



Evaluación del riesgo del consumo de maní infectado con *Thecaphora frezii*. Parte II.

Informe Final (7 de octubre 2016):

Objetivos:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Parte I, y a solicitud de La Fundación Maní Argentino, en esta parte se propuso continuar el proyecto a través de dos líneas de investigación:

A) CULTIVO DE MANÍ (*ARACHIS HYPOGAEA L.*): ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INFECCIÓN POR *THECAPHORA FREZII* PARA EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DEL CARBÓN.

OBJETIVO GENERAL:

Aumentar la competitividad del maní argentino y minimizar las pérdidas económicas causadas por el carbón, generado por *Thecaphora frezii*, mediante el diseño de nuevas estrategias de prevención de la enfermedad, desarrolladas a partir del conocimiento de los mecanismos intervinientes en el proceso de infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar y analizar el perfil de compuestos liberados al suelo por el “clavo” de *Arachis hypogaea* L., potencialmente inductores de la germinación de las esporas de *Thecaphora frezii*.
- Evaluar la germinación de las teliosporas en condiciones de laboratorio, en presencia de los compuestos identificados en el objetivo anterior.
- Determinar si la presencia del hongo *T. frezii* en la tierra afecta la liberación de compuestos desde el “clavo” al suelo, y sus posibles efectos sobre el desarrollo del hongo.

B) EFECTOS TÓXICOS DE METABOLITOS DE *THECAPHORA FREZII*.

Teniendo en cuenta la solicitud presentada por la Fundación Maní Argentino y los resultados de la primera etapa, se realizarán bioensayos tendientes a obtener datos que permitan profundizar el conocimiento sobre los posibles efectos tóxicos de metabolitos de *Thecaphora frezii*.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluación de la toxicidad genética del hongo *Thecaphora frezii*, en cultivos de células procariotas y eucariotas, *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la mutagenicidad de los extractos de esporas de *T. frezii* en cultivos de bacterias.
- Estudiar el daño cromosómico inducido por los extractos de teliosporas en células humanas cultivadas *in vitro*.



- Identificar y analizar el perfil de compuestos del o los extractos que presenten potencial genotoxicidad.
- Determinar la capacidad genotóxica de los metabolitos puros presentes en mayor concentración en los extractos que muestren acción tóxica dirigida al ADN.

ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA:

LÍNEA A

a) Modelo experimental

Las plantas de maní (*Arachis hypogaea L*): Se obtuvieron mediante la siembra de semillas sanas de híbridos susceptibles e inmunes en macetas de 40 cm de diámetro, conteniendo tierra esterilizada en autoclave a 121 °C durante 40 minutos. Los cultivos se desarrollaron bajo condiciones hídricas y de temperatura controladas, en un invernadero con ciclos de luz/oscuridad de 14/10 h a 22 °C.

Cuando las plantas de maní se encontraron en el estadio de “clavo”, y los frutos penetrados en el suelo, aproximadamente entre los 50 a 60 días después de la emergencia, se cosecharon los frutos y se tomaron todas las muestras de tierra el mismo día.

	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4
TIERRA	+	+	+	+
TELIOSPORAS	-	+	-	+
SEMILLAS DE MANÍ	-	-	+	+

Lote 1: Se tomaron muestras de tierra de los primeros 5 cm de profundidad a partir de macetas que no fueron contaminadas con teliosporas, ni sembradas. Luego, se obtuvieron los extractos de dichas muestras.

Lote 2: Las macetas fueron contaminadas con las esporas de *Thecaphora frezii*, esparciendo las mismas mediante espolvoreo sobre la tierra, con posterior homegeneización hasta 5 cm de profundidad. Se tomaron muestras de la tierra contaminada y se realizaron extractos de las mismas.

Lote 3: Las macetas fueron sembradas con las semillas de maní y cuando las plantas alcanzaron el estadio de clavo, los frutos fueron cosechados y se obtuvieron extractos de los mismos, llamados en adelante “*extractos de clavo*”. Además, se tomaron muestras de tierra en el lugar donde el clavo se enterró, y se obtuvieron extractos de las mismas.

Lote 4: Las macetas se contaminaron con teliosporas, de la misma forma que las macetas del lote 2, y luego, se sembraron con las semillas de maní para simular el desarrollo de la planta en un suelo contaminado. Después de que los frutos, en el estadio de “clavo” se enterraron en el suelo, se tomaron muestras de la tierra alrededor del clavo, y se realizaron extractos de las mismas.

Obtención y preparación de la muestra de clavo: Los clavos obtenidos del lote 3 se recolectaron, y luego, triturarán con un homogenizador a cuchillas y en mortero?.



Obtención de los extractos:

Los extractos se realizaron a partir de muestras de 1,5 g de clavos de maní (menores a 1 cm de largo) de las plantas susceptibles e inmunes que estuvieron en contacto o no (control) con las teliosporas, obteniéndose 4 condiciones clavos de plantas susceptibles (SC), de plantas susceptibles y expuestas a las teliosporas (ST), plantas inmunes (IC), y plantas inmunes expuestas a las teliosporas (IT)

A cada muestra se le agregaron 6 mL de Hexano, se homogeneizaron en vortex y colocaron en un agitador de bandeja durante 2 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min, y se obtuvo el sobrenadante (extracto de hexano), que posteriormente fueron evaporados con N₂(g) y guardados a -80 °C hasta su utilización. Los extractos secos, "pellets", de las muestras fueron resuspendidos sucesivamente en Acetato de etilo, Metanol y Metanol ácido (0,2 % de ácido fórmico), repitiendo el procedimiento anterior. En total se obtuvieron 16 muestras, correspondientes a las dos variedades de plantas (Inmunes y susceptibles), dos condiciones de cultivo de las plantas (expuestas o no las teliosporas) y 4 tipos de extractos (Hexano, Hex; Acetato de etilo, AE; Metanol, MOH; y Metanol ácido, MOH+).

Tabla 1 Extractos obtenidos de las plantas (exudados) que estuvieron en contacto o no (control) con las teliosporas

Solvente				
Hexano	SC	ST	IC	IT
Ac. de etilo	SC	ST	IC	IT
Metanol	SC	ST	IC	IT
Metanol Ácido	SC	ST	IC	IT

Plantas susceptibles (SC), Plantas susceptibles y expuestas a las teliosporas (ST), Plantas inmunes (IC), Plantas inmunes expuestas a las teliosporas (IT)

Los extractos de clavo se obtendrán mediante una secuencia de extracciones seriadas con solventes de distinta polaridad (éter de petróleo o hexano; acetato de etilo o diclorometano, y metanol o metanol acidificado). Esta secuencia de extracción permitirá hacer una primera separación entre compuestos liposolubles, de polaridad intermedia y compuestos más polares (extraíbles en metanol).

b) Análisis de los extractos:

Las muestras MOH y MOH+ fueron resuspendidas en metanol grado HPLC con sonicación. El volumen final de disolución fue de 1 mL. Y fueron analizados por HPLC-MS. Donde se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

Solvente A: ácido fórmico 0.5%

Solvente B: acetonitrilo con ácido fórmico 0,5%

Flujo: 0,35 mL/min

Columna: C18; Phenomenex, 100 × 2,10 mm; tamaño de partícula 2,6 micras.

Temperatura: 30°C



Volumen de inyección: 10 uL

Tabla 2 Composición del gradiente de solventes

TIEMPO (min)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)
0	95	5
21	5	95
24	5	95
25	95	5
32	95	5

Solvente A: ácido fórmico 0.5%. Solvente B: acetonitrilo con ácido fórmico 0,5%

Las muestras AE fueron resuspendidas en 150 µL de AE + 10 µL BSTFA (incubado 35 min en oscuridad a T ambiente=20°C)+ 40 µL MeOH (para agotar el reactivo BSTFA que no haya reaccionado), incubado 5 min y luego guardado a -20 °C hasta su medición y análisis por GC. Las muestras extraídas de hexano no se analizaron debido a que la extracción en esas muestras fue escasa, con poco sedimento, y no tuvo impacto sobre la germinación como se verá mas adelante)

Los extractos que se utilizaron para evaluar la germinación de las teliosporas se re-disolvieron en 200 ul de DMSO, y en los cultivos se usó 1 % de cada extracto.

c) Efectos de los extractos o componentes específicos de los mismos sobre la germinación de las teliosporas:

Se analizarán los efectos de los extractos sobre la germinación de las teliosporas, para poder determinar cuáles son los metabolitos responsables de los potenciales efectos inducidos por los mismos que presenten actividad.

Cultivo de Teliosporas

Se realizó el cultivo en medio de Murashige y Skoog líquido y sólido por un período de 30 a 40 días, observando la germinación al microscopio óptico (100X) y determinando la proporción de esporas germinadas.

Se probaron 5 condiciones:

1. Se sembró una suspensión de Teliosporas previamente desinfectadas con 1.5 % de hipoclorito de Sodio, y tres enjuagues con agua destilada estéril. Se sembraron en los medios de Murashige y Skoog aproximadamente 10.000 teliosporas en placas de 24 wells placa. Aquellas placas que contenían medio solido fueron incubadas tanto en aerobiosis como en microaerofilia a 25 °C y en oscuridad.
2. A la condición anterior se le agregó dos extractos de maní: maní triturado y maní sin triturar (solo al medio solido).
3. Se agregaron al cultivo anterior tres fitohormonas en forma individual en 6 concentraciones[#]: Ácido salicílico (SA), Giberelinas (GA) y Ácido absicico (ABA).



4. SE prepararon los medios de cultivo con agua de lluvia. Se utilizaron las tres fitohormonas anteriores en forma individual y combinada con y sin extracto de maní triturado y sin triturar.
5. Se utilizaron placas de mayor tamaño (Petri de 35 mm) para la siembra lo que permitió una distribución más homogénea de las teliosporas, pudiendo analizar mejor el crecimiento de las mismas. El cultivo se realizó en las mismas condiciones de 4. pero adicionando 5 fitohormonas en forma individual a 2 concentraciones diferentes* : SA, GA, ABA, Acido jasmonico (JA), Metil jasmonico (MeJ) y Acido Indol acético (IAA) y los 16 extractos de clavos descritos en Materiales y Métodos: HEX, AE, MOH y MOH+ tanto de las variedades inmunes y susceptibles de maní expuestas y no expuestas a *Thecaphora*.

#: **ABA:** 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 10 μ M, 1 nM, 0,1 nM
GA: 50 μ M, 5 μ M, 0,5 μ M, 50 nM, 5nM, 0,5 nm
SA: 500 μ M, 50 μ M, 5 μ M, 0,5 μ M, 50nM, 5 nm

*: **ABA:** 79 μ M, 7,9 μ M
GA: 57 μ M, 5,7 μ M
SA: 150 μ M, 15 μ M
JA: 238 μ M, 23,8 μ M
MeJ: 280 μ M , 28 μ M
IAA: 57 μ M, 5,7 μ M

LÍNEA B

a) Estudio citogenético para detectar daño cromosómico: Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la toxicidad de un compuesto o de una mezcla de sustancias sobre un tipo celular específico, es necesario exponer las células a dosis del compuesto, o de la mezcla de sustancias, que no induzcan la muerte celular (citotoxicidad) en forma aguda. En otras palabras, los efectos tóxicos deben ser evaluados en células viables, es decir que es necesario tener al menos 70-80% de células vivas, en las que se puedan detectar los efectos tóxicos primarios. Esta consideración general, también es válida cuando se trata de ensayos para evaluar la toxicidad genética de un compuesto o mezcla de sustancias, como es el caso de los extractos de teliosporas de *Thecaphora frezii*.

Se estudiaron los efectos citotóxicos de los extractos de teliosporas mediante la técnica de MTT, según el diseño experimenta que se muestra e la Figura 1



Citotoxicidad de los extractos de teliosporas

- Líneas celulares de origen:
 - Hepático (HepG2), carcinoma hepatocelular humano.
 - Intestinal (Caco-2), adenocarcinoma colorrectal humano.

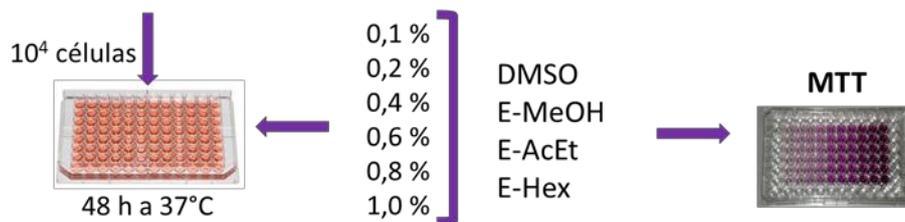


Fig. 1 Esquema de prueba de citotoxicidad de los extractos

b) Ensayo de micronúcleos (MN):

Los MN son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, que se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular. Reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, mala segregación de los cromosomas y por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN (Fig. 2).

Evaluación de genotoxicidad en células eucariotas: Ensayo de micronúcleos (MN).

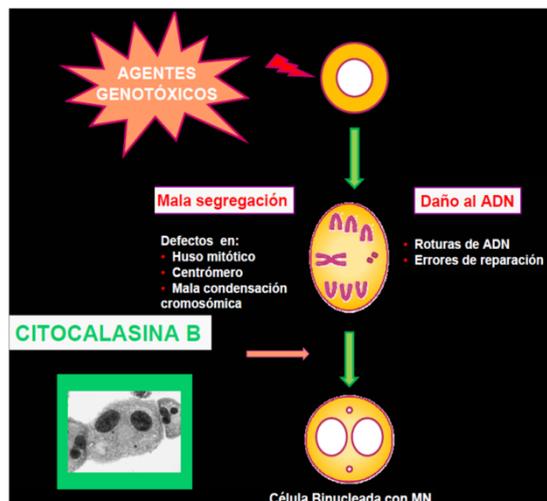


Fig. 2 Esquema del ensayo de micronúcleos

Concretamente, el ensayo se realizó según el procedimiento descrito por Theumer *et al.* (2010). Brevemente, las células se cultivaron durante 24 h en presencia o ausencia de los extractos. y luego los medios de cultivo fueron reemplazados por medio fresco conteniendo citocalasina B (3 mg/mL) para inhibir la citocinesis. Posteriormente, las células se fijaron y se



tiñeron con el colorante Hoescht, para luego contar 500 células binucleadas en un microscopio de fluorescencia y determinar la frecuencia de aparición de los MN.

RESULTADOS:

LÍNEA A

a) ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

EXTRACTOS METANÓLICOS POR HPLC-MS

Los extractos MOH+ de las muestras SC, ST, IC e IT fueron analizados por HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (MS). Se utilizaron modos de ionización negativo y positivo para abarcar la mayor cantidad de compuestos posibles (aunque a veces un mismo compuesto muestra ambos tipos de ionización).

Se comenzó el análisis usando el modo de ionización negativo $M - H \rightarrow (M-1)^-$

Cromatogramas de 4 muestras extraídas con metanol ácido. Modo negativo.
SC: susceptible control; ST: susceptible teliospora; IC: inmune control; IT: inmune teliospora

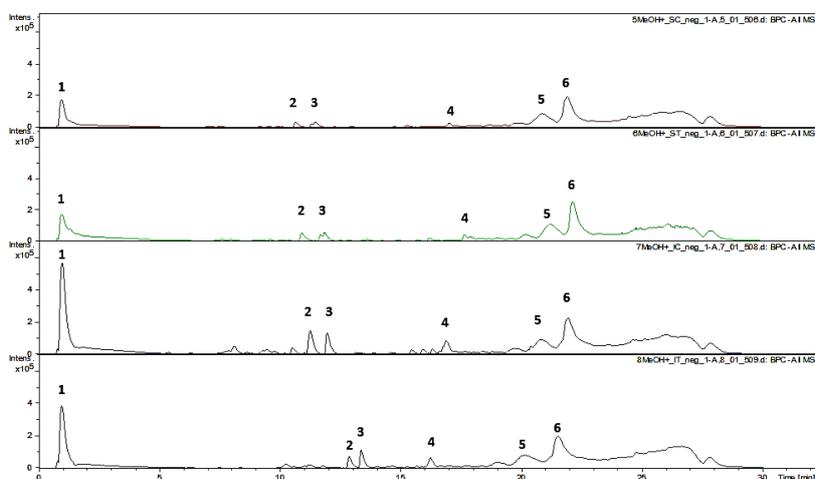


Fig. 3 Cromatograma utilizando metanol ácido modo negativo

Se identificaron por masa exacta 6 compuestos. El perfil de compuestos es similar (el mismo perfil de compuestos en las cuatro muestras), pero las cantidades relativas son mayores en las muestras inmunes con relación a los controles (en especial en la inmune control, seguida de la inmune teliospora).

El pico 1 correspondería a ácido quínico. El resto de los picos no pudo ser identificado por ausencia de patrones de los posibles compuestos. Para su identificación correspondería hacer



una separación por HPLC preparativo y un estudio espectroscópico completo de cada compuesto.

El análisis se completó realizando HPLC acoplado a MS pero en MODO POSITIVO.

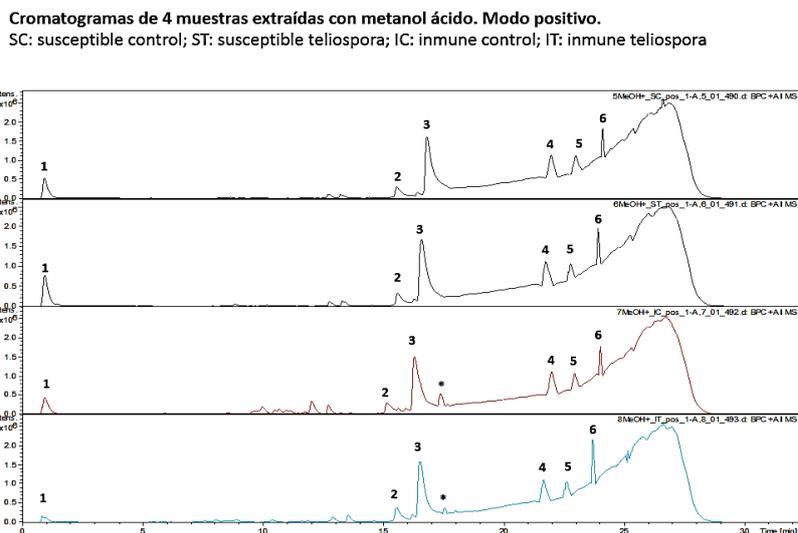


Fig. 4 Cromatograma utilizando metanol ácido modo positivo

Al igual que en el modo negativo, se observa presencia de seis compuestos principales, aunque en este caso las diferencias cuantitativas no son tan marcadas para las distintas muestras.

Es interesante ver la aparición de un pequeño pico (señalado con * luego del pico 3) en las muestras inmunes. El compuesto no pudo ser identificado, pero es evidente su presencia en las muestras inmunes.

El pico 1 muestra menor cantidad relativa en las variedades inmunes (en especial inmune con teliospora) con relación a los controles.

El pico 1 se trata del mismo compuesto en las cuatro muestras analizadas, pero no es ácido químico (el espectro de MS en modo positivo no coincide con el del ácido químico). Por lo tanto el pico 1 corresponde a un compuesto no identificado. Para la correcta identificación de todos los picos observados en modo positivo correspondería hacer una separación por HPLC preparativo y un estudio espectroscópico completo de cada compuesto.



Los extractos de metanol presentan picos e iones similares a los extractos de metanol ácido.
MeOH

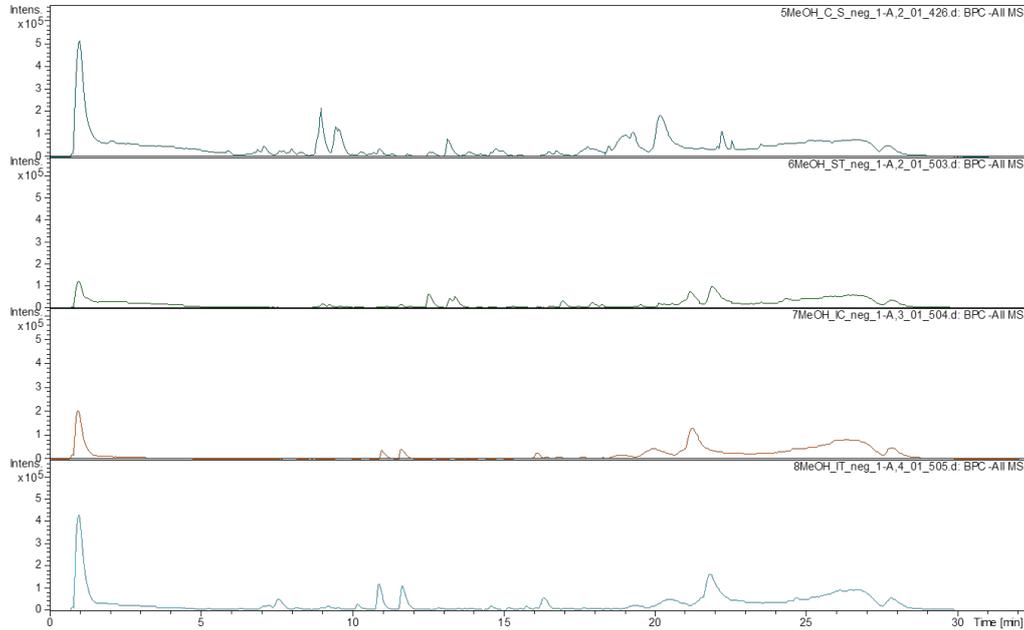


Fig 5 Cromatogramas de 4 muestras extraídas con metanol. Modo negativo. SC: susceptible control; ST: susceptible teliospora; IC: inmune control; IT: inmune teliospora

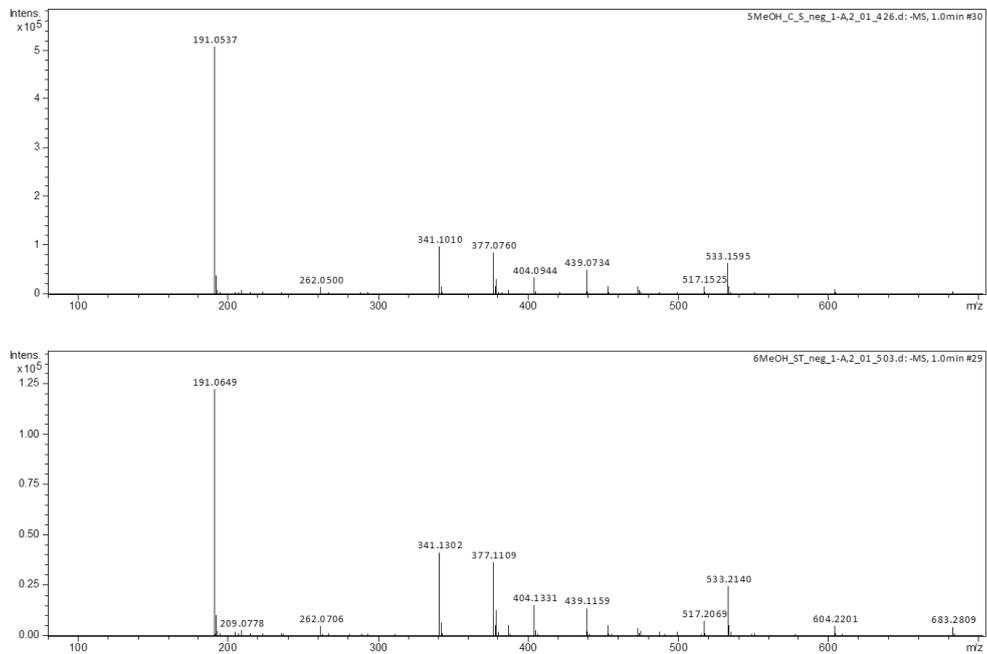


Fig 6 Pico 1. Espectro de MS de susceptible control y susceptible teliospora

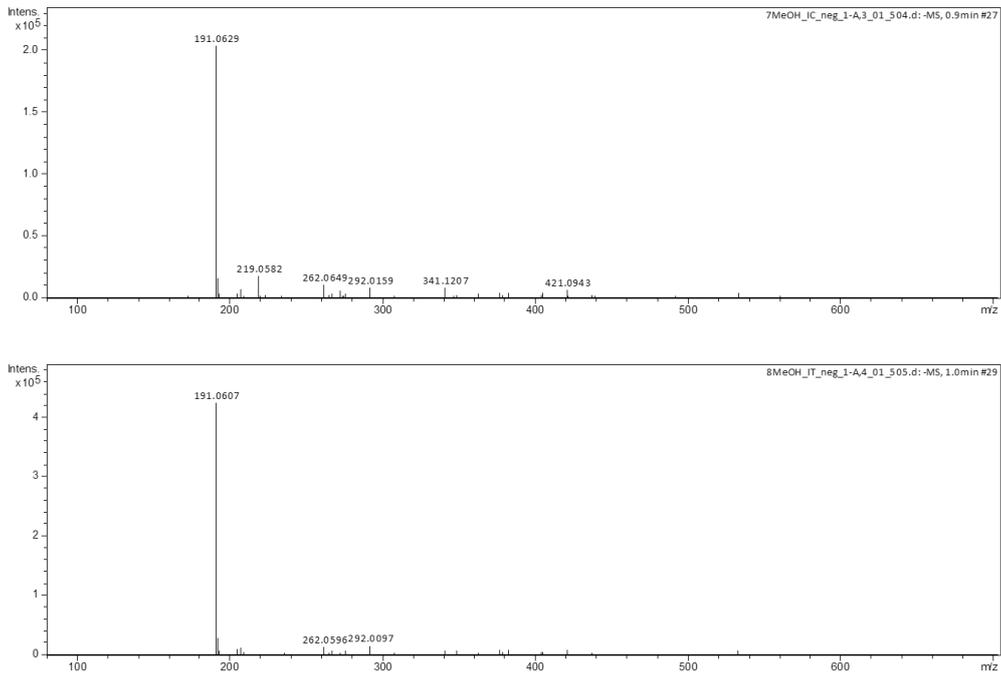


Fig 7 Pico 1. Espectro de MS de Inmune control e Inmune teliospora

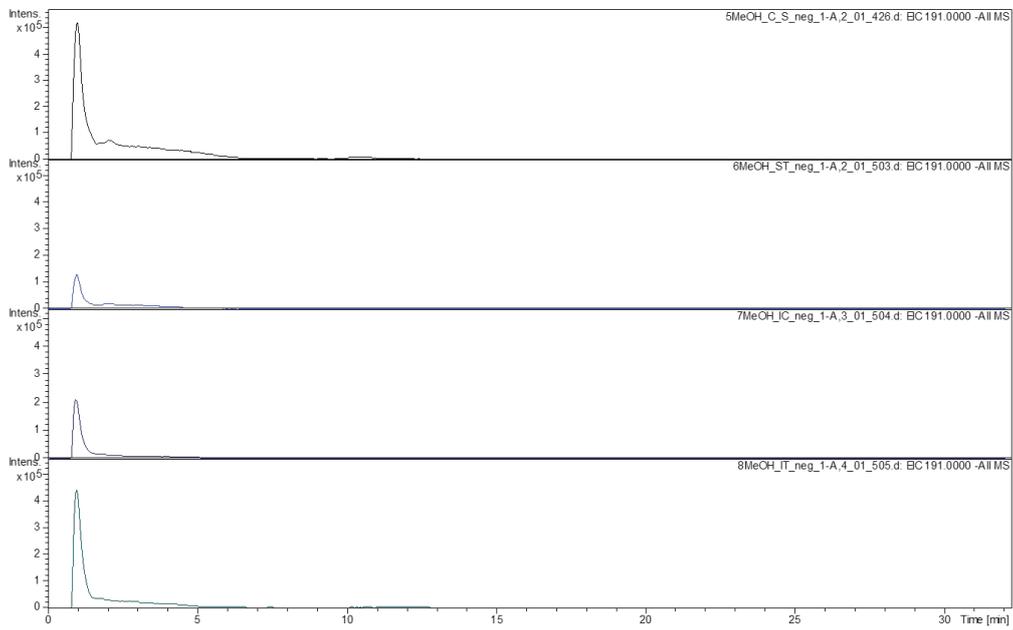


Fig 8 Pico 1. m/z 191,95, ácido quinico

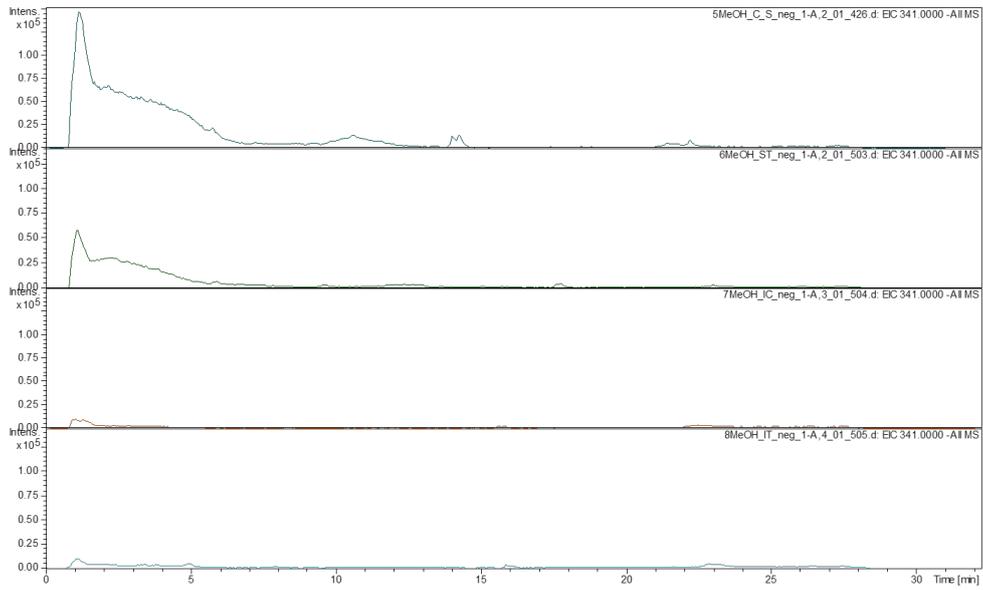


Fig 9 Pico 1. m/z 341,11

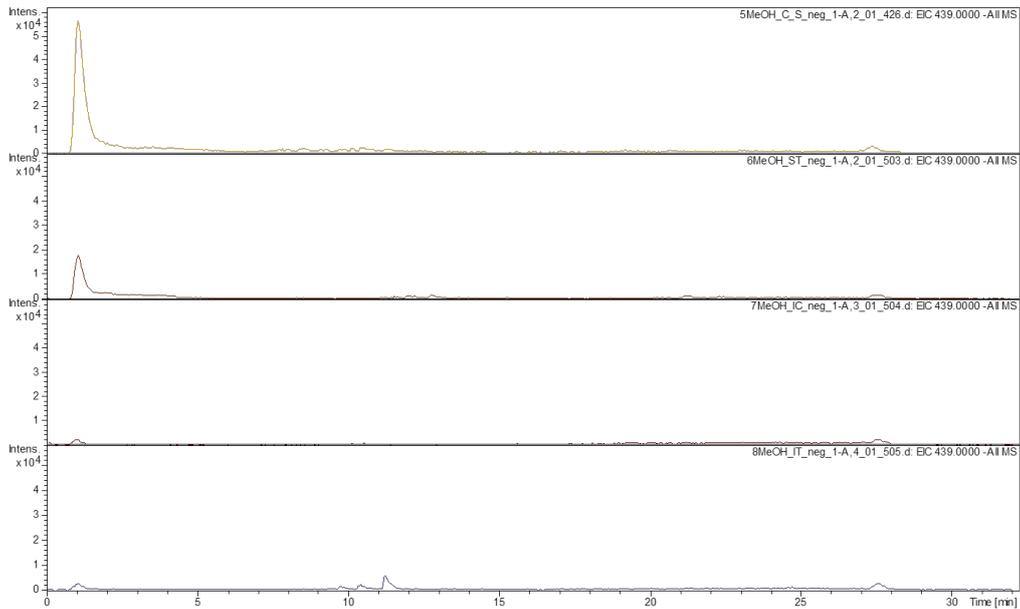


Fig 10 Pico 1. m/z 439,08

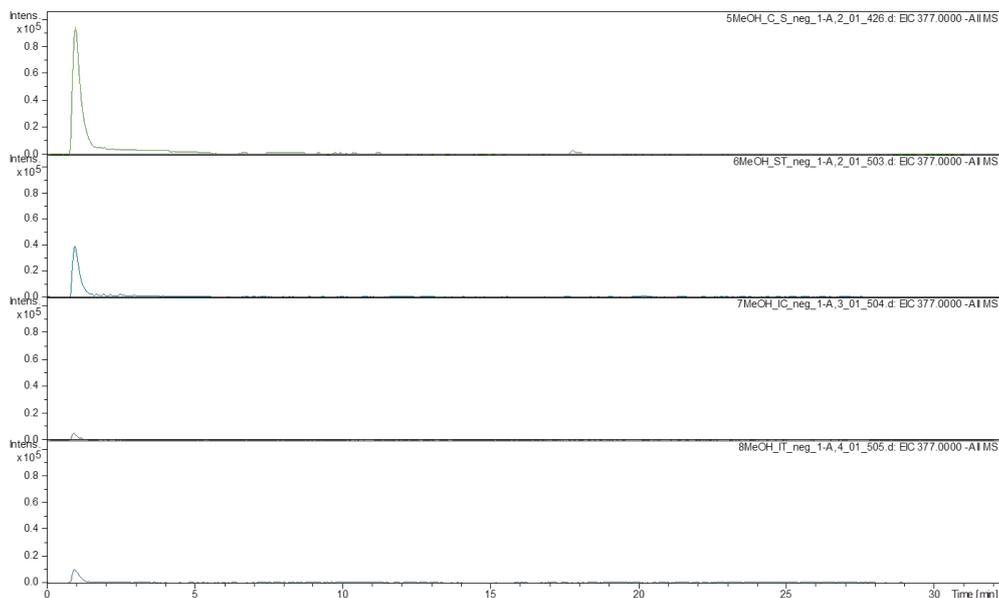


Fig 11 Pico 1. m/z 377,07

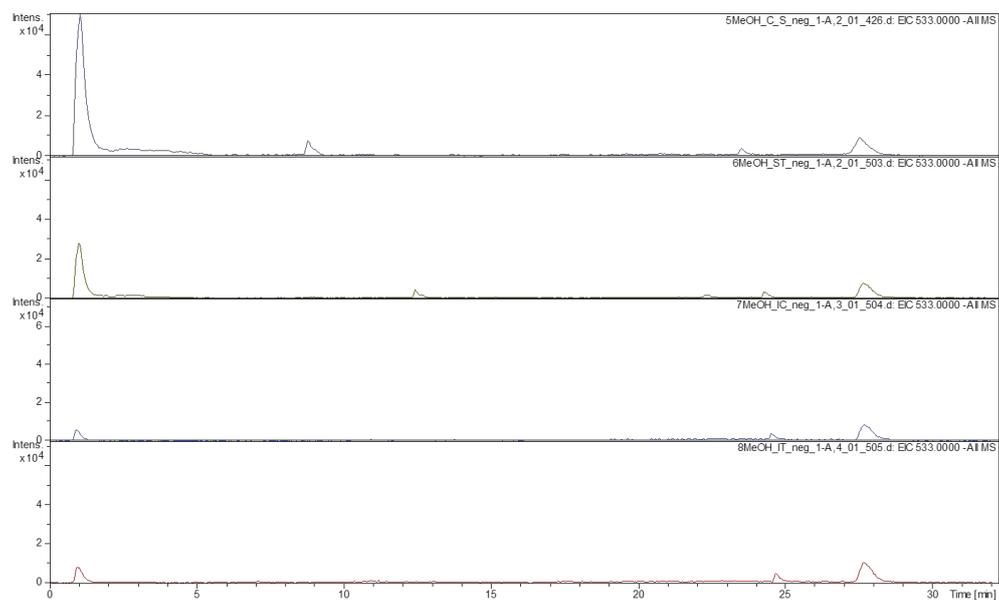


Fig 12 Pico 1. m/z 533,17

Del análisis de los cromatogramas anteriores podemos deducir que en los extractos metanólicos las 4 muestras muestran perfiles similares, con 6 picos mayoritarios cuando se analiza la corriente iónica total. Con respecto al pico 1: el ion 191,05 está presente en todas las muestras, pero se encuentra aumentado en las muestras CS (5) y TI (8). En las muestras inmunes desaparecen los iones 341,1; 439,1; 377,1; 533,1.



ANÁLISIS EXTRACTOS ACETATO DE ETILO POR GC-MS POST-DERIVATIZACIÓN CON TMS
(Tetrametilsilano).

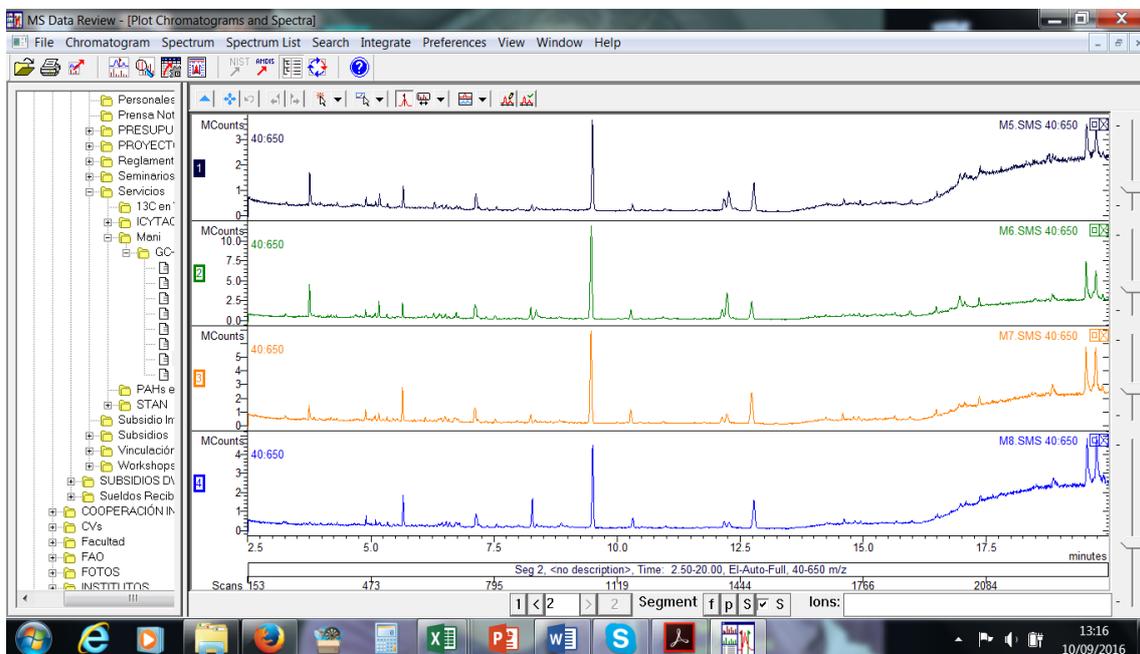


Fig 13. Cromatogramas extractos Acetato de Etilo M5/6/7/8 superpuestos

Del análisis de los extractos superpuestos se puede concluir que el perfil entre las distintas muestras es similar (muestra los mismos compuestos pero con distintas cantidades según la muestra).

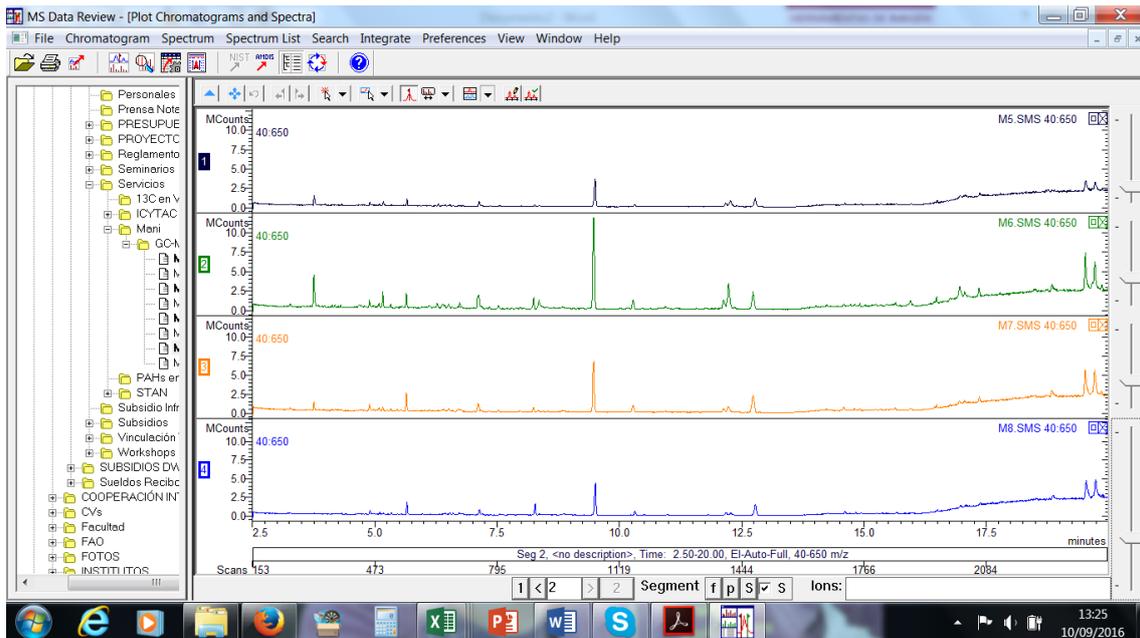


Fig.14 Cromatogramas extractos Acetato de Etilo M5/6/7/8 en la misma escala (Y)



CONCLUSIONES:

Los extractos realizados con Acetato de Etilo muestran compuestos del tipo ácidos grasos y fitosteroles (campesterol, stigmasterol, etc.) en general, aunque algunas estructuras son particulares.

- La muestra ST tiene en general la mayor abundancia en la gran mayoría de los compuestos detectados (aún en aquellos no identificados).
- La muestra IC tiene en muchos casos la menor abundancia para la gran mayoría de los compuestos detectados.
- La muestra IT también tiene la menor abundancia para algunos de los compuestos detectados, aunque en una proporción un tanto menor a M7.
- El compuesto más abundante que se detectó es el ácido oleico (C18:1), característico de maní.

b) EFECTOS DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS TELIOSPORAS:

En los cultivos realizados con las condiciones 1, 2 y 3 descritas en Materiales y Métodos no hubo germinación de las teliosporas hasta los 40 días de observación (Fig 15).

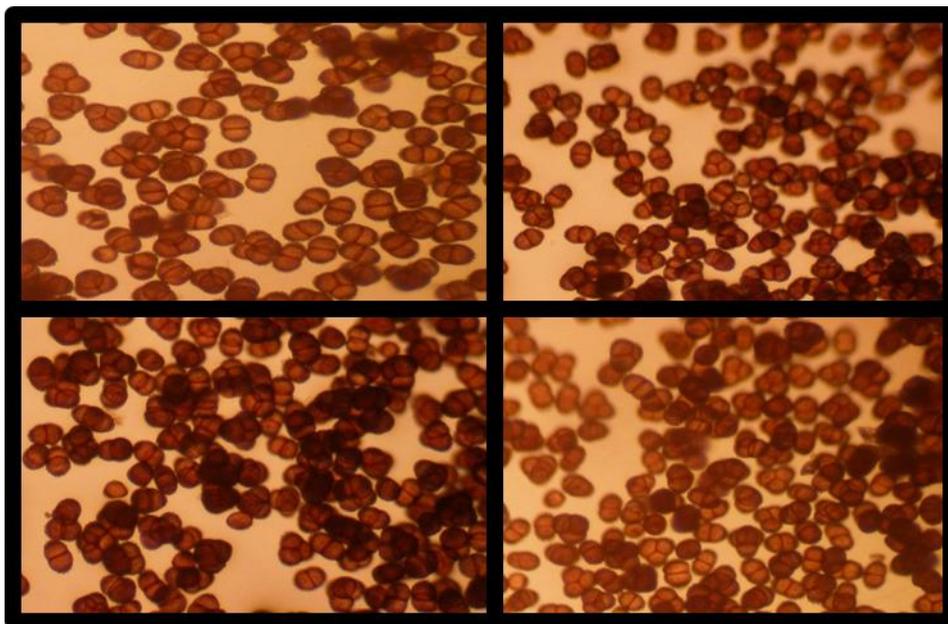


Fig. 15 Microfotografía de teliosporas de las condiciones 1, 2 y 3 sin germinación detectable.

En los cultivos realizados bajo las condiciones descritas en 4 se observó germinación de las teliosporas a los 7 días de la siembra sin diferencia significativa entre los distintos tratamientos (Fig 16). Bajo las condiciones descritas en 5 se observó una mayor germinación a partir del día 7 y posterior filamentización solamente en las placas con el agregado del extracto de clavo AE proveniente tanto de plantas inmunes como sensibles (Fig 17).

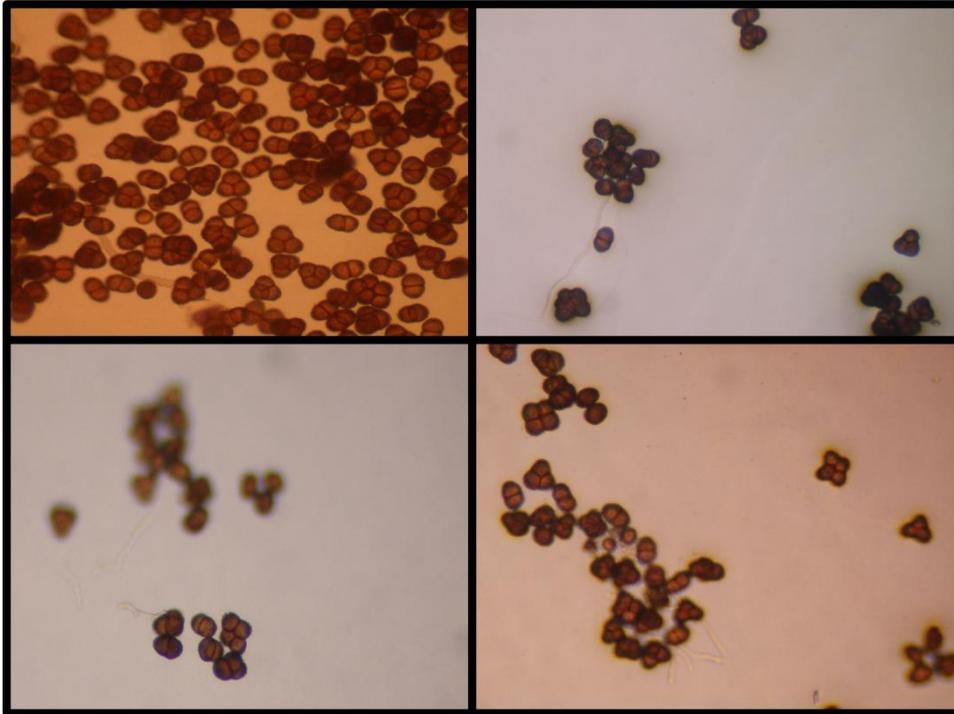


Fig 16 Microfotografía de teliosporas de las condición 4 donde se puede observar escasa germinación de las mismas.

La colonia desarrollada bajo estas últimas condiciones fue tipificada por PCR como *Thecaphora frezii* en el Instituto de Patología Vegetal IPAVE. Brevemente: Se realizó una PCR usando los cebadores TF2-F/TF2-R, específicos para *Thecaphora frezii*. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa 1,5% y posterior tinción con GelRed™. Se observó la presencia de la banda esperada (190 pb) en la muestra y el Control Positivo. La prueba se realizó por duplicado para confirmar el resultado.

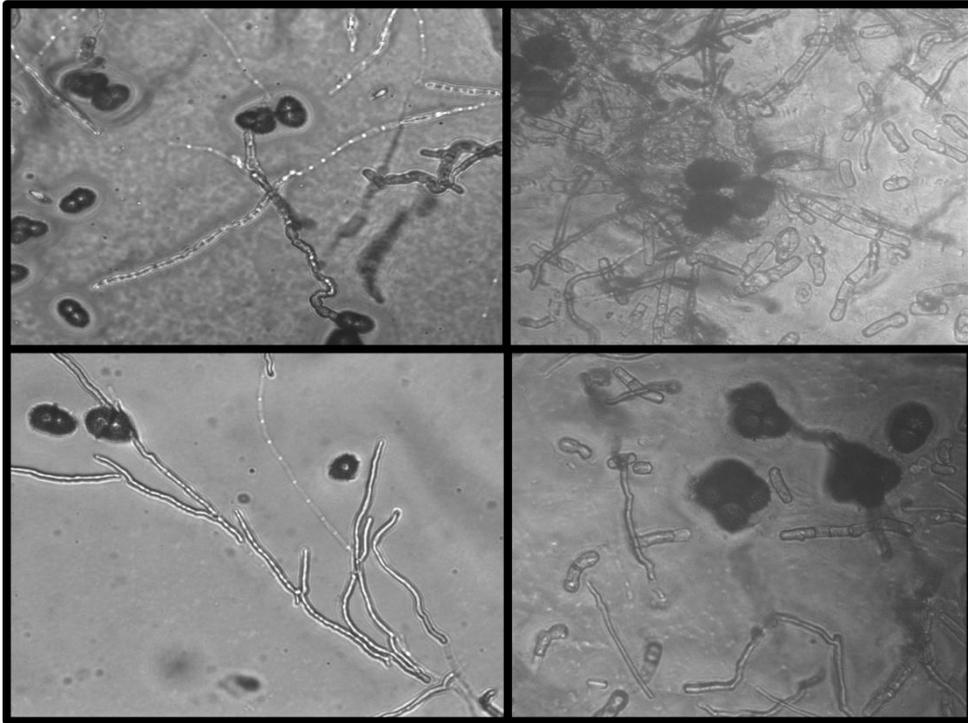


Fig. 17 Microfotografía de las teliosporas de la condición 5 con desarrollo de filantización de *T. frezii*.

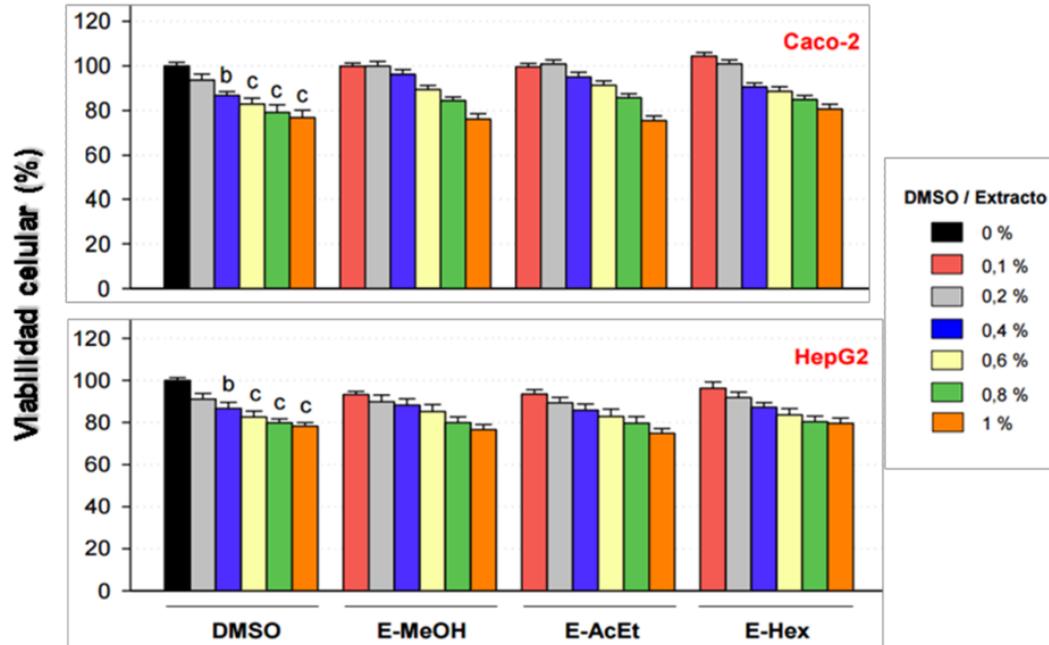
LÍNEA B

Se realizaron estudios de citotoxicidad de los extractos de teliosporas sobre dos líneas celulares humanas; una de origen hepático (HepG2), y una línea derivada de epitelio de colon (Caco-2). Ambas líneas son herramientas muy utilizadas en toxicología, debido a que permiten evaluar los efectos de los tóxicos sobre los blancos de acción principales de las toxinas que ingresan por vía oral.

En las condiciones experimentales utilizadas, los extractos de teliosporas no fueron citotóxicos en el rango 0,1-1%; tanto para las células Caco-2 como para las células HepG2 (Fig. 18). Esto se concluye tras comparar la viabilidad celular para cada nivel de exposición de los extractos, con respecto al mismo nivel de exposición del vehículo (DMSO). En función de estos resultados, se evaluaron los efectos genotóxicos de los extractos de teliosporas en el rango 0,1-1%, ya que la viabilidad de las células Caco-2 y HepG2 no fue afectada en estas condiciones.



Citotoxicidad de los extractos de teliosporas



Los gráficos muestran el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar.
Letras indican diferencias entre los tratamientos y el control correspondiente (^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$).

Fig. 18 Citotoxicidad extractos de teliosporas

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de citotoxicidad, se estudiaron las frecuencias de micronúcleos inducidas por los extractos de teliosporas en las células Caco-2 y HepG2.

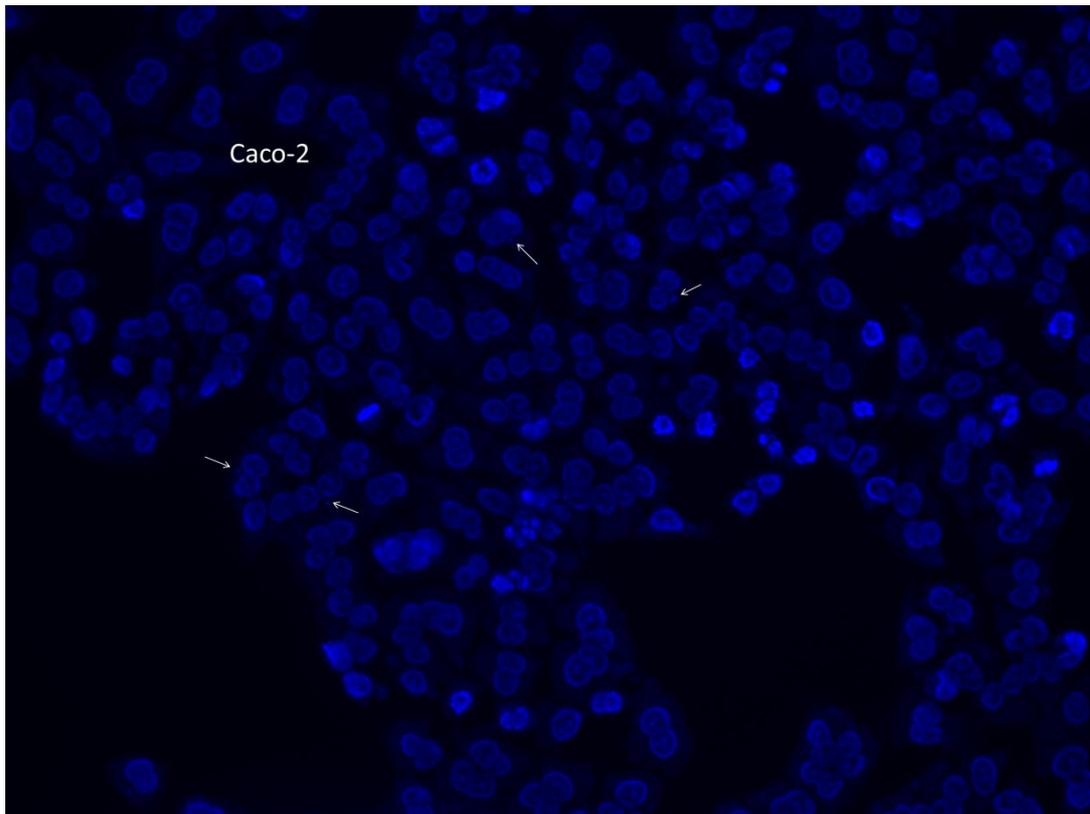


Fig 19. Imagen microscópica de células Caco-2 binucleadas con micronúcleos (flechas).

Los resultados del recuento diferencial de células binucleadas con y sin micronúcleos se muestran en la Figura 20. En rojo se indican los porcentajes de micronúcleos registrados en cada tratamiento.

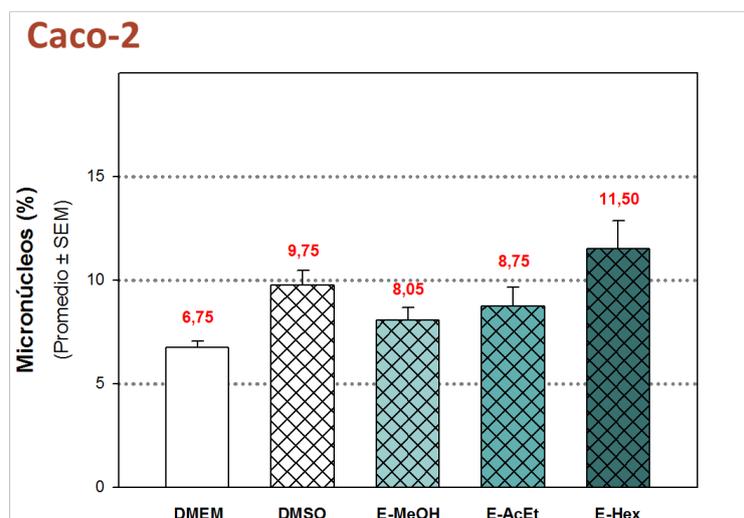


Fig. 20 Frecuencias de micronúcleos inducidas en células Caco-2 por los extractos de teliosporas de *T. frezii*.



La Figura 21 muestra una imagen representativa de las células HepG2 en las que se ha bloqueado la citocinesis mediante la incorporación de citocalasina B.

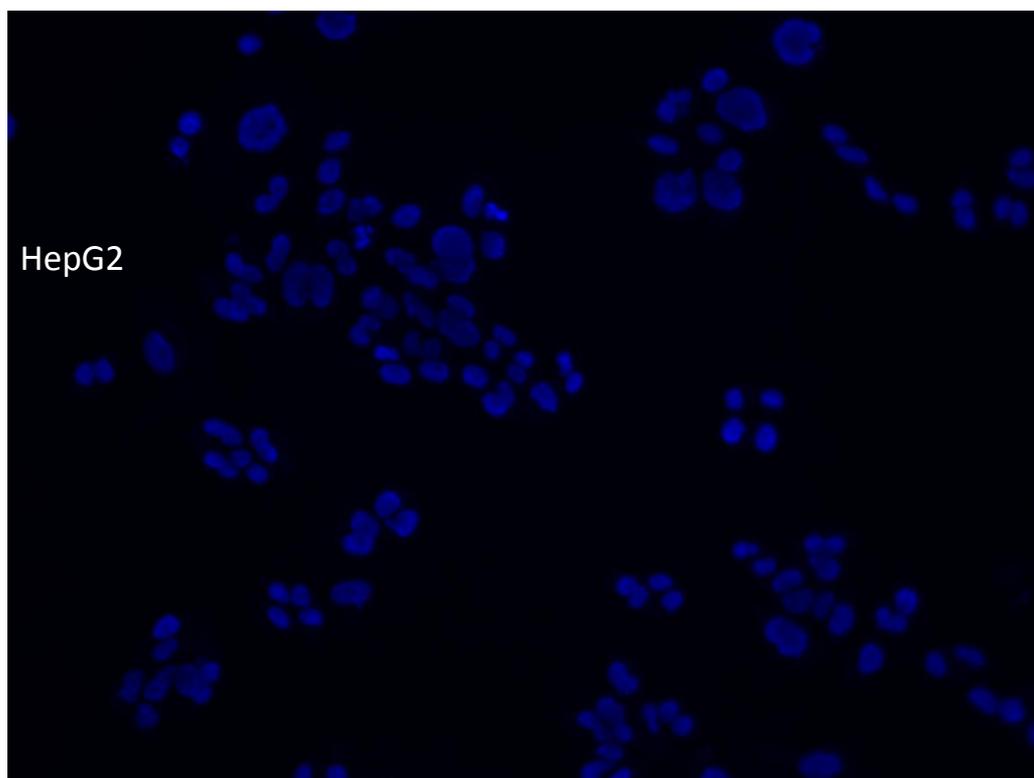


Fig. 21 Imagen microscópica de células HepG2 binucleadas.

Los resultados del recuento diferencial de células binucleadas con y sin micronúcleos se muestran en la Figura 22, donde los números en rojo indican los porcentajes de micronúcleos registrados en cada tratamiento.

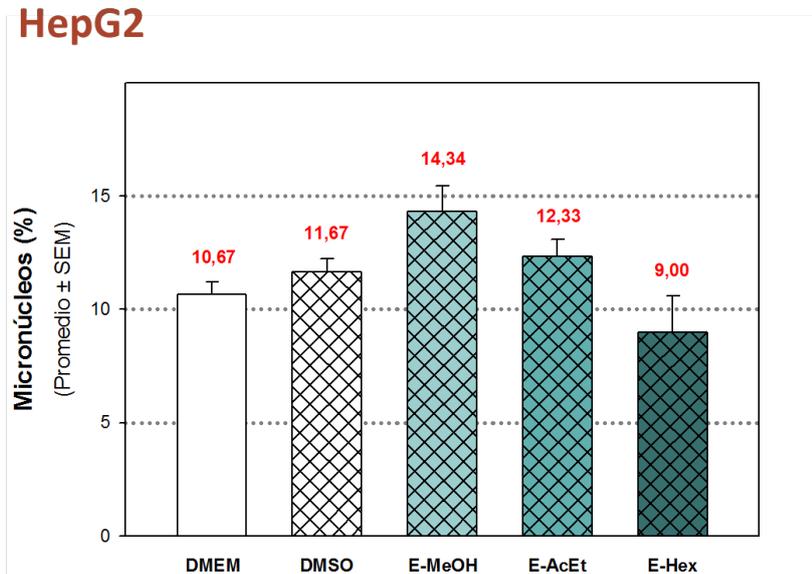


Fig. 22 Frecuencias de micronúcleos inducidas en células HepG2 por los extractos de teliosporas de *T. frezii*.

En la Figura 23 se muestran imágenes de células Caco-2 y HepG2 binucleadas, y en las que se observan distintas morfologías de micronúcleos (MNs). Para hacer uso del equipamiento con la mayor sensibilidad disponible, las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica con una cámara monocromática (panel de la izquierda), las cuales fueron coloreadas mediante el uso del software, con un color similar al esperado para el colorante Hoescht (panel de la derecha).

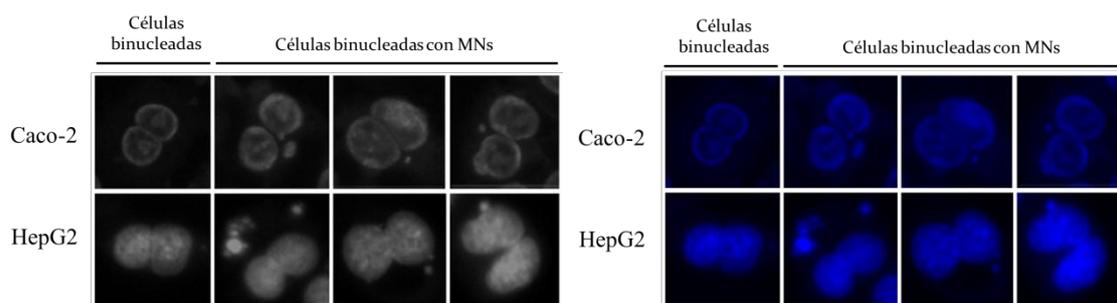


Fig. 23 Células Caco-2 y HpG2 binucleadas en las que se observan distintas morfologías de micronúcleos.



Conclusiones y consideraciones generales

Línea A

Los resultados de los cultivos de teliosporas sugieren la existencia de componentes inductores de la germinación en los clavos, los cuales se encontrarían tanto en genotipos susceptibles como inmunes a la infección por *Thecaphora frezii*.

Si bien es necesario profundizar el perfil cromatográfico de los extractos para identificar con mayor precisión sus componentes (separación por HPLC preparativo y un estudio espectroscópico completo de cada compuesto), la principal diferencia entre ellos corresponde a las cantidades relativas de los mismos, siendo mayores en las muestras inmunes con relación a los controles. En este sentido, será interesante tener en cuenta para un posterior estudio la aparición del pico adyacente al identificado como 3 (Fig 4) solamente en los extractos metanólicos de los clavos provenientes de las variedades inmunes de *T. frezii*

De todas condiciones ensayadas para evaluar la influencia de las principales variables que podrían impactar sobre la germinación y filamentización *in vitro* de las teliosporas, es interesante destacar que la presencia de agua de lluvia en la preparación de los medios de cultivo, logró estimular la germinación de las mismas (Fig 16). Como así también los extractos de Acetato de Etilo fueron los únicos que activaron en forma significativa la filamentización de las teliosporas a los 7 días de incubación, como se muestra en las microfotografías en la Fig 17. Estos extractos muestran compuestos del tipo ácidos grasos y fitosteroles (campesterol, stigmasterol, etc.) en general, presentando algunas estructuras particulares. Estas estructuras deberían ser identificadas para estudiar su acción en forma individual.

Línea B

Los resultados de los ensayos de micronúcleos refuerzan la hipótesis de la ausencia de genotoxicidad de los extractos de teliosporas de *T. frezii*, lo cual se deduce a partir de los porcentajes de micronúcleos observados en células de origen intestinal (Caco-2), como también en células hepáticas (HepG2) especializadas en el metabolismo de xenobióticos.

Cabe mencionar que se realizará un informe anexo integrador de los hallazgos de los estudios de evaluación de la toxicidad de las teliosporas de *T. frezii*, contemplando los resultados de las partes I y II del proyecto.

Integrantes equipo de investigación:

Héctor Rubinstein
Martín Theumer
Daniel Wunderlin
Verónica Mary
Pilar Velez

Héctor R. Rubinstein