



Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental



Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

XVI Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental

Patrocinan:

**Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha
Consejería de Sanidad
Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural
Ministerio de Sanidad y Consumo**

Colaboran

**Diputación Provincial de Toledo
Ayuntamiento de Talavera de la Reina**

Organiza:

***Grupo de Mutagénesis Ambiental
CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales
mutagenesisambiental@cma.csic.es***

**Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla-La Mancha
Talavera de la Reina, 18-21 de junio 2007**



COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente: Eduardo de la Peña de Torres. CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales (epena@ccma.csic.es).

Secretaria: Antonia Martínez López. CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales (amlopez@ccma.csic.es)

Tesorero: Oscar Herrero Felipe. CSIC. Centro de Ciencias Medioambientales.

Vocales: M^º José Hazen San Juan. Universidad Autónoma de Madrid
Paloma Fernández Freire. Universidad Autónoma de Madrid
José M. Pérez Martín. Universidad Autónoma de Madrid
Ana Peropadre López. Universidad Autónoma de Madrid;
Guadalupe Martínez Juárez. Instituto de Ciencias de la Salud
Mercedes Mayoral Arenas. Ayuntamiento de Talavera de la Reina
Carmen Herranz Amo. Diputación de Toledo

COMITÉ CIENTÍFICO

Dr. Ricardo Marcos Dauder. Universidad Autónoma de Barcelona
Dra. Carmen Pueyo de la Cuesta. Universidad de Córdoba
Dra. Luisa Maria Sierra Zapico. Universidad de Oviedo
Dr. Amadeu Creus Capdevila. Universidad Autónoma de Barcelona
Dra. M^º Isabel Arrieta Sáez. Universidad del País Vasco
Dr. Miguel Angel Comendador García. Universidad de Oviedo
Dra. Carmen Barrueco Fernández-Cuervo. Ministerio de Sanidad y Consumo
Dr. Joaquin Piñero Bustamente. Universidad de Sevilla
Dra. Susanna Suarez Figueras. Universidad de Santiago de Compostela
Dr. Juan Atenza Fernández. Instituto de Ciencias de la Salud. JCCLM.
Dra. María José Hazen San Juan. Universidad Autónoma de Madrid
Dra. Adela López de Cerain Salsamendi. Universidad de Navarra
Dra. Isabel Burguete Toral. Universidad de Murcia
Dr. Eduardo de la Peña de Torres. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

SEDE DE LA REUNIÓN

Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla-La Mancha

Carretera Nacional V. Km. 114

45600 Talavera de la Reina, Toledo

PROGRAMA



Lunes 18 de Junio de 2007

- 15.00 Entrega de la documentación
- 15.30 Inauguración Oficial de la Reunión
Da. Berta Hernández Fierro. Directora General de Salud Pública y Participación. Consejería de Sanidad. JCCM
D. Juan Atenza Fernández. Director del Instituto de Ciencias de la Salud. JCCM
D. Ricardo Marcos Dauder. Presidente de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental
- 15.50 Historia de la SEMA 1998-2007.
D. Eduardo de la Peña de Torres. Organizador de la XVI Reunión Científica de la SEMA
- 16.00 Conferencia inaugural: **Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro** CETESB - Brasil
Azo-dies and related compounds as important mutagenic aquatic contaminants
Moderador: Dr. Eduardo de la Peña
- 17.00 Pausa
- 17.30 1ª Sesión de comunicaciones:
Moderador: Dra. Luisa Mª Sierra
1. **Aguilar-Melero P,** Osuna-Jiménez I, Jurado J, Fuentes-Almagro CA, Prieto-Alamo MJ
 Silenciamiento del Gen Prdx1 de mamífero mediante RNAi: Respuesta a estrés oxidativo
 2. **Liviac D,** Creus A, Marcos R
 Estudios de genotoxicidad, cinética de reparación y daño oxidativo de dos halonitrometanos, subproductos de la desinfección del agua de consumo
 3. Silva A, Lourenço S, Coelho S, Sousa A, Lourenço J, Verschaeve L, Barroso C, **Mendo S.**
 Assessment of the genotoxicity of endocrine disruptor contaminants to the netted whelk *Nassarius reticulatus* (L.)
 4. **Kaplan C,** Pastor N, Domínguez I, Campanella C, Orta ML, Neukam KI, Mateos S.
 Lithium salts induce micronuclei in AA8 chinese hamster cells but no DNA or Chromosome damage
- 21.00 **Visita guiada a Talavera de la Reina organizado por su Ayuntamiento**

Martes 19 de Junio de 2007

- 9.30 2ª Sesión de comunicaciones:
Moderador: Dra. Antonia Velazquez
5. **Planelló R,** Martínez-Guitarte JL, Morcillo G.
 Cambios en la expresión génica inducidos por dosis agudas de cadmio en larvas de *chironomus riparius*
 6. **Pérez Martín JM,** Labrador V, Peropadre A, Fernández Freire P, Herrero O, de la Peña E, Hazen MJ.
 Efecto tóxico de la combinación binaria butilhidroxianisol y propilparabeno
 7. **Fernández Freire P,** Pérez Martín JM, Herrero O, Peropadre A, Hazen MJ
 Efecto antiproliferativo del ácido perfluorooctanoico
 8. **Neukam KI,** Pastor N, Orta ML, Campanella C, Kaplan C, Cortés F.
 Induction of endoreduplication by flavonols present in the human diet
- 11.00 Pausa
- 11.30 Conferencia invitada **Dra. Mª José Hazen San Juan.** Universidad Autónoma de Madrid
Evaluación del riesgo tóxico de contaminantes ambientales: otros enfoques
Moderador: Dr. Amadeu Creus
- 14.00 Almuerzo
- 16.00 **Visita a Toledo y recorrido guiado organizado por la Diputación Provincial de Toledo**

Miércoles 20 de Junio de 2007

9.30 3ª Sesión de comunicaciones

Moderador: Dr. Santiago Mateos

9. **Stoyanova E**, El-Yamani N, Coll E, Marcos R.

Evaluación del daño genético en pacientes con insuficiencia renal en diálisis, mediante el ensayo del cometa

10. **Paiva L**, Martínez V, Creus A, Marcos R.

Frecuencias de micronúcleos en trabajadores expuestos al arsénico

11. **Campanella C**, Kaplan C, Orta ML, Neukam K, Ardizzone N, Marino A, Montalbano A, Capello F, Cortés F.

The effects of oxidative stress on neoplastic cell survival

11.00 Pausa

11.30 4ª Sesión de comunicaciones

Moderador: Felipe Cortés

12. Badal M, Portela A, Cabré O, **Xamena N**.

Estudio de la expresión del elemento transponible FB-NOF DE *Drosophila melanogaster*

13. Uriol E, Comendador MA, **Sierra LM**.

Estimación de la genotoxicidad del tratamiento CMF en células somáticas de *D. melanogaster in vivo*

14. Hernando J, Comendador MA, **Sierra LM**.

Efectos de agentes inductores de enlaces cruzados en células germinales de *Drosophila in vivo*: mutación, recombinación y reparación

13.30 Almuerzo

15.30 5ª Sesión de comunicaciones:

Moderador. Miguel Angel Comendador

15. **Orta ML**, Neukam K, Campanella C, Kaplan C, Mateos S.

La sustitución del DNA con nucleósidos halogenados protege de las roturas de cadena y de los intercambios entre cromátidas hermanas inducidas por el inhibidor de topoisomerasa I camptotecina

16. Baida A, González-Flores E, Akdi M, Galofré P, Marcos R, **Velázquez A**.

Asociación de dos loci independientes en 1p12 con la susceptibilidad al cáncer de tiroides

17. Alvarez O, Fernández L, Pérez A, Sierra LM, López ML, **Comendador MA**, Ferreiro JA.

Variantes del GEN *BRCA1* Asociadas al Desarrollo del Cáncer Múltiple Incluido Mama

16.30 Pausa

17.00 Asamblea Anual de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental

Presidente: Dr. R. Marcos; Secretario Dr. A. Creus; Tesorero: Dr. E. de la Peña

20:30 **Cena de la Reunión SEMA 2007**

Jueves 21 de Junio de 2007

9.30 6ª Sesión de comunicaciones:

Moderador Noel Xamena

19. **Carmona ER**, Kossatz E, Creus A, Marcos R.

Evaluación genotóxica de los metales pesados mercurio y plomo con el ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*

20. **Chávez MJ**, Creus A, Marcos R.

Aplicación de técnicas de citogenética molecular para la detección de aneuploidía y clastogenicidad en células humanas expuestas al arsénico

21. **Soriano C**, Creus A, Marcos R.

Caracterización de mutaciones inducidas por arsénico mediante el ensayo de linfoma de ratón

11.0 Pausa

11.30 Ponencia de clausura: **Dras. Carmen Barrueco y Raquel Fernández**

Subdirección Gral. de Sanidad Ambiental y Salud Laboral .

Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad y Consumo

Reglamento REACH. Mutagenicidad: Requerimiento de ensayos y criterios de clasificación y etiquetado.

Moderador: Dr. Ricardo Marcos

13:00 Clausura de la Reunión

RESÚMENES DE PONENCIAS



AZO-DYES AND RELATED COMPOUNDS AS IMPORTANT MUTAGENIC AQUATIC CONTAMINANTS

Gisela de Aragão Umbuzeiro

Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB Av. Prof. Frederico Herman Jr, 345, 05459 900 São Paulo-SP Brasil giselav@cetesbnet.sp.gov.br

The Cristais river is used for drinking water purposes after treatment to feed 60,000 people living in Cajamar city, located in the metropolitan region of São Paulo in Brazil. In 1998, because of the introduction of the Salmonella microsome assay in the surface water quality monitoring program of São Paulo State this river was found to be mutagenic and the response was repeated during the subsequent samplings. The pollution sources were investigated using different strains of *Salmonella typhimurium* and selective extraction procedures of the water. A dye processing plant, located 6 km before the Drinking Water Treatment Plant (DWTP) was identified as the responsible for the mutagenic activity detected in the river water. The industrial effluent presented high mutagenic levels and the river water, sediment and sludge produced by the DWTP were also positive for the Salmonella.

In 2005, the compounds that were partially responsible for the mutagenic activity were identified. The compounds were the dye components of a Black Dye Commercial Product (BDCP), frequently used by the industry. Their structures were determined using NMR and HPLC/MS as: CI Disperse Blue 373, CI Disperse Violet 93 and CI Disperse Orange 37. Those dyes, which showed mutagenic activity in the Salmonella microsome assay were detected and quantified in the raw and treated industrial effluent, river and drinking water and sludge of the DWTP. Mutagenic and carcinogenic aromatic amines, including some prohibited by the European Union were preliminary detected in the effluent and water samples analyzed. The drinking water was analyzed and besides the mutagenic aromatic amines and the expected disinfection by-products, the three cited dyes and chlorinated/reduced dyes were detected.

In order to obtain more toxicological information about those effluent and river water samples other systems besides the Salmonella assay were applied. The treated effluent were positive for micronuclei in plants (*Allium* and *Tradescantia*) and were able to induce preneoplastic lesions in rats increasing the level of concern when humans and other organisms are exposed to waters under the influence of this effluent discharge.

The results show that dyes and other related compounds can be released into the environment through industrial effluent discharge and contaminate surface water, sediment and drinking water. More studies are necessary to evaluate the risks of the exposure of aquatic biota and humans to those complex mixtures containing mutagenic compounds.

EVALUACIÓN DEL RIESGO TÓXICO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES : OTROS ENFOQUES.

Hazen, M.J.

Grupo de Toxicología celular. Departamento de Biología (Lab. A-110). Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. C/ Darwin 2 , 28049-Madrid.

En los últimos diez años, numerosos contaminantes ambientales, que nunca han sido sometidos a estudios completos de riesgo, se han añadido al censo inicial a la vez que se evidencian nuevas formas de exposición. Entre ellos se encuentran compuestos industriales, plaguicidas, aditivos alimentarios, detergentes, cosméticos y productos farmacéuticos. Algunos de los compuestos referidos son sustancias de toxicidad baja, según los análisis tradicionales, que han pasado los tests de seguridad biológica sin ningún problema. Sin embargo, la presencia constante y persistente de tales sustancias implica la interacción entre ellas y como consecuencia, un riesgo a largo plazo para el medio ambiente y la salud que es de momento desconocido.

Una gran variedad de compuestos químicos alteran los procesos celulares básicos al interferir con el metabolismo, la producción de energía, la síntesis de macromoléculas y la integridad de diversas estructuras subcelulares. De esta manera, se pueden provocar intoxicaciones agudas, debidas a la exposición a altas dosis, así como alteraciones a largo plazo que causan mutagénesis, carcinogénesis y toxicidad para la reproducción. Para poder cubrir en lo posible todo este tipo de efectos es recomendable utilizar un conjunto de modelos experimentales e indicadores de efectos tóxicos que garanticen resultados rápidos, fiables y con un alto valor de predicción.

Se describe a modo de ejemplo una estrategia de ensayo para la evaluación del efecto tóxico de contaminantes ambientales que incluye biomarcadores bioquímicos, morfológicos y moleculares.

REGLAMENTO REACH. MUTAGENICIDAD: REQUERIMIENTO DE ENSAYOS Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO

Raquel Fernández Sánchez y Carmen Barrueco Fernández-Cuervo.
Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral. Ministerio de Sanidad y Consumo.

El 30 de diciembre de 2006 se publicó el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH). Este Reglamento, cuyo objetivo principal es garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente, constituye una nueva política en materia de sustancias y preparados químicos, y surge como consecuencia de la revisión del sistema actual.

El Reglamento REACH se basa en el principio de que corresponde a los fabricantes, importadores y usuarios intermedios garantizar que sólo fabrican, comercializan o usan sustancias que no afectan negativamente a la salud humana o al medio ambiente.

REACH establece un sistema de recogida de información en varias fases que permitirá obtener información y reducir los riesgos derivados del uso de las sustancias químicas que se producen/importan en la UE en cantidad superior a una tonelada/año. Para ello cuenta con los siguientes elementos clave:

- Registro, que exige a la industria que facilite información sobre sus sustancias con el objeto de conseguir una utilización segura de las mismas.
- Evaluación, que garantiza que la industria cumple sus obligaciones y evita que se realicen ensayos innecesarios.
- Autorización de sustancias con propiedades extremadamente preocupantes (CMRs, PBTs, disruptores endocrinos, etc.) para unos usos particulares.
- Restricción, como red de seguridad para la reducción de riesgos que no hayan sido abordados en las etapas anteriores.

Además, para garantizar la gestión eficaz de los aspectos técnicos, científicos y administrativos del Reglamento REACH, se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA).

La Agencia creará y gestionará una base de datos de acceso público que permitirá a los consumidores tomar decisiones sobre el uso de las sustancias y preparados químicos con conocimiento de causa.

Las sustancias mutagénicas se consideran altamente preocupantes y, como tales, son objeto de una cuidadosa atención por parte del REACH.

El expediente técnico que acompaña a la solicitud de registro para una sustancia deberá incluir información sobre las propiedades mutagénicas, la cual variará en función del tonelaje. Si la sustancia reúne los criterios para ser clasificada como mutagénica será incluida en la lista de sustancias sujetas a autorización y podrá estar sometida a restricciones para su fabricación, comercialización y uso.

La presentación se centrará en los ensayos de mutagenicidad requeridos en el REACH y los criterios de clasificación y etiquetado.

RESÚMENES DE COMUNICACIONES



SILENCIAMIENTO DEL GEN *Prdx1* DE MAMÍFERO MEDIANTE RNAi: RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO.

Aguilar-Melero P, Osuna-Jiménez I, Jurado J, Fuentes-Almagro CA, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo-Ochoa 2ª planta. Carretera Madrid-Cádiz km 396a, 14071-Córdoba. España.

Los organismos aerobios producen y degradan EROs que ejercen funciones fisiológicas vitales y que también causan efectos perjudiciales. Se habla de estrés oxidativo cuando las células se enfrentan a concentraciones anormalmente altas de EROs. Las peroxirredoxinas (Prdx) son tiorredoxina-peroxidasas que contribuyen al mantenimiento del estado tiol-redox intracelular. Su función principal es la detoxificación de H₂O₂, peroxinitritos e hidroperóxidos orgánicos. Además, están implicadas en otras funciones como la proliferación celular, transducción de la señal, embriogénesis y desarrollo. En mamíferos se han descrito 6 isoformas. Por su localización citosólica y su abundancia a Prdx1 se le supone un papel fundamental dentro de esta familia de peroxidasas.

Las células se defienden frente a situaciones de estrés mediante respuestas coordinadas que modulan los niveles de expresión de distintos grupos de genes. Desde su descubrimiento el silenciamiento génico mediante el uso de RNAi se ha convertido en una herramienta esencial en el análisis funcional de genes en numerosos sistemas biológicos.

El objetivo de este trabajo es la caracterización funcional del gen *Prdx1* de mamífero tanto en condiciones normales de crecimiento como en respuesta a estrés oxidativo. Para ello se inhibió su expresión mediante el uso de RNAi, inicialmente de forma transitoria (siRNA), para posteriormente obtener líneas celulares estables con niveles disminuidos de Prdx1 (shRNA), que permiten analizar parámetros y estudiar situaciones experimentales incompatibles con el silenciamiento transitorio.

La línea celular con la expresión de Prdx1 inhibida de forma estable presentó características propias tanto en morfología como en crecimiento. Así, el tiempo de generación de estas células fue casi 2 veces superior al de la línea con niveles normales de Prdx1. En estas células se están comparando los patrones de expresión génica, tanto a nivel basal como en respuesta a un tratamiento subletal con H₂O₂ (500 µM, hasta 8h de exposición), de un grupo de genes implicados en la respuesta antioxidante y de la mayor parte de los componentes del sistema Trx, con el fin de evidenciar posibles mecanismos compensatorios en su expresión. El efecto de la inhibición de Prdx1 sobre otros genes se está investigando con técnicas de análisis masivo (microseries de DNA). Se han llevado a cabo experimentos para evaluar la expresión diferencial entre células inhibidas y células normales en respuesta a CdCl₂ (30 µM, 2h).

Asimismo, hemos establecido las condiciones para la inhibición simultánea de la expresión de Prdx1, Prdx3 (principal Prdx mitocondrial) y Gclc (enzima que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de GSH), afectando así tanto al sistema Trx como a la vía GSH/Grx, lo que nos permitirá establecer posibles relaciones funcionales entre las 2 principales rutas para el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular.

Financiación: MEC (BFU2005-02896) y cofinanciación FEDER.

ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD, CINÉTICA DE REPARACIÓN Y DAÑO OXIDATIVO DE DOS HALONITROMETANOS, SUBPRODUCTOS DE LA DESINFECCIÓN DEL AGUA DE CONSUMO

Liviac D, Creus A, Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

A raíz del descubrimiento que al tratar químicamente el agua para consumo humano se producía una disminución en la incidencia de enfermedades causadas por el agua contaminada, en la actualidad el agua destinada al consumo humano es desinfectada. Esta desinfección asegura una reducción casi total de los agentes patógenos causantes de enfermedades y epidemias. Debido a este proceso de desinfección, se producen ciertos compuestos químicos, los llamados subproductos de la desinfección. En la actualidad se han descrito entre 600 y 700 subproductos de la desinfección del agua, muchos de los cuales no se han cuantificado ni se conocen sus posibles efectos adversos.

En base a los resultados obtenidos previamente con los compuestos bromonitrometano y tricloronitrometano en la línea celular linfoblastoide humana TK6 mediante el ensayo de micronúcleos y el ensayo del cometa, decidimos ampliar su evaluación utilizando dos variantes del ensayo del cometa para estudiar la cinética de reparación y el daño oxidativo. Además, para confirmar los resultados del ensayo de micronúcleos en células TK6, se evaluó el bromonitrometano con el mismo ensayo pero utilizando sangre completa.

Los dos halonitrometanos evaluados se diferencian por su estructura (bromado y clorado), y pertenecen a la lista de prioridad de investigación de subproductos de desinfección del agua de consumo elaborada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). Los resultados obtenidos en la cinética de reparación demuestran que las células son capaces de reparar el daño genético producido por ambos compuestos, hasta llegar a niveles de daño prácticamente basales. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de micronúcleos, tanto en células TK6 como en sangre completa, lo que indica que el daño primario producido es fácilmente reparable y no llega a fijarse. Asimismo se ha determinado la capacidad de ambos halonitrometanos para producir daño oxidativo.

ASSESSMENT OF THE GENOTOXICITY OF ENDOCRINE DISRUPTOR CONTAMINANTS TO THE NETTED WHELK *NASSARIUS RETICULATUS* (L.)

Silva, A¹, Lourenço S¹, Coelho S¹, Oliveira I, Sousa A¹, Lourenço J¹, Verschaeve L³, Barroso C.^{1,2}, Mendo, S.^{1,2}

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

² CESAM—Centro de Estudos do Ambiente e Mar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

³ Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

The netted whelk *Nassarius* (=Hinia) *reticulatus* (L.) is a common European prosobranch gastropod that is distributed from the Black Sea and the Mediterranean, north to Norway and into the western Baltic. Recent works have shown that TBT acts as a potent endocrine disruptor to this species, which has caused *N. reticulatus* populations to be extensively affected by imposex throughout Europe. Despite the number of studies, no information exists regarding the genotoxic effects of TBT and other endocrine disruptors to this whelk. Due to its attractive use in ecotoxicology, the comet assay was employed in the present study to assess the genotoxicity of some contaminants with androgenic (TBT) and estrogenic activity (nonylphenol and estrone) to *N. reticulatus*. Gill cells were selected for this study because they are in contact with large volumes of water, when compared to the rest of the animal, thus becoming a suitable target tissue for contaminant exposure. The comet assay proved to be a suitable technique to study DNA damage in gill cells caused by environmental contaminants. However, the high frequency of comet cells, in the order of 70%, was commonly observed in animals kept in the laboratory for more than one day after collection, even considering the good apparent condition of the animals. This high natural background level of DNA fragmentation may obscure the effect of the genotoxic agents to be tested. In fact, no significant effects were detected for chronic exposures to the above contaminants. One approach to solve this problem is to perform the toxicological tests starting immediately after collection of the animals, in case it is not intended to supplement the animal's diet with specific vitamins. In fact, significant effects could only be observed in acute exposures to TBT immediately after animal collection from their habitat. The usefulness and limitations of this technique are discussed in the present study.

LITHIUM SALTS INDUCE MICRONUCLEI IN AA8 CHINESE HAMSTER CELLS BUT NO DNA OR CHROMOSOME DAMAGE.

Kaplan C¹, Pastor N., Domínguez I., Campanella C², Orta M. L., Neukam K. I., Mateos S.

Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Tel.: +34 954557039; Fax: +34 954610261; www.grupo.us.es/gcucera

¹ Molecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, University of Hacettepe, 06800, Ankara / Turkey

² Human Anatomy Section, Department of Experimental Medicine, University of Palermo/Italy

Lithium salts have been used as a treatment of manic-depressive disorders since the 1950s. As to the possible negative effects of lithium on human health the picture it is as yet unclear. Studies on lithium and its salts have shown that at nontoxic doses lithium has not any apparent deleterious effects (mutagenic, teratogenic etc.) in bacteria, human and animal cells. Nevertheless, it has been also reported some side effects of lithium such as hyperparathyroidism, hypothyroidism, renal toxicity, and diabetes insipidus.

In order to try to add new data on this issue, in this study we have made use of the Chinese hamster ovary (CHO) AA8 cell line to study any possible cytotoxic and genotoxic effects of lithium by using toxicity assay, micronuclei assay, chromosome aberration assay, endoreduplication assay, and comet assay. High nontoxic doses of Li_2CO_3 and LiCl resulted in an increasing number of micronuclei in the AA8 cells, while neither the yield of endoreduplication nor the chromosome aberration frequency were increased. We also tested any potential DNA damage induced by lithium as assessed by the Comet assay, with negative results. An interesting observation was the big size of micronuclei induced by Li_2CO_3 , which seems to point to an aneuploidy effect of lithium rather than a clastogenic effect. This observation, together with the negative results on DNA and chromosome breakage seems to support that the micronuclei observed contain missegregated whole chromosomes. It is widely accepted that loss of entire chromosome (also named loss of heterogeneity or aneuploidy) cause chromosome and genomic instability. Recent reports suggest that genomic instability is closely related to induction of tumor progression, as most types of cancer cells show genomic instability. In conclusion, we consider that Li_2CO_3 can be considered as a potential aneugen able to cause tumor progression through genomic instability.

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR DOSIS AGUDAS DE CADMIO EN LARVAS DE *CHIRONOMUS RIPARIUS*

Planelló R., Martínez-Guitarte J.L., Morcillo G.

Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, UNED. Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

El cadmio es un contaminante con un amplio espectro de efectos adversos en los organismos, acumulándose especialmente en los ecosistemas acuáticos. Los Chironómidos constituyen una parte importante de las comunidades bénticas de los sistemas acuáticos no marinos, siendo un elemento clave en la cadena trófica de estos ecosistemas. Considerados como organismo de referencia en ensayos de biotoxicidad (EPA, 1996, 2000; ASTM, 1999), en estos dípteros se han descrito diversos efectos del cadmio sobre parámetros relacionados con el desarrollo pero los estudios a nivel celular y genómico son muy escasos.

En este trabajo, se han analizado los efectos citotóxicos del cadmio en larvas de *C. riparius* sometidas a exposiciones agudas no letales, con el fin de detectar dianas tempranas e identificar posibles biomarcadores a nivel molecular.

A nivel citológico, se han valorado las modificaciones inducidas en los cromosomas politénicos en dos de las regiones más activas en condiciones control, los genes BR y el nucleolo. Mientras los primeros, que codifican proteínas de secreción, no parecen afectados, el cadmio sí provoca cambios en la estructura así como una notable disminución de la actividad del nucleolo. El análisis del rRNA por Northern Blot confirma que el cadmio produce una disminución significativa en los niveles RNA pre-ribosómico (32s). Sin embargo, los niveles de transcrito de las proteínas ribosómicas L11 y L13, analizados mediante RT-PCR semicuantitativa, no parecen afectados. Estos resultados muestran, por primera vez, que el rRNA es una diana temprana y específica del cadmio que podría ser utilizada como biomarcador y que éste tóxico provoca un desacoplamiento de las rutas principales de la actividad nucleolar, a saber, rRNA y proteínas ribosómicas.

Por otro lado, la actividad transcripcional del gen Hsp70, ejemplo de gen inducido por estrés, muestra un aumento significativo tras la exposición a cadmio. Aunque no es tan drástico como en el caso de un estrés térmico, estos resultados confirman la inducción de este gen también frente a metales pesados, por lo que puede considerarse como biomarcador, aunque no específico, de exposición aguda a cadmio.

Por último, se ha analizado el efecto del cadmio sobre un gen de acción endocrina. Los resultados preliminares muestran un aumento significativo en el transcrito del receptor de ecdisona (EcR). Recientemente se ha descrito que el cadmio, además de altamente tóxico y carcinogénico, también tiene un efecto como disruptor endocrino en vertebrados. Puesto que los datos en vertebrados son muy escasos, estos resultados son especialmente interesantes para la caracterización del cadmio como disruptor endocrino en estos organismos.

EFFECTO TÓXICO DE LA COMBINACIÓN BINARIA BUTILHIDROXIANISOL / PROPILPARABENO.

Pérez Martín J.M.¹, Labrador V. ¹, Peropadre A. ¹, Fernández Freire P. ¹, Herrero O. ², de la Peña E. ², Hazen M.J. ¹

1. Grupo de Toxicología Celular. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

2. Laboratorio de Mutagénesis Ambiental. Centro de Ciencias Medioambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

En la última década se han detectado multitud de nuevos contaminantes de origen antropogénico, que se incluyen en el grupo de los fármacos y compuestos de cuidado personal (PPCPs). Existe la necesidad de conocer los efectos tóxicos que estos contaminantes pueden causar al medio ambiente y a la salud humana. A esta preocupación, hay que añadir el creciente interés por analizar las combinaciones de estos compuestos tal y como aparecen el medio ambiente.

En el presente trabajo se han evaluado los efectos antiproliferativos de la mezcla binaria butilhidroxianisol (BHA) / propilparabeno (pPHB), ambos presentes a concentraciones $\geq 1\mu\text{g/L}$ en aguas de uso humano. Para ello empleamos una línea celular establecida (Vero) de fibroblastos de riñón de mono, de una reconocida sensibilidad, y un conjunto de ensayos de citotoxicidad.

Los resultados mostraron que la mezcla de ambos compuestos ejerce un efecto citostático mayor que el observado para los compuestos individuales, bloqueando a las células en interfase. El estudio se complementó con un análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo, que reveló cambios en los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular y un incremento en el número de células poliploides tras la exposición conjunta a BHA y pPHB. Este último efecto resultó completamente inesperado a la vista de los resultados obtenidos con los compuestos individuales.

Con estos resultados podemos concluir que la mezcla binaria de BHA y pPHB altera el control del ciclo celular de las células Vero, inhibiendo la proliferación celular.

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL ÁCIDO PERFLUOROCTANOICO

P Fernández Freire, JM Pérez Martín, O Herrero, A Peropadre, MJ Hazen

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

El ácido perfluorooctanoico o PFOA es una sustancia que se emplea desde 1951 como reactivo intermedio en la fabricación de compuestos derivados de fluoropolímeros y fluoroelastómeros, tales como revestimientos plásticos, retardadores de llama, antiadherentes, impermeables, etc. Esta polivalencia hace que sea un constituyente de muchos artículos empleados diariamente en todo el mundo, de tal modo que su distribución en el medio es constante y dispersa. Sus características físico – químicas le convierten en una sustancia de muy difícil degradación una vez liberada al medio ambiente, circunstancia que fomenta los procesos de bioacumulación.

Hemos empleado una línea celular establecida de riñón de mono, las células Vero, para estudiar los posibles efectos del PFOA derivados de daños en el material genético. Los recuentos de índice mitótico mostraron un descenso significativo tras la exposición a distintas concentraciones de PFOA, coincidiendo con resultados previos obtenidos en vegetales (*Vicia faba*). Un estudio del contenido de ADN a lo largo del ciclo celular mediante citometría de flujo, confirmó la reducción en el número de células en la fase $G_2 - M$, corroborando los valores obtenidos para el índice mitótico. Además, las técnicas citométricas nos permitieron observar un incremento en los porcentajes de células en las fases de $G_0 - G_1$, lo que indica una parada en el ciclo celular.

El análisis de otros efectos del PFOA en nuestro sistema celular, puso de manifiesto una perturbación del retículo mitocondrial, demostrado por el marcaje con rodamina 123 y el ensayo de reducción del MTT. Esta alteración de la fisiología mitocondrial podría ser la responsable de la parada del ciclo celular, no ya tanto como consecuencia de un fallo en la bioenergética celular, sino por la activación de un punto de control mitocondrial del ciclo.

Podemos concluir por tanto, que el ácido perfluorooctanoico es un compuesto de toxicidad moderada, que se comporta como citostático y que, por tanto, podría alterar la proliferación en los organismos expuestos.

INDUCTION OF ENDOREDPLICATION BY FLAVANOLS PRESENT IN THE HUMAN DIET

Neukam K. I., Pastor N., Orta M. L., Campanella, C¹., Kaplan C²., Cortés F.

Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Tel.: +34 954557039; Fax: +34 954610261; www.grupo.us.es/gcucera

¹ Human Anatomy Section, Department of Experimental Medicine, University of Palermo

² Molecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, University of Hacettepe, 06800, Ankara / Turkey

Flavanols are polyphenolic secondary plant products which are abundant in our diet. They are known to exert antiinflammatory, vasoprotective and anticarcinogenic activity, and epidemiologic studies have revealed a positive correlation between increased flavanol consumption and a reduced risk for cancers, stroke and coronary heart diseases. The anticarcinogenic properties of tea and its flavanolic constituents have been studied in a variety of *in-vitro* and animal investigations, providing evidence that tea flavanols are able to inhibit carcinogenesis of various cancers, which in some cases could be correlated with increased tumor cell apoptosis and decreased cell proliferation. Topoisomerases are nuclear enzymes which interact with DNA and play a major role in these processes. We found that four of the main tea flavanols, namely (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate, are able to catalytically inhibit topoisomerase II enzymes isolated from hamster ovary AA8 cells dose-dependently. Additionally, at these concentrations we observed high levels of endoreduplication, a rare phenomenon which occurs after two successive rounds of DNA replication without intervening mitosis. Of the compounds tested, (-)-epigallocatechin gallate was found to be the most potent whereas catecholic flavanols revealed minor effects, leading to the conclusion that maximum effects require a pyrogallol structure at the B-ring, while additional substitution with a galloylic residue at the C3 hydroxyl group leads to further augmentation of the effect. Thus, we suggest that the anticancer properties of tea flavanols can be at least partly due to their ability to interfere with the cell cycle and block cell proliferation at early stages of mitosis.

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL EN DIÁLISIS, MEDIANTE EL ENSAYO DEL COMETA

Stoyanova E, El-Yamani N, Coll E*, Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès); * Fundació Puigvert, Barcelona

En los pacientes con insuficiencia renal crónica se ha observado un incremento del daño genético respecto a la población sana. Se presume que el aumento de la inestabilidad genética podría estar relacionado con la incidencia de la patología cancerosa y cardiovascular observada en este tipo de pacientes. El objetivo del presente estudio es evaluar el daño genético en pacientes con insuficiencia renal sometidos a diálisis y relacionar los resultados que se obtengan con distintos parámetros clínicos. En este estudio han participado 70 pacientes en hemodiálisis (HD) estable, de 64 ± 13 años de edad y con un tiempo medio en HD de 37 meses y, además, se han incluido otros 2 grupos, uno formado por pacientes renales en fase de pre-diálisis y otro por personas sanas, utilizado como control. El nivel de daño genético se ha evaluado en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo del cometa llevado a cabo en condiciones alcalinas, y habiéndose utilizado las enzimas específicas de reparación: endonucleasa III y formamidopirimidina glicosilasa, para detectar la posible inducción de daño oxidativo. El porcentaje de DNA en la cola y el OTM (*Olive tail moment*) han sido los dos parámetros que hemos utilizado para cuantificar el daño genético. Según los análisis estadísticos de los resultados obtenidos del ensayo se han observado asociaciones del nivel de daño genético con algunos hábitos de los pacientes, así como con el tiempo que llevan en el programa de HD y con otros parámetros clínicos. Actualmente estamos realizando la evaluación del daño genético en el grupo de pacientes de pre-diálisis y en el grupo control de personas sanas, para ir completando el estudio de biomonitorización.

FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN TRABAJADORES EXPUESTOS AL ARSÉNICO

Paiva L, Martínez V, Creus A, Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

El arsénico es un elemento clasificado por la IARC como carcinógeno en humanos. Se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones del mundo y actualmente son millones de personas las que están expuestas a sus efectos tóxicos. En los colectivos expuestos de forma crónica al arsénico se observa un incremento en la incidencia de enfermedades como el cáncer de piel, de vejiga, de pulmón, de hígado y de sangre, además de otras alteraciones cutáneas, hepáticas, nerviosas, cardiovasculares, hematopoyéticas, respiratorias y endocrinas.

En Chile, las características geológicas de la región de Antofagasta asociadas al desarrollo de la actividad minera vienen contribuyendo de forma significativa al incremento de los niveles ambientales de arsénico. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el riesgo genotóxico causado por la exposición ocupacional al arsénico. Para ello, se analizó la frecuencia de micronúcleos (MN) en células de mucosa bucal y en linfocitos de sangre periférica en mineros chilenos. También se tomaron muestras de orina para determinar los niveles de As y de sus metabolitos.

El estudio se llevó a cabo en un total de 206 individuos, divididos en 3 grupos: un grupo expuesto constituido por 105 trabajadores de la fundición de una explotación minera de cobre, en donde hay niveles importantes de arsénico, un grupo control interno formado por 53 empleados del área administrativa de la misma minería, y un grupo control externo compuesto por 48 trabajadores de otra minería en la que no se detectan niveles significativos de arsénico.

El análisis de los niveles de As y de sus metabolitos en orina ha sido un biomarcador adecuado para evaluar las diferencias en los niveles de exposición existentes entre los tres grupos estudiados. Aunque los datos epidemiológicos confieren un claro riesgo genotóxico a la exposición al As, la magnitud del daño genético detectado en nuestro estudio cabe ser considerada como muy moderada. Sólo se ha encontrado un incremento significativo de la frecuencia de MN en células de mucosa bucal en el grupo del control interno, no pudiéndose establecer ninguna correlación entre los niveles de exposición al arsénico y la frecuencia de MN.

ESTUDIO DE LA POSIBLE CAPACIDAD GENOTÓXICA DEL FÁRMACO ANTIHIPERTENSIVO ALPHA-BLOQUEANTE DOXAZOSINA: DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE SCEs Y MNs EN PACIENTES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

Arrieta I, Peñagarikano O, Téllez M, Criado B, Ramirez J, Ortega B., Gonzalez A., Flores P., Lostao CM

La hipertensión arterial requiere un tratamiento farmacológico largo y continuado los pacientes por tanto están sometidos a una exposición ininterrumpida a los fármacos antihipertensivos durante mucho tiempo. Este tratamiento continuado puede generar efectos secundarios adversos.

Estudios realizados por nuestro grupo han evaluado la capacidad genotóxica de fármacos beta-bloqueantes y calcio-antagonistas utilizando para ello marcadores citogenéticos.

En base a los resultados previos obtenidos y utilizando las mismas técnicas analíticas en este estudio se ha analizado la capacidad genotóxica del antihipertensivo Doxazosina. El análisis se ha realizado en pacientes hipertensos antes y después de iniciar el tratamiento farmacológico, de forma que el paciente actúa como control de si mismo.

El antihipertensivo Doxazosina, pertenece al grupo de los alpha-bloqueantes, que actúan bloqueando receptores alpha en ciertas áreas del organismo. Los resultados obtenidos con este fármaco señalan como en los estudios previos un aumento significativo en la frecuencia de Micronucleos y confirman la eficacia de este marcador citogenético en estudios de genotoxicidad.

THE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS ON NEOPLASTIC CELL SURVIVAL

Campanella C¹, Kaplan² C, Orta ML, Neukam KI, Ardizzone N¹, Marino, A¹, Montalbano A¹, Cappello F¹, Cortés F.

Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Tel.: +34 954557039; Fax: +34 954610261; www.grupo.us.es/gcucera

¹ Human Anatomy Section, Department of Experimental Medicine, University of Palermo, via del Vespro 129, 90127 Palermo, Italy

² Molecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, University of Hacettepe, 06800, Ankara, Turkey

INTRODUCTION:

The aim of present work was to evaluate the effects of oxidative stress on neoplastic cell survival in an *in vitro* model since the oxidative stress mimics hypoxic events in tumoral growth. In particular, we investigated the molecular mechanisms involved in H₂O₂-induced apoptosis in NCI-H292 (mucoepidermoid carcinoma) cell line.

MATERIALS AND METHODS:

NCI-H292 were cultured and treated with different concentrations of H₂O₂. The cell viability was evaluated by MTT test. In addition, apoptotic index was assessed by Annexin-FITC citofluorimetric analysis. We evaluated the nuclear damage induced by oxidative stress using the single-cell gel (SCG) electrophoresis (Comet assay). Western blotting and immunocytochemistry analyses were also performed using primary mouse antibodies directed towards human p53 (DO-7, DAKO), p21 (187, SANTA CRUZ) and hsp70 (W27, SANTA CRUZ). Finally, the expression of p53 was also assessed by means of the RT-PCR assay.

RESULTS:

Treatment with different concentrations of H₂O₂ caused a reduction of up to 40% of cell viability, as shown by the MTT test. Moreover, annexin-FITC cytofluorimetric analysis demonstrated that the reduction of cell viability was due to a significant increase in apoptotic events. The Comet assay has shown DNA damage in NCI-H292 after exposure to H₂O₂. P53 resulted negative by immunocytochemistry and Western blotting analyses, as expected, since it is in wild-type form in these cells and it has a short half-life; nevertheless, its mRNA resulted expressed, as observed by the RT-PCR analysis, without variation after stimulation. Finally, we found an increase in p21 only after stimulation, while Hsp70 was invariably overexpressed in all conditions.

DISCUSSION AND CONCLUSION:

Our preliminary results demonstrate that the oxidative stress induced by H₂O₂ causes a reduction of cell viability and increased DNA damage. In addition, we find an increase in apoptotic events, possibly due to a p53-induced pathway; these data however, need further confirmation. Nevertheless, since it was already postulated that hsp70 has an anti apoptotic role in tumoral (osteosarcoma) cells, via a negative feed-back with p53, we will rather investigate molecular pathways involving p53 and hsp70, as well as other related proteins, in our experimental model.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL ELEMENTO TRANSPONIBLE *FB-NOF* DE *Drosophila melanogaster*

Badal M, Portela A, Cabré O, Xamena N.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

Los elementos transponibles son una importante fuente de mutaciones en los genomas donde se hospedan. Disrupción insercional de genes, alteración de la expresión y regulación génica, translocaciones e inversiones por recombinación ectópica, son algunos de los efectos derivados de su existencia. Aún así, no hay duda de que estos efectos contribuyen a la plasticidad de los genomas eucariotas y, por lo tanto, a su adaptabilidad.

El elemento transponible *FB-NOF* de *Drosophila melanogaster* es uno de los más desconocidos del género. Tiene una estructura modular con regiones altamente repetitivas, que le confieren una gran capacidad recombinogénica y está demostrada su implicación en un número creciente de alteraciones, algunas con gran significado evolutivo. Sin embargo, la mayoría de sus inserciones tienden a perder la parte central del elemento, con capacidad para codificar hasta tres ORF, pero mantienen las repeticiones invertidas altamente repetitivas. Esta observación centra la atención en la expresión de la parte interna de *FB-NOF*.

En el presente trabajo se describe el análisis exhaustivo de los ORF potenciales del elemento *FB-NOF* mediante herramientas bioinformáticas y moleculares. Nuestros resultados indican que este transposón se encuentra activo en la actualidad, que dos de sus ORF se expresan en individuos adultos, quizás a partir de un mismo mRNA dicistrónico y que generan péptidos que, en cultivo celular, se localizan mayoritariamente en el citoplasma.

ESTIMACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DEL TRATAMIENTO CMF IN VIVO EN CÉLULAS SOMÁTICAS DE *D. melanogaster*

Uriol E., Comendador M.A., Sierra L.M.

Área de Genética. Dpto. Biología Funcional e IUOPA. C/ Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo.

La biomonitorización de pacientes con cáncer de mama sometidas a quimioterapia adyuvante CMF (ciclofosfamida, CP, metotrexato, MTX, y 5-fluorouracilo, 5-FU) con el ensayo del cometa revela que, aunque existe variabilidad interindividual, se pueden establecer dos grupos, dependiendo de que el tratamiento induzca o no roturas de DNA. En un intento por determinar los efectos de cada compuesto por separado y la mezcla de los tres, se han utilizado los ensayos del cometa y el SMART *w/w+* para estudiar la inducción de roturas de DNA y su relevancia genotóxica en términos de inducción de recombinación mitótica y clastogenicidad.

Se utilizaron tres concentraciones por compuesto. Los resultados del cometa muestran que los tres compuestos inducen roturas con algunas de las concentraciones analizadas. El ensayo SMART revela que CP y MTX inducen clastogenicidad y recombinogenicidad, mientras que 5-FU es mayoritariamente recombinogénico.

Por último, se intentó simular el tratamiento CMF utilizando una mezcla de los tres compuestos y manteniendo las proporciones entre ellos. Problemas de toxicidad limitaron las concentraciones utilizadas. Los resultados obtenidos con el ensayo del cometa muestran que no hay una respuesta positiva con ninguna de las concentraciones. En cambio, en el ensayo SMART sí se produce una respuesta positiva con la combinación más concentrada, indicando que el tratamiento CMF puede inducir tanto clastogenicidad como recombinación mitótica.

EFFECTOS DE AGENTES INDUCTORES DE ENLACES CRUZADOS EN CÉLULAS GERMINALES DE *DROSOPHILA* *IN VIVO*: MUTACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN.

Hernando J, Comendador MA, Aguiar S, Sierra LM

Dpto. Biología Funcional, Área de Genética e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA).
Universidad de Oviedo.

En células germinales femeninas los efectos y consecuencias de la inducción de daño en el DNA se han estudiado muy poco, si se comparan con los estudios equivalentes en machos.

Drosophila melanogaster representa un excelente organismo modelo para este tipo de estudios y, por ello, se ha utilizado para evaluar la actividad de varios agentes inductores de enlaces cruzados en el DNA, clorambucil, busulfán, melfalán y ciclofosfamida, que se usan habitualmente en tratamientos de quimioterapia del cáncer, en la inducción de mutaciones y en la alteración de las frecuencias y patrones de recombinación meiótica. Además, se ha estudiado la influencia de la proteína Mus308 en estos procesos.

Los resultados obtenidos muestran que todos los agentes analizados inducen mutaciones en oocitos, maduros e inmaduros, tanto de hembras normales como mutantes para el gen *mus308*. Ahora bien, mientras que la respuesta es independiente de la concentración en células eficientes en reparación, se incrementa con la concentración en células deficientes en la actividad Mus308.

Por otro lado, los daños en el DNA inducidos por estos agentes son capaces de alterar tanto la frecuencia como la distribución de sobrecruzamientos meióticos, y este efecto está modulado por Mus308.

Las diferencias obtenidas entre las dos condiciones de reparación, tanto en frecuencia de mutación como de recombinación, demuestran el papel de Mus308 en el procesamiento y/o reparación de los daños inducidos por este tipo de agentes.

LA SUSTITUCIÓN DEL DNA CON NUCLEÓSIDOS HALOGENADOS PROTEGE DE LAS ROTURAS DE CADENA Y DE LOS INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDAS POR EL INHIBIDOR DE TOPOISOMERASA I CAMPTOTECINA.

Orta M. L¹., Neukam K¹., Campanella, C²., Kaplan C³., I., Mateos S¹.

1-Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Tel.: +34 954557039; Fax: +34 954610261; www.grupo.us.es/gcucera

²Molecular Biology Section, Department of Biology, Faculty of Science, University of Hacettepe, 06800, Ankara / Turkey.

³Human Anatomy Section, Department of Experimental Medicine, University of Palermo, Palermo. Italy.

La enzima fundamental topoisomerasa I corta sólo una de las dos cadenas del DNA en secuencias preferidas dentro de sus sitios de reconocimiento y unión. Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente que cuando las células incorporan nucleósidos halogenados análogos de la timidina en el DNA, se interfiere con la segregación cromosómica lo cual genera una alta tasa de endoreduplicación (1). Utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante, se encontró una clara protección de roturas de DNA inducidas por el veneno de topo II m-AMSA (2). En la presente investigación hemos querido comprobar si la presencia de nucleósidos halogenados en el DNA también disminuye la frecuencia de interacción de la topoisomerasa I con el DNA y por lo tanto la frecuencia de estabilización de los complejos de rotura inducidas por el veneno de topo I camptotecina. Dicha hipótesis se ha sometido a análisis experimental mediante la detección en electroforesis en campo pulsante de las roturas de doble cadena, y mediante análisis de los intercambios entre cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas. La protección resultante se ha confirmado paralelamente de forma clara al observarse la pérdida en células halógeno-sustituidas de la actividad de topo I unida al DNA como resultado de la acción estabilizadora de los complejos de rotura promovida por la camptotecina.

[1] Cortes F, Pastor N, Mateos S, Dominguez I. The nature of DNA plays a role in chromosome segregation: endoreduplication in halogen-substituted chromosomes. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Jun 11; 2(6): 719-26.

[2] Cantero G, Mateos S, Pastor N, Cortes F. Halogen substitution of DNA protects from poisoning of topoisomerase II that results in DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2006 Jun 10; 5(6): 667-74.

ASOCIACIÓN DE DOS LOCI INDEPENDIENTES EN 1p12 CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE TIROIDES

Baida A., González-Flores E, Akdi M, Galofré P*, Marcos R, Velázquez A.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès); * Servei de Medicina Nuclear, Hospital Josep Trueta, Girona

Se han descrito diferentes genes directamente relacionados con el cáncer de tiroides, sin embargo, los procesos del desarrollo del tumor no están definidos. Actualmente se postula que genes de susceptibilidad junto con factores ambientales pueden tener un papel importante en dichos procesos. Estudios previos realizados por nosotros sugieren que la región 1p12-13 está relacionada con la incidencia de cáncer de tiroides. Así, con el fin de localizar los factores de susceptibilidad en esta región se realizó un estudio de asociación caso-control en una población española, analizando seis polimorfismos que se extienden 2,4 Mb en la región 1p12-13. En este estudio se genotiparon, mediante PCR-RFLP, 136 individuos control y 201 pacientes de cáncer de tiroides. Cuatro de los seis polimorfismos analizados no mostraron asociación con el cáncer tiroides; sin embargo, los dos polimorfismos restantes, rs2145418 y rs 4658973, sí que presentaron una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). En ambos casos se encontraron diferencias significativas en las frecuencias génicas ($p < 0,0001$) y en la distribución de genotipos ($p < 0,0001$) entre pacientes y controles. Las odds ratios para el marcador rs2145418 fueron de 9,2 (95% CI, 4,50-21,6,) y de 5,0 (95% CI, 2,85-8,83) para los homocigotos y los heterocigotos portadores del alelo variante G, respectivamente; mientras que en el caso del marcador rs4658973 las odds ratios fueron 0,07 (95% CI, 0,03-0,18) y 0,40 (95% CI, 0,26-0,62) para los homocigotos y los heterocigotos portadores del alelo variante G, respectivamente. Ambos marcadores se encuentran en la región 1p12 y no muestran desequilibrio de ligamiento, lo que indica que su relación con la susceptibilidad al cáncer de tiroides es independiente. Por lo tanto, estos resultados revelan una fuerte asociación de la región 1p12 del cromosoma 1 con el cáncer de tiroides y sugieren la presencia de loci candidatos de susceptibilidad para este tipo de cáncer en esta región. Este estudio se está ampliando a una población alemana, a la vez que se realiza el análisis de haplotipos relacionados con los marcadores rs2145418 y rs4658973 por separado.

VARIANTES DEL GEN *BRCA1* ASOCIADAS AL DESARROLLO DE CÁNCER MÚLTIPLE INCLUIDO MAMA

O. Álvarez, L. Fernández, A. Pérez, L.M. Sierra, M.L. López, M.A. Comendador, Ferreiro, J.A.,
Área de Genética. Departamento de Biología Funcional e IUOPA. Universidad de Oviedo.

La ocurrencia de varios procesos tumorales en una misma persona sugiere la presencia de un defecto hereditario. Entre las distintas combinaciones posibles de tumores primarios múltiples nos hemos centrado en aquellas que incluyen cáncer de mama ya que éste es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, estimándose que 1 de cada 8 mujeres va a desarrollar esta patología a lo largo de su vida.

Entre los genes implicados en riesgo de cáncer de mama y/u ovario, *BRCA1* interviene en procesos celulares fundamentales como reparación del ADN, transcripción y reorganización de la cromatina y control del ciclo celular, de forma que es el más importante y el que explica un mayor número de casos. Por este motivo, en este trabajo hemos determinado la presencia de mutaciones en el gen *BRCA1* mediante la secuenciación completa de su región codificante en personas que han padecido cáncer múltiple incluido mama y/o en sus familiares.

Los resultados de las 78 personas analizadas, pertenecientes a 45 familias, muestran que:

- (a) Al menos 4 familias son portadoras de mutaciones patogénicas (pequeñas deleciones o inserciones).
- (b) 20 familias son portadoras de 6 variantes génicas que dan lugar al cambio de un aminoácido; 3 de ellas aparecen en varias familias y se consideran habitualmente como polimorfismos, mientras que el resto aparecen cada una en una sola persona de familias distintas. Dos de estas variantes no han sido descritas con anterioridad.
- (c) Al menos 14 variantes, localizadas tanto en intrones como en exones, segregan conjuntamente dando lugar a haplotipos presentes en casi un 60% de las personas analizadas.

EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS METALES PESADOS MERCURIO Y PLOMO CON EL ENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART) EN ALAS DE *Drosophila melanogaster*

Carmona ER, Kossatz E, Creus A, Marcos R.

Grup de Mutagenesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

La presencia de metales en el ambiente ha ido aumentando enormemente en las últimas décadas debido a diferentes actividades antropogénicas, hasta el punto que, actualmente, algunos metales representan una fuente de contaminación ambiental importante y potencialmente adversa para los seres vivos. Aunque numerosos estudios han evaluado los efectos tóxicos, genotóxicos y carcinogénicos de diferentes metales pesados, aún se desconocen los efectos que pueden provocar algunos de ellos y los mecanismos de acción por los cuales pueden causar genotoxicidad. De esta forma, los nuevos estudios que utilicen ensayos de corta duración en eucariotas, y que sean capaces de detectar un amplio rango de efectos genotóxicos, son importantes a la hora de conocer y dilucidar los efectos de los metales y metaloides en el material genético.

Actualmente, en nuestro grupo de trabajo se está llevando a cabo una evaluación genotóxica de los metales mercurio y plomo. En esta comunicación se presentan los resultados que hemos obtenido hasta ahora con el ensayo *in vivo* de mutación y recombinación somáticas (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*, el cual ha demostrado ser una buena herramienta para evaluar la actividad genotóxica (mutagénica/recombinogénica) de diferentes compuestos químicos, incluidos los metales pesados. Los resultados obtenidos con dos compuestos de mercurio (cloruro de mercurio y cloruro de metil mercurio) indican que este metal no incrementa significativamente la frecuencia de ninguna de las tres categorías de clones mutantes (sectores sencillos, dobles y grandes), por lo que no presenta actividad genotóxica detectable en este ensayo SMART. En este momento se está procediendo al análisis de los resultados de los tratamientos con cloruro de plomo y nitrato de plomo.

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CITOGÉNICA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍA Y CLASTOGENICIDAD EN CÉLULAS HUMANAS EXPUESTAS AL ARSÉNICO

Chávez MJ, Creus A, Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

Este estudio se basa en los efectos genotóxicos producidos por el arsenito de sodio (iAs) y formas metiladas (MMA y DMA) en células humanas cultivadas (linfoblastoides TK6 y linfocitos de sangre periférica), detectados mediante el ensayo de micronúcleos y con el uso de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se determinó el origen de los micronúcleos (clastogénico/aneugénico). Como controles positivos se emplearon mitomicina C para clastogenicidad y griseofulvina para aneugenicidad y como control negativo el agua.

La exposición de las células TK6 a iAs, MMA y DMA no produjo efectos significativos para la inducción de micronúcleos, en relación a los valores obtenidos en el control negativo indicando que, bajo las condiciones de esta investigación, la línea celular TK6 es, en cierta forma, resistente al efecto genotóxico del arsénico y, por lo tanto, la cantidad de MN inducida en el ensayo no sobrepasa significativamente el valor que se obtiene en el control negativo. Los linfocitos presentaron una respuesta positiva al tratamiento con arsenito de sodio (4 μM), con un incremento significativo de la frecuencia de MN. Los resultados muestran que las células TK6 son efectivamente más resistentes que los linfocitos al efecto del arsenito, en las condiciones utilizadas, indicando que cada tipo celular tiene una capacidad de respuesta diferente frente a la exposición a cada agente potencialmente genotóxico.

El uso de la técnica FISH acoplada con la prueba de micronúcleos no produjo resultados concluyentes en relación al posible papel aneugénico y/o clastogénico de las formas químicas del arsénico evaluadas, ya que las frecuencias inducidas de MN centrómero+ y centrómero- son similares a las obtenidas en el control negativo.

CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES INDUCIDAS POR ARSÉNICO MEDIANTE EL ENSAYO DE LINFOMA DE RATÓN

Soriano C, Creus A, Marcos R.

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)

El arsénico es un metaloide ubicuo en el ambiente, que se ha asociado a gran número de enfermedades en las poblaciones humanas expuestas al mismo. Es un conocido carcinógeno cuyo mecanismo de acción todavía no está bien caracterizado, por lo que su estudio continúa siendo de gran interés para los investigadores.

Está ampliamente demostrado que los compuestos de arsénico son potentes agentes clastogénicos, produciendo aberraciones cromosómicas. Los resultados previos obtenidos por nuestro grupo en el ensayo de mutación génica de linfoma de ratón (MLA), empleando la línea celular linfoblastoide L5178Y, han demostrado la genotoxicidad de diferentes compuestos de arsénico, entre ellos el trióxido de arsénico.

En este trabajo se pretende estudiar el espectro molecular de las mutaciones inducidas por el trióxido de arsénico, que podría ser de interés para explicar alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer. La determinación de los tipos de mutaciones puntuales u otras anomalías cromosómicas provocadas por la exposición de cultivos celulares a este compuesto genotóxico se ha realizado partiendo de las colonias mutantes obtenidas en el MLA.

Se han efectuado una serie de PCR para dilucidar los tipos de mutaciones inducidas en estas células que las han llevado a ser mutantes para el locus *Tk* (timidina kinasa), marcador utilizado en el MLA. Asimismo, la secuenciación del cDNA del gen *Tk* permite detectar las alteraciones sufridas, en comparación con la secuencia de tipo salvaje.

Los resultados obtenidos hasta el momento con el MLA indican que las mutaciones inducidas son, principalmente, de tipo cromosómico. Esta conclusión se desprende de que se generan colonias pequeñas, lo que hace pensar que básicamente el arsénico habrá producido sucesos clastogénicos. Es por ello que se han seleccionado una serie de microsatélites del cromosoma 11 de ratón, en donde se encuentra localizado el locus *Tk*, para emplearlos como marcadores de posición y así poder determinar el tamaño de las deleciones.

SEMA 1998-2007



Memoria 1989-2007 de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental (SEMA): Reuniones Científicas, Publicaciones y página Web



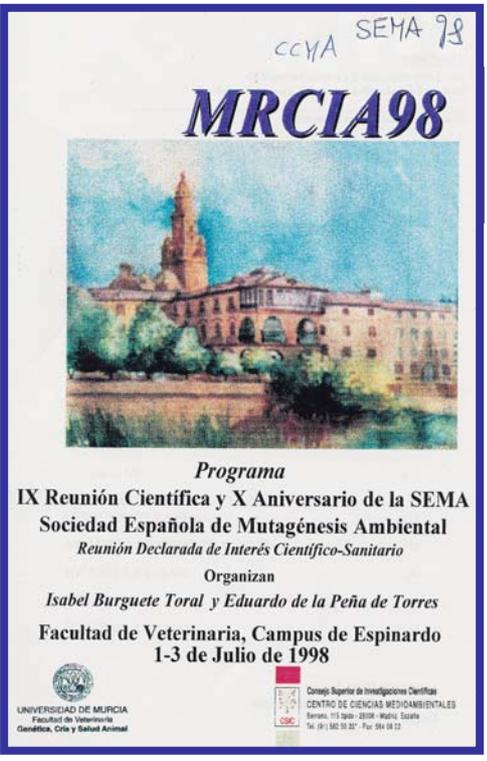
Eduardo de la Peña de Torres
Tesorero SEMA
Centro de Ciencias Medioambientales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
epena@ccma.csic.es



Reuniones de Mutagénesis 1984-1998:

- 1984 – Reunión de los Grupos que Realizan Evaluación Mutagénica en España. CSIC
- 1985 – Mesa Redonda en las Jornadas Toxicológicas Españolas. Córdoba AETox. 2ª Reunión de los Grupos que Realizan Evaluación Mutagénica en España
- 1987 – 3ª Reunión de los Grupos que Realizan Evaluación Mutagénica en España
- 1988 – Genotoxicología – Programa Movilizador de Toxicología del CSIC
- Constitución de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental (SEMA)
- 1989 – I Reunión Científica de la SEMA. UAB. Barcelona
- 1990 -- II Reunión Científica de la SEMA. Univ. de Oviedo
- 1991 – III Reunión Científica de la SEMA. Univ. de Navarra
- 1992 --- IV Reunión Científica de la SEMA. Univ. Zaragoza
- 1993 – 23 rd. Annual Meeting of the EEMS. UAB. Barcelona
- 1994 – V Reunión Científica de la SEMA. Univ. Cordoba
- 1995 – VI Reunión Científica de la SEMA. Alcobendas (Madrid)
- 1996 --VII Reunión Científica de la SEMA. Univ. Sevilla
- 1997 – VIII Reunión Científica de la SEMA. Univ. Oviedo
- 1998 – IX Reunión Científica de la SEMA. MRCIA '98. Univ. Murcia



	<p>Comité Organizador</p> <p>Isabel Burguete Toral Eduardo de la Peña de Torres</p> <p>Vocales:</p> <p>Ana Guadaño Larrauri Antonia Martínez López M^a Luisa Hevia Mendez Antonio Ramírez de la Fe</p>	
	<p>Invitados:</p> <p>David A. Eastmond UCR-USA Elina Valcarce MSyC Dino di Berardino. U. Nápoles</p>	
<p>Murcia 1-3 julio</p>		

		<p>EVALUACIÓN MUTAGÉNICA Y GENOTÓXICA</p>  <p>MRCIA</p> <p>EDUARDO DE LA PEÑA DE TORRES, CSIC ISABEL BURGUETE TORAL, UNIVERSIDAD DE MURCIA ANA GUADAÑO LARRAURI, CSIC</p> <p><i>Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica. Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental.</i></p> <p>MRCIA 98</p> <p>X Aniversario de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental</p>	
			



Organiza Grupo de Mutagènesi (Departament de Genètica i de Microbiologia) de la Universitat Autònoma de Barcelona

Comité Organizador
 Presidente: **Dr. Ricardo Marcos**
 Vocales: **Dr. Oriol Cabré**
 Dr. Amadeu Creus
 Dra. Antonia Velázquez
 Tesorero: **Dr. Jordi Surrallés**
 Secretario: **Dr. Noel Xamena**

Conferenciante Invitado
Dr. A.T. Natarajan

Bellaterra
 (Barcelona)
 5-7 julio 2000

Asistió Eduardo de la Peña Jr.

c-172

2267

SEMA2000

Xª REUNIÓN CIENTÍFICA DE
 LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
 MUTAGÉNESIS AMBIENTAL

BELLATERRA, 5-7 / JULIO / 2000
Programa y resúmenes

Asistió Eduardo Jr.

Comité Organizador

- M^a Isabel Arrieta Sáez
- Carlos M^a Lostao Zuza
- M^a Mercedes Télez Sedano
- Begoña Criado Alonso
- Eduardo Ortíz Lastra
- Piedad Flores Elices
- Esther Irurzun Zuazabal
- Rosa M^a Alonso Rojas
- Rosa M^a Jiménez Sanz
- Olga Peñagarikano Ahedo
- Begoña Ortega Azpitarte

Conferenciantes Invitados

- Dra. Micheline Kirsch-Volders
- Dra. Lucia Migliore

Bilbao
10-12 julio
2002

Comité Organizador

Presidente: Dr. Joaquín Garrido Vázquez
 Vocales: Dr. A. Carballeira Ocaña
 Dr. M. L-Rivadulla Lamas
 Dr. A. Álvarez Prechous
 Dra. Carmen Pardiñas Añón
 Dra. Dolores Menéndez Prieto
 Tesorera: Dra. Rosa A. Sueiro Benavides
 Secretaria: Dra. Susana Suárez Figueras

Conferenciantes Invitados

D. Ángel Gómez Amorín
 D. Juan José González

Santiago de Compostela
12-4 julio 2003

Comité Organizador

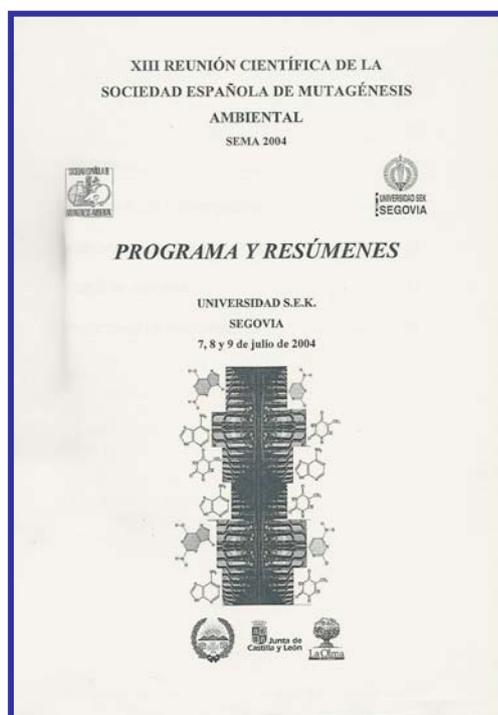
Presidente: Dr. Samuel González Mancebo
 Tesorera: Dra. Ana M^a Martín Moreno
 Secretarios: D. Juan J. Jiménez Martínez
 D.Fernando Bartolomé Robledo

Vocales:
 - Dra. Mónica A. Fernández Salim
 - Dra. M^a Luz Diago Egaña
 - Dra. Carmen Ruiz Roldá
 - Dra.M^aLuisa de la Puerta Turrillas

Conferenciantes Invitados

- Dr. Julio Casado Linarejos
 - Dra. Argelia Castaño Calvo
 - Dr. Enrique Estrada Vélez

Segovia
 7-9 julio 2004



Organiza Grupo de Mutagénesis Ambiental de la Universidad de Oviedo Comité Organizador

Presidente: Miguel Ángel Comendador
 Secretaria: Luisa María Sierra Zapico
 Tesorero: José Antonio Ferreiro Ríos
 Vocales: Esther Uriol Egido
 Ignacio Sancho Martínez
 Leticia Aguado Ortiz
 Ana Pérez García
 Olaya Álvarez Vallés

Conferenciantes Invitados

- Dr. Jordi Surrallés
 - Dr. R. Waters
 - Dr. R.A. Baan



Organiza Grupo de
Biología Molecular de los
mecanismos de respuesta
a estrés

Comité Organizador

Presidente: Carmen Pueyo de la Cuesta
Secretaria: Nieves Abril Díaz
Tesorera: M^a José Prieto Alamo
Vocales: Juan López Barea
Juan Jurado Carpio
Carmen María Michán Doña
Julia Ruiz Laguna
Inmaculada Osuna Jiménez
Carlos A. Fuentes Almagro
Patricia Aguilar Melero
Teresa Gómez Fernández
Beatriz Espejo Reyes

Conferenciantes Invitados

- Prof. Jose Luis Gómez Ariza
- Dr. Murat K. Sapparbaev
- Dr. J. Kevin Chipman

Córdoba
19-21 junio 2006



Organiza Grupo de
Mutagénesis Ambiental
CCMA - CSIC

Comité Organizador:

- E. de la Peña / CSIC
- O. Herrero / CSIC
- A. Martínez / CSIC
- M.J. Hazen / UAM
- P. Fernández / UAM
- J.M^a Pérez / UAM
- A. Peropadre / UAM
- G. Martínez- ICS/JCCM
- M. Mayoral / Ayto.Talavera
- C. Herranz / Dpt.Toledo

Invitados

- Dra. G. Umbuzeiro / Brasil
- Dra. M^a J. Hazen / UAM
- Dra. C. Barrueco / M^o S y C
- Da. R. Fernández / M^o S y C

Talavera de la Reina
18-21 junio 2007





muchas gracias por asistir

EDUARDO de la PEÑA de TORRES

ASISTENTES / AUTORES



ASISTENTES

1 Aguilar Melero P.	b92agemep@uco.es
2 Arrieta Saez I.	ggparsai@lg.ehu.es
3 Atenza Fernández J.	jatenza@jccm.es
4 Barrueco Fdez-Cuervo C.	cbarrueco@msc.es
5 Burguete Toral I.	burguete@um.es
6 Campanella C.	claudiettacam@hotmail.com
7 Carmona Ortíz E.	erico.carmona@uab.es
8 Chávez Delgado M.	magaly.chavez@gmail.com
9 Comendador MA.	mac@uniovi.es
10 Cortés Benavides F.	cortés@us.es
11 Creus Capdevila A.	amadeu.creus@uab.es
12 Fernández Freire P.	paloma.fernandez@uam.es
13 Fernández Sánchez R.	rfernandezs@msc.es
14 Gómez Amorín A.	angel.gomez.amorin@sergas.es
15 González Mancebo S.	samuel.gonzález@ie.edu
16 Hazen de San Juan MJ.	mariajose.hazen@uam.es
17 Hernández Fierro B.	bhernandez@jccm.es
18 Herrero Felipe O.	oscar.herrero@ccma.csic.es
19 Kaplan C.	cigdemkaplan@us.es
20 Liviac Muñoz D.	danaemarcela.liviac@@uab.es
21 Marcos Dauder R.	ricard.marcos@uab.es
22 Martínez Cepa M.	mmartinez@jccm.es
24 Martínez Juárez G.	gumartinez@jccm.es
25 Martínez López A.	mutagenesisambiental@ccma.csic.es
26 Mateos Cordero S.	smateos@us.es
27 Mendo S.	smendo@bio.ua.pt
28 Miguez Barroso CM.	cmiguez@bio.ua.pt
29 Neukam K.	keule165@web.de
30 Orta Vázquez ML.	manortvaz@alum.us.es
31 Paiva Sousa L.	leiliane.paiva@uab.es
32 de la Peña de Torres E.	epeña@ccma.csic.es
33 Pérez Martín J.M.	jomanuel.perez@uam.es
34 Peropadre López A.	ana.peropadre@uam.es
35 Planelló Carro R.	rplanello@ccia.uned.es
36 Sierra Zapico LM.	lmsierra@uniovi.es
37 Soriano Tárrega C.	carolina.soriano@uab.es
38 Stoyanova E.	eli_stoqnova@mail.bg
39 Umbuzeiro G.	gisela@cetesbnet.sp.gov.br
40 Velázquez Henar A.	antonia.velazaquez@uab.es
41 Xamena López N.	noel.xamena@uab.es

ÍNDICE DE AUTORES

A

Aguiar S.		25
Aguilar-Melero P.	b92agemep@uco.es	11
Akdi M.		27
Álvarez O.		28
Ardizzone N.		22
Arrieta A.	ggparsai@lg.ehu.es	21

B

Badal M.	marti.badal@uab.es	23
Baida A.	aida.baida@uab.es	27
Barroso C.	cmiguez@bio.ua.pt	13
Barrueco Fdez-Cuervo C.	cbarrueco@msc.es	9

C

Cabré O.	oriol.cabre@uab.es	23
Campanella C.	claudiettacam@hotmail.com	14, 18, 22, 26
Cappello F.		22
Carmona E.	erico.carmona@uab.es	29
Chávez M.	magaly.chavez@gmail.com	30
Coelho S.		13
Coll E.		19
Comendador MA.	mac@uniovi.es	24, 25, 28
Cortés F.	cortés@us.es	18, 22
Creus A.	amadeu.creus@uab.es	12, 20, 29, 30, 31
Criado B.		21

D

Domínguez I.		14
--------------	--	----

E

El-Yamani N.		19
--------------	--	----

F

Fernández Freire P.	paloma.fernandez@uam.es	16, 17
Fernández L.		28
Fernández Sánchez R.	rfernandezs@msc.es	9
Ferreiro JA.	ferreirojose@uniovi.es	28
Flores P.		21
Fuentes-Almagro CA.		11

G

Galofré P.		27
González A.		21
González-Flores E.		27

H

Hazen MJ.	mariajose.hazen@uam.es	8, 16, 17
Hernando J.		25
Herrero O.	oscar.herrero@ccma.csic.es	16, 17

J

Jurado J.	ge2jucaj@uco.es	11
-----------	-----------------	----

K

Kaplan C.	cigdemkaplan@us.es	14, 18, 22, 26
Kossatz E.		29

L

Labrador V.		16
Liviac Muñoz D.	danaemarcela.liviac@@uab.es	12
López ML.		28
Lostao CM.		21
Lourenço J.		13
Lourenço S.		13

M

Marcos Dauder R.	ricard.marcos@uab.es	12, 19, 20, 27, 29, 30, 31
Marino A.		22
Martínez V.		20
Martínez-Guitarte R.		15
Mateos S.	smateos@us.es	14, 26
Mendo S.	smendo@bio.ua.pt	13
Montalbano A.		22
Morcillo G.		15

N

Neukam K.	keule165@web.de	14, 18, 22, 26
-----------	-----------------	----------------

O

Orta ML.	manortvaz@alum.us.es	14, 18, 22, 26
Ortega B.		21
Osuna-Jiménez I.		11

P

Paiva L.	leiliane.paiva@uab.es	20
Pastor N.		14, 18
de la Peña de Torres E.	epeña@ccma.csic.es	16,33
Peñagarikano O.		21
Pérez A.		28
Pérez Martín JM.	josemanuel.perez@uam.es	16, 17
Peropadre A.	ana.peropadre@uam.es	16, 17
Planelló R.	rplanello@ccia.uned.es	15

Portela A.		23
Prieto-Alamo MJ,	anna.portela@uab.es	11
Pueyo C.	bb1pucuc@uco.es	11
R		
Ramírez J.		21
S		
Sierra LM.	lmsierra@uniovi.es	24, 25, 28
Silva A,		13
Soriano C.	carolina.soriano@uab.es	31
Sousa A,		13
Stoyanova E.	eli_stoqnova@mail.bg	19
T		
Télez M.	ggbtesem@lg.ehu.es	21
U		
Umbuzeiro G.	gisela@cetesbnet.sp.gov.br	7
Uriol E.		24
V		
Velázquez A.	antonia.velazaquez@uab.es	27
Verschaeve L.		13
X		
Xamena N.	noel.xamena@uab.es	23