

Capacidad genotóxica de la hidrazida maleica (MH) detectada por intercambios de cromátidas hermanas (SCE) y por otros bioensayos en *Allium cepa*

Antonio Del Campo G.* y Rina Coletto O.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia
Apartado 526. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

Recibido: 13-06-97 Aceptado: 15-03-98

Resumen

La hidrazida maleica (MH) es un compuesto utilizado ampliamente como inhibidor del crecimiento vegetal y como herbicida. Utilizada a concentraciones finales de 10^{-4} M y 10^{-5} M se comporta como agente clastógeno y/o genotóxico incrementando los intercambios entre cromátidas hermanas en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Cuando los meristemos alcanzaron su cinética de equilibrio dinámico, fueron colocados en una solución de bromodeoxiuridina (BrdUrd) 10^{-4} M, durante dos rondas completas y posterior tratamiento con el herbicida al comienzo del período replicativo (S) del segundo ciclo; tratamientos posteriores con cafeína, pusieron de manifiesto la acción potenciadora de la auxina para producir aberraciones cromosómicas. La técnica de bromosustitución del ADN ha hecho posible la visualización de intercambios que ofrecen una metodología importante para detectar el daño genómico producido por la MH. Los resultados obtenidos demuestran que: 1. existe una sensibilidad de los meristemos de *Allium cepa* a la MH, siendo máxima al comienzo del periodo S, 2. la efectividad de la MH para producir SCE está relacionada con los procesos de replicación más que con los de reparación y 3. la producción de aberraciones cromosómicas es un proceso S-dependiente.

Palabras clave: *Allium cepa*; bromodeoxiuridina; cafeína; hidrazida maleica.

Genotoxic activity of the maleic hydrazide (MH) detected by sister chromatid exchanges (SCE) and by another bio-assays in *Allium cepa*

Abstract

Maleic hydrazide (MH) is a compound widely used as an herbicide and for inhibiting plant growth. Used at final concentrations of 10^{-4} M and 10^{-5} M it behaves as a clastogenic and/or genotoxic agent increasing the sister chromatid exchanges (SCE) on radical meristems from *Allium cepa*. When meristems reached kinetic of dynamic equilibrium then were placed in a solution of bromodeoxyuridine (BrdUrd) 10^{-4} M during two complete cycles and then were treated with the herbicide at the initiation of the replicative period (S) of the second cycle; an additional treatment with caffeine showed the dramatic effect of the auxine in producing

* Autor para la correspondencia.

chromosomic aberrations. The bromosubstitution technique for DNA has made possible the visualization of SCE and offers an important method for detecting genomic damage produced by the MH. The results obtained show that: 1. meristems of *Allium cepa* have a sensibility to MH with a maximum response at the beginning of the S period, 2. the effectivity of the MH to produce SCE is related more to the processes of replication than those of reparation and 3. the production of chromosomic aberrations occurs as a result of a S-dependent process.

Key words: *Allium cepa*; bromodeoxyuridine; caffeine; maleic hydrazide.

Introducción

Una exitosa división celular requiere que ciertos procesos tengan lugar y se completen; la entrada a la mitosis, p. ej., está condicionada a la culminación de la replicación del ADN. Esto supone una serie de eventos, unos continuos como el crecimiento en masa de la célula desde que nace hasta que se divide y otros discontinuos como la replicación del genoma y su reparto equitativo a las células hijas (1-3).

La hidrazida maleica (MH), definida químicamente como 1,2-dihidro-3,6-piridoxona, isómero estructural del uracilo, es un compuesto estable, poco soluble en agua y capaz de reaccionar fácilmente con compuestos básicos.

La producción comercial de papas, batatas, cebollas, ajos y tabaco suele sufrir pérdidas considerables de humedad durante su almacenamiento, debido a razones fisiológicas de respiración y evaporación cuyos efectos se ven incrementados por el rápido crecimiento de brotes antes de que el vegetal llegue a manos del consumidor. La MH, como regulador del crecimiento, es aplicada semanas antes de las cosechas para prevenir el desarrollo de los retoños (4-7).

De acuerdo a los diversos autores, la MH actúa como:

1. una antiauxina interfiriendo con la síntesis y actividad de las fitohormonas (8);
2. un inhibidor de la síntesis de sistemas enzimáticos: deshidrogenasas, fosfatasas, etc. (9);

3. un sulfidrilo que reacciona con grupos tioles libres (10);
4. un competidor del uracilo, incorporándose al ARN y bloqueando la síntesis proteica (11); y
5. un inhibidor de la división celular por lesiones producidas en el genoma durante el período replicativo (S) (12).

Aunque el mecanismo de acción de la MH no está muy claro si lo están los efectos que produce en la célula, entre los que se destacan:

1. la inhibición de síntesis de lípidos y proteínas (13);
2. el incremento de compuestos n-nitrosos (14);
3. la inducción de SCE (15) y aberraciones cromosómicas (16 y 17);
4. producción de tumores en mamíferos (18).

Debido a todos los efectos que produce en vegetales, se la ha catalogado como genotóxica y/o clastogénica.

La producción de aberraciones cromosómicas (CA) por la MH mediante un mecanismo S-dependiente y su efecto mutágeno en muchas especies vegetales, fue originalmente reportada por Darlington y McLeish en 1951 (19); en *Allium cepa* este compuesto aumenta efectivamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas (20).

La introducción de pesticidas y herbicidas en el ambiente agrícola, así como el incremento de polución en el aire, suelos y

agua ponen de manifiesto el peligro que estos representan. Es importante evaluar si estos químicos pueden llegar a hacerse mutágenos y cancerígenos a través del sistema enzimático vegetal; una forma de evaluar el posible efecto de genotoxinas en el medio es a través de SCE, ya que se pueden determinar los daños inducidos por factores ambientales en el ADN (21-23).

Desde que Taylor et al. (24) detectaron por vez primera la existencia de SCE en *Vicia faba* mediante autorradiografía, se mantiene la duda sobre los mecanismos que los originan: si son producto de los tratamientos para ponerlos de manifiesto o si al menos alguna fracción de ellos ocurre espontáneamente. Schwarzman et al. (25) utilizando meristemos radicales de *Allium cepa* concluyeron que la mayoría de ellos parecían ser inducidos por la BrdUrd aunque tampoco descartan la posibilidad de que una pequeña parte de ellos puede ocurrir espontáneamente. Del análisis de estos autores se concluye que:

- a. Los SCE se forman por rotura y reunión de las 4 cadenas polinucleotídicas de un cromosoma y
- b. Estos intercambios no ocurren al azar sino entre las cadenas polares, una de cada cromátida.

Con el presente trabajo nos proponemos:

1. determinar, en nuestro material de estudio, la acción clastogénica y/o genotóxica de la MH a distintas concentraciones que nos permitan clasificar a este compuesto como un agente químico capaz de inhibir la proliferación celular y otros efectos ana-telofásicos;
2. determinar en qué momento del ciclo de división celular es más efectiva la acción de la droga y a qué concentración; y
3. valorar mediante la técnica de la fluorescencia más giemsa (FPG) el inter-

cambio entre cromátidas hermanas y su relación con el efecto de la MH.

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizaron meristemos radiculares de *Allium cepa* crecidos en agua destilada, a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ y en oscuridad. El agua, aireada constantemente por burbujeo a una rata de 20 mL/seg, fue removida cada 24 h. Los bulbos fueron colocados en recipientes de vidrio de 80 mL de capacidad de forma que sólo sus bases permanecían en contacto con el agua (26).

Metodología

Las condiciones de cultivo descritas anteriormente, se mantuvieron durante los diversos tratamientos con MH, BrdUrd, cafeína y colchicina y se iniciaron cuando las raíces alcanzaron su cinética de equilibrio (20 mm de longitud, aprox.).

Tratamiento con hidrazida maleica (MH):

La MH definida químicamente como 1,2-dihidro-3,6-piridazona, puede existir en 3 formas tautoméricas como compuesto heterocíclico; se la utilizó a distintas concentraciones ($5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M) con el fin de conocer la concentración óptima que no bloquease en más del 50% el índice mitótico manteniéndolo en el tiempo y que revirtiese a la normalidad a las 48 h, aproximadamente. En estas condiciones y después de 2 h de tratamiento, se separaron las raíces a las horas 0, 3, 6, 9, 12 y 15 de recuperación, cuantificándose los diversos tipos de aberraciones cromosómicas (CA). Los controles fueron manejados de la misma forma, pero sin tratamiento con la droga, Figura 1.

Para la cuantificación de las aberraciones cromosómicas (CA) e intercambios entre cromátidas hermanas (SCE), los meristemos recibieron un tratamiento de 1 h a las concentraciones 10^{-4} M y 10^{-5} M.

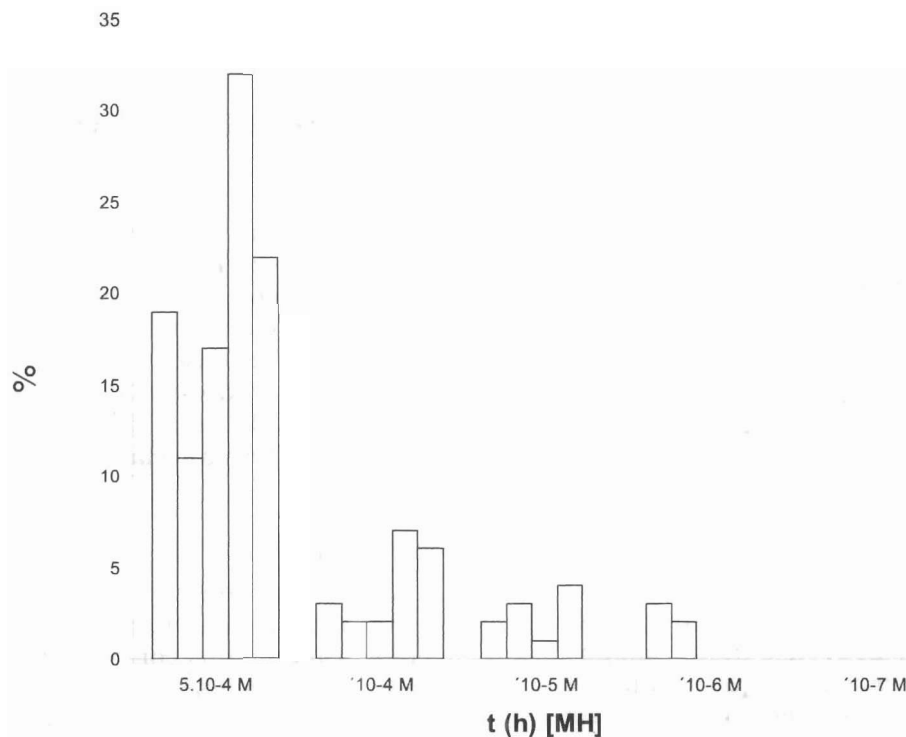


Figura 1. Clastogenicidad de la hidrazida maleica (MH), expresada en porcentaje, a diferentes concentraciones y después de 1 h de tratamiento suministrado al comienzo del período replicativo (S), seguido de 15 h de recuperación.

Tratamiento con 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdUrd):

Con el fin de lograr la sustitución en el ADN de la timidina por BrdUrd durante 2 rondas de replicación se trataron las raíces con este análogo a una concentración de 10^{-4} M. Para acumular los cromosomas en metafase se dio un tratamiento con colchicina 0,05%, de 3 h de duración y en condiciones de hipoxia (15).

Tratamiento con cafeína:

La cafeína es una droga que, utilizada en determinadas condiciones, actúa como inhibidora de los procesos de reparación del genoma durante los períodos G2 y profase del ciclo proliferativo. Se utilizó a una concentración de 3 mM y se suministró a los meristemas durante 2 h, correspondientes a la mitad del G2 y temprana mitosis (26).

Fluorescencia más giemsa (FPG):

Después de fijadas, las raíces fueron tratadas con pectinasa 0,5%, diluida en tampón citrato 0,001 M y ajustada a pH 4,2, durante 1 h y a 37°C; los preparados se hicieron en portaobjetos gelatinados; removidos los cubreobjetos por el método del hielo seco, las preparaciones fueron hidratadas en agua destilada durante 10 min y teñidas con Hoechst 32258 (1 mg del fluorocromo en 1 mL de etanol y 0,2 mL de esta solución en 100 mL de solución salina citrato, SSC 0,5X) a temperatura ambiente y durante 20 min. Después de un leve lavado en SSC 0,5X, se colocaron nuevos cubreobjetos con una gota de la solución salina y fueron sellados con esmalte de uñas; posteriormente, las preparaciones colocadas en una bandeja, fueron irradiadas con luz UV de longitud de onda de 313 nm y durante 1 h; removidos los cubreobjetos, las preparaciones fueron incu-

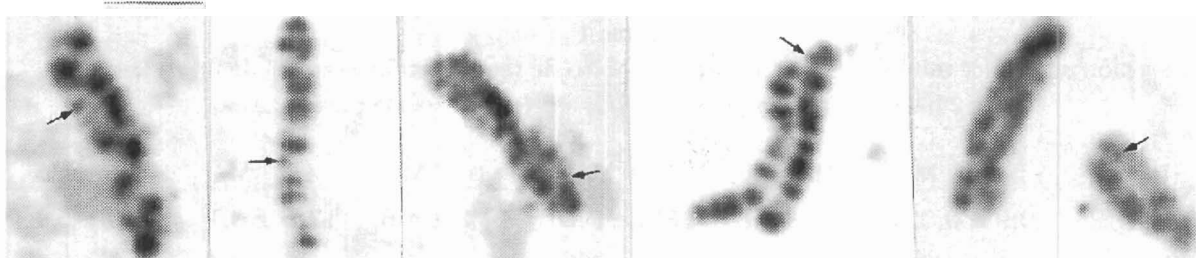


Figura 2. Intercambio entre cromátidas hermanas (SCE) en cromosomas de *Allium cepa* obtenidas después de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdUrd) durante 2 ciclos completos; se pueden observar "intercambios puntuales" (flechas).

badadas en SSC 0,5X durante 1 h a 55°C, siendo tratadas a continuación, con HCl 5N, a 20°C durante 15 min y lavadas con agua destilada. Finalmente, las preparaciones fueron teñidas con giemsa al 2% en tampón fosfato 0,017 M, a pH 6,8 y durante 7 min a temperatura ambiente (15, 25, 27).

Estudios citológicos

Recuento de aberraciones cromosómicas:

Tomando en cuenta todas las células meristemáticas en anafase y telofase de cada preparación, se determinó el número de cada una de ellas que mostraban puentes cromosómicos, roturas y otras anomalías, calculándose el porcentaje de ana-telofases anormales.

Recuento de SCE:

Después que las células incorporaron BrdUrd en su ADN durante 2 ciclos completos, fue posible detectar en los cromosomas por la técnica de FPG, una tinción diferencial en las cromátidas hermanas, quedando visualizados los intercambios entre ellas, Figura 2. El recuento de intercambios se realizó con el microscopio en cromosomas de la segunda mitosis. Dado que los cromosomas de *Allium cepa* son muy similares en longitud y forma, la frecuencia de intercambios se realizó por cromosoma; por otro lado, dada la dificultad en distinguir los intercambios localizados cerca del centrómero, no se contabilizaron aquellos que ocurrían a este nivel.

Tinción de las preparaciones:

Para los estudios citológicos de los meristemas tratados con la MH, las raíces fueron fijadas previamente en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1) y coloreadas posteriormente mediante la técnica de Feulgen (15).

La tinción utilizada para la observación de los SCE fue la descrita anteriormente.

Resultados

Cinética celular en poblaciones meristemáticas sometidas a tratamientos con MH

En estudios previos, Evans y Scott (28) observaron que la MH, aunque no es un agente alquilante actúa de una forma similar con respecto a la producción de CA, es decir, que las lesiones producidas en el ADN no se manifiestan como tales hasta que no hayan pasado por un período S.

Por la literatura (29-40) se conoce que la MH ha sido utilizada en vegetales a concentraciones de 2 mM hasta 50 mM en tratamientos de 1 y 2 h. En este trabajo se decidió valorar el efecto del herbicida a concentraciones de $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M durante 2 h y su incidencia sobre el índice mitótico (MI) en poblaciones meristemáticas en cinética de equilibrio dinámico. Los resultados que se presentan en la Tabla 1 indican que un tratamiento con la MH de $5 \cdot 10^{-4}$ M produce una grave depresión del

Tabla 1
Variación del índice mitótico (MI) durante el proceso de recuperación después de un tratamiento de 2 h con hidrazida maleica (MH) a diferentes concentraciones

Horas	$5 \cdot 10^{-4}$ M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	Control
3	$0,9 \pm 0,02$	$1,9 \pm 0,6$	$8,4 \pm 2,2$	$11,3 \pm 4,6$	$13,6 \pm 6,1$	$13,0 \pm 5,1$
6	$1,1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,5$	$8,1 \pm 1,5$	$9,6 \pm 3,2$	$11,9 \pm 2,4$	$12,5 \pm 3,9$
9	$1,2 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,7$	$6,0 \pm 1,7$	$10,6 \pm 2,9$	$11,2 \pm 4,1$	$12,9 \pm 4,5$
12	$1,4 \pm 0,08$	$3,3 \pm 1,0$	$9,0 \pm 3,1$	$12,8 \pm 5,7$	$10,5 \pm 3,5$	$11,6 \pm 4,7$
15	$1,4 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,9$	$9,5 \pm 2,4$	$12,5 \pm 3,2$	$12,7 \pm 4,6$	$12,0 \pm 2,8$
X*	$1,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,7$	$8,2 \pm 2,2$	$11,4 \pm 3,9$	$11,8 \pm 4,1$	$12,4 \pm 4,2$
X(c.l.)**	9438	8844	7578	7987	8412	7607

*X = media aritmética. **X(c.l.) = promedio de células leídas.

MI, llegando a valores de 0,9% a la hora 3 de recuperación e incrementándose ligeramente hasta 1,4% a la hora 15 después del tratamiento con el herbicida. Estos resultados contradicen en parte, a los obtenidos por González-Gil y Navarrete (15) quienes trabajando con la droga a una concentración de 10^{-4} M, obtuvieron una depresión hasta la mitad del valor control durante las horas 3 y 6, recuperándose este hasta el doble del valor control a las horas 9 y 12, volviendo a la normalidad en horas posteriores. En nuestro material de estudio y a medida que se fue incrementando la concentración de la MH en los diversos tratamientos, los valores porcentuales del MI se fueron aproximando a los de los controles.

Teniendo en cuenta que a pesar de que las concentraciones de 10^{-4} M y 10^{-5} M deprimen el crecimiento, más en el primer caso que a 10^{-5} M, se adquieren sin embargo, nuevos equilibrios proliferativos que son estables a lo largo del tiempo; tasas inferiores de concentración no afectan prácticamente al MI, mientras que a $5 \cdot 10^{-4}$ M lo bloquean.

Aberraciones cromosómicas (CA) ana-telofásicas (A-Ta) producidas por la MH

La toxicidad de productos clastogénicos se hace evidente con la presencia de cro-

mosomas rotos o por la alteración de parámetros determinados por la cinética celular. En la Figura 1 se muestra, de una manera global, el porcentaje de A-Ta por horas y para cada concentración de la MH; las olas que presenta el gráfico no son atribuibles a un efecto de bloqueo y posterior formación de picos de sincronía sino más bien al diferente comportamiento celular en los distintos meristemas de un mismo bulbo y frente a un mismo tratamiento.

Evans y Scott (28) observaron que las células que se encontraban iniciando su período replicativo eran las que mayor proporción de CA mostraban después de un tratamiento corto con la MH, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo en el que a concentraciones de 10^{-4} M se observaron CA durante las horas 3 y 6 de la recuperación, sugiriendo que a pesar de tratarse de una concentración relativamente diluida, se manifiesta el daño producido en el genoma, sólo durante las primeras horas de la recuperación; estos resultados también están de acuerdo con los de Heindorff et al. (41) quienes reportaron en *Vicia faba* que las células vegetales expuestas durante un corto tiempo a bajas concentraciones de agentes mutagénicos, presentan CA inmediatamente después del tratamiento, desapareciendo en horas posteriores, debido a que estas cé-

lulas pueden activar su sistema de reparación del ADN cuando el daño lo ha producido un agente alquilante, como es el caso de la MH, considerada como tal. A medida que las concentraciones de la droga son más fuer-

tes, aumenta su capacidad clastogénica a pesar de que el MI va disminuyendo drásticamente.

En la Tabla 2 se especifica, también por horas y para cada concentración, el tipo de

Tabla 2
Tipo de aberraciones cromosómicas en anafase y telofase, frente a las normales, expresadas por horas y por concentración de la hidrazida maleica (MH)

[MH] ¹	Horas	A-Tn ²	Aberraciones cromosómicas			
			R.C. ³	P.A. ⁴	Mcn. ⁵	% ± SD
5 · 10 ⁻⁴	3	47	5	4	1	17,5 ± 3,4
	6	29	3	-	-	9,4 ± 2,1
	9	47	5	3	-	14,5 ± 2,9
	12	16	4	1	1	37,5 ± 4,8
	15	18	2	2	-	18,2 ± 4,5
10 ⁻⁴	3	105	2	-	-	1,9 ± 1,1
	6	40	3	2	1	1,3 ± 0,7
	9	86	1	-	-	1,2 ± 0,9
	12	71	3	3	2	10,1 ± 2,1
	15	81	4	1	-	5,8 ± 0,7
10 ⁻⁵	3	160	2	-	-	1,2 ± 0,6
	6	133	1	2	-	2,2 ± 0,3
	9	101	1	-	-	0,9 ± 0,08
	12	175	4	1	1	3,3 ± 0,6
	15	202	-	-	-	-
10 ⁻⁶	3	227	3	-	-	1,3 ± 0,2
	6	171	1	1	1	1,7 ± 0,4
	9	138	-	-	-	-
	12	378	-	-	-	-
	15	288	-	-	-	-
10 ⁻⁷	3	331	-	-	-	-
	6	297	-	-	-	-
	9	268	-	-	-	-
	12	271	-	-	-	-
	15	307	-	-	-	-

¹[MH] = concentración molar de la hidrazida maleica. ²A-Tn = anafases y telofases normales. ³R.C. = roturas cromosómicas. ⁴P.A.: Puentes Anafásicos. ⁵Mcn.: Micronúcleos.

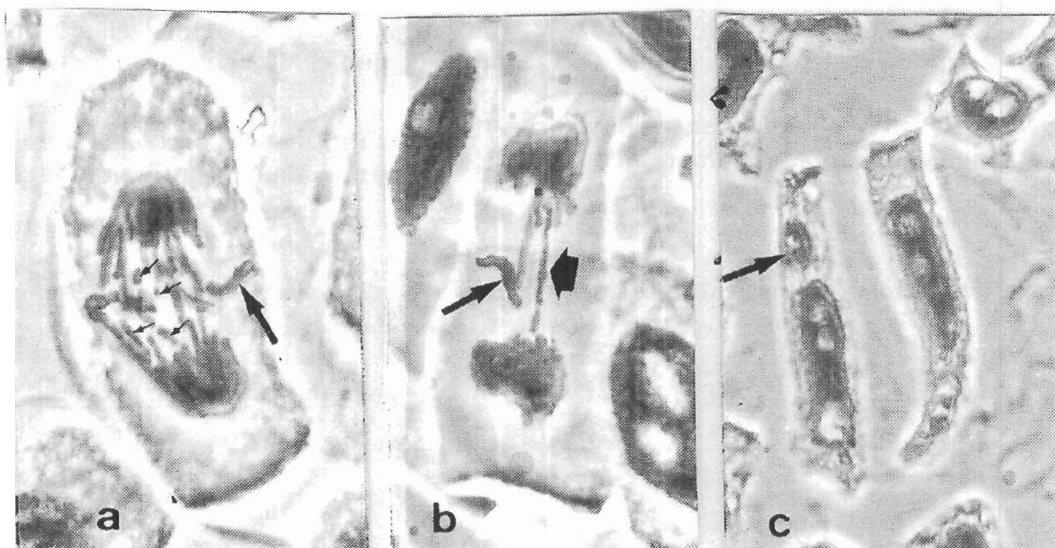


Figura 3. Aberraciones cromosómicas: a. roturas cromosómicas (flechas finas) y cromosoma "rezagado" (flecha gruesa); b. puentes anafásicos (flecha gruesa) y cromosoma "rezagado" (flecha fina) y c. micronúcleo (flecha).

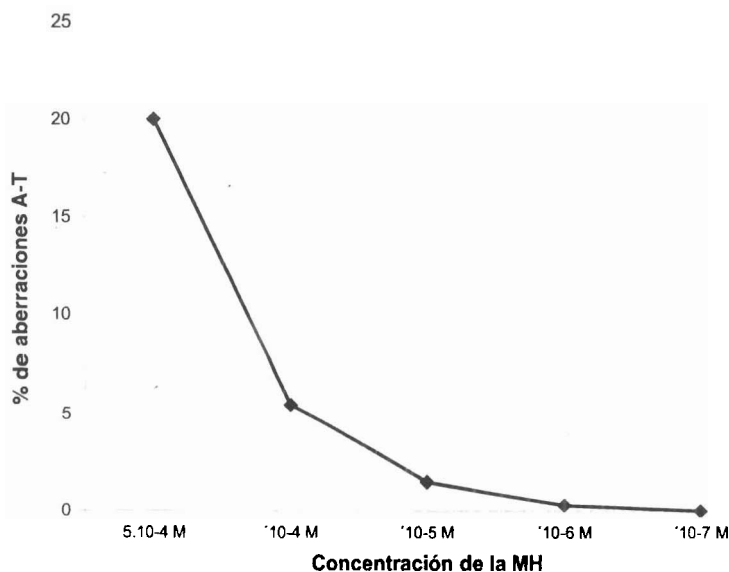


Figura 4. Anafases y telofases aberrantes (A-Ta) para cada concentración de MH, expresadas de una forma global.

alteraciones cromosómicas y su porcentaje; de los diferentes tipos que se pueden presentar (roturas, puentes cromosómicos, micronúcleos, desplazamientos de cromosomas, cromosomas pegajosos (stickiness), c-mitosis, endomitosis, etc.), solamente se

han visualizado roturas de cromosomas, puentes anafásicos y un pequeño porcentaje de micronúcleos, Figura 3 a,b y c y Tabla 2, por lo que la MH no parece ser un fuerte clastógeno en *Allium cepa*. En la Figura 4

se indican, de una manera global, estos efectos.

Detección de A-Ta por cancelación de las rutas de reparación por la cafeína

En la Figura 5 se describe el protocolo para el bloqueo, por la cafeína 3 mM, de la reparación postreplicativa del daño causado por la MH en las células meristemáticas de *Allium cepa*. La Figura 6 representa los resultados experimentales obtenidos de un tratamiento con el herbicida durante 1 h y a una concentración de 10^{-4} M, seguido de un

postratamiento con cafeína, de 2 h de duración y colchicina 0,05%; la MH se aplicó al comienzo del período S, mientras que la xantina durante G₂ y comienzo de la mitosis. También se obtuvieron con estos tratamientos, A-Ta del tipo roturas, puentes y micronúcleos, Figura 3 a,b y c. Como se observa en la Figura 6, la capacidad de la cafeína para incrementar severamente la frecuencia de aberraciones inducidas por la MH, aumenta a medida que disminuye la concentración del agente clastogénico lo que puede expresarse mediante un "factor de

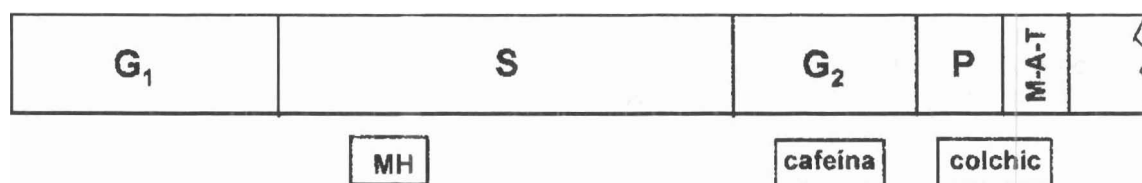


Figura 5. Protocolo experimental para el bloqueo, por la cafeína 3 mM, de la reparación postreplicativa del daño causado por la MH en las células meristemáticas de *Allium cepa*.

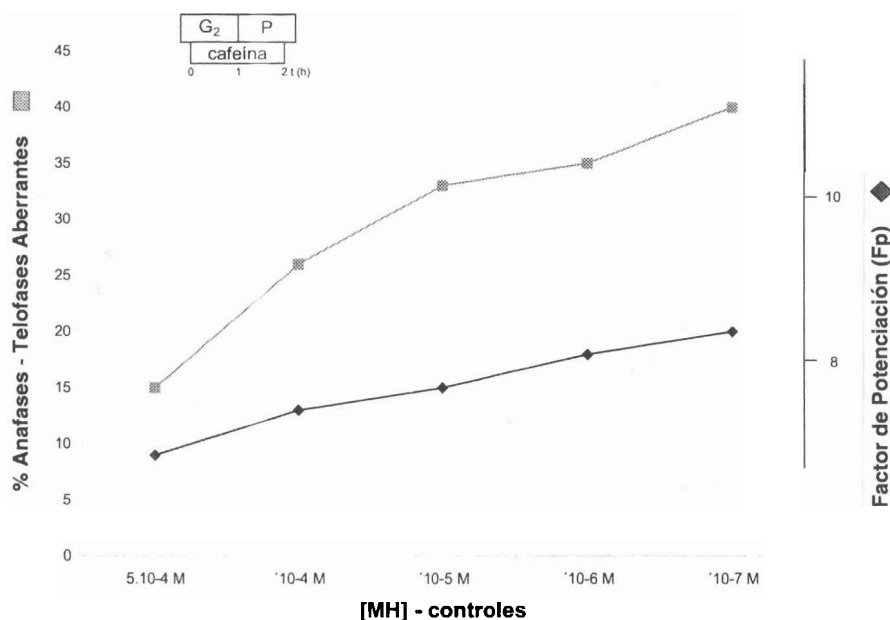


Figura 6. Aberraciones cromosómicas después de un tratamiento de 1 h de duración con MH a diferentes concentraciones, seguido de un tratamiento con cafeína 3 mM y de 2 h de duración y postratamiento con colchicina 0,05%. Se expresa también el "factor de potenciación" considerando a la MH 10^{-4} M como el agente inductor.

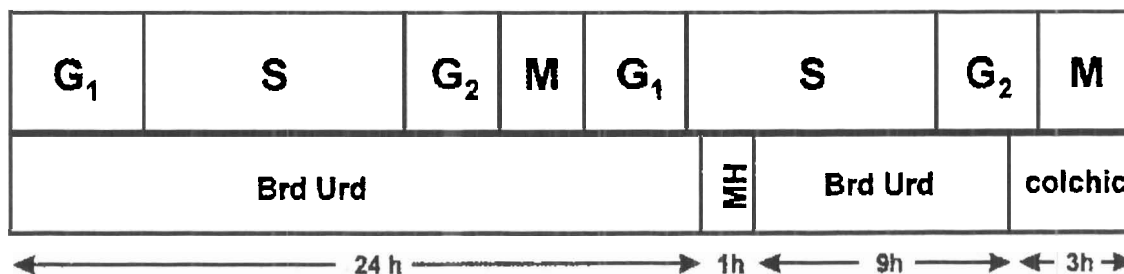


Figura 7. Protocolo experimental para el análisis de la efectividad de la MH para inducir intercambios entre cromátidas hermanas.

potenciación (Fp)", definido como la relación entre el tratamiento combinado (MH + cafeína) y la suma de los efectos del inductor y el agente potenciador (26); a medida que aumenta la concentración de la MH disminuye la capacidad de la cafeína para potenciar más A-Ta.

Valoración del intercambio entre cromátidas hermanas (SCE)

La Figura 7 representa el protocolo para el análisis de la efectividad de la MH para inducir SCE, Figura 2. Como puede observarse en la Figura 7, a la hora 24 de iniciado el tratamiento con la BrdUrd 10^{-4} M, se dieron postratamientos de 1 h de duración con el clastógeno coincidiendo con el comienzo del período S del segundo ciclo mitótico; las concentraciones utilizadas fueron de 10^{-4} M y 10^{-5} M.

Como se indica en la Figura 8, cuando un cromosoma se replica en presencia de BrdUrd, análogo de la timidina, durante 2 ciclos completos, las cromátidas hermanas poseen cada una 1 cadena polinucleotídica bromosustituida, permaneciendo la otra cadena como nativa al final de la primera ronda de replicación; después de la segunda replicación, también en presencia del análogo, las cromátidas hermanas poseen un número diferente de cadenas bromosustituidas lo que hace que adquieran propiedades diferentes de tinción, después de los sucesivos tratamientos por la técnica del FPG.

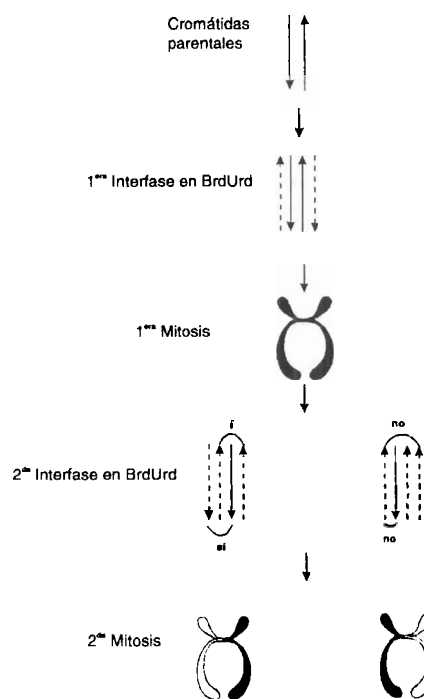


Figura 8. Diagrama de los patrones de marcación con BrdUrd y tinción diferencial de las cromátidas hermanas a lo largo de 2 ciclos celulares consecutivos, considerando que la replicación y segregación del ADN es semiconservativa. Las barras verticales representan las cadenas polinucleotídicas después de la replicación del ADN (las continuas son no-sustituidas y las punteadas bromosustituidas). Las cadenas polares facilitan SCE, no así las cadenas antiparalelas.

Este intercambio que se realiza entre cadenas polares es consecuencia de 3 momentos importantes durante la técnica del FPG:

1. el fluorocromo Hoechst 33258, al incorporarse lateralmente a la cadena de ADN, capta la energía que irradia la luz UV;
2. la irradiación UV es mucho mayor que la emitida por el fluorocromo y cuya diferencia se utiliza para crear radicales libres allí donde hay Br^- en la cadena de ADN. Según Hutchinson (42) la energía emitida disocia el Atomo del Br^- de la molécula de bromouracilo para producir un radical uracil que al tomar un átomo de H^+ de la desoxirribosa más próxima forma uracilo, responsable de las roturas en una de las cadenas para producir intercambios; y
3. la incubación en SSC 0.5X facilita esa separación del Br^- .

Estas 3 fases de la Técnica del FPG actúan de una manera cooperativa.

Frecuencia de SCE

Los 16 cromosomas que forman el cariotipo de *Allium cepa* son muy semejantes entre sí, excepto el par satelizado, lo que facilita el análisis de la frecuencia de SCE por cromosoma y por consiguiente, por célula. Por otro lado, dada la dificultad para distinguir los intercambios localizados muy cerca del centrómero, se siguió el criterio de no contabilizar los existentes a este nivel. Se analizaron 135 cromosomas de células tratadas con la MH a una concentración de 10^{-5} M, 93 cromosomas tratados con el herbicida [10^{-4} M] y 142 de los controles, determinándose el ajuste de las distribuciones de cromosomas con diferente número de intercambios observados experimentalmente a una distribución de Poisson calculada teóricamente a partir de las medias experimentales de cada caso, mediante un test de χ^2 .

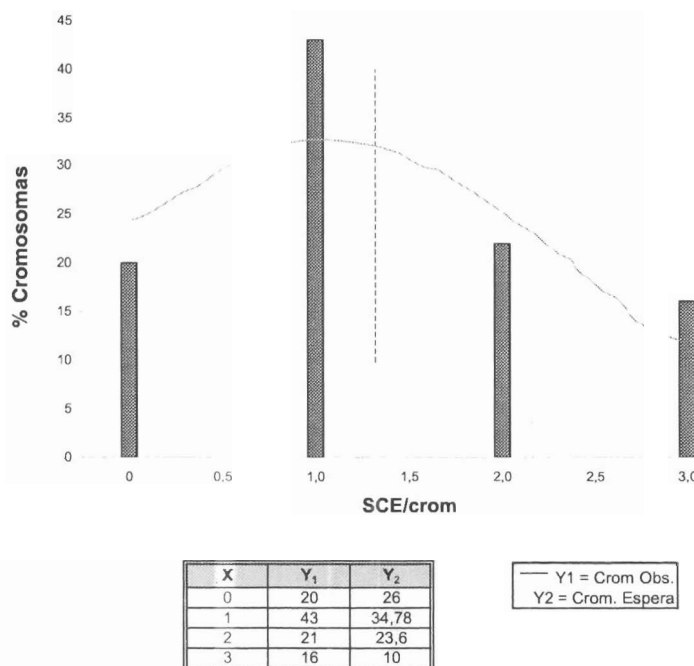


Figura 9a. Distribución de la frecuencia de cromosomas y número de SCE por cromosoma. La barra punteada representa el valor medio y las continuas los valores observados; la curva representa los porcentajes esperados, derivados de la distribución de Poisson: A. controles.

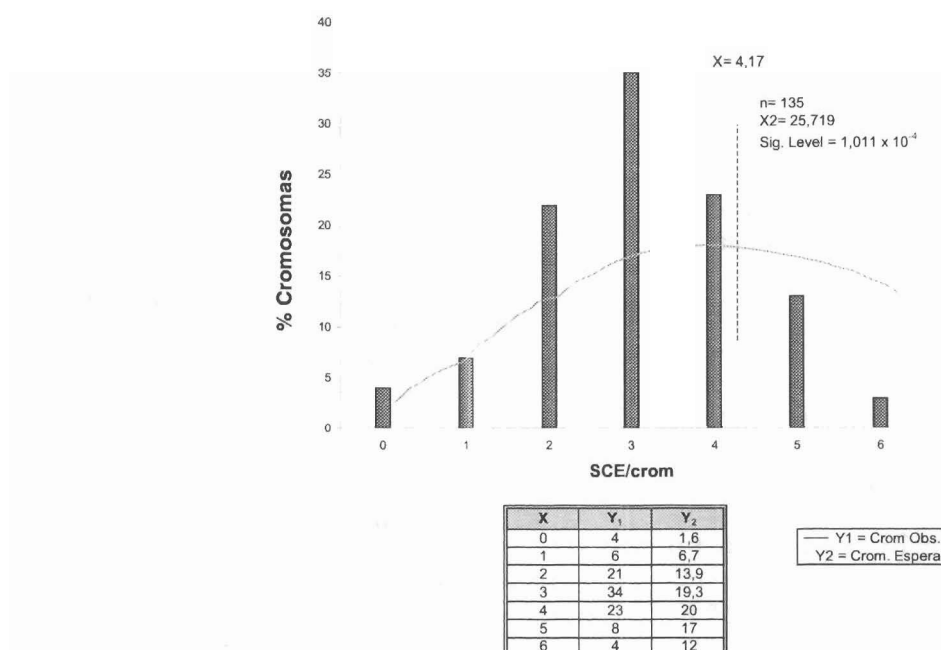


Figura 9b. Después de un tratamiento con MH 10^{-5} M.

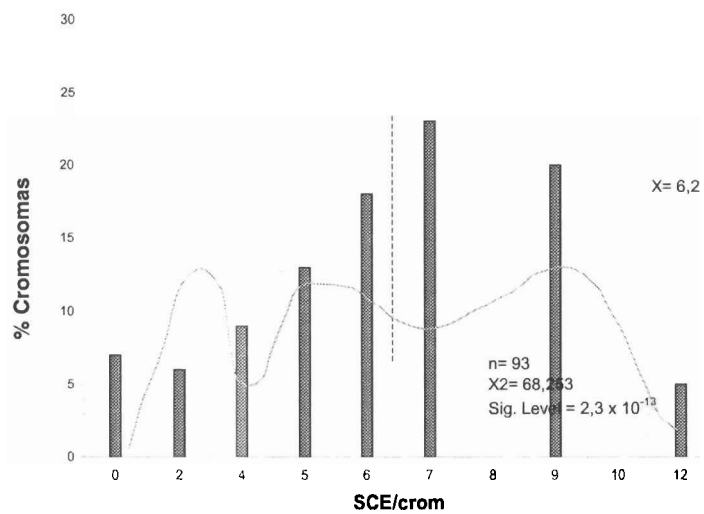


Figura 9c. Después de un tratamiento con MH 10^{-4} M.

La Figura 9 demuestra esta frecuencia de intercambios por cromosoma y su relación a la distribución de Poisson; de acuerdo al test del X^2 , las frecuencias observadas para la concentración 10^{-5} M se aproximan a las esperadas (9b), no así en el caso de [10^{-4} M] cuyos desajustes estarían de acuerdo con un daño más radical a las células meristemáticas en desarrollo (9c); esta aproximación entre las frecuencias observadas y esperadas se hace más evidente en el caso del control (9a).

Discusión

Observaciones preliminares

Los meristemas radicales de *Allium cepa* tienen una cinética de equilibrio dinámico caracterizada por un crecimiento constante que determina el mantenimiento de un número siempre fijo de células para cada fase del ciclo de división celular; por otra parte, un MI constante representa una cinética de equilibrio dinámico correspondiente a un desarrollo normal del meristemo (15).

Se ha encontrado que unas concentraciones de MH 10^{-4} M y 10^{-5} M, aunque deprimen el crecimiento por un descenso del MI adquiriendo nuevos equilibrios proliferativos, estos permanecen constantes a lo largo del tiempo, por lo que se han escogido estas concentraciones para los estudios citológicos correspondientes. Estos datos indicarían que este herbicida, una vez que entra a la célula, permanece en forma activa produciendo lesiones durante varios ciclos celulares.

La inducción de SCE y de CA, relativamente pocas en número y en diversidad, al contrario de otros agentes clastogénicos, podría explicarse por la presencia de radicales producidos en *Allium cepa* durante el metabolismo de la MH o deberse a que es fuertemente dependiente del pH, siendo menos efectiva a pH cercano a la neutralidad (43) como fueron las condiciones de este trabajo.

La MH y la inducción de CA

Para tratar de explicar la presencia de los distintos tipos de CA en células tratadas con MH, se puede inferir que el ADN puede cometer errores durante la replicación lo que puede originar, no sólo roturas de cadena sencilla y formación de puentes cromosómicos, sino también mutaciones; esto sucedería porque las polimerasas, que están implicadas en los procesos de reparación del genoma, tienen bloqueada su actividad por el herbicida, siendo inductor eficaz también de intercambios cuando el ADN contiene BrdUrd y está en proceso de replicación (16).

Con relación a la acción potenciadora de CA por la cafeína, Figura 6, aquella es mayor cuando las concentraciones de la MH son menores porque al ser más corta la duración del G2, la célula cuenta con menos tiempo para repararse (26), lo que sugiere que la cafeína impide que las células dañadas por la MH se reparen al acortarse el tiempo necesario para su recuperación antes de entrar a mitosis.

Aberraciones detectadas por SCE

La irradiación del ADN bromosustituido inhibe selectivamente la transcripción del genoma pero no su replicación (22); se sabe que el BrdUrd, conocido mutágeno, origina errores en el apareamiento de las bases aumentando la cantidad de CA y de SCE (28, 33, 43, 44); sin embargo, el ADN bromosustituido no representa problema alguno para el normal desarrollo del ciclo de división celular, al menos mientras las células estén resguardadas de la luz.

Se han observado SCE con un rango que va desde pequeñísimos puntos, "intercambios puntuales", que están en el límite de resolución del microscopio de luz hasta finísimas líneas que cruzan el espesor de las cromátidas, Figura 2; la presencia de estos intercambios puntuales apuntan a admitir esta hipótesis: como en G2 ya se ha completado la replicación del ADN quedando únicamente cortos segmentos sin replicar den-

tro de algunos replicones, la MH, activa aún dentro de la célula, provocaría estos fenómenos.

Los resultados obtenidos en *Allium cepa* indican que la MH a concentraciones de 10^{-4} M y 10^{-5} M provoca una mayor inducción de SCE cuando las células son tratadas con el herbicida al principio del período S, lo que está de acuerdo con los resultados de Schwartzman y Gutiérrez (45) y González-Gil y Navarrete (15); sin embargo, a medida que aumenta la concentración de la MH la situación va cambiando, de forma que a una concentración de 10^{-4} M las células afectadas por el pesticida se encuentran en una situación no replicativa, lo que indica que la MH actúa, a esta concentración, interfiriendo en el proceso normal de replicación.

La inducción de SCE por la MH no es un efecto aditivo al del BrdUrd sino que ambos agentes ejercen una acción sinérgica o cooperativa y se requieren nuevos y profundos estudios para llegar a comprender el significado de los intercambios entre cromátidas hermanas. Ahora bien, el hecho de que se observen SCE en los controles pudiera ser consecuencia de la rotura de las cadenas polinucleotídicas bromosustituidas, según las hipótesis de Kato (46).

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia por los aportes al desarrollo de este Trabajo; así mismo a Joseph Jay Ewald por la colaboración y asesoramiento prestados.

Referencias Bibliográficas

1. DASSO M., NEWPORT W. *Cell* 61:811-823, 1990.
2. ALLEN J.B., ZHOU Z., SIEDE W., FRIEDBERG E.C., ELLEDGE S.J. *Genes and Development* 8:2416-2428, 1994.
3. TOYN J.H., JOHNSON A.L., JOHNSTON L.H. *Molecular and Cellular Biology* 15 (10):5312-5321, 1995.
4. SRALLKNECHT G.F., GERRISON A.J., WALZ W.R., THORNBERG S.C. *Hort Science* 17:926-927, 1982.
5. SALAMA A.M. *Tropical Sciences* 27:233-238, 1987.
6. JENKINS P.D. *Tropical Sciences* 24:17-28, 1982.
7. RENAUD J.M., KELLER Y., VUILLAUME G. *Journal Chromatography* 604:243-246, 1992.
8. LEOPOLD A.C., KLEIN W.H. *Science* 114: 9, 1951.
9. HOFFMAN I., PARUPS E.V. *Residues Reviews* 7:96-104, 1964.
10. WELLWE L.W., BALL C.D., STELL H.M. *Plant Physiology* 32:196-199, 1952.
11. RAKITIN Y.V., VLADIMIRTSEVA S.V., NIKILAEVA L.N. *Soviet Plant Physiology* 21(3):493, 1994.
12. HARBER A., WHITE, Y.D. *Plant Physiology* 35:495-498, 1960.
13. MULLER M.A. *Journal of Food Science* 42:618-621, 1977.
14. PONNAMPALM R., MONDY N. *Journal of Food Science* 50:1246-1248, 1985.
15. GONZALEZ-GIL G., NAVARRETE H.M. *Mutation Research* 163:57-61, 1986.
16. NATAJARN A.T., KLASTERSKA I. *Hereditas (Lond.)* 79:150-154, 1975.
17. RIBAS G., SURRALLES J., CARBONELLE., XANEMA M., CREUS A., MARCOS R. *Mutagénesis* 11(3):221-227, 1996.
18. EPSTEIN S.J., ANDREA H., JEFFE S., JOSHI H., FALK H., MANTELL N. *Nature* 215:1388-1390, 1967.
19. DARLINGTON C.D., McLEISH J. *Mutation Research* 167:407-408, 1951.
20. McMANUS M.A. *Nature (Lond.)* 185:44-45, 1960.
21. KATO H. *Experimental Cell Research* 85: 238-247, 1974.

22. LATT S.A. **Proceeding National Academy Science (USA)** 71:3162-3166, 1974.
23. PERRY P., WOLF S. **Nature** 251:156-158, 1974.
24. TAYLOR J.H., WOODS P.S., HUGHES W.L. **Proceeding National Academy Science (Wash.)** 43:122-128, 1957.
25. SCHVARTZMAN J.B., CORTES F. **Chromosoma** 62:119-131, 1977.
26. DEL CAMPO A., ROMERO J. **Ciencia** 2(1): 7-16, 1994.
27. KIHLMAN B.A., KRONBORG D. **Chromosoma** 51:1-10, 1975.
28. EVANS J.H., SCOTT S. **Genetics** 49:48-61, 1963.
29. TURNER A.W., HODGETTS V.E. **Nature** 185:407-408, 1951.
30. RIEGER R., MICHAELIS A., NICOLOFF H. **Mutation Research** 140:99-102, 1984.
31. HEINDORFF K., MICHAELIS A., AURICH O., RIEGER R. **Mutation Research** 142: 23-27, 1985.
32. HEINDORFF K., AURICH O., RIEGER R., MICHAELIS A. **Mutation Research** 142: 183-186, 1985.
33. CORTES F., ESCALZA P., MATEOS S., DIAZ-RECASENS M. **Mutation research** 192:125-130, 1987.
34. MICHAELIS A., TAKCHISA S., RIEGER R., AURICH O. **Mutation Research** 173:187-191, 1986.
35. VALEMINSKY J., GICHNER T. **Mutation Research** 197:221-242, 1988.
36. RIEGER R., MICHAELIS A. **Mutation Research** 209:141-144, 1988.
37. RIEGER R., MICHAELIS A., TAKCHISA S. **Mutation Research** 244:31-35, 1990.
38. CESSNA A.J. **Pestic Sci** 33:169-176, 1991.
39. HONGYN Y., ZILI Z. **Mutation Research** 272:125-131, 1992.
40. MICHAELIS A., RIEGER R. **Mutation Research** 302:157-160, 1993.
41. HEINDORFF K., RIEGER R. **Biologisches Zentralblatt** 103:9-23, 1984.
42. HUTCHINSON F. **Quarterly Review of Biophysics** 6:201-246, 1973.
43. GONZALEZ-FERNANDEZ A., HERNANDEZ P., LOPEZ-SAEZ J.F. **Mutation Research** 149:275-281, 1985.
44. KANAYA N., GILL B.S., GROVER I.S., MURIN A., OSIECKA R., SASDHU S.S. **Mutation Research** 310:231-247, 1994.
45. SCHVARTZMAN J.B., GUTIERREZ C. **Mutation Research** 72:483-489, 1980.
46. KATO H. **Chromosoma (Berl.)** 59:179-191, 1977.