

Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas

Ricardo Restrepo¹, Diana Reyes¹, Marlyn Catalina Ortiz¹, Fernando A. Rojas Ruiz², Vladimir V. Kouznetsov²✉

Received: 21-09-2012 Accepted: 07-11-2012 Published on line: 26-11-2012

Edited by Alberto Acosta ✉

Chromosomal aberrations in *Allium cepa* onion bulbs induced by 4-aminoquinoline hybrid molecules.

Abstract. The toxicological properties of three hybrid compounds, quinoline-thiazolidinone (FR-72 and FR-121) and acridin-epoxyisoindolindione (FR-154) were studied by applying named compounds to the test of the roots of *Allium cepa* onion bulbs. Molecules FR-72, FR-121 and FR-154 were synthesized *de novo* according to described synthetic protocols. Clean and healthy bulbs of *Allium cepa* ($2n = 16$), previously immersed in distilled water, were dried with paper towels and placed directly into test tubes filled with the test substance. The experiments were carried out at room temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and were kept in darkness. The period of exposure of bulbs was 120 hours; the roots used for the genotoxicity evaluation were on average of 2 to 2.5 cm in length. The evaluation of the effect of the three quinolinic molecules on the growth of onion roots of *Allium cepa* bulbs was achieved using different concentrations of the three growth parameters (EC_{50} , IM, ACs) The evaluated substances performed aneugenic actions, operating at cellular and molecular structure level and preventing the fixing of mitotic spindle fibers, causing the movement of chromosomes in the anaphase or loss of chromosomes, even inducing apoptosis by exceeding the homeostatic capacity of the cell. The preliminary analysis indicated that molecule FR-121 at 10^{-6} M concentration and molecule FR-154 at 10^{-3} M concentration, proved to be potent phytotoxic agents causing various clastogenic and aneugenic aberrations.

Key words: phytotoxic agents, *Allium cepa*, 4-aminoquinolines, chromosomal aberrations.

Resumen. Se estudiaron las propiedades toxicológicas de los tres compuestos híbridos quinolin-tiazolidinona (FR-72 y FR-121), y acridin-epoxyisoindolindiona (FR-154) aplicándolos en el test de las raíces de bulbos de cebolla *Allium cepa*. Las moléculas FR-72, FR-121 y FR-154 fueron sintetizadas *de novo* según protocolos experimentales descritos. Los bulbos de *Allium cepa* ($2n = 16$) limpios y sanos, previamente sumergidos en el agua destilada, se secaron con papel toalla y se colocaron directamente en los tubos de ensayo llenos con la sustancia a evaluar. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y se mantuvieron en oscuridad. El periodo de exposición de los bulbos fue de 120 horas y las raíces que se utilizaron para el montaje de genotoxicidad eran en promedio de 2 a 2.5 cm de longitud. La evaluación del comportamiento de las tres moléculas quinolónicas sobre la inhibición del crecimiento promedio de las raíces de bulbos de cebolla *Allium cepa* se realizó con los tres parámetros de bioactividad (CE_{50} , IM, ACs) en diferentes concentraciones. Las sustancias evaluadas pueden considerarse aneugénicas, ya que actúan a nivel de estructuras celulares y moleculares e impiden la fijación de las fibras del huso acromático, por ende ocasionan el desplazamiento de cromosomas en anafase o pérdidas de cromosomas, llegando incluso a ser inductoras de la apoptosis al sobrepasar la capacidad homeostática de la célula. El análisis preliminar indicó que la molécula FR-121 a concentración 10^{-6} M y la molécula FR-154 a concentración 10^{-3} M resultaron ser potentes agentes fitotóxicos provocando diversas aberraciones clastogénicas y aneugénicas.

Resumo. Foram estudadas as propriedades toxicológicas dos três compostos híbridos, quinolina-tiazolidinona (FR-72 e FR-121) e hidroacridin-epoxyisoindolindiona (FR-154) aplicando-os no teste das raízes de bulbos de cebola *Allium cepa*. As moléculas FR-72, FR-121 e FR-154 foram sintetizadas *de novo* de acordo com os protocolos experimentais já descritos. Os bulbos de *Allium cepa* ($2n = 16$) limpos e sádios, previamente imersos em água destilada, foram secos com papel toalha e colocados diretamente em tubos de ensaio, cheios com a substância de teste. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantiveram-se na escuridão. O período de exposição dos bulbos foi de 120 horas e as raízes usadas para a montagem de genotoxicidade tinham, em média, de 2 a 2,5 cm de comprimento. A avaliação do comportamento das três moléculas quinolónicas sobre a inibição do crescimento médio das raízes de bulbos de cebola *Allium cepa* foi realizada com os três parâmetros de bioatividade (EC_{50} , IM, ACs) em diferentes concentrações. As substâncias avaliadas podem se considerar aneugénicas, já que atuam ao nível de estruturas celulares e moleculares, e impedem o estabelecimento de fibras do fuso acromático, provocando assim o deslocamento dos cromossomos na anáfase ou perda de cromossomos, chegando, inclusive, a serem inductoras da apoptose ao ultrapassar a capacidade homeostática da célula. A análise preliminar indicou que a molécula FR-121 em concentração de 10^{-6} M e a molécula de FR-154 em concentração de 10^{-3} M resultaram ser potentes agentes fitotóxicos provocando várias aberrações clastogénicas e aneugénicas.

1 Facultad de Química Ambiental, Universidad Santo Tomás - USTA, Bucaramanga, Colombia.

2 Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander - UIS, Bucaramanga, Colombia.

Introducción

El núcleo quinolínico está presente en diferentes productos naturales bioactivos, en particular alcaloides, constituyendo una amplia familia de compuestos conocidos por presentar propiedades biológicas sobresalientes como actividades farmacológicas (fármacos) y acciones pesticidas (agroquímicos) (1). De otro lado, los derivados quinolínicos naturales y sintéticos suelen exhibir propiedades citotóxicas que pueden afectar la división celular de algunos organismos vivos (2). Los bioensayos citotóxicos establecen una conexión esencial entre las diferentes ciencias naturales, desde la química orgánica hasta la química ambiental y la ecotoxicología. Debido a su importancia biológica, social y económica, se han desarrollado gran variedad de pruebas toxicológicas con una gran diversidad de organismos (3). Estas pruebas permiten evaluar la biodisponibilidad de contaminantes presentes en muestras compuestas por mezclas complejas, valiéndose de las respuestas a los distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas y moleculares, hasta disfunción endocrina, y modificaciones conductuales y fisiológicas (efectos sobre crecimiento, reproducción) (4). Las pruebas toxicológicas pueden servir también para analizar el grado de citotoxicidad de un compuesto natural o sintetizado con un fin específico (fármaco, nuevo material o agroquímico, *etc.*). Dentro de esta amplia variedad de bioensayos toxicológicos se encuentra el ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L., el cual permite evaluar la inhibición del crecimiento promedio de las raíces, determinando rápida y fácilmente el efecto de las sustancias orgánicas sobre el organismo vivo (5).

Las ciencias naturales han empleado las propiedades estructurales de diferentes maneras durante años. Un aporte importante en su desarrollo fue el trabajo reportado por Lipinski y colaboradores sobre la aplicación de “reglas” para el estudio de descriptores moleculares que ha llegado a ser sobresaliente (6), tanto en el campo de las ciencias medicinales (creación de fármacos) como en el campo de la agroquímica (preparación de agentes pesticidas). La regla de Lipinski (regla de “cinco”) permite efectuar un análisis preliminar rápido de las propiedades físico-químicas y estructurales de

compuestos que, de acuerdo con bases de datos construidas por fármacos y agroquímicos, presentan un patrón de las características estructurales que favorecen su absorción y reducen su perfil de toxicidad (peso molecular (PM) ≤ 500 , logaritmo de coeficiente de partición (Log P) ≤ 5 , número de aceptores de enlaces de hidrógeno (nON) ≤ 5 y número de donadores de enlaces de hidrógeno (nOHNH) ≤ 5). Este tipo de parámetros físico-químicos y otros adicionales (solubilidad en agua, volumen espacial, superficie polar molecular, *etc.*) calculados *in silico* han demostrado ser útiles para predecir las propiedades biológicas no sólo de nuevos agentes farmacológicos (6), sino también de nuevas sustancias agroquímicas (7,8).

Teniendo en cuenta lo anterior y que el análisis de citotoxicidad de nuevas sustancias orgánicas es de suma importancia biológica, ecológica y biomédica, en este trabajo se seleccionaron tres nuevos compuestos heterocíclicos del tipo híbridos moleculares entre los sistemas de quinolina y tiazolidinona (epoxiisoindolodiona) para el estudio preliminar de sus propiedades toxicológicas sobre la inhibición del crecimiento de las raíces de cebolla *Allium cepa*.

En el presente trabajo se reportan, por primera vez, y se discuten los resultados de toxicidad aguda inducida por los híbridos 4-aminoquinolínicos FR-72, FR-121 y FR-154 sobre la especie *Allium cepa* L., los cuales podrían ser útiles en estudios agroquímicos posteriores de este tipo de sustancias orgánicas, por ende estos resultados pueden ser útiles tanto para los químicos orgánicos como para los toxicólogos que investigan sobre los procesos biológicos de las especies vegetales.

Materiales y métodos

Para el montaje de la prueba se siguieron los lineamientos de los protocolos descritos (9-13). Los bulbos de *Allium cepa* ($2n = 16$) limpios y sanos, previamente sumergidos en el agua destilada, se secaron con papel toalla y se colocaron directamente en los tubos de ensayo llenos con la sustancia a evaluar.

Los bulbos eran libres de raíces que previamente hayan germinado. Se usaron controles positivos utilizando DMSO (Dimetilsulfoxido) al 1% y 3%,

concentraciones hechas en las diluciones de los compuestos heterocíclicos FR-72, FR-121 y FR-154 (**Figura 1**). Estos últimos fueron preparados, purificados y caracterizados espectroscópicamente según los protocolos previamente descritos (14, 15).

FR 72: 3-(2-((7-Cloroquinolin-4-il)amino)etil)-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)tiazolidin-4-ona

Sólido beige, rendimiento 56 %; $R_f = 0.4$, pf 250-253 °C; IR (KBr): 3371_(OH), 2870_(CH₂), 1666_(C=O), 1574_(C=N) cm⁻¹. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, Me₄Si), δ (ppm): 8.33 (2-H, d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.14 (5-H, d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.80 (8-H, d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.55 (N-H, t, 1H), 7.46 (6-H, dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.88 (5'-H, d, $J = 8.3$ Hz 1H), 6.84 (2'-H, d, $J = 2.0$, 1H), 6.77 (5'-H, dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H) 6.29 (3-H, d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.79 (2-H, s, 1H), 3.76 (OCH₃, s, 3H) 3.82-3.62 (5-Ha y 5-Hb, m, 2H), 3.59-3.52 (2''-Ha, m, 1H), 3.50-3.42 (1''-Ha, m, 1H), 3.25-3.18 (1''-Hb, m, 1H), 3.39 (-OH, s, 1H), 3.01-2.94 (2''-Hb, m, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆, Me₄Si), δ (ppm): 171.0, 151.6, 149.6, 149.3, 147.9, 148.9, 133.4, 131.3, 127.5, 124.2, 123.7, 120.1, 117.3, 111.5, 110.7, 98.3, 62.9, 55.5, 55.4, 40.6, 32.1. C₂₁H₂₀ClN₃O₃S.

FR121: 3-(2-((7-Cloroquinolin-4-il)amino)etil)-2-imino-tiazolidin-4-ona

Sólido blanco, rendimiento 78 %; $R_f = 0.4$, pf 182-185 °C; IR (KBr): 3329_(NH), 1619_(C=O), 1573_(C=N) cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.42 (2-H, d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 8.15 (5-H, d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.79 (8-H, d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.46 (6-H, dd, $J = 1.3, 8.9$ Hz, 1H), 6.58 (3-H, d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.13 (5-Ha, d, $J = 10.9$ Hz, 2H), 4.37 (C=NH, s, 1H), 3.61 (2'-H, t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.48 – 3.43 (1'-H, m, 2H), 7.45-7.49 (NH, m, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 171.8, 158.3, 154.5, 152.3, 149.3, 134.8, 129.2, 124.4, 121.7, 117.5, 99.2, 50.1, 46.5, 30.2. GC-MS: $t_R = 18.2$ min. MS (EI) m/z (%): 320 (M⁺, 65), 195 (100), 167 (50), 139 (35). C₁₄H₁₃ClN₃OS.

FR154: 2-(2-((6-Cloro-2-metoxiacridin-9-il)amino)etil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoxiisindolo-1,3(2H)-diona

Sólido amarillo, rendimiento 87 %, $R_f = 0.7$; pf 115-120 °C; IR (KBr): 3440_(NH), 1697_(C=O) cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.29 (4-H, d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.85 (8-H, d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.81 (5-H, d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.54 (1-H, d, 1H), 7.40 (7-H, dd, $J = 1.5, 7.9$ Hz, 1H), 7.31 (3-H, dd, $J = 1.5, 4.8$ Hz, 1H), 6.88 (NH, s, 1H), 6.50 (5'-H, s, 2H), 5.03 (4'-H, s, 2H), 3.95 (OCH₃, s, 3H), 3.83-3.82 (2'-H, m, 2H), 3.73 (1'-H, t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.76 (3'-H, s, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 171.1 (2), 170.2, 145.2, 142.5 (2), 130.2, 128.7, 124.8, 123.97, 122.9, 114.8, 112.8, 112.6, 112.4, 112.1, 109.6, 109.4, 108.3 (2), 55.4, 55.2, 51.7 (2). GC-MS: $t_R = 35.0$ min. MS (IE) m/z (%): 449 (M⁺, No detectado). C₂₄H₂₀ClN₃O₄.

= 1.5 Hz, 1H), 7.54 (1-H, d, 1H), 7.40 (7-H, dd, $J = 1.5, 7.9$ Hz, 1H), 7.31 (3-H, dd, $J = 1.5, 4.8$ Hz, 1H), 6.88 (NH, s, 1H), 6.50 (5'-H, s, 2H), 5.03 (4'-H, s, 2H), 3.95 (OCH₃, s, 3H), 3.83-3.82 (2'-H, m, 2H), 3.73 (1'-H, t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.76 (3'-H, s, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 171.1 (2), 170.2, 145.2, 142.5 (2), 130.2, 128.7, 124.8, 123.97, 122.9, 114.8, 112.8, 112.6, 112.4, 112.1, 109.6, 109.4, 108.3 (2), 55.4, 55.2, 51.7 (2). GC-MS: $t_R = 35.0$ min. MS (IE) m/z (%): 449 (M⁺, No detectado). C₂₄H₂₀ClN₃O₄.

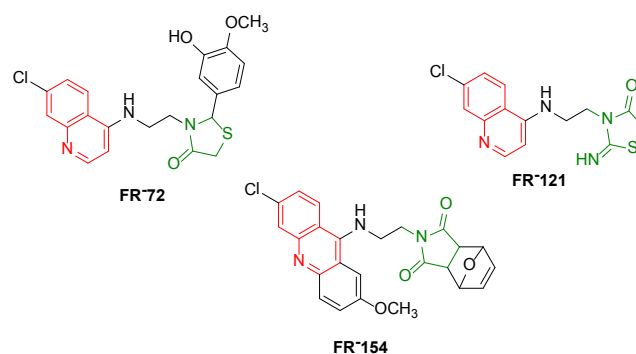


Fig. 1. Compuestos híbridos heterocíclicos de quinolina y tiazolidinona (epoxiisindolodiona), seleccionados para el ensayo.

Los experimentos se realizaron con tres repeticiones a temperatura ambiente $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y se mantuvieron en oscuridad. El periodo de exposición de los bulbos fue de 120 horas, las raíces que se utilizaron para el montaje de genotoxicidad eran en promedio de 2 a 2.5 cm de longitud.

Para la evaluación genotóxica se cortaron las raíces y se sumergieron por 15 min. en HCl 6N. Una vez transcurrido el tiempo de exposición al ácido, se lavaron cuidadosamente tres veces con agua destilada para eliminar el ácido, se cortaron los últimos 2 o 3 mm de las puntas (de color más blanco) y se conservaron en tintura de orceína por 10 min. para su coloración.

Finalmente, para la observación microscópica se utilizó un microscopio marca Zeiss modelo Axiostar plus con adaptador para microfotografía; las puntas de las raíces coloreadas fueron colocadas en láminas porta objetos, cubiertas con una laminilla y, con la protección de una servilleta, fueron presionadas fuertemente sobre ellas con el dedo pulgar (“Squash”), de tal manera que la punta de la raíz exponga una capa fina del tejido vegetal.

La observación de las aberraciones cromosómicas (16) y la determinación del índice mitótico (13) se realizaron en el objetivo de 40X. El índice mitótico es el número de células que se encuentran en división celular por 1000 células observadas (9).

Resultados

Concentración Efectiva: Las raíces de los bulbos de cebolla fueron expuestas a las diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-6} y 10^{-9} M) de las tres sustancias evaluadas (FR-72, FR-121, FR-154) para poder determinar la CE_{50} (o los porcentajes de inhibición). Los resultados obtenidos (**Figura 2**) indican que para los compuestos FR-121, FR-154 y FR-72 a las respectivas concentraciones 10^{-6} M, 10^{-3} M y 10^{-9} M, el porcentaje de inhibición resultó superior al 50%, mientras que el porcentaje de inhibición del compuesto FR-154 a la concentración de 10^{-6} era inferior al 50%. El compuesto FR-121 a la concentración de 10^{-9} M no era activo (cero de inhibición).

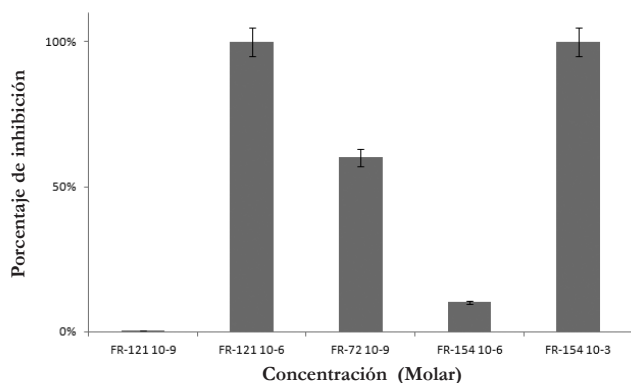


Fig. 2. Concentración efectiva basada en la longitud de las raíces de *Allium cepa*.

Índice Mitótico: El IM de los compuestos FR-72, FR-121, FR-154 en diferentes concentraciones fue calculado utilizando la ecuación 1 de acuerdo con el procedimiento descrito (9).

$$IM = \frac{n_{100}}{n_T} \quad [1]$$

n_{100} - número de células en división x 100
 n_T - número total de células

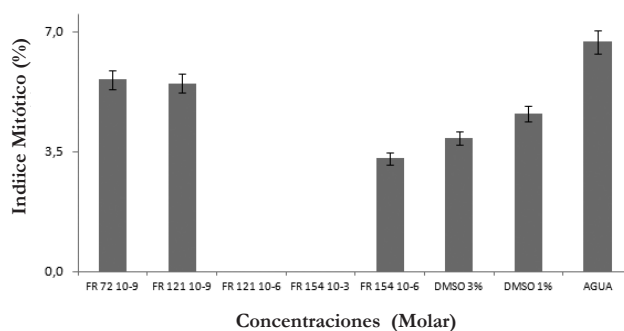


Fig. 3. Índice mitótico de los compuestos FR-72, FR-121, FR-154 y los controles en las concentraciones evaluadas.

Los resultados de los compuestos FR-72, FR-121, FR-154 y los controles en las concentraciones evaluadas se registraron en la siguiente gráfica (**Figura 3**).

Los valores reportados de DMSO 3% y DMSO 1% corresponden a los controles positivos, el agua al control negativo y de comparación. El valor de 0 de los compuestos FR-121 a la concentración de 10^{-6} y FR-154 a la concentración de 10^{-3} indican que a estas concentraciones no hubo suficiente desarrollo de raíces para el montaje y por lo tanto no hay tejido para el cálculo de IM.

Discusión

Es bien sabido que al exponer a hidratación un bulbo de cebolla (*Allium sp.*) se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la absorción se lleva a cabo en presencia de sustancias orgánicas o inorgánicas tóxicas la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación (9).

Este efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al agente tóxico. La cuantificación del efecto se realiza considerando dos respuestas: 1. estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al compuesto, respecto a la longitud promedio de las raíces del recipiente control y 2. con el diagnóstico

microscópico, para establecer el índice mitótico y las aberraciones cromosómicas que se presenten.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal en la investigación de nuevos agentes agroquímicos es el desarrollo de compuestos activos con bajas dosis efectivas, elevada selectividad y un impacto ambiental mínimo, el presente estudio de la citotoxicidad aguda inducida por los híbridos 4-aminoquinolínicos FR-72, FR-121 y FR-154 (**Figura 1**), se inició con el cálculo de algunos parámetros físico-químicos para estos compuestos, importantes en este tipo de bioensayos.

Así, con el fin de predecir el comportamiento de las sustancias orgánicas sobre el crecimiento de las raíces de cebolla se obtuvieron los siguientes parámetros físico-químicos: la lipofilia (Log P) y la solubilidad en agua (Log S) (**Tabla 1**).

Los resultados de los cálculos mostrados en la Tabla 1 demuestran que los compuestos analizados FR-72, FR-121, FR-154 cumplen con cada uno de los parámetros establecidos por la regla de Lipinski (6, 17). Así mismo, la comparación de los resultados de solubilidad (Log S) de estos compuestos con los valores calculados para la lipofilia (Log P) refleja, como era de esperarse, una gran coherencia al presentar una relación inversa entre estas dos propiedades. Los valores calculados de lipofilia y solubilidad en agua son moderados y se encuentran dentro de los apropiados para el estudio planeado (18, 19).

Tabla 1. Parámetros de Lipinski* para los híbridos 4-aminoquinolínicos FR-72, FR-121, FR-154.

Compuesto	PM * (g/mol)	Log P	Log S
FR-72	429.9	3.33	-4.06
FR-121	449.9	3.72	-2.87
FR-154	320.8	2.09	-5.11

* PM – peso molecular, P - coeficiente de repartición, S - solubilidad

Después del análisis de los parámetros físico-químicos calculados *in silico* de los tres compuestos, se procedió al estudio de sus propiedades biológicas, determinando los siguientes parámetros importantes sobre el crecimiento de las raíces de cebolla *Allium*

cepa: la concentración efectiva (CE_{50}), el índice mitótico (IM) y las aberraciones cromosómicas (ACs) los cuales se discuten a continuación.

Concentración Efectiva: La CE_{50} se define como la concentración de una sustancia que es capaz de inhibir el 50% de alguna función medible con respecto al comportamiento normal en agua (control negativo). Al analizar los datos obtenidos en nuestro experimento, se pudo llegar a las siguientes conclusiones: 1. El porcentaje de inhibición del compuesto FR-121 a la concentración 10^{-9} M fue muy inferior al 50% de la longitud de las raíces respecto al control lo que indica que la molécula FR-121 a esta concentración no generó un efecto inhibitorio (carece del efecto fitotóxico), mientras que el compuesto FR-72 a la misma concentración exhibió una inhibición intermedia (60%) con respecto a la longitud de la raíz del control. 2. El cambio de la concentración (10^{-6} M) del compuesto FR-121 provocó la inhibición total (100%) del crecimiento de las raíces indicando que este compuesto es un potente agente fitotóxico; el caso contrario fue del compuesto FR-154 a la misma concentración, el cual mostró una inhibición baja (10%) de la longitud de las raíces con respecto a las raíces del control. 3. A la concentración alta (10^{-3} M), la molécula FR-154 inhibió totalmente el crecimiento de las raíces (100%).

Índice Mitótico: El IM se define como el número de células por unidad (normalmente 1.000) que sufren mitosis durante un determinado período de tiempo de exposición (120 horas) y se utiliza principalmente como estimación de la velocidad del crecimiento tisular. En términos generales, valores del IM inferiores al valor del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas utilizadas en el ensayo. Caso contrario, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular evidenciando una sustancia química con potencial para formación de tejido tumoral (16).

El valor del IM del control negativo (agua) era de 6.7% (**Figura 3**). Aunque este valor es bajo, se encuentra entre los rangos de condiciones normales, es decir, la mayoría de las células se encuentran en

interfase ($\approx 90\%$) (20). Sin embargo, los resultados encontrados en los controles positivos (1% DMSO, IM = 4.6% y 3% DMSO, IM = 3.9%) evidenciaron sus efectos sobre los procesos de reproducción en las células de cebolla, observándose un mayor efecto en DMSO al 3%, la mayor concentración utilizada como control positivo. Al analizar los resultados obtenidos, se percibió una tendencia: mientras la concentración del compuesto evaluado se incrementa, su IM disminuye, indicando una inhibición de la función mitótica, por ende, una clara acción inhibitoria sobre la división celular. Los compuestos FR-121 y FR-72 a la concentración de 10^{-9} M mostraron valores de IM entre 5.5 y 5.6, respectivamente, lo que revela una leve acción inhibitoria sobre el proceso mitótico comparando con el control negativo (agua). El compuesto FR-154 a una concentración de 10^{-6} M resultó ser más activo en la inhibición (IM = 3.3). Los compuestos FR-121 a concentración de 10^{-6} M y FR-154 a una concentración de 10^{-3} M bloquearon totalmente el proceso mitótico (IM = 0) indicando una acción tóxica y destructiva en las células meristemáticas de la raíz de cebolla, demostrando una inducción a la apoptosis por estos compuestos químicos (21).

El estudio microscópico de las células de la cebolla con el compuesto FR-121 a una concentración de 10^{-6} M mostró que la mayoría de las células fueron totalmente destruidas y muchas de ellas no presentaron núcleos ni fases cromosómicas. El efecto del compuesto FR-154 a una concentración de 10^{-3} M sobre los bulbos fue más pronunciado

Tabla 2. Porcentajes de inhibición del IM en cada compuesto referente al IM del control.

Compuesto	Concentración (M)	IM	% Inhibición
FR-72	10^{-9}	5.6	16.42
FR-121	10^{-9}	5.5	17.91
FR-121	10^{-6}	0.0	100
FR-154	10^{-3}	0.0	100
FR-154	10^{-6}	3.3	50.75
DMSO	3%	3.9	41.79
DMSO	1%	4.6	31.34
Agua	*	6.7	*

* No se reportan valores numéricos ya que el montaje control con agua es el utilizado para obtener los comparativos en el cálculo de porcentaje de inhibición.

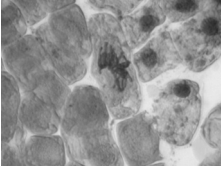
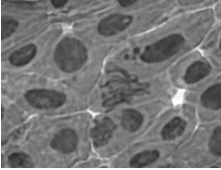
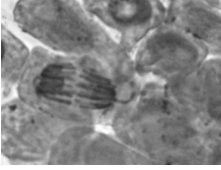
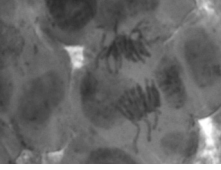
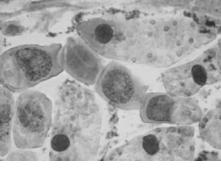
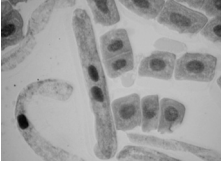
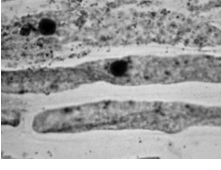
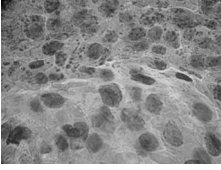
y consistió en el bloqueo total de la germinación, evidenciando una alta fitotoxicidad.

Al hacer el comparativo del porcentaje de inhibición, como parámetro de evaluación considerando el IM de cada compuesto, se contempla que aquellos IM que inhiben por encima del 50% se consideran compuestos tóxicos e inhibitorios de la división celular (20). Los valores de inhibición obtenidos para los compuestos evaluados se presentan en la Tabla 2.

Los resultados indican que los compuestos FR-121 (a una concentración de 10^{-6} M) y FR-154 (a una concentración de 10^{-3} M) fueron muy tóxicos con una inhibición del 100% sobre el control. El compuesto FR-154 a una concentración de 10^{-6} M inhibió en un 50.8% con respecto al control, considerándose como tóxico. La misma molécula a una concentración de 10^{-6} M sólo mostró inhibición baja (10%) a nivel radicular (**Figura 2**), pero exhibió una alta toxicidad a nivel del IM (**Tabla 2**). Este hecho puede deberse a posibles acciones horméticas, en la que se manifiesta con un crecimiento estimulado a bajas concentraciones (10^{-6} M) pero con daños que se revelan a nivel mitótico al sobrepasar la capacidad homeostática de la célula generando la genotoxicidad (22).

Aberraciones Cromosómicas: Las aberraciones cromosómicas (ACs) se caracterizan por los cambios cromosomales que pueden sufrir las estructuras genéticas o el total de los cromosomas y pueden generarse espontáneamente tanto por agentes químicos como físicos. Las ACs pueden ser inducidas por varios factores como el rompimiento del ADN o la inhibición de la síntesis y replicación del ADN alterado. Muchas de las ACs son consecuencia de una segregación anormal de los cromosomas, generado por la acción de agentes aneugénicos. En términos generales, las ACs como puentes y rompimientos, indican acciones clastogénicas, mientras que las ACs como cromosomas errantes o perdidos, mutilaciones, cromosomas pegajosos, multipolaridad y C-metafase, resultan de efectos aneugénicos. Cuando las alteraciones morfológicas causadas por la acción de los agentes químicos ocurren en la interfase nuclear se llaman aberraciones nucleares. Generalmente, estas alteraciones se manifiestan principalmente como núcleos lobulados, núcleos desplazados, polinúcleos y micronúcleos. (16, 23, 24). Teniendo en cuenta lo anterior, el último

Tabla 3. Aberraciones encontradas en los extendidos evaluados.

Agente causante	Imagen observada	Cambios genéticos
FR-121 concentración 10^{-9} M		Cromosomas pegajosos y estrellados
FR-121 concentración 10^{-6} M		Liberación de cromosomas en profase
		Cromosoma errante en anafase
		Cromosoma errante en anafase tardía
		Núcleo desplazado a la zona periférica
FR-154 concentración 10^{-3} M		Células con doble núcleo
		Macrocélulas con granulaciones en el citoplasma y algunas anucleadas
		Células amorfas con núcleos difusos, granulaciones en el citoplasma con pérdida de pared celular

ensayo planeado en esta investigación consistía en el diagnóstico al microscopio de las ACs.

El análisis de los cambios genéticos (cromosómicas) de las células de la cebolla (**Tabla 3**) confirmó totalmente los resultados observados del estudio sobre el IM (**Figura 3**): a medida que aumenta la concentración del compuesto, se encuentran con mayor frecuencia y severidad eventos de malformación o aberración cromosómicas. Al observar los cambios genéticos se puede concluir que las sustancias evaluadas tienen acciones más de aneugénicas, que actúan a nivel de estructuras celulares y moleculares e impiden la fijación de las fibras del huso mitótico, por ende, ocasionan el desplazamiento de cromosomas en el anafase o pérdidas de cromosomas. Esta acción se manifestó en las aberraciones identificadas como cromosomas pegajosos, cromosomas liberados tempranamente o errantes en fases más avanzadas. Asimismo, a nivel nuclear, las anormalidades como polinúcleos son resultado de anafases multipolares asociadas a adherencias cromosomales, generando células inviables.

La presencia de “fases pegajosas” puede deberse a un efecto causado por el compuesto seleccionado sobre la estructura de la cromatina, bloqueando su descondensación, o ser el resultado de las mismas roturas cromosómicas unidas por algún tipo de ligasas.

Conclusión

Los tres compuestos, híbridos quinolin-tiazolidinona (FR-72 y FR-121) y acridin-epoxiisoidolindiona (FR-154) fueron sintetizados *de novo* y evaluados en el test de la raíces de bulbos de cebolla, analizando los tres parámetros del crecimiento (CE_{50} , IM, ACs). Los resultados obtenidos sobre la citotoxicidad aguda en diferentes concentraciones indicaron que el compuesto FR-121 a una concentración de 10^{-6} M y el compuesto FR-154 a una concentración de 10^{-3} M resultaron ser potentes agentes fitotóxicos. Este último compuesto a una concentración de 10^{-6} M estimula una respuesta hormética manifestada en los resultados de estimulación radicular y simultáneamente con una inhibición del IM.

Las sustancias evaluadas tienen acciones más de aneugénicas, que actúan a nivel de estructuras

celulares y moleculares e impiden la fijación de las fibras del huso mitótico, por ende, ocasionan el desplazamiento de cromosomas en anafase o pérdidas de cromosomas, llegando incluso a ser inductoras de la apoptosis al sobrepasar la capacidad homeostática de la célula. Todos los resultados obtenidos establecen acciones inhibitorias de fases mitóticas y, por ende, de reproducción celular.

El monitoreo de nuevos estudios para puntualizar estos resultados con nuevas series de compuestos se están realizando ahora en nuestros laboratorios que permitirán identificar nuevos agentes agroquímicos.

Financiación

Los autores agradecen la financiación del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés en la publicación de estos resultados.

Referencias

1. Yates FS. The Quinoline Alkaloids. En: Katritzky AR, Rees CW. (eds.). *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Pergamon Press. New York, Estados Unidos. 1984; p. 512.
2. Kouznetsov VV, Amado Torres DF. Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina. *Universitas Scientiarum* 2008; **13**: 303-317.
3. Handy RD. Systems toxicology: using the systems biology approach to assess chemical pollutants in the environment. *Advances in Experimental Biology* 2008; **2**: 249-281.
4. Uhl M, Plewa MJ, Majer BJ, Knasmüller S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays, 11-30. En: Maluszynska J, Plewa M. (eds.). *Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health*. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego. Katowice, Poland. 2003; p. 150.
5. Mohan MA, Suprava J K, Panda BB. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008; **70**: 300-310.
6. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ.

- Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; **23**: 3-25.
7. Speck-Planche A, Kleandrova VV, Scotti MT. Fragment-based approach for the in silico discovery of multi-target insecticides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2012; **111**: 39-45.
 8. Mahmoud A, Al-sha'er, Mutasem OT. Discovery of novel CDK1 inhibitors by combining pharmacophore modeling, QSAR analysis and in silico screening followed by in vitro bioassay. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; **45**: 4316-4330.
 9. Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 1985; **102**: 99-112.
 10. Castillo Morales G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México. 2004; pp. 1-202.
 11. Radić S, Sripancev V, Vujcic V, Rajcic M, Širac S, Pevalek-Kozlina B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of The Total Environment* 2010; **408**:1228-1233.
 12. Rank J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 2003; **1**: 38-42.
 13. Barbério A, Voltolini JC, Mello MLS. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology* 2011; **20**: 927-935.
 14. Rojas Ruiz FA, García-Sánchez RN, Estupiñan SV, Gómez-Barrio A, Torres Amado DF, Pérez-Solórzano BM, Nogal-Ruiz JJ, Martínez-Fernández AR, Kouznetsov VV. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; **15**: 4562-4573.
 15. Rojas-Ruiz FA, Kouznetsov VV. Property-Based Design and Synthesis of New Chloroquine Hybrids via Simple Incorporation of 2-Imino-thiazolidin-4-one or 1H-Pyrrol-2,5-dione Fragments on the 4-Amino-7-chloroquinoline Side Chain. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011; **22**: 1774-1781.
 16. Morais D, Marin-Morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research* 2009; **682**: 71-81.
 17. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. www.molinspiration.com/services. Consultado el 22 de marzo de 2012.
 18. Jorgensen WL, Duffy EM. Prediction of drug solubility from structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; **54**:355-366.
 19. Hou TJ, Xia K, Zhang W, Xu XJ. ADME Evaluation in Drug Discovery 4. Prediction of Aqueous Solubility Based on Atom Contribution Approach. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2004; **44**: 266-275.
 20. Asita OA, Matobole RM. Comparative study of the sensitivities of onion and broad bean root tip meristematic cells to genotoxins. *African Journal of Biotechnology* 2010; **9**: 4465-4470.
 21. Cascales MA. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 2003; **69**: 37-64.
 22. Pérez DG, Restrepo MR, Martínez SG. Hormesis: Antecedentes e Implicaciones en los Sistemas Biológicos. *Latin American Journal of Pharmacy* 2009; **28**: 954-960.
 23. Freyre S, Estrada M, Bolaños H. Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias* 2009; **12**: 12-17.
 24. Herrero JM, Pérez Martín P, Fernández-Freire L, Carvajal-López A, Peropadre MJ. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2012; **743**: 20-24.