



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Expresión de biomarcadores de genotoxicidad, daño al ADN y estrés oxidativo
en células pulmonares humanas expuestas *in vitro* al fungicida mancozeb
(principio activo)**

Chiara Sofia Bonzon

Directora de tesis: Dra. Gabriela Chaufan

Codirectora de tesis: Dra. Nancy Andrioli

Lugar de trabajo: Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (LEEM),
Departamento Química Biológica, y Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE)
FCEN-UBA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Diciembre 2024

Chiara Sofia Bonzon

Dra. Gabriela Chaufan
(Directora de Tesis)

Dra. Nancy Andrioli
(Co-directora de Tesis)

Índice

Resumen.....	3
Title & Summary.....	4
Introducción.....	5
Uso de agroquímicos.....	5
Mancozeb.....	5
Estrés oxidativo.....	7
Daño al ADN y genotoxicidad.....	7
Ensayos in vitro.....	8
Objetivos e hipótesis.....	9
Materiales y métodos.....	9
1. Cultivos celulares.....	9
1.1. Condiciones de cultivo.....	9
1.2. Tratamientos.....	10
2. Citotoxicidad - MTT.....	11
3. Genotoxicidad - Ensayo de micronúcleos.....	12
4. Daño al ADN - Ensayo de cometa.....	13
5. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	14
5.1. Determinación de proteínas totales.....	14
5.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD).....	15
5.3. Actividad catalasa (CAT).....	16
5.4. Actividad glutatión S-transferasa (GST).....	17
5.5. Determinación del contenido total de glutatión (GSH).....	18
6. Análisis estadístico.....	19
Resultados.....	20
1. Citotoxicidad.....	20
2. Genotoxicidad.....	21
3. Daño al ADN.....	23
4. Biomarcadores de estrés.....	24
Discusión y conclusiones.....	27
Referencias bibliográficas.....	29

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis directoras, Gaby y Nancy, por ayudarme en todo momento desde que toqué la puerta de sus laboratorios. Por darme mil oportunidades sin esperar nada a cambio, y por su amabilidad y cariño que hicieron de los últimos años de mi carrera sean increíbles. Gracias por hacerme sentir que soy parte desde el primer día.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por darme una mano siempre que hacía falta, parte de este trabajo es gracias a ustedes.

A mi familia, por su amor incondicional y acompañarme todos estos años. Por siempre preguntar e interesarse por mi carrera, por recordar y estar siempre desde los gestos más pequeños. A mi mamá, por siempre esperarme con una sonrisa y comida en la mesa después de estar mil horas afuera de casa; a mi papá, por estar, escuchar, y responder siempre con las palabras justas; y a mi hermana, por enseñarme y mostrarme que la resiliencia da sus frutos.

A mis amigas de toda la vida: gracias por cada éxito, cada velita, cada compañía y cada festejo. Por estar en las crisis, dándome los ánimos que me faltaban para seguir y confiar más en mí que yo misma.

A la Facultad de Ciencias Exactas, por ser una segunda casa y rodearme de gente admirable y apasionante. Por permitirme conocer a mis amigos de la facultad, que sin ellos no habría llegado hasta acá. Gracias por las mil horas y mil meriendas juntos, por las risas y por ser el mejor grupo de trabajo. Gracias a todos los docentes que me formaron con humildad y por tratar a todos los alumnos como un par, valorando los errores y la curiosidad. Cada uno me enseñó algo que voy a llevar conmigo siempre.

A los jurados que evaluaron esta tesis, es un honor que profesionales de su nivel lean mi trabajo. Agradezco mucho su tiempo y dedicación.

Finalmente, a la Universidad pública, por permitirme a mí y a todos los argentinos formarse profesionalmente con una educación de excelencia.

Resumen

El uso de pesticidas en la agricultura plantea actualmente una preocupación significativa debido a los efectos adversos que muchos agroquímicos tienen sobre el medio ambiente y la salud humana. En 2020, la Unión Europea prohibió el uso del fungicida de amplio espectro Mancozeb (MZ) debido a evidencias de sus impactos negativos; sin embargo, su mercado global continúa en expansión. En este contexto, el presente estudio se enfocó en evaluar cómo el principio activo de MZ afecta la línea celular A549, partiendo de la hipótesis de que posee efectos citotóxicos directamente proporcionales a su concentración y que induce daño al ADN, genotoxicidad y estrés oxidativo. Se determinó la curva de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT con la cual se estimó un $CL_{50} = 45,87 \pm 1,14 \mu\text{g/ml}$, y se establecieron los parámetros de NOAEL y LOAEL como 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, para las concentraciones ensayadas a 24 horas de tratamiento. A partir de estos datos, se definieron las concentraciones sub-citotóxicas para los ensayos posteriores. Al analizar el índice de división nuclear se revelaron diferencias significativas a concentraciones 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$, indicando que el MZ a estas concentraciones genera citostaticidad en las células A549 afectando su proliferación. Adicionalmente se observó un leve aumento en la frecuencia de micronúcleos a 10 $\mu\text{g/ml}$, aunque este aumento no fue significativo. El ensayo de cometas mostró un aumento significativo del daño al ADN a 20 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo que el fungicida afecta la integridad del ADN. Para evaluar si estos efectos están mediados por estrés oxidativo, se analizaron las actividades de las enzimas Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD) y Glutación S-transferasa (GST) y el contenido de glutatión total mediante ensayos espectrofotométricos. La actividad de CAT disminuyó significativamente a concentraciones de 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la actividad de SOD se redujo en todas las concentraciones del principio activo de MZ. Contrastando, la actividad de GST aumentó significativamente a 20 $\mu\text{g/ml}$, acompañada de una disminución del contenido de GSH en la misma concentración. Los resultados del presente estudio indican que el MZ ejerce un efecto citotóxico dosis-dependiente sobre la línea celular A549, afectando su proliferación a concentraciones subletales. Si bien se detectó daño en el ADN, no se pudo confirmar si este es de naturaleza genotóxica o citotóxica, ya que no se observó un aumento significativo en la formación de micronúcleos. En las condiciones ensayadas no fue posible afirmar que la toxicidad del MZ está mediada vía estrés oxidativo, pero tampoco se puede descartar. Se sugiere realizar estudios adicionales para esclarecer el mecanismo de toxicidad del MZ sobre la línea A549 explorando diferentes tiempos de exposición y menores concentraciones para poder determinar el comportamiento de estas enzimas antioxidantes. Estos resultados resaltan la necesidad de profundizar en la evaluación de los efectos del MZ, mejorar la evaluación de riesgos y promover prácticas agrícolas más seguras para la salud humana y el medio ambiente.

Title & Summary

Expression of biomarkers of genotoxicity, DNA damage, and oxidative stress in human lung cells exposed *in vitro* to the fungicide mancozeb (active ingredient)

The use of pesticides in agriculture is currently a concern due to the negative effects that many agrochemicals have on the environment and human health. In 2020, the European Union banned the use of the broad-spectrum fungicide Mancozeb (MZ) due to evidence of its harmful impacts; however, its global market continues to grow. In this context, the present study focused on evaluating how the active ingredient of MZ affects the A549 cell line, based on the hypothesis that it has cytotoxic effects directly proportional to its concentration and induces DNA damage, genotoxicity, and oxidative stress. The cytotoxicity curve was determined using the MTT assay, estimating a $LC_{50} = 45.87 \pm 1.14 \mu\text{g/ml}$, with the NOAEL and LOAEL parameters set at 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively, for the studied concentrations after 24 hours of exposure. Based on these values, sub-cytotoxic concentrations were established for subsequent assays. The analysis of the nuclear division index revealed significant differences at concentrations of 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$, indicating that MZ at these concentrations causes cytostaticity in A549 cells, affecting their proliferation. Additionally a slight increase in micronucleus frequency was observed at 10 $\mu\text{g/ml}$, but it was non significant. The comet assay showed a significant increase in DNA damage at 20 $\mu\text{g/ml}$, suggesting that the fungicide compromises DNA integrity. To assess whether these effects were mediated by oxidative stress, the activities of the Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), and Glutathione S-transferase (GST) enzymes, along with total glutathione content, were analyzed using spectrophotometric assays. CAT activity significantly decreased at concentrations of 10 and 15 $\mu\text{g/ml}$, while SOD activity was reduced at all concentrations of MZ. In contrast, GST activity increased significantly at 20 $\mu\text{g/ml}$, accompanied by a significant decrease in GSH content at the same concentration. The results of this study indicate that MZ exerts a dose-dependent cytotoxic effect on the A549 cell line, affecting cell proliferation at sublethal concentrations. Although DNA damage was detected, it could not be confirmed whether this damage is genotoxic or cytotoxic in nature, as no significant increase in micronucleus formation was observed. Under the conditions tested, it was not possible to assert that MZ toxicity is mediated via oxidative stress, but it also shouldn't be ruled out. Additional studies are recommended to clarify the mechanism of MZ toxicity on the A549 cell line testing lower concentrations and exposure times to better determine the behavior of these enzymes. These findings highlight the need to further evaluate the effects of MZ, improve risk assessments, and promote safer agricultural practices for human health and the environment.

Introducción

Uso de agroquímicos

Ante el rápido crecimiento poblacional en el siglo XX, se desarrollaron diversas estrategias para incrementar la producción de alimentos. Entre ellas, destacó el uso de compuestos químicos en la agricultura, destinados a reducir las enfermedades de los cultivos y optimizar su rendimiento. Hoy en día, alrededor de un tercio de los productos alimenticios depende del uso de pesticidas, y esta cifra aumenta año tras año debido al cambio climático. Aunque la manufacturación e implementación de los diferentes agroquímicos fue crucial para satisfacer la demanda alimentaria y ha traído grandes beneficios, su aplicación a gran escala impacta negativamente sobre el medio ambiente al filtrarse en distintos compartimentos como el agua, el aire y la tierra (Tudi, M. et al, 2021). Este fenómeno afecta a una variedad de organismos, incluidos animales y seres humanos. La exposición humana a estos químicos ocurre principalmente a través del consumo diario de alimentos y agua, aunque quienes enfrentan el mayor riesgo son los trabajadores rurales que manipulan estos pesticidas directamente (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). En un estudio reciente llevado a cabo en poblaciones de 8 pueblos rurales de Argentina reveló una mayor incidencia de cáncer en aquellos que viven en proximidad a las aplicaciones de pesticidas (Verzeñassi et al, 2023).

En la mayoría de los países se determina un nivel máximo de residuos presentes en el agua de consumo humano, pero específicamente en Argentina la lista de pesticidas medidos para la determinación de calidad de agua definida por la Ley 18284 (Capítulo XII) se encuentra desactualizada. En un estudio realizado en el presente año (Aparicio & De Gerónimo, 2024) se encontraron restos de muchos pesticidas de uso actual en el agua potable no tenidos en cuenta por el ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica), y la concentración individual de pesticidas en el 8.7% y 17.6% de las muestras tomadas de fuentes públicas y privadas, respectivamente, superaban el límite máximo de concentración definido por la Unión Europea para pesticidas (0,1 µg/l). Teniendo todo esto en cuenta, parece crucial reevaluar las medidas de seguridad y asegurar que los pesticidas utilizados en las zonas rurales del país y sus concentraciones de uso sean seguros.

Mancozeb

El mancozeb (MZ) es un fungicida agrícola de amplio espectro que se encuentra en el mercado desde 1948 (EPA, 2005) y a partir de entonces su aplicación se realizó de manera extensiva. El MZ pertenece a la familia de fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) y se encuentra acomplejado con manganeso y zinc (Figura 1). Funciona como un agente fungicida al inactivar grupos sulfhidrilo de los aminoácidos de enzimas mitocondriales fúngicas afectando el metabolismo de lípidos, respiración y producción de ATP. Como su mecanismo de acción se basa en la inactivación de enzimas, no es irrazonable pensar que este compuesto podría afectar a células de otros organismos (Roede & Miller, 2014).

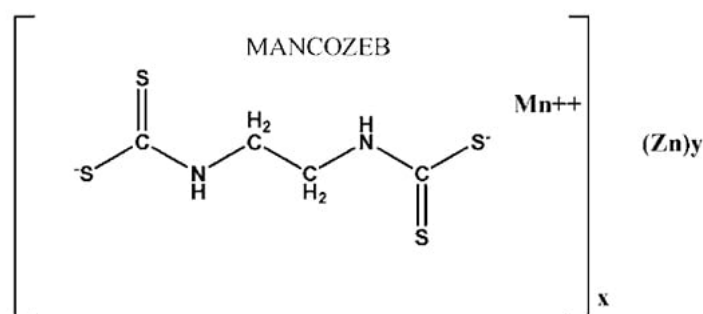


Figura 1 - Estructura química del principio activo de MZ.

El MZ ha sido identificado como un potente carcinógeno en animales de laboratorio (Belpoggi et al., 2002; Cecconi et al., 2007), con evidencia de algunos efectos genotóxicos (Cecconi et al., 2007). Esto podría estar relacionado con la formación de su metabolito, el etilenbisditiocarbamato o EBDC, que puede biotransformarse en etilentiourea, una sustancia con propiedades carcinogénicas, teratogénicas y antitiroideas (Dearfield, 1994). En humanos, se ha reportado una asociación moderada entre la exposición al MZ y defectos en el tubo neural, aunque no se observó un aumento en la incidencia de cáncer de tiroides, como ocurrió en estudios con ratas (Nordby et al., 2005).

Estudios *in vitro* también han demostrado que el MZ provoca efectos tóxicos en células hepáticas, induciendo muerte celular (Pirozzi et al., 2016). En células de colon humanas, se ha observado que induce apoptosis a bajas concentraciones y disminuye la actividad de los complejos I, III, IV y V de la cadena respiratoria (Dhaneshwar & Hardej, 2021). Se ha observado que la exposición a MZ disminuye la fertilidad en ratones hembra (Liu et al, 2017) y podría llegar a afectar el sistema reproductivo femenino (Cecconi et al., 2007; Baligar & Kaliwal, 2001; Rossi et al, 2006). Estos efectos podrían atribuirse a la apoptosis mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno (Hoffman & Hardej, 2012; Kumar et al., 2019; Mohammadi-Sardoo et al, 2018) o al daño en el ADN, como se ha documentado en varios estudios *in vitro* e *in vivo* (Calviello et al., 2006; Paz-Trejo & Gómez-Arroyo, 2017; Goldoni et al., 2014).

La concentración de aplicación de este compuesto (formulación MZ 80%) varía según el cultivo, siendo la más alta de 4 kg/Ha en arroz (Farm Chemicals S.A., s.f.). Los residuos de MZ detectados en frutas y hortalizas sugieren que la población podría estar crónicamente expuesta. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó un rango de exposición de 0,01-1 µg/kg/día (WHO, 1988) debido a su capacidad de inducir cáncer de tiroides y hepático en roedores, clasificándolo en el grupo 3 de sustancias químicas según la IARC (2001).

Todos estos antecedentes llevaron a la suspensión del uso del MZ en los países de la Unión Europea (Official Journal of the European Union, 2020). Igualmente, en 2022 el mercado global de mancozeb alcanzó un valor de 1148,81 millones de dólares, y se espera que continúe creciendo de manera sostenida durante los próximos años, con un incremento promedio anual del 4.4%. (The Insight Partners, 2023)., Considerando que se sigue utilizando en el ámbito agrícola en muchos países, incluyendo Argentina, y que su mercado se encuentra en constante crecimiento, es prudente estudiar los efectos negativos que puede tener este pesticida sobre la salud humana.

Estrés oxidativo

El oxígeno, compuesto esencial para la vida en la Tierra, desempeña un papel clave en la respiración celular y en diversas funciones metabólicas. Sin embargo, su presencia también puede desencadenar procesos que amenazan la integridad celular y la salud humana. Esto ocurre por la formación y activación de compuestos llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), que son altamente reactivas y tienden a oxidar otros compuestos. Muchos son radicales libres, los cuales son inestables al tener electrones desapareados. Las formas principales de ERO presentes en las células son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) (Ong & Logue, 2023). El origen de estos compuestos puede ser fisiológico, principalmente por la actividad mitocondrial, peroxisomal y del retículo endoplasmático, y tienen entre sus funciones la señalización celular y defensa contra microorganismos. Sin embargo, también pueden producirse debido a factores exógenos como la exposición a rayos X, contaminantes químicos o fármacos (Corrales & Muñoz, 2012).

La neutralización de las ERO en las células se da a través de antioxidantes; estos compuestos o sistemas redox (incluidos los sistemas de glutatión y tioredoxina) convierten las ERO en moléculas estables, bloqueando así sus efectos dañinos. La "primera línea de defensa" contra el daño oxidativo está conformada por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), mientras que la "segunda línea de defensa" incluye antioxidantes como el glutatión (GSH), la vitamina E y el ascorbato, entre otros (Pisoschi & Pop, 2015).

El mantenimiento de niveles óptimos de ERO en la célula implica un equilibrio cuidadoso entre su producción y la neutralización controlada por los antioxidantes. La interrupción de este equilibrio provoca una acumulación de ERO, generando un estado conocido como estrés oxidativo, que si no se resuelve pone en peligro la salud celular. El exceso de ERO en las células causa daño en las macromoléculas, incluyendo el ADN (Lioi et al, 1998). El estrés oxidativo está asociado con los mecanismos patogénicos de varias enfermedades, incluidas enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias, así como trastornos psicológicos o procesos de envejecimiento (Ďuračková, 2010).

Uno de los mecanismos moleculares de toxicidad más estudiados inducidos por pesticidas es el estrés oxidativo (Franco et al., 2009). Por lo tanto, resulta fundamentada la relevancia de investigar el estrés oxidativo en este estudio.

Daño al ADN y genotoxicidad

La integridad de la información genética en los organismos es esencial para su supervivencia. Si bien las mutaciones son una de las fuentes de variabilidad que contribuye con el proceso evolutivo de las poblaciones biológicas, a nivel individual puede inducir efectos adversos como la muerte celular, el desarrollo de cáncer y otras enfermedades. Dado que las mutaciones son eventos aleatorios, el resultado de una mutación dependerá de su localización en el genoma y de la secuencia de ADN impactada, ya que estas variables determinan la afectación de la funcionalidad genética. Los daños en el ADN pueden originarse por fuentes endógenas, como errores en la replicación, o exógenas, como la exposición a la radiación ultravioleta, entre otras. Aun cuando las células poseen mecanismos de reparación del ADN, los niveles de injuria pueden superar la capacidad de los mencionados mecanismos (Chatterjee & Walker, 2017).

La exposición de las células a los agentes exógenos, tanto químicos como físicos, que se clasifican como genotoxinas y/o mutágenos incrementan la probabilidad de inducir mutaciones que resultan en disfunciones celulares. Las sustancias genotóxicas se definen como “agentes que alteran la estructura, información, o segregación del ADN, incluyendo daño que no afecta su replicación o lo hacen de manera temporal”; mientras que las mutagénicas inducen cambios permanentes en el ADN (UN, 2021).

La evaluación del potencial genotóxico de un agente requiere la implementación de bioensayos en los que se realiza una exposición controlada y se cuantifican puntos finales para la obtención de biomarcadores de efecto genotóxico. Entre los biomarcadores más utilizados con este propósito se encuentran las anormalidades de la interfase, como la formación de micronúcleos. Los micronúcleos (MNi), considerados biomarcadores de genotoxicidad multipropósito, se componen de fragmentos de ADN provenientes de rupturas o pérdida cromosómica que, luego de una división celular, se separan del núcleo principal y son envueltos en membrana nuclear, implicando un daño irreparable del ADN.

De la misma definición de genotoxicidad se desprende que es necesario mantener activos los procesos vinculados a la división celular para revelar los efectos genotóxicos por medio de los biomarcadores mencionados. Por esta razón las pruebas de genotoxicidad deben incluir pruebas de citotoxicidad o citostaticidad con el fin de determinar el rango de concentraciones subletales y sub-citotóxicas. Con este propósito se puede utilizar como un biomarcador el índice de división nuclear (IDN) que es inversamente proporcional al tiempo de duplicación poblacional; una alteración en este índice, indica un posible efecto citotóxico (Fenech, 2000).

En seres humanos, la exposición a sustancias mutagénicas puede provenir de contaminantes ambientales, residuos de pesticidas en alimentos, medicamentos, cosméticos y otros factores relacionados con el estilo de vida (Choudhuri et al., 2021). Esto subraya la importancia de evaluar los riesgos asociados con la exposición a agentes genotóxicos e implementar medidas de control para minimizar o eliminar su presencia en el ambiente.

Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* consisten en utilizar como modelo de estudio células en cultivos. Preceden a los estudios *in vivo* y por ese motivo, dependiendo del resultado, podría permitir evitar el uso de animales de experimentación, lo que es una ventaja tanto desde el punto de vista ético como por ser más costo-efectivos. A estas ventajas se suma la posibilidad de examinar procesos celulares específicos. Los cultivos de células humanas que se utilizan actualmente se originaron en la década de 1950, y consisten en la recolección de células de un tejido específico, manteniéndolas a temperatura corporal (37°C) en un medio enriquecido que simula el entorno del cuerpo humano (Taylor, 2014).

La línea celular A549 deriva de células de un adenocarcinoma de pulmón, crece en monocapa y representa un modelo estable del epitelio pulmonar de los alvéolos tipo II (Foster et al., 1998). Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en estudios de toxicología, farmacología, daño pulmonar y procesos metabólicos *in vitro* (Andrioli & Chaufan, 2021; Arif et al., 2019; Yan et al., 2020). Las investigaciones toxicológicas *in vitro* realizadas por nuestro grupo con diversos agroquímicos han demostrado efectos citotóxicos asociados a mecanismos de estrés oxidativo (Chaufan et al. 2014; Coalova et al 2023) y genotóxicos (Chaufan et al., 2019; Andrioli & Chaufan, 2021; Andrioli et al., 2023). Entonces, se propuso

utilizar la línea celular A549 como modelo para estudiar el efecto del MZ en las células humanas.

Objetivos e hipótesis

Dados los impactos significativos que los pesticidas tienen tanto en la salud humana como en el medio ambiente, resulta crucial profundizar en el conocimiento de sus efectos. Este estudio se enfoca en evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos que el principio activo del fungicida MZ ejerce sobre la línea celular A549, proporcionando así información valiosa que podría contribuir a una mejor comprensión y regulación del uso de pesticidas en la agricultura. Con esto, se proponen los siguientes objetivos e hipótesis de trabajo:

Objetivo 1. Caracterizar la curva de citotoxicidad del Mancozeb, identificando las concentraciones subletales para la evaluación de genotoxicidad en células A549.

→ **Hipótesis 1.** El Mancozeb exhibe efectos citotóxicos en la línea celular A549, y estos efectos son directamente proporcionales a la concentración del fungicida.

Objetivo 2. Evaluar la expresión de biomarcadores de genotoxicidad, incluyendo daño al ADN y formación de micronúcleos, y biomarcadores de estrés oxidativo tras la exposición a concentraciones inferiores a la CL50 de Mancozeb en la línea celular A549.

→ **Hipótesis 2.** El Mancozeb induce daño al ADN, la formación de micronúcleos e induce estrés oxidativo en la línea celular A549.

Materiales y métodos

1. Cultivos celulares

1.1. Condiciones de cultivo

La línea celular A549 fue adquirida del Banco Argentino de Células (CABA, Bs. As., Argentina). Estas células fueron cultivadas en medio completo (medio mínimo esencial (MEM), suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml, vitaminas y aminoácidos no esenciales), en un ambiente húmedo, con CO₂ al 5% (v/v) a 37°C.

Las células se cultivaron en frascos T-25 (4 ml; 2,8x10⁶ células/frasco), renovando el medio de cultivo dos veces por semana. Los pasajes celulares se realizaron cuando las células alcanzaban una confluencia del 80-90%. Este proceso se realizó siempre de la misma manera, e implicó descartar el medio de cultivo, lavar dos veces con PBS (Phosphate Buffer Saline) y añadir una solución de tripsina-EDTA al 0,05%. Dado que estas células se cultivan en monocapa, esta enzima facilita su desprendimiento al degradar las proteínas de adhesión. Para optimizar la acción de la tripsina, los frascos se incubaron a 37°C durante 5-10 minutos, verificando su efectividad mediante observación microscópica. Posteriormente, se alicuotó y diluyó la suspensión celular en 4 ml de medio completo, lo cual detiene la acción de la tripsina gracias a la presencia de SFB.

1.2. Tratamientos

Con el fin de determinar la curva de citotoxicidad del principio activo del MZ (Mancozeb Prestanal®, grado analítico) se crecieron las células en placas de 96 wells ($\sim 0,04 \times 10^6$ células/pocillo) hasta una confluencia del 80%. Luego, se lavó con PBS y se añadió medio sin SFB con concentraciones crecientes de MZ (previamente diluido en DMSO) durante 24 hs: 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron 12 réplicas de cada tratamiento a la par de un control de concentración 0 $\mu\text{g/ml}$ con el agregado de 0.375% de DMSO (vehículo) calculado a partir de la concentración más alta de la curva (250 $\mu\text{g/ml}$).

Con la curva anterior se definieron las concentraciones subletales con las que posteriormente se evaluó la expresión de biomarcadores de genotoxicidad y de estrés oxidativo. Para los ensayos de micronúcleos (MNi) se utilizaron concentraciones de 2,5; 5; 7,5; 10; 15, y 20 $\mu\text{g/ml}$. En cambio, para los de cometa se usaron concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de MZ, al igual que para los ensayos de estrés oxidativo. Para todos los casos el tiempo de intoxicación fue de 24 hs a 37°C.

Dependiendo del ensayo, las células fueron sembradas en distintos tipos de placas. Para la determinación de actividad de enzimas antioxidantes, compuestos antioxidantes no enzimáticos y proteínas totales fueron cultivadas en placas de Petri (8 ml; $\sim 8,8 \times 10^6$ células/placa) con 6 réplicas por tratamiento. Tanto para micronúcleos como para cometas se utilizaron placas de 6 pocillos (2 ml; $\sim 1,2 \times 10^6$ células/pocillo) y se realizaron 3 réplicas de cada concentración. Se puede observar un resumen esquemático de los ensayos y tratamientos en la Figura 2.

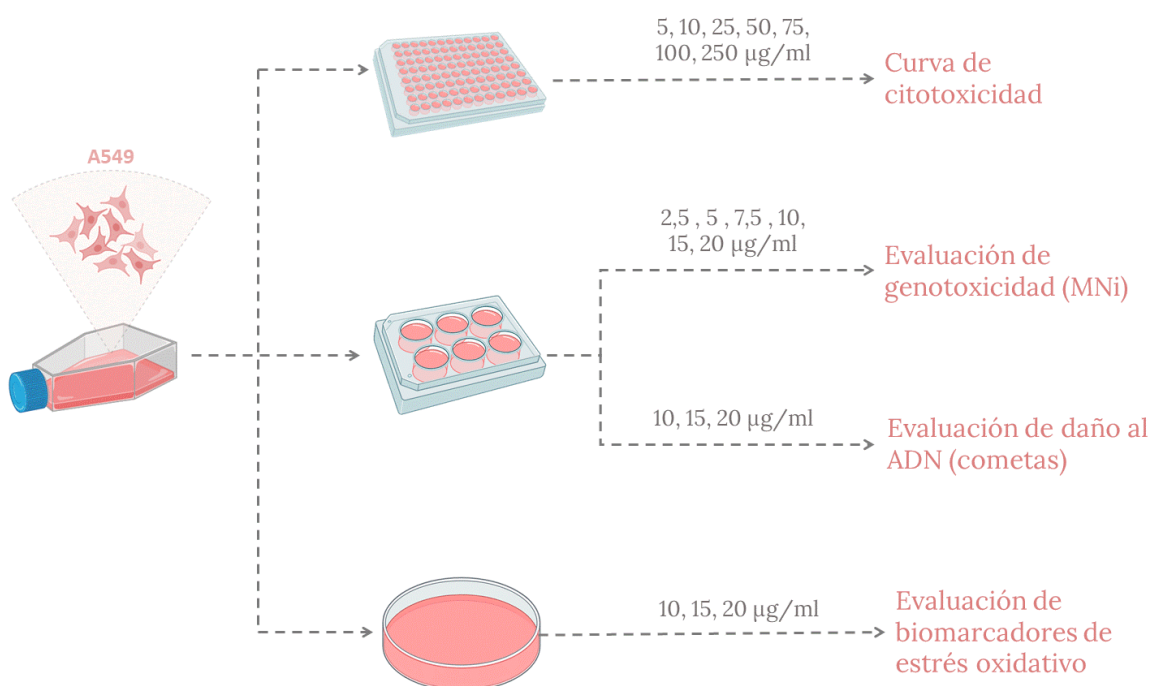


Figura 2 - Tratamientos realizados para los ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad, daño al ADN y biomarcadores de estrés oxidativo. Los valores sobre las flechas representan las concentraciones del principio activo MZ utilizadas. Todos los tratamientos se realizaron a 24 hs de exposición.

2. Citotoxicidad - MTT

Este ensayo colorimétrico se realiza para determinar concentraciones citotóxicas del agroquímico en estudio. Se basa en la reducción metabólica del compuesto de color amarillo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, también conocido como MTT. El MTT entra en las células y pasa a la mitocondria, donde se reduce por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto insoluble de color púrpura, el formazan. Dado que la reducción de MTT sólo puede ocurrir en las células metabólicamente activas, el nivel de formazan producido permite medir la viabilidad celular.

El procedimiento consta de la realización de una curva de formación de formazan en función de la concentración del tóxico. La concentración de formazan se mide mediante un espectrofotómetro, registrando la absorbancia a 570 nm. (Mosmann T., 1983)

Una vez realizados los tratamientos de 24 hs en las dos placas de 96 pocillos con 12 réplicas de cada una de las concentraciones nombradas anteriormente, se retiró el medio con MZ (o control) y se lavó con PBS cada uno de los pocillos. Luego se añadió 200 µl de medio fresco conteniendo 1 mg/ml de MTT a cada uno de los pocillos, asegurando trabajar con la menor cantidad de luz posible ya que el MTT es fotosensible. Pasadas 1,5 horas de incubación a 37°C en oscuridad se retiró el medio y se disolvieron los cristales restantes de MTT agregando 200 µl de etanol absoluto a todos los pocillos y resuspendiendo con la pipeta. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 570 nm restando la absorbancia a 630 nm correspondiente a componentes inespecíficos en un lector de placas (DR-200Bs Microplate Reader) y se generó la curva de absorbancia mencionada anteriormente. Se puede observar una esquematización del ensayo en la Figura 3.

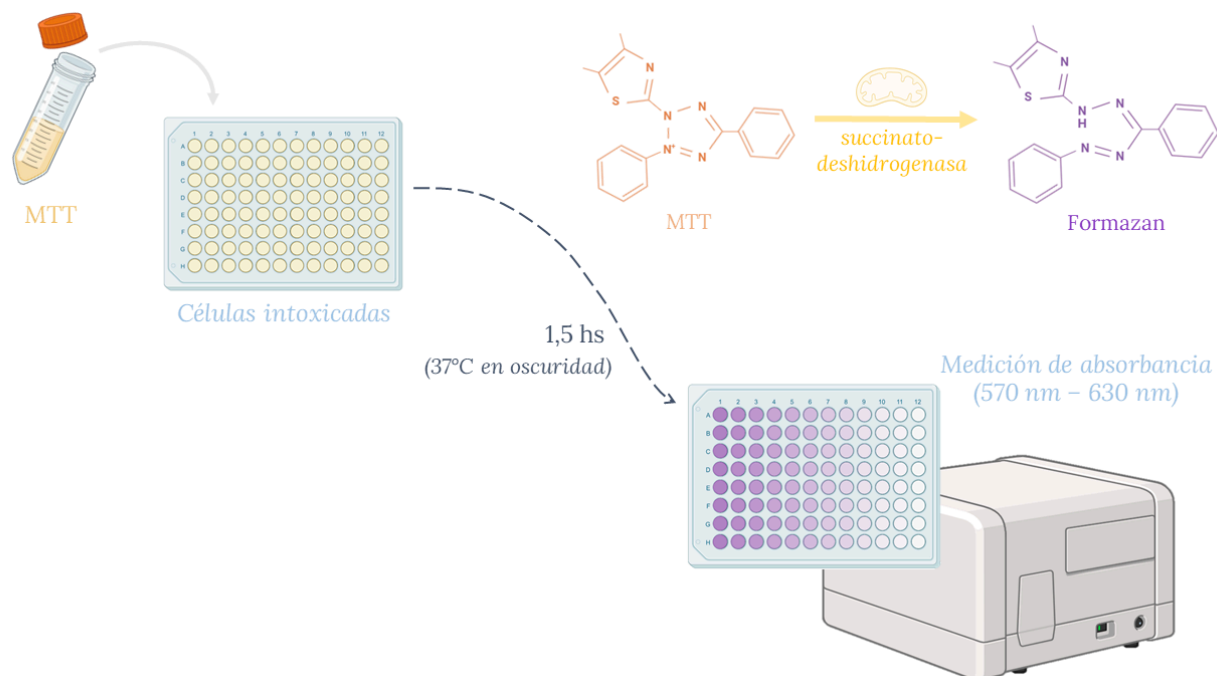


Figura 3 - Esquematización del ensayo de MTT para determinar concentraciones citotóxicas de un compuesto.

A partir de estos datos, se determinó la concentración letal 50 (CL50), la cual se define como la concentración del compuesto requerida para reducir un 50% la viabilidad celular.

También se pudieron determinar los parámetros de toxicidad LOAEL (lowest observed adverse effect level) y NOAEL (no observed adverse effect level). El primer parámetro (LOAEL) denota la mínima concentración en la que el tóxico estudiado presenta efectos nocivos sobre el modelo estudiado, mientras que el segundo (NOAEL) es la concentración más alta en la que no hay efectos significativos en relación al control (0 µg/ml). Son utilizados normalmente para la determinación de concentraciones para ensayos clínicos de fármacos o para determinar la toxicidad de compuestos para sus regulaciones (Pizzo & Benfenati, 2016).

3. Genotoxicidad - Ensayo de micronúcleos

Con el fin de evaluar si el principio activo del Mancozeb es genotóxico a concentraciones sub-citotóxicas se procedió a realizar un ensayo de micronúcleos aplicando la técnica de bloqueo de citocinesis (CBMN) (Fenech, 1993). Como los micronúcleos solo se pueden expresar en células que completan la división nuclear, el uso de citocalasina B, un inhibidor del ensamblaje de microfilamentos, permite bloquear la citocinesis para cuantificar los micronúcleos en células binucleadas en interfase. Esto garantiza que las células hayan experimentado división durante la exposición. Esta metodología evita subestimar el daño al cuantificar los micronúcleos, ya que en las células mononucleadas que detienen su división celular no se formarían.

Las células utilizadas en este ensayo fueron cultivadas sobre cubreobjetos estériles. Luego de las 24 horas de exposición al MZ, se lavó con PBS y se añadió medio de cultivo con SFB y Citocalasina B 4 µg/mL durante 24 horas para permitir una replicación de las células y generar células binucleadas. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con ácido acético:metanol (1:3) durante 10 minutos y vueltas a lavar 3 veces con PBS.

Se realizó una tinción mediante el agregado de GIEMSA 20% durante 10 minutos obteniendo preparados permanentes. Luego de retirar el exceso de colorante, se lavó los cubreobjetos con agua destilada y se verificó la tinción bajo el microscopio. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos con DePeX boca abajo para proteger las células fijadas.

Cada preparado fue observado en un microscopio óptico (Leica DM500) a 400x, contabilizando el número de células mono, bi, tri y tetra nucleadas tanto con o sin micronúcleos, a la vez de aquellos núcleos con aberraciones cromosómicas como puentes y buds, hasta contabilizar como mínimo 50 células binucleadas. Se pueden observar unas imágenes tomadas en este trabajo en la Figura 4.

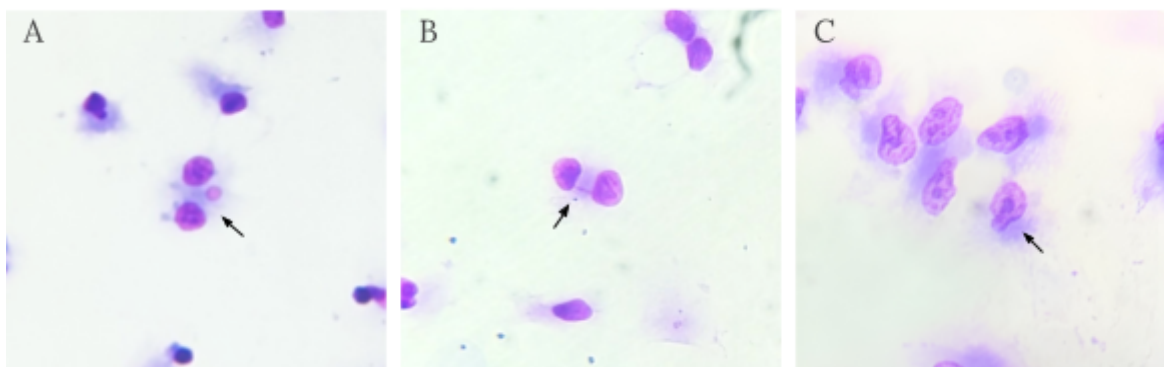


Figura 4 - Preparaciones del ensayo de CBMN de células A549 binucleadas teñidas con GIEMSA (400x).

(A) Célula binucleada con micronúcleo, (B) célula binucleada con puente, y (C) célula mononucleada con bud.

Con los datos obtenidos, se calculó el índice de división nuclear (IDN) para evaluar la citotoxicidad/citostaticidad con la siguiente ecuación:

$$IDN = \frac{N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4}{N_{Tot}} \quad (1)$$

donde Ni es el número de células con i cantidad de núcleos y N_{Tot} el total de células contabilizadas. Para poder evaluar la genotoxicidad se estimó la frecuencia de micronúcleos con la ecuación (2).

$$Frecuencia\ de\ MNi = \frac{\# \text{ células binucleadas con } MNi}{\# \text{ células binucleadas totales}} \quad (2)$$

4. Daño al ADN - Ensayo de cometa

Para evaluar el daño al ADN se realizó el ensayo de cometa o electroforesis de células únicas (SCGE) (Singh et al, 1988). Este ensayo detecta daños en el ADN a nivel de célula única, midiendo la cantidad de ADN que migra fuera del núcleo bajo un campo eléctrico. La longitud y la intensidad de la "cola" del cometa indican el grado de daño.

Luego de la exposición al MZ durante 24 horas con las distintas concentraciones mencionadas anteriormente, se descartó el medio de cultivo y se lavó con PBS para después levantar las células con el agregado de 0,05% tripsina-EDTA. Se resuspendieron con 1 ml de medio de cultivo con SFB y se cosecharon por centrifugación a 140 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular con 1 ml de PBS.

Por otra parte, se colocaron 300 μ L de ágar de punto de fusión normal 1% (APFN) sobre cubreobjetos previamente "ensuciados" con el mismo agar e inmediatamente se colocó un cubreobjeto encima y se lo dejó solidificar en la heladera. Pasados 10 minutos, se retiró el cubreobjetos deslizando suave y horizontalmente. Las muestras fueron diluidas de forma tal de tener en 10 μ L de solución 10000 células totales y luego se agregaron a 200 μ L de agar de bajo punto de fusión 0,75 % (ABPF) en tubo eppendorf. Esta preparación se extendió sobre los portaobjetos que contenían APFN y se colocó un cubreobjeto sobre los mismos. Se dejó solidificar 10 minutos en la heladera a 4°C y se retiró el cubreobjetos de la misma manera que antes.

Los portaobjetos se mantuvieron en la heladera sumergidos en una cubeta coplin con solución de lisis fría (Tris-HCl 10 mM, pH 10, conteniendo NaCl 2,5 M, EDTA-Na2 100 mM y Tritón 1%) protegida de la luz (mínimo 1 hora - máximo 1 semana), la cual elimina las membranas celulares y nucleares dejando el ADN firmemente enrollado en lo que se conoce como nucleoide. Luego se colocaron los portaobjetos en una cámara de electroforesis horizontal a 4°C, cubiertos con buffer de electroforesis (solución de 30% NaOH 10N (A) y 5% de EDTA 200 mM (B)) por 20 minutos, para permitir el desenrollado alcalino de los nucleoides. Transcurrido ese tiempo se realizó la electroforesis por 20 minutos a 300 mA y 25 V, tiempo en el cual los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo dando la forma de "cometa". Finalizada la electroforesis, los portaobjetos fueron enjuagados tres veces con buffer de neutralización (Tris-HCl 0.4 M, pH 7,5) y una vez con agua destilada. Por último, se los dejó secar y se los tiñó con DAPI 0,2 μ g/mL. Se realizó un control positivo con H₂O₂ 5 mM con

exposición de 30 minutos. Este control permite asegurar que las corridas electroforéticas ocurrieron correctamente y que los resultados negativos (ausencia de daño) no sean por fallas técnicas.

Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Leica DMLB (1000x) y se registró el número de nucleoides con daño nivel 1-4 hasta contabilizar 150 por tratamiento. Se consideró daño nivel 0 (sin daño) aquellos sin migración de fragmentos (sin cola), nivel 1 (daño leve) aquellos con una cola de longitud menor al diámetro del nucleóide, nivel 2 (daño moderado) aquellos con una cola de longitud igual al diámetro del nucleóide, nivel 3 (daño alto) aquellos con cola de longitud mayor al diámetro de dos nucleoides y menor al de tres, y nivel 4 (daño extremadamente alto) aquellos con cola de longitud mayor al diámetro de tres nucleoides. Con los datos obtenidos se calculó el Índice de Daño (ID), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4}{N} \quad (3)$$

donde n_i es el número de núcleos con daño nivel i y N el número total de nucleoides contabilizados.

5. Biomarcadores de estrés oxidativo

Para evaluar si el principio activo del Mancozeb induce estrés oxidativo en las células, se investigó la actividad enzimática de diversas enzimas antioxidantes y detoxificantes presentes en células humanas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST). Adicionalmente se analizó la concentración de glutatión (GSH), un compuesto antioxidante no enzimático. Un aumento en la actividad de estas enzimas o en los niveles de GSH sugeriría una respuesta celular al estrés oxidativo.

Para todos los casos se intoxicaron las células con las concentraciones previamente declaradas (Figura 2). Luego de 24 hs se descartó el medio, se realizaron dos lavados con PBS y para cosechar las células se agregó 0,05% tripsina-EDTA, incubó a 37°C y luego se inactivó con medio de cultivo con SFB. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 140 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 1 mL de PBS con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM). Las células resuspendidas se conservaron a -20°C durante al menos 24 horas.

Para las mediciones, las muestras se descongelaron y mediante sonicación se realizó el lisado celular, haciendo 3 pulsos de 5 segundos cada uno, con intervalos en hielo, utilizando un sonicador de punta a 40 V. Posteriormente, se centrifugaron a 11.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se utilizó para los ensayos de actividad enzimática y de compuestos antioxidantes no enzimáticos. Los ensayos se realizaron 3 veces, con 6 réplicas por tratamiento en cada caso.

5.1. Determinación de proteínas totales

Para cada ensayo enzimático o de determinación del contenido de compuestos antioxidantes los valores obtenidos se relativizaron a la cantidad total de proteínas en cada réplica, permitiendo así la comparación entre tratamientos. Esto además garantiza asegurar que cada réplica contiene una cantidad de células similar (sin diferencias estadísticamente

significativas entre ellas), lo que permite la comparación de las actividades enzimáticas o del contenido de compuestos antioxidantes entre los diferentes tratamientos.

La determinación de proteínas totales en los sobrenadantes de los lisados celulares se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como estándar una solución de seroalbúmina bovina a una concentración de 0,1 mg/ml. Esto se realizó para cada repetición del ensayo con dos réplicas técnicas para cada muestra, y se aseguró que no hayan diferencias significativas en la cantidad de proteínas totales entre los tratamientos.

5.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La presencia de esta especie reactiva de oxígeno es un indicador de estrés oxidativo, por lo que la SOD protege a la célula de sus efectos dañinos. Por este motivo, se decidió estudiar la actividad de SOD utilizando un método en microplaca adaptado en nuestro laboratorio a partir de una técnica previamente desarrollada (Beauchamp & Fridovich, 1971).

El ensayo se basa en la medición indirecta de la actividad de SOD al medir la desaparición de su sustrato, el $O_2^{\cdot-}$. Para generar estos radicales se aprovecha la fotoreducción de un pigmento llamado riboflavina al exponerlo a la luz. Luego, gracias al uso de un espectrofotómetro se determina su concentración por medio de una reacción entre el $O_2^{\cdot-}$ y el Nitro Blue Tetrazolium (NBT), la cual da como producto el azul de formazán, un compuesto coloreado. Entonces, la actividad de SOD inhibe la formación del azul de formazán, y por lo tanto la cantidad de color azul es una medida indirecta e inversa de la actividad enzimática. En la Figura 5 se encuentra una esquematización de la reacción involucrada.

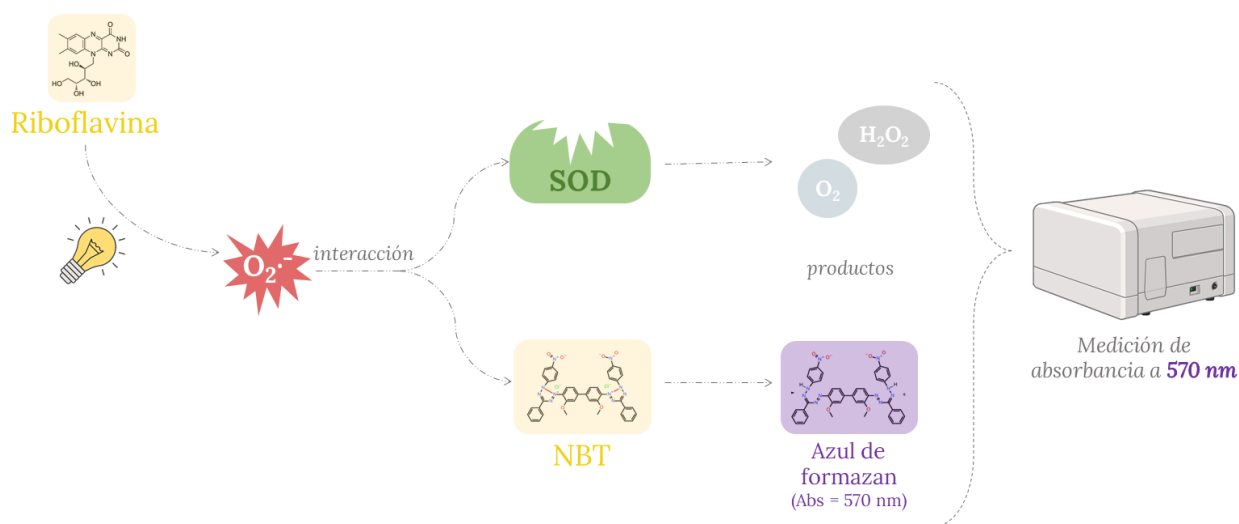


Figura 5 - Esquematización de la reacción involucrada en la determinación de la actividad de SOD en los sobrenadantes celulares tratados.

Para realizar la medición se colocó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos distintos volúmenes (0, 5, 10, 15, 20 μ l) de muestra enzimática (2 réplicas técnicas por muestra); 177 μ l de una mezcla conteniendo EDTA 0,1 mM, DL-metionina 13 mM y NBT 75 μ M; riboflavina a una concentración final de 2 μ M y la cantidad necesaria de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,8) para llevar a 0,3 ml de volumen final. Luego, las muestras se expusieron 1-2 minutos a 20

cm de dos tubos fluorescentes de 15W para generar los $O_2^{\cdot-}$. El blanco del ensayo corresponde a los pocillos sin muestra (0 μ l). Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placa (DR-200 Bs Microplate Reader).

Las unidades enzimáticas (UE) de SOD se definieron como la cantidad de enzima que es capaz de inhibir un 50% la velocidad de reducción fotoquímica del NBT. Los resultados se expresaron como UE/mg de proteínas, y se calcularon según la ecuación (4). El valor del porcentaje de inhibición se obtuvo a partir del porcentaje de formación de NBT, y con éste se construyeron curvas de formación de NBT en función de la cantidad de muestra para cada réplica, de las cuales se obtuvo una pendiente (p). El valor de los mg de proteína en las muestras se obtuvo mediante la determinación de proteínas totales nombrada anteriormente.

$$\frac{UE_{SOD}}{mg \text{ proteínas}} = \frac{50\% \text{ de inhibición de la formación de NBT} \times 1000}{p_{promedio} \times (mg \text{ proteína} / ml)} \quad (4)$$

5.3. Actividad catalasa (CAT)

La enzima catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno, y a la par interviene en la oxidación de donores de H (metanol, etanol y otros) con el consumo de 1 mol de peróxido. Ante el estrés generado por la presencia del xenobiótico hay un aumento consecuente de la concentración de peróxido intracelular, dado tanto por la actividad de SOD como por otras enzimas, el cual es utilizado como sustrato por CAT. Entonces, ésta es otra enzima comúnmente estudiada para analizar la respuesta al estrés. Considerando que el peróxido presenta un máximo de absorbancia entre 230 y 250 nm, se aprovechó esta propiedad para determinar la actividad de CAT midiendo la cinética de desaparición de H_2O_2 (Aebi, 1984). En la Figura 6 se puede observar una esquematización del ensayo realizado.

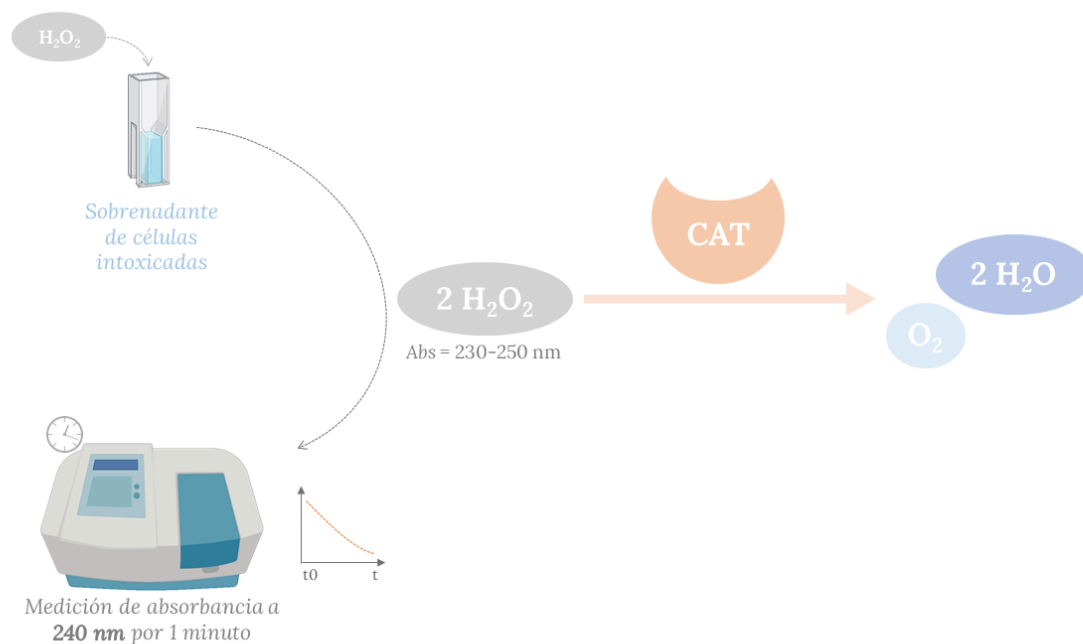


Figura 6 - Esquematización del ensayo para determinar la actividad de la enzima antioxidante CAT y la reacción involucrada.

Para el ensayo se utilizó el sobrenadante enzimático, 8 mM de H_2O_2 y buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7, c.n.p llegar a 800 μ l. Se usa una concentración baja de sustrato para evitar que se inhiba la actividad de la enzima en estudio y asegurar que la velocidad de la reacción sea proporcional a la actividad enzimática. Luego del agregado de 100 μ l de muestra se leyó la absorbancia a 240 nm (Shimadzu UV-1700) durante 60 segundos con intervalos de 5 segundos para medir la cinética de la reacción.

Se definió una UE de CAT como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 mmol de H_2O_2 por minuto. Los resultados se expresaron como UE/mg proteína, y se calcularon según la ecuación (5). El valor de los mg de proteína en las muestras se obtuvo mediante la determinación de proteínas totales nombrada anteriormente.

$$\frac{UE_{CAT}}{mg \text{ proteínas}} = \frac{K \times Vol_{final}}{\varepsilon \times Vol_{alícuota} \times (mg \text{ proteína} / ml)} \quad (5)$$

donde ε es el coeficiente de extinción molar del peróxido en las condiciones de trabajo (40 $mm^{-1}cm^{-1}$) y K es la constante de velocidad de la reacción enzimática y se calcula como:

$$K = \frac{1}{t - t_0} \times \ln\left(\frac{Abs_{t_0}}{Abs_t}\right) \quad (6)$$

siendo $t_0 = 0$ minutos y $t = 1$ minuto, y las Abs_{tx} son las absorbancias obtenidas a estos tiempos.

5.4. Actividad glutatión S-transferasa (GST)

El sistema seleccionado por las células para metabolizar xenobióticos (sustancias químicas sin un rol biológico en un organismo) incluye, entre otros, la enzima glutatión S-transferasa (GST), que adiciona un GSH a estas sustancias, aumentando su solubilidad en agua y facilitando su excreción (Hayes et al, 2005).

La actividad de GST se midió mediante un método espectrofotométrico ya establecido (Habig et al, 1976). Esta técnica se basa en la conjugación del GSH con el reactivo 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), formando el compuesto coloreado GS-dinitrobenceno (GS-DNB), que presenta una absorbancia máxima a 340 nm. Entonces, en este caso se analizó la actividad enzimática por la cinética de formación de producto aprovechando esta reacción esquematizada en la Figura 7.

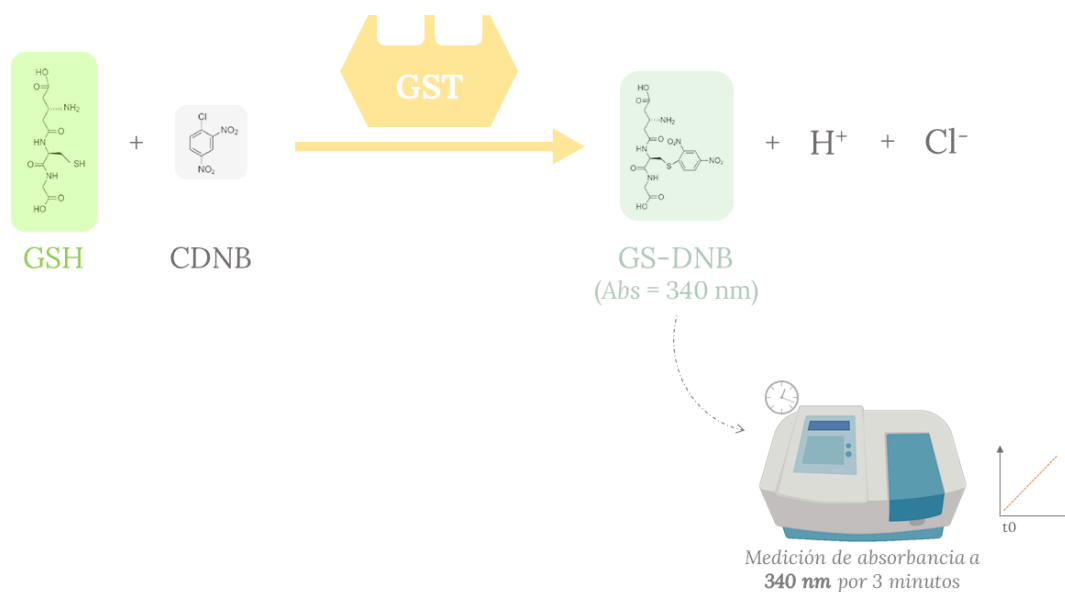


Figura 7 - Esquematzación de la reacción involucrada para determinar la actividad de la enzima detoxificante GST.

Para esta medición se añadieron en una cubeta de cuarzo 684 μ l de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 6,5, 8 μ l de glutatión reducido 100 mM (GSH) y 100 μ l de la muestra. La reacción se inició con el agregado de 8 μ l de CDNB 100 mM, preparado en etanol absoluto, y se registraron los valores de absorbancia a 340 nm durante 180 segundos, con intervalos de 15 segundos con la utilización de un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700).

Las UE de GST se definieron como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 μ mol de GS-DNB por minuto a 25 °C. Los resultados se expresaron en UE/mg de proteína, calculados según la ecuación (7). El valor de los mg de proteína en las muestras se obtuvo mediante la determinación de proteínas totales nombrada anteriormente.

$$\frac{UE_{GST}}{mg \text{ proteínas}} = \frac{B \times Vol_{final}}{\epsilon \times Vol_{alícuota} \times (mg \text{ proteína} / ml)} \quad (7)$$

donde B es el valor de la pendiente obtenida en la curva de Abs 340 nm en función del tiempo. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del GS-DNB es 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

5.5. Determinación del contenido total de glutatión (GSH)

El glutatión es un tripéptido pequeño y es el principal antioxidante de las células. En las células, el glutatión se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado (GSSG), siendo el primero el que posee las propiedades antioxidantes al ser donador de electrones. Para la medición del contenido de tioles (grupos -SH) totales se procedió con una adaptación a microplaca de nuestro laboratorio de una técnica ya establecida (Anderson, 1985). Se basa en la oxidación del GSH y la reducción del ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), dando como producto GSSG y TNB, siendo el segundo un compuesto coloreado con un pico de absorbancia a 412 nm (Figura 8).

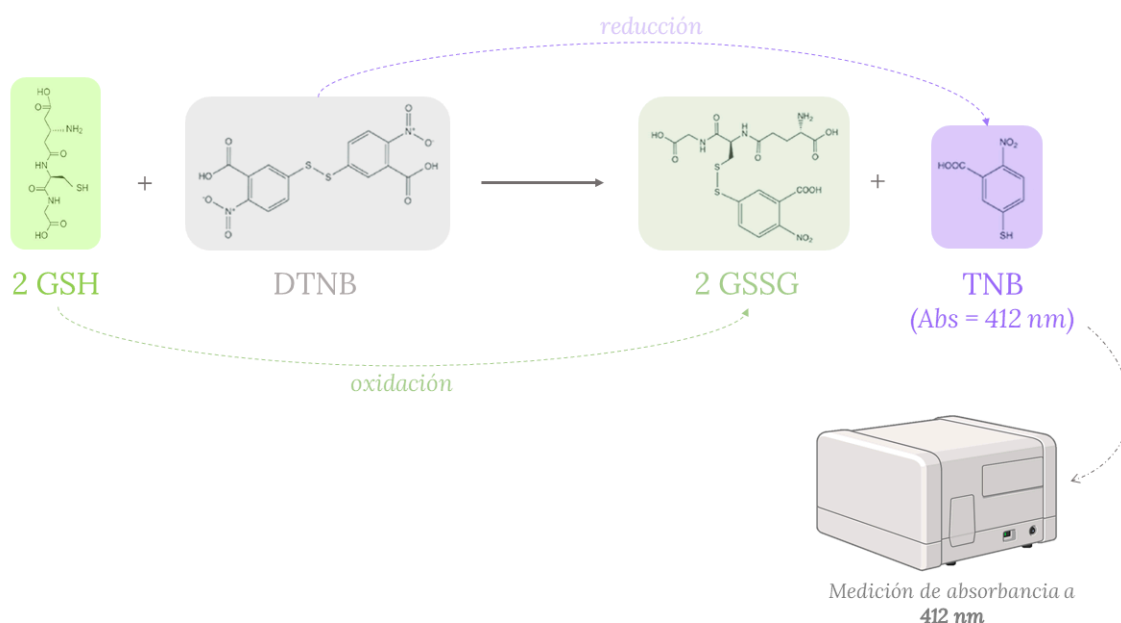


Figura 8 - Esquematación de la reacción involucrada para determinar el contenido total de GSH en sobrenadantes celulares desproteinizados.

Previamente, las muestras se desproteinizaron con ácido sulfosalicílico al 10% en una relación 2:1. Este medio ácido permite que la cantidad de glutatión total (GSH + GSSG) no se vea afectada por oxidación enzimática al inactivar la γ -glutamyl transpeptidasa. Además, se elimina el problema de la presencia de otros grupos SH que pueden tener las proteínas de la muestra, como la cisteína, y permite enfocar la medición sólo al glutatión de la muestra. Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Se tomaron 50 μ l del sobrenadante y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con 116 μ l de buffer fosfato de sodio 0,143 M pH 7,5, que contenía EDTA 6,3 mM y 84 μ l de DTNB 6 mM.

Simultáneamente, se realizó una curva de calibración con 0, 5, 10, 15, 20 y 25 μ l de GSH 0,2 μ M preparado en ácido sulfosalicílico, 84 μ l de DTNB 6 mM, y se completó a 250 μ l con buffer fosfato de sodio.

Se midió la absorbancia de las muestras y la curva a 405 nm en un lector de placa (DR-200 Bs Microplate Reader). Junto con la pendiente de la curva de calibración (p) y el volumen de la alícuota usada se definió el contenido de nmoles de GSH/mg de proteína con la siguiente ecuación.

$$nmoles_{GSH} = \frac{Abs_{405\text{ nm}}}{p \times Vol_{alícuota} \times (mg\text{ proteína} / ml)} \quad (8)$$

El valor de los mg de proteína en las muestras se obtuvo mediante la determinación de proteínas totales nombrada anteriormente.

6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con la versión 4.4.0. de R studio.

Para poder realizar la curva de dosis-respuesta del ensayo MTT con la que luego se definió la CL50 se analizaron los datos utilizando un código previamente publicado (Ritz et al, 2015) y ajustando los datos a un modelo logarítmico de 4 parámetros.

Tanto para determinar los parámetros NOAEL y LOAEL de citotoxicidad, como para evaluar efectos genotóxicos y oxidativos se realizaron las comparaciones estadísticas de los valores de los biomarcadores obtenidos a partir de los experimentos, entre las muestras tratadas con MZ y no tratadas (controles negativos, 0 $\mu\text{g/ml}$ MZ). En los casos en los que los datos cumplieron el criterio de normalidad y homocedasticidad se implementó el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple de Tukey. En los casos en los que no se cumplieron dichos supuestos, se utilizó como método no paramétrico la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunnet.

Resultados

1. Citotoxicidad

Se realizaron 4 repeticiones por duplicado, siendo 24 repeticiones por concentración, del ensayo de MTT detallado en el apartado anterior con las concentraciones 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ del principio activo de MZ para determinar la CL50 y posteriormente definir las concentraciones sub-citotóxicas para los ensayos de genotoxicidad, daño al ADN y análisis de biomarcadores de estrés. A continuación, se procedió a realizar la curva concentración-respuesta con los valores de absorbancia en función del logaritmo de la concentración de MZ, como se puede observar en la Figura 9.

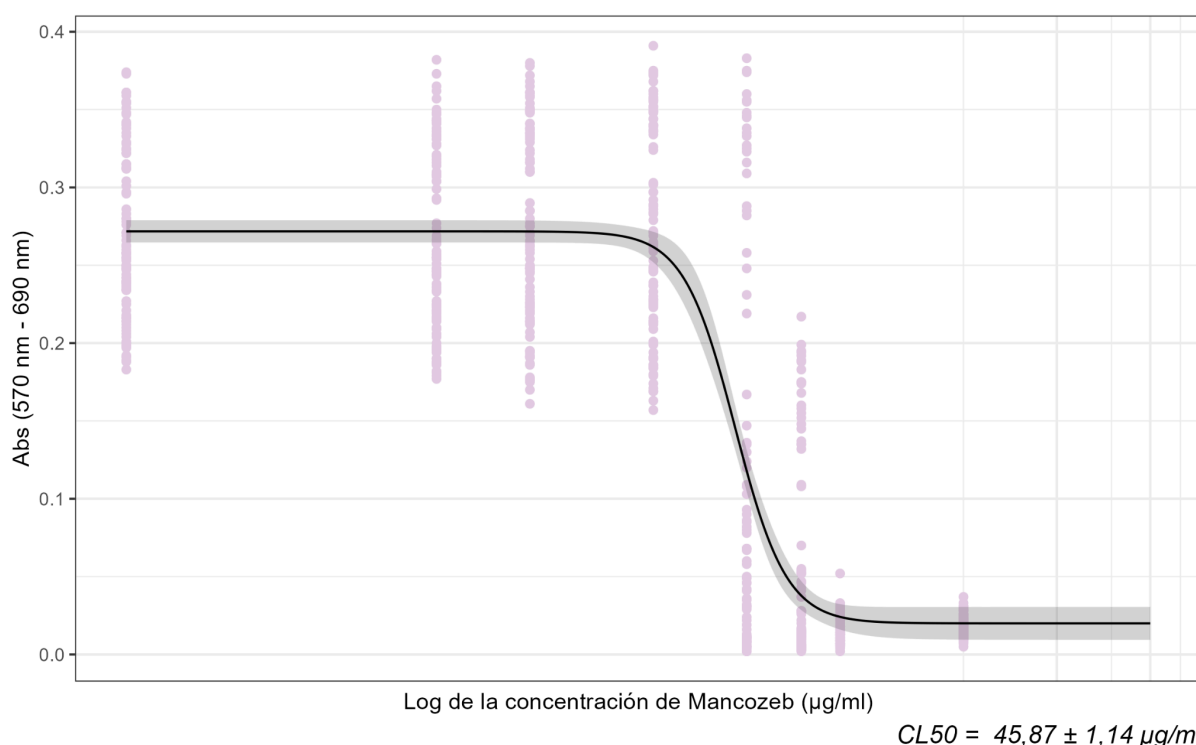


Figura 9 - Curva concentración-respuesta de MZ (principio activo) con ensayo MTT en células A549.

Absorbancia asociada a la formación de formazán (supervivencia) en función del logaritmo de las concentraciones utilizadas de MZ (5, 10, 25, 50, 75, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$). Cada punto es un dato ($n = 4$ repeticiones, 24 replicas x tratamiento), y la recta representa la línea de tendencia (negro) junto a su intervalo de confianza (gris). En la zona inferior derecha se encuentra la CL50 estimada junto a su desvío estándar.

En base a esta curva se logró definir la CL50 del principio activo de MZ: $CL50 = 45,87 \pm 1,14 \mu g/ml$. Además, con estos mismos datos se definieron las concentraciones NOAEL y LOAEL analizando las diferencias en la actividad mitocondrial, y consecuentemente supervivencia, de los tratamientos en relación al control (0 $\mu g/ml$). Los resultados se representaron con un *violin plot* en la Figura 10.

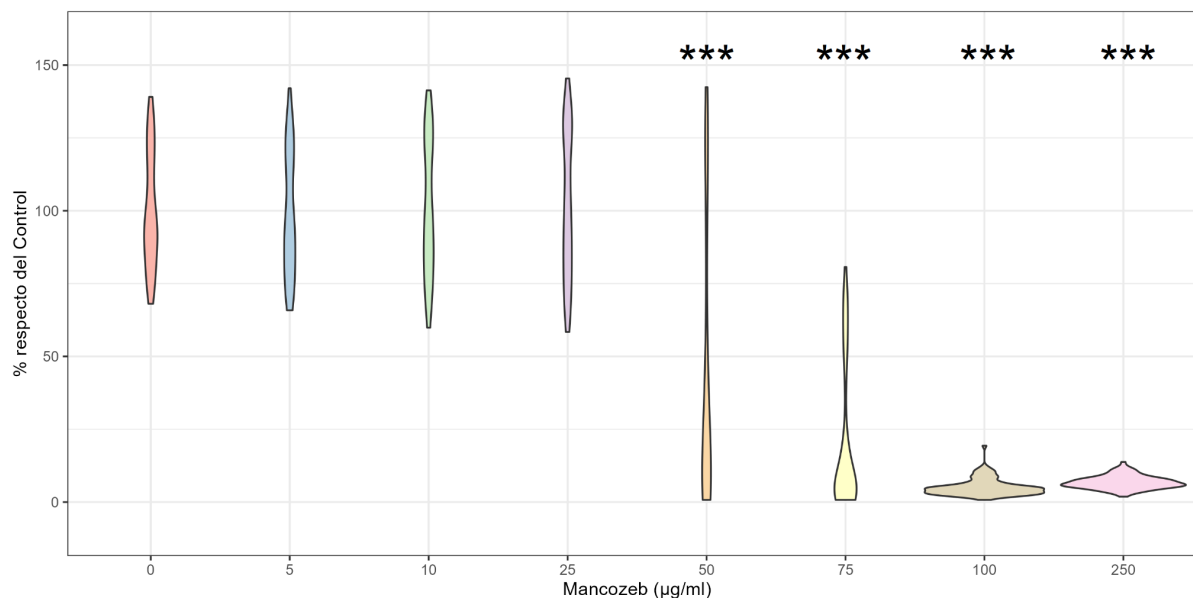


Figura 10 - Supervivencia de las células A549 a distintas concentraciones de MZ (principio activo) con ensayo MTT. Diagrama de violín del porcentaje de actividad mitocondrial en relación al control (0 $\mu g/ml$) de distintas concentraciones de MZ (n = 4 repeticiones, 24 replicas x tratamiento). La forma de los violines representa la densidad de los datos, siendo el ancho la frecuencia de los datos y el largo su distribución. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$ y * = $p < 0,1$.

Con las comparaciones múltiples anteriores se pudieron determinar las NOAEL y LOAEL como 25 y 50 $\mu g/ml$, respectivamente.

2. Genotoxicidad

Una vez obtenida la CL50 y la concentración máxima en la que no hay efectos adversos (citotóxicos), se decidió trabajar con concentraciones menores a la NOAEL para observar si concentraciones sub-citotóxicas de MZ tienen efectos nocivos (genotóxicos y citostáticos) en las células.

Luego, se realizaron los ensayos de micronúcleos con las concentraciones de MZ de 2,5; 5; 7,5; 10; 15, y 20 $\mu g/ml$, teniendo 4 réplicas cada uno. Con todos estos datos, se procedió a analizar si había diferencia en el índice de división nuclear (definido por la ecuación 1) para ver si el tratamiento afectó la dinámica de duplicación de población de las A549. Los resultados se encuentran representados en un diagrama de cajas y bigotes en la Figura 11.

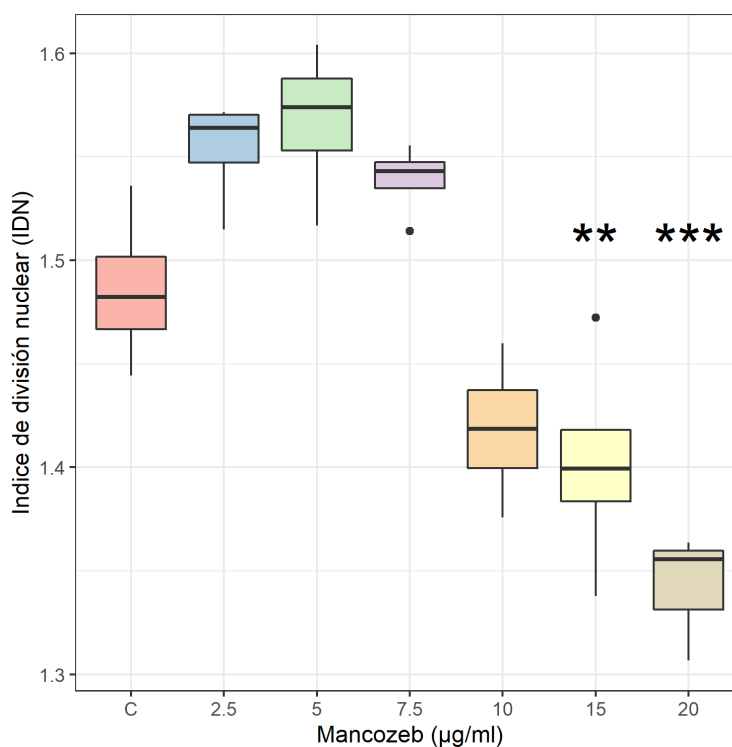


Figura 11 - Índice de división nuclear de las células A549 expuestas a MZ (principio activo). Diagrama de caja mostrando el IDN a distintas concentraciones de MZ ($n = 4$ réplicas x tratamiento). Las cajas indican la mediana, los cuartiles y el intervalo de confianza (95%). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$ y * = $p < 0,1$.

Se obtuvieron diferencias significativas en el IDN de las concentraciones de 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0488$; $p = 0,0007$, respectivamente), indicando que el MZ a estas concentraciones producen citostaticidad en las células A549 afectando su proliferación. Entonces, se procedió a analizar la presencia de micronúcleos sólo en aquellas concentraciones que no presentan diferencias significativas en el IDN (Figura 12).

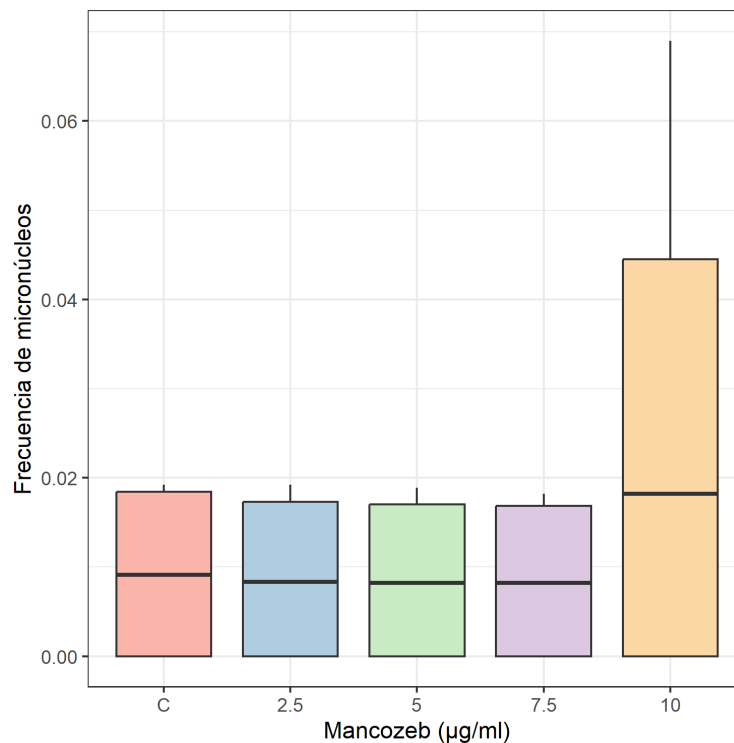


Figura 12 - Frecuencia de MNi en células A549 binucleadas expuestas a MZ. Diagrama de caja mostrando la frecuencia de MNi en células a distintas concentraciones de MZ ($n = 4$ réplicas x tratamiento). Las cajas indican la mediana, los cuartiles y el intervalo de confianza (95%). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$ y * = $p < 0,1$.

La distribución de los valores de MNi para cada tratamiento muestra que la exposición a la máxima concentración de MZ (10 µg/ml, $p = 0,4843$) induce valores de MNi superiores a los resto de los tratamientos, sin diferencias estadísticamente significativas con el control negativo.

3. Daño al ADN

Se analizó el daño al ADN con el ensayo de cometas, calculando el índice de daño (ID) generado por las concentraciones 10, 15 y 20 µg/ml de MZ, establecidas en base a los resultados del ensayo de MNi. Para determinar los niveles de daño observados se siguió el criterio mostrado en la Figura 13. Los resultados para las células A549 expuestas a MZ se muestran en la Figura 14.

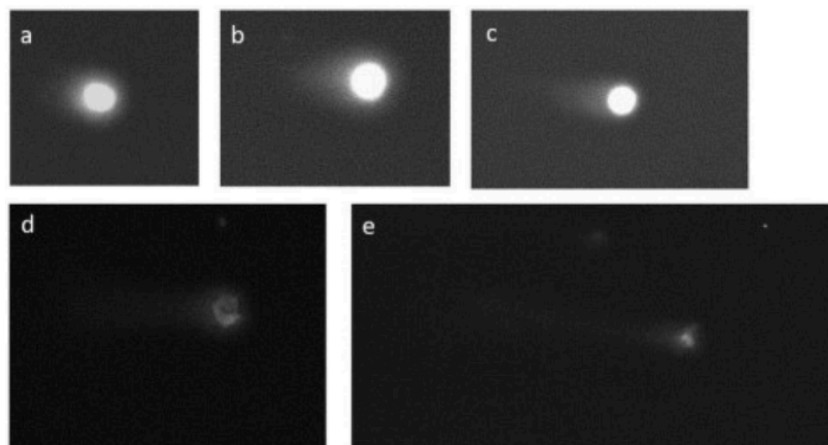


Figura 13 - Ensayo CBMN en células HEp-2. Niveles de daño al ADN (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3, (e) 4. El ADN nuclear fue teñido con DAPI y visualizado por microscopía de fluorescencia.

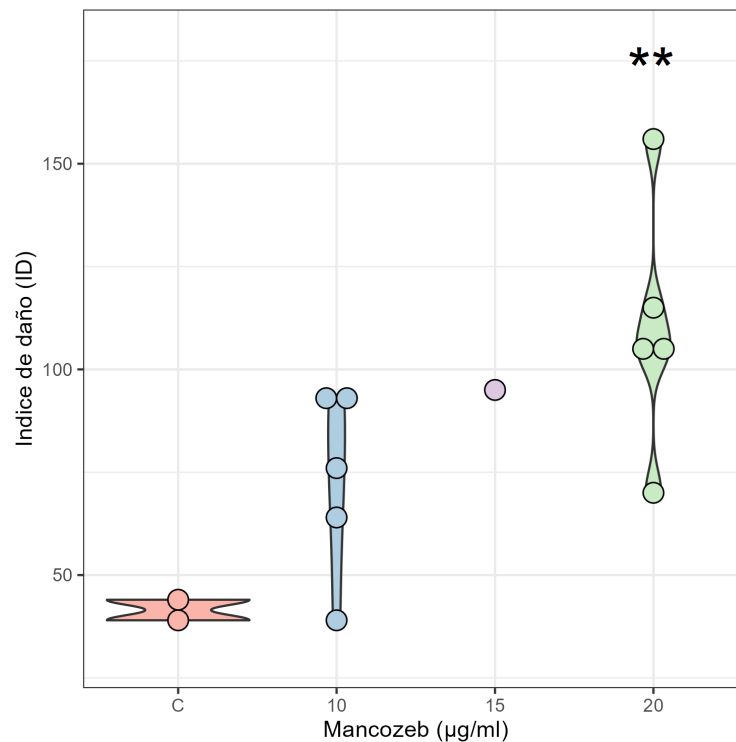


Figura 14 - Índice de daño en células A549 expuestas a MZ. Diagrama de violines mostrando el índice de daño del ADN a distintas concentraciones de MZ. La forma de los violines representa la densidad de los datos, siendo el ancho la frecuencia de los datos y el largo su distribución. Cada punto representa una réplica de la concentración estudiada. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$ y * = $p < 0,1$.

En la figura anterior se observan valores del daño al ADN inducidos por la última concentración ensayada (20 µg/ml; $p = 0,0431$) que son significativamente mayores estadísticamente que los obtenidos al exponer las células al control negativo, indicando que el fungicida produce daño a la molécula de ADN en estas condiciones de ensayo.

4. Biomarcadores de estrés

Para poder analizar los biomarcadores de estrés estudiados (enzimas + GSH) fue necesario asegurar que los contenidos de proteínas totales determinado con el ensayo de Bradford no varíen entre tratamientos. Esto se realizó de manera independiente, para cada una de las repeticiones en las que se hicieron todas las determinaciones. Los ensayos tanto para proteínas totales como para determinar los biomarcadores de estrés oxidativo se repitieron 3 veces, cada una con 6 determinaciones por tratamiento. Se pueden ver los resultados de una de las repeticiones de Bradford en la Figura 15, a modo de ejemplo.

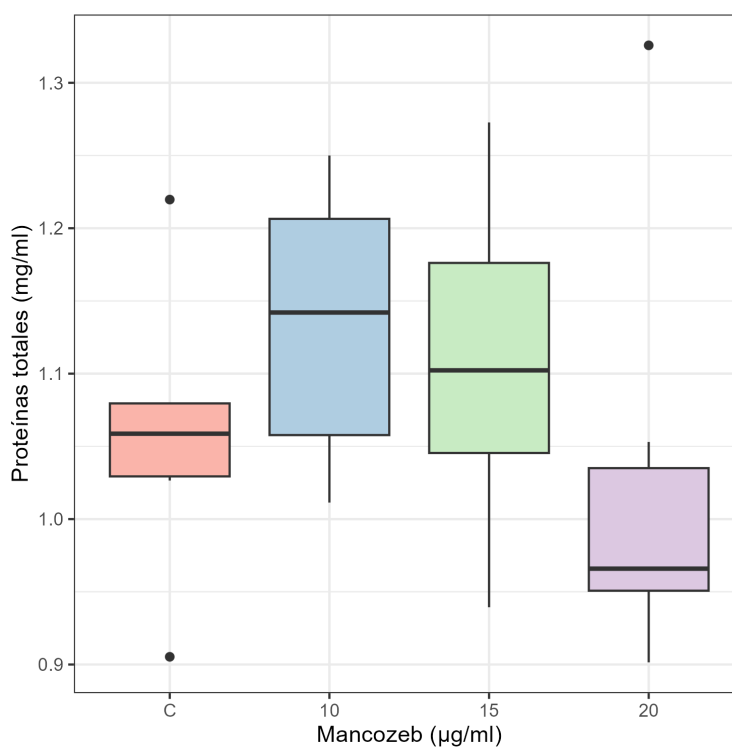


Figura 15 - Proteínas totales en células A549 expuestas a MZ. Diagrama de caja mostrando la cantidad de proteínas totales a distintas concentraciones de MZ ($n = 3$, 6 réplicas x tratamiento). Las cajas indican la mediana, los cuartiles y el intervalo de confianza (95%). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = $p < 0,01$; ** = $p < 0,05$ y * = $p < 0,1$.

Como en las 3 repeticiones no hubo diferencias significativas en relación al control negativo, se prosiguió a realizar un *pool* de todos resultados para generar un gráfico y una conclusión más robustas. Para poder hacer esto, los resultados se relativizaron a sus propios controles y se representan como % del control. Los resultados obtenidos se pueden observar en las Figuras 16 y 17.

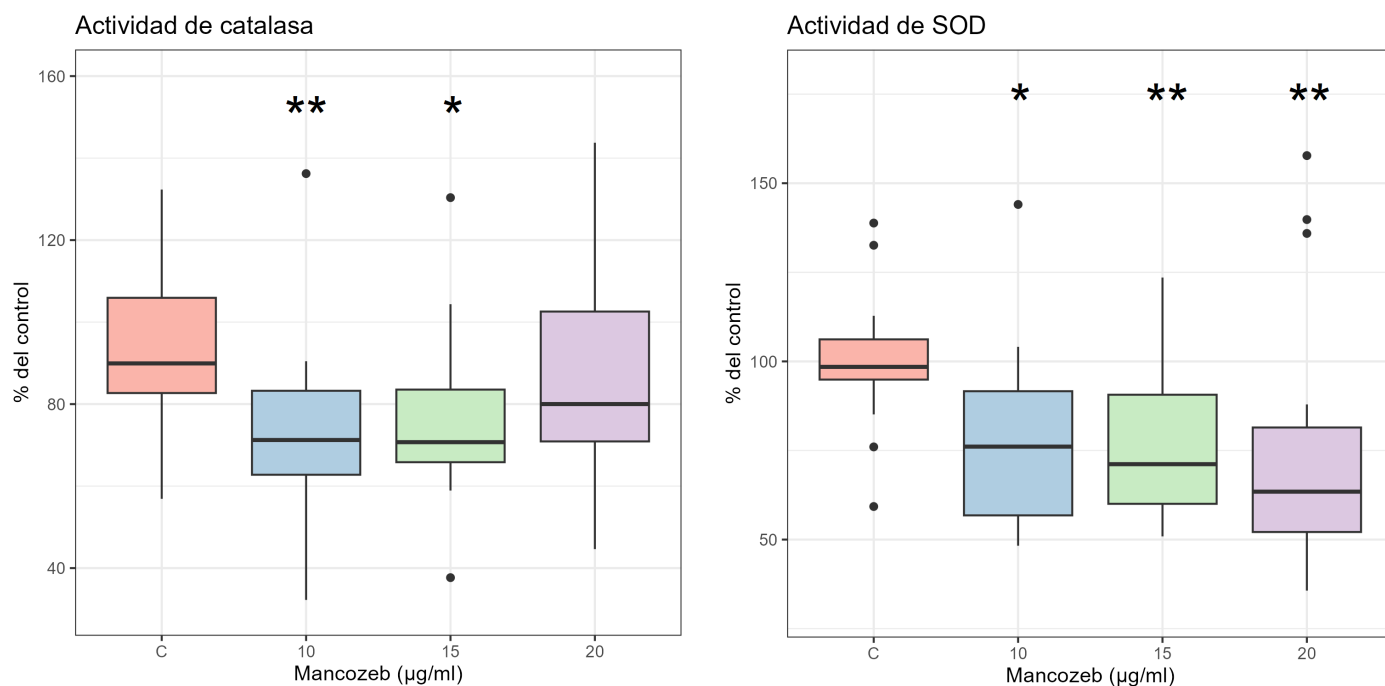


Figura 16 - Actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en células A549 expuestas a MZ.

Diagrama de caja mostrando la actividad de las enzimas como % del control (0 µg/ml) a distintas concentraciones de MZ (n = 3, 6 réplicas x tratamiento). Las cajas indican la mediana, los cuartiles y el intervalo de confianza (95%). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = p < 0,01; ** = p < 0,05 y * = p < 0,1.

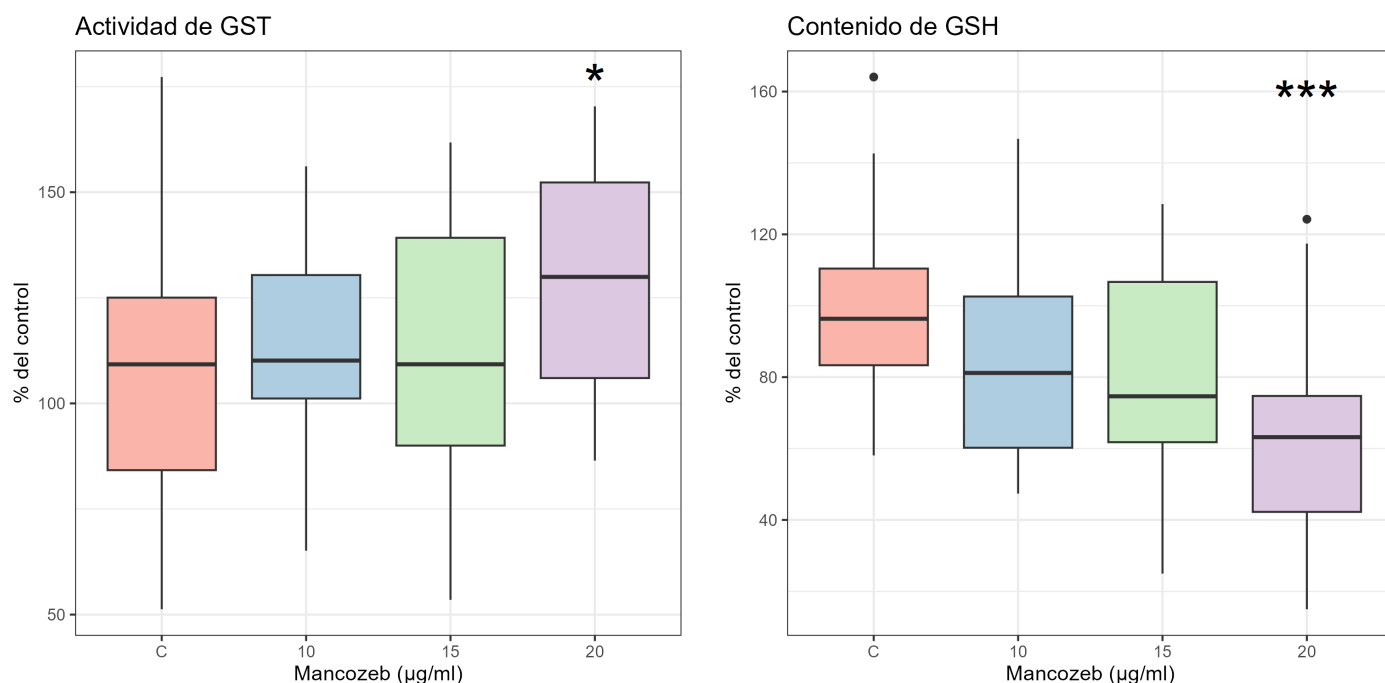


Figura 17 - Actividad de la enzima detoxificante GST y contenido de GSH en células A549 expuestas a MZ. Diagrama de caja mostrando la actividad de la enzima y el contenido de GSH como % del control (0 µg/ml) a distintas concentraciones de MZ (n = 3, 6 réplicas x tratamiento). Las cajas indican la mediana, los cuartiles y el intervalo de confianza (95%). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al tratamiento control, siendo *** = p < 0,01; ** = p < 0,05 y * = p < 0,1.

La actividad de CAT fue significativamente menor en las células expuestas a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0407$) y 15 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,0758$) en relación al control, mientras que la de SOD disminuyó en todas las concentraciones estudiadas del principio activo de MZ ($p = 0,0515$; $p = 0,0454$; $p = 0,0250$; 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). En el caso de GST la actividad fue significativamente mayor en las muestras expuestas a la concentración más alta ($p = 0,0834$; 20 $\mu\text{g/ml}$) acompañado de valores significativamente menores del contenido de GSH ($p = 0,0005$; 20 $\mu\text{g/ml}$) en las células expuestas a la misma concentración, lo cual es razonable al ser este compuesto sustrato de GST.

Discusión y conclusiones

En el marco del primer objetivo, se obtuvo la curva de concentración-respuesta mediante el ensayo colorimétrico de MTT, observándose un efecto citotóxico del compuesto sobre la línea celular A549. Estos efectos fueron directamente proporcionales a la concentración del fungicida. A partir de esta curva, se estableció el rango de concentraciones para abordar el segundo objetivo. Dado que se buscaba analizar los efectos del mancozeb (MZ) a concentraciones subletales y sin provocar efectos morfológicos evidentes en las células, se decidió trabajar con concentraciones entre 0 y 20 $\mu\text{g/ml}$, todas menores a la NOAEL.

Al analizar los biomarcadores de genotoxicidad y daño al ADN se observó que las concentraciones de 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ generaban efectos citotóxicos sobre las A549 afectando su proliferación, y a 20 $\mu\text{g/ml}$ se observó un mayor daño al ADN en relación al control. Sin embargo, dado que no se detectó un aumento significativo en la formación de MNi a concentraciones inferiores, y que protocolarmente no se comparan los MNi en concentraciones con ADN afectados, no es posible asegurar que el MZ tiene un efecto genotóxico sobre esta línea celular. El daño al ADN observado a la concentración más alta podría deberse a diversos factores, y como no se analizó el mecanismo específico del daño, no se puede determinar si se trata de un daño genotóxico (con potencial mutagénico) o es un resultado vinculado al efecto citotóxico.

Sería útil realizar un ensayo de daño y reparación de ADN, evaluando el índice de daño en diferentes tiempos tras la remoción del MZ, para verificar si el daño disminuye a través del tiempo. Otros ensayos posibles para dilucidar el mecanismo de citotoxicidad es utilizando un menor tiempo de exposición. Además, sería recomendable en estudios futuros aumentar el número de réplicas para los ensayos de MNi y cometas, además de incluir concentraciones intermedias entre 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ para determinar la concentración mínima en la que ocurre el daño al ADN, la citotoxicidad, y si entre ellas se observa un aumento en la frecuencia de micronúcleos. Hay que tener en cuenta que si bien se obtuvieron resultados relevantes, se requieren una mayor cantidad de réplicas y repeticiones para cada ensayo para poder confirmar estas conclusiones.

En cuanto al estrés oxidativo, se observó inhibición de las actividades enzimáticas. En el caso de la enzima CAT en las concentraciones intermedias, y de la SOD en todas las concentraciones evaluadas. Por otra parte, el aumento de la actividad de la GST a la concentración más alta se vio acompañado de una disminución del contenido total de GSH. Esto sugiere que el principal mecanismo de detoxificación implica la conjugación de GSH con el MZ (mediada por la GST) para facilitar su eliminación. Si bien esta enzima es detoxificante,

es necesario tener en cuenta que también es considerada antioxidante de segunda línea. La menor actividad de las otras dos enzimas antioxidantes podría deberse a un daño general que resultaría en una menor cantidad de proteínas activas, o por inhibición por sus respectivos sustratos y/o productos (Hileman et al., 2001). Un ensayo que complementaría estos resultados es un análisis de proteínas oxidadas totales, el cual permite observar el daño a proteínas totales.

Aunque no se pudo confirmar que el daño al ADN y la toxicidad observados se deban al estrés oxidativo, tampoco se puede descartar dicha posibilidad. Está comprobado que la presencia de estrés oxidativo moderado puede alterar el ciclo celular induciendo la senescencia (Halliwell, 2006), hecho que podría explicar la citostaticidad dada a concentraciones mayores a 10 ug/ml. Para corroborar si los efectos nocivos del MZ están asociados a la producción de ERO sería conveniente evaluar su presencia en las concentraciones estudiadas. Además, hace tiempo que se ha reportado que concentraciones elevadas de sustrato pueden inhibir las mismas enzimas antioxidantes (Hodgson & Fridovich, 1975; Aebi, 1984), como también el producto de peroxidación lipídica dada por la presencia de ERO (Lee & Park, 1995). Un posible experimento futuro sería analizar la actividad de SOD y CAT a concentraciones de MZ más bajas que las utilizadas en este estudio, o con menor tiempo de exposición.

En conclusión, el fungicida MZ parece ejercer efectos citotóxicos sobre la línea celular A549 afectando su proliferación y causando daño al ADN; y la respuesta celular a la presencia de MZ podría darse por medio de una detoxificación mediante el sistema de GST-GSH. Sin embargo, se requieren estudios adicionales y repeticiones de los ensayos para determinar si el estrés oxidativo y el daño genotóxico juegan un papel en estos efectos.

Estos hallazgos subrayan la necesidad de evaluar con mayor profundidad los efectos de MZ, optimizar la evaluación de riesgos y fomentar prácticas agrícolas más seguras para el ser humano y el ambiente.

Referencias bibliográficas

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Anderson M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology*, 113, 548-555.
- Andrioli, N. B., & Chaufan, G. (2021). Dose-independent genotoxic response in A549 cell line exposed to fungicide Iprodione. *Archives of Toxicology*, 95, 1071-1079.
- Andrioli, N. B., Nieves, M., Poltronieri, M., Bonzon, C., & Chaufan, G. (2023). Genotoxic effects induced for sub-cytotoxic concentrations of tebuconazole fungicide in HEP-2 cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 373, 110385.
- Aparicio, V., & De Gerónimo, E. (2024). Pesticide pollution in Argentine drinking water: A call to ensure safe access. *Environmental Challenges*, 14, 100808.
- Arif, T., Amsalem, Z., & Shoshan-Barmatz, V. (2019). Metabolic Reprogramming Via Silencing of Mitochondrial VDAC1 Expression Encourages Differentiation of Cancer Cells. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 17, 24-37.
- Baligar, P. N., & Kaliwal, B. B. (2001). Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Industrial health*, 39(3), 235-243.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D., & Maltoni, C. (2002). Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 982, 123-136.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F. I., & Palozza, P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and applied pharmacology*, 211(2), 87-96.
- Cecconi, S., Paro, R., Rossi, G., & Macchiarelli, G. (2007). The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. *Current pharmaceutical design*, 13(29), 2989-3004.
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Chaufan, G., Coalova, I., & Molina, M. D. C. R. D. (2014). Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *International Journal of Toxicology*, 33(1), 29-38.
- Chaufan, G., Galvano, C., Nieves, M., Mudry, M. D., Rios de Molina, M. D. C., & Andrioli, N. B. (2019). Oxidative response and micronucleus centromere assay in HEP-2 cells exposed to fungicide iprodione. *Chemical Research in Toxicology*, 32(4), 745-752.
- Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C., & Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 345, 109531.
- Corrales, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213-225.

- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402–1419.
- Dearfield K. L. (1994). Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. *Mutation research*, 317(2), 111–132.
- Dhaneshwar, A., & Hardej, D. (2021). Disruption of mitochondrial complexes, cytotoxicity, and apoptosis results from Mancozeb exposure in transformed human colon cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 84, 103614.
- Ďuračková Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*, 59(4), 459–469.
- EPA (2005) Reregistration eligibility decision for Mancozeb. EPA 738-R-04-012.
- Farm Chemicals S.A. (s.f.). Etiqueta del fungicida Mancozeb. Recuperado de <https://www.fcagro.ar/mancozebfarmchemicals/>
- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, 455(1-2), 81–95.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285(1), 35–44.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243(2):359–366.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutation research*, 674(1-2), 3–22.
- Goldoni, A., Klauck, C. R., Da Silva, S. T., Da Silva, M. D., Ardenghi, P. G., & Da Silva, L. B. (2014). DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. *Folia biologica*, 60(4), 202–204.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1976). Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 175(2), 710–716.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88.
- Hileman, E. A., Achanta, G., & Huang, P. (2001). Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*, 5(6), 697–710.
- Hodgson, E. K., & Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14(24), 5294–5299.
- Hoffman, L., & Hardej, D. (2012). Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(2), 556–573.
- J.R. Roede & G.W. Miller (2014) Mancozeb, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition), Academic Press, Pages 144–146, ISBN 9780123864550
- Kumar, K., Sabarwal, A., & Singh, R. P. (2019). Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. *Mitochondrion*, 48, 1–10.
- Lee, M. H., & Park, J. W. (1995). Lipid peroxidation products mediate damage of superoxide dismutase. *Biochemistry and molecular biology international*, 35(5), 1093–1102.

- Lioi, M. B., Scarfi, M. R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., & Ursini, M. V. (1998). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutation research*, 403(1-2), 13-20.
- Liu, Y., Wang, Y. L., He, S. W., Chen, M. H., Zhang, Z., Fu, X. P., Fu, B. B., Liao, B. Q., Lin, Y. H., Qi, Z. Q., & Wang, H. L. (2017). Protective effects of resveratrol against mancozeb induced apoptosis damage in mouse oocytes. *Oncotarget*, 8(4), 6233-6245.
- Lushchak, V. I., & Storey, K. B. (2021). Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI Journal*, 20, 956.
- Mohammadi-Sardoo, M., Mandegary, A., Nabiuni, M., Nematollahi-Mahani, S. N., & Amirheidari, B. (2018). Mancozeb induces testicular dysfunction through oxidative stress and apoptosis: Protective role of N-acetylcysteine antioxidant. *Toxicology and industrial health*, 34(11)
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nordby, K. C., Andersen, A., Irgens, L. M., & Kristensen, P. (2005). Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 31(2), 89-96.
- Official Journal of the European Union (2020). Commission Implementing Regulation (EU) 2020/2087. L 423/50
- Ong, G., & Logue, S. E. (2023). Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(5), 981.
- Paz-Trejo, C., & Gómez-Arroyo, S. (2017). Genotoxic evaluation of common commercial pesticides in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology and industrial health*, 33(12), 938-945.
- Pirozzi, A. V., Stellavato, A., La Gatta, A., Lamberti, M., & Schiraldi, C. (2016). Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicology letters*, 249, 1-4.
- Pizzo, F., & Benfenati, E. (2016). In Silico Models for Repeated-Dose Toxicity (RDT): Prediction of the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) for Drugs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1425, 163-176.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PloS one*, 10(12), e0146021.
- Rossi, G., Palmerini, M. G., Macchiarelli, G., Buccione, R., & Cecconi, S. (2006). Mancozeb adversely affects meiotic spindle organization and fertilization in mouse oocytes. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 22(1), 51-55.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Taylor, M. W. (2014). A History of Cell Culture. *Viruses and Man: A History of Interactions*, 41-52.
- The Insight Partners. (2023). Mancozeb Market - Mancozeb Market Size, Growth & Forecast 2030, Fuente: <https://www.theinsightpartners.com/reports/mancozeb-market>
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112.

UN (United Nations) (2021) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)—Ninth revised edition. New York and Geneva

Verzeñassi, D., Vallini, A., Fernández, F., Ferrazini, L., Lasagna, M., Sosa, A., Hough, G. (2023). Cancer incidence and death rates in Argentine rural towns surrounded by pesticide-treated agricultural land. *Clinical Epidemiology and Global Health*. Vol 20. 101239.

WHO (1988). *Environ Health Criteria 78* Geneva. World Health Organization. 17-02.

Yan, L., Yali, L., Chenghao, L., Caiqin, F., Zhongbo, Z., Weiyu, R., Yu, M., Xiaotian, Z., Biwen, W., Xiaojie, J., & Yongqi, L. (2020). Bellidifolin Inhibits Proliferation of A549 Cells by Regulating STAT3/COX-2 Expression and Protein Activity. *Journal of oncology*, 2020, 1723791.