

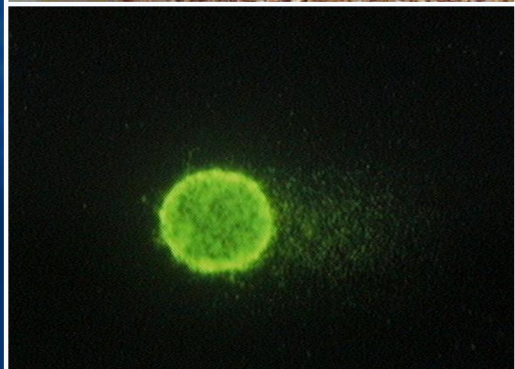


Journal of Basic & Applied Genetics (Formerly MENDELIANA)

JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS
REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA

Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX

Included in **SciELO**



CO
A
B

ÍNDICE

4 - 16

ESTRUCTURA GENÉTICO-ISONÍMICA DEL NOROESTE ARGENTINO

José E. Dipierri, Emma L. Alfaro, Graciela Bailliet, Claudio Bravi, María E. Albeck, Marina Muzzio, Virginia Ramallo, Josefina María Brenda Motti

17 - 23

CYTOLOGICAL AND CYTOGENETIC EFFECTS INDUCED BY THIABENDAZOLE ON *ALLIUM CEPA* ROOT MERISTEMS

Andrioli Nancy B., Mudry Marta D.

24 - 32

SENSIBILIDAD DE DISTINTAS LÍNEAS MURINAS A LA CICLOFOSFAMIDA MEDIDA A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA

Daniel Francisco Arencibia-Arreola, Luis Alfredo Rosario-Fernández, Yolanda Emilia Suárez-Fernández

33 - 41

IN VITRO APPROACH TO THE STUDY OF CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF X-RAYS

Ponzinibbio M.V., Peral-García P., Seoane A.

42 - 55

ASSOCIATION PATTERN OF RECIPROCAL TRANSLOCATIONS INDUCED BY CHEMICALS AND IONIZING RADIATION IN MOUSE GERM CELLS: A COMPARISON BETWEEN SINGLE AND COMBINED TREATMENTS.

J.C. De Luca, E. Ortiz-Jaureguizar, P. Posadas

56 - 63

DIURNAL CORTISOL SLOPE IN GIRLS AND ADOLESCENTS WITH DIAGNOSIS OF TURNER SYNDROME

López, M.C., Aguilar, M.J., Zabaleta, V., Bakker, L.

64 - 71

¿ES VARIABLE LA RESPUESTA DE *Zinnia peruviana* AL DRENAJE DEFICIENTE? POLIMORFISMOS POBLACIONALES EN *Zinnia peruviana*

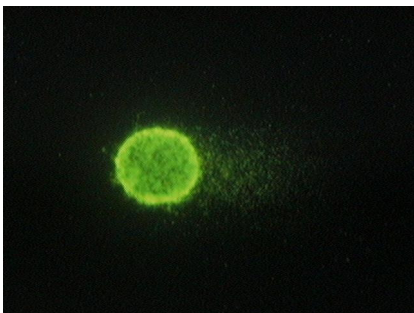
Fatta N.A., Vassallo S.A.

FOTOGRAFÍAS Y AUTORES



Ratón con crías
Autor: María Inés Oyarzabal

Los artículos que conforman este fascículo fueron aceptados para publicación durante la gestión editorial de la Dra Lidia Vidal Rioja, excepto por uno de ellos, que fue aceptado durante la gestión del Dr. Jorge Cladera. La Comisión Directiva de la SAG agradece a ambos la tarea realizada.



Ensayo Cometa en células irradiadas de hámster
Autor: M.V. Ponzinibbio



Zinnia peruviana
Autor: Nora Fatta



ESTRUCTURA GENÉTICO-ISONÍMICA DEL NOROESTE ARGENTINO

José E. Dipierri, Emma L. Alfaro, Graciela Bailliet, Claudio Bravi, Maria E. Albeck, Marina Muzzio, Virginia Ramallo, Josefina María Brenda Motti

Instituto de Biología de la Altura. Universidad Nacional de Jujuy.
Laboratorio de Genética Molecular Poblacional, IMBICE, CCT CONICET La Plata.
Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Jujuy. CONICET
Avda. Bolivia 1661. (4600) San Salvador de Jujuy

dipierri@inbial.unju.edu.ar
jedipierri49@yahoo.com

ABSTRACT

From a collaborative effort of several institutions and researchers the aim of this work was to further studies on the population structure of Northwest Argentina (NWA) using both the analysis of the distribution and frequency of surnames by the isonymic method and genetic markers. To this end, blood markers (ABO, HLA), Y chromosome, mtDNA and total genomic analysis were used, allelic and haplogroup frequencies were determined, intra- and interpopulation genetic diversity was analyzed and dendrograms were constructed. To assess NWA miscegenation, which started in the second half of the XVII century, rates were calculated using as a reference allele frequencies of (European, Amerindian and African) parental populations. Surnames are suitable material for analyzing the structure of populations in terms of consanguinity and kinship and their ethnic origin. This paper analyzes the inbreeding coefficient by random isonymy, isonymic distances calculated as from the identity of surnames and the richness or abundance of surnames that can weigh genetic drift by isonymy. The genetic structure of NWA population shown by isonymy was that it is characterized by low interpopulation differentiation at large urban center level, isolation by distance with a large genetic differentiation among departmental subpopulations, high consanguinity level in isolated departments that are not part of the capital cities in the region, and varying degrees of miscegenation according to the markers considered, but which generally revealed a predominant Amerindian contribution followed by European and African participation. These results are consistent with the demographic attributes, historical background of settlement in the region and geographical particularities of the NWA, which would lead to conclude that the population structure of the NWA would be determined by the migration status and relative isolation of its populations.

Key words: molecular markers, population structure, Northwest Argentina

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de la estructura poblacional del NOA recurriendo al análisis de la distribución y frecuencia de apellidos por el método isonímico y a la utilización de marcadores genéticos a partir de un esfuerzo colaborativo de varias instituciones e investigadores. Para ello se utilizaron marcadores sanguíneos (ABO, HLA), cromosoma Y, ADNmt y análisis genómico total y se determinaron frecuencias alélicas y de haplogrupos, se analizó la diversidad genética intra e interpoblacional y se construyeron dendrogramas. Para evaluar el mestizaje en el NOA iniciado en la segunda mitad del siglo XVII se calcularon porcentajes de miscegenación usando como referencia frecuencias alélicas de las poblaciones parentales (europea, amerindia y africana), familias lingüísticas y poblaciones amerindias. Los apellidos constituyen un material adecuado para analizar la estructura de las poblaciones en términos de consanguinidad y parentesco y el origen étnico de las mismas. En este trabajo se analiza el coeficiente de consanguinidad por isonimia al azar, las distancias isonímicas calculadas a partir de la identidad de apellidos y la riqueza o abundancia de apellidos que permite ponderar la deriva génica por isonimia.

La estructura genético-isonímica del NOA se caracterizaría por una escasa diferenciación interpoblacional a nivel de los grandes centros urbanos, aislamiento por distancia, con una gran diferenciación genética entre sus subpoblaciones departamentales, alta consanguinidad en los departamentos más aislados no integrantes de las ciudades capitales de provincia y grados variables de miscegenación de acuerdo a los marcadores considerados pero que en general revelan una contribución amerindia preponderante, seguida por la europea y africana. Estos resultados son coherentes con los atributos demográficos, los antecedentes históricos del poblamiento de la región y las particularidades geográficas del NOA, lo que permitiría concluir que la estructura poblacional del NOA se encontraría determinada por la condición migratoria y el aislamiento relativo de sus poblaciones.

Palabras clave: apellidos, marcadores moleculares, estructura de población, NOA

LAS ESTRUCTURAS DE POBLACIÓN

Los estudios de población convocan la atención de muchas disciplinas (demografía, economía, sociología, genética, etc.) lo que convierte a la población, por estar asociada y existir en marcos espacio-temporales concretos, en un objeto de estudio interdisciplinario. Cada disciplina puede delinear correctamente niveles de población o estructuras dentro de las poblaciones. Éstas pueden ser tan inclusivas como la población mundial o tan limitada como la familia (Macbeth y Collison, 2002). En 1972 Harrison y Boyce describen los patrones de agrupamiento jerárquico observados dentro de las poblaciones subdivididas como estructuras, biológicas y/o culturales. En algunas disciplinas, la configuración de este patrón resulta fácil de delimitar. Demográficamente o geográficamente el patrón puede ser desplegado desde el hogar al país, pasando por la ciudad, los departamentos, las provincias o sus equivalentes administrativos. Genéticamente, una población puede ser subdividida en subpoblaciones y éstas en demes; socialmente, desde la familia a la comunidad, al grupo étnico o idiomático, etc.

Sin embargo, el concepto de estructura de población es utilizado de manera imprecisa porque el mismo difiere de acuerdo a cada enfoque disciplinario (Castro de Guerra, 1987). En demografía se refiere a la composición por sexo y edad, junto a la consideración de la frecuencia de nacimientos, muertes y migraciones sucedidas en un período de tiempo determinado. En genética poblacional este concepto tiene varias acepciones. Para Vogel y Motulsky (1982) la estructura genética de una población se refiere a la composición genética de la misma, en términos de la distribución de alelos y genotipos, por los efectos combinados de la mutación, selección, migración y deriva génica. Yasuda y Morton (1967) definen la estructura genética como la totalidad de las desviaciones de la panmixia y la misma resultaría de los efectos de la consanguinidad, migración, apareamiento direccional, deriva génica y tomaría en cuenta además el tamaño y distribución de las poblaciones subdivididas (Lasker y Mascie-Taylor, 1993).

Desde la perspectiva disciplinar, el estudio de la estructura poblacional podría parecer en todo momento operativo. Las poblaciones se abordarían desde el punto de vista de cada disciplina, sus méto-

dos y supuestos teóricos. Sin embargo, este enfoque clásico resulta en cierta forma limitante. A menos que el objetivo de estos estudios sea meramente descriptivo, las diferentes estructuras de población no deberían considerarse aisladamente, sino en forma conjunta intentando comprender sus interrelaciones (Castro de Guerra, 1987). La complejidad de la población como objeto de estudio justifica aún más la interdisciplinariedad de su abordaje, la necesidad de un enfoque global que incluya junto a la consideración de los factores disciplinares específicos, otros provenientes de disciplinas relacionadas. Este enfoque sistémico debería contribuir a integrar las múltiples interrelaciones entre los diversos fenómenos (demográfico, social, biológico, económico, etc.) que caracterizan a las poblaciones humanas.

LA REGIÓN NOA

Los conceptos de espacio, territorio y región se encuentran estrechamente interrelacionados; abarcan muchas disciplinas y no han alcanzado aún consenso teórico y metodológico (Ortega Valcarcel, 2000). El término región es utilizado en una variedad de formas para denotar el compartimiento de un espacio de significancia formal, funcional o perceptiva.

Uno de los modelos aplicados al análisis de la dinámica económica del espacio territorial es el de centro-periferia, aplicado en la mayoría de los países en vías de desarrollo. Según este modelo, la transformación económica se organiza sobre la base de una estructura polarizada, en donde las regiones son subsistemas, relacionados entre sí jerárquicamente, al sistema nación (Hilhorst, 1971). A partir de este modelo se deducen dos tipos de regionalización, la polarizada y la homogénea. El modelo de regiones polarizadas fue aplicado a 6 provincias del Noroeste Argentino (NOA) por el CFI (1963) para determinar las regiones económicas de Argentina (Hilhorst, 1971). Los espacios geoeconómicos definidos a partir del concepto de región polarizada están ligados al de región natural o región geográfica, un espacio del territorio diferenciado o delimitado, continuo y homogéneo (Ortega Valcárcel, 2000). La región se comportaría como una unidad estructurada que le otorga singularidad e individualidad (Boisier, 1992).

No existe consenso sobre las provincias que integran el NOA. Mientras algunos autores (Pontussi, 1995) coinciden con la clasificación del CFI (1963), otros (Boleda, 1993; Boleda, 1998; Bolsi y Pucci, 1997) incluyen a La Rioja porque pese a sus diferencias, las seis provincias mantienen una homogeneidad demográfica que justifica su inclusión en un conjunto espacial supraprovincial. Además de las características económicas (CFI, 1963; Hilhorst, 1971) y demográficas (Boleda, 1993; Boleda, 1998; Bolsi y Pucci, 1997), los antecedentes históricos (Bazán, 1986), etnohistóricos (Lorandi y Otonello, 1992) y culturales (Ruiz, 1993) contribuyen también a la singularidad del NOA como región. Biogeográficamente el NOA integra la Región Neotropical y dentro de ésta comparte los Dominios Amazónico (Provincia Yungas), Chaqueño (Provincias Prepuneña y Chaqueña) y Andino-Patagónico (Provincias Altoandina y Puneña) (Cabrera y Willink, 1973).

Las poblaciones nativas del NOA se adscriben a las Áreas Culturales Chaco Austral y Noroeste (macro Área Andina) (Hernández, 1992), esta última la más importante del país y con mayor trascendencia en el desarrollo de la población actual del NOA por su importancia numérica en tiempos prehispánicos y por su permanencia debida a la resistencia que ofrecieron al proceso de desnaturalización iniciado con la conquista (Hernández, 1992; Pucci, 1998). Basándose en el momento de ingreso de las poblaciones alóctonas continentales y extracontinentales se puede dividir el poblamiento del NOA en tres fases: a) precolonial, con una profundidad temporal de al menos 9200±600 BP por datación del sitio de Inca Cueva (Jujuy) (Aschero, 1980); b) colonial, marcada por el ingreso de población europea a partir de 1542 y africana durante el siglo XVIII. El Censo Virreinal de 1778 da cuenta de la composición étnica del NOA en este momento del poblamiento (Tabla I); c) formación del estado nacional caracterizado por el ingreso masivo (1857-1926) de migrantes europeos y de otros continentes que se distribuyen heterogéneamente en el NOA, concentrándose en Tucumán y capitales provinciales.

A partir de un esfuerzo colaborativo de varias instituciones e investigadores se ha podido profundizar el análisis de la estructura poblacional del NOA iniciado en los 90 (Dipierrri y Alfaro, 1994) recurriendo al análisis de la distribución y frecuencia de apellidos por el método isonímico y a la uti-

lización de marcadores genéticos. Este trabajo se propone revisar los principales resultados obtenidos con estas investigaciones.

Provincias	Categorías étnicas censales					
	Blancos		Naturales		Negros y Mestizos	
	N	%	N	%	N	%
Jujuy	653	5	11181	82	1785	13
Salta	3190	28	3070	26	5305	46
Tucumán	3166	16	4069	20	12869	64
Sgo. Estero	2247	14	4867	32	8312	54
Catamarca	4590	30	2817	18	7908	52
La Rioja	2617	27	5200	53	1906	20
Total	16463		31204		38085	

Fuente: Comadrán Ruiz, 1969

Tabla I. Composición étnica de la población del noroeste argentino según el censo de Carlos III de 1778.

LOS GENES DEL NOA

En el caso de los marcadores genéticos los datos son representativos de poblaciones urbanas y las muestras de sangre fueron proporcionadas por donantes de sangre y de órganos en hospitales públicos del NOA. Se utilizaron marcadores sanguíneos (ABO, HLA) (Morales *et al.*, 2000; Alfaro *et al.*, 2004; 2005), ADNmt (Dipierrri *et al.*, 1998; Tamm *et al.*, 2007; Bravi, 2005), cromosoma Y (Dipierrri *et al.*, 1998; Muzzio *et al.*, 2010; Muzzio, 2010; Bailliet *et al.*, 2005; Ramallo *et al.*, 2005; 2009) y análisis genómico total (678 microsatélites autosómicos y 29 ligados al X) (Wang *et al.*, 2008). Más detalles de la metodología utilizada para la determinación de los mismos puede consultarse en la bibliografía consignada previamente.

Se determinaron frecuencias alélicas y de haplogrupos, se analizó la diversidad genética intra e interpoblacional y se construyeron dendrogramas. Para evaluar el creciente mestizaje en el NOA iniciado en la segunda mitad del siglo XVII se calcularon porcentajes de miscegenación usando como referencia frecuencias alélicas de las poblaciones parentales (europea, amerindia y africana), familias lingüísticas y poblaciones amerindias (Wang *et al.*, 2008).

Referente al sistema ABO, estudiado en 95.562

individuos (2.7% población del NOA), el alelo más frecuente en todas las provincias fue el 0. El alelo A presenta una frecuencia superior al 15% en Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja, mientras que el B es mayoritario en Tucumán y Santiago del Estero (Tabla II) (Morales *et al.*, 2000). La baja frecuencia continental de A y B en centro y suramerindios apoya la hipótesis de que estos grupos étnicos precolombinos eran portadores solo del alelo 0 y que los alelos A y B podrían haber sido introducidos por las poblaciones autóctonas o resultar de una fuerte selección y/o pérdida por deriva (Dipierri *et al.*, 1999). La tipificación en momias de alelos A sugiere que las poblaciones suramerindias precolombinas portaban este alelo y quizás el B, pero en muy baja frecuencia. Sin embargo, estos hallazgos en momias son muy controvertidos (Salzano y Callegari Jacques, 1988; Llop y Rothhammer, 1988).

El sistema ABO (Tabla II) indicaría una baja diversidad genética interpoblacional entre las poblaciones urbanas capitalinas del NOA ya que el 99.9% de la variación encontrada resulta de diferencias intrapoblacionales (Morales *et al.*, 2000). Con el sistema HLA puede también observarse una remarcable homogeneidad genética entre las provincias del NOA y una estructura genética similar con un exceso de heterocigosis (Alfaro *et al.*, 2005). En cuanto a la variabilidad alélica del sistema HLA las poblaciones urbanas del NOA, al igual que otras poblaciones amerindias, se caracterizan por un limitado número de alelos, más notorio en el locus A que en el B (Salzano y Callegari Jacques, 1988). En efecto, solo 4 alelos del locus A (A2, A24, A28, A31) se presentan en el 60% del total de individuos analizados en el NOA, y ellos son marcadores típicamente amerindios (Rothhammer *et al.*, 1997) (Tabla II). En el locus B la misma proporción está representada por 6 especificidades, B5, B62, B60, B51, B44 y B7, de las cuales las 4 primeras se encuentran frecuentemente en Amerindios (Alfaro *et al.*, 2004; 2005). La introgresión de genes de población africana ha sido demostrada para la provincia de Jujuy con los haplogrupos del sistema GM, cuyas frecuencias se distribuyen de forma inversa a la altura geográfica (Dipierri *et al.*, 2000).

Los haplogrupos del cromosoma Y muestran mayor diversidad étnica interpoblacional (Tabla II). Mientras que en Salta y Jujuy el haplogrupo predo-

minante es el Q1a3a (Bailliet *et al.*, 2009), linaje mayoritario entre nativos americanos, en Tucumán y Catamarca el haplogrupo más frecuente es el R originario de Europa. En estas dos provincias el haplogrupo DE, frecuente en población africana, alcanza su máximo valor (Tabla II) (Muzzio *et al.*, 2010, Muzio, 2010; Bailliet *et al.*, 2005; Ramallo *et al.*, 2005; 2009). Por el contrario con el ADNmt solo se identificaron 4 haplogrupos presentes en todas las poblaciones americanas y compartidos con poblaciones del este y centro de Asia, lo que indica la pobre diversidad filética de linajes maternos en el NOA semejante a la encontrada en el resto de América (Tabla II) (Bravi, 2005).

El análisis de agrupamiento de las 6 provincias de NOA utilizando los marcadores sanguíneos (Fig. 1A) o combinados con los linajes maternos y paternos para 4 provincias (Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca) (Fig. 1B) indica relaciones biológicas semejantes. Se identifican dos grandes agrupamientos, por un lado Jujuy y Salta, por otro Santiago del Estero junto a Catamarca y La Rioja, quedando Tucumán en una posición intermedia. Este agrupamiento reflejaría la localización diferencial de las poblaciones autóctonas extracontinentales y la mayor integración cultural de Salta y Jujuy al mundo andino.

Si bien se observan diferencias entre los porcentajes de aportes continente-específicos de origen africano, europeo y americano al genoma del NOA calculados con los marcadores genéticos de la Tabla III y el análisis genómico total, todos los marcadores indican la misma tendencia caracterizada por un predominio promedio del tronco parental amerindio (43.2%), seguido por el europeo (38%) y el africano (13.3%). Con el análisis genómico total puede apreciarse la afinidad biológica diferencial de Salta, Tucumán y Catamarca con las poblaciones parentales (Fig. 2) y con los grandes troncos lingüísticos (Fig. 3) y poblaciones nativas americanas (Tabla IV). El análisis genómico total también permite evidenciar una contribución sexual diferencial al proceso de mestizaje del NOA. En efecto las proporciones de ancestros africanos y amerindios en las provincias de Tucumán y Catamarca calculadas con los microsatélites del X son mayores que las estimadas con los marcadores autosómicos, situación que se acompaña de una reducción concomitante de los ancestros europeos. Este patrón es consistente con

un mestizaje caracterizado predominantemente por la unión de hombres europeos con mujeres autóctonas. Este sesgo sexual en la mezcla europea-nativa ha sido comprobado con los polimorfismo del Y en

población jujeña (Dipierri *et al.*, 1998) y múltiples poblaciones mestizas latinoamericanas (Wang *et al.*, 2008).

Frecuencias	Jujuy	Salta	Tucumán	S. Estero	Catamarca	La Rioja
Sistema ABO ¹						
A	0.080	0.090	0.180	0.170	0.180	0.160
B	0.030	0.030	0.060	0.070	0.050	0.050
O	0.890	0.880	0.760	0.760	0.770	0.790
Sistema HLA ²						
A1	0.068	0.075	0.098	0.070	0.072	0.068
A11	0.037	0.038	0.043	0.055	0.064	0.030
A2	0.380	0.337	0.261	0.206	0.301	0.231
A23	0.026	0.015	0.016	0.007	0.008	0.007
A24	0.129	0.078	0.105	0.101	0.098	0.108
A25	0.009	0.019	0.022	0.022	0.008	0.011
A26	0.039	0.032	0.058	0.040	0.040	0.049
A28	0.111	0.136	0.099	0.097	0.094	0.137
A29	0.026	0.049	0.075	0.032	0.028	0.052
A3	0.024	0.051	0.057	0.077	0.056	0.068
A30	0.041	0.029	0.045	0.047	0.060	0.037
A31	0.117	0.119	0.088	0.158	0.133	0.150
A32	0.026	0.019	0.038	0.029	0.012	0.018
A33	0.006	0.017	0.013	0.018	0.012	0.011
A34	0.002	0.004	0.001	0.007	0.016	0.007
A36	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004
A43	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
A66	0.000	0.000	0.001	0.004	0.000	0.000
Ax	0.060	0.067	0.043	0.093	0.081	0.076
B13	0.009	0.013	0.016	0.012	0.015	0.011
B14	0.024	0.023	0.044	0.036	0.026	0.058
B17	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
B18	0.066	0.015	0.058	0.044	0.033	0.043
B27	0.009	0.023	0.019	0.016	0.015	0.011
B35	0.289	0.211	0.210	0.203	0.181	0.145
B37	0.004	0.008	0.004	0.004	0.011	0.000
B38	0.026	0.053	0.040	0.036	0.037	0.032
B39	0.045	0.040	0.045	0.048	0.080	0.085
B41	0.017	0.025	0.023	0.012	0.007	0.014
B42	0.000	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004
B44	0.060	0.073	0.122	0.068	0.084	0.101
B45	0.000	0.004	0.004	0.024	0.015	0.022
B46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B47	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000
B48	0.000	0.002	0.001	0.004	0.000	0.004
B49	0.022	0.032	0.034	0.043	0.030	0.036
B50	0.006	0.021	0.021	0.012	0.011	0.014
B51	0.066	0.069	0.054	0.068	0.088	0.058
B52	0.013	0.006	0.013	0.012	0.007	0.018
B53	0.000	0.002	0.000	0.036	0.015	0.036
B55	0.004	0.013	0.004	0.000	0.007	0.007
B56	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
B57	0.007	0.010	0.019	0.056	0.026	0.025
B58	0.007	0.004	0.007	0.012	0.000	0.004
B60	0.070	0.062	0.043	0.072	0.056	0.043
B61	0.047	0.042	0.028	0.012	0.033	0.014
B62	0.084	0.091	0.035	0.044	0.045	0.043
B63	0.020	0.013	0.010	0.028	0.030	0.025
B64	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
B7	0.057	0.058	0.075	0.048	0.041	0.036
B70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022
B8	0.041	0.040	0.063	0.048	0.045	0.074
Bx	0.068	0.087	0.044	0.060	0.068	0.074
Haplogrupos Y ^{3,4,5,6,7}						
F	0.046	0.064	0.294	-	0.145	-
K	0.186	0.021	0.000	-	0.013	-
DE	0.023	0.085	0.118	-	0.105	-
P	0.000	0.085	0.059	-	0.039	-
R	0.279	0.234	0.411	-	0.447	-
Q	0.395	0.403	0.118	-	0.092	-
NC	0.071	0.108	0.000	-	0.159	-
Haplogrupos ADNmt ^{7,8,9}						
A	0.158	0.222	0.333	-	0.240	-
B	0.579	0.389	0.111	-	0.040	-
C	0.158	0.278	0.556	-	0.240	-
D	0.105	0.111	0.000	-	0.480	-

Fuentes: ¹Morales *et al.*, 2000; ²Alfaro *et al.*, 2004; ³Muzzio *et al.*, 2010; ⁴Muzzio, 2010; ⁵Bailliet *et al.*, (2005); ⁶Ramallo *et al.*, (2005; 2009); ⁷Dipierri *et al.*, 1998; ⁸Tamm *et al.*, 2007; ⁹Bravi, 2005.

Tabla II. Frecuencias alélicas y de haplogrupos en provincias del NOA

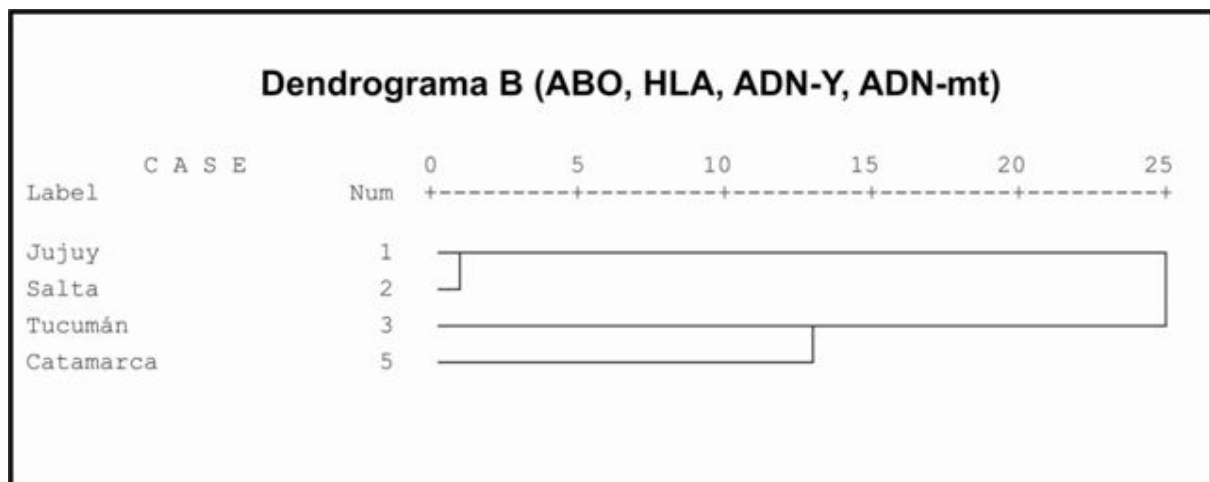
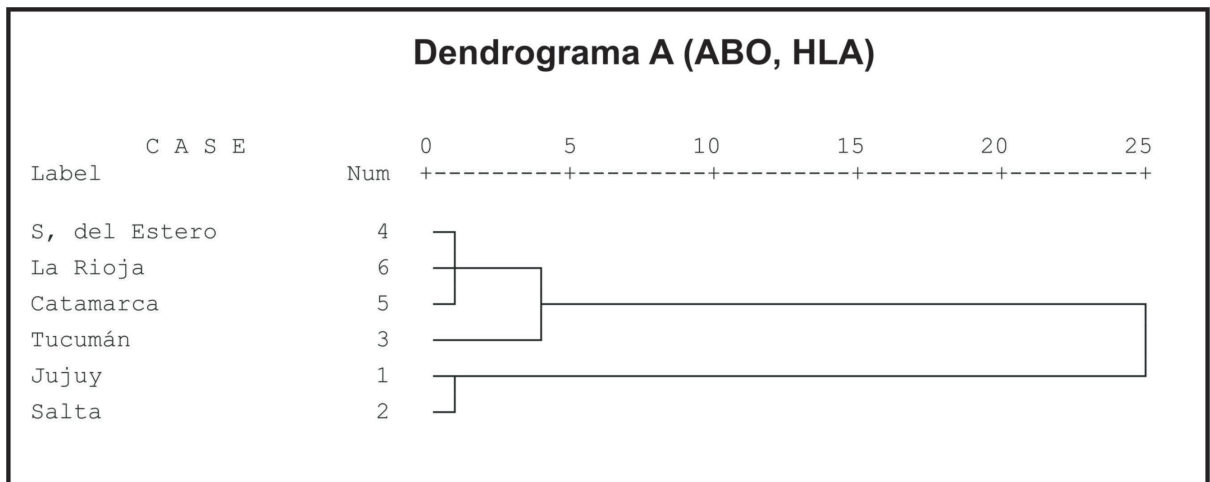
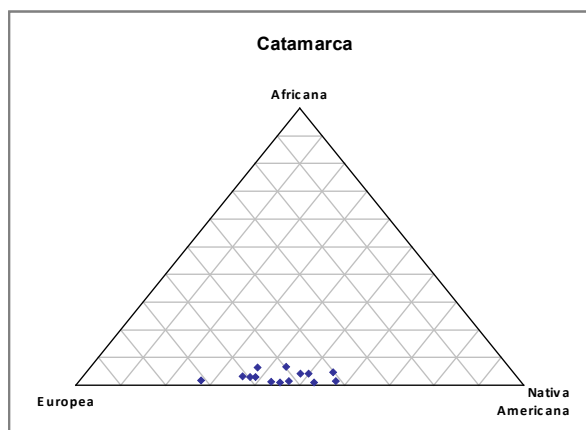
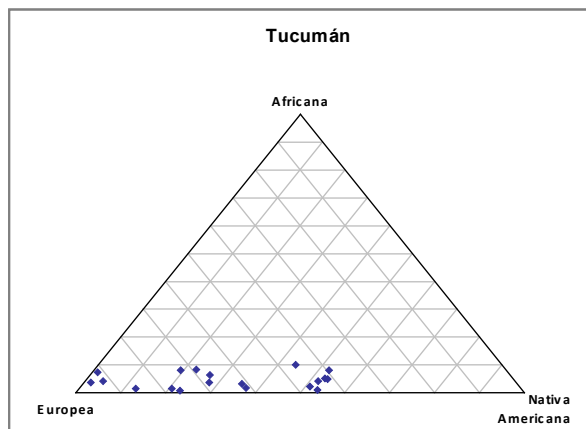
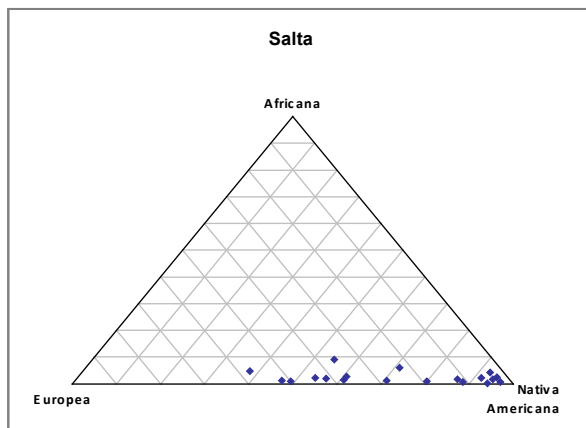


Figura 1. Distancias genéticas entre las provincias del NOA calculadas a partir de frecuencias alélicas y de haplogrupos de la Tabla I.

Provincias	Poblaciones Parentales											
	Amerindia				Europea				Africana			
	ABO	HLA	A	X	ABO	HLA	A	X	ABO	HLA	A	X
Jujuy	71	53			15	46.9			14	0.1		
Salta	67	41.4	71.9	62.7	23	55.5	25.2	26.4	10	3.1	3	10.9
Tucumán	28	24.2	30.5	44.7	46	66.9	64.6	39.5	26	8.9	4.9	15.8
S. del Estero	30	30.4			39	46			31	23.6		
La Rioja	40	31			49	50.3			11	10.1		
Catamarca	32	37	43.7	64.3	48	52.9	53.2	23.8	20	18.7	3	2
NOA	45	35.1			34	55.3			21	9.6		
Variación	28-71				15-49				2-31			
Promedio	43.2				38				13.3			

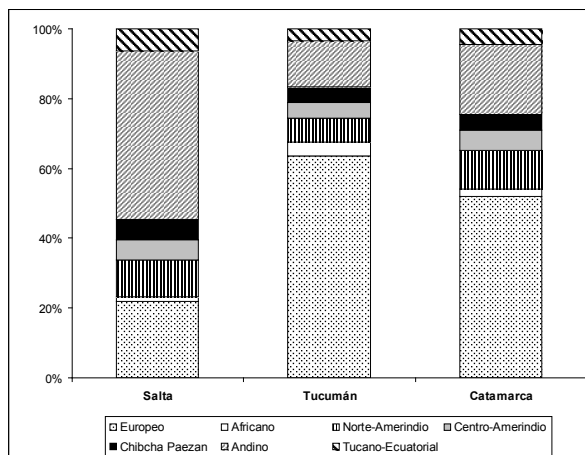
A (Autosomicos); X (Ligados al X)

Tabla III. Porcentajes de mezcla genética por sistemas genéticos y poblaciones parentales en provincias del NOA



Fuentes: Wang et al., 2009

Figura 2. Distribución del mestizaje por individuos de Salta, Tucumán y Catamarca. La posición de cada punto en el triángulo indica la proporción de ancestría africana, europea y nativa americana



Fuentes: Wang et al., 2009

Figura 3. Ancestría promedio de Salta, Tucumán y Catamarca estimada con respecto a grandes troncos lingüísticos nativos americanos (se incluyen los componentes europeo y africano)

Población	Salta	Tucumán	Catamarca
Europea	0,232	0,649	0,537
Africana	0,004	0,024	0,005
Pima	0,016	0,017	0,050
Mixtec	0,018	0,027	0,013
Zapoteca	0,036	0,015	0,030
Mixe	0,007	0,010	0,016
Maya	0,033	0,013	0,012
Kaqchikel	0,013	0,012	0,010
Guaymi	0,004	0,007	0,007
Cabecar	0,003	0,007	0,011
Embera	0,012	0,005	0,009
Waunana	0,018	0,012	0,010
Zenu	0,008	0,005	0,005
Arhuaco	0,006	0,004	0,005
Kogi	0,006	0,008	0,004
Inga	0,022	0,009	0,010
Quechua	0,152	0,047	0,124
Aymara	0,313	0,023	0,041
Huilliche	0,021	0,030	0,018
Wayuu	0,012	0,009	0,014
Piapoco	0,016	0,014	0,012
Ticuna (Arara)	0,012	0,010	0,007
Ticuna (Tarapaca)	0,004	0,005	0,005
Karitiana	0,008	0,003	0,005
Surui	0,005	0,006	0,007
Guaraní	0,006	0,004	0,003
Aché	0,009	0,023	0,022
Kaingang	0,004	0,003	0,005

Tabla IV: Ancestría promedio de Salta, Tucumán y Catamarca con respecto a poblaciones nativas americanas consideradas individualmente (se incluyen los componentes europeo y africano)

LOS APELLIDOS DEL NOA

Los apellidos constituyen un material adecuado para analizar la estructura de las poblaciones en términos de consanguinidad y parentesco y el origen étnico de las mismas. Crow y Mange (1965) sentaron las bases de esta metodología al proponer el coeficiente de consanguinidad por isonimia (F). Posteriormente se desarrollaron otros indicadores: coeficiente de parentesco por isonimia (Lasker, 1977), distancias isonímicas (Lasker, Nei, Euclídea) calculadas a partir de la identidad de apellidos y α de Fisher o riqueza o abundancia de apellidos que permite ponderar la deriva génica por isonimia. Esta metodología fue aplicada para analizar la estructura genética por isonimia de la Argentina (Dipierri *et al.*, 2005a) y del NOA (Dipierri *et al.*, 2007) y sus resultados pueden consultarse en:

http://web.unife.it/progetti/genetica/pdata/Isonymy_Argentina.txt

Los apellidos analizados provinieron de 2.576.548 individuos incluidos en los Padrones Electorales (2001) de los 117 Departamentos que integran el NOA. La consanguinidad por isonimia y α se correlacionan negativamente (Dipierri, 2004) por consiguiente valores elevados de consanguinidad y concomitantemente bajos de α indican que la población es endogámica, se encuentra conformada por pocos apellidos diferentes con una elevada frecuencia y que sobre ella se ha producido un fuerte efecto de deriva. La provincia más consanguínea y con menor riqueza de apellidos es La Rioja (Tabla V). Los valores más altos de consanguinidad se observaron en departamentos de la zona andina y los más bajos, como era de esperar, en las capitales provinciales (Fig. 4). La consanguinidad promedio de los 117 departamentos del NOA (0.284 ± 0.2) duplica al de Argentina (0.135 ± 0.143) y también el promedio departamental de todas las provincias del NOA, excepto Tucumán, situación que se interpreta como el mayor aislamiento relativo de tipo geográfico particularmente de La Rioja y Catamarca (Tabla 5). El α promedio del NOA (130.9 ± 79.8) es inferior al de toda la Argentina (602), al promedio provincial (422) y departamental (358) (Dipierri *et al.*, 2003). Esto estaría indicando que en las provincias del NOA existiría una menor heterogeneidad o riqueza de apellidos con respecto al resto de país, riqueza que oscila entre un α de 17 (Susques y Anto-

fagasta de la Sierra) y 374 (Capital, Tucumán).

La variación de las frecuencias de apellidos entre departamentos de una provincia o microdiferenciación interpoblacional puede ser ponderada por el indicador F_{ST} propuesto por Relethford (1988). La provincia con mayor microdiferenciación fue Catamarca (0.0369323), seguida por La Rioja (0.0322842), Salta (0,0022710), Jujuy (0,0020552), Santiago del Estero (0,0018646) y Tucumán (0,0010821). Catamarca y La Rioja son las que presentan, coincidentemente, la consanguinidad y el α departamental promedio más alto y más bajo del NOA respectivamente.

La correlación positiva de las distancias genéticas por isonimia con las geográficas entre los 117 departamentos del NOA corresponde al modelo de aislamiento por distancia de Malécot (1948), por lo que la diferenciación genética entre las poblaciones de la región a nivel departamental se produciría por la exogamia de individuos entre poblaciones vecinas a través de migraciones de corta distancia (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). Las distancias genéticas por isonimia permiten diferenciar en el espacio del NOA 10 conglomerados coincidentes con la subdivisión geográfica de la región y con el heterogéneo desarrollo socioeconómico y de las comunicaciones viales registradas en el área.

Estos resultados indican que grandes porciones del territorio regional, especialmente de los subconjuntos departamentales más aislados, no relacionados con las capitales provinciales ni con las ciudades secundarias; concentrarían las poblaciones más consanguíneas y con menor diversidad de apellidos (Dipierri, 2004) (Fig. 4).

Utilizando los apellidos como discriminante étnico es posible examinar la etnogénesis de las poblaciones y en este sentido los apellidos del NOA se muestran muy efectivos para analizar la contribución de las poblaciones parentales a la población actual y su distribución espacial. Observando el origen étnico de los 7 apellidos más frecuentes a nivel provincial, todos son patronímicos de origen español excepto el apellido Mamaní en la Provincia de Jujuy. Los apellidos autóctonos (Erdman, 1964), entre los 7 más frecuentes, se presentan en muchos departamentos de las provincias de Jujuy y Salta y sólo en uno o dos departamentos de las provincias de Catamarca y Tucumán, no observándose ni en La Rioja ni en Santiago del Estero. Los 100 apellidos

más frecuentes de Argentina son todos patronímicos españoles, en cambio en el NOA entre los 100 más frecuentes los apellidos autóctonos Mamani y Tola ocupan el puesto 22 y 78 con 14395 y 6076 individuos respectivamente (Dipierri, 2004). La distribución de los apellidos por su origen lingüístico y/o geográfico es coherente con la información etnohistórica relativa a la contribución del indigenado en la conformación de las poblaciones del NOA y al proceso de desestructuración diferencial a la que fueran sometidas las poblaciones nativas a partir del siglo XVI (Lorandi y Otonello, 1992). En la Fig. 5 puede observarse el porcentaje de individuos de Salta y Jujuy de acuerdo al origen autóctono o foráneo de los apellidos, y dentro de los foráneos de acuerdo a su origen geográfico. En ambas provincias predominan los individuos portadores de apellidos foráneos y dentro de éstos de aquellos provenientes de sur de Europa (Albeck *et al.*, 2007; 2010; Alfaro *et al.*, 2005). No obstante, esta distribución es coherente con la proporcionada por los datos demográficos (Tabla I) y genéticos (Tablas II y IV, Figs. 2 y 3).

Dado que la transmisión de los apellidos responden al mismo tipo de herencia que los genes, se pueden establecer una asociación entre ambos linajes. En la provincia de Jujuy se analizó la relación entre los alelos del sistema ABO y la clasificación de los individuos de acuerdo al origen de los apellidos (autóctonos y foráneos) por regiones geográficas distribuidas en un gradiente altitudinal. En todos los niveles de altura la frecuencia del alelo 0 fue mayor en los individuos con apellidos autóctonos y la de los alelos A y B entre los individuos con apellidos foráneos (Dipierri *et al.*, 1999). La misma relación pudo establecerse con los alelos D/d del sistema Rh. El alelo d fue más frecuente en apellidos foráneos y en las tierras bajas, hallazgo que coincide con el hecho de que de acuerdo a Cavalli-Sforza *et al.* (1994), el haplotipo cde del sistema Rh constituye un excelente indicador de introgresión de genes caucásicos (Morales *et al.*, 2003). Dipierri *et al.* (1998) utilizando los marcadores holándricos α , DYS199, DYS19, YAP y pSRY analizaron la correlación entre estos polimorfismos y los apellidos de los individuos de poblaciones jujeñas situadas a diferentes niveles altitudinales, observando que el haplotipo α II-DYS199*T-DYS19*A, específico de amerindios (Bianchi *et al.*, 1998), se encontraba presente en el 35.5% y el 16.7% de los individuos con ape-

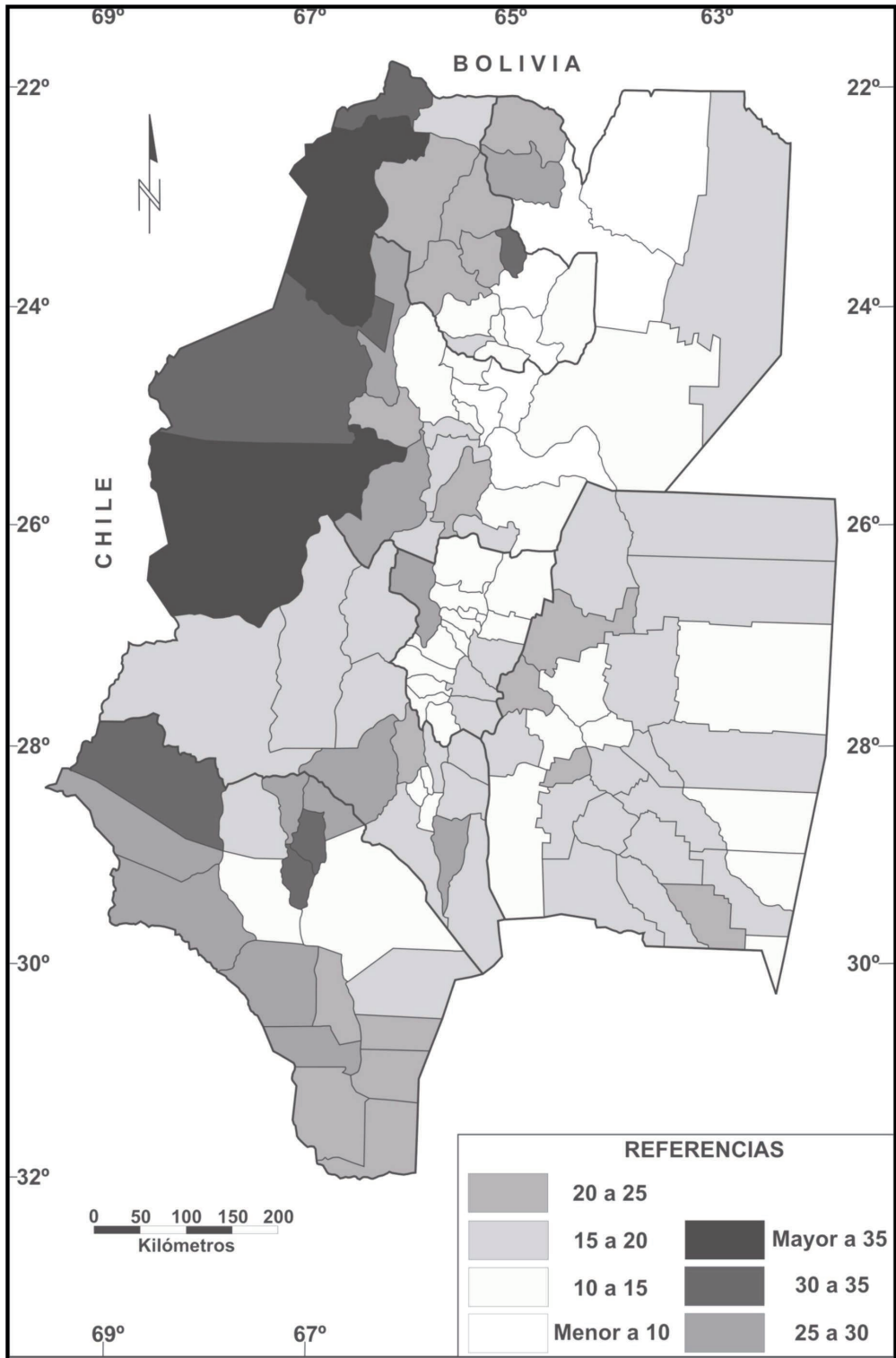
lidos autóctonos y foráneos respectivamente. Una correlación opuesta se observó con los haplotipos no amerindios, europeos específicamente (Bianchi *et al.*, 1998). Este trabajo demostró una introgresión de patrilineajes (haplotipos del cromosoma Y) españoles inversamente proporcional a la altura geográfica y la presencia exclusiva de haplotipos mitocondriales amerindios en todos los niveles altitudinales, lo que demuestra un apareamiento paterno direccional en las poblaciones de la Quebrada de Humahuaca. Muzzio (2010) al analizar en varias poblaciones del NOA la relación entre apellidos y haplogrupos del cromosoma Y determina que el “riesgo” relativo de un individuo con un apellido americano para presentar un haplogrupo nativo americano es 3 veces mayor que la probabilidad de que un individuo extranjero presente un haplogrupo foráneo.

Provincia	Toda la provincia		Promedio departamental	
	Φ_{ii} (x100)	α	Φ_{ii} (x100)	α
Tucumán	0.093±0.0003	269	0.160±0.097	193.2±79.
S. del Estero	0.122±0.0500	204	0.235±0.073	117.4±41.6
Salta	0.074±0.0003	334	0.265±0.182	149.0±98.2
Catamarca	0.106±0.0010	235	0.327±0.311	108.9±50.2
Jujuy	0.092 ±0.0010	273	0.368±0.367	143.2±107.9
La Rioja	0.134±0.0010	186	0.385±0.137	77.8±41.4

Tabla V: Consanguinidad por isonimia (Φ_{ii}) y riqueza de apellidos (α) por provincias y departamentos del NOA

CONCLUSIONES

Las poblaciones humanas conforman distintas estructuras parcialmente flexibles, lábiles e interdependientes. El análisis de la interrelación entre estas estructuras jerárquicas en el NOA, en este caso genética e isonímica, permitió profundizar no solamente su conocimiento, sino también la dinámica poblacional y microevolución de esta particular región geográfica argentina. La estructura genético-isonímica del NOA se caracterizaría por una escasa diferenciación genética interpoblacional a nivel de los grandes centros urbanos, aislamiento por distancia, con una gran diferenciación genética entre sus subpoblaciones departamentales, alta consanguinidad en los departamentos más aislados no integrantes de las ciudades capitales de provincia y grados variables de miscigenación de acuerdo a los mar-



Fuente: Dipierri, 2004

Figura IV: Distribución de la consanguinidad por isonimia ($\sum ii \times 100$) por departamentos del NOA

cadoreos considerados pero que en general revelan una contribución amerindia preponderante, seguida por la europea y africana. Las estructuras genética e isonímica son coherentes con los atributos demográficos, los antecedentes históricos del poblamiento de la región y las particularidades geográficas del NOA. Esta coherencia permitiría concluir que la estructura poblacional del NOA se encontraría determinada por la condición migratoria y el aislamiento relativo de sus poblaciones (Dipierri *et al.*, 2005b).

BIBLIOGRAFÍA

- Albeck M.E., Alfaro E.L., Dipierri J.E. (2007) Apellidos y estructura Sociodemográfica: cambio y continuidad en Casabindo (siglo XVII al XX). En: Boleda M, Mercado MC (Compiladores). Seminario Internacional de Población y Sociedad en América Latina (SEPOSAL), 8-10 Junio, Tomo I, pp. 332-346.
- Albeck M.E., Alfaro E.L., Dipierri J.E. (2010) Origen, diversidad y frecuencia de los apellidos en Salta (República Argentina). Manuscrito.
- Alfaro E., Dipierri J., Gutiérrez N., Vullo C (2004). Frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en el Noroeste Argentino. *Antropo* 6:15-23.
- Alfaro E.L., Albeck M.E., Dipierri J.E. (2005). Apellidos en Casabindo entre los siglos XVII y XX. Continuidades y cambio. *Andes* 16: 147-166.
- Alfaro E.L., Dipierri J.E., Gutiérrez N.J., Vullo C.M. (2005) Genetic structure and admixture in urban populations of the Argentina North-West. *Ann Hum Biol* 32(6):724-737.
- Aschero C. (1980) Comentarios acerca de un fechado radiocarbónico del sitio de Inca Cueva IV (Dpto. de Humahuaca-Jujuy) RSAA Tomo XIV.
- Bailliet G., Ramallo V., Alfaro E.L., Dipierri J.E., Bianchi N.O. (2005) Caracterización de linajes paternos en muestras provenientes de tres provincias del NOA. BAG (Actas del XXXIV Congreso Argentino de Genética), XVII:181.
- Bailliet G., Ramallo V., Muzzio M., García A., Santos M.R., Alfaro E.L., Dipierri J.E., Salceda S., Carnese F.R., Bravi C.M., Bianchi N.O., Demarchi D.A. (2009) Brief communication: Restricted geographic distribution for Y-Q* paragrupo in South America. *Am J Phys Anthropol* 140(3):578-582.
- Bazán A.R. (1986) La Historia del Noroeste Argentino. Editorial Plus Ultra. Bs.As. Argentina.
- Bianchi N.O., Catanesi, C.I., Bailliet, G., Martinez-Magnac V.L., Bravi C.M., Vidal-Rioja L.B., Herrera R.J., Lopez-Camelo J. (1998) Characterisation of ancestral and derive Y-chromosome haplotypes of New World Native Populations. *Am J Hum Genet* 63:1862-1871.
- Boisier S. (1992) El difícil arte de hacer región. Centro de Estudios Regionales Andino Bartolomé de las Casas. Cuzco, Perú.
- Boleda M. (1993) La población del Noroeste Argentino. Historia y actualidad. Legasa. Buenos Aires.
- Boleda M. (1998) Ciudades del Noroeste Argentino. Alianza Editorial, Buenos Aires.
- Bolsi A.S., Pucci R (1997) Problemas poblacionales del Noroeste Argentino. Instituto de Estudios Geográficos. Facultad de Filosofía y Letras. Junta de Andalucía. Universidad Nacional de Tucumán.
- Bravi C.M. (2005) Análisis de linajes maternos en poblaciones nativas americanas. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Cabrera A.L., Willink A (1973) Biogeografía de América Latina. Monografía N° 13. OEA.
- Castro de Guerra D. (1987) Uso de apellidos para determinar estructura de población en pueblos negros de la costa norcentral de Venezuela. Tesis de Grado Magister Scientiarum en Biología. Centro de Estudios Avanzados. IVIC, Caracas.
- Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P. y Piazza A. (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, New Jersey.
- C.F.I. (Consejo Federal de Inversiones) (1963) Relevamiento de la estructura económica de la Argentina. Centro de Investigaciones Torcuato di Tella. Buenos Aires.
- Comadrán Ruiz (1969) Evolución demográfica durante el periodo hispano (1535-1810). EUDEBA. Buenos Aires.

- Crow J.E., Mange A.P. (1965) Measurements of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surnames. *Eugenic Quarterly* 12:190-203
- Dipierri J.E. (2004) Apellidos del Noroeste Argentino: Distribución, Isonimia, Estructura y Dinámica Poblacional. Tesis de Maestría. Maestría en Teoría y Metodología de las Ciencias Sociales. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Jujuy.
- Dipierri J.E., Alfaro E., Dugoujon J.M., Constans J. (2000) GM and KM inmunoglobulin allotypes and other serum genetic markers (Hp, Gc, Pi and Tf) among South American living at different altitudes (Jujuy Province, Argentina): Admixtures estimates. *Hum Biol* 72(2):305-319.
- Dipierri J.E., Alfaro E., Martinez Marignac V., Bailliet G., Bravi C., Cejas S., Bianchi N.O. (1998) Paternal directional matting in two Amerindian subpopulations located at different altitudes in Northwest Argentina. *Hum Biol* 70(6):1000-1010.
- Dipierri J.E., Alfaro E.L., Scapoli C., Mamolini E., Rodríguez Larralde A., Barraí I. (2005a) Surnames in Argentina: A population study through isonymy. *Am J Phys Anthropol* 128(1):199-299.
- Dipierri J.E., Alfaro E., Bejarano, I.F. (1999) Surnames, ABO system and miscegenation in highland populations of Province of Jujuy (Northwest Argentine). *Homo* 50(1):14-20.
- Dipierri J.E., Rodríguez Larralde A., Alfaro E.L., Andrade A., Chaves E., Barraí I. (2005b). Distribución de apellidos y migración en el noroeste argentino. *Antropo* 10:35-50.
- Dipierri J.E., Rodríguez Larralde A., Alfaro E.L., Barraí I. (2007) Isonymic structure of the Argentine Northwest. *Ann Hum Biol* 34(4):498-503.
- Dipierri, J.E., Alfaro E. (1994) Aspectos genéticos y bioantropológicos de las poblaciones nativas del Noroeste de la República Argentina. *Mendeliana (Suplemento) XI (1):12-15*
- Erdman L.E. (1964) Patronimia del Noroeste Argentino. *Rev. Instituto de Antropología (Universidad Nacional de Córdoba)*, Tomo III:121-134.
- Harrison G.A., Boyce AJ (1972) The structure of human populations. Clarendon Press Oxford.
- Hernández I. (1992) Los indios de la Argentina. Colecciones Mapfre 1492, Madrid.
- Hilhorst J.G.M. (1971) Planeamento regional. Enfoque sobre sistemas. Biblioteca de Ciências Sociais. Zahar Editores. Río de Janeiro. Brasil.
- Lasker G.W. (1977) A coefficient of relationship by isonymy: a method for estimating the genetic relationship between populations. *Hum Biol* 49:489-493.
- Lasker G.W., Mascie-Taylor CGN (1993) Research strategies in human biology: field and survey studies. Cambridge University Press.
- Llop E., Rothhammer F. (1988) A note on presence of blood groups A and B in Pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol* 75:107-111.
- Lorandi A.M., Otonello M. (1992) Argentina: completando la historia. *Ciencia e Investigación*. Tomo 45 (2):84-99.
- Macbeth H., Collison P. (2002) Human Populations Dynamics. Cross-Disciplinary Perspectives. Cambridge University Press.
- Malécot G. (1948) Les mathématiques de l'Hérédité. Paris. Masson.
- Martinez-Marignac V., Bailliet G., Dipierri J.E., Alfaro E., López-Camelo J.S. y Bianchi N.O. (2001) Variabilidad y antigüedad de linajes holándricos en poblaciones Jujeñas. *Rev. Arg. Antrop. Biol.* 3(1): 49-63.
- Morales J., Alfaro E., Dipierri J., Bejrano I. (2003). Apellidos y sistema Rh (D/d) en poblaciones jujeñas. *Rev Arg Antrop Biol* 5(2):7-13.
- Morales J., Dipierri J.E., Alfaro E., Bejarano I.F. (2000) Distribution of the ABO system in the Argentine Northwest: Miscegenation and genetic diversity. *Interciencia* 25(9):432-435.
- Muzzio M. (2010) Isonimia y cromosoma Y: ¿concordancia o conflicto?. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Museos. UNLP.

- Muzzio M., Ramallo V., Bailliet G. (2010) Comparación de apellidos y linajes de cromosoma Y en 4 provincias del NOA. Manuscrito.
- Ortega Valcarcel J. (2000) Los horizontes de la geografía. Teoría de la geografía. Editorial Ariel S.A. Barcelona, España.
- Pontussi E.P. (1995) Geografía del Noroeste Argentino. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta.
- Pucci R. (1998) El tamaño de la población aborigen del Tucumán en la época de la conquista: balance de un problema y propuesta de una estimación. *Población y Sociedad* N° 5: 239-270.
- Ramallo V., Alfaro E.L., Dipierri J.E., Bianchi N.O., Bailliet G. (2005) Linajes holandricos en tres provincias del NOA. *Rev Arg Antrop Biol* 7(1):65.
- Ramallo V., Mucci J.M., García A., Muzzio M., Motti J.M.B., Santos M.R., Pérez M.E., Alfaro E.L., Dipierri J.E., Demarchi D.A., Bravi C.M., Bailliet G. (2009) Comparison of Y chromosome haplogroup frequencies in 8 Provinces from Argentina. *For Sci Inter: Genetics Supplement Series*, 2(1):431-432.
- Relethford J.H. (1988) Estimation of kinship and genetic distance from surnames. *Hum Biol* 60:475-492.
- Rothhammer S., Silva S.M., Callegari Jacques S., Llop E., Salzano F.M. (1997) Gradients of HLA diversity in South America Indians. *Ann Hum Biol* 24:197-208.
- Ruíz M.S. (1993) Prehistoria y arqueología regional. En: Campi, D (Editor) *Jujuy en la Historia. Avances de Investigación I*. Unidad de Investigación en Historia Regional, FHYCS-UNJU.
- Salzano F.M., Callegari Jacques S. (1988) South American Indians. A case study in human for recovering genetic information. *Hum. Biol.* 55:219-255.
- Tamm E., Kivisild T., Reidla M., Metspalu M., Glenn Smith D., Mulligan C.J., Bravi C.M., Rickards O., Martinez-Labarga C., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A., Golubenko M.V., Stepanov V.A., Gubina M.A., Zhadanov S.I., Ossipova I.P., Damba L., Voevoda M.I., Dipierri J.E., Villems R., Malhi R.S. (2007) Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE* 9(829): 1-6.
- Vogel F., Motulsky A.G. (1982) *Human Genetics. Problems and Approaches*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wang S., Ray N., Rojas W., Parra M.V., Bedoya G., Gallo C., Poletti G., Mazzotti G., Hill K., Hurtado A.M., Camrena B., Nicolini H., Klitz W., Barrantes R., Molina J.A., Freimer N.B., Bortolini M.C., Salzano F.M., Petzl-Erler M.L., Tsuneto L.T., Dipierri J.E., Alfaro E.L., Bailliet G., Bianchi N.O., Llop E., Rothhammer F., Excoffier L., Ruiz-Linares A. (2008) Geographic patterns of genome admixture in latin american mestizos. *Plos One* 4(3):1-9.
- Yasuda N., Morton E.N. (1967) Studies on human population structure. *Proceedings of the 3rd International Congress of Human Genetics*. Ed: Crow JF and Nell JV, pp. 249-265. Baltimore: Johns Hopkins.



CYTOLOGICAL AND CYTOGENETIC EFFECTS INDUCED BY THIABENDAZOLE ON *ALLIUM CEPA* ROOT MERISTEMS

Andrioli Nancy B.¹; Mudry Marta D.^{1,2}

¹Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

nandrioli@hotmail.com

ABSTRACT

The toxicity and genotoxicity of thiabendazole (TBZ) in its commercial formulation Foldan® was studied in *Allium cepa* meristematic cells at concentrations ranging between 10 and 250 µg / ml. Our results show that exposure to TBZ induces a significant increase in the frequency of anaphase telophase chromosomal aberrations, micronuclei and binucleated cells at all the concentrations of TBZ assayed. The frequency of anaphase telophase aberrations was observed to reach a plateau at the concentration of 50 µg / ml of TBZ, which could be probably due to TBZ mitotic toxicity manifested at concentrations of 100 and 250 µg / ml. An increase was also observed in the rate of metaphase and anaphase, which was, in turn, indicative of alterations in chromatid segregation. Results from the present study indicate that exposure to TBZ induces toxicity and genotoxicity, both being consistent with mechanisms that interfere with microtubule formation.

Key words: Genotoxicity, cytotoxicity, mitotic index, micronuclei, binucleates, thiabendazole

RESUMEN

Se estudió la toxicidad y genotoxicidad de tiabendazole (TBZ) en su fórmula comercial Foldan® en células meristemáticas de *Allium cepa* para un rango de concentraciones que oscilaban entre 10 y 250 µg/ml. Nuestros resultados muestran que la exposición a TBZ induce un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas anafase telofase, células binucleadas y micronúcleos en todas las concentraciones de TBZ analizadas. La frecuencia de aberraciones anafase telofase alcanzó un *plateau* en la concentración de 50 µg/ml de TBZ, probablemente a causa de la toxicidad mitótica manifestada en las concentraciones de 100 y 250 µg/ml de TBZ. También se observó un incremento en el índice de metafase y anafase, indicando alteraciones en la segregación de las cromátidas. Los resultados del presente estudio muestran que la exposición a TBZ induce tanto toxicidad como genotoxicidad, ambas consistentes con la presencia de mecanismos que interfieren en la formación de los microtúbulos.

Palabras clave: Tiabendazol, genotoxicidad, índice mitótico, células binucleadas, micronúcleos.

INTRODUCCIÓN

Failure in the migration of chromosomes to poles as a result of the absence of a functional spindle, an event known as mitotic slippage, can lead to either aneuploidy by chromosome loss or polyploidy (Elhajouji *et al.*, 1998; Tsuiki *et al.*, 2001). Microtubule arrays are essential for functional mitosis and require the perfect balance between assembly and disassembly of tubulin molecules (Sammak and Borisy, 1988; Cassimeris *et al.*, 1988). As several therapeutic drugs are mitotic spindle poisons which inhibit microtubule polymerization, they are used to carry out research studies on the processes and mechanisms occurring through microtubules (Riffell *et al.*, 2009). On the other hand, benzimidazole drugs, which seem to cause a mitotic slippage effect (Albertini, 1990; Pisano *et al.*, 2000; Kiso *et al.*, 2004), are used as fungicides and anthelmintic in humans, animals and plants (Grover *et al.*, 2001).

The 2-(4 thiazolyl) benzimidazole or thiabendazole (TBZ) is a chemical compound widely used as an anthelmintic in human and veterinary medicine, as well as a fungicide for the control of post-harvest diseases on fruits and vegetables (Lankas *et al.*, 2001). *In vitro* tests have shown that TBZ binds to tubulin monomers, thus inhibiting microtubule formation (Pisano *et al.*, 2000). In contrast, *in vivo* analyses have reached inconclusive results (Mudry de Pargament *et al.*, 1987; Carballo *et al.*, 2006). Recent research suggests that TBZ affects microtubule dynamics, altering the balance between tubulin monomer pools and microtubule polymers and thus inhibiting the autoregulatory control of tubulin synthesis (Kiso *et al.*, 2004; Carballo *et al.*, 2006). On the other hand, several parameters used in genotoxic analysis may provide information about the underlying mechanisms behind these effects, thus allowing the characterization of possible clastogenic or aneugenic agents.

Plants are widely used in laboratories all over the world to analyze mutagenicity and meristematic tissues are adequate for this type of studies (Rank and Nielsen, 1997). In addition, plants have many structural and functional analogs of the CDK-cyclin complex involved in the control and regulation of mitosis in fungi and animals (De la Torre, 2005).

However, mitotic processes in higher plants show additional microtubule arrangements, different from animal mitotic cells (Hepler and Hush, 1996). Microtubule damage in these cells may result in cytological and cytogenetic changes that can be quantified to assess the effect of exposure to different chemicals and environmental conditions on account of the fact that they are also the target of microtubule disrupting agents. Furthermore, apart from the mitotic spindle, microtubule arrays are formed during the plant cell cycle which, in turn, give rise to preprophasic bands and phragmoplast. Cytokinesis requires the formation of microtubule phragmoplast and root meristems and the inhibition of phragmoplast formation gives rise to binucleate cells (Giménez-Abián *et al.*, 2004).

Allium cepa is an excellent plant model for the study of chromosome aberrations after any chemical treatment. This model is sensitive and cytological studies are easy to perform, thus giving information on the effects on cell division and chromosomes (Fiskesjö, 1985; Grant, 1999). In the anaphase-telophase aberration test, two groups of end points should be taken into account (Feretti, 2007), namely:

- 1) Lagging chromosomes, multipolar anaphases, disorganized anaphases, C- mitosis and polyploidy, all of which indicate spindle disturbance.
- 2) Fragments, rings and bridges, which are indicative of clastogenic effects.

The presence of condensed chromosomes randomly distributed in the cell or C-mitosis suggests inhibition of spindle formation, which affects the metaphase–anaphase transition, similar to the colchicine effect.

Micronuclei frequency is another biomarker of genotoxic damage. Micronuclei are composed of either acentric chromosome fragments or whole chromosomes and they increase by exposure to clastogenic and aneugenic agents (Fenech, 2000; Lindberg *et al.*, 2007). Micronuclei are formed at the end of telophase and are more frequently observed during interphase. Furthermore, binucleate cell induction has been taken into account in genotoxicity analysis on account of the fact that microtubular disruption affects the consolidation of the phragmoplast in telophase (Soliman, 2001).

In view of the above, and taking into account the wide use of TBZ and the contradictory findings reported to date on the use of this chemical

compound, root meristem cells of *A. cepa* were exposed to the commercial formulation Foldan® at different TBZ concentrations in order to characterize its genotoxic effects.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Foldan® (TBZ 500 mg, Excipients c.s.) was obtained from Andrómaco (Buenos Aires, Republic of Argentina). Dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS 67-68-5) was purchased from Baker (Buenos Aires, Republic of Argentina) and Orcein (CAS N° 1400-62-0) was obtained from BioPack (Buenos Aires, Republic of Argentina).

Control and thiabendazole-treated cells

Bulbs of *A. cepa*, variety *valcatorce* (INTA), were placed into glass jars containing filtered tap water (SPA® Filter) at 24°C in darkness. Oxygen was supplied by constant bubbling. Roots between 1 and 2 mm in length were exposed to a series of TBZ concentrations. A stock solution containing 500 mg of Foldan® in 20 ml of DMSO was prepared and all test concentrations were obtained by appropriate dilution of the stock solution in filtered tap water. Four experimental concentrations were chosen following the criterion according to which all should be lower than those inhibiting root growth in a percentage higher than 50% with respect to the control (Fiskesjö, 1985). Test concentrations were 10, 50, 100 and 250 µg/ml TBZ. DMSO 1% maximum concentration was used as solvent control. Independent experiments were performed in triplicate. Exposure was maintained for 30 h to guarantee two complete mitotic cycles (Grant, 1999). At the end of exposure time, roots were cut and root tips fixed in ethanol and glacial acetic acid (3:1) for 24 h. Squash preparations of the meristem-tip cells were made and stained using 2% acetic orcein. The slides were examined under a Leica DMLB light microscope (1000 x).

End points analysis

The following endpoints were scored for genotoxicity analysis:

- 1) Mitotic index was analyzed by counting 1000 cells in all stages of the mitotic cycle.
- 2) Chromosome aberrations were determined by

the examination of 300 anaphases-telophases per concentration, including: a) lagging chromosomes, multipolar telophases, disorganized anaphases, polyploid cells and C-mitosis; b) bridges and acentric fragments.

3) Index phases as percentage of each mitotic phase over total mitotic cells.

4) Micronuclei frequency was characterized as the percentage of micronucleated cells per 1000 interphase cells.

5) Frequency of binucleate cells as percentage of the total cells observed.

Statistical analysis

Student's t test was used to compare the average values of anaphase-telophase aberrations, mitotic index, binucleate cells and index phases between treated and untreated cells. The X² test was used to detect statistical differences in micronucleus frequencies. Analyses were carried out with STATISTICA (StatSoft Inc. 1999).

RESULTS

Mitotic and phase index

The IM inhibition decreased as the TBZ concentration increased (Fig. 1). Results showed both a significant decrease in mitotic index frequency at 100 and 250 µg/ml of TBZ and an increase in metaphase and anaphase frequency at 50, 100 and 250 µg/ml of TBZ (Table 1).

Anaphase-telophase aberrations, binucleate cells and micronuclei

Significant differences in the frequency of anaphase-telophase aberrations were observed at 10, 50, 100 and 250 µg/ml TBZ ($p < 0.01$) whereas no increase was observed after the 50 µg/ml concentration reached a plateau (Fig. 2). The types observed were: polyploid, C-mitosis, lagged chromosomes and disorganized anaphases. No bridges or fragments as indicative of clastogenic effect were observed. The frequency of micronuclei and binucleate cells was significantly increased in all treatments in comparison to the control ($p < 0.05$). Binucleate cells were found in interphase or early prophase and were considered to be perturbers of cytokinesis (Table 2).

TBZ (µg/ml)	MN ± SD	BN ± SD	Anaphase-telophase aberration				AC± SD (%)
			Lag	C-met	Des an	Polyp	
0	1.00±0.50	–	–	1	1	–	1.92±0.93
0 (DMSO 1%)	1.00±0.40	–	–	1	1	–	1.87±1.32
10	5.9±2.50**	2.30±1.4*	1	1	3	1	5.22±1.83**
50	10.50±0.16**	2.70±0.9*	5	12	17	14	46.28±14.38**
100	22.8±3.33**	7.7±2.5**	4	9	19	17	48.82±7.39**
250	38,6±6,00**	13,2±7,4**	3	10	18	14	47.48±18.86*

Table I. Micronuclei frequency (MN), binucleated cells (BN) and anaphase - telophase aberrations (AC) in meristematic cells of *A. cepa* exposed to TBZ and negative controls and solvent control (DMSO).

Student *t*-test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. MN: micronucleous; BN: binucleated cells; Lag: lagging chromosome, C-met: C-metaphase, Des. An.: disorganized anaphases, Polyp: polyploid cells, CA: chromosome aberrations.

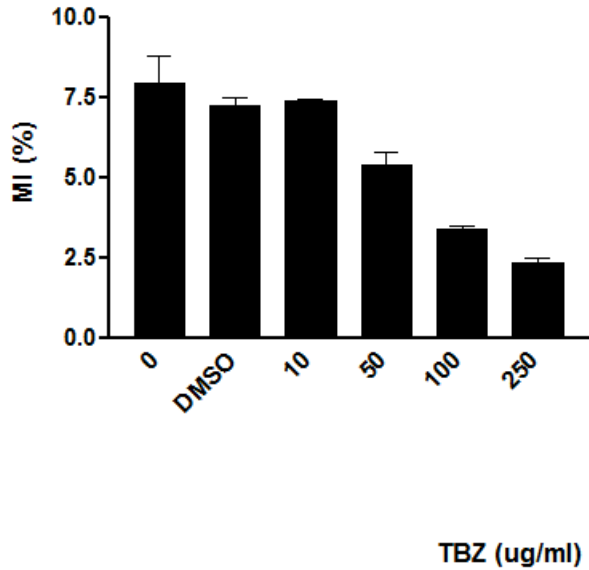


Figure 1.

TBZ(µg/ml)	MI ± SD (%)	Phase Index			
		P	M	A	T
0	7.82±1.29	0.58±0.09	0.13±0.02	0.10±0.04	0.19±0.06
0 (DMSO 1%)	7.28±0.41	0.52±0.03	0.11±0.02	0.16±0.04	0.21±0.05
10	7.42±0.09	0.49±0.07	0.21±0.08	0.10±0.04	0.20±0.06
50	5.40±0.69	0.35±0.01	0.23±0.02*	0.21±0.05*	0.20±0.04
100	3.40±0.18**	0.36±0.10	0.30±0.02*	0.12±0.06	0.22±0.08
250	2.36±0.27**	0.31±0.12	0.27±0.08*	0.20±0.11	0.22±0.06

Table II. Phase Index in *A. cepa* meristematic root cells exposed to TBZ (µg/ml) and negative controls and solvent control (DMSO).

Student *t*-test. * $p < 0,05$. TBZ: thiabendazole, P: prophase, M: metaphase, A: anaphase, T: telophase.

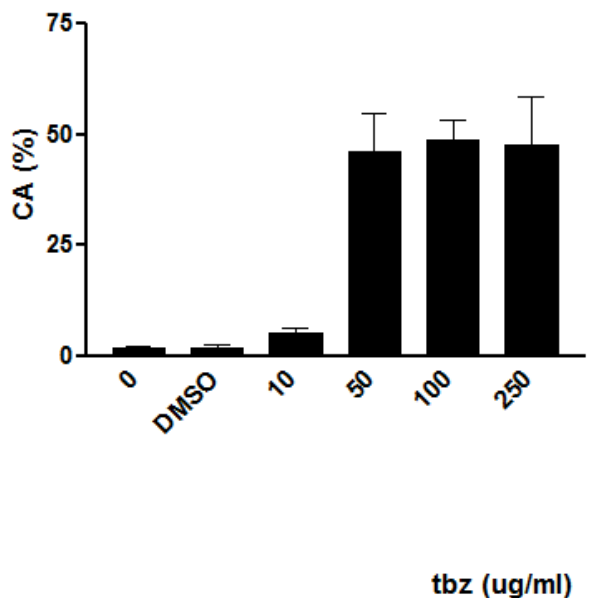


Figure 2.

DISCUSSION

The concentrations of TBZ assayed in the present study were in accordance with those used in previous studies conducted to analyze its genotoxic effects. In *Aspergillus nidulans*, the 50-200 µg/ml TBZ range was observed to have the capacity of disrupting microtubules (Kiso *et al.*, 2004). In *Hordeum vulgare*, the 25-250 µg/ml TBZ range was reported to have no effect on microtubule arrays (Voutsinas *et al.*, 1997). In addition, results from CHO cells exposed to 10-25 µg/ml TBZ show that TBZ promotes the inhibition of tubulin synthesis and defects in the spatial organization of microtubules in mitosis, thus disturbing the normal organization of microtubule arrays and inducing formation of aberrant spindles (Pisano *et al.*, 2000). In CHO cells, a significant dose-dependent increase in sister chromatid exchange frequency (SCE) using 50-100 µg/ml TBZ dose-range also showed a significant increase in mitotic spindle anomalies (Carballo *et al.*, 2006). Furthermore, while in *A. cepa* MI inhibition evidenced a concentration-response relation (Fig. 1), the frequency of anaphase-telophase aberrations did not evidence such relation on account of the fact that in the second concentration assayed frequency values reached a plateau (Fig. 2).

An increased damage derived from an increased exposure concentration may lead cells either to arrest in interphase or to die. As these cells do not enter mitosis, they are not detected and the frequency of anaphase telophase aberrations may therefore begin to decrease when IM values are very low as a result of mitotic toxicity. The 100-250 TBZ concentration range was observed to inhibit IM, with very toxic effects observed. Still, anaphase telophase aberrations were not found to decrease but remained. This could support the hypothesis of TBZ binding to free tubulin. This occurs in cells throughout the whole cell cycle, thus being indicative of the fact that cells are affected even when they enter mitosis. The binding of TBZ to tubulin could affect the self-regulatory control of tubulin synthesis resulting in a change in the global dynamics of microtubule formation. An increase in metaphase frequency is considered a consequence of spindle disturbance. The C-mitotic effect was originally observed after treatment with colchicines and was interpreted as a difficulty to enter anaphase, thus preventing microtubule formation. In *A.*

cepa meristem root cells disorganized anaphases, polyploidy and laggard chromosomes were also induced and could be related to defects in microtubule polymerization dynamics. Failure in the exchange of tubulin subunits, intact microtubules or actin linkage probably leads to a global effect producing a deficient spatial organization of every microtubule array.

On the other hand, according to previous research the absence of a full phragmoplast in telophase is likely to lead to the formation of binucleate cells and polyploidization (Giménez-Abián *et al.*, 2004). This is in agreement with the presence of binucleate and polyploid cells observed in the present study. Within this framework, micronuclei frequency could be considered to be another biomarker of alterations in the mitotic spindle. The substantial increase in micronuclei frequency indicates nuclear envelope entrapment of whole chromosomes or DNA fragments or DNA in excess that were extruded from the nucleus (Fernandes *et al.*, 2007). Our observations regarding the absence of TBZ clastogenic effect are in agreement with previous results obtained from a screening for clastogenicity with benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl, fuberidazole and thiabendazole by other authors in *A. cepa* and other species such as *Allium sativum* and *Vicia faba*. Only benomyl and carbendazim were found to evidence clastogenic effects (Sahu *et al.*, 1983) in agreement with findings from our study. In addition, in spite of findings collected from animal models, no multipolar cells were observed in *A. cepa* meristem root cells (Carballo *et al.*, 2006). This could be due to differences between microtubular center organizations on account of the fact that centrosomes are not present in plants, thus suggesting that different molecular mechanisms are involved in multipolar cells induction in plants and animals (Shimamura *et al.*, 2004).

Taken together, findings from the present study lead us to conclude that, under the conditions of the present experimental design, Foldan® evidences ability to promote both genotoxicity and cytotoxicity in *A. cepa* meristem root tips cells. The formation of aberrant spindles and phragmoplast disruption could be consistent with the interaction between tubulins and TBZ action.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by the *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET) (MDM PIP 5012) and the University of Buenos Aires, Argentina (MDM Grant UBACyT X107).

REFERENCES

- Albertini S. (1990). Analysis of nine known or suspected spindle poisons for mitotic chromosome malsegregation using *Saccharomyces cerevisiae* D61.M. *Mutagenesis* 5:453-459.
- Carballo M.A., Hick A.S., Solonesky S., Larramendy M.L., Mudry M.D. (2006). Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *J. Appl. Toxicol.* 26:293-300.
- Cassimeris L., Pryor N.K., Salmon E.D. (1988). Real-time observations of microtubules dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107:2223-2231.
- De la Torre C. (2005). Aceleración y frenado de la proliferación celular. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 71:535-569.
- Elhajouji A., Cunha M., Kirsch-Volders M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 13:193-198.
- Fenech M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455:81-95.
- Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti E., Moretti M., Monarca S. (2007). *Allium cepa* chromosome aberrations and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit. Contam.* 24(6):561-572.
- Fernandes T.C.C., Mazzeo D.E., Marin-Morales M. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicida. *Pestic. Biochem. Phys.* 88:252-259.
- Fiskesjö G.F. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112.
- Giménez-Abián M.I., Giménez-Abián J.F., Utrilla L., De la Torre C. (2004). Nuclear ploidy is contingent on the microtubular cycle responsible for plant cytokinesis. *Protoplasma* 224:41-47.
- Grant W.F. (1999). Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene-Tox. Program. *Mutat. Res.* 99:273-291.
- Grover J.K., Vats V., Uppal G., Yadav S. (2001). Anthelmintic: A review. *Trop. Gastroenterol.* 22(4):180-189.
- Hepler P.K., Hush J.M. (1996). Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiol.* 112:455-461.
- Kiso T., Fujita K., Ping X., Tanaka T., Taniguchi M. (2004). Screening for microtubule-disrupting antifungal agents by using a mitotic-arrest mutant of *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives accompanying tubulin loss. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5):1739-1748.
- Lankas G.R., Nakatsuka T., Ban Y., Komatsu T., Matsumoto H. (2001). Developmental toxicity of orally administered thiabendazole in ICR mice. *Food Chem. Toxicol.* 39:367-374.
- Lindberg H.K., Wang X., Jarventaus H., Falck G.C.M., Norppa H., Fenech M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res.* 617(1-2):33-45.

- Mudry de Pargament M.D., Labal de Vinuesa M., Larripa I. (1987). Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: I. Thiabendazole (TBZ). *Mutat. Res.* 188:1-6.
- Pisano C., Battistoni A., Dagrasi F., Tanzarella C. (2000). Changes in microtubule organization after exposure to benzimidazole derivative in Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 15:507-515.
- Rank J., Nielsen M.H. (1997). *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 390:121-127.
- Riffell J.L., Zimmerman C., Khong A., Mc Hardy L.M., Roberge M. (2009). Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle* 8 (18):3029-3042.
- Sahu R.K., Behera B.N., Sharma C.B.S.R. (1983). Cytogenetic effects from agricultural chemicals. *Environ. Exp. Bot.* 23(1):79-83.
- Sammak P.J., Borisy G.G. (1988). Detection of single fluorescent microtubules and methods for determining their dynamics in living cells. *Cell Motil. & the Cytoskel.* 10(1-2):237-245.
- Shimamura M., Brown R.C., Lemmon B.E., Akashi T., Naohisa K., Mizuno N., Tomizawa K., Yoshimoto K., Deguchi H., Hosoya H., Horio T., Mineyuki Y. (2004). Tubulin in basal land plants: Characterization, localization and implication in the evolution of acentriolar microtubule, organizing centers. *Plant Cell.* 16:45–59.
- Soliman M.I. (2001). Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Online J. Biol. Sci.* 1(11):1021-1027.
- StatSoft Inc. 1999. www.statsoft.com
- Tsuiki H., Nitta M., Tada M., Inagaki M., Ushio Y., Saya H. (2001). Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene* 20(4):420-429.
- Voutsinas G., Zarani F, Kappas A. (1997). The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biol. Int.* 21(7):411-418.



SENSIBILIDAD DE DISTINTAS LÍNEAS MURINAS A LA CICLOFOSFAMIDA MEDIDA A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA.

Daniel Francisco Arencibia-Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario-Fernández², Yolanda Emilia Suárez-Fernández³.

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Reparto Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, La Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, La Habana, Cuba.

³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Mayabeque, Cuba.

darencibia@finlay.edu.cu

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sensibility of different murine lines to the cyclophosphamide (CF) measure through the micronucleus assay in bone marrow cells. Being used mice of both sexes of the Balb/c, NMRI, OF-1 and C57BL/6/cenp lines. The use of the best line was suggested in this assay on the base of significant appearance of low indexes spontaneous and high induced indexes to the CF. It was obtained as a result that the Balb/c line in both sexes differs significantly of the other evaluated lines. In this line the lowest results in cytotoxicity index (relationship among young erythrocytes/mature erythrocytes) and genotoxicity indexes (erythrocytes percent in bone marrow with micronucleus) were observed, at the same time of responding from an acceptable form to the CF. Also the line C57/BL6/cenp was the less efficient and more sensitive to the mutagen, being obtained the highest spontaneous and induced results. These results allow to suggest that the Balb/c mice, is the most appropriate line to use as biomodel in the micronucleus assay, when it is used the CF as positive control.

Key words: Micronucleus assay, mice, bone marrow, cyclophosphamide.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida (CF) medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. Siendo utilizados ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp. Se sugirió el uso de la mejor línea en este ensayo sobre la base de aparición significativa de índices espontáneos bajos e índices inducidos altos a la CF. Se obtuvo como resultado que la línea Balb/c en ambos sexos difiere significativamente de las demás líneas evaluadas. En esta línea se observaron los resultados más bajos de índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos maduros) y genotoxicidad (porcentaje de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos), a la par de responder de forma aceptable a la CF. Además la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y más sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos e inducidos más altos. Estos resultados permiten sugerir que la línea de ratones Balb/c, es la más apropiada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo.

Palabras clave: Ensayo de micronúcleos, ratones, médula ósea, ciclofosfamida.

INTRODUCCIÓN

Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer (Hecht, 2002; Mortelmans y Rupa, 2004).

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre (Stoneham *et al.* 2000; García *et al.* 2000).

Por lo general los estudios mutagénicos y genotóxicos en la toxicología experimental, se realizan cuando ya se han realizado todos los estudios de toxicidad aguda potencial del producto a evaluar en dos especies y por al menos dos vías, la que se propone para su uso en humanos y otra que por lo general es la vía intraperitoneal (Autor *et al.* 2009). Las autoridades regulatorias tales como la ICH (Conferencia Internacional sobre la Armonización), OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo) y EPA (Agencia para la Protección del Ambiente en Estados Unidos), exigen un ensayo *in vitro* que determine daño a nivel de genes, de elección el ensayo de Ames, y un ensayo *in vivo* que determine daño a nivel de los cromosomas, de elección el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones para realizar la solicitud de ensayo clínico fase I, en voluntarios sanos (Tice *et al.* 1994; OECD, 1997; Autor *et al.* 2009).

Existen en nuestros días una amplia gama de ensayos de genotoxicidad, con el fin de que los investigadores los utilicen de forma estratégica y sensata los más conveniente posible según las propiedades del producto a evaluar y las condiciones de equipamiento. Estas condiciones incluyen personal califi-

cado, materiales, medios, disponibilidad de equipamiento, experiencia en la técnica evaluativa y en la interpretación científica. Permitiendo de esta forma poder darle una explicación real y veraz a los resultados obtenidos (Autor *et al.* 2009).

Dado que la mayoría de estos ensayos son bastante caros es conveniente que se elija cuál realizar y nunca se realicen estudios que determinen el mismo daño, pues se consideran repetitivos.

Como parte de la evaluación toxicológica se realiza el tamizaje de la potencialidad genotóxica (determinar la toxicidad a nivel de ADN, genes y cromosomas), dentro de la cual los ensayos *in vivo* dan el mayor peso de la conclusión final de si la sustancia investigada es o no mutagénica y/o genotóxica. Dentro de estos ensayos se encuentra el de electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa), evaluando el daño a nivel de la estructura primaria del ADN, el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en médula ósea de roedores el cual determina la ocurrencia o no de daño en cromosomas y el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide en roedores determinando el efecto genotóxico a nivel celular (Autor *et al.* 2009).

Durante las investigaciones de un mismo producto a evaluar mediante el tamizaje genotoxicológico se utilizan diferentes líneas sin tener en cuenta, la más eficiente para detectar daño en el ADN. Además de que las líneas de ratones producidas en nuestro país hasta el momento no habían sido evaluadas y/o exploradas teniendo en cuenta su eficiencia genética para detectar sustancias con baja, media o alta genotoxicidad. Además el estudio profundo de nuestros biomodelos permitirá utilizar el mínimo de animales y obtener resultados fiables; por lo que disminuirán las repeticiones de estos estudios tan costosos y fastidiosos.

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia espontánea e inducida de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética en el biomodelo a utilizar, así podremos darnos cuenta si estamos frente a una sustancia mutagénica y/o genotóxica, y si estamos en presencia) de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, además al ser estas pruebas tan decisivas en la evolución positiva o negativa de un nuevo producto de índoles diversas es necesario buscar el biomodelo animal ideal (Autor *et al.* 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de distintas líneas murinas a la ciclofosfamida (CF) medida a través del ensayo de micronúcleos en células de la médula ósea. Siendo utilizados ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp. Fue sugerido el uso de la mejor línea en este ensayo sobre la base de aparición significativa de índices espontáneos bajos e índices inducidos altos a la CF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp adultos jóvenes (6-7 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g al término de la cuarentena, donde se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos internacionales para el uso de los animales de Laboratorios (CCAC, 1997).

Grupos experimentales

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administró en el horario de 10:30-11:30 a.m. y las concentraciones a administrar de cada sustancia se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (5 ratones/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratones/grupo/sexo.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante 14 días.

En el grupo experimental 2 se utilizó Tween 65 al 2%, como vehículo utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo (Carbajal *et al.* 2005; Arruzabalá *et al.* 2006). En el grupo experimental 3 se utilizó NaCl al 0,9% como segundo grupo solvente, ya que está demostrado que el mismo es el disolvente

de la mayoría de las sustancias hidrofílicas a preparar (Shayne, 2007). Ambos productos fueron preparados 2 horas antes de la administración; se administraron por vía oral durante 14 días.

En el grupo experimental 4 se utilizó como control positivo la CF en dosis de 50 mg/kg, por vía intraperitoneal, mutágeno adquirido por la firma comercial mexicana Lemri SA bajo la marca LEDOXINA, el cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9% (Autor *et al.* 2009a). La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, 48 horas y luego a las 24 horas antes de la eutanasia (Wyrobek, 1983; Rossello *et al.* 2006; Autor *et al.* 2009b).

Observaciones clínicas

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m. y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó gentilmente por flujo introduciendo una aguja con jeringuilla cargada con 3 ml de suero bovino fetal (SBF). La médula así obtenida diluida con el SBF se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b). Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego establecer una tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b). Las láminas se codificaron, el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas", utilizando un microscopio Olympus BH-2 (100x con lente de inmersión). Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal para calcular el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos. Ade-

más se procedió a calcular la frecuencia de EP portadores de micronúcleos (MN) en 2 000 EP/animal (MN-EP), según los requisitos establecidos como parámetro de genotoxicidad y cuantificar el número de MN totales (OECD, 1997; Autor *et al.* 2009b).

Eutanasia

A todos los animales se les practicó la eutanasia por dislocación cervical en previa atmósfera de éter teniendo en cuenta el tiempo de exposición a cada una de las sustancias evaluadas (Shayne, 2007).

Análisis estadístico

La frecuencia de EP portadores de micronúcleos y el índice de citotoxicidad (EP/EN), se realizó mediante el método de análisis de varianza (ANOVA). El número total de MN se analizó mediante la prueba de Chi-cuadrado, ambos tipos de variables se analizaron estableciendo a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$ (Autor *et al.* 2009b). Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

RESULTADOS

Los resultados del ensayo de micronúcleos para las cuatro líneas de ratones evaluadas se encuentran en la (Tabla I y II). Para la línea Balb/c el índice de citotoxicidad (EP/EN), se encuentra en el rango espontáneo de 1,16-1,19 para el caso de los machos y de 1,15-1,19 en las hembras. El índice de genotoxicidad dado por el % de EP que contienen micronúcleos se encuentra en los machos entre 0,16-0,18 % en los machos y en las hembras están en el rango de 0,13-0,17 %.

En tanto los resultados de la línea OF-1 teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad se encuentran entre 1,14-1,15 en los machos y en las hembras entre 1,12-1,14. Los resultados del índice de genotoxicidad para el caso de los machos están en el rango de 0,18-0,21 % en los machos y de 0,14-0,18 % en las hembras.

El índice de citotoxicidad en los ratones NMRI se encuentra entre 1,16-1,17 en los machos y en las hembras esta entre 1,12-1,15. El índice de genotoxicidad se encuentra en el intervalo de 0,17-0,19 % en los machos y en las hembras esta entre 0,16-0,19 %.

Al evaluar en este ensayo la línea de ratones

C57BL/6/cenp, se encontró que el índice de citotoxicidad era de 1,12-1,14 en los machos y en las hembras se encontró en el intervalo de 1,09-1,12, estando esta relación en el intervalo más bajo por lo cual esta línea es la que manifiesta mayor daño espontáneo. Por otra parte, el índice de genotoxicidad estuvo en el rango de 0,18-0,21 % en los machos y de 0,18-0,21 % en las hembras. Una vez más se demostró que esta línea de ratones en ambos sexos presenta mayor % de EP portadores de micronúcleos.

Al comparar los resultados espontáneos e inducidos en las variables analizadas entre líneas de ratones se obtuvo como resultado que la línea Balb/c difiere con las demás evaluadas en ambos sexos. Esta comparación se realizó para variables continuas utilizando la prueba de ANOVA ($p<0.05$) y para variables categóricas utilizando la prueba de Chi-Cuadrado ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

En ninguno de los estudios realizados se evidenció síntomas clínicos indicativos de toxicidad. Reafirmando que la dosis utilizada en las sustancias evaluadas en este ensayo no fueron altamente tóxicas a nivel sistémico pero se logró un efecto importante en las células dianas analizadas (Autor *et al.* 2009a; Autor *et al.* 2009c).

Teniendo en cuenta el ensayo evaluado se obtuvo como resultado que la línea Balb/c difirió con las otras tres líneas evaluadas en ambos sexos. Las diferencias estuvieron dadas al tener en cuenta el índice de citotoxicidad obtenido de la relación eritrocitos policromáticos (EP)/eritrocitos normocromáticos (EN), el índice de genotoxicidad (% de EP que contienen micronúcleos), así como el número de EP con MN como índice de severidad del daño. En esta línea se obtuvieron los resultados espontáneos más bajos e inducidos más altos, destacándose la sensibilidad de este biomodelo animal para detectar compuestos clastogénicos (Gámez *et al.* 2000; Autor *et al.* 2009a; Autor *et al.* 2009c; Autor *et al.* 2010a).

Los resultados espontáneos e inducidos con CF obtenidos en esta línea de ratones Balb/c concuerdan con los obtenidos por varios autores y nuestro grupo de trabajo (Gámez *et al.* 2000; Lóriga *et al.* 2001; Fraga *et al.* 2001; Mañas *et al.* 2006; Autor *et al.* 2011), en los grupos controles, tratados con sol-

ventes y CF en la dosis utilizada en este ensayo.

La línea de ratones C57BL/6/cenp fue la menos eficiente, encontrándose los índices de daños espontáneos más altos, pero a su vez fue la más sensible al daño clastogénico logrado por la CF en células de la médula ósea. Las diferencias significativas entre líneas de ratones a la acción genotóxica de la CF pudieran ser en respuesta a diferentes niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima citocromo P-4501A1 en el hígado. Entre líneas de una misma especie se han observado diferencias epigenéticas al tener en cuenta esta enzima hepática fundamental en la fase I del metabolismo de xenobióticos, que participa en el metabolismo de la CF en el hígado al utilizarse como droga citotástica (Amri *et al.* 1986; Jana *et al.* 1998).

Para que esta droga se metabolice es necesario la activación en los microsomas hepáticos, en un primer paso a hidroxiciclofosfamida, transformándose espontáneamente a aldofosfamida, y posteriormente en las células blanco se convierte en mostaza fosforamida, del que surgen cuatro metabolitos: -mostaza fosforamida (activo), acroleína, carboxifosfamida y 4-ceofosfamida que son escasamente activos. La CF es inactivada por enzimas microsomas y hepáticas con participación activa de la citocromo P-450 (Rezvanfar *et al.* 2008).

Al comparar el biomodelo ratas Sprague Dawley (SD) y ratones Balb/c de ambos sexos en el ensayo de micronúcleos y aberraciones cromosómicas, nuevamente los ratones de esta línea experimentaron los índices endógenos de daño más bajos e inducidos altos (Autor *et al.* 2011a).

Demostrándose que genéticamente la línea de ratones Balb/c en ambos sexos es más estable que las otras evaluadas y que las ratas SD, además de haber presentado una respuesta aceptable a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

El hecho de que los ratones Balb/c hayan resultado ser la línea más apropiada en este ensayo que las otras líneas de ratones y ratas SD al tener en cuenta los índices endógenos evaluados, pudiera estar dado por la baja tasa de variabilidad genética de esta línea al ser isogénica, lo cual constituye una ventaja al evaluar el efecto genotóxico de drogas mediante este ensayo, pero a su vez no obtendremos un respuesta heterogénea, la cual es típica en poblaciones humanas. Mediante este análisis sugerimos que la línea de ratones Balb/c, es la más apro-

piada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo, ya que permite detectar en un estrecho margen de error aquellas sustancias que sean clasificadas de muy baja genotoxicidad, además de responder de forma aceptable a clastógenos químicos como la CF. Estos resultados conducen a una mejora en la robustez de esta prueba. A su vez permitirán clasificar con mayor grado de exactitud aquellas sustancias que al igual que la CF, logren formar monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas con la consecuente aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos; aumentando la aparición de retardos anafásicos en células somáticas (Matuo *et al.* 2007; Rezvanfar *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

La línea de ratones Balb/c en ambos sexos difiere significativamente de las demás líneas evaluadas. En esta línea se observaron los resultados más bajos de índice de citotoxicidad (relación entre eritrocitos jóvenes/eritrocitos maduros) y genotoxicidad (porcentaje de eritrocitos en médula ósea con micronúcleos), a la par de responder de forma aceptable a la CF. Además la línea C57/BL6/cenp fue la menos eficiente y más sensible al mutágeno, obteniéndose los resultados espontáneos e inducidos más altos. Los resultados del presente trabajo, permiten sugerir que la línea de ratones Balb/c, es la más apropiada para utilizar como biomodelo en el ensayo de micronúcleos, cuando es utilizada la CF como control positivo.

Grupo	n	EP/EN	MN totales	MN-EP (%)
Ratones Balb/c de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,18 ± 0,01d	23d	0,16 ± 0,03d
Sustancia Vehículo 1	10	1,16 ± 0,04d	26	0,18 ± 0,04d
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,05d	25d	0,18 ± 0,04d
Control Positivo (CF)^a	10	0,87 ± 0,03*d	258*d	1,82 ± 0,89*d
Hembras				
Control Negativo	10	1,15 ± 0,05d	19	0,13 ± 0,04d
Sustancia Vehículo 1	10	1,17 ± 0,02d	20d	0,14 ± 0,07d
Sustancia Vehículo 2	10	1,19 ± 0,04d	24d	0,17 ± 0,08d
Control Positivo (CF)^a	10	0,85 ± 0,02*d	233*d	1,65 ± 0,77*d
Ratones OF-1 de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,14 ± 0,01	26	0,18 ± 0,01
Sustancia Vehículo 1	10	1,16 ± 0,04	28	0,20 ± 0,03
Sustancia Vehículo 2	10	1,15 ± 0,05	30	0,21 ± 0,05
Control Positivo (CF)^a	10	0,91 ± 0,06*	267*	1,89 ± 0,61*
Hembras				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,03	22	0,16 ± 0,05
Sustancia Vehículo 1	10	1,14 ± 0,06	25	0,18 ± 0,06
Sustancia Vehículo 2	10	1,13 ± 0,05	20	0,14 ± 0,04
Control Positivo (CF)^a	10	0,89 ± 0,02*	251*	1,78 ± 0,58*

Tabla I. Índice de citotoxicidad (EP/EN), MN totales e índice de genotoxicidad (MN-EP %) en ratones Balb/c y OF-1 de ambos sexos, utilizados como biomodelos en el ensayo de micronúcleos.

CF (Ciclofosfamida) .^a Administración por vía intraperitoneal. Determinación in 2000 células/animal y en 2000 EP/animal. *p<0.05 (comparación contra el control, prueba de ANOVA). (X media; SD desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0.05 (comparación contra el control, Prueba de Chi-Cuadrado solamente para la variable MN totales). d = Resultados que difieren al comparar las diferentes líneas de ratones utilizadas en el mismo sexo y tratamiento.

Grupo	n	EP/EN	MN totales	MN-EP (%)
Ratones NMRI de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,16 ± 0,02	27	0,17 ± 0,02
Sustancia Vehículo 1	10	1,17 ± 0,03	28	0,17 ± 0,02
Sustancia Vehículo 2	10	1,16 ± 0,03	30	0,19 ± 0,04
Control Positivo (CF) ^a	10	0,92 ± 0,05*	286*	1,80 ± 0,61*
Hembras				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,02	30	0,19 ± 0,05
Sustancia Vehículo 1	10	1,15 ± 0,05	26	0,16 ± 0,04
Sustancia Vehículo 2	10	1,15 ± 0,03	28	0,17 ± 0,03
Control Positivo (CF) ^a	10	0,90 ± 0,03*	280*	1,77 ± 0,53*
Ratones C57BL/6/cenp de ambos sexos				
Machos				
Control Negativo	10	1,12 ± 0,02	29	0,18 ± 0,02
Sustancia Vehículo 1	10	1,13 ± 0,03	31	0,20 ± 0,04
Sustancia Vehículo 2	10	1,14 ± 0,03	34	0,21 ± 0,04
Control Positivo (CF) ^a	10	0,94 ± 0,07*	275*	1,73 ± 0,72*
Hembras				
Control Negativo	10	1,10 ± 0,02	31	0,20 ± 0,01
Sustancia Vehículo 1	10	1,12 ± 0,04	28	0,18 ± 0,05
Sustancia Vehículo 2	10	1,09 ± 0,03	33	0,21 ± 0,01
Control Positivo (CF) ^a	10	0,93 ± 0,04*	282*	1,78 ± 0,81*

Tabla II. Índice de citotoxicidad (EP/EN), MN totales e índice de genotoxicidad (MN-EP %) en ratones NMRI y C57BL/6/cenp de ambos sexos, utilizados como biomodelos en el ensayo

CF (Ciclofosfamida) .a Administración por vía intraperitoneal. Determinación in 2000 células/animal y en 2000 EP/animal. *p<0.05 (comparación contra el control, prueba de ANOVA). (X media; SD desviación estándar para las dos replicas realizadas). *p<0.05 (comparación contra el control, Prueba de Chi-Cuadrado solamente para la variable MN totales). d = Resultados que difieren al comparar las diferentes líneas de ratones utilizadas en el mismo sexo y tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Amri H., Batt A., Siest G. (1986). Comparison of cytochrome P-450 content and activities in liver microsomes of seven species including man. *Xenobiotic*. 16:351-358.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Suárez Y.E., Delgado L. (2010a). El ratón NMRI como biomodelo en el ensayo de micronúcleos. *Retel*. 31(3):21-31.
- Arencibia D.F., Gutiérrez A., Gámez R., Pardo B., Curveco D., García H. (2009a). Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. *Rev Cub Farm*. 43(2):8-9.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Rodríguez Y., Martín Y., Díaz D. (2009c). Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Retel*. 24(2):7-29.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., Curveco D. (2009). Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel*. 23(3):23-40.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Morffi J., Curveco D. (2009b). Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*. 25(3):22-38.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Suárez Y.E., Vidal A. (2011a). Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Química Viva*. 10(2):17-21.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Vidal A. (2010). The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. *VacciMonitor*. 19(Suplement 2):245.
- Arencibia D.F., Vidal A., Rosario L.A., Suárez Y.E., Delgado L. (2011). Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*. 20(1):28-33.
- Arruzazabala M.L., Mas R., Molina V. (2006). Effect of D-004, a lipid extracts from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R&D*. 7:233-241.
- Carbajal D., Molina V., Más R., Arruzazabala M.L. (2005). Therapeutic effect of D-004, a lipid extracts from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs. Exptl. Clin. Rest*. 31:193-198.
- CCAC. (1997). Canadian Council on Animal Care. Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc; Canada. p. 155-162.
- Fraga J.R., Domínguez Y., Friman M., González S.B., Somoza A.D., Pérez C. (2001). Evaluación genotóxica de la vacuna antileptospirósica vax-SPIRAL® empleando el ensayo de micronúcleos trasplacentarios. *An. Toxicol*. 1(1):35-39.
- Gámez R., Fernández I., Acosta P.C., Alemán C., Rodeiro G., Rodríguez M. (2000). Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. *Rev. CENIC*. 31(3):211-216.
- García L., Sureiro R.A., Garrido M.J. (2000). Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: X Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental. p.108-109.
- Hecht S.S. (2002). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Molec. Mutag.* 39(2):119-126.
- Jana N.R., Sarkar S., Yonemoto J., Tohyama C., Sone H. (1998). Strain differences in cytochrome P451A1 gene expression caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver: Role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 248:554-558.
- Lóriga E., Alfonso B., Socorro M., Ortega J., Pomares Y. (2001). Evaluación genotóxica de la vacuna VAMENGOC-BC® empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. *An. Toxicol*. 1(1):25-29.
- Mañas F., González M.B., García H., Weyers I., Ugnia L., Larripa IB., Gorla N. (2006). La genotoxicidad del herbicida Glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *THEORIA*. 15(2):53-60.

- Matuo R., Oliveira R.J., Silva A.F., Mantovani M.S., Ribeiro L.R. (2007). Anticlastogenic activity of aqueous extract of *Agaricus blazei* in Drug-Metabolizing cells (HTCs) during cell cycle. *Toxicol. Mecha. Method.* 17(3):147-152.
- Mortelmans K., Rupa D. (2004). Current Issues in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Adv. Applied. Microbiol.* 56(3):379-397.
- OECD. (1997). Guideline for the testing of chemical. *Directrices de OECD TG 475 (Genetic Toxicology: In vivo Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells).* Anex B11; USA. p. 5-6.
- Rezvanfar M.A., Sadrkhanlou R.A., Ahmadi A., Shojaei H., Rezvanfar M.C., Mohammadirad A. (2008). Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 27:901-910.
- Rossello P., Olivé J., Munuera E., Gonzáles T.H., Rodriguez E. (2006). Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España. p. 2-3.
- Shayne C.G. (2007). Animal Models in toxicology. Chapter 2, The Mouse. *Toxicology.* Second edition. New York (U.S.A): Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group, LLC. p. 24-72.
- Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V., Gill L. (2000). Olive oil diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *J. Epidemiol.* 134(2):756-760.
- Tice R.R., Hayashi M., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mut. Res.* 312:305-312.
- Wyrobek A.J. (1983). An evaluation of the sperm morphology test in experimental animals and other sperm test in humans. *Mut Res.* 115(3):73-148.

***IN VITRO* APPROACH TO THE STUDY OF CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF X-RAYS**

Ponzinibbio M.V.^{1,2}, Peral-García P.^{1,2}, Seoane A.^{1,2,*}

¹IGEVET (UNLP-CONICET), La Plata, Argentina

²CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina

*Corresponding Author: aseoane@fcv.unlp.edu.ar

ABSTRACT

The present research was undertaken in order to study the effect of repeated low doses of radiation on two different cell lines from the same species. An *in vitro* model test was developed to avoid the influence of the confounding factors affecting epidemiological studies and to simulate a chronic exposure (50 mSv of x-rays during ten consecutive days). Comet assay and early apoptosis were analyzed immediately after exposure and after chronic irradiation. Sequential irradiation induced an increase of cells showing DNA damage. Index Damage was higher than that of the controls in both cell lines immediately after exposure and after chronic irradiation. These differences between exposed and control cells were statistically significant only for the transformed cell line after chronic irradiation ($p < 0.001$). Significantly higher levels of apoptosis were scored after chronic exposure in both cell lines ($p < 0.001$). The induction of DNA damage and apoptosis in hamster cells by chronic exposure to low dose ionizing radiation was demonstrated. Cell types reacted differently to chronic exposure. Though further investigation is needed to understand the mechanisms of radiation effects on chronic low-dose-exposed cell populations, cellular type should be taken into account in the design of *in vitro* experiments to understand low-dose-irradiation effects.

Key words: apoptosis, comet assay, *in vitro*, ionizing radiation, low dose

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con el fin de estudiar el efecto de dosis bajas y repetidas de radiación sobre dos líneas celulares de la misma especie. Se desarrolló un modelo *in vitro* para evitar la influencia de los factores de confusión que afectan a los estudios epidemiológicos y para simular una exposición crónica. Las técnicas utilizadas fueron el ensayo cometa y el análisis de apoptosis temprana; estas se llevaron a cabo inmediatamente después de la exposición y luego de la irradiación crónica. La irradiación secuencial indujo un aumento de células con daño en el ADN. El índice de daño fue mayor que el de los controles en ambas líneas celulares, tanto inmediatamente después de la exposición como luego de la irradiación crónica. Este aumento fue estadísticamente significativo solamente para la línea celular transformada luego de la irradiación crónica ($p < 0,001$). El análisis de apoptosis arrojó niveles significativamente mayores al control para ambas líneas celulares luego de la exposición crónica ($p < 0,001$). Se demostró que la exposición crónica a radiación ionizante de dosis bajas indujo daño en el ADN y apoptosis en células de hámster chino cultivadas *in vitro*. Las respuestas de ambos tipos celulares fueron algo diferentes. Evidentemente, el tipo celular debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar experimentos *in vitro* para entender los efectos de la radiación crónica de dosis baja en las poblaciones celulares.

Palabras clave: apoptosis, ensayo cometa, *in vitro*, radiación ionizante, dosis bajas

INTRODUCTION

Living beings are permanently exposed to ionizing radiation emitted either from natural or anthropogenic sources. Although for public health purposes the overall risks of cancer are assumed to increase in proportion to the dose of ionizing radiations (Upton, 2002), the effects caused by low-dose irradiation differ from those caused by high-dose irradiation. Assessment of risks that might be attributable to low level acute, or even chronic, radiation exposure entails the use of models that enable a better understanding of the underlying mechanisms of such exposures. In this sense, there is increasing evidence that low doses of radiation might induce other phenomena such as bystander effects and adaptive responses (Azzam *et al.*, 1998; Venkat *et al.*, 2001; Sawant *et al.*, 2002; Ballarini *et al.*, 2002; Little *et al.*, 2002).

Most of the studies of radiation exposures and mutagenesis have been carried out either *in vivo* with exposed human populations or *in vitro* with cell lines irradiated with single radiation doses. An *in vitro* model test was developed to avoid the influence of the confounding factors affecting epidemiological studies and to simulate a chronic exposure. This model allowed the preservation of controlled conditions by using cultured cells exposed daily to x-rays. Induction of chromosomal aberrations and DNA damage by repeated exposure to very low doses of x-rays were described in our laboratory by means of this approach (Güerci *et al.*, 2003; 2004; 2005). However, these findings may be limited to the cell line employed and they may, consequently, not be a generalized phenomenon caused by repeated low doses of radiation.

The present research was undertaken in order to study the genetic effect of repeated low doses of radiation on two different cell lines from the same species: one is the transformed, epithelial-like and aneuploid Chinese Hamster Ovary (CHO) and the other, which originated from a primary culture, is the fibroblastic, diploid and non-transformed Chinese Hamster Embryo Diploid (CHED).

The single cell gel electrophoresis assay, a sensitive and rapid method to determine the level of DNA damage in terms of strand breaks and alkaline labile sites (Wojewodzka *et al.*, 1998; Møller *et al.*, 2000; Collins, 2004) was used. In addition,

apoptosis induction was evaluated by means of Annexin V-FITC marked.

MATERIAL AND METHODS

Cells

CHO cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and CHED cells were kindly provided by Professor A.T. Natarajan. They were cultured in Ham's F10 medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Natocor Laboratories, Province of Cordoba, Argentina) and antibiotics (50 IU penicillin and 50 µg/ml streptomycin) (Bagó Laboratories, Buenos Aires, Argentina) in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were cultured in Falcon T-25 (Nunc, Denmark).

Experimental design

Two flasks for each cell line were cultured for ten days. One of them was employed as negative control and the other was irradiated daily at the same hour. Control and irradiated populations were assayed immediately after the first and the tenth irradiations. Following the first irradiation, cells were trypsinized, resuspended and divided into various fractions. One was kept in culture to obtain the repeatedly exposed population and aliquots were separated for comet assay and apoptosis analysis. After ten days, cells were tested again for the same assays. The doubling time of CHO and CHED cells under these culture conditions was periodically checked in the laboratory by the bromodeoxyuridine technique (BrdU); it varies between 12-15 h. Each experiment was repeated twice. Average values are shown in the tables below. Analysis was carried out blinded by one investigator.

Irradiation conditions

The radiation dose employed (50 milisievert=mSv) (≈50 mGy) was determined taking into account previous experience in our laboratory (Güerci *et al.*, 2003; 2004; Seoane *et al.*, 2007) and the dosimetry reported in other epidemiological studies (Barquinero *et al.*, 1993; Paz y Miño *et al.*, 1995; Balakrishnan and Rao, 1999; He *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2001; Maluf and Erdtmann, 2000;

Cavallo *et al.*, 2002). The x-ray apparatus was supplied by Dental San Justo Company (Buenos Aires, Argentina) and operated at 65kV and 5 mA. Doses were determined by using a dosimeter Keithley Digital 35617 EBS microchamber PTW N 2336/414 (C-Com Industries, Robertville, MO, USA) which was employed at a dose rate of 50 mSv/min. Radiation was administered from above through the medium at exposure times of 60 seconds. For the irradiation treatment, 10 ml of fresh medium were placed on the attached cells to prevent cell detachment from occurring.

Comet Assay

Single cell gel electrophoresis was performed by employing the alkaline version described by Singh and coworkers (1988) with some modifications (Tice and Strauss, 1995). Briefly, slides were covered with a first layer of 180 μ l of 0.5% normal agarose (Carlsbad, CA, USA). An amount of 75 μ l of 0.5% low melting point agarose (Carlsbad, CA, USA) was mixed with approximately 15,000 cells suspended in 15 μ l and layered onto the slides, which were then immediately covered with coverslips. After agarose solidification at 4°C for 10 min, coverslips were removed and slides were immersed in fresh lysis solution at 4°C overnight. The slides were equilibrated in alkaline solution for 20 min. Electrophoresis was carried out for 30 min at 25 V and 300 mA (1.25 V/cm). The slides were subsequently neutralized by washing them three times with Tris buffer (pH 7.5) every 5 min and then in distilled water. The slides were stained with 1/1000 SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) solution (Olive, 1999). A total of 400 randomly selected comet images were analyzed per treatment. Data were statistically analyzed with the X²-test with the Statgraphics® 5.1 software.

Scoring was made at 400x magnification by means of a fluorescent microscope (Olympus BX40 provided with a 100 W high pressure mercury lamp (USHIO USH 102 D) and a 515-560 nm excitation filter. Images were captured with a Sony 3 CCD-IRIS Color Video Camera and saved by using Image Pro Plus® software. The comet assay was carried out blinded on coded slides.

Based on the extent of strand breakage, cells were classified according to their tail length in five categories, ranging from 0 (no visible tail) to 4 (still

a detectable head of the comet but most of the DNA in the tail) (Olive, 1999; Collins, 2004) (Fig. 1). In order to quantify DNA damage from the comets, the measuring method of Collins (2004) was used. Index Damage (ID) was obtained: if 100 comets are scored and each comet is assigned a value of 0 to 4 according to its category, the total score for the sample gel will be between 0 to 400 “arbitrary units”. Visual scoring (arbitrary units) is rapid as well as simple and there is a very close agreement between this method and computer image analysis (percentage of DNA in tail) (Collins, 2004).

$$ID = \frac{(\text{Degree1x1}) + (\text{Degree2x2}) + (\text{Degree3x3}) + (\text{Degree4x4})}{\text{Total}} \times 100$$

Analysis of apoptosis by Annexin V /PI staining assay

Early apoptosis as evaluated by membrane redistribution of phosphatidylserine was examined by using an Annexin V-FITC. Externalization of phosphatidylserine (PS) to the outer side of the plasma membrane is one of the earliest features of cells undergoing apoptosis, which can be marked by Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein with a very high affinity for PS (Todd Allen *et al.*, 1997; van Engeland *et al.*, 1998). By conjugating fluorescein isothiocyanate to Annexin V, it is possible to identify and quantify apoptotic cells. Briefly, cells were washed twice with binding buffer, resuspended in 0.1 ml of FITC-Annexin V (1 mg/ml final concentration), incubated for 10 min in the dark at room temperature, washed twice in binding buffer, added to 0.1 ml of PI solution (1 mg/ml final concentration) and analyzed under a fluorescence microscope. A total of 1000 cells were scored per experimental point. Data were statistically analyzed with the X²-test with the Statgraphics® 5.1 software.

RESULTS

Tables 1 to 4 summarize the results derived from the present study. Sequential irradiation induced an increase of cells showing DNA damage. Index Damage was higher than that of the controls in both cell lines, not only immediately after exposure (50 mSv) but also after chronic irradiation (500 mSv); these differences between exposed and control cells

were statistically significant only for CHED cells after chronic irradiation ($p < 0.001$). In addition, differences between cell exposed one time and those exposed 10 times were evaluated, these differences were statistically significant only for CHED cells ($p = 0.05$).

When comparison was made between cell lines, CHO and CHED cells showed similar damage level upon being scored immediately after the first exposure (no significant differences). Following chronic irradiation, the responses from both cellular types were quite different. Index Damage scored in CHED cells was significantly higher than that scored in CHO cells ($p < 0.01$).

Early apoptosis results are summarized in Table 5. Both cell lines showed significant levels of apoptosis when they were scored immediately after exposure and at the end of the experiment ($p < 0.0001$). Significantly higher frequency of apoptosis was also observed at the end than at the beginning of the experiment ($p < 0.0001$, CHO; $p < 0.01$ CHED). When comparison was made between cell lines, CHED cells showed significantly more apoptosis ($p < 0.0001$) than CHO cells at both sample times.

DISCUSSION

When cells are exposed to low doses of ionizing radiation, one of the most important kinds of damage is double-strand breaks (Gollin, 2005). In response to the introduction of DSB into DNA, eukaryotic cells trigger a cascade of mechanisms that lead first to the cell cycle arrest and then to DNA repair if possible. When repair is wrong or not possible, a cell should die or remains damaged (Morgan, 2003; Mothersill and Seymour, 2003). Single cell gel electrophoresis (SCGE) or comet assay is a rapid and sensitive fluorescent microscopic method that allows measurement of DNA strand breaks in individual cells (Singh, 2000). In its alkaline version, it detects DNA damage as single-stranded and/or double-stranded DNA breaks in eukaryotic genome, as well as alkali-labile sites, incomplete DNA repair sites, and changes in structural chromosome configuration (Tice *et al.*, 2000). Our results indicate that continuous x-ray exposure for 10 days at 50 mSv/day induces DNA-damage and apoptosis in these cell lines. In this context, these

results are consistent with our previous findings with lower doses of X rays (2.5 to 10 mSv) (Güerci *et al.*, 2004; 2005) and those of other authors (Vijayalaxmi *et al.*, 1993; Wojewodzka *et al.*, 1998; Sudprasert *et al.*, 2006) who found DNA damage after exposure to doses of 50 mGy (≈ 50 mSv) of ionizing radiation in other cellular types.

Based on direct epidemiological evidence of human populations, Brenner and colleagues (2003) claim that when exposure occurs at doses above 50-100 mSv (protracted exposure) or 10-50 mSv (acute exposure) the risk of some types of cancer increases. According to Mothersill and Seymour (2003), the results obtained could be explained by assuming that cells do not recover well after the first exposure. Genetic changes could be accumulated during the experiment as a result of the direct effect of radiation, genomic instability or other non-targeted phenomena. Some authors have reported the relationship between radiation induced genetic instability and the events of spontaneous apoptosis and increased reproductive cell death (Limoli *et al.*, 1998; Mendonca *et al.*, 1999; Chang and Little, 1992; Jamali and Trott, 1996).

The response of CHED cells was quite different from that of CHO cells. Different probabilities of DSB conversion into lethal lesions or different repair capacities could be suggested to explain this. In this respect, McLachlan-Burgess and coworkers (2006) reported differences in the response to low dose ionizing radiation-induced DNA damage and increased reactive oxygen species between normal human fibroblasts and cancerous cells while other authors observed an adaptive response in normal cells but not in tumor ones (Jiang *et al.*, 2008). The differences between both cell lines may indicate that in the low dose region, the response to radiation depends as much on the characteristics of the cell population as on the dose employed (Little *et al.*, 1989; Crompton *et al.*, 2002).

On the other hand, Index Damage appears to be a sensitive parameter as also found by some authors in different cell types (Collins *et al.*, 1995; da Silva *et al.*, 2000). Its use as a parameter of the comet assay was reported by Maluf and coworkers (2001) and Martino-Roth and coworkers (2003) in human lymphocytes exposed to radiation doses similar to those used in the present study. In the latter, Index Damage turned out to be useful to detect DNA

damage in CHO and CHED cells exposed to low-dose X-rays. This index not only allows the observation of significant differences between control and treated cells but also between the two different cell types.

The induction of DNA damage and apoptosis in hamster cells by chronic exposure to low-dose- ionizing radiation was demonstrated. Transformed and non-transformed cell types react differently to direct and indirect damage when using low-dose repeated exposures to ionizing radiation. Though further investigation is needed to understand the mechanisms of radiation effects on chronic low-dose-exposed cell populations, cellular type should be taken into account in the design of *in vitro* experiments to understand low-dose-irradiation effects.

Treatment	DNA damage level (%)					Index Damage
	Degree 0	Degree 1	Degree 2	Degree 3	Degree 4	
Negative	83.13	10.42	4.22	1.74	0.50	26.05
Control	(0.37)	(0.31)	(0.20)	(0.13)	(0.07)	
50 mSv	76.21	15.35	5.37	2.05	1.02	36.32
x-rays	(0.43)	(0.36)	(0.23)	(0.14)	(0.10)	

Table I. DNA damage CHO cells analyzed immediately after exposure to 50 mSv x-rays. Standard error of the mean is indicated between parentheses.

Treatment	DNA damage level (%)					Index Damage
	Degree 0	Degree 1	Degree 2	Degree 3	Degree 4	
Negative	77.78	18.52	2.47	1.23	0.00	27.16
Control	(0.42)	(0.39)	(0.16)	(0.11)	(0.00)	
50 mSv	67.99	26.22	4.57	0.00	1.22	40.24
x-rays	(0.47)	(0.44)	(0.21)	(0.00)	(0.11)	

Table II. DNA damage in CHO cells analyzed after ten days of chronic exposure to 50 mSv x-rays. Standard error of the mean is indicated between parentheses.

Treatment	DNA damage level (%)					Index Damage
	Degree 0	Degree 1	Degree 2	Degree 3	Degree 4	
Negative	83.66	13.86	2.48	0.00	0.00	18.81
Control	(0.37)	(0.35)	(0.16)	(0.00)	(0.00)	
50 mSv	74.00	14.50	11.50	0.00	0.00	37.50
x-rays	(0.44)	(0.35)	(0.32)	(0.00)	(0.00)	

Table III. DNA damage in CHED cells analyzed immediately after exposure to 50 mSv x-rays. Standard error of the mean is indicated between parentheses.

Treatment	DNA damage level (%)					Index Damage
	Degree 0	Degree 1	Degree 2	Degree 3	Degree 4	
Negative	82.50	11.00	6.00	0.50	0.00	24.50
Control	(0.38)	(0.31)	(0.24)	(0.07)	(0.00)	
50 mSv	67.50	17.00	10.50	4.00	1.00	54.00
x-rays	(0.47)	(0.38)	(0.31)	(0.20)	(0.10)	

Table IV. DNA damage in CHED cells analyzed after ten days of chronic exposure to 50 mSv x-rays. Standard error of the mean is indicated between parentheses.

Treatment	Apoptosis (%)			
	CHO cells		CHED cells	
	Day 1	Day 10	Day 1	Day 10
Negative	50 (0.06)	80 (0.28)	99 (0.34)	121 (0.56)
Control				
50 mSv x-rays	94 (0.14)	153 (0.29)	188 (0.41)	228 (0.53)

Table V. Frequency of FITC-Annexin V positive cells analyzed after ten days of chronic exposure to 50 mSv x-rays. Standard error of the mean is indicated between parentheses.

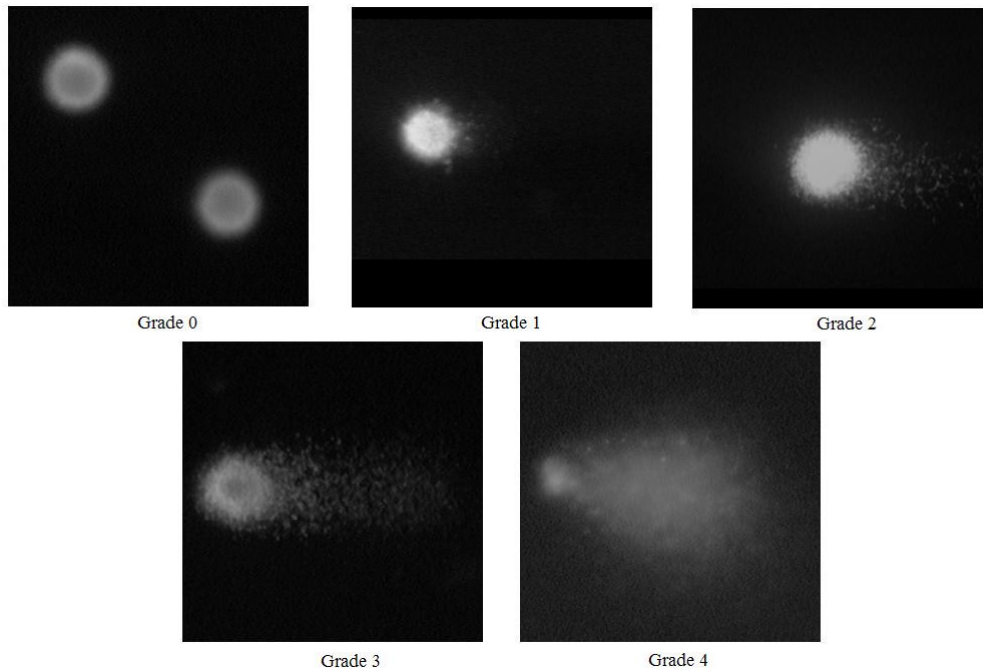


Figure 1. Cell classification according to their tail length. Categories: 0 (no visible tail) to 4 (still a detectable head of the comet but most of the DNA in the tail).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant PIP 5583 from CONICET (*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*), grant PICT 14329 from ANPCyT (*Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica*) and grant 11-V138 from UNLP (*Universidad Nacional de La Plata*), Argentina. Authors are grateful to Prof. Juan Andrieu for the calibration of the irradiation equipment and to Professor of English, Ms. Ana Insausti, for the style revision of this manuscript.

BIBLIOGRAPHY

Azzam E.I., de Toledo S.M., Gooding T., Little J. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Rad. Res.* 150:497-504.

Balakrishnan S. and Rao S. (1999). Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of occupational workers exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat. Res.* 442:37-42.

Ballarini F., Biaggi M., Ottolenghi A., Sapora O. (2002). Cellular communication and bystander effects: a critical review for modelling low dose radiation action. *Mutat. Res.* 501:1-12.

Barquinerio J.F., Barrios L., Caballin M., Miró R., Ribas M., Subias A., Egozcue J. (1993). Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low low levels of ionizing radiation. *Mutat. Res.* 286:275-279.

Brenner D.J., Doll R., Goodhead D., Hall E., Land C., Little J., Lubin J., Preston D., Preston R., Puskin J., Ron E., Sachs R., Samet J., Setlow R., Zaider M. (2003). Cancer risk attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc. Nat. Acad. Scs. (USA)* 25:13761-13766.

Cardoso R., Takahashi-Hyodo S., Peitl P. Jr., Ghilardi-Neto T., Sakamoto-Hojo E. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing

- radiation. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21:431-439.
- Cavallo D., Marinaccio A., Perniconi B., Tomao P., Pecoriello V., Moccaldi R., Iavicoli S. (2002). Chromosomal aberrations in long-haul air crew members. *Mutat. Res.* 513:11-15.
- Chang W.P. and Little J.B. (1992). Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation is associated with delayed reproductive death phenotype. *Mutat. Res.* 20:191-199.
- Collins A. (2004). The comet assay for DNA damage repair. *Mol. Biotechnol.* 26:249-260.
- Collins A., A1-Guo M., Duthie S. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 36:69-77.
- Crompton N., Shi Y., Wuergler F., Blattmann H. (2002). A single dose of X-rays induces high frequencies of genetic instability (aneuploidy) and heritable damage (apoptosis), dependent on cell type and p53 status. *Mutat. Res.* 17:173-86.
- da Silva J., de Freitas T., Heuser V., Marinho J., Erdtmann B. (2000). Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:270-278.
- Gollin S.M. (2005). Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin. Cancer Biol.* 15:3-42.
- Güerci A., Dulout F., Seoane A. (2003). Cytogenetic analysis in Chinese hamster cells chronically exposed to low doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 79:793-799.
- Güerci A., Dulout F., Seoane A. (2004). DNA damage in Chinese hamster cells repeatedly exposed to low doses of X-rays. *Cytogenet. Genome Res.* 104:173-177.
- Güerci A., Dulout F., Grillo C., Seoane A. (2005). Differential response of two cell lines sequentially irradiated with low X-ray doses. *Int. J. Radiat. Biol.* 81:367-372.
- He J., Chen W., Jin L., Jin H. (2000). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat. Res.* 469:223-231.
- Jamali M., Trott K.R. (1996). Persistent increase in the rates of apoptosis and dicentric chromosomes in surviving V79 cells after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 70:705-709.
- Jiang H., Li W., Li X., Cai L., Wang G. (2008). Low-dose radiation induces adaptive response in normal cells, but not in tumor cells: in vitro and in vivo studies. *J. Radiat. Res.* 49:219-230.
- Limoli C.L., Hartmann A., Shephard L., Yang C., Boothman D., Bartholomew J., Morgan W.F. (1998). Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity. *Cancer Res.* 58:3712-3718.
- Little J.B., Azzam E.I., de Toledo S.M., Nagasawa H. (2002). Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals. *Radiat. Prot. Dosimetry* 99:159-162.
- Little J.B., Ueno A., Dahlberg W. (1989). Differential response of human and rodent cell lines to chemical inhibition of the repair of potentially lethal damage. *Radiat. Environ. Biophys.* 28:193-202.
- McLachlan-Burgess A., McCarthy S., Griffin C., Richer J., Cutler R., Pandey S. (2006). Differential response induced by exposure to low-dose ionizing radiation in SHSY-5Y and normal human fibroblast cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135:159-178.
- Maluf S., Passos D., Bacelar A., Speit G., Erdtmann B. (2001). Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay.

- Environ. Mol. Mutagen. 38:311-315.
- Maluf S.W., Erdtmann B. (2000). Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 471:21-27.
- Martino-Roth M., Viégas J., Roth D. (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet. Mol. Res.* 2:410-417.
- Mendonca M., Howard K., Farrington D., Desmond L., Temples T., Mayhugh B., Pink J., Boothman D. (1999). Delayed apoptotic responses associated with radiation-induced neoplastic transformation of human hybrid cells. *Cancer Res.* 59:3972-3979.
- Møller P., Knudsen L., Loft S., Wallin H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9:1005-1015.
- Morgan W.F. (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat. Res.* 159:567-580.
- Mothersill C., Seymour C. (2003). Low-dose radiation effects: experimental hematology and the changing paradigm. *Exp. Hematol.* 31:437-445.
- Olive P. (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 75:395-405.
- Paz y Miño C., Dávalos M., Sanchez M., Arévalo M., Leone P. (1995). Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutat. Res.* 516:57-61.
- Sawant S.G., Zheng W., Hopkins K., Randers-Pehrson G., Lieberman H., Hall E. (2002). The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat. Res.* 157:361-364.
- Seoane A., Güerci A., Dulout F. (2007). Genetic instability induced by low doses of x-rays in hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 83:81-87.
- Singh N., McCoy M., Tice R.R., Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175:184-191.
- Singh N.P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455:111-127.
- Sudprasert W., Navasumrit P., Ruchirawat M. (2006). Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209:503-511.
- Tice R.R., Strauss G.H. (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13:207-214.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutag.* 35:206-221.
- Todd Allen R., Hunter W., Agrawal D. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 37:215-228.
- Upton A.C. (2002). Carcinogenic effects of low-level ionizing radiation: problems and prospects. *In Vivo* 16:527-33.
- van Engeland M., Nieland L., Ramaekers F., Schutte B., Reutelingsperger C. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31:1-9.

- Venkat S., Apte S.K., Chaubey R., Chauhan P. (2001). Radioadaptive response in human lymphocytes in vitro. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20:165-175.
- Vijayalaxmi G., Struss R., Tice R. (1993). An analysis of gama-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat. Res.* 292:123-128.
- Wojewodzka M., Kruszewski M., Iwaneňko T., Collins A., Szumiel I. (1998). Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation I. Strand breakage. *Mutat. Res* 416:21-35.



ASSOCIATION PATTERN OF RECIPROCAL TRANSLOCATIONS INDUCED BY CHEMICALS AND IONIZING RADIATION IN MOUSE GERM CELLS: A COMPARISON BETWEEN SINGLE AND COMBINED TREATMENTS.

J.C. De Luca^{1,3}, E. Ortiz-Jaureguizar^{2,3}, P. Posadas^{2,3}

¹Instituto de Genética Veterinaria “Fernando Noel Dulout” (IGEVET). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata - CONICET. 60 y 118 s/n B1900AVW La Plata. Argentina.

²Laboratorio de Sistemática y Biología Evolutiva (LASBE). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Paseo del Bosque s/n B1900FWA. La Plata. Argentina.

³CONICET

jdeluca@fcv.unlp.edu.ar
eortiz@fcnym.unlp.edu.ar
posadas@fcnym.unlp.edu.ar

ABSTRACT

The similarity degree of chemical, ionizing radiation, and combined treatments of chemical plus ionizing radiation in their capacity to induce reciprocal translocations was analyzed by means of multivariate analysis techniques on mice germ cells. The effect of three different doses of gamma rays, four doses of X-rays, and different doses of adriamycin, mitomycin C, thio-tepa and bleomycin, as well as the combined treatments of two doses of gamma rays with adriamycin, mitomycin c and thio-tepa, were studied. Our objectives were: 1) to determine the degree of similarity between the effects of chemicals and ionizing radiations in relation to the induction of reciprocal translocations in germ cells; and 2) to test the conclusions reached by previous authors using only single treatments. Data were arranged in a basic data matrix, analyzed by cluster analysis and ordination methods. The results showed that: 1) as single and combined treatments were grouped together, there was not a specific pattern of chromosomal aberration induced for physical and chemical agents; 2) the association degree between single treatments was similar to that obtained by previous authors, although in this analysis combined treatments were added; and 3) some combined treatments using 9 Gy and drugs appear in different groups, although we expected that all the combined treatments of drugs with 9 Gy were grouped together. As a working hypothesis, we propose that the variability observed when the different treatments were compared could be dose dependent.

Key words: Chromosome aberrations; multivalent configurations; chromosomal damage; multivariate analysis.

RESUMEN

Por medio de técnicas de análisis multivariado se determinó el grado de similitud de distintos agentes químicos y radiaciones ionizantes en la inducción de translocaciones recíprocas en células germinales de ratón. Se comparó el efecto de tres diferentes dosis de rayos gamma, cuatro dosis de rayos X y distintas dosis de adriamicina, mitomicina C, thio-tepa y bleomicina, así como también los tratamientos combinados con dos dosis de rayos gamma con adriamicina, mitomicina C y thio-tepa, y cuatro de rayos X. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar el grado de similitud entre los tipos de translocaciones recíprocas inducidas por los agentes químicos y las radiaciones ionizantes; y 2) comparar estos resultados con los obtenidos previamente por otros autores al comparar los tratamientos individuales. Para la comparación de los diferentes tratamientos se elaboró una matriz de datos analizada por medio de técnicas de agrupamiento y de ordenación. Los resultados revelaron que: 1) los tratamientos simples y combinados se agruparon juntos, indicando la falta de un patrón específico de aberraciones inducido; 2) el grado de asociación entre los tratamientos simples no se vio modificado, a pesar de la incorporación de los tratamientos combinados; y 3) algunos tratamientos combinados con 9 Gy y las diferentes drogas se asociaron con otros tratamientos, en lugar de asociarse juntos como era de esperarse teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores. Como hipótesis de trabajo, proponemos que la variabilidad observada en los diferentes tratamientos podría ser dependiente de la dosis empleada.

Palabras clave: Aberraciones cromosómicas, configuraciones multivalentes, daño cromosómico, análisis multivariado.

INTRODUCTION

Genetic damage can be induced by different agents, being the DNA molecule the main target. These agents can interact with the DNA molecule in a different way through the induction of DNA double and single-strand break cross-links and base damage. In all cases the primary lesions must be amplified to be detected as chromosomal aberrations. On the other hand, ionizing radiations can interact with macromolecules or cellular structures in two ways: a), when the damage is directly induced in the macromolecules by ionized particles and b), when the damage is induced by free radicals produced by ionization of cell water. Raser and O'Shea (2005) proposed that radiation induces reactive oxygen species (ROS). This species induce genomic instability. The persistence of ROS indicates a continuous turnover of oxidative species perpetuating a source of damage over time that could account for the delayed damage observed (Morgan, 2003; Limoli et al., 2003).

In a similar way some chemicals like adriamycin (ADR), mitomycin C (MMC) and bleomycin (BLM) can interact with DNA in different ways such as intercalation, DNA adduct formation and free radical induction, respectively (Povirk and Austin, 1991); (Povirk, 1996); (Sanderson and Shield, 1996). The analysis of reciprocal translocations induced by physical and chemical agents in mammalian germ cells includes multivalent configuration types and frequencies.

The germinal epithelium is very sensitive to radiation-induced damage, with changes to spermatogonia following as little as 0.2 Gy. Testicular doses of less than 0.2 Gy had no significant effect on FSH levels or sperm counts, whereas doses between 0.2 and 0.7 Gy caused a transient dose – dependent increase in FSH and reduction in sperm concentration, with a return to normal values within 12 – 24 months. No threshold dose has been determined in cases of azoospermia standing; however, doses of 1.2 Gy and above are likely to be associated with a reduced risk of recovery of spermatogenesis. The time to recovery, if it is to occur, is also likely to be dose dependent (Howell and Shalet, 2005). The spermatogenesis can be affected by ionizing radiation (Hacker-Klomp et al., 1984) to the high sensitivity of the germ

cells induces both cell death as well as increase the sensibility to the induction of mutations (Van Buul *et al.*, 1995). The heterogeneity in the radiosensitivity of the various cell types during spermatogenesis is well known. Despite the fact that spermatids are considered to be among the populations most susceptible to genetic damage (Meistrich, 1993), spermatogonia are the precursors of the next generations of developing and mature germ cells (Russel *et al.*, 1998). The induction of translocations in diakinesis metaphase is used to evaluate the mutagenic effect of ionized radiations in mammals. This test detects the frequency of reciprocal translocations induced in spermatogonia and predicts the genetic damage in F1 (Stubbs *et al.*, 1997). The knowledge of the fate of induced translocations in spermatogonia is especially important in the precise evaluation of genetic risk. Genetically impaired spermatogonia from meiosis form spermatozoa with nonbalanced, balanced or normal genome. This situation could be responsible for the appearance of dominant lethal mutations, offspring with multiple abnormalities, as well as phenotypically normal, heterozygous translocations in the progeny (Schwartz *et al.*, 1986; Matsuda *et al.*, 1991; Sonta, 2004).

De Luca *et al.* (2000) analyzed the similarity relationships between single treatments of chemical and physical agents, using as features different kind of multivalent configurations. These authors found that: 1) there was not a specific pattern of chromosomal damage induction for physical and chemical agents using presence/absence data; 2) the increase in the amount of reciprocal translocation observed with 9 and 10 Gy was due to an increase in the kind of multivalent configuration, and could have been dose dependent; and 3) the similarity observed in the group formed by the chemicals and the lower doses of ionizing radiation could also have been dose dependent.

In this paper we add combined treatments of drugs and/or ionizing radiations to the single treatments analyzed by (De Luca *et al.*, 2000). Using the same methodology our objectives were: 1) to determine the degree of similarity or difference between the effects of chemicals and ionizing radiations in relation to the induction of reciprocal translocations in germ cells; and 2) to test the conclusions reached by these authors.

MATERIALS AND METHODS

Operational taxonomic unit (OTU) selection

Relationships between three gamma rays (GR) doses (1, 5, and 9 Gy), different doses of the chemicals ADR, MMC, BLM and thio-tepa (TT), as well as several combined treatments (*i.e.*, chemical plus ionizing radiation) were analyzed. Data were obtained from experiments carried out in male BALB/c mice (De Luca *et al.*, 1988; 1990a, b). In addition, data obtained from van Buul and Léonard (1980) about the effect of 0.25, 0.50, 0.75, 1, and 10 Gy of X-rays (XR) were included in the analysis. Table I summarizes the different treatments considered. Some of the 22 treatments induced the same types of reciprocal translocations (*i.e.*, ADR5-MMC-0.75-1 Gy; TT-BLM20-BLM40; 5 Gy-BLM60), although frequencies were different (van Buul and Léonard 1980; De Luca *et al.*, 1988; 1990a, b). Data were not clustered since this procedure did not modify the obtained results.

AGENT	DOSE	NUMBER OF ANIMALS STUDIED
ADR	5 mg/Kg	11
ADR	10 mg/Kg	4
MMC	2 mg/kg	8
BLM	20 mg/Kg	6
BLM	40 mg/Kg	6
BLM	60 mg/Kg	6
TT	0.2 mg/Kg	7
GR	1 Gy	4
GR	5 Gy	10
GR	9 GY	11
XR*	0.25 Gy	10
XR*	0.50 GY	10
XR*	0.75 Gy	10
XR*	10 GY	9
ADR + GR	5 mg/Kg + 5 Gy	7
ADR + GR	5 mg/Kg + 9 GY	6
ADR + GR	10 mg/Kg + 5 GY	4
ADR + GR	10 mg/Kg + 9 Gy	4
MMC + GR	2 m/Kg + 5 GY	10
MMC + GR	2 mg/Kg + 9 GY	8
TT + GR	0.2 mg/Kg + 5 GY	8
TT + GR	0.2 mg/Kg + 9 GY	10

Table I. Experimental protocol employed to compare reciprocal translocations types induced by the different treatment

Data accumulation

The data considered included 14 variables, *i.e.*, reciprocal translocations, induced in stem cell spermatogonia and scored as multivalent configurations in diakinesis-metaphase I. All variables were qualitative and scored as presence/absence. Table II summarizes the different configurations considered and their corresponding codifications.

MULTIVALENT CONFIGURATIONS (VARIABLES)	CODIFICATION
(A) 18 II + 1 C IV	Present (1) Absent (0)
(B) 18 II + 1 R IV	Present (1) Absent (0)
(C) 18 + 1 CIII + 1 I	Present (1) Absent (0)
(D) 17 II + 1 RVI	Present (1) Absent (0)
(E) 17 II + 1 CVI	Present (1) Absent (0)
(F) 16 II + 1 CIV + 1 RIV	Present (1) Absent (0)
(G) 16 II + 2 CIV	Present (1) Absent (0)
(H) 16 II + 2 RIV	Present (1) Absent (0)
(I) 16 II + 1 CVIII	Present (1) Absent (0)
(J) 15 II + 1 CIV + 1 CVI	Present (1) Absent (0)
(K) 15 II + 1 CIV + 1 RVI	Present (1) Absent (0)
(L) 15 II + 1 CVI + 1 RIV	Present (1) Absent (0)
(M) 15 II + 1 RVI + 1 RIV	Present (1) Absent (0)
(N) 14 II + 2 CIV + 1 RVI	Present (1) Absent (0)
TN	Total Number

Table II. Multivalent configuration codification

Data processing

Data were arranged in a basic data matrix (BDM) of 22 OTUs by 14 reciprocal translocation types using single plus combined treatments (Table III). Before accomplishing the multi-varied analysis, the MBD was analyzed to determine: (1) how many types of reciprocal translocations produced each treatment; and (2) in how many treatments each reciprocal translocation appeared. Afterwards, BDM were analyzed by means of two methods: cluster analysis and ordination. Computer analysis was done by means of PAST 2.08 (Hammer *et al.*, 2001) and NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1997). Details about methods and computational procedures can

	18 II +1 C IV	18 II +1 R IV	15 II +1 C VI	15 II +1 C IV	17 II +1 C VI	16 II +2 CIV	16 II +1 C VIII	16 II+ 2 R IV	18 II+ 1 C +1 I	17 II +1 R VI	16 II +1 C VI	14 II +2 C VI	15 II+ 1 R IV	15 II +1 R VI
ADR5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.75 Gy	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1Gy	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADR10	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5Gy	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
BLM60	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9Gy	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
0.25Gy	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0.50Gy	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10Gy	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
TT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLM20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLM40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADR5+5Gy	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ADR5+9Gy	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
ADR10+9Gy	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADR10+5Gy	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC+5Gy	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MMC+9Gy	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
TT+5Gy	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
TT+9Gy	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1

Table III. Basic matrix data (BMD) of single plus combined treatments

be found in Sneath and Sokal (1973) and Crisci and López Armengol (1983).

Cluster analysis

The BDM was transformed into a similarity association matrix (SAM) among OTUs using the Jaccard coefficient Sneath and (Sokal, 1973). SAM served as input in the calculation of a phenogram by the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) (Sokal and Michener, 1958). Cophenetic correlations between the phenogram and SAM input were computed using the cophenetic correlation coefficient (CCC) (Sokal and Rohlf, 1962). If more than one phenogram was obtained, a consensus tree was performed to summarize the results. A consensus tree represents the consensus topology (subset of relationship) of two or more trees, and was obtained by the majority rule consensus

method (Margus and McMorris, 1981). The consensus index C_{ic} (Rohlf, 1982) was employed as a measure of the similarity of the original trees.

Ordination

The SAM obtained in 3.1. was transformed into a scalar product form so that its eigenvalues and eigenvectors could be computed, resulting in a principal coordinate analysis (PCA) (Gower, 1966). The results of the PCA were used as an initial configuration matrix to perform a non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) (Kruskal, 1964a, b). This technique represents dissimilarities among any objects or variables by any point in K-dimensional space, so that the interpoint distances in the K-dimensional space corresponded as much as possible to the observed

distances between the objects. Distances were fitted in K-dimensional space to a monotone function of the original distances with a coefficient called “stress” (Kruskal, 1964a, b). This author suggests verbal evaluations for various levels of stress (S) and goodness of fit (GF):

S	GF
0.40	Poor
0.20	Fair
0.10	Good
0.05	Excellent
0.00	“Perfect”

Local distortions in the graphic representation of the NMDS were estimated by means of the Minimum Spanning Tree (MST). Consequently, MST was used as a visual aid in grouping close points. MST is the shortest possible set of connected lines connecting all points.

RESULTS

BDM Description

Taking into account the 22 treatments, the most frequent reciprocal translocations A (18 II + 1C IV) and B (18 II + 1R IV), which appear at 21 and 19 treatments, respectively, followed at distance by E (17 II + 1 CVI) and F (16 II + 2 CIV), appearing in 8 and 6 treatments, respectively (Fig. 1a). If we discriminate against single and combined treatments, it appeared that the most common translocations were still A and B, although this was more evident in the case of simple treatments (Fig. 1b). Moreover, when the other two translocations were analyzed, these remain the second largest in the combined treatments (Fig. 1c) but in the single treatments F was low, place was occupied by I (18 II + 1 CIII + 1 I) (Fig. 1c). The analysis of the BDM showed that MMC+9Gy and TT+9Gy produced the greatest amount of translocations (10 and 8 respectively), followed by 9Gy and 10Gy (with 7 and 6, respectively) (Fig. 2). It was also noted that: (a) drugs and low and medium doses of radiation produced few translocations (1 to 3) (Fig. 2); (b) in the cases of ADR5, MMC and TT, the number

of translocations increased markedly by combining such drugs with high radiation dose (Fig. 2); (c) and in the case of ADR10, although there was an increase in the number of aberrations when combined with a high dose of radiation, this was much lower than the observed in the case of the other three drugs (Fig. 2).

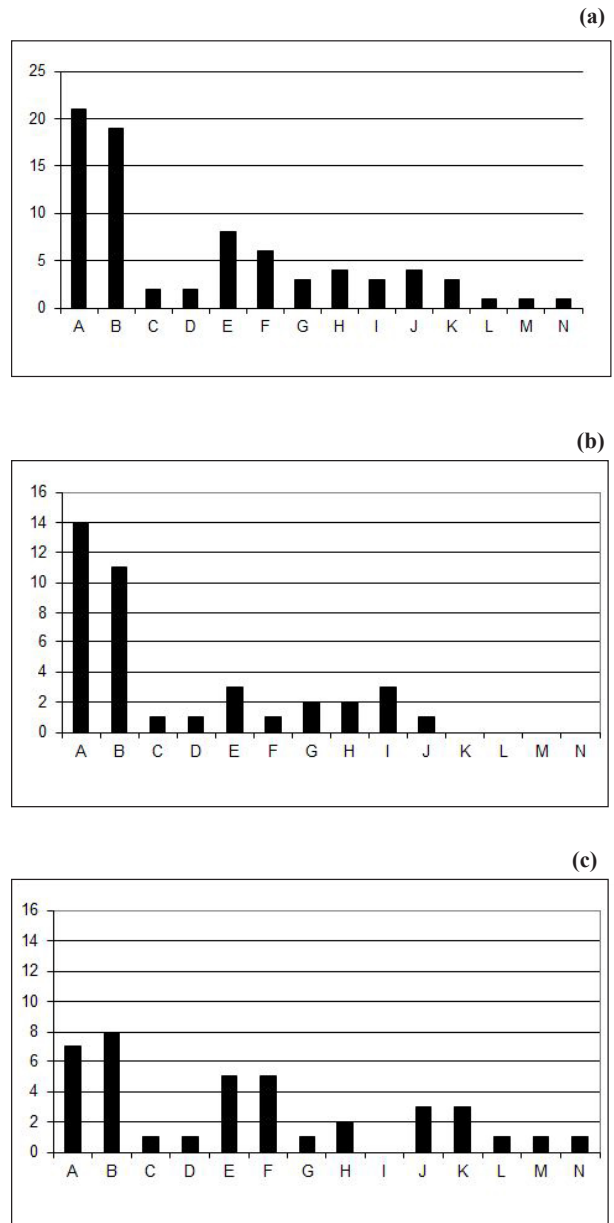


Figure 1. Number of multivalent configurations induced by the different treatments. (a) single plus combined treatments; (b) single treatments; (c) combined treatments. For references, see Table II.

Cluster analysis

We obtained eight phenograms (CCC = 0.93885) of association among OTUs. The consensus tree showed 13 groups (Fig. 3): **(a)** formed by ADR5+5Gy; **(b)** formed by ADR5, MMC, 0.75Gy, 1 Gy, ADR10+5Gy, ADR10, ADR10+9Gy, 5 Gy, BLM 60, 0.25 Gy, 0.50 Gy, TT+5Gy, TT, BLM 20, BLM 40, 9 Gy, ADR5+9 Gy, MMC+5Gy, TT+9Gy, MMC+9Gy, and 10 Gy; **(c)** formed by ADR5, MMC, 0.75Gy, 1 Gy, ADR10+5Gy, ADR10, ADR10+9Gy, 5 Gy, BLM 60, 0.25 Gy, 0.50 Gy, TT+5Gy, TT, BLM 20, and BLM 40; **(d)** formed

by ADR5, MMC, 0.75Gy, 1 Gy, ADR10+5Gy, ADR10, ADR10+9Gy, 5 Gy, BLM 60, 0.25 Gy, 0.50 Gy, and TT+5Gy; **(e)** formed by TT, BLM 20, and BLM 40; **(f)** formed by ADR5, MMC, 0.75Gy, 1 Gy, and ADR10+5Gy; **(g)** formed by ADR10, and ADR10+9Gy; **(h)** formed by 5 Gy and BLM 60; **(i)** formed by 0.25 Gy and 0.50 Gy; **(j)** formed by 9 Gy, ADR5+9 Gy, MMC+5Gy, TT+9Gy, MMC+9Gy, and 10 Gy; **(k)** formed by 9 Gy, ADR5+9 Gy, MMC+5Gy, TT+9Gy, MMC+9Gy; **(l)** formed by ADR5+9 Gy, MMC+5Gy and TT+9Gy; and **(m)** formed by ADR5+9 Gy and MMC+5Gy.

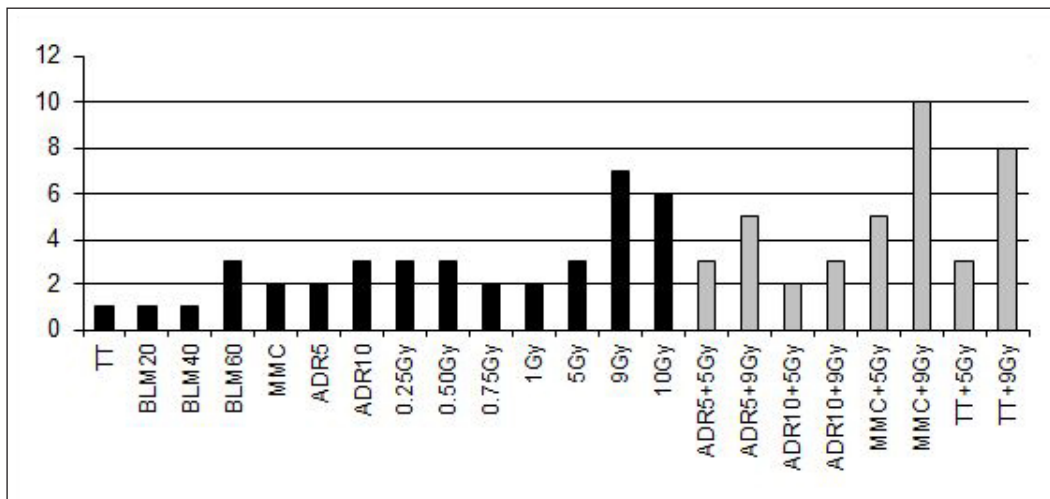


Figure 2. Total number of multivalent configurations scored for the 22 single and combined treatments. References: Black: single treatments; Grey: combined treatments.

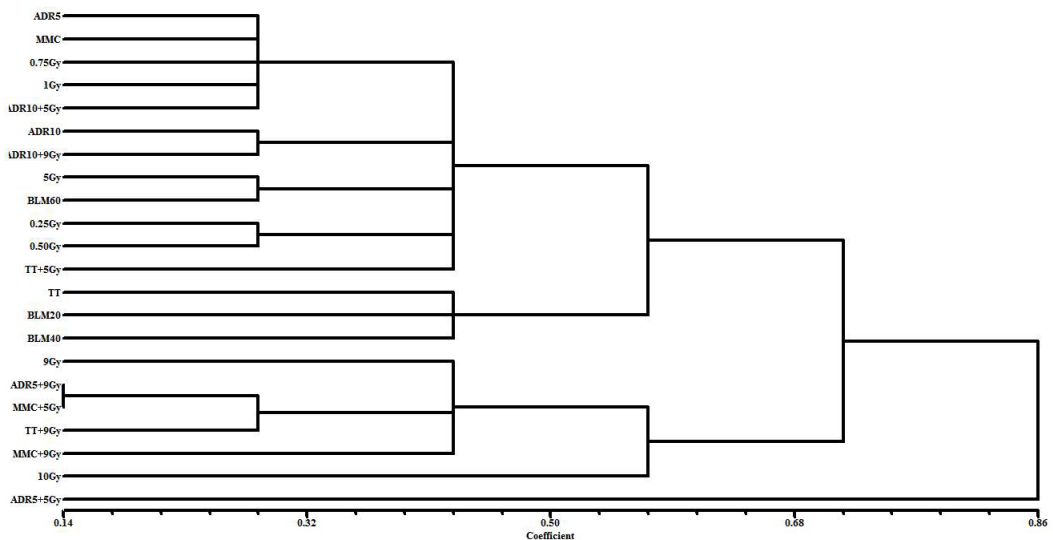


Figure 3. Consensus strict dendrogram showing the common groups among the eight phenograms obtained from the MBD of single plus combined treatments. $CI_c = 0.60$

Ordination

In the bidimensional graphic (Fig. 4) four groups can be recognized. These groups were also found in the strict consensus dendrogram depicted in Fig. 3 [i.e., (a), (d), (e), and (j)].

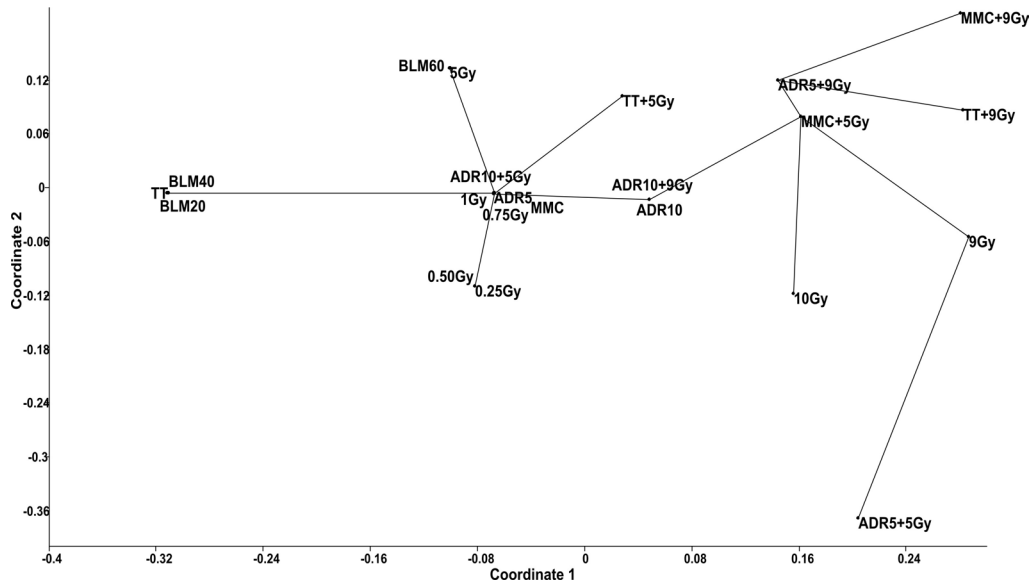


Figure 4. Multidimensional scaling plus minimum spanning tree graphic showing the 22 OTUs (single plus combined treatments) in a bidimensional graphics (axis I-II, 58.66 % of the variance). The final “stress” was 0.03893

DISCUSSION

The results obtained showed that single and combined treatments were grouped together (Figs. 3 and 4). This was an expected result, since nine of the fourteen types of reciprocal translocations were shared (Table III and Fig. 1). Consequently, there was not a specific pattern of chromosomal aberration induced for physical and chemical agents. These results were in concordance with those obtained by De Luca *et al.* (2000) when only single treatments were analyzed, although the multivalent configurations induced by the single treatments were a little less diverse than those induced by combined treatments, and produced, with the exception of 9Gy and 10Gy, a lesser type of reciprocal translocations than combined treatments (Table 3 and Figs. 1 to 5). On the other hand, the association degree between single treatments was similar to that obtained by De Luca *et al.* (2000), although combined treatments were added (compare Figs. 3 and 4 with 5 and 6). For example, the same groups observed in the

consensus dendrogram obtained by De Luca *et al.* (2000) (see Fig. 3, e.g., 0.25Gy-0.50Gy-5Gy-BLM60-ADR5-MMC-0.75Gy-1Gy-ADR10; TT-BLM20-BLM40; 9 Gy-10 Gy) were recovered in the consensus dendrogram of single and combined treatments (Fig. 3).

Although, our new results showed some differences with those of De Luca *et al.* (2000). On the one hand, these authors founded two main groups of reciprocal translocations one included treatments with 9 Gy of GR and 10 Gy of XR, and the other included all the chemical compounds and the remainder doses of GR and XR (Figs. 5 and 6). De Luca *et al.* (2000) concluded that 9 Gy of GR and 10 Gy of XR induced a similar kind of reciprocal translocations and a higher variability of reciprocal translocations than drugs and the remaining doses of radiation (Fig. 5). Additionally, these authors observed that these doses of radiation increased the frequency of reciprocal translocations. Taking

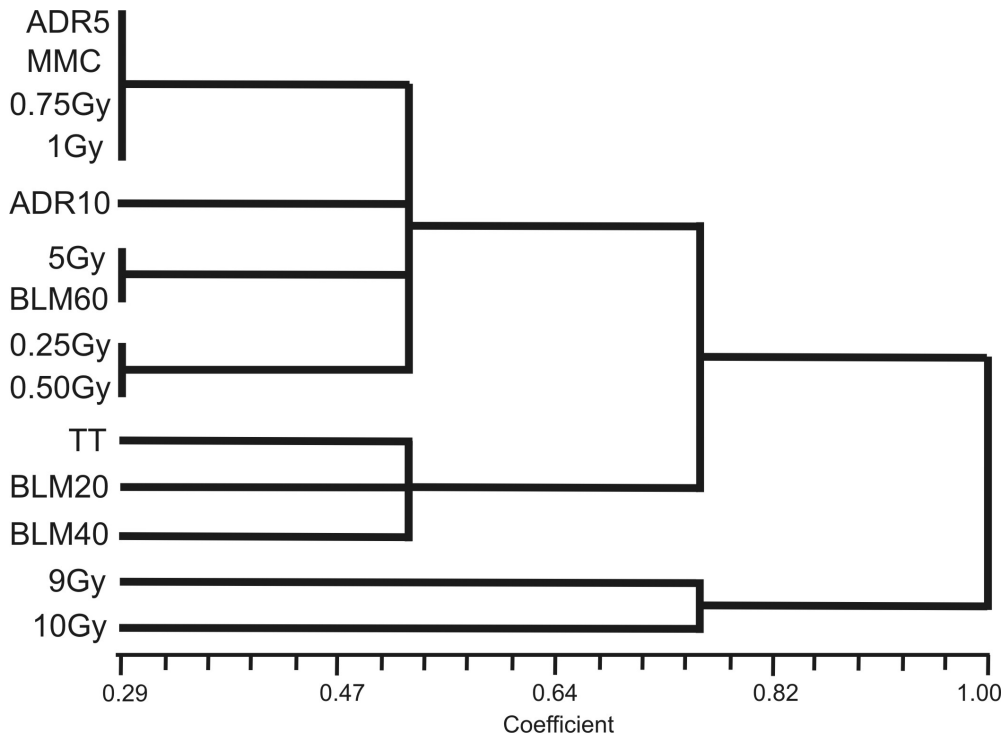


Figure 5. Consensus strict dendrogram obtained from single treatments by De Luca *et al.*, 2000 (Fig. 2).

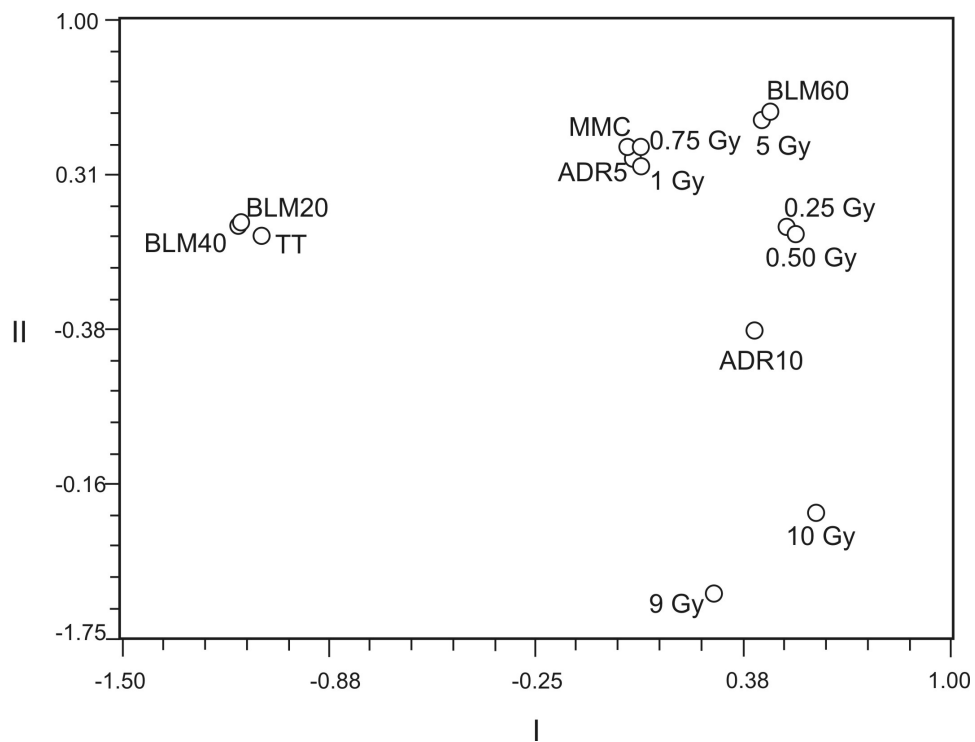


Figure 6. Multidimensional scaling graph obtained from single treatments by De Luca *et al.*, 2000 (Fig. 3)

into account these conclusions, we expected that all the combined treatments of drugs with 9 Gy were grouped together. Although, we found that some combined treatments using 9 Gy and drugs appeared in different locations. Thus, the Figs. 3 and 4 shows that: (1) ADR10+9Gy was grouped with ADR10, and both were related with ADR5, MMC, 0.75 Gy, 1 Gy, ADR10+5Gy, 5 Gy, BLM 60; and (2) MMC+5Gy was located inside the group of the highest radiation doses.

The relationship between ADR10 and ADR10+9 Gy was striking, as both treatments produced the same type of aberrations (Table III and Fig 2). In this case, the addition of 9 Gy of gamma rays did not increase the diversity of aberrations, as in most of the combination in which germ cells were irradiated with this dose of radiation (Table III and Fig 2). If we compare this behavior with ADR5 and ADR5+9 Gy, it appears that ADR5 produces only two types of translocations [the most common, i.e., A (18 II + 1 CIV) and B (18 II + 1 RIV), Table III and Fig .1 a), while ADR10 induce three [A and B plus E (17 II + 1 CVI), also produced by 9 Gy, 10 Gy and some combined treatments; see Table III and Fig 2]. However, ADR5+9 Gy produced five translocations (Table III and Fig 1b), which, two are common with ADR5 and ADR10 (A and B); one (E) is common with ADR10, 9 Gy, 10 Gy and some combined treatments; one [F (16 II + 2 CIV)] shared with 9 Gy and some combined treatments, and the remainder [K (16 II + 1 CIV + 1 RIV)] shared only with MMC+9Gy and TT+9Gy (Table III). Taking into account these results, the similarity observed between ADR10 and ADR10+9Gy could be due to a high enough dose to produce a certain of such cell damage (or death) that the later addition of 9Gy does not find the necessary substrate to produce new types of translocations. This seems to be reinforced by the fact that in the cases of the other drugs tested (i.e., TT and MMC) showed a marked increase in diversity 9Gy combination therapies (Table III and Fig 2).

Adriamycin interact with DNA through different mechanisms, mainly intercalation (ADR) (Warning, 1970) as well as free radicals production (Lambert, 1983; Gewirtz, 1999; Singal *et al.*, 2000). Two different ways of free radical formation by adriamycin have been described. The first way implicates the formation of a semiquinone free

radical by the action of several NADPH-dependent reductases that produce a one-electron reduction of the doxorubicin to the corresponding doxorubicin semiquinone (Olson and Mushlin, 1990; De Beer *et al.*, 2001; Doroshov, J.H., 2006). In the presence of oxygen, redox cycling of adriamycin-derived quinone-semiquinone yields superoxide radicals (Singal *et al.*, 2000). In the second way, adriamycin free radicals come from a non-enzymatic mechanism that involves reactions with iron. For example, Fe⁺³ reacts with adriamycin in a redox reaction after which the iron atom accepts an electron and a Fe⁺² doxorubicin free radical complex is produced (De Beer *et al.*, 2001).

Summing up, our results suggest that the induction of reciprocal translocations in mouse germ cells by single and combined treatments with ADR is dose dependent. The mice injected with 5 mg/kg of ADR and irradiated 24 hours later with 5 Gy exhibited very few multivalent configurations, and the frequency of translocations were lower than the one detected in animals irradiated only with 9 Gy of γ -rays, and equal to those recorded in animals irradiated only with 5 Gy of gamma rays (Table III and Fig. 2). However, when the dose of radiation was increased to 9 Gy of gamma rays, a dramatic increase in the type of translocations was observed. On the contrary, in mice injected with 10 mg/kg of ADR and irradiated with 5 or 9 Gy of gamma rays similar number of different translocations were found. These types were significantly lower than those detected in mice treated with 5 mg/kg of ADR and irradiated with 9 Gy of gamma rays (Table III and Fig. 2).

Leenhouts and Chadwick (1981) and van Buul and Seelen (1991) have postulated three main parameters of the stem cell spermatogonial population that affect the level of induced translocations: 1) the proportion of sensitive and resistant cells; 2) the ratio of the probabilities that a basic lesion in the DNA leads to cell killing or translocation formation; and (3) the proliferation-differentiation pattern of surviving spermatogonial stem cells after irradiation. Significant increase of intra as well as inter-individual variability is produced by high degrees of cell killing due to the increase in the effect of clonal proliferation of the relatively few surviving stem cells (Léonard and Deknudt, 1969; van Buul and Léonard, 1984). Combined treatment

results would be in concordance with the hypothesis that the resistant synchronization cells from the first treatment, is not enough to explain the frequency of reciprocal translocations induced (Cattanach and Barlow, 1984).

It has been proposed that the results observed after combined treatments could be explained assuming that depletion of any kind of spermatogonia is enough to modify the chromosomal response of stem cells (van Buul, 1984). This means that the first dose of radiation in fractionation experiments or the treatment with a chemical before irradiation induce a selective killing of proliferating spermatogonial cells, triggering the surviving stem cells to enter an active cycle to repopulate de epithelium (Cattanach *et al.*, 1976; Cattanach and Crocker, 1980; Preston and Brewen, 1976; van Buul, 1983). According to this, the additive-potentiating effect observed after combined treatments with chemicals and ionizing irradiation does not depend on the amount of chromosomal damage induced by the chemical but on the ability of the compound to induce depletion of differentiating and differentiated spermatogonia. However this assumption is not enough to explain the subadditive effect observed after combined treatments with MMC and 4 Gy of X-rays (Deknudd and Leonard, 1979), MMC plus 5 Gy (De Luca *et al.*, 1990a) or 5 mg/kg of ADR plus 5 Gy (De Luca *et al.*, 1990b) (see below).

If the frequency of translocations recovered after combined treatments with chemicals and ionizing radiation depends only on the depletion of any kind of spermatogonia by the compound and on the amount of chromosomal damage (and cell mortality) induced by the radiation, then only two types of response can be expected, additivity and potentiating. Additivity when combined treatments induce a considerable amount of chromosomal damage without killing a great number of cells, and potentiating when combined treatments induce extensive cell death and only a few surviving cells with a high yield of chromosomal damage can be scored (see De Luca *et al.*, 1990a,b).

On the other hand the association between all the combined treatments with 9 Gy (except the abovementioned ADR10+9Gy) could be explained because all of them showed a potentiating effect (De Luca *et al.*, 1990b). Although, it is not clear why MMC+5 Gy was included in this group because it

showed a subadditive effect similar to that observed in ADR 5+5 Gy in previous works (De Luca *et al.*, 1990a,b). Additionally, ADR 5+5 Gy appear located into a group separated of the remaining treatments, showing a very low similarity with them (Figs. 3 and 4).

According with the BDM, MMC+5Gy produced five type of reciprocal translocations (Table III and Fig. 2), two common with most of the treatments [i.e., A (18 II + 1C IV) and B (18 II + 1 R IV)], one common with ADR10, 9 Gy, 10 Gy and some combined treatments (i.e., E (17 II + 1 CVI), one common with 9 Gy and some combined treatments [i.e., F (16 II + 2 CIV)], and one common with 10 Gy and some combined treatments [J (17 II +1 R VI)]. Among the combined treatments, MMC+5Gy was very similar to ADR5+9Gy, because they showed four reciprocal translocations and only two different (Table III).

Bioreduction of MMC leads to the formation of free radicals, which causes a cascade of reactions including lipid peroxidation, protein, DNA-damage and ultimately cell death (Kappus, 1986; Na *et al.*, 2001). Depending on the biotransformation pathway, metabolism of MMC may generate reactive oxygen species (ROS) (Gustafson *et al.*, 1992). When ROS interact with cells and exceed endogenous antioxidant systems, there is indiscriminate damage to biological macromolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids (Offord *et al.*, 2000).

As was aforementioned, MMC+5Gy showed a subadditive effect in previous works (De Luca *et al.*, 1990a,b). In order to explain the subadditivity effect, it is necessary to assume that other factors that those involved in potentiating and additivity (see above) could be involved in the mechanism of translocation induction in stem-cell spermatogonia of mice. It has been proposed that the role of the repair mechanism could be considered in this sense (De Luca *et al.*, 1988; van Buul, 1984). These repair mechanisms can reduce cell mortality in such a way that higher frequency of more radio-resistant cells can survive. But with a higher dose of chemicals (e.g., ADR10) the amount chromosomal damage induced is so great that the repair mechanisms triggered are not enough to reduce cell mortality. In our study MMC facilitated the appearance of many reciprocal translocations only found in combined treatments and/or in single treatments with higher

doses of ionizing radiation (Table III). It suggests that MMC can produce a higher cell sensibility, facilitating the mutagenic action of the ionizing radiations. This effect is observed when middle doses of radiation are applied, but the effect observed is even more marked when higher doses are applied. However, this working hypothesis should be proven with appropriate experiments.

As was mentioned above, ADR5+5 Gy appeared in a monotypic group, related with the remainder treatments at low similarity values (Figs. 3 and 4). According to the BDM (Table III), this treatment produced only three kinds of reciprocal translocations: (1) B (18 II + 1 R IV) (the second more common translocation, see Table III and Fig. 1); (2) D (15 II + 1 C IV + 1 RIV), a translocation very rare, only shared with 9 Gy (Table III and Fig. 1); and (3) H (16 II + 2 RIV), a low recorded translocation, only shared with 9 Gy, 10 Gy, and MMC+9Gy (Table III and Fig. 1). Additionally, this was the only treatment in which the more frequent reciprocal translocation recorded in this study [i.e., A (18 II + 1 C IV); see Table III and Fig. 1] was absent, although we can assume that this absence simply can be due to chance. As was mentioned above, ADR5+5Gy had an subadditive effect in previous works (De Luca et al., 1990a,b). Unlike what is observed with the MMC+5Gy, in this case an increase of sensibility to the ionizing radiations was not appreciated. In this way, the subadditive effect due to the action of the mechanisms of cell repair could explain the position of this treatment in the multivariate graphics (Figs. 3 and 4).

CONCLUSIONS

Our results show that there was not a specific pattern of chromosomal aberration induced for physical and chemical agents, because single and combined treatments were grouped together.

The association degree between single treatments was basically similar to that obtained by De Luca et al. (2000), although in our analysis combined treatments were added. Combined treatments using 9 Gy plus drugs appeared in different groups, although according to the previous work of De Luca et al (2000) we expected that all the combined treatments of drugs with 9 Gy were grouped together. We believe that the variability observed when the

different treatments were compared could be dose dependent, but this hypothesis needs to be tested. Additionally, the action of potentiating, additivity, and subadditivity can help to explain the location of most of the combined treatments.

REFERENCES

- Cattanach, B.M., C.M. Heath, and J.M. Tracey. (1976). Translocation yield from mouse spermatogonial stem cell following fractionated X-ray treatments: influence of unequal fraction size and of increasing fractionation interval. *Mutat. Res.*, 35: 257-268.
- Cattanach, BM and J.H Barlow. (1984). Evidence for the re-establishment of a heterogeneity in radiosensitivity among spermatogonial stem cells repopulating the mouse testis following depletion by X-rays. *Mutat. Res.*, 127: 81-91
- Cattanach,, B.M. and A.J.M. Crocker. (1980). Modified genetic response to X-irradiation of mouse spermatogonial stem cells surviving treatment with TEM. *Mutat. Res.*, 70: 211-220.
- Crisci, J.V. and M.F. López Armengol. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. 1st. Edn., OEA, Washington, ISBN 0-8270-1717-0.
- De Beer, E.L., A.E. Bottone and E.E. Voest. (2001). Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, 415, 1-11.
- De Luca J.C., F.N. Dulout, M.A. Ulrich, C.C. Furnus, and J.M. Andrieu. (1990a). The induction of reciprocal translocations in mouse germ cells. II. Combined effects of mitomycin C or thio-tepa with two doses of gamma rays. *Mutat. Res.*, 232: 17-21.
- De Luca J.C., F.N Dulout, C. Grillo, M.C. Terreros, and J.M. Andrieu. (1990b). The induction of reciprocal translocations in mouse germ cells by chemical and ionizing radiations. III.

- Differential effect of two doses of adriamycin combined with 5 or 9 Gy of gamma rays. *Mutat. Res.*, 232: 11-16.
- De Luca, J.C., E. Ortiz-Jaureguizar and F.N. Dulout. (2000). A multivariate approach to the association pattern of reciprocal translocations induced by chemicals and ionizing radiation in mouse germ cells *Genet. Mol. Biol.*, 23: 581-587.
- De Luca, J.C., F.N. Dulout, and J.M. Andrieu. (1988). The induction of reciprocal translocations in mouse germ cells by chemicals and ionizing radiations. I. Dose-response relationships and combined effects of bleomycin with thio-tepa and gamma rays. *Mutat. Res.*, 202: 65-70.
- Deknudt, G.H. and A. Léonard. (1979). Interactions between ionizing radiations and chemicals in producing chromosomal aberrations in mammals. *Mutat. Res.*, 64: 133 (Abstract).
- Doroshov, J.H. (2006). Anthracyclines and Anthracenediones, in: Chabner BA; Longo DL (eds), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practices*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp 415-450.
- Gewirtz, D.A. (1999). A Critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.*, 57, 727-741.
- Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika.*, 53: 325-338.
- Gustafson, D.L. and C.A. Pritsos. Oxygen radical generation and alkylating ability of mitomycin C bioactivated by xanthine dehydrogenase, (1992). *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 35:147-151.
- Hacker-Klom, B., W. Gohde, and J. Schuman. (1984). Mammalian spermatogenesis as a biological dosimetry for ionizing radiation. *Biological Dosimetry*. Edited by W.G. Eisern and M.L. Mendelsohn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 127-137
- Hammer, Ø. D.A.T. Harper and P.D. Ryan. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electrónica* 4: 9pp. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm [Accessed 5 February 2010]
- Howell, S. J. and Shalet, S. M. (2005). Article spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J. Natl. Cancer Monogr. Inst.* 34:12-7.
- Kappus, H. (1986). Overview of the enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.*, 35:1-6.
- Kruskal, J.B. (1964a). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit: a nonmetric hypothesis. *Psychometrika.*, 29: 1-27.
- Kruskal, J.B. (1964b). Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29: 115-129.
- Lambert B, M. Sten, S. Söderhäll, U. Ringborg, and R. Lewensohn. (1983). DNA repair replication, DNA breaks and sister-chromatid exchange in human cells treated with adriamycin in vitro. *Mutat. Res.*, 111: 71-84.
- Leenhoust, H.P. and K.H. Chadwick. (1981). An analytical approach to the induction of translocations in spermatogonia of the mouse. *Mutat. Res.*, 82: 305-321.
- Léonard, A. and G.H. Deknudt, (1969). Dose-response relationship for translocations induced by X-irradiation in spermatogonia of mice. *Radiat. Res.*, 40: 276-284.
- Limoli C, Giedzinski E, Morgan WF, Swarts SG, Jones GD and Hyun W. (2003). Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Canc. Res.*, 63: 3107-3111.

- Margus, T. and F.R. McMorris, (1981). Consensus n-trees. *Bull. Math. Biol.*, 43: 239-244.
- Matsuda, T., Y. Horii, K. Hayashy, and O. Yoshida. (1991). Quantitative analysis of seminiferous epithelium in subfertile carriers of chromosomal translocations. *Int. J. Fertil.*, 36:344-51.
- Meistrich, M.L. (1993). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur. Urol.*, 23:136-142.
- Morgan W.F. (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat. Res.*, 159, 567-580.
- Na, Y. V.-S. Li, Y. Nakanishi, K. F. Bastow, and H. Kohn. (2001). Synthesis, DNA cross-linking activity, and cytotoxicity of dimeric mitomycins. *J. Med. Chem.*, 44: 3453–3462.
- Offord E., G. van Poppel, and R. Tyrrell. (2000). Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease. *Free Rad. Res.*, 33(supplement):S5–S19.
- Olson, R.D., and P.S. Mushlin, (1990). Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J.*, 4: 3076-3086.
- Povirk, L.F. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.*, 355:71-89.
- Povirk, L.F. and M.J.F. Austin. (1991). Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.* 257: 127-143.
- Preston, R.J. and J.G. Brewen. (1976). X-ray-induced translocations in spermatogonia. II. Fractionation responses in mice. *Mutat Res.*, 36: 333-344.
- Raser JM and O'Shea EK. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Sci.*, 309: 2010–2013.
- Rohlf, F.J. (1982). Consensus indices for comparing classifications. *Math. Biosci.*, 59: 131-144.
- Rohlf, F.J. (1997). NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, vol 2.0. Exceter Software, Setauket, New York.
- Russell, W.L., J.W. Bangham, and L.B. Russell. (1998). Differential response of mouse male germ-cell stages to radiation induced specific-locus and dominant mutations. *Genetics.*, 148:1567-1578.
- Sanderson, B.J. and A.J. Shield. (1996). Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutat. Res.*, 355: 41-57.
- Schwartz, S., C.G. Palmer, P.L. Yu, J.A. Boughman, and M.M. Cohen. (1986). Analysis of translocations observed in three different populations. I. Reciprocal translocations. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 42: 42-52.
- Singal, P.K., T. Li, D. Kumar, I. Danelisen, and N. Iliskovic. (2000). Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Mol. Cell. Biochem.*, 207: 77-86.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, pp. 573.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.*, 38: 1409-1438.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1962). The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon.*, 11: 33-40.
- Sonta, S. (2004). Contribution of chromosomal imbalance to sperm selection and preimplantation loss in translocation heterozygous Chinese hamsters. *Cytogenet. Genome Res.*, 104:261-70.
- Stubbs, L., E.A. Carver, N.L. Cacheiro, M. Shelby, and W. Generoso. (1997). Generation and characterization of heritable reciprocal translocations in mice. *Methods.*, 13:397-408

- van Buul P.P.W. (1984). Enhanced radiosensitivity for the induction of translocations in mouse stem cell spermatogonia following treatment with cyclophosphamide or adriamycin. *Mutat. Res.*, 128: 207-211.
- Van Buul, P. P. W., D.G. De Rooij, I.M. Zandman, M. Grigorova, and A. Van Duyn, (1995). X-ray-induced chromosomal aberrations and cell killing in somatic and germ cells of the scid mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67: 549-555.
- van Buul, P.P.W. and A. Léonard. (1980). Evidence of a threshold X-ray dose for sensitizing stem-cell spermatogonia of the mouse to the induction of chromosomal translocations by a second larger one. *Mutat. Res.*, 70: 95-101.
- van Buul, P.P.W. and A. Léonard. (1984). Effects of unequally fractionated X-rays exposures on the induction of rearrangements in mouse spermatogonia. *Mutat. Res.*, 127: 65-72.
- van Buul, P.P.W. and M.C. Seelen. (1991). The relationship between induced reciprocal translocations and cell killing of rhesus monkey spermatogonial stem cells after combined treatments with follicle-stimulating hormone and X-rays. *Mutat. Res.*, 263: 1-8.
- van Buul, P.P.W/ T. Ishihara and M.S. Sasaki (Eds.). (1983). Radiation-Induced Chromosome Damage in Man. Induction of chromosome aberrations by ionizing radiation in stem cell spermatogonia of mammals, New York, Alan Liss, pp. 369-400. ISBN 0845124048, 9780845124048.
- Waring, M.J. (1970). Drugs and DNA: uncoiling of DNA double helix as evidence of intercalation. *Humangenetik.*, 9: 234-236.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jorge Crisci (LASBE) for his extremely valuable support and critical reading of an early version of the manuscript. This work was supported by grants from “Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas” (PIP No. 5583). The authors are scientific researchers of the CONICET, whose continuous support is gratefully acknowledged.

Authors thanks TPN Lucy Gómez de Mainer for reviewing the manuscript.

DIURNAL CORTISOL SLOPE IN GIRLS AND ADOLESCENTS WITH DIAGNOSIS OF TURNER SYNDROME

López, M.C.¹, Aguilar, M.J.², Zabaleta, V.³, Bakker, L.⁴

^{1,4}Facultad de Psicología, Grupo de Investigación Comportamiento Humano, Genética y Ambiente, Centro de Investigación en Procesos Básicos, Metodología y Educación (CIMEPB), Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina

²Grupo de Investigación Comportamiento Humano, Genética y Ambiente, Centro de Investigación en Procesos Básicos, Metodología y Educación (CIMEPB), Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina

³Facultad de Psicología, Centro de Investigación en Procesos Básicos, Metodología y Educación (CIMEPB), Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina³Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Mayabeque, Cuba.

mcarolinalopez@hotmail.com

ABSTRACT

Turner Syndrome is a non-inheritable chromosomal abnormality with highest incidence in female population. Women diagnosed with this condition present atypical brain morphology which includes hippocampal and amygdalar disorders. Both structures are key to the regulation of daily cortisol concentrations. This study analyzes diurnal cortisol slope in girls and adolescents diagnosed with Turner Syndrome. The aim of our study is to establish possible associations with the atypical brain morphology described for this population. A competitive radioimmunoassay was conducted on salivary cortisol samples obtained at 8 a.m. and 6:00 p.m. for two days, at a school and rest day. Descriptive statistical analyses were performed and their average values compared with a similar study in non-Turner girls. An alteration of diurnal cortisol slope was observed in all the participants, all evidencing high evening levels. The present study attempts to associate hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity with anatomical and functional alterations of the hippocampus and amygdala, considering that they constitute the primary neural development defect for women diagnosed with this syndrome. This also entails great vulnerability to environmental stress factors. The goal of this study is to advance our understanding of the factors that favor the anatomical and functional reorganization and recovery of important neural structures related to cognitive and emotional development of women suffering from Turner Syndrome.

Key words: Turner syndrome, diurnal cortisol slope, salivary cortisol

RESUMEN

El Síndrome de Turner es el trastorno cromosómico no heredable de mayor incidencia en la población femenina. Las mujeres con este diagnóstico presentan una morfología cerebral atípica que incluye alteraciones en hipocampo y amígdala. Ambas estructuras son claves en la regulación de las concentraciones diarias de cortisol. Este estudio analiza la pendiente diaria de cortisol en niñas y adolescentes con diagnóstico de Síndrome de Turner, con la finalidad de establecer posibles asociaciones con la morfología cerebral atípica descrita para esta población. Se realizó radioinmunoensayo competitivo en muestras de cortisol salival obtenidas a las 8:00 y 18:00 horas durante dos jornadas, escolar y de descanso. Se aplicaron análisis estadísticos descriptivos y los valores medios obtenidos fueron comparados con un estudio similar realizado con niñas y adolescentes sin diagnóstico de Síndrome de Turner. Se observó alteración de la pendiente diaria de cortisol en el total de las participantes, con altos niveles vespertinos. Este trabajo intenta vincular la hiper-reactividad del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal con la alteración anatómica y funcional del hipocampo y la amígdala, considerando que las mismas son un defecto primario del desarrollo neural en las mujeres con diagnóstico de Síndrome de Turner, hecho que implica una mayor vulnerabilidad a estresores ambientales. Se propone profundizar el estudio de los factores que favorecen la recuperación y reorganización anatómica y funcional de estructuras neurales importantes en el desarrollo cognitivo y emocional de las mujeres con este diagnóstico.

Palabras clave: Síndrome de Turner, pendiente diaria de cortisol, cortisol salival

INTRODUCCIÓN

The study of the features that characterize people with genetic disorders opens up new lines of research that further show the convergence of biological and environmental factors in the development of cognitive processes (Plomin *et al.*, 2002). Turner Syndrome (TS) is a genetic disorder that involves either total or partial X-monosomy in females. This non-inheritable chromosomal abnormality occurs in approximately 1 out of 1900 female live births (Murphy *et al.*, 2006). As to the neurocognitive profile, previous studies have revealed that verbal and intellectual abilities remain intact (Doswell *et al.*, 2006; Kesler *et al.*, 2004b). Notwithstanding this, selective deficits of certain domains, such as visual-spatial abilities, including spatial perception processes, visual-motor integration, left/right orientation and non-verbal memory have been reported. Difficulties in working memory and attention tasks requiring control of impulsivity and self-monitoring have also been documented (Zinn *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2006; Mazzocco, 2006; Murphy *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2006; Haberecht *et al.*, 2001).

Research on brain development is therefore key to learn about the above-mentioned neurocognitive deficits. The main findings within this line of research reveal the presence of a cortical organization and atypical brain morphology, particularly in the right brain hemisphere with deficit in the frontotemporal circuits (Tamm *et al.*, 2003). Furthermore, magnetic resonance images have revealed a decrease in the gray substance volume of the right occipital and temporal lobes and left and right frontal lobes (Doswell *et al.*, 2006; Hart *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006; Danielewicz & Pisula, 2005; Brown *et al.*, 2004; Kesler *et al.*, 2004b). Alterations have also been reported in the cerebellum and pons as well as in subcortical structures, such as the thalamus, amygdala and hippocampus. On the other hand, McCauley and Sybert (2006) and Kesler *et al.* (2004a) observed an enlarged left amygdala, involving the gray substance and a reduction in the right hippocampus, including the gray and white substance.

The hippocampus, which is located in the medial temporal lobe, is key to cognitive processes and it is involved in the consolidation of episodic

and spatial memory. Kesler *et al.* (2004a) reported an association between structural alterations of the hippocampus and memory deficit in TS which affect primarily short and long-term memory as well as visual-spatial memory. The amygdala, which is located in the ventral hippocampal region, regulates, in turn, emotional events as well as learning and attention processes, assigning an emotional load to memory to the extent that it increases its consolidation and evocation. It has also been demonstrated that the electric stimulation of this structure elicits behavioral characteristics connected with feelings of fear and anxiety (Joseph-Bravo & Gortari, 2007), thus accomplishing a fundamental role in understanding social interactions. On the other hand, Kesler *et al.* (2004b) related amygdala hyperactivity to high social anxiety in TS, which is expressed as shyness, social isolation, concern for keeping control and flexibility deficit in terms of routine changes (McCauley & Sybert 2006; Russell *et al.*, 2006).

The amygdala and hippocampus are connected through the cingulate cortex and closely related to the prefrontal cortex. In this respect, Maldonado *et al.* (2008) claimed that the ventromedial prefrontal and dorsolateral cortex play a central role in the development of cognitive functions, such as memory and attention. Furthermore, together with the frontal cortex and the hypothalamus, they are key brain structures for the stress circuit. The hippocampus, whose neurons carry the largest concentration of corticosteroid receptors in mammal brain, is one of the targets of cortisol action. One of its neuroendocrine functions is to regulate the concentration of circulating cortisol through processes of negative feedback, thus inhibiting the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). By means of cortisol secretion, this axis operates on several organs and tissues, including the central nervous system, and particularly the limbic system and the prefrontal regions involved in central cognitive processes for the acquisition of new abilities and knowledge. Moderate cortisol levels permit the use of glucose in the brain, mediating neuron plasticity, which exerts a facilitating effect on memory and favors the learning process. In contrast, high cortisol levels interrupt neuron plasticity mechanisms, obstructing the favorable development of these cognitive processes (Jimerson *et al.*, 2006).

On the other hand, when fear and anxiety are involved, the amygdala secretes a neurotransmitter that activates HPA axis (corticotropin-releasing hormone, CRH), whose effects stimulate and modulate several brain regions involved in emotions and stress. Baseline concentrations of CRH result in increased alertness, thus favoring learning, while when in excess, CRH leads to attention deficits (Joseph-Bravo & Gortari, 2007).

Cortisol circadian rhythm is used as a biological marker to assess the proper functioning of HPA axis. According to this rhythm, cortisol levels begin to increase in the last hour of sleep, reach their peak about thirty minutes after waking up, and quickly decrease during the following thirty-to-sixty minutes, to keep on decreasing steadily during the rest of the day, and reaching their lowest level at the end of diurnal activity phase (López-Mato, 2004). Deregulation of HPA axis leads to a circadian rhythm disruption which manifests itself in changes in the daily decrease of cortisol concentrations with either absence of or decrease in the decline. Furthermore, although Oskis *et al.* (2009) described a positive correlation between girls' pubertal stage and cortisol awakening response, the daily decline of cortisol concentration curve remains significantly robust, not being affected by age, sex, developmental stage or body composition (Rosmalen *et al.*, 2005).

In view of the above, the purpose of the present study was to analyze diurnal cortisol slope in girls and adolescents diagnosed with TS. Findings from this research are expected to contribute to determining the bases of a hypothesis that could help explain the relationships between circadian rhythm and the anomalies reported for this population by the literature available on the hippocampus and amygdala.

METHODS

Design

A simple group and a retrospective *ex-post facto* design were adopted for this study, in agreement with Montero and León's classification (2007).

Participants

Subjects in this study were girls and adolescents diagnosed with TS (N = 6). Their ages ranged from 7 to 16 years. They were recruited following specific healthcare protocols for the treatment of this syndrome in Mar del Plata city, Republic of Argentina. Girls and/or adolescents were excluded from our study if they had a BMI higher than 35kg/m², diabetes, chronic liver or renal failure, had been under corticoid treatment in the last year, or had suffered from an acute illness in the last two weeks.

Description of participants

The families surveyed belonged to middle class and the girls and adolescents included in this study attended either public or private schools in Mar del Plata city. All participants had received growth hormone and had started, in most of the cases, their treatment at an early age, which had allowed them to reach height percentiles within the normal range. Only one participant received estrogen therapy to achieve puberty. Taking into account the impact that these hormone therapies have on psychosocial development, it is important to note that both are crucial to optimizing life quality in the studied population.

Table I describes the most relevant biological parameters for each participant.

*Mosaic karyotype

** Growth hormone

Participant	1	2	3	4	5	6
Karyotype	45,X0	45,X0/ 46,XXdelq10*	45,X0/ 46,XXdelp21*	46,XX/45,X0/ 47,XXX*	46,XX/ 45,X0*	45,X0
Current age	7 years	7 years	13 years	14 years	15 years	16 years
Current hormonal treatment	H. C**	H. C	H. C	H. C	H. C	estrogens
Puberty	without puberty	without puberty	without puberty	with spontaneous puberty	with spontaneous puberty	with induced puberty

Table I. Clinical information of girls and teenagers with diagnosis of Turner's Syndrome (N= 6).

Materials

Salivary-free cortisol determination was carried out. This method offers great advantages over serum or urinary measurements on account of the fact that it is painless and non-invasive and, above all, it reduces the stress derived from blood collection. It thus prevents bias which may arise from the application of this procedure. On the other hand, it has been demonstrated that salivary cortisol levels represent plasma levels properly which remain stable for several weeks, thus permitting to accurately and efficiently quantify biologically active cortisol (Mirasoli *et al.*, 2002).

Salivary cortisol was measured by means of a competitive radioimmunoassay, using the commercial Coat-a-Count kit with serum standards diluted 1:10. Assay analytical sensitivity was of 8.28 nmol/l, whereas intra- and interassay sensitivity was under 6.1% and 7.1%, respectively. Our study was carried out at the Laboratory of Clinical and Endocrine Analyses LACYE (90240) in Mar del Plata city (Republic of Argentina) and accredited by the CONEA. Official permission has been granted to this laboratory to use *in vitro* radioactive tracers in human beings.

Procedure

Healthcare centers and professionals treating girls and adolescents diagnosed with TS were firstly contacted and through them, families were subsequently contacted. Details on the objectives and main characteristics of this research were given

to them. Families were further asked to sign an informed consent form and girls and adolescents were asked to provide their assent, whereby it was explicitly stated that cooperation was voluntary and anonymous. With previous parental consent secured, the clinical records of girls and adolescents participating in our study were collected. Salivary sample collection protocol was further distributed with the following indications: i) not to brush their teeth before collecting saliva sample to avoid bleeding gums, and ii) not to drink water or eat food, or use steroid inhalers. Approximately 1ml of saliva was obtained, collected after direct salivation in a sterile glassware tube without preservatives and stored at 4° C. Two daily measurements were taken, one right after waking up (at 8 a.m.) and the other in the evening (at 6 p.m.). Ethical approval was provided by the Ethical Committees of the participating health care centers.

To assess the effect of possible environmental demands, and considering that within the multiple contexts in which children are reared, school environment may become a potential stress factor as a result of its daily demands, four salivary samples were obtained from each participant. Two of them were collected during a regular school day and the other two during a rest day, the latter being considered as baseline in accordance with Moya-Albiol *et al.* (2005).

Daily cortisol slope analysis was carried out by means of descriptive tests and mean difference tests, contrasting morning and evening values collected

on both days with those reported by Gröschl *et al.* (2003).

Ethical considerations

Ethical research principles concerning human beings were followed and data were confidentially kept.

RESULTS

Cortisol levels in the girls and teenagers participating in this study as well as central trend measurements and salivary cortisol concentration variability between morning (8 a.m.) and evening (6 p.m.) are shown in Table II.

Participant	School Days		Rest days		Puberty
	Morning	Evening	Morning	Evening	
1	29.53	20.92	26.66	15.67	No
2	31.46	18.96	21.00	16.58	No
3	20.86	18.87	20.94	21.50	No
4	24.15	24.78	22.35	22.65	Yes
5	29.80	17.91	23.43	19.89	Yes
6	19.62	20.34	19.95	19.95	Yes
Mean	25.90	20.29	22.38	19.37	-----
Standard Deviation	5.04	2.44	2.42	2.73	-----

Table II. Levels of morning and evening cortisol (nmol/l) of the population approached in both days.

The comparison of the values corresponding to both days via Wilcoxon test showed no significant differences between morning and evening cortisol levels during both days. Based on the absence of variability, both morning and evening values in Table III correspond to an average of the values

retrieved during school and rest day. A comparison of the descriptive statistical values of our study population with those reported by Gröschl (2003) on healthy girls and adolescents ranging from 2 to 15 years is shown in Table III.

*(Gröschl, Rauh and Dörr, 2003).

	Girls and teenagers with diagnosis of Turner's Syndrome		Healthy girls and teenagers with ages between 2 and 15 years*	
	Morning	Evening	Morning	Evening
nmol/l				
Mean	24.07 (3.3)	16.36 (5.3)	24.7 (8.5)	1.7 (1.4)
Range	19.78-28.09	10.14-23.71	3.0-54.9	0.2-8.7

Table III. Univariate descriptive statistics of girls and teenagers with diagnosis of Turner's Syndrome, comparison with population information.

DISCUSSION

Although sample size could be a limiting factor, findings from our research lead us to conclude that, based on normal morning values (Table V), diurnal cortisol decline in girls and adolescents diagnosed with TS evidences a significantly flattened slope with respect to high evening cortisol values. The same was observed when the values collected in our study were compared with cortisol reference ranges recorded in post-menarchal girls' saliva by Aardal and Holm (1995).

The fact that all participants evidenced daily cortisol slope dysfunction, regardless of the stage of pubertal development (pre- and post-menarchal girls), karyotype (pure line and mosaic) and hormone treatments received at the time of the study (growth hormone and estrogen hormone), lead us also to conclude that this daily dysfunction could be interpreted as a characteristic of syndrome expression. It would therefore be interesting to verify these results by means of a case-control study to ensure that high evening cortisol levels are pathognomonic in ST population.

On the other hand, as no significant differences were recorded between school and rest days, this could not only minimize the impact of environmental factors but also strengthen the hypothesis according to which changes in the daily decline of cortisol concentration curve can be considered a characteristic of TS expression. Therefore, diurnal cortisol slope dysfunction could be analyzed in terms of the assumption that anatomical and functional alterations in the hippocampus and amygdala are the primary defect of neural development in women with TS. Hippocampal hypodevelopment seems to induce a deregulation of HPA axis as a result of a deficit in the negative feedback on CRH release by the hypothalamus. In addition, as amygdalar volume gets larger, this could contribute to axis overexcitement, becoming sensitized to the action of possible stress factors. As a result, diminished hippocampal volumes along with larger amygdalar volume could lead to HPA axis hyper-reactivity with sustained cortisol increase.

Concomitantly, previous research has shown that high chronic cortisol concentrations are linked to neurotoxicity processes which reduce hippocampal volume due to neurosynaptogenesis decrease in

the CA-3 zone (Meraz and Bañuelos, 2009). This, in turn, increases hippocampal impairment, thus hindering neuron regeneration and reinforcing non-adaptation processes that end in cognitive and affective disorders whose physiopathological feature is hippocampal atrophy.

According to findings from previous research, atypical neural development of the hippocampus and amygdala could be due to estrogen deficiency in women with TS (Kesler *et al.*, 2004a; Monereo-Megias and Peñalver-Talavera, 2003). Estrogens are responsible for the regulation of diverse neuron mechanisms including synaptogenesis, synaptic plasticity, neuron density, long-term potentiation effects and excitatory postsynaptic potentials. Furthermore, although accounting for volume differences between diminished hippocampus and enlarged amygdala is not an easy task, they could be considered as resulting from dysfunctional processes in cell migration, neuroplasticity and synaptic and dendritic prunings. Such dysfunction could lead to an abnormal distribution and organization of nerve tissues, thus inducing disproportionate cell density increase and decrease in certain brain regions. Furthermore, if the genetic expression of the syndrome involves diminished hippocampal volume and increased amygdalar volume, this atypical brain morphology could be a risk factor as of birth stage for women with TS.

A more comprehensive study of the relationship between atypical brain morphology and diurnal cortisol slope in this population via simultaneous comparative study including magnetic resonance imaging, will contribute not only to comparing and contrasting the hypothesis herein presented but also to accounting for high biological environmental sensitivity observed in women diagnosed with TS on account of the fact that persistent activation of HPA axis is associated with emotional and cognitive biases that affect the development of key learning processes. The study on the relationships between genetic and environmental factors and their concomitant expression in the psychoneuroendocrine system in vulnerable populations, will help develop strategies encouraging both the recovery and anatomical and functional reorganization of fundamental neural structures for the cognitive and emotional development of women with TS. Finally, in view of the fact that some women with

ST were found to evidence distinctive features of pubertal development, further studies on the awakening response will contribute to determining intrapopulation differences, such as those identified by Oskis *et al.* (2008).

REFERENCES

- Aardal, E., Holm, A.C. (1995). Cortisol in saliva. Reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33:927-932.
- Brown, W., Kesler, S., Eliez, S., Warsofsky, I., Haberecht, M., Reiss, A. (2004). A volumetric study of parietal lobe subregions in Turner Syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 46 (9):607-609.
- Danielewicz, D., Pisula, E. (2005). Self-esteem evaluation of girls of Turner Syndrome. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska* 60 (16/72):329-332.
- Doswell, B.H., Visootsak, J., Brady, A.N., Graham, J.M. (2006). Turner Syndrome: An update and review for the primary pediatrician. *Clin. Pediatr.* 45(4):301-313.
- Gröschl, M., Rauh, M., Dörr, H.G. (2003). Circadian rhythm of salivary cortisol, 17 α -hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin. Chem.* 49(10):1688-1691.
- Haberecht, M., Menon, V., Warsofsky, I., White, C., Dyer Friedman, J., Glover, G., Nelly, K., Reiss, A. (2001). Functional neuroanatomy of visuo-spatial working memory in Turner Syndrome. *Hum. Brain Mapp.* 14(2):96-107.
- Hart, S., Davenport, M., Hooper S., Belger A. (2006). Visuospatial executive function in Turner Syndrome: Functional Mri and neurocognitive findings. *Brain* 129 (5):1125-1136.
- Jimerson, S.R., Durbrow, E.H., Adam, E., Gunnar, M., Bozoky, I.K. (2006). Associations among academic achievement, attention, and adrenocortical reactivity in caribbean village children. *Can. J. School Psychol.* 21(1/2):120-138.
- Joseph-Bravo, P., Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biociencia* 14 (3):65-76.
- Kesler, S., Garrett, A., Bender, B., Yankowitz, J., Zeng, S.M., Reiss, A. (2004a). Amygdala and hippocampal volumes in Turner syndrome: a high-resolution MRI study of X-monosomy. *Neuropsychologia* 42:1971-1978.
- Kesler, S., Haberecht, M., Menon, V., Warsofsky, I., Dyer-Friedman, J., Neely, J., Reiss, A. (2004b). Functional neuroanatomy of spatial orientation processing in Turner Syndrome. *Cereb. Cortex* 14 (2):174-180.
- López-Mato, A.M. (2004). *Psiconeuroinmunoendocrinología II*. Buenos Aires: Polemos.
- Maldonado, E.F., Fernández, F.J., Trianes, M.V., Wesnes, K., Petrini, O., Zangara, A., Enguix, A., Ambrosetti, L. (2008). Cognitive performance and morning levels of salivary cortisol and amylase in children reporting high vs. low daily stress perception. *Span. J. Psychol.* 11(1):3-15.
- Mazzocco, M. (2006). The cognitive phenotype of Turner Syndrome: Specific learning disabilities. *Int. Cong. Ser.* 1298:83-92.
- McCauley, E., Sybert, V. (2006). Social and behavioral development of girls and women with Turner Syndrome. *Int. Cong. Ser.* 1298:93-99.
- Meraz, M.T., Bañuelos P.J. (2009). Efecto del estrés crónico sobre la remodelación dendrítica en la región CA3 del hipocampo. *e-Gnosis* 7(3):1-21.
- Mirasoli, M., Deo, S.K., Lewis, J.C., Roda, A., Daunert, S. (2002) Bioluminescence immunoassay for cortisol using recombinant aequorin as a label. *Anal. Biochem.* 306:204-11.
- Monereo-Megias, S., Peñalver-Talavera, D. (2003). La mujer adulta con Síndrome de Turner: algunas consideraciones. En: Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica (Org.), Síndrome de Turner (pp. 147-165). Barcelona: J& C Ediciones Médicas S.L.
- Montero, I., León, O. (2007). A guide for naming research studies in Psychology. *Int. J. Clin. Health Psychol.* 7(3):847-862.
- Moya-Albiol, L., Serrano, M. A., González-Bono, E., Rodríguez-Alarcón, G. and Salvador, A. (2005). Respuesta psicofisiológica de estrés en una jornada laboral. *Psicothema*, 17 (2), 205-211.
- Murphy, M., Mazzocco, M., Gerner, G., Henry, A. (2006). Mathematics learning disability in girls with

- Turner Syndrome or fragile X Syndrome. *Brain Cogn.* 61(2):195-210.
- Oskis, A., Loveday, C., Hucklebridge, F., Thorn, L., Clow, A (2009). Diurnal patterns of salivary cortisol across the adolescent period in healthy females. *Psychoneuroendocrinol.* 34:307-16.
- Plomin, R., De Fries, J., McClearn, G., Guffin, P. (2002). *Genética de la Conducta*. Buenos Aires: Ariel Ciencia.
- Rosmalen, J., Oldehinkel, A., Ormel, J., de Winter, A., Buitelaar, J., Verhulst, F. (2005). Determinants of salivary cortisol levels in 10-12 year old children; a population-based study of individual differences. *Psychoneuroendocrinol.* 30:483-495.
- Ross, J., Roeltgen, D., Zinn, A. (2006). Cognition and the sex chromosomes: Studies in Turner Syndrome. *Horm. Res.* 65:47-56.
- Russell, H., Wallis, D., Mazzocco, M., Moshang, T., Zackai, E., Zinn, A., Ross, J., Muenke, M. (2006). Increased prevalence of ADHD in Turner Syndrome with no evidence of imprinting effects. *J. Pediatr. Psychol.* 31(9):945-955.
- Schmidt, P., Rubinow, D., Bondy, C. (2006). Adult women with Turner Syndrome: A systematic evaluation of current and past psychiatric illness, social functioning, and self-esteem. *Int. J. Clin. Health Psychol.* 1298:100-107.
- Tamm, L., Menon, V., Reiss, A.L. (2003). Abnormal prefrontal cortex function during response inhibition in Turner Syndrome: Functional magnetic resonance imaging evidence. *Biol. Psychiatry* 53(2):107-111.
- Zinn, A., Roeltgen, D., Stefanatos, G., Ramos, P., Elder, F., Kushner, H., Kowal, K., Ross, J. (2007). A Turner Syndrome neurocognitive phenotype maps to Xp22.3. *Behav. & Brain Funct.* 3(24):1-14.



¿ES VARIABLE LA RESPUESTA DE *Zinnia peruviana* AL DRENAJE DEFICIENTE? POLIMORFISMOS POBLACIONALES EN *Zinnia peruviana*

Fatta N.A.¹, Vassallo S.A.²

¹Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina

²Licenciatura Ambiental, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, San Martín 4453,
C1417DSE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

nfatta@agro.uba.ar

ABSTRACT

An experiment was carried out in order to i) validate observations on *Zinnia peruviana* grown under excess water conditions, ii) compare the behavior of plants from three origins under two soil moisture regimes, and iii) select individuals to serve as substrates with impeded drainage. For the differentiation between origins and treatments, biomass production and ratios between stem and root dry weight and between stem and LDMC fresh and dry weight were analyzed. Seeds from Capilla del Monte, Villa Giardino and La Higuera (Córdoba Province, Republic of Argentina) were sown on October 10, 2008. On November 30, 2008, they were further transplanted into pots which either had good drainage (control) or remained with excess water during the experiment (treated). The design was factorial with three origins and two soil moisture treatments. Survival was observed to be highest in the plants from La Higuera and no treatment effects were found on this character. By November 1, 2009, there were no effects of independent variables as to the number of leaves, axillary buds, epicotyl length, nor for the LDMC determined on March 6, 2009. The ratio of dry weights of shoot and root showed a slight treatment effect on the treated plants. Results from this study indicate that plants were not damaged as a result of water excess in the substrate and that, on the contrary, extra water was favorable. Our aims could be successfully achieved by selecting individuals from the reference population which satisfactorily responded to the culture treatment chosen.

Key words: leaf dry matter content, stem-root ratio, landscaping

RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento diseñado para alcanzar los siguientes objetivos: i) validar observaciones sobre *Zinnia peruviana* cultivada bajo condiciones de exceso de agua, ii) comparar el comportamiento de plantas de tres orígenes bajo dos regímenes de humedad del sustrato, e iii) seleccionar individuos aptos para desempeñarse satisfactoriamente en sustratos con drenaje deficiente. Para la diferenciación entre orígenes / tratamientos, se analizó la producción de biomasa y los cocientes entre los pesos secos del vástago y de la raíz y entre los pesos secos y frescos del vástago o LDMC. El 10 de octubre de 2008 se sembraron semillas de Capilla del Monte, Villa Giardino y La Higuera (Provincia de Córdoba, República Argentina). El 30 de noviembre de 2008 las plantas se trasplantaron a macetas que tuvieron -durante el experimento realizado- buen drenaje (testigos) o exceso de agua (tratadas). El diseño fue un factorial con tres orígenes y dos tratamientos de humedad del sustrato. El máximo índice de sobrevivencia se registró en las plantas de La Higuera y no se observaron efectos de los tratamientos sobre este carácter. El 11 de enero de 2009 no se detectaron efectos de las variables independientes sobre el número de hojas, el número de brotes axilares, la longitud del epicótilo así como tampoco sobre el LDMC determinado el 6 de marzo de 2009. El cociente entre los pesos secos del vástago y de la raíz mostró un leve efecto del tratamiento a favor de las plantas tratadas. Los resultados de este estudio indican que las plantas no se perjudicaron por el exceso de agua en el sustrato y que, por el contrario, el agua suplementaria les resultó favorable. Se cumplió con los objetivos establecidos seleccionando individuos de la población de referencia con comportamiento satisfactorio para el tratamiento de cultivo elegido.

Palabras clave: leaf dry matter content, relación vástago-raíz, parquización

INTRODUCCIÓN

Zinnia peruviana (L.) L. (Asteraceae) es una especie nativa de Argentina (Dimitri *et al.*, 1997; Planchuelo *et al.*, 2003) que pertenece al género *Zinnia*, el cual tiene amplia distribución en América (Torres, 1963). Se trata de una planta herbácea que puede llegar a tener una altura de 1 m, es de ciclo anual, y tiene potencial decorativo para espacios de uso estival (Fatta *et al.*, 2005; Uría *et al.*, 2005). Su rusticidad y su capacidad para crecer en suelos degradados (Burgh y Bredebjano, 2005) la convierten en buena candidata para la parquización de bajo mantenimiento (Perfetti y Fatta, 2007; Perfetti *et al.*, 2008 a y b). Es desconocida en los circuitos comerciales, por lo que la generación de información acerca de su cultivo podría promover su uso.

Dado que fue posible observar de manera asistemática que *Z. peruviana* tiene la capacidad de soportar exceso de agua en el sustrato, se diseñó un experimento con la finalidad de: i) validar observaciones anteriores, ii) comparar el comportamiento de *Z. peruviana* de tres orígenes bajo dos regímenes de humedad del sustrato, e iii) identificar y seleccionar individuos aptos para desempeñarse satisfactoriamente sobre sustratos con drenaje deficiente.

Los descriptores utilizados fueron caracteres relacionados con la producción de biomasa y la relación entre ellos. Se partió de la hipótesis según la cual los cocientes entre los pesos secos del vástago y de la raíz y entre los pesos aéreos secos y frescos o el LDMC (*Leaf Dry Matter Content*) (Vendramini *et al.*, 2002), podrían ayudar a discriminar los orígenes e informar si los tratamientos dan lugar a respuestas diferentes.

La relación vástago:raíz está genéticamente determinada (Samejima *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005), se ve influida por la disponibilidad del sustrato (Warncke y Barber, 1973; Fredeen *et al.*, 1989; Olff *et al.*, 1990; Ericsson, 1995; Reynolds y D'Antonio, 1996; Scheible *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2000; Campbell y de Jong, 2000; Yeh *et al.*, 2000; Goran *et al.*, 2003; Kang y van Iersel, 2004; Roemheld y Kirkby, 2007), y por el ambiente en general (MacKay y Barber, 1985; Campbell y de Jong, 2000).

Se sabe también que esta relación contribuye a explicar la adaptación de los individuos al estrés ambiental (Ledig *et al.*, 1970; Fatemy y Evans, 1986; Masle y Passioura, 1987; Bowen y Pate, 1993; Rogers *et al.*, 1996; Pace *et al.*, 1999; Goncalves *et*

al., 2001).

El LDMC puede obtenerse a partir del peso de las hojas o del vástago entero, tal como se hizo en el experimento realizado en el presente estudio (Shipley y Vu, 2002; Li *et al.*, 2005; Vaieretti *et al.*, 2007), y tiene la ventaja de ser de simple determinación (Garnier *et al.*, 2004). Además, su uso es consensuado (Weiher *et al.*, 1999; Garnier *et al.*, 2001; Khaled *et al.*, 2006) con finalidades semejantes a las enunciadas (Arendonk y Poorter, 1994; Wilson *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2004), para describir la eficiencia fotosintética (Dijkstra y Lambers, 1989; Shipley y Vu, 2002) y la acumulación de reservas (Pontes *et al.*, 2007). Por otro lado, Westoby (1998), Garnier *et al.* (2004) y Roche *et al.*, (2004) han señalado que es versátil porque puede explicar la tasa de crecimiento en ambientes cambiantes. En virtud de lo anterior, se asumió que ambos cocientes serían potentes para contrastar las observaciones preliminares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el exterior, en Capilla del Monte (30° 52' LS 64° 30' LO), a 110 km hacia el norte de la ciudad de Córdoba, República Argentina. La población de referencia estuvo conformada con semillas de *Z. peruviana* procedentes de Capilla del Monte, Villa Giardino (31° 06' LS 64° 29' LO) y La Higuera (31° 01' LS 65° 06' LO). El 10 de octubre de 2008 las semillas de esta población de referencia se sembraron en almácigos, sobre turba y el 30 de noviembre de 2008 se trasladaron a macetas de plástico de 750 ml con un orificio único de drenaje en la base, utilizando tierra de lombriz y arena gruesa (50:50). Parte de las macetas fueron consideradas testigo y se colocaron sobre una plataforma enrejada que permitía el drenaje del exceso del agua del riego diario. Las macetas restantes se colocaron en bandejas plásticas Celpack K, sin orificios, de 25 cm de largo, 19 cm de ancho y 4 cm de altura que se mantuvieron con agua durante el experimento. Los individuos se ubicaron al azar. El diseño fue de un factorial con tres orígenes y dos niveles de humedad del sustrato (3x2). Los tratamientos y el número de repeticiones (n) en distintas fechas se detallan en la Tabla I.

Se contó el número de sobrevivientes, en cada planta se determinó el número de días entre la siembra y la aparición del primer capítulo expandido (DAF) y el 11 de enero de 2009, se contaron las hojas y los brotes axilares, y se midió la longitud del epicótilo. El 6 de marzo de 2009 se obtuvieron los pesos frescos de los vástagos de cuatro plantas de cada tratamiento, cortados a la altura del cuello y se reservaron las raíces. Posteriormente estos materiales se ensobraron y se colocaron en estufa a 60 °C. A las 48 hs se obtuvieron los pesos secos y se calcularon los cocientes LDMC y vástago:raíz.

El resto de los individuos se trasplantó a un sustrato de alta fertilidad con la finalidad de multiplicar este germoplasma considerado *elite* por contar con un ciclo de domesticación y de selección. Para el análisis estadístico (ANOVA y test de Tukey) se usó el programa *Infostat*.

RESULTADOS

El mayor porcentaje de sobrevivencia fue para el origen L, y no se observaron efectos de los tratamientos sobre este carácter.

Tratamiento	Origen	Drenaje deficiente	n Nov. 30, 2008	n Enero 11, 2009	n Marzo 6, 2009
L1	La Higuera	sí	12	10	4
P1	Capilla del Monte	sí	12	8	4
I1	Villa Giardino	sí	12	6	4
L0	La Higuera	no	12	10	4
P0	Capilla del Monte	no	12	6	4
I0	Villa Giardino	no	12	7	4

Tabla I. Tratamientos, número de repeticiones (n) a lo largo del experimento con dos regímenes de humedad del sustrato y para los orígenes I, P y L

El 11 de enero de 2009 no se registraron diferencias estadísticamente significativas para el número de brotes axilares y de hojas y tampoco para la longitud del epicótilo (Tabla II).

Tratamiento	Número de brotes axilares	Número de hojas	Longitud del epicótilo (cm)	DAF (días)	LDMC (g x g ⁻¹)	Cociente pesos secos vástago:raíz (g x g ⁻¹)
L1	0 a	10 a	4,97 a	100 c	0,283 a	2,57 a
P1	0 a	10 a	6,06 a	90 ab	0,384 a	5,428 b
I1	0 a	10 a	6,35 a	85 a	0,229 a	4,221 ab
L0	0 a	11 a	6,33 a	99 c	0,2777 a	2,679 a
P0	0 a	10 a	5,48 a	96 abc	0,3004 a	4,123 ab
I0	0,43 a	11 a	6,37 a	81 a	0,279 a	2,556 a

Tabla II. Longitud del epicótilo, número de hojas y de brotes axilares el 11 de enero de 2009 y DAF del experimento con dos regímenes de humedad del sustrato y para los orígenes I, P y L.

Las letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$

Para el cociente vástago:raíz, se observó un efecto del tratamiento ($p=0,044$). Las plantas P0 e I0 mostraron valores más bajos para el carácter con respecto a las plantas P1 e I1, respectivamente (Tabla II). En las condiciones suministradas los tratamientos produjeron respuestas semejantes para el LDMC y no se observaron efectos de las variables independientes (Tabla II). Se observaron polimorfismos para DAF en los que hubo efecto del origen ($p= 0,005$) (Tabla II). Las plantas I fueron de floración más temprana y el origen L mostró el máximo DAF.

DISCUSIÓN

La mortandad de individuos se debió parcialmente a la mala respuesta al manejo en cultivo, como consecuencia de la falta de domesticación de la población de referencia. La mayor sobrevivencia se observó en las plantas L, hecho que las hace potencialmente domesticables de manera más simple o en un plazo menor.

Según Forshey (1991), el exceso de agua en el sustrato está asociado a una elongación superior de los vástagos. Dado que en el presente experimento no se observaron diferencias significativas entre los

tratamientos para la longitud de los epicótilos (Tabla II), se presume que los tratamientos L1, P1 e I1 no se corresponden con situaciones de exceso de agua. En cuanto al resultado correspondiente al número de yemas axilares brotadas, se estima que la falta de fertilización pudo haber limitado el crecimiento en todos los individuos.

Kafkaki (1994) y Goncalves *et al.* (2001) observaron que el cociente vástago:raíz disminuye como consecuencia del estrés salino y Liao *et al.* (2001) y Price *et al.* (2002) indicaron que dicha disminución es una respuesta a situaciones de estrés nutricional o hídrico. Por lo tanto, el resultado para este cociente parece indicar que los individuos P0 e I0 sufrieron situaciones de estrés probablemente de origen hídrico, tal vez como consecuencia del tamaño pequeño del contenedor. Se presume, en consecuencia, o bien que las plantas L1, I1 y P1 no se perjudicaron con el exceso de agua en el sustrato, o bien que el agua suplementaria les resultó favorable.

El resultado para el LDMC permite interpretar que las plantas de los tres orígenes mostraron un potencial similar de crecimiento y eficiencia en el uso de los recursos (Vaieretti *et al.*, 2007) y que la capacidad de producir biomasa no fue afectada diferencialmente por los regímenes de humedad del

sustrato (Poorter y de Jong, 1999).

Con respecto a las diferencias fenotípicas para el DAF, estas podrían reflejar diferencias genéticas resultantes de la selección natural. A los fines de la domesticación, el menor DAF del origen I aparece como interesante debido a que la floración es un criterio que determina la venta de la planta y la anticipación de este momento da lugar a costos más bajos de producción. Por otra parte, el atraso en la floración del origen L podría sugerir que esas plantas estaban derivando fotosintatos a otras estructuras (como las radicales) mientras que las plantas de otro origen los derivaban a la inducción a la floración. Probablemente por eso, las plantas L mostraron valores menores de la relación vástago:raíz.

Lo anterior indica que se cumplieron los objetivos del presente estudio y que fue posible confirmar los resultados precedentes e identificar y seleccionar individuos con comportamiento satisfactorio para las condiciones de cultivo impuestas. Se demostró que el cociente vástago:raíz es capaz no solo de distinguir entre los diferentes tratamientos sino de mostrar cuál es el más indicado para la población de referencia.

Lo anterior permite concluir que en la población de referencia de *Z. peruviana* existen recombinantes con respuesta indiferente o levemente favorable al drenaje deficiente. Se planea un experimento de mayor dimensión con la población *elite* surgida de esta experiencia, el cual reproducirá las condiciones de los sistemas de mitigación destinados a la recuperación de aguas. Estos datos podrían ser de suma utilidad para la zona en la que se realizó este ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arendonk J.J.C.M., Poorter H. (1994). The chemical composition and anatomical structure of leaves of grass species differing in relative growth rates. *Plant, Cell & Environ.* 17:963-970.
- Bowen B.J., Pate J.S. (1993). The Significance of Root Starch in Post-fire Shoot Recovery of the Resprouter *Stirlingia latifolia* R. Br. (Proteaceae). *Ann. Bot.* 72: 7-16.
- Burgh M.Y., Bredebjano G.J. (2005). The distribution and extent of declared weeds and invader plants in the macro channel of the Olifants river system Mpumalanga. *Koedoe.* 48 (1):67-75.
- Campbell C.A., de Jong R. (2000.) Root to straw influence of moisture and rate of N fertilizer. *Can. J. S. Sc.* 81:39-43.
- Diaz S., Hodgson J.H., Thompson K., Cabido M., Cornelissen J.H.C., Jalili A., Montserrat Martí G., Grime J.P., Zarrinkamar F., Asri Y., Band S.R., Basconcelo S., Castro Díez P., Funes G., Hmzehee B., Khoshnevi M., Pérez Harguindeguy N., Perez Rontome M.C., Shirvany F.A., Vendramini F., Yazdani S., Abbas Azimi R., Bogaard A., Boustani S., Charles M., Dehgaan M., Torres Espuny L., Falczuk V., Guerrero Campo J., Hynd A., Jones G., Kowsary E., Kazemi Saeed F., Maestro Martinez M., Romo Diez A., Shaw S., Siavash B., Villar Salvador P., Zak M.R. (2004). The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *J. Veg. Sci.* 15:295-304.
- Dijkstra P., Lambers H. (1989). Analysis of specific leaf area and photosynthesis of two inbred lines of *Plantago major* differing in relative growth rate. *New Phytol.* 113:283-290.
- Dimitri M.J., Lonardis R.F.J., Biloni J.S. (1997). El nuevo libro del árbol. Tomo I. Editorial El Ateneo. Argentina.
- Ericsson T. (1995). Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* 168-169:205-214.
- Fatemy F., Evans K., (1986). Effects of *Globodera rostochiensis* and water stress on shoot and root growth and nutrient uptake of potatoes. *Rev. Nem.* 9(2):181-184.
- Fatta N., Uría R., Roitman G.G. (2005). Caracterización de una población de *Zinnia peruviana*. VII° Jornadas Nacionales de Floricultura. 19-21 octubre 2005, Trevelin, Argentina, p. www.inta.gov.ar/esquel.info.
- Forshey C.G. (1991). Measuring growth in complex system: How do growth regulators alter growth? *HortScience* 26:999-1001.

- Fredeen A.L., Rao I.M., Terry N. (1989). Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiol.* 89:225-230.
- Garnier E., Shipley B., Roumet C., Laurent G. (2001). A standardization protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* 15:688-695.
- Garnier E., Cortez J., Billes G., Navas M.L., Roumet C., Debussche M., Laurent G., Blanchard A., Aubry D., Bellmann A., Neill C., Toussaint J.P. (2004). Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* 85(9):2630-2637.
- Goncalves F.R., Fernandez E.A.T., Ferreira H.F.F. (2001). Distribuicao de materia seca e composicao quimica das raizes, caule e fohlas de *Goiabeira submetida* a estresse salino. *PAB* 36(1):79-88.
- Goran I., Ågren G.I., Franklin O. (2003). Root: Shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. *Ann. Bot.* 92:795-800.
- Ho M.D., Rosas J.C., Brown K.M., Lynch J.P. (2005). Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. *Funct. Plant. Biol.* 32:737-748.
- InfoStat/P versión 1.1 (2002). <http://www.infostat.com.ar/index.php> (acceso dic. 2004).
- Kafkaki V. (1994). Combined irrigation and fertilization in arid zones. *Israel J. Plant Sci.* 42:301-310.
- Kang J.G., van Iersel M.W. (2004). Nutrient solution concentration affects shoot/root ratio, leaf area ratio and growth of subirrigated *Salvia (Salvia splendens)*. *HortScience* 39(1):49-54.
- Khaled R.A.H., Duru M., Decruyenaere V., Jouany C., Cruz P. (2006). Using leaf traits to rank native grasses according to their nutritive value. *Rang. Ecol. Manag.* 59(6):648-654.
- Ledig P.T., Bormann F.H., Wenger K.F. (1970). The distribution of dry matter growth between shoots and roots in loblolly pine. *Bot. Gazette* 131(4):349-359.
- Li Y., Johnson D.A., Su Y., Cui Y., Zhang T. (2005). Specific leaf area and leaf dry matter content of plants growing in sand dunes. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46:127-134.
- Liao H., Rubio G., Yan X., Cao A., Brown K.M., Lynch J.P. (2001). Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. *Plant Soil* 232:69-79.
- Mackay A.D., Barber S.A. (1985). Soil moisture effects on root growth and phosphorus uptake by corn. *Agron. J.* 77:519-523.
- Masle J., Passioura J.B. (1987). The effect of soil strength on the growth of young wheat plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 14:643-656.
- Müller I., Schmid B., Weiner J. (2000). The effect of nutrient availability on biomass allocation patterns in 27 species of herbaceous plants. *Perspect. Plant. Ecol. Evol. Syst.* 3:115-127.
- Olf H., Van Andel J., Bakker J.P. (1990). Biomass and shoot/root allocation of five species from a grassland succession series at different combinations of light and nutrient supply. *Funct. Ecol.* 4:193-200.
- Pace P.F., Cralle H.T., Sherif H.M., El-Halawany J., Cothren T., Senseman S.A. (1999). Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants. *J. Cotton Sci.* 3:183-187.
- Perfetti S., Fatta N. (2007). *Zinnia peruviana*: respuestas en postrasplante y a la restricción hídrica en tres poblaciones. III Jornadas Nacionales de Flora Nativa, 16-18 octubre. Primera Edición, AlfaVet Impresiones, Argentina, pp. 167-176.

- Perfetti S., Zacarias N., Zeballos N., Tognocchi B.M., Fatta N.A. (2008a). Evaluación de las tasas de establecimiento y de crecimiento inicial de plántulas de *Zinnia peruviana* de dos orígenes. XXXI Congreso Argentino de Horticultura, 30 septiembre-3 octubre, Mar del Plata, Argentina, p. 116.
- Perfetti S., Campos B.M., Aguirre G., Finzi L., Fatta N.A. (2008b). El agregado de una solución salino-sódica y de un preparado herbal estimulan el crecimiento de *Zinnia peruviana*. XXXI Congreso Argentino de Horticultura, 30 septiembre-3 octubre, Mar del Plata, Argentina, p.121.
- Planchuelo A.M., Carreras M.E., Fuentes E. (2003). Las plantas nativas como recursos ornamentales en la Argentina. En: Mascarini L., Villela F.F. y Wright E. (Eds). *Investigación y Tecnología de Producción: Conceptos y Generalidades*. Editorial de la Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina, pp. 300-303.
- Pontes L. da S., Soussana J.F., Louault F., Andueza D., Carrere P. (2007). Leaf traits affect the above ground productivity and quality of pasture grasses. *Funct. Ecol.* 21:844-853.
- Poorter H., de Jong R. (1999). A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol.* 143:163-176.
- Price A.H., Steele K.A., Gorham J., Bridges J.M., Moore B.J., Evans J.L., Richardson P., Jones R.G.W. (2002). Upland rice grown in soil filled chambers and exposed to contrasting water deficit regimes. I. Root distribution, water use and plant water status. *Field Crops Res.* 76:11-24.
- Reynolds H.L., D'Antonio C.D. (1996). The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen: Opinion. *Plant Soil* 185:75-97.
- Roche P., Diaz Burlinson N., Gachet S. (2004). Congruency analysis of species ranking based on leaf traits: which traits are more reliable? *Plant Ecol.* 174:34-48.
- Roemheld V., Kirkby E.A. (2007). Magnesium functions in crop nutrition and yield. *The Int. Fert. Soc. Proc.* 616 U.K. 4-23.
- Rogers H.H., Prior S.A., Runion G.B., Mitchell R.J. (1996). Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant Soil* 187(2):229-248.
- Samejima H., Kondo M., Ito O., Nozoe T., Shinano T., Osaka M. (2005). Characterization of root systems with respect to morphological traits and nitrogen-absorbing ability in the new plant type of tropical rice lines. *J. Plant Nut.* 28(5):835-850.
- Scheible W.R., Lauerer M., Schulze E.D., Caboche M., Stitt M. (1997). Accumulation of nitrate in the shoots acts as a signal to regulate shoot/root allocation in tobacco. *Plant J.* 11(4):671-691.
- Shipley B., Vu T.T. (2002). Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytol.* 153(2):359-364.
- Torres A.M. (1963). Taxonomy of *Zinnia*. *Brittonia* 15:1-25.
- Uría R., Fatta N., Roitman G. (2005). Ensayo de comportamiento de una especie nativa en los jardines de Buenos Aires. VII Jornadas Nacionales de Floricultura, 19-21 octubre, Trevelin, Argentina, p. www.inta.gov.ar/esquel.info.
- Vaieretti M.V., Diaz S., Vile D., Garnier E. (2007). Two measurement methods of leaf dry matter content produce similar results in a broad range of species. *Ann. Bot.* 99(5):955-958.
- Vendramini F., Diaz S., Gurvich D.E., Wilson P.J., Thompson K., Hodgson J.G. (2002). Leaf traits as indicators of resource use strategy in floras with succulent species. *New Phytol.* 154:147-157.

- Warncke D.D., Barber S.A. (1973). Ammonium and nitrate uptake by corn (*Zea mays* L.) as influenced by nitrogen concentration and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio. *Agron. J.* 65:950-953.
- Weiher E., Van der Werf A., Thompson K., Roderick M., Garnier E., Eriksson O. (1999). Challenging Theophrastus: a common core list of plant traits for functional ecology. *J. Veg. Sci.* 10(5):609-620.
- Westoby M. (1998). A leaf height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant Soil* 199:213-227.
- Wilson P.J., Thompson K., Hodgson J.G. (1999). Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytol.* 143:155-162.
- Yeh D.M., Lin L., Wright C.J. (2000). Effects of mineral nutrient deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot/root ratio in *Spatyphillum*. *Sci. Hort.* 86(3):223-233.