genética y la Toxicología, siendo, por consiguiente, la rama de la Ciencias Naturales que estudia cómo diferentes tipos de agentes xenobióticos – físicos, químicos o biológicos– pueden dañar al material genético tanto en la interfase como durante la división celular de células somáticas y/o germinales. El término xenobiótico deriva del griego (xeno ξένος (gr. 'extraño, forastero') + bio βίος (gr. 'vida') + tik os/ ē (gr.) y etimológicamente significa ajeno a la vida. Este término es de carácter general y es utilizado para designar a todas las sustancias extrañas que ingresan a los seres vivos (Mudry y Carballo, 2006). Los primeros estudios relacionados con la Genética Toxicológica fueron realizados en la década de 1920 evaluando los efectos inducidos por rayos X y luz UV en organismos modelo como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Insecta: Diptera: Drosophilidae) (Mudry y Carballo, 2006). Sin embargo, no fue hasta las décadas de 1950 y 1960, tanto con el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por Watson y Crick (Watson y Crick, 1953) así como el reconocimiento de la Genética Toxicológica como disciplina en el año 1969, que el estudio del impacto negativo producido por agentes ambientales en la salud humana adquirió verdadero protagonismo.

En las últimas décadas ha habido un notable incremento en el interés público sobre los efectos perjudiciales primarios y/o secundarios que diversos agentes, producto de procesos tecnológicos e industriales, pueden producir tanto en la salud humana como en la ambiental. Por otra parte, se conoce que la probabilidad de que un xenobiótico induzca daño sobre el material genético depende de diferentes tipos de variables tales como su concentración en el ambiente, la vía de ingreso y metabolización en un organismo así como la capacidad de las distintas células y tejidos para contrarrestar el daño inducido, entre otros factores (Mudry y Carballo, 2006).

La Genotoxicología comprende, por consiguiente, el estudio de la acción nociva de xenobióticos sobre los componentes hereditarios de los seres vivos y las consecuencias que su exposición genera sobre los ecosistemas y la biota. Por lo tanto, los xenobióticos pueden ser agentes físicos tales como la temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas; agentes químicos, tales como metales, halógenos, ácidos orgánicos e inorgánicos, entre otros y agentes biológicos tales como algunos parásitos, bacterias, hongos y virus (Repetto

Jiménez y Reppeto Kuhn, 2009). Esta disciplina estudia las modificaciones de la estructura genética y sus manifestaciones en la reproducción de la célula, tejido o del individuo, en procesos conocidos como mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis. Todo agente xenobiótico capaz de interactuar de manera negativa, tanto física como químicamente, con las bases del ADN y alterar su estructura es considerado un mutágeno. Por otro lado, el término “genotóxico” es más amplio, ya que incluye los agentes que inducen no sólo mutaciones sino cualquier otro tipo de daño acontecido en el ADN celular (Mudry y Carballo, 2006).

Según una revisión reciente (Mohamed et al., 2017), los agentes genotóxicos de acuerdo al efecto que producen pueden clasificarse en:

Carcinogénicos o agentes que causan o promueven cáncer. Los cambios inducidos son irreversibles. Entre los ejemplos de agentes carcinogénicos se encuentra la radiación UV solar, compuestos químicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, benceno, cromo VI, plaguicidas, entre otros.

Mutagénicos o agentes causantes de mutaciones sobre el material hereditario. Ejercen distintos tipos de daño en el material genético, los cuales pueden ser heredables. Entre los ejemplos de mutágenos se encuentran las sustancias radiactivas, los rayos X, la radiación UV y ciertas sustancias químicas. Pueden dañar a las células y provocar enfermedades, entre ellas provocar un desarrollo neoplásico.

Teratogénicos o agentes causantes de anomalías de carácter anatómico o funcional durante el desarrollo embrionario de un organismo. Provocan el desarrollo de diferentes tipos y/o niveles de defectos congénitos. Entre los ejemplos de agentes teratogénicos se encuentran compuestos como la talidomida, cocaína, retinoides, estreptomina, carbamazepina, entre otros.

Se conoce que durante la exposición a xenobióticos, gran parte de ellos derivados de la actividad antropogénica, se generan diferentes tipos de alteraciones nocivas sobre el material genético. El daño en el ADN surge como consecuencia de la modificación permanente de la estructura primaria de ésta molécula, que podría conducir, en última instancia, a una modificación en la función proteica, en la inactivación/activación génica y en la generación de mutaciones en el ADN (Gagné et al., 2014). Si la mutación del/de los gen(es) se produce en un gen con un rol importante en la diferenciación, comunicación o crecimiento celular, pueden producirse diversas alteraciones negativas en el funcionamiento celular y en última instancia, la generación de un proceso neoplásico o la muerte celular. El daño en el material genético es causado por la interacción de una sustancia genotóxica con la estructura primaria y/o con la secuencia de bases púricas y pirimidínicas de la molécula del ADN. Estas sustancias interactúan con la secuencia de bases específicas del ADN causando diferentes tipos de lesiones en el material genético como la formación de rupturas, fusiones, deleciones, amplificaciones, aductos, uniones cruzadas, defectos o errores durante la separación de los cromosomas o no disyunción, entre otras, generándose diferentes tipos de daño en el ADN incluyendo la presencia de mutaciones (Mohamed et al., 2017). Los estudios en Genética Toxicológica se orientan a cumplir dos objetivos básicos: a) implementar metodologías de ensayo para la evaluación de riesgo, definiendo el impacto nocivo

de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente y, b) elucidar la relación entre los mecanismos de genotoxicidad y la iniciación del proceso de carcinogénesis (Mudry y Carballo, 2006).

Los estudios de genotoxicidad pueden realizarse empleando diferentes tipos de matrices bióticas como sistemas *in vitro* e *in vivo* y son diseñados con el fin de identificar cualquier sustancia o compuesto que tenga la capacidad de inducir un efecto perjudicial sobre el material genético de manera directa o indirecta mediante diferentes tipos de mecanismos de acción (Mohamed et al., 2017). La fijación permanente del daño en el ADN genera el desarrollo de mutaciones a nivel génico, así como daño a nivel cromosómico, tanto estructural como numérico. La visualización y cuantificación de estas alteraciones se pueden llevar a cabo mediante la realización de diferentes tipos de pruebas o bioensayos, los cuales poseen un rol importante al poder predecir si un compuesto determinado tiene el potencial de causar genotoxicidad, y en consecuencia desencadenar un proceso de carcinogénesis. Poseen la ventaja de poder ser reproducidos, y dependiendo el tipo de tejido, el daño puede o no ser reparado. Cuando el proceso de reparación celular se altera, puede desencadenarse un proceso de carcinogénesis, teratogénesis y/o apoptosis (Mudry y Carballo, 2006). Ningún ensayo individual tiene la capacidad de detectar todos los agentes genotóxicos ni todos los tipos de daño genético inducido por un agente xenobiótico, por lo que resulta necesario emplear un conjunto de bioensayos que abarquen diferentes sistemas biológicos y diferentes biomarcadores de daño genético que permitan asegurar que la mayoría de los agentes puedan ser detectados (Soriano Tárraga, 2009). Las Instituciones Internacionales encargadas de regular el uso de sustancias o productos antes de ser incorporados al consumo masivo, exigen que para clasificar a un xenobiótico como genotóxico son requeridos, de manera jerarquizada, como mínimo tres clases de bioensayos diferentes, donde deben ser incluidos en un primer nivel dos ensayos *in vitro* tales como: a) un ensayo de mutación reversa en sistemas bacterianos (ensayo de Ames) con y sin la presencia de un sistema de activación metabólica y b) un ensayo para la evaluación citogenética de daño a nivel cromosómico en células de mamífero (aberraciones cromosómicas –AC– o ensayo de micronúcleos –MNs–) y/o un ensayo *in vitro* de mutación como el ensayo de linfoma de ratón. Se requieren dos ensayos diferentes debido a que los compuestos estudiados pueden provocar mutaciones génicas puntuales o daño a nivel cromosómico. Por último, se requiere de un ensayo de genotoxicidad en sistemas *in vivo* para el análisis cromosómico (MNs o AC) usando células de médula ósea de mamíferos, en general de ratones o ratas expuestas que estarían indicando en forma indirecta la posibilidad o no de inducción de daño genotóxico en células germinales (Soriano Tárraga, 2009).

Los ensayos diseñados para detectar cambios nocivos en el ADN son capaces de identificar diferentes clases de modificaciones del material genético que abarcan desde alteraciones en la secuencia de bases del ADN, alteraciones a nivel molecular, intercambios génicos entre pares de cromosomas homólogos y no homólogos al igual que diferentes tipos de alteraciones en la integridad de los cromosomas. Existen cuatro niveles de evaluación del daño genético. El nivel primario, o bacteriano o molecular, que detecta mutaciones puntuales empleando ensayos en

diferentes tipos de organismos procariotas. Entre los ensayos utilizados en este nivel se encuentra el test de Ames. El nivel secundario, o celular, donde se emplea un cultivo de células con el objetivo de caracterizar el daño en líneas celulares establecidas, emplean ensayos como el de AC, intercambios de cromátidas hermanas y el de MNs. En el nivel terciario o nivel orgánico, el cual se aplica en plantas y animales, incluido el ser humano, se evalúan exposiciones de tipo ocupacional y accidental. Por último, en el nivel cuaternario o nivel epidemiológico es donde se evalúan los efectos genotóxicos en poblaciones expuestas.

Dentro de los ensayos más comúnmente utilizados en Genética Toxicológica y que serán tratados en este capítulo, se encuentran:

- Ensayo o test de Ames: el punto final evaluado es la mutación génica puntual en una célula bacteriana. Se emplean cepas de *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*. Las mutaciones puntuales evaluadas incluyen sustituciones de una única base o deleciones e inserciones de uno o varios pares de bases detectados como cambios en el marco de lectura.
- Ensayo de AC: el punto final evaluado es la inducción de AC tanto estructurales como numéricas.
- Ensayo de linfoma de ratón: los puntos finales evaluados son la inducción de mutaciones génicas y daño cromosómico al mismo tiempo.
- El ensayo de MNs: Es un ensayo que evalúa daño a nivel cromosómico tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*.
- El ensayo cometa (EC o SCGE –single cell gel electrophoresis–): el punto final es la evaluación de rupturas de simple o doble en la molécula de ADN, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Çavaş, 2017; Singh, 1996). Si bien el EC es una metodología aún no validada internacionalmente, resulta un método económico, rápido y sencillo para evaluar inestabilidad genómica.
- El ensayo del citoma (CBMN -cytokinesis-block micronucleus-): es una adaptación del ensayo de MNs que además de cuantificar la inestabilidad genómica evalúa parámetros de citotoxicidad y proliferación celular.

Principales Ensayos empleados en Genética Toxicológica

Ensayo de Ames

Desarrollado por el Dr. Bruce Ames y colegas a comienzos de 1970 (Ames et al., 1972; 1973; Pillco y de la Peña, 2014), actualmente es uno de los ensayos *in vitro* más utilizados para identificar la capacidad deletérea de un compuesto en células procariotas. Es una herramienta que se emplea para detectar el potencial mutagénico y antimutagénico de químicos y mezclas de los mismos presentes o no en el ambiente, fluidos corporales, alimentos, drogas, agentes físicos,

entre otros. El punto final evaluado es la inducción de mutaciones generadas por sustituciones de una única base o deleciones e inserciones de uno o varios pares de bases detectados como cambios en el marco de lectura en una célula bacteriana.

Para este método, se desarrollaron una serie de cepas de *Salmonella Typhimurium* o *E. coli* auxótrofas para el aminoácido histidina (his) o triptófano (Trp), respectivamente. En *Salmonella Typhimurium* el principio de este ensayo se basa en que, una vez identificada la mutación (de his⁻ → his⁺) la misma se revierte en presencia del xenobiótico a ser estudiado y la célula bacteriana es capaz de volver a sintetizar el aminoácido his (Mohamed et al., 2017). Las cepas bacterianas revertantes son identificadas por su habilidad de crecer en ausencia de este aminoácido. El número de colonias revertantes espontáneas por placa es relativamente constante para una determinada cepa bacteriana. Sin embargo, cuando se agrega un mutágeno a la placa, el número de colonias revertantes aumenta por incremento en el número de mutaciones revertantes inducidas por el agente, generalmente resultando la frecuencia de las mismas directamente relacionada con la dosis del xenobiótico ensayado (Mortelmans y Zeiger, 2000; Pillco y de la Peña, 2014).

Existen diversas cepas de *Salmonella* que se caracterizan por poseer mutaciones en los genes del operón his. Las cepas más utilizadas son aquellas que presentan una mutación en el gen *hisG46* (cepa TA100) y en el gen *hisD3052* (cepa TA98). En la cepa TA100 se produce la reversión de his⁻ → his⁺ por sustitución de una única base en el gen mutado, mientras que en la cepa TA98 la mutación afecta el marco de lectura en una secuencia de pares de bases. Posteriormente, se incorporaron al análisis la detección de otros tipos de mutaciones con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo a diferentes agentes xenobióticos (Mudry y Carballo, 2006). Entre estas, se encuentra la mutación en el gen *rfa*, la cual causa modificaciones en la capa de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana aumentando la permeabilidad de la pared bacteriana a moléculas más grandes. Además, se ha incluido la mutación en el gen *uvrB*, la cual bloquea el mecanismo de reparación por escisión de bases luego del daño inducido en el ADN e impide a una bacteria reparar este tipo de daño causado al ADN, haciendo que la bacteria sea más sensible a los agentes mutagénicos. Además, la deleción en el gen *uvrB* afecta también al gen de la biotina y por ello, las cepas bacterianas se tornan, además, auxótrofas para la vitamina biotina (bio⁻) (Mudry y Carballo, 2006).

Asimismo, en este ensayo es necesario incorporar al conjunto de cepas seleccionadas un complejo exógeno de activación metabólica de mamífero (fracción microsomal S-9), el cual emula las condiciones metabólicas de los mamíferos, capacidad ausente en bacterias. El sistema de activación o fracción S-9 consiste en una fracción sobrenadante de un homogenato microsomal proveniente del hígado de ratas expuestas generalmente al carcinógeno aroclor 1254 o a fenobarbital. La fracción S-9 contiene enzimas del complejo CYP420 y sus isoformas al igual que diferentes tipos de enzimas de la fase II del metabolismo como las transferasas. La presencia de estas enzimas en el complejo permite metabolizar al xenobiótico en estudio. Esta fracción S-9 se coloca en el cultivo bacteriano en presencia del xenobiótico y las células son cultivadas siguiendo los lineamientos generales del ensayo a 35-37 °C durante 48 h, momento en el cual se procede al conteo de las colonias microbianas.

En paralelo al tratamiento con el agente en estudio se realiza un cultivo bacteriano en ausencia de la fracción S-9 y es empleado como control negativo (Figura 7.1.).

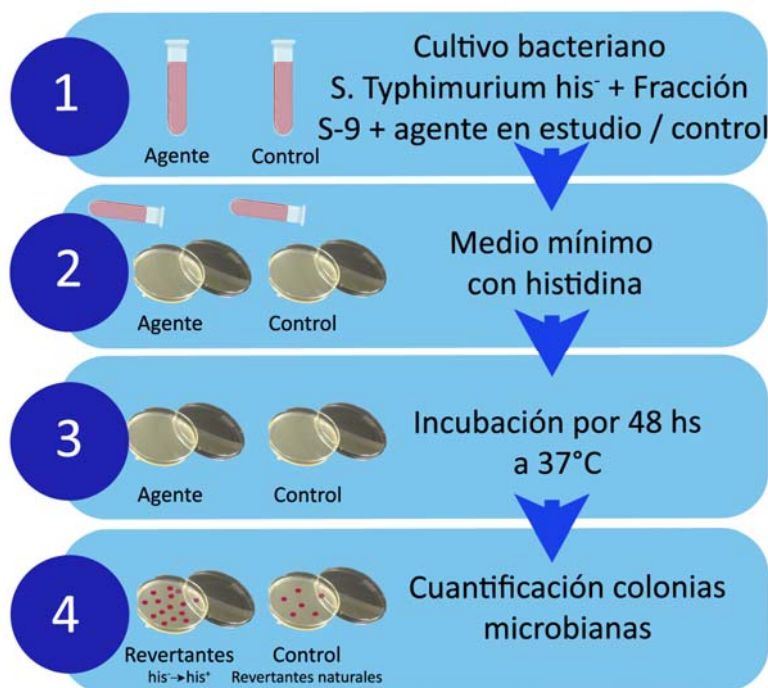


Figura 7.1: Protocolo del ensayo de Ames

El ensayo de Ames es un bioensayo rápido, de bajo costo y fácil de implementar, por lo que en general es empleado para realizar una evaluación inicial de la mutagenicidad de un compuesto con potencial carcinogénico. Es un ensayo versátil y a través de diferentes modificaciones introducidas al protocolo inicial, básicamente con el empleo de diferentes cepas bacterianas, se han podido identificar mutágenos potenciales mediante variaciones experimentales, por ejemplo, el método de preincubación, el ensayo de microsuspensión, el ensayo de punto y el método estándar de incorporación de placa (Pillco y de la Peña, 2014) (Mortelmans y Zeiger, 2000). El ensayo de Ames es requerido o recomendado por agencias regulatorias para aceptar o registrar nuevos químicos, drogas, biocidas, plaguicidas, materiales, entre otros al igual que nuevas combinaciones de los mismos.

Ensayo de aberraciones cromosómicas (AC)

Las AC son alteraciones que pueden ocurrir tanto en el número como en la estructura del complemento cromosómico normal de una especie determinada en estudio. Estas pueden ser generadas de manera espontánea o pueden ser inducidas por diferentes agentes clastogénicos y/o aneugénicos (Mitelman, 1995; Mudry y Carballo, 2006).

Las AC pueden ser inducidas por agentes químicos, físicos o biológicos, o surgir durante el proceso de reparación del ADN, lo cual está altamente influenciado por la estructura de la

cromatina y la actividad transcripcional de la célula afectada. Los agentes químicos (como agentes alquilantes, intercalantes, inhibidores de la reparación del ADN, entre otros), físicos (radiaciones sean ionizantes o no) y biológicos (como el virus SV40, el de Sarcoma de Roux, entre otros) capaces de inducir AC se denominan agentes clastogénicos. El daño puede producirse por la interacción directa de estos agentes con el ADN, o de manera indirecta por interferencias durante el proceso de replicación y reparación de la molécula de ADN. Los agentes clastogénicos pueden tener diferentes mecanismos de acción. Pueden dividirse en agentes dependientes de la fase S, los cuales inducen lesiones que requieren un periodo de síntesis de ADN (fase S del ciclo celular) para expresarse, tales como luz UV, agentes alquilantes y la mayoría de los agentes químicos y por otro lado, los agentes independientes de la fase S, los cuales inducen las lesiones en todas las fases del ciclo celular, incluyendo al período S, tales como la radiación ionizante, agentes citostáticos como la bleomicina y otros compuestos radiomiméticos, entre otros.

Las AC pueden dividirse en dos tipos principales: estructurales y numéricas. Las AC estructurales consisten en reordenamientos de la disposición lineal de los genes sobre los cromosomas que afectan su estructura, forma y tamaño y las AC numéricas implican la pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas completos (Lacadena, 1996). Las AC se generan habitualmente como consecuencia de errores que ocurren durante el proceso de duplicación del material genético y/o durante la división celular y que no pueden ser corregidos de manera eficiente por la célula. Asimismo, las AC pueden originarse tanto a nivel de las células somáticas como de células germinales, por lo que pueden ser transmitidas a la descendencia provocando anormalidades cromosómicas hereditarias. Ambos tipos de anormalidades están asociadas con consecuencias negativas en la salud de la población humana y también para otras especies y, en muchos casos, generan anomalías congénitas en recién nacidos e inclusive están directamente vinculadas con el desarrollo de neoplasias (Mohamed y col., 2017).

El ensayo de AC tiene como objetivo identificar los posibles agentes que causan mutaciones estructurales o numéricas en cromosomas o cromátidas de los mismos. Los primeros estudios describiendo los procesos de formación de AC fueron realizados por Perthes usando oocitos de *Ascaris* sp irradiados con rayos X (Perthes, 1904) y por Koernicke en células de raíz de *Vicia faba* y *Pisum sativum* irradiadas con rayos X (Guimarães et al., 2014; Koernicke, 1904). Para la realización de este tipo de ensayo debe seleccionarse una línea celular apropiada, sea primaria o establecida, cuya elección depende de la estabilidad que presente el cariotipo, del número y diversidad de los cromosomas y de la frecuencia de AC espontáneas. En líneas generales, los extendidos celulares son analizados bajo un microscopio óptico convencional de campo claro y una magnificación de 1000X. Se analizan al menos 100 metafases por preparado, en las cuales se registran la frecuencia y el tipo de AC por cada 100 células analizadas, determinándose el porcentaje de células aberrantes, considerando como tal a aquella que presenta por lo menos una AC (Figura 7.2.).

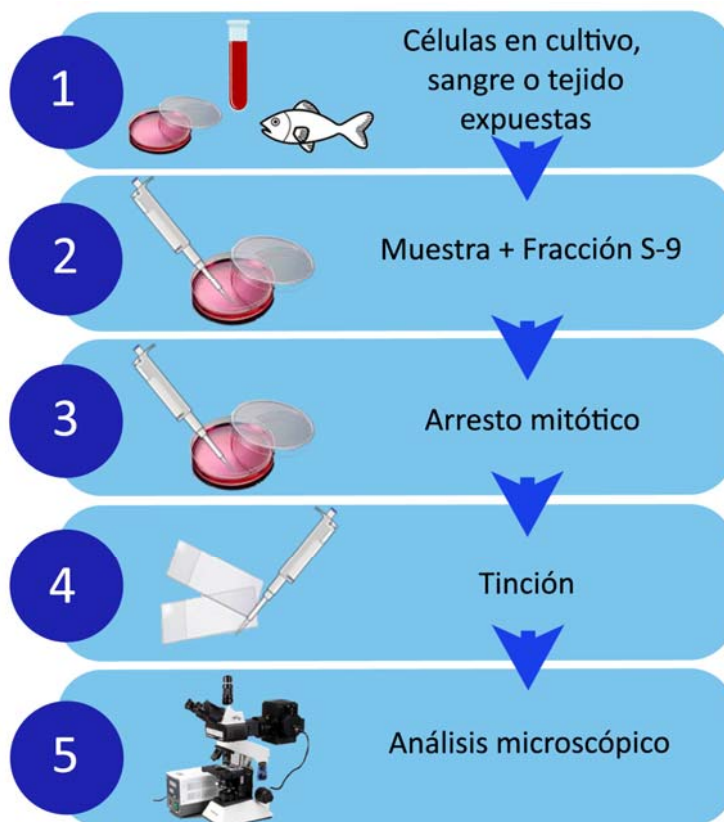


Figura 7.2: Protocolo del ensayo de aberraciones cromosómicas

Las AC estructurales pueden resultar de diversos procesos. Entre las mismas podemos encontrar:

- a) Duplicaciones:** se duplica una sección de un cromosoma, lo cual produce material genético extra. Las duplicaciones pueden abarcar desde una duplicación a nivel génico y la duplicación de segmentos cromosómicos hasta la duplicación de todo el complemento cromosómico como por ejemplo en el caso de las poliploidías. En líneas generales, las duplicaciones no suelen tener una manifestación fenotípica observable a simple vista, sino mediante análisis citogenéticos y moleculares y en muchos casos son de importancia evolutiva.
- b) Deleciones** (o eliminaciones): se pierde o se elimina un segmento del cromosoma o una cantidad muy pequeña de material genético que puede incluir a un único gen. Cuando el segmento cromosómico perdido es terminal, se denomina *deficiencia*, cuando es intersticial, *delección intersticial* o *delección* propiamente dicha. A modo de ejemplo, en la especie humana, una alteración cromosómica provocada por una delección parcial o total del brazo corto del cromosoma 5 origina el síndrome conocido como “maullido de gato” (del francés *cri du chat*).

- c) **Cromosomas en anillo:** consiste en una doble deleción terminal que incluyen ambos telómeros y unión de los mismos dando origen a un cromosoma circular. Pueden presentar o no pérdida de material genético.
- d) **Inserciones:** parte de un cromosoma se ha insertado en una posición inusual dentro del mismo (intracromosómicas) o en otro cromosoma (intercromosómicas).
- e) **Inversiones:** una parte del cromosoma se ha desprendido y reinsertado en el cromosoma, pero con diferente orientación. Deben producirse dos roturas dentro del mismo cromosoma, el segmento gira 180° y finalmente se vuelven a unir. Las inversiones pueden clasificarse en paracéntricas, cuando el segmento invertido no incluye el centrómero, y pericéntricas, cuando el centrómero está incluido en un segmento invertido e implican, generalmente, un cambio en la morfología del cromosoma.
- f) **Translocaciones,** se generan cuando se intercambian segmentos cromosómicos dentro del complemento cromosómico. Hay dos tipos principales de translocaciones, las internas o intracromosómicas, cuando un segmento cromosómico cambia de posición dentro del propio cromosoma como es el caso de las translocaciones internas intraradiales y extraradiales; y las translocaciones intercromosómicas, donde algún segmento cromosómico pasa a situarse en otro cromosoma, y donde podemos incluir a las transposiciones y a las translocaciones recíprocas o intercambios. En una translocación **recíproca**, se da un intercambio de segmentos entre dos cromosomas distintos. En una translocación **no recíproca**, el traspaso del fragmento ocurre únicamente en una dirección. Un tipo muy común de translocación que ocurre en el reino animal son las translocaciones **robertsonianas**, en las que un cromosoma entero se une a otro a nivel del centrómero debido a mecanismos de fusiones y fisiones céntricas. Este tipo de reordenamiento cromosómico en muchos casos ha tenido importantes consecuencias desde el punto de vista evolutivo en numerosos grupos taxonómicos, incluyendo al género *Homo*.

Una variación cromosómica estructural puede afectar a un solo cromosoma, como ocurre en las deleciones, duplicaciones e inversiones, o puede afectar simultáneamente a dos o más cromosomas, como sucede en las translocaciones. Existen distintos tipos de AC estructurales, causadas por rupturas o unión incorrecta de segmentos cromosómicos presentando una reorganización estructural que puede ser balanceada o desbalanceada. Dentro de las reorganizaciones no balanceadas o desequilibradas se pueden incluir a las deleciones, duplicaciones o inserciones de segmentos cromosómicos. Las reorganizaciones balanceadas incluyen regiones cromosómicas invertidas o translocadas (cambios en la ubicación). Dado que la totalidad del ADN del complemento está presente, las reorganizaciones cromosómicas balanceadas pueden pasar desapercibidas y es posible que no resulten en alteraciones fenotípicas visibles salvo en el caso específico que la ruptura cromosómica involucre a un gen funcional (Figura 7.3.).

En cuanto al otro gran grupo de anomalías, las AC numéricas se definen como aquellos cambios que afectan al número cromosómico normal de una especie en estudio, debido a la pérdida o ganancia de cromosomas completos o pares cromosómicos de la especie.

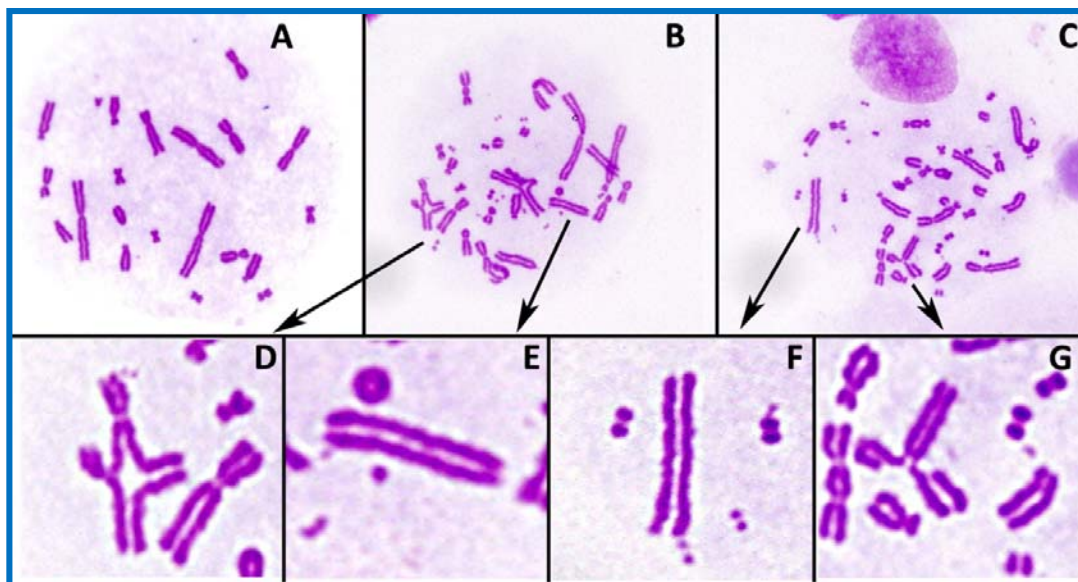


Figura 7.3: Células CHO-K1 en cultivo mostrando: (A) metafase normal (B - C), metafases con aberraciones cromosómicas estructurales, (D) intercambios, (E) anillo y fragmentos acéntricos, (F) Doble diminutos y fragmentos acéntricos y (G) Intercambios, cromosoma dicéntrico, doble diminutos y fragmentos acéntricos. Las figuras D - G son imágenes parciales de B y C destacando distintos ejemplos de AC.

A su vez, las AC numéricas pueden clasificarse en dos grandes grupos, las **euploidías** y las **aneuploidías**. En las euploidías, la célula tiene uno o más juegos completos de cromosomas. Dentro de estas, se encuentran:

- a) **Monoploidías**, en la cual toda célula de un organismo o tejido presenta por un único elemento de cada par de homólogos característicos de las células de los individuos normales de una especie (organismos haploides, n).
- b) **Poliploidías**, en la que los individuos poseen varios juegos completos de cromosomas homólogos (tetraploidías $-3n-$, tetraploidías $-4n-$).

Por otra parte, en las aneuploidías el número de cromosomas difiere del tipo silvestre en parte de su dotación cromosómica, debido a la presencia de uno o varios cromosomas extra o a la ausencia de un elemento. La aneuploidía, ocurrida de forma espontánea, es frecuente en la naturaleza y tiene un carácter evolutivo. La mayor parte de las aneuploidías se originan por un proceso de no disyunción cromosómica durante una de las divisiones meióticas o durante la mitosis. Este error puede ser accidental, estar causado por el incremento de la edad (mayormente en la ovogénesis) o por la exposición a agentes potencialmente aneugénicos, los cuales interfieren con la formación del huso mitótico (Guimarães et al., 2014).

Los individuos normales son disómicos, y los aneuploides se clasifican siguiendo la siguiente terminología:

- a) **Monosomías**, Individuos a los cuales les falta un cromosoma completo. Su dotación cromosómica es $2n-1$. Un ejemplo de monosomía es el síndrome de Turner donde una mujer presenta un único cromosoma X o el mismo está incompleto y fenotípicamente son de menor estatura que el promedio e infértiles.
- b) **Nulisomías**, individuo con ausencia de un par de cromosomas homólogos en su complemento cromosómico. Su dotación cromosómica es $2n-2$.
- c) **Polisomías**, cuando un individuo tiene más de dos cromosomas en lugar de un par. Dentro de estas últimas se encuentran las **trisomías**, que se originan al duplicarse los cromosomas tres veces, **tetrasomías** que se originan al duplicarse cuatro veces, etc. Un ejemplo de una afección causada por una trisomía es el Síndrome de Down, el cual se caracteriza fenotípicamente por diferentes grados de retraso mental y otros problemas de salud. Un individuo con Síndrome de Down tiene tres copias del cromosoma 21 (total o parcial) en lugar de dos, motivo por el cual la afección también se conoce como “trisomía 21” siendo su constitución cromosómica $47, XX/XY,+21 (2n+1)$.

Como podemos observar, la detección temprana de AC constituye un biomarcador fundamental en la toma de decisiones desde el punto de vista clínico en diferentes tipos de enfermedades como síndromes, malformaciones genéticas, diferentes grados de esterilidad y la aparición de procesos cancerosos, entre otros. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la obtención de un resultado positivo en este ensayo no siempre está correlacionado con un proceso de carcinogénesis, ya que un único bioensayo no puede detectar todos los mecanismos que participan en el proceso de tumorigénesis. Por esto, se complementa este ensayo con otros tales como el test de Ames, el test de MNs y/o el test de linfoma de ratón. Adicionalmente, se deben incluir ensayos *in vivo*, ya que algunos agentes son mutagénicos *in vivo* pero no *in vitro*.

Ensayo de mutaciones genéticas en células de mamíferos (ensayo de linfoma de ratón)

Es el ensayo *in vitro* más usado para evaluar eventos mutacionales en mamíferos. Fue desarrollado originalmente por Clive y colaboradores en 1972 (Clive et al., 1972). Evalúa la inducción de mutaciones en el gen timidina quinasa (*Tk*) ubicado en el cromosoma 11 del genoma de ratón y detecta un amplio espectro de daño genético debido a la naturaleza y localización de este gen, evidenciando tanto mutaciones puntuales como mutaciones a nivel cromosómico (Chen et al., 2014). El gen *Tk* codifica para una enzima citosólica fosfotransferasa, involucrada en la vía de recuperación del nucleótido pirimidina. La enzima TK fosforila

deoxitimidina a deoxitimidina 5' fosfato de manera tal que la deoxitimidina pueda ser incorporada al ADN. Varias características de la enzima TK permiten que este ensayo detecte diferentes tipos de mutaciones. Entre ellas, que el gen *Tk* funcional no es necesario para células de cultivo, por lo cual mutantes *Tk* pueden crecer y desarrollarse. Además, las células deficientes en TK pueden ser seleccionadas con el análogo de la pirimidina trifluorotimidina (TFT). Este compuesto, al ser captado por la célula y fosforilado por la TK, origina metabolitos tóxicos que producen muerte celular. Así, las células con la enzima TK no funcional serán resistentes a TFT, ya que serán incapaces de metabolizarla y desarrollarán colonias mutantes; mientras que las células que posean la enzima funcional serán sensibles a TFT y por ende, morirán (Soriano Tárraga, 2009).

Para la realización de este ensayo se utiliza la línea celular comercial de linfoma de ratón L5178Y/ $Tk^{+/-}$ -3.7.2C. Esta línea celular fue elegida por una serie de características que la hacen idónea para ensayos de mutación génica *in vitro*. Entre ellas, presentar crecimiento en suspensión, tiempo de duplicación corto (9-11 h), número estable de cromosomas y alta eficiencia de clonación. Si la enzima TK es normal, incorpora el análogo TFT en el ADN durante la reparación o división celular, conduciendo a la muerte celular. Sólo las células con la mutación del gen *Tk* ($Tk^{-/-}$) sobreviven a su presencia debido a la alteración de las vías de rescate de nucleótidos. Luego de la adición del TFT, las células son típicamente cultivadas por 10-14 días durante los cuales las células $Tk^{-/-}$ forman colonias. Una característica de las colonias mutantes del gen *Tk* es que crecen en colonias de diferentes tamaños. Las colonias grandes de mutantes crecen a una tasa similar a las células *Tk* heterocigotas mientras que las colonias de mutantes pequeñas crecen a una tasa menor. La frecuencia relativa entre los dos tipos de colonias es dependiente del mutágeno. En general, los agentes clastógenos tienden a producir colonias de mutantes pequeñas con bordes irregulares mientras que los agentes que producen mutaciones puntuales o deleciones de pares de bases y no producen rupturas de cromosomas, producen colonias de mayor tamaño y con bordes lisos (Lloyd y Kidd, 2012). Así, el tamaño de las colonias junto con los análisis moleculares pueden revelar el mecanismo mutagénico de acción de los xenobióticos evaluados (Chen et al., 2014).

La guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos OECD 476 (OECD, 1997) recomienda que el ensayo se realice en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica, comúnmente la fracción mitocondrial S-9. El periodo de expresión en el locus *Tk* es de 2 días, pero puede extenderse a 3 días si el agente en estudio retrasa el ciclo celular. Luego del tratamiento, las placas mutantes son incubadas de 10-14 días. Pasado este periodo, las colonias pueden ser contadas visualmente o usando un contador automático (Lloyd y Kidd, 2012) (Figura 7.4.).

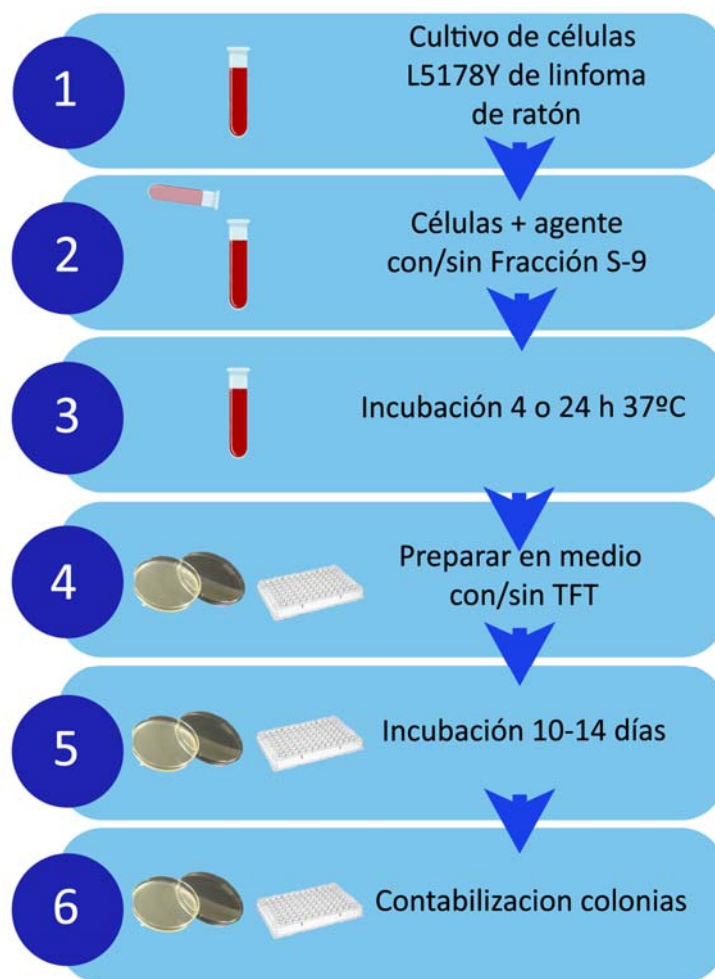


Figura 7.4: Protocolo ensayo de linfoma de ratón

Ensayo cometa (EC)

El ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales es una metodología sensible, rápida, simple y visual utilizada para analizar rupturas en la molécula de ADN de simple o doble cadena, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Çavaş, 2017; Singh, 1996). El EC fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson (Ostling y Johanson, 1984), quienes emplearon una línea celular tumoral de mamíferos irradiada y utilizaron la metodología con una solución de electroforesis a pH neutro que permitió la detección de lesiones de cadena doble en el ADN. Posteriormente, Singh en sus investigaciones sobre el efecto de la radiación empleando rayos X y H_2O_2 desarrolló la variante alcalina de la técnica mediante la incorporación de una solución de pH alcalino (≥ 12) durante la electroforesis a la que son sometidas las muestras. Este cambio permitió adicionar la detección de lesiones de cadena simple y sitios sensibles al álcali (Singh et al., 1988). Actualmente este bioensayo

puede ser empleado en cualquier célula eucariótica aislada o suspensión nuclear, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Ha sido ampliamente utilizado en cultivos celulares, en células de animales y humanas (células sanguíneas, células pertenecientes a diferentes tejidos y esperma), células de la hemolinfa de moluscos e insectos, en levaduras y en tejidos vegetales (Azqueta y Collins, 2014).

Esta técnica posee la ventaja de poder ser aplicada a cualquier población de células eucariotas, sin tener en cuenta su actividad mitótica o el período del ciclo celular donde se encontraban en el momento de la exposición al xenobiótico. Más aún, otra ventaja es que sólo se requiere de una pequeña cantidad de tejido o de células de un tejido y adicionalmente a los métodos de categorización visual del daño, tiene la opción de ser analizada de manera automática utilizando programas de computación. Los resultados pueden ser obtenidos en un lapso breve de análisis por parte de un observador (Azqueta y Collins, 2013; Collins, 2004; Tice et al., 2000). Se utiliza tanto en programas de seguridad regulatoria para la evaluación de productos químicos en relación con la genotoxicidad y en estudios de reparación del ADN, así como para el biomonitorio humano y en el ámbito emergente de la Ecogenotoxicología (Gagné et al., 2014).

Esta técnica permite analizar el daño en el ADN (tal como hemos mencionado e incluyendo daño oxidativo a nivel de bases púricas y/o pirimídicas) inducido por un xenobiótico en células individuales contenidas en una capa de gel de agarosa. Básicamente, las células, luego de la exposición a un tóxico, son resuspendidas en agarosa de punto de fusión bajo la cual es colocada sobre un portaobjetos, entre otras dos capas de agarosa de punto de fusión normal. Posteriormente, las células son lisadas para remover las membranas celulares al igual que las proteínas que se encuentran unidas al ADN, dejando al núcleo desprovisto de su membrana nuclear, tomando la denominación de “nucleoide”. Luego se procede al desenrollamiento del ADN del nucleoide, y luego el mismo es sometido a una electroforesis induciendo a los fragmentos de las cadenas de ADN celular generados por el agente xenobiótico a migrar hacia el polo positivo del campo eléctrico durante el proceso de electroforesis. (Figura 7.5.). En otras palabras, los fragmentos de ADN cargados negativamente migran libremente hacia el ánodo a través de un campo eléctrico en una solución de electroforesis mientras que el ADN no fragmentado (sin carga neta) permanece sin migrar del nucleoide y sigue formando parte del mismo (Azqueta et al., 2017; Çavaş, 2017). Luego de la neutralización y la tinción con un colorante o con un fluorocromo con afinidad por el ADN, la imagen resultante a analizar se asemeja a un cometa, con una zona más definida denominada “cabeza” en la región original del nucleoide y una región conteniendo el ADN fragmentado migrado, la “cola” del nucleoide (Figura 7.6.).



Figura 7.5: Protocolo del ensayo cometa

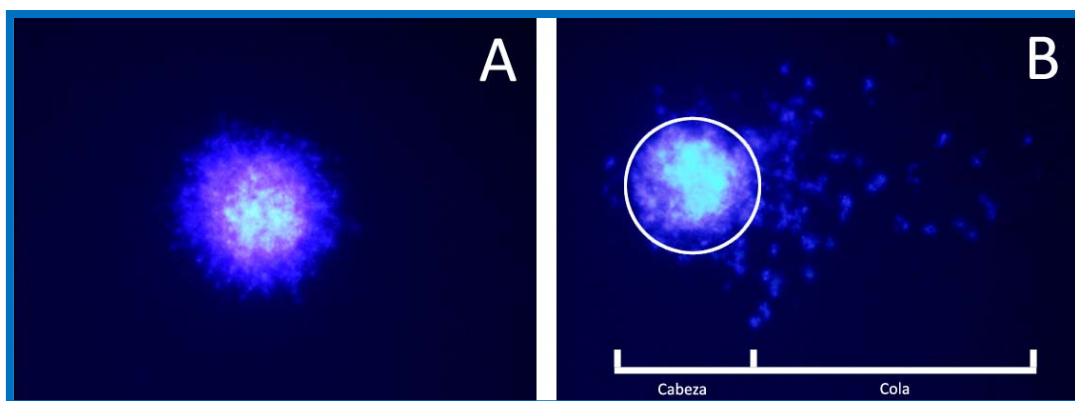


Figura 7.6: Fotografías de nucleoides coloreados con DAPI (A) Nucleoide no dañado (tipo 0). (B) Nucleoide con un alto grado de daño (tipo IV)

La migración del ADN es directamente proporcional al daño que presenta el mismo. En otras palabras, cuanto más lesionado el ADN, mayor el número de fragmentos a migrar y mayor la cola del cometa, pero además cuanto más cortos sean los fragmentos de ADN inducidos, más lejos migrarán durante la electroforesis y por ende, más larga será la distancia de migración del nucleoide, y mayor entonces la cola del cometa. Entre las tinciones más utilizadas se encuentran la impregnación argéntica y el uso de fluorocromos tales como el bromuro de etidio, yoduro de propidio, SybrGreen y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), entre otras (Collins et al., 2008; Cristofolletti et al., 2009; Mustafa et al., 2015; Vera-Candioti et al., 2013).

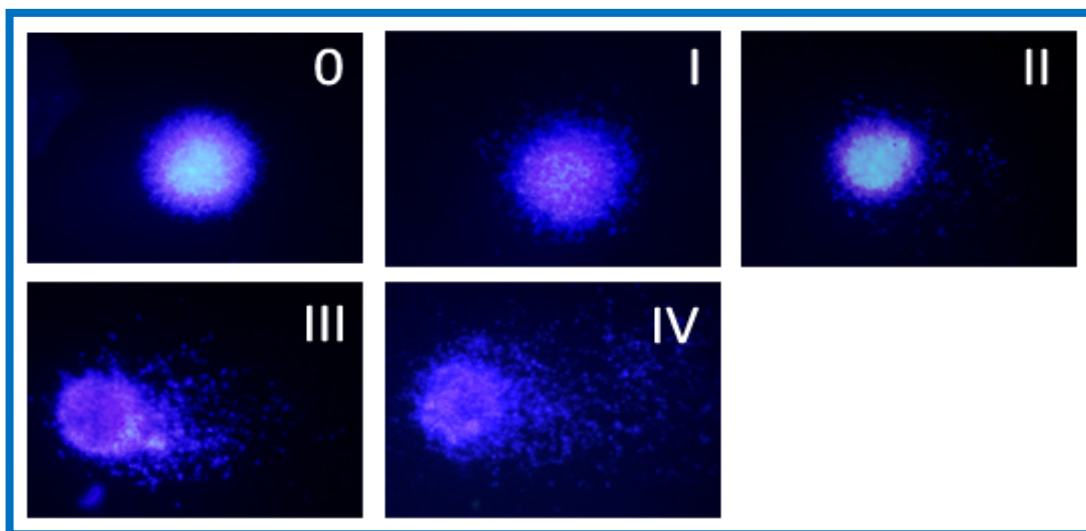


Figura 7.7: Fotografías de nucleoides de eritrocitos del poecílido *Cnesterodon decemmaculatus* con distintos grados de daño. Categorías de daño Tipo 0-I nucleoides no dañados. Nucleoides II-IV nucleoides con daño creciente.

Una de las maneras clásicas de cuantificación visual del daño en el ADN fue propuesta por Çavaş y Konen (2007). La misma se realiza y se expresa en unidades arbitrarias basadas en la clasificación de los nucleoides en cinco categorías (categorías 0-IV) de acuerdo a la extensión de la cola. Según la misma, los nucleoides tipo 0-I agrupan a los nucleoides no dañados, los tipo II incluyen a los de nivel de daño leve, los de tipo III a aquellos nucleoides que presentan un nivel de daño medio mientras que los nucleoides tipo IV incluyen a los que presentan un grado de daño máximo (Figura 7.7.). En el análisis automatizado de los cometas, los programas de computación, entre los que pueden ser mencionados el *OpenComet* y *NIH image* permiten el cálculo de más de 20 parámetros usando imágenes obtenidas en el momento de su estimación o capturadas con anterioridad (Çavaş, 2017). Entre los parámetros obtenidos por este tipo de programas de computación para expresar el nivel de daño en el ADN se encuentran el largo de la cola, el porcentaje de ADN contenido en la cola y el momento *Olive*. El largo de la cola, generalmente, incluye la distancia de migración del ADN desde el nucleoide. El porcentaje de ADN de la cola se calcula sustrayendo de la cantidad total del ADN del nucleoide el porcentaje de ADN presente en la cabeza del cometa. Finalmente, el momento *Olive* se define como el producto del largo de la cola y la fracción total de ADN presente en la misma (Dogan y Can, 2011; Martínez-Paz et al., 2013). Los resultados también pueden expresarse calculando un índice, el Índice de Daño Genético (IDG) propuesto por Pitarque y col. (1999), el cual pondera la prevalencia de cada clase de nucleoide según la siguiente fórmula:

$$\text{IDG} = (1 \times \text{I} + 2 \times \text{II} + 3 \times \text{III} + 4 \times \text{IV}) / N_{(0-IV)}$$

Donde, 0-IV representan las clases de nucleoides y $N_{(0-IV)}$ representa el total de los nucleoides analizados.

Diferentes variantes del ensayo cometa han sido descritas, entre ellas la combinación con isotiocianato de fluoresceína (FISH), la electroforesis de campo variable y la inclusión de endonucleasas de restricción (Azqueta et al., 2017; Kushwaha et al., 2011; Mondal y Guo, 2017; Sorensen et al., 2005). Esta última es una de las variantes mundialmente adoptadas, y propone la inclusión de enzimas que detectan lesiones específicas del ADN. El grupo de investigación de Collins y colaboradores fueron los primeros en emplear endonucleasas de restricción en el ensayo cometa para aumentar su sensibilidad. El protocolo incluye la incubación de las células lisadas con enzimas de restricción capaces de reconocer específicamente diferentes tipos de bases dañadas en la molécula de ADN (Azqueta y Collins, 2013). En esta modificación metodológica, luego de la etapa de lisis celular empleada en el protocolo general de la metodología del ensayo cometa, los geles de agarosa conteniendo los nucleoides son incubados con las endonucleasas específicas que no sólo reconocen lesiones en las bases del ADN, sino que introducen cortes de cadena a nivel del sitio reconocido, originando de este modo sitios apurínicos. Por consiguiente, de existir bases dañadas reconocidas por la endonucleasa específica, la misma no solo reconoce dichos sitios, sino que produce los cortes en la cadena de ADN, lo cual se traduce en un incremento en número de fragmentos de ADN, efecto que será observado en la práctica como una mayor densidad (mayor momento) de la cola del nucleoide debido al aumento del número de fragmentos, o a una mayor longitud de la misma dada por una mayor migración de fragmentos de menor tamaño. Las enzimas más utilizadas son la Endonucleasa III (Endo III) para detectar pirimidinas oxidadas y la formamidopirimidina-ADN glicosilasa (FPG) para detectar purinas oxidadas (mayormente 8-oxo-guanina) y formamidopirimidinas que resultan de la ruptura de purinas oxidadas o alquiladas (Collins, 2004; Collins et al., 1996). Asimismo, entre la lista de enzimas utilizadas, pueden mencionarse entre otras, a la T4 endonucleasa V (T4endoV), también conocida como T4 PDG, caracterizada por detectar dímeros ciclobutano de pirimidinas y la AlkA para detectar bases alquiladas, entre ellas residuos de 3-metilaldenina (Azqueta y Collins, 2014). Esta variante metodológica del EC clásico ha permitido dilucidar, en parte, los posibles mecanismos de acción de algunos compuestos genotóxicos, investigar enfermedades derivadas de la situación de estrés oxidativo, evaluar estrés oxidativo generado por ejercicio en el hombre o en animales, estudiar efectos antioxidantes de compuestos presentes en la dieta así como en la evaluación del estado sanitario ambiental (Azqueta et al., 2017).

Ensayo de micronúcleos (MNs)

Esta metodología permite la evaluación del daño inducido por un xenobiótico a nivel cromosómico, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. El mismo puede ser determinado en distintos tipos de células proliferantes mediante la inducción de daño clastogénico o aneugénico.

Fue descrito por primera vez por Evans y col. (1959) quienes utilizaron como modelo experimental raíces de *Vicia faba* expuestas a radiación ionizante. Esta técnica se basa en analizar la presencia

de macrolesiones a nivel de la molécula de ADN donde el material genético desprendido da origen a pequeños núcleos denominados micronúcleos (MNs). Estos MNs, a nivel microscópico, son detectados en células en interfase celular como pequeñas porciones de material extranuclear, en otras palabras no contenido en el núcleo celular, y siempre rodeados por membrana nuclear. El MN debe ser considerado como marcador o indicador indirecto de daño cromosómico. El mismo puede originarse por una o varias rupturas de la molécula de ADN la cual alcanza su máximo grado de compactación de la cromatina, que como sabemos acontece durante la metafase mitótica, dando lugar a la formación de un uno o a varios fragmento(s) cromosómico(s) acéntrico(s) (efecto clastogénico) o pueden estar formados por cromátidas enteras o por un cromosoma completo el cual no migró normalmente durante la anafase-telofase celular por alteraciones acontecidas en el aparato mitótico (efecto aneugénico) (Çavaş, 2017; Fenech et al., 2011). Por este motivo, requieren al menos una división celular para expresarse y poder ser visualizados con una tinción convencional nuclear en el estado de interfase celular. Adicionalmente, pueden ser observados y por consiguiente, cuantificados en diferentes modelos experimentales, incluyendo células vegetales y animales, e inclusive humanas, empleando distintos tipos celulares, dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objetivo del estudio, con la única salvedad que las mismas tienen que ser células proliferantes (Mudry y Carballo, 2006). (Figura 7.8.).



Figura 7.8: Protocolo del ensayo de MNs

Los criterios establecidos y mundialmente aceptados para identificar un MN en una célula interfásica son los propuestos por Fenech (2000; 2007). Los mismos indican que los MNs para ser considerados como tales deben tener una morfología redondeada, un diámetro menor a 1/3

respecto al núcleo principal, no ser refringentes, mostrar menor o la misma intensidad en la coloración que el núcleo principal, no estar conectados al núcleo principal, no estar solapados al núcleo principal, tener los bordes definidos y bien diferenciados del núcleo principal al igual que no existir más de 6 MNs en una misma célula (Figura 7.9).

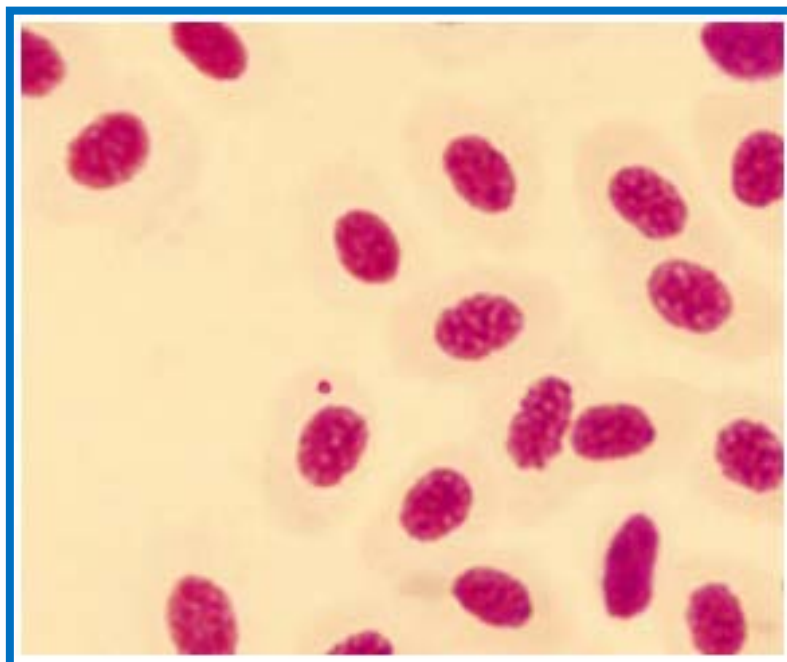


Figura 7.9: Extendido sanguíneo de peces mostrando un Micronúcleo.

Particularmente, el análisis de frecuencia de MNs en eritrocitos circulantes de organismos acuáticos expuestos a diferentes tóxicos se ha tornado una metodología aceptada y utilizada ampliamente a nivel mundial dentro del campo de la Genotoxicología (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Gökalp Muranlı y Güner, 2011; Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016; Soloneski y Larramendy, 2017). Aún más, se ha convertido en una herramienta de estudio obligatoria durante el proceso de aprobación de productos farmacéuticos, químicos, plaguicidas, diferentes tipos de materiales, entre otros (Mudry y Carballo, 2006). Entre las tinciones más utilizadas para este método se encuentran la coloración con Giemsa, coloración con naranja de acridina (NAcr), DAPI, yoduro de propidio, entre otras (Çavaş, 2017). El uso de Giemsa, formado por una mezcla de colorantes neutros y básicos, es sin lugar a dudas la metodología de tinción más extendida, aunque con este método, algunos artefactos no conformados por material nuclear pueden ser teñidos y confundidos con MNs por un observador no experimentado. Por otro lado, la NAcr es un fluorocromo catiónico específico para ácidos nucleicos, vale decir pone en evidencia tanto ADN como ARN, siendo considerada por consiguiente, una técnica más confiable que la de Giemsa, aunque con la desventaja de precisar equipamiento más sofisticado, como microscopía con epifluorescencia y el empleo de filtros de excitación adecuados en el equipo empleado.

Asimismo, cabe destacarse que, aun no existiendo en la literatura un consenso universal para su significancia y clasificación, se describieron y se propusieron diversas anomalías nucleares (AN), diferentes a los MNs, como signo de daño inducido en el material genético por diferentes agentes xenobióticos (Carrasco et al., 1990). Las mismas pueden resumirse en las siguientes variedades o tipos designadas vernáculamente como “otras alteraciones nucleares” siguiendo los criterios establecidos por diversos autores (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Nikoloff et al., 2014; Strunjak-Perovic et al., 2009). Dentro de dichas alteraciones nucleares pueden incluirse a las células binucleadas (CB), cuando la misma presenta dos núcleos de tamaño similar con su membrana nuclear intacta; brotes nucleares (BN - *buds*), cuando el núcleo celular presenta una pequeña evaginación de material genético que sobresale de la membrana nuclear. Esta evaginación contiene en su interior euromatina y se encuentra unida al núcleo por un pedúnculo de material genético cuyo ancho puede ser ligeramente menor al ancho del BN o mucho más delgado, dependiendo del momento del proceso de extrusión del material; núcleos lobulados (NL), cuando el núcleo de la célula presenta una o más evaginaciones de la membrana nuclear, más grandes que los BN y escotaduras nucleares (EN), cuando los núcleos presentan vacuolas y una invaginación pronunciada de su membrana nuclear (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Nikoloff et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2015; Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016; Strunjak-Perovic et al., 2009) (Figura 7.10).

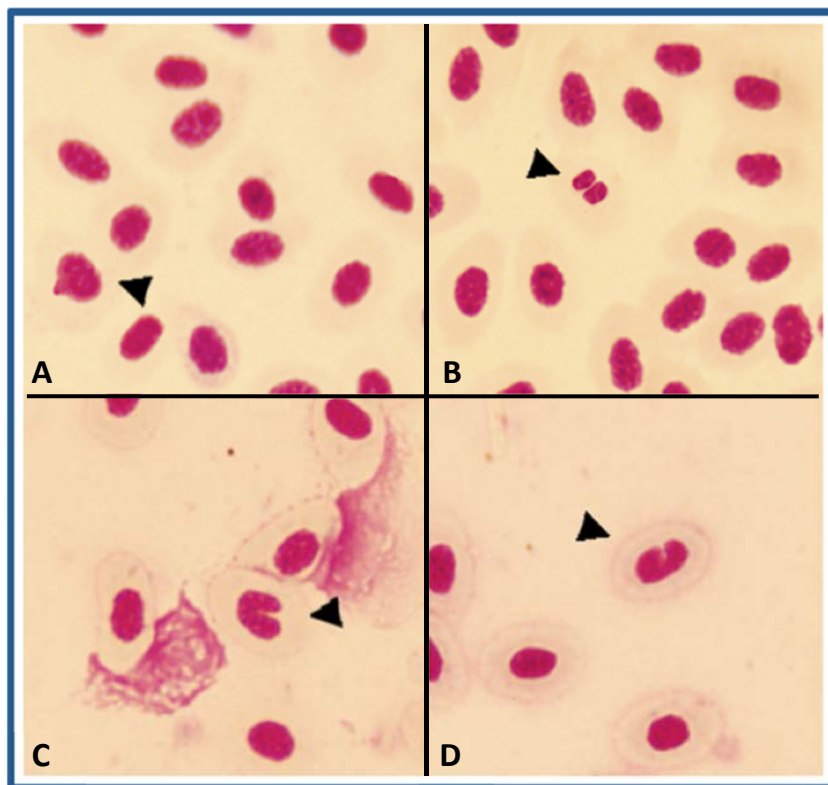


Figura 7.10: Anormalidades nucleares (cabeza de flecha). (A) Brote nuclear (B) Célula binucleada (C) Célula lobulada v (D) Escotadura nuclear.

Se ha sugerido que la aparición de algunas ANs y MNs son resultado de eventos genotóxicos relacionados con diferentes causas tales como problemas durante la segregación de los cromosomas que se encuentran alineados de manera incorrecta en la placa metafásica o que permanecen unidos entre ellos durante la división celular (Çavaş, 2017; Seriani et al., 2012; Shimizu et al., 1998), aparición de aneuploidías (Fernandes et al., 2007) y generación de procesos de degradación celular (Ateeq et al., 2002). También se ha sugerido que los NLs y BNs podrían originarse durante el proceso de eliminación de exceso ADN generado por amplificación génica a través de ciclo de ruptura-fusión-puente. Este ADN en exceso se ubicaría en la periferia del núcleo y sería posteriormente eliminado por un mecanismo de extrusión, formando un MN o, en el caso de que este proceso se vea interrumpido, la generación de un BN o un NL. Análisis estadísticos probaron una correlación positiva entre la aparición de BNs y la formación de MNs (Çavaş, 2017). Fernandes y col. (2007) han sugerido que las CBs y ENs podrían ser indicadores de xenobióticos que actuarían mediante un mecanismo aneugénico. Se ha reportado, asimismo, que este efecto podría suceder por fallas durante la polimerización de las tubulinas y en consecuencia, la generación de alteraciones a nivel del aparato mitótico (Walia et al., 2013). Adicionalmente, Ateeq y col. (2002) sugirieron que los xenobióticos generan condiciones hipóxicas que resultan en la disminución de los niveles de ATP, conduciendo a malformaciones morfológicas en los eritrocitos por alteraciones en el ciclo normal de polimerización de tubulinas, proteínas motrices y rectoras del aparato mitótico.

Ensayo del citoma (CBMN)

Previamente se mencionó que el ensayo de MNs puede llevarse a cabo tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. En los sistemas *in vitro* se debe demostrar que las células en cultivo han atravesado al menos un ciclo de duplicación celular, condición necesaria como hemos mencionado anteriormente para la observación y estudio de MNs (Elhajouji y Lukamowicz-Rajska, 2013). Una adaptación del ensayo de MNs fue la realizada en 1985 por Fenech y Morley (1985), quienes desarrollaron una metodología conocida como “técnica del bloqueo de la citocinesis” (CBMN, por sus siglas en inglés *cytokinesis-block micronucleus*), en la cual se introduce dentro del sistema de cultivo un alcaloide de origen fúngico, la citocalasina-B, derivada del hongo *Helminthosporium dematioideum*. La citocalasina-B tiene la propiedad de inhibir la polimerización de los filamentos de actina que, junto a los filamentos de miosina, participan en la formación del anillo contráctil necesario para separación de las células hijas al final de la mitosis celular (Zalcain et al., 2005), impidiendo de esta manera, el avance de la citocinesis durante la duplicación celular. En otras palabras, se impide la división del citoplasma pero no la nuclear. El concepto de “citoma” implica que cada célula en el sistema estudiado es registrada citológicamente por su estado de viabilidad (células viables, apoptóticas y necróticas), por su estado mitótico (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas etc.) y por su estado de inestabilidad cromosómica (presencia de MNs, BNs, puentes nucleares etc.). Por esta razón es apropiado referirnos a esta técnica

como ensayo MN-citoma con bloqueo de citocinesis (Fenech, 2007). Esta metodología permite entonces diferenciar en las preparaciones la presencia de células binucleadas debido a que no se produce la separación de las dos células hijas y establecer en ellas la cantidad y la frecuencia de MNs (Fenech, 2007).

Además, la aplicación del CBMN posibilita observar efectos citostáticos mediante el registro de la proporción de células mononucleadas, que son aquellas que no se duplicaron durante su tiempo de permanencia en condiciones de cultivo, células trinucleadas, tetranucleadas al igual que células polinucleadas -que se duplicaron dos o más veces-. Por otra parte, la aplicación del CBMN permite reconocer poblaciones celulares que se encuentran en vías de apoptosis y necrosis, así como una amplia gama de lesiones cromosómicas, en particular roturas, reordenamientos cromosómicos, pérdidas de cromosomas y procesos de no disyunción. Los puentes nucleoplásmicos (NPBs de sus siglas en inglés, *nucleoplasmic bridges*) (Figura 7.11) son un biomarcador de la presencia de cromosomas dicéntricos, generados como resultado de fusiones teloméricas o debido a la generación de fallas durante los procesos de reparación de la doble hebra de ADN. Los NPBs se forman cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos son traccionados hacia los polos opuestos de las células hijas durante la anafase celular. La célula atraviesa rápidamente la anafase-telofase, completando finalmente la citocinesis, la cual resulta en la ruptura de los puentes nucleoplásmicos como consecuencia de la separación de las células hijas. Los NPBs pueden visualizarse y registrarse gracias al desarrollo del ensayo de citoma. Al estar inhibida la citocinesis, el puente dicéntrico formado durante la anafase permanece intacto, pudiendo observarse como un fragmento de cromatina continua entre las células binucleadas. El CBMN permite además la detección de brotes nucleares, conocidos también como *buds* nucleares (BNs) que, como se mencionara anteriormente, están relacionados con procesos de amplificación génica nuclear como estimación de procesos de inestabilidad genómica (Fenech, 2007). Un protocolo generalizado de esta metodología puede verse en la Figura 7.11. En cuanto a la incorporación de la citocalasina-B, existen dos métodos para realizarla: el método secuencial y el simultáneo. En el caso del método secuencial, se expone el cultivo celular al xenobiótico en estudio, posteriormente al tratamiento se retira el compuesto del sistema de cultivo y se realiza la incorporación de la citocalasina-B. Este método es empleado en los casos en los cuales se sospeche que la citocalasina-B interfiere con la incorporación de la sustancia a evaluar (como es el caso de la mayoría de los nanomateriales). En el método simultáneo, la citocalasina-B es aplicada al cultivo al mismo tiempo que el xenobiótico bajo estudio. Esta versión del CBMN es la más utilizada comúnmente y demanda una menor cantidad de tiempo de procesamiento (Manshian et al., 2013). Los MNs pueden ser detectados utilizando diferentes tinciones para ADN, como hemos mencionado en el acápite anterior, y su frecuencia puede ser cuantificada de manera directa microscópicamente o de manera indirecta por citometría de flujo (Angel Castañeda, 2012).



Figura 7.11: Protocolo básico mostrando el ensayo del citoma

Un aporte al esclarecimiento del origen de la formación de MNs es el uso de metodologías de inmunodetección usando anticuerpos CREST (de sus siglas en inglés, Calcinosis, Fenómeno de Raynaud, Dismotilidad Esofágica, Esclerodactilia y Telangientasia). Los pacientes con síndrome de CREST producen una clase particular de autoanticuerpos denominados anticuerpos anticentromero (ACA). Estos anticuerpos se caracterizan por reaccionar contra proteínas que conforman el cinetocoro, íntimamente asociado a los centrómeros de los cromosomas del propio individuo, por lo que también reciben el nombre de anticuerpos anticinetocoro (Brenner et al., 1981; Kuramoto et al., 2017; Moroi et al., 1980). Empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta se demostró que ACA presentes en el suero de pacientes con síndrome CREST tienen la capacidad de reconocer y acoplarse a cinetocoros de diversos tipos celulares de mamíferos, dado que su antígeno es un componente nuclear altamente conservado en la escala biológica (Brenner et al., 1981; Moroi et al., 1980). Así, utilizando la tinción con anticuerpos anticinetocoro se puede identificar la presencia o ausencia de centrómeros en los MNs y clasificarlos según el origen del MN en Mn de origen clastógeno y/o aneugénico. Aquéllos MNs que estén formados por uno o más cromosomas serán inmunomarcados con el ACA, poniéndose en evidencia la presencia de centrómeros

dentro del material genético que lo compone. Un MN se clasifica como CREST-positivo cuando se puede observar al menos una marca fluorescente en el mismo, mientras que se clasifica como CREST-negativo cuando no se observa una marca fluorescente dentro de los límites del MN. La visualización de un MN con marcación CREST-positiva revela que el MN estaría compuesto por al menos un cromosoma que mantiene su centrómero y es indicio de que el xenobiótico ha generado un daño en el ADN mediante un efecto aneugénico, mientras que una reacción CREST-negativa indicaría que el MN está conformado por fragmentos cromosómicos que carecen de centrómeros, originados por un efecto clastogénico (González et al., 2011; Miller y Adler, 1990; Olivero, 2008; Parry et al., 2002).

Otra herramienta comúnmente empleada en conjunto con el CBMN que también colabora en la determinación del origen de los MNs es la técnica de hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* es una técnica usada para localizar y detectar secuencias específicas de ARN o ADN tanto en células como en secciones de tejido o en tejidos enteros. El principio básico del método es la unión de una hebra simple de ADN o ARN a su secuencia complementaria en cromosomas en metafase o en núcleos interfásicos. Cuando se desea llevar a cabo la hibridación entre hebras de ADN, estas deben estar en su conformación de hebra simple, por lo tanto, la sonda de ADN y el ADN objetivo deben estar desnaturalizados. Con el fin de detectar la sonda ésta es etiquetada por medio de la incorporación a la misma de radioisótopos o de moléculas no isotópicas (fluorescentes y no fluorescentes), como por ejemplo biotina y fluoresceína, entre otras. Las etiquetas radioisotópicas son observadas por medio de autoradiografías con una película fotográfica específica (*stripping film*) o con una emulsión fotográfica líquida. Las etiquetas no isotópicas son visualizadas por medio de técnicas de histoquímica o inmunohistoquímica (Jensen, 2014).

Existen distintos tipos de hibridación *in situ*: PCR con hibridación *in situ*, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), multicolor FISH e hibridación *in situ* con cromógenos (CISH) (Decorrier y Kirsch-Volders, 2013; Jensen, 2014). A lo largo de las dos últimas décadas la hibridación *in situ* con fluorescencia se ha ido consolidando como una de las técnicas de tinción citoquímicas más empleadas, dada su versatilidad y sensibilidad (Nath y Johnson, 2000). Esta técnica citogenética-molecular emplea sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes, que forman un híbrido con una secuencia complementaria objetivo en el ADN de la muestra en estudio. La señal de la sonda es detectada mediante microscopía de fluorescencia, y para cada muestra de ADN se determina si presenta o carece de dicha señal. Existen 3 tipos de sondas: específicas de un locus, sondas de secuencias repetitivas de ADN (centroméricas y teloméricas) y sondas que marcan cromosomas completos (de pintado cromosómico). Cuando se emplea esta técnica en conjunto con el CBMN, se pueden utilizar sondas centroméricas (que marcan la región del centrómero) para determinar el tipo de efecto ejercido por un mutágeno. Si además se emplean sondas de pintado cromosómico, se puede determinar que cromosoma(s) o fragmentos de cromosomas particulares están involucrados en la formación del MN. Esta técnica presenta alta sensibilidad y especificidad, dado que pone en evidencia la partici-

pación de determinados cromosomas o parte de los mismos en el origen de un MN bajo estudio. Esta última ventaja supera una limitación importante de la citogenética convencional, la necesidad de obtener las células en metafase para realizar un estudio detallado (Decordier y Kirsch-Volders, 2013; Lavaut Sánchez et al., 2016).

Antecedentes del empleo de algunos de los biomarcadores mencionados

En la actualidad, los agroquímicos representan una de las fuentes más importantes de contaminación a nivel mundial. Los avances obtenidos en el área de la Genética Toxicológica han permitido la realización de evaluaciones con el fin de monitorear los efectos inducidos por distintos xenobióticos en los organismos expuestos. Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es y ha sido evaluar la genotoxicidad inducida por distintos principios activos y formulaciones comerciales de agroquímicos empleados comúnmente en el agro argentino en células de vertebrados, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*.

Mediante la metodología del EC se evaluaron los efectos genotóxicos inducidos por el insecticida imazetapir tanto como principio activo (p.a.) como en su formulado comercial Pivot®. Los resultados demostraron su capacidad para inducir rupturas en la cadena de ADN en células CHO-K1 (células provenientes de ovario de hámster chino) luego de la exposición *in vitro* a concentraciones de 0,1 µg/ml (Soloneski et al., 2017). Resultados similares fueron obtenidos en ensayos *in vivo* empleando el formulado comercial Pivot® en células circulantes sanguíneas provenientes de larvas de los anuros nativos *Hypsiboas pulchellus* (Pérez-Iglesias et al., 2015) y *Rhinella arenarum* (Carvalho et al., 2019), evidenciando inducción de daño en el ADN a concentraciones de 0,39 y 7,82 mg/L, respectivamente para cada especie.

Resultados similares fueron obtenidos con el antiparasitario ivermectina y su formulado comercial Ivomec® en células de la línea de mamífero CHO-K1 (Molinari et al., 2012) y la línea celular de insecto *Aedes albopictus* CCL-126™ (Molinari et al., 2010). En ambos estudios se demostró un aumento significativo de rupturas en el ADN luego de la exposición a 50 y a 25-50 µg/ml para las líneas celulares CHO-K1 y CCL-126™, respectivamente.

Cuando se evaluó el herbicida flurocloridona, los resultados obtenidos demostraron que el p.a. y las formulaciones comerciales Twin Pack Gold® y Rainbow® poseen la capacidad de inducir rupturas de cadena simple en el ADN tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos *in vitro* fueron realizados en la línea celular CHO-K1 en concentraciones equivalentes de 1, 5 y 15 µg/ml para flurocloridona, Rainbow® y Twin Pack Gold® (Nikoloff et al., 2014), respectivamente, mientras que en la línea celular HepG2 (células provenientes de hepatocarcinoma humano) en concentraciones de 1 µg/ml tanto para el p.a. como para ambos formulados comerciales (Nikoloff et al., 2014). Los ensayos *in vivo* fueron realizados en estadíos larvales premetamórficos de *R. arenarum* obteniendo resultados positivos con concentraciones equivalentes a 0,71 y 0,74 mg/L de las formulaciones Rainbow® y Twin Pack Gold®, respectivamente (Nikoloff et al., 2014).

La evaluación del fungicida zineb y de su formulación comercial Azzurro® demostró la capacidad de inducir daño genotóxico a concentraciones de 1 y 100 µg/ml tanto para el p.a. como para la formulación comercial, respectivamente empleando como modelo de estudio la línea celular CHO-K1 (Soloneski et al., 2002). Resultados similares fueron obtenidos para los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D contenido en sus respectivas formulaciones Banvel® y DMA® a concentraciones equivalentes a 2 y 50 µg/ml, respectivamente (González et al., 2005; 2007).

Adicionalmente, se demostró la capacidad de inducir daño genotóxico en el ADN de células sanguíneas provenientes de peces ejercido por el herbicida glifosato. Se evaluaron las formulaciones comerciales Panzer® y Credit® *in vivo* en células circulantes sanguíneas de ejemplares adultos del pez nativo *Cnesterodon decemmaculatus* luego de una exposición aguda, obteniéndose resultados positivos a concentraciones de 3,90 y 22,90 mg/L para las formulaciones Panzer® y Credit®, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013). Adicionalmente la formulación Credit® se evaluó en *R. arenarum*, obteniéndose inducción de daño en una concentración equivalente a 3,91 mg/L (Soloneski et al., 2016). Además, en esta misma especie se evaluó el efecto mezclas de glifosato contenido en la formulación Credit® en combinación con el herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel® y de glifosato con el insecticida imazetapir en su formulado comercial Pivot®, observándose resultados positivos a concentraciones de 3,91 + 17,92 mg/L de glifosato y dicamba y de 3,91 + 7,82 mg/L de glifosato e imazetapir (Soloneski et al., 2016).

Asimismo, resultados positivos también fueron observados luego de una exposición aguda (48 y 96 h) en *C. decemmaculatus* mediante la metodología del EC empleando el insecticida organofosforado clorpirifós en sus formulaciones comerciales Lorsban*48E y CPF Zamba® a concentraciones de 0,008 y 0,052 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013). Resultados similares fueron observados en la misma especie con el insecticida pirimicarb en sus formulados Aficida® y Patton Flow® a concentraciones de 25 y 22 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013); y con los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® a concentraciones de 410 y 252 mg/L, respectivamente (Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016). El efecto genotóxico de Banvel® y DMA® también fue evaluado en *C. decemmaculatus* luego de una exposición prolongada, demostrando su capacidad de inducir daño en el ADN a concentraciones de 41 y 25 mg/L (Ruiz de Arcaute et al., 2018). Adicionalmente, el formulado Banvel® fue evaluado en larvas de *R. arenarum* observándose inducción de rupturas de cadena simple a concentraciones de 17,92 mg/L (Soloneski et al., 2016).

Por último, mediante esta metodología se evaluó al insecticida imidacloprid y su formulado comercial Glacoxan Imida® en larvas premetamórficas del anuro *H. pulchellus*, observándose un aumento de daño en el ADN a partir de la concentración equivalente a 15 y 12,5 mg/L para el p.a. y Glacoxan Imida®, respectivamente (Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014).

Nuestro grupo de trabajo, luego de verificar el potencial genotóxico de los pesticidas imazetapir, dicamba y 2,4-D, aplicó la metodología del EC modificado con enzimas de restricción con el objetivo de obtener información adicional e intentar dilucidar el posible mecanismo de acción por

el cual esos compuestos ejercen su efecto e inducen daño en el ADN. Para ello se realizó, luego del período de lisis celular de las muestras sanguíneas, una incubación con dos enzimas de restricción: Endo III y FPG, que empleadas en combinación con el EC permiten revelar la presencia de bases pirimidínicas o purinas oxidadas, respectivamente. Esta evaluación fue realizada *in vitro* empleando el insecticida imazetapir y su formulación comercial Pivot® en células CHO-K1, observándose un aumento de daño en el ADN a concentraciones de 0,1 µg/ml cuando se emplearon las enzimas FPG y Endo III, demostrando que dicho herbicida induce daño por oxidación tanto de bases púricas como de bases pirimidínicas (Soloneski et al., 2017). Este mismo herbicida fue evaluado mediante esta técnica luego de una exposición aguda *in vivo* con concentraciones equivalentes a 0,39 mg/L empleando larvas de la especie *H. pulchellus*, mediante la cual se pudo comprobar que parte de este daño está producido por oxidación de purinas (tratamiento con FPG). Contrariamente, luego del post tratamiento con Endo III no se registró un aumento significativo en los nucleoides dañados, por lo que el insecticida empleado no induciría la oxidación de bases pirimidínicas (Pérez-Iglesias et al., 2017).

Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizó la evaluación de los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4-D contenidos en sus formulados comerciales Banvel® y DMA® empleando el poecílido *C. decemmaculatus*. Las concentraciones evaluadas fueron 410 y 252 mg/L de Banvel® y DMA®, respectivamente y los resultados demostraron que parte de este daño estaría producido por oxidación de purinas, que fue evidenciado luego del post tratamiento con FPG (Ruiz de Arcaute et al., 2019). Por otro lado, luego del tratamiento con la enzima Endo III, no se observó un aumento significativo de daño, por lo que estos herbicidas no inducirían daño a través de la oxidación de pirimidinas, al menos en la especie evaluada.

Cuando se empleó el ensayo de MNs para evaluar los efectos mutagénicos inducidos por distintos xenobióticos se reportaron diversos resultados. La inducción de MNs fue observada empleando el herbicida dicamba y su formulado comercial Banvel® en células CHO-K1 en concentraciones de 50 µg/ml (González et al., 2011) e *in vivo* en *C. decemmaculatus* expuestos a concentraciones de 1229 mg/L al formulado comercial Banvel® (Ruiz de Arcaute et al., 2014). Cuando se evaluó el herbicida flurocloridona y sus formulaciones comerciales Rainbow® y Twin Pack Gold® *in vitro* en células CHO-K1 sólo se observó inducción de MNs con la concentración de 5 µg/ml de la formulación Twin Pack Gold®. Dicho aumento de la presencia de MNs no fue observada luego de la exposición a flurocloridona ni a su formulado comercial Rainbow® (Nikoloff et al., 2014). Resultados similares fueron observados empleando el mismo herbicida y formulaciones comerciales en la línea celular HepG2, en la cual sólo se observó inducción de MNs luego de la exposición a 5 µg/ml de la formulación Twin Pack Gold® (Nikoloff et al., 2014). La capacidad de inducir MNs de las formulaciones Rainbow® y Twin Pack Gold® fue evaluada *in vivo* en larvas de *R. arenarum* luego de una exposición de 48 y 96 h, observándose resultados positivos luego de la exposición a 0,71 mg/L de Rainbow® no así luego de la exposición a Twin Pack Gold®.

Adicionalmente se observó inducción de MNs por el herbicida carbofurán y su formulación comercial Furadan® en sistemas *in vitro* empleando la línea celular CHO-K1 a concentraciones equivalentes a 10 y 50 µg/ml para el p.a. y el formulado comercial, respectivamente (Soloneski

et al., 2008). Por otra parte, la capacidad de inducir MNs fue analizada utilizando el fungicida zineb y su formulación comercial Azzurro[®] en linfocitos humanos *in vitro*, observándose inducción significativa de MNs a concentraciones de 25 µg/ml para ambos compuestos (Soloneski et al., 2002). Cuando se evaluó el herbicida S-metolaclo y su formulación comercial Twin Pack Gold[®] en la línea celular HepG2 se observó un aumento significativo en la inducción de MNs únicamente cuando se evaluó el formulado comercial a una concentración de 0,5 µg/ml. Tal incremento no fue observado cuando se evaluó el principio activo S-metolaclo (Nikoloff et al., 2013).

Resultados positivos empleando el Ensayo de MNs luego de una exposición aguda en el pez *C. decemmaculatus* fueron observados empleando el herbicida glifosato en sus formulaciones comerciales Panzer[®] y Credit[®] a concentraciones de 3,90 y 22,90 mg/L, respectivamente (Vera-Candioti et al., 2013); con el insecticida clorpirifós en sus formulados Lorsban*48E[®] y CPF Zamba[®] a concentraciones de 0,008 y 0,052 mg/L (Vera-Candioti et al., 2014); con el insecticida pirimicarb en su formulado Aficida[®] y Patton Flow[®] a concentraciones de 80 y 22 mg/L (Vera-Candioti et al., 2010; 2013) y con el herbicida auxínico 2,4-D en su formulado comercial DMA[®] en la concentración equivalente a 252 mg/L (Ruiz de Arcaute et al., 2016). Adicionalmente, cuando este ensayo se empleó utilizando como matriz biótica al anuro *H. pulchellus*, se observaron resultados positivos en inducción de MNs con el insecticida imidacloprid y su formulación comercial Glacoxan Imida[®] a concentraciones de 15 y 25 mg/L, respectivamente (Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014); con el insecticida pirimicarb en su formulado Aficida[®] a concentraciones de 19,51 mg/L y con el herbicida imazetapir en su formulado comercial Pivot H[®] a concentraciones de 0,39 mg/L, evidenciando su capacidad genotóxica (Pérez-Iglesias et al., 2015).

Adicionalmente se evaluaron otras anomalías nucleares además de los MNs tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Estos estudios demostraron la capacidad de inducir daño genético *in vitro* del herbicida flurocloridona y su formulación comercial Twin Pack Gold[®] en concentraciones de 1 y 5 µg/ml, respectivamente, en la línea celular CHO-K1 (Nikoloff et al., 2014). Contrariamente, el formulado basado en flurocloridona Rainbow[®] no fue capaz de inducir anomalías nucleares en la concentración más alta ensayada de 15 µg/ml. Las formulaciones Rainbow[®] y Twin Pack Gold[®] también fueron evaluadas en eritrocitos circulantes del anuro *R. arenarum*, las cuales no aumentaron la incidencia de anomalías nucleares en las concentraciones ensayadas (Nikoloff et al., 2014).

Cuando se evaluó la capacidad de inducir anomalías nucleares de los herbicidas dicamba y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel[®] y DMA[®] en *C. decemmaculatus* se obtuvieron aumentos significativos de la incidencia de anomalías nucleares en las concentraciones 410 y 504 mg/L de dicamba y 2,4-D, respectivamente (Ruiz de Arcaute et al., 2014; 2016).

Por último, se evaluó la inducción de anomalías nucleares de distintos pesticidas *in vivo* en el anuro *H. pulchellus*. El herbicida imidacloprid fue capaz de ejercer un aumento significativo en la frecuencia de anomalías nucleares en la concentración de 15 mg/L, no así su formulado comercial Glacoxan Imida[®] a concentraciones de 12,5 mg/L (Pérez-Iglesias et

al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014). Resultados positivos fueron observados con los insecticidas pirimicarb, en su formulado comercial Aficida® e imazetapir en su formulado Pivot H®, en las concentraciones equivalentes a 19,51 y 0,39 mg/L, respectivamente (Natale et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2015).

Finalmente, de estos estudios se desprende el hecho que un único bioensayo no resulta suficiente como indicador para caracterizar la genotoxicidad de un xenobiótico determinado. Es necesario tanto el empleo de distintos biomarcadores específicos de respuesta temprana como la evaluación teniendo en cuenta diferentes niveles de organización biológica. Estas herramientas nos permiten resolver problemáticas ambientales actuales, tal como la contaminación por el uso indiscriminado de plaguicidas, con la finalidad de intervenir oportunamente antes de que se produzca un daño irreversible. En adición, es importante destacar que nuestros estudios tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* han demostrado los riesgos potenciales a los cuales los organismos se ven sometidos por la exposición a formulaciones comerciales de agroquímicos. Asimismo, demuestran que en muchos de los casos, las formulaciones comerciales de los plaguicidas resultan ser mucho más perjudiciales que el compuesto activo en sí mismo, poniendo en evidencia la presencia de componentes potencialmente genotóxicos y/o citotóxicos dentro de los agentes empleados como aditivos que forman parte del producto comercial los cuales deben ser conjuntamente evaluados.

Bibliografía

- Ames, B. N.; Durston, W. E.; Yamasaki, E. y Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 2281-2285.
- Ames, B. N.; Gurney, E. G.; Miller, J. A. y Bartsch, H. (1972). Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69, 3128-3132.
- Ateeq, B.; Abul Farah, M.; Niamat Ali, M. y Ahmad, W. (2002). Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518, 135-144.
- Azqueta, A. y Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87, 949-968.
- Azqueta, A. y Collins, A. R. (2014). The comet assay: High throughput use of FPG. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 199-217). New York: Springer.
- Azqueta, A.; Costa-Amaral, I. C. y Collins, A. R. (2017). High-throughput measurement of DNA breaks and oxidised bases with the comet assay. En A. Anderson y A. Dhawan, *The Comet Assay in Toxicology* (pp. 67-92). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Brenner, S.; Pepper, D.; Berns, M. W.; Tan, E. y Brinkley, B. R. (1981). Kinetochore structure, duplication, and distribution in mammalian cells: Analysis by human autoantibodies from scleroderma patients. *Journal of Cell Biology*, 91, 95-102.
- Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L. y Mayers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2123-2136.
- Carvalho, W. F.; Ruiz de Arcaute, C.; Pérez-Iglesias, J. M.; Laborde, M. R. R.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28, 367-377.
- Çavaş, T. (2017). The use of fish as model aquatic organisms in genotoxicity studies. Non-traditional aquatic models. En M. Larramendy, *Ecotoxicology and Genotoxicology* (pp. 245-277). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Çavaş, T. y Ergene-Gözükara, S. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 81-91.
- Çavaş, T. y Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22, 263-268.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261.
- Collins, A. R.; Dusinská, M.; Gedik, C. M. y Stetina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104, 465-469.
- Collins, A. R.; Oscoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C. y Stetina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143-151.
- Chen, T.; Guo, X. y Moore, M. M. (2014). The mouse lymphoma assay. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 115-141). New York: Springer.
- Christofolletti, C. A.; David, J. A. y Fontanetti, C. S. (2009). Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 155-158.
- Decordier, I. y Kirsch-Volders, M. (2013). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for the micronucleus test. En A. B. Dhawan, M. *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 237-244). Totowa: Humana Press.
- Dogan, D. y Can, C. (2011). Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 951-995.
- Elhajouji, A. y Lukamowicz-Rajska, M. (2013). Flow cytometric determination of micronucleus frequency. En A. B. Dhawan, M. *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 123-146). Totowa: Humana Press.

- Evans, H. J.; Nearya, G. J. y Williamson, F. S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology*, 1, 216-229.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2, 1084-1104.
- Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A. T.; Surrallés, J.; Crott, J. W.; Parry, J.; Norppa, H.; Eastmond, D. A.; Tucker, J. D. y Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26, 125-132.
- Fenech, M. y Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147, 29-36.
- Fernandes, T. C. C.; Mazzeo, D. E. y Marin-Morales, M. (2007). Mechanism of micronuclei formation in poliploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicida. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 252-259.
- Gagné, F.; Lacaze, É.; Bony, S. y Devaux, A. (2014). Genotoxicity. En F. Gagné, *Biochemical Ecotoxicology* (pp. 171-196). London: Elsevier.
- Gökalp Muranlı, F. D. y Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research*, 726, 104-108.
- González, M.; Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. (2005). Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology In Vitro*, 19, 289-297.
- González, N. V.; Nikoloff, N.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2011). A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. *Toxicology Letters*, 207, 204-212.
- González, N. V.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2007). The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel® induce genotoxicity and cytotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research*, 634, 60-68.
- Guimarães, A. P. A.; Guimarães, A. C.; Alcarânta, D. A.; Raimundo Cunha, L.; Lima, P. L.; Vasconcellos, M. C.; Montenegro, R. C.; Soares, B. M.; Amorim, M. M. y Burbano, R. R. (2014). Chromosomal aberration test utilities *in vitro* and *in vivo*. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA repair* (pp. 115-141). New York: Springer.
- Jensen, E. (2014). Technical review: *In situ* hybridization. *Anatomical Record*, 297, 1349-1353.
- Koernicke, M. (1904). Über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Keimung und das Wachstum. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 22, 148-155.
- Kuramoto, N.; Ohmura, K.; Ikari, K.; Yano, K.; Furu, M.; Yamakawa, N.; Hashimoto, M.; Ito, H.; Fujii, T.; Murakami, K.; Nakashima, R.; Imura, Y.; Yukawa, N.; Yoshifuji, H.; Taniguchi, A.; Momohara, S.; Yamanaka, H.; Matsuda, F.; Mimori, T. y Terao, C. (2017). Anti-centromere

- antibody exhibits specific distribution levels among anti-nuclear antibodies and may characterize a distinct subset in rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*, 7: 6911, 1-8
- Kushwaha, S.; Vikram, A.; Trivedi, P. P. y Jena, G. B. (2011). Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research*, 726, 242-250.
- Lacadena, J. R. (1996). *Citogenética*. Madrid, España: Editorial Complutense. 931 pág.
- Lavaut Sánchez, K.; Hernández Aguilar, N. y Ruiz Moleón, V. (2016). Hibridación *in situ* fluorescente: herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32, 99-109.
- Lloyd, M. y Kidd, D. (2012). The mouse lymphoma assay. En J. Parry y E. Parry, *Genetic Toxicology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 35-54). New York: Springer.
- Manshian, B. B.; Singh, N. y Doak, S. H. (2013). The *in vitro* micronucleus assay and kinetochore staining: Methodology and criteria for the accurate assessment of genotoxicity and cytotoxicity. En A. B. Dhawan, *Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 269-289). Totowa: Humana Press.
- Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J. L. y Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research*, 758, 41-47.
- Miller, B. M. y Adler, I. D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, 5, 411-415.
- Mitelman, F. (1995). *ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature (1995): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Memphis, Tennessee, USA: Karger Medical and Scientific Publishers.
- Mohamed, S.; Sabita, U.; Rajendra, S. V. y Raman, D. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, 1, 1-6.
- Molinari, G.; Kujawski, M.; Scuto, A.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2012). DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1260-1267.
- Molinari, G.; Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. (2010). Genotoxic and cytotoxic *in vitro* evaluation of ivermectin and its formulation ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CCL-126™) cells. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92, 1577-1593.
- Mondal, M. y Guo, J. (2017). Comet-FISH for ultrasensitive strand-specific detection of DNA damage in single cells. *Methods in Enzymology*, 591, 83-95.
- Moroi, Y.; Peebles, C.; Fritzler, M. J.; Steigerwald, J. y Tan, E. M. (1980). Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 1627-1631.
- Mortelmans, K. y Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 20, 29-60.
- Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (2006). *Genética Toxicológica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial De los Cuatro Vientos. 672 pág.

- Mustafa, S. A.; Kariab, S. S.; Davies, S. J. y Jha, A. N. (2015). Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis*, 30, 107-116.
- Natale, G.; Vera-Candioti, J.; Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S.; Larramendy, M. y Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Dumeril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 471-479.
- Nath, J. y Johnson, K. L. (2000). A review of fluorescence *in situ* hybridization (FISH): Current status and future prospects. *Biotechnic & Histochemistry*, 75, 54-78.
- Nikoloff, N.; Escobar, L.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 777-781.
- Nikoloff, N.; Larramendy, M. y Soloneski, S. (2014). Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 233-241.
- Nikoloff, N.; Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (2014). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus and comet assay for evaluation of fluorochloridone-induced genotoxicity. *Environmental Toxicology*, 29, 884-892.
- Nikoloff, N.; Natale, G. S.; Marino, D.; Soloneski, S. y Larramendy, M. (2014). Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 275-281.
- OECD (1997). OECD Guideline 476 for the testing of chemicals. 1-10.
- Olive, D.; Flamm, W. G.; Machesko, M. R. y Bernheim, N. J. (1972). A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutation Research*, 16, 77-87.
- Olivero, O. A. (2008). Relevance of experimental models for investigation of genotoxicity induced by antiretroviral therapy during human pregnancy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658, 184-190.
- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Pérez-Iglesias, J. M.; Ruiz de Arcaute, C.; Natale, G. S., S E y Larramendy, M. L. (2017). Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 503-508.
- Pérez-Iglesias, J. M.; Ruiz de Arcaute, C.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G. S. y Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 120-126.

- Pérez-Iglesias, J. M.; Soloneski, S.; Nikoloff, N.; Natale, S. y Larramendy, M. L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 15-24.
- Perthes, G. (1904). Versuche über den Einfluß der Röntgenstrahlen und Radiumstrahlen auf die Zellteilung. *Deut Med Wochenschr*, 30, 632-634.
- Pillco, A. y de la Peña, E. (2014). Ames test (bacterial reverse mutation test): Why, when, and how to use. En L. M. Sierra y I. Gaivão, *Genotoxicity and DNA Repair* (pp. 3-23). New York: Springer.
- Pitarque, M.; Vaglenov, A.; Nosko, M.; Hirvonen, A.; Norppa, H.; Creus, A. y Marcos, R. (1999). Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research*, 441, 115-127.
- Repetto Jiménez, M. y Reppeto Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos. 675 pág.
- Ruiz de Arcaute, C.; Larramendy, M. L. y Soloneski, S. (2018). Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces:Poeciliidae). *Environmental Pollution*, 243, 670-678.
- Ruiz de Arcaute, C.; Ossana, N. A.; Pérez-Iglesias, J. M.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2019). Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 20485-20498.
- Ruiz de Arcaute, C.; Pérez-Iglesias, J. M.; Nikoloff, N.; Natale, G. S.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators*, 45, 632-639.
- Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2016). Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 222-229.
- Ruiz de Arcaute, C.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-metoxibenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutation Research*, 773, 1-8.
- Seriani, R.; Abessa, D. M. S.; Kirschbaum, A. A.; Pereira, C. D. S.; Ranzani-Paiva, M. J. T.; Assunção, A.; Silveira, F. L.; Romano, P. y Mucci, J. L. N. (2012). Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7, 67-72.
- Shimizu, N.; Itoh, N.; Utiyama, H. y Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140, 1307-1320.
- Singh, N. P. (1996). Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. En G. P. Pfeifer, *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations* (pp. 3-24). New York: Plenum Press.

- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Soloneski, S.; González, M.; Piaggio, E.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. L. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, Azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research*, 514, 201-212.
- Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2017). The use of the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the genotoxic evaluation of environmental pollutants. En M. L. Larramendy, *Ecotoxicology and genotoxicology - Non-traditional Aquatic Models* (pp. 327-346). London: The Royal Society of Chemistry.
- Soloneski, S.; Reigosa, M. A. y Larramendy, M. L. (2002). Effects of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, Azzurro. II. Micronucleus induction in immunophenotyped human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 57-62.
- Soloneski, S.; Reigosa, M. A.; Molinari, G.; González, N. V. y Larramendy, M. L. (2008). Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and Furadan® on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells. *Mutation Research*, 656, 68-73.
- Soloneski, S.; Ruiz de Arcaute, C. y Larramendy, M. L. (2016). Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 17811-17821.
- Soloneski, S.; Ruiz de Arcaute, C.; Nikoloff, N. y Larramendy, M. L. (2017). Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 10292-10300.
- Sorensen, K. C.; Stucki, J. W.; Wagner, E. D.; Wagner, E. D. y Plewa, M. J. (2005). Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 174-181.
- Strunjak-Perovic, I.; Coz-Rakovac, R.; Topic Popovic, N. y Jadan, M. (2009). Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 287-291.
- Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Vera-Candiotti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2010). Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutation Research*, 703, 180-186.
- Vera-Candiotti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 166-173.

- Vera-Candiotti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Toxicology and Industrial Health*, 11, 1051-1060.
- Vera-Candiotti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2013). Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 368-373.
- Vera-Candiotti, J.; Soloneski, S. y Larramendy, M. L. (2014). Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environmental Toxicology*, 29, 1390-1398.
- Walia, G. K.; Handa, D.; Kaur, H. y Kalotra, R. (2013). Erythrocyte abnormalities in a freshwater fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 287-295.
- Watson y Crick (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737-738.
- Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28, 227-236.