

## Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.)

Letty Marcano\*, Xiomara Montiel, Ingrid Carruyo, María del Pilar Bracho  
y Lorena Atencio

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia  
Apartado 526. Maracaibo 401f. Venezuela

Recibido: 04-11-97 Aceptado: 25-06-98

### Resumen

Se estudió el efecto mitotóxico y genotóxico del Cadmio a diferentes concentraciones (3.4, 4.9 y  $9.9 \times 10^{-5}$  M) y tiempo de exposición (24.48 y 72 horas). Los bulbos se cultivaron en agua filtrada, a 25°C con aireación constante. El tratamiento se realizó, en las mismas condiciones de cultivo, utilizando solución acuosa de cadmio a la concentración respectiva. Se observó una disminución del crecimiento de las raíces y del índice mitótico de una forma dependiente del tiempo y la concentración utilizada. Las células tratadas presentan irregularidades en el núcleo y alteraciones de la morfología cromosomal, tales como: "Stekinesis", efecto c-mitótico, aneuploidía, poliploidía, formación de puentes cromosómicos en anafase, presencia de cromosomas aislados y micronúcleos. Se concluye que el cadmio induce un efecto mitotóxico y genotóxico sobre poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L, cuya intensidad depende de la concentración y el tiempo de exposición.

**Palabras clave:** Aberraciones cromosómicas; cadmio; células meristemáticas; índice mitótico.

## Mitotoxic and genotoxic effect of cadmium on *Allium cepa* L. meristematic cells

### Abstract

Mitotoxic and genotoxic effects of Cadmium was studied at different concentrations (3.4, 4.9, and  $9.9 \times 10^{-5}$  M) and exposure times (24.48 and 72 hours) on ALLIUM CEPA L. Bulbs were cultivated on filtrate tap water at 25°C with constant aeration. Treatments were done by using aqueous cadmium solutions at different concentrations on meristematic tissues. A direct effect was observed between a slower root growth and mitotic index and cadmium concentration and exposure time. Nuclear irregularities and abnormal chromosomal morphology were also observed, like stickiness, c-mitotic effect, Aneuploid and Polyploid cells, chromosome bridges formation during anaphase, isolated chromosomes and micronucleus. From those results, a mitotoxic and genotoxic effect was induced by Cadmium concentration and exposure on meristematic populations of *Allium cepa* L.

**Key words:** Cadmium; chromosomal aberration; mitotic index; root tip cells.

\* Autor para la correspondencia.

## Introducción

Se ha establecido que, de todos los metales tóxicos encontrados en el ambiente y utilizados en la industria, el cadmio ( $\text{Cd}^{+2}$ ) presenta características particulares que lo llevan a considerar como uno de los más peligrosos desde el punto de vista de la contaminación ambiental (1).

El cadmio es un elemento tóxico a dosis bajas, presenta un largo período de vida media (30 años aproximadamente en humanos), baja frecuencia de excreción por parte del organismo, y se acumula, predominantemente, en los tejidos blandos como hígado, riñón y gónadas (2-4).

Se han reportado varios trabajos que establecen una variedad de alteraciones producidas por el cadmio en muchos tejidos. En tejidos animales induce despolimerización de la actina (5), incremento de osteoclastos maduros (6) y activación de oncogenes (7). En cultivos de líneas celulares establecidas como CHO, produce perturbaciones del crecimiento y aberraciones cromosómicas (8) y en cultivos de células del riñón humano (células 293), es capaz de inducir apoptosis (9). Con la excepción de los hallazgos en *Vicia faba* por Mo y Li (10) y en *Hordeum vulgare* por Zhang y Yang (11), las investigaciones citológicas sobre el efecto contaminante del cadmio en cultivos de células meristemáticas han sido escasas.

Con el propósito de ampliar los conocimientos del efecto citotóxico del cadmio en cultivos de células meristemáticas, se estudian las alteraciones producidas por este metal a diferentes tiempos y concentraciones sobre el crecimiento de los tejidos meristemáticos; división celular y morfología nuclear y cromosomal en *Allium cepa* L.

## Materiales y Métodos

Como material de estudio se utilizaron meristemos de cebolla (*Allium cepa*), ya que por sus características particulares (bajo

costo, facilidad de manipulación, cromosomas fáciles de observar, etc.), se considera como uno de los mejores modelos biológicos para el estudio del efecto de contaminantes ambientales, y los resultados obtenidos con este modelo son extrapolables a cualquier otro sistema biológico (12-14).

Los bulbos de cebolla se mantienen en agua filtrada, renovada cada 24 horas, a temperatura constante de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  y aireación continua a razón de 10 - 20 ml de aire por minuto. Una vez que las raíces alcanzaban de 2 a 3 cm de longitud se sumergían en una solución acuosa de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), a concentraciones de 3,4, 7,4 y  $9,9 \cdot 10^{-5}$  M (5, 10 y 20 ppm respectivamente). Se realizaron tratamientos de 12, 24, 48 y 72 horas de duración, renovando la solución cada 24 horas. Para cada concentración y tiempo de tratamiento se realizó un control en el cual la solución de cadmio fue sustituida por agua destilada. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado. Las raíces fueron medidas una por una y para cada tiempo se cortaron cuatro raíces para realizarles el estudio citológico, para lo cual se fijaron en una mezcla de alcohol-ácido acético glacial a una proporción 3:1 por 24 horas, para luego ser teñidas por las técnicas de Fucsina Básica (15) y/o Orceína acético-clorhídrica (16). Se analizaron un promedio de 3000 células para el estudio del índice mitótico, observándose las anomalías cromosómicas de las células en división.

Se realizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las células tratadas y los controles ( $p < 0,05$  o  $p < 0,01$ ).

## Resultados y Discusión

### Efecto del cadmio sobre el crecimiento de la raíz

Se pudo observar que a medida que aumenta la concentración de cadmio y se prolonga el tiempo de exposición de los meristemos, se produce un retardo significativo en

## Introducción

Se ha establecido que, de todos los metales tóxicos encontrados en el ambiente y utilizados en la industria, el cadmio ( $\text{Cd}^{+2}$ ) presenta características particulares que lo llevan a considerar como uno de los más peligrosos desde el punto de vista de la contaminación ambiental (1).

El cadmio es un elemento tóxico a dosis bajas, presenta un largo período de vida media (30 años aproximadamente en humanos), baja frecuencia de excreción por parte del organismo, y se acumula, predominantemente, en los tejidos blandos como hígado, riñón y gónadas (2-4).

Se han reportado varios trabajos que establecen una variedad de alteraciones producidas por el cadmio en muchos tejidos. En tejidos animales induce despolimerización de la actina (5), incremento de osteoclastos maduros (6) y activación de oncogenes (7). En cultivos de líneas celulares establecidas como CHO, produce perturbaciones del crecimiento y aberraciones cromosómicas (8) y en cultivos de células del riñón humano (células 293), es capaz de inducir apoptosis (9). Con la excepción de los hallazgos en *Vicia faba* por Mo y Li (10) y en *Hordeum vulgare* por Zhang y Yang (11), las investigaciones citológicas sobre el efecto contaminante del cadmio en cultivos de células meristemáticas han sido escasas.

Con el propósito de ampliar los conocimientos del efecto citotóxico del cadmio en cultivos de células meristemáticas, se estudian las alteraciones producidas por este metal a diferentes tiempos y concentraciones sobre el crecimiento de los tejidos meristemáticos; división celular y morfología nuclear y cromosomal en *Allium cepa* L.

## Materiales y Métodos

Como material de estudio se utilizaron meristemos de cebolla (*Allium cepa*), ya que por sus características particulares (bajo

costo, facilidad de manipulación, cromosomas fáciles de observar, etc.), se considera como uno de los mejores modelos biológicos para el estudio del efecto de contaminantes ambientales, y los resultados obtenidos con este modelo son extrapolables a cualquier otro sistema biológico (12-14).

Los bulbos de cebolla se mantienen en agua filtrada, renovada cada 24 horas, a temperatura constante de  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y aireación continua a razón de 10 - 20 ml de aire por minuto. Una vez que las raíces alcanzaban de 2 a 3 cm de longitud se sumergían en una solución acuosa de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), a concentraciones de 3,4, 7,4 y  $9,9 \cdot 10^{-5}$  M (5, 10 y 20 ppm respectivamente). Se realizaron tratamientos de 12, 24, 48 y 72 horas de duración, renovando la solución cada 24 horas. Para cada concentración y tiempo de tratamiento se realizó un control en el cual la solución de cadmio fue sustituida por agua destilada. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado. Las raíces fueron medidas una por una y para cada tiempo se cortaron cuatro raíces para realizarles el estudio citológico, para lo cual se fijaron en una mezcla de alcohol-ácido acético glacial a una proporción 3:1 por 24 horas, para luego ser teñidas por las técnicas de Fucsina Básica (15) y/o Orceína acético-clorhídrica (16). Se analizaron un promedio de 3000 células para el estudio del índice mitótico, observándose las anomalías cromosómicas de las células en división.

Se realizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las células tratadas y los controles ( $p < 0,05$  o  $p < 0,01$ ).

## Resultados y Discusión

### Efecto del cadmio sobre el crecimiento de la raíz

Se pudo observar que a medida que aumenta la concentración de cadmio y se prolonga el tiempo de exposición de los meristemos, se produce un retardo significativo en

el crecimiento de las raíces (Figura 1), similar al reportado en otras plantas tales como *Heliantus* (17), *Vicia faba* (10), y *Hordeum vulgare* (11).

La concentración a la cual se produce el 50% de la restricción del crecimiento ( $CE_{50}$ ) fue calculada por la diferencia porcentual del crecimiento de los meristemos expuestos al cadmio con respecto al control para cada una de las concentraciones de cadmio utilizadas, dicho valor corresponde a  $4,2 \times 10^{-5}$  M (Figura 2).

La alta toxicidad del metal a concentraciones tan bajas podría explicarse porque el

poder de penetración del cadmio en las plantas, es mucho mayor a la de otros metales pesados (18).

Asimismo, se observó que los meristemos expuestos a concentraciones de  $7,4$  y  $9,9 \times 10^{-5}$  M por más de 48 horas, tienden progresivamente a oscurecerse, engrosarse y finalmente, a encorvarse en forma de gancho, de una manera dosis- y tiempo- dependiente, cambios que son indicadores de muerte celular (13).

#### Efecto sobre el índice mitótico

El índice mitótico (IM), se considera como un parámetro que refleja la frecuencia

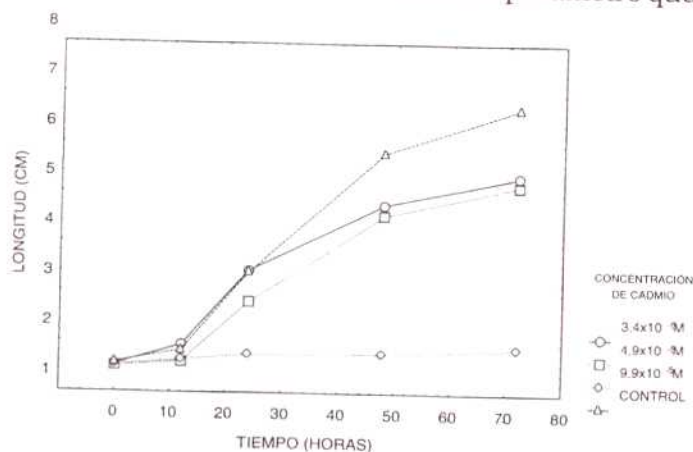


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de  $Cd^{+2}$  ( $3,4$ ,  $4,9$  y  $9,9 \times 10^{-5}$  M) a diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72 horas) sobre los meristemos de *Allium cepa* L.

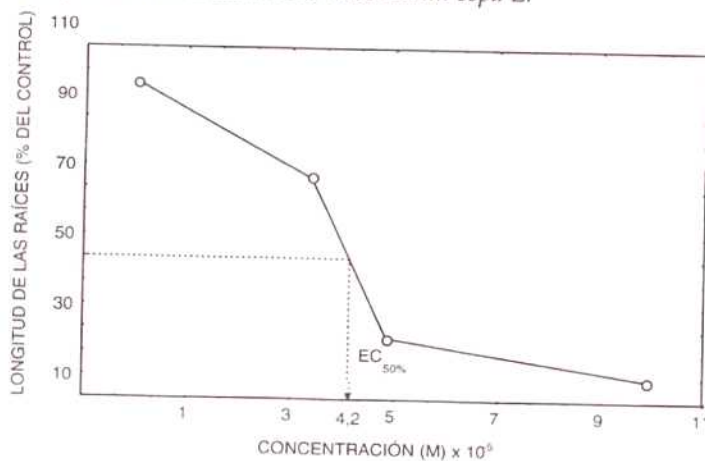


Figura 2. Curva donde se determina la concentración en la cual se produce el 50% de la inhibición del crecimiento ( $EC_{50}$ ), de los meristemos expuestos al  $Cd^{+2}$  con respecto al control.

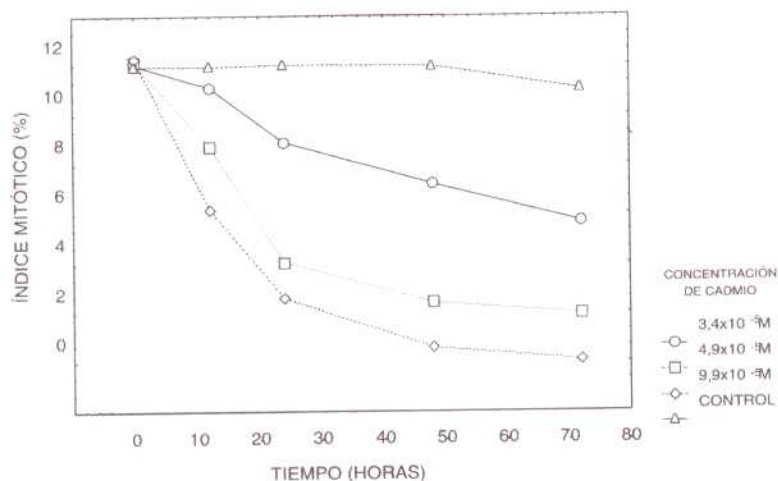


Figura 3. Efecto del  $Cd^{+2}$  a diferentes concentraciones y tiempo de tratamiento sobre el índice mitótico en poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L.

de la división celular y la velocidad de crecimiento de los meristemas. La Figura 3 muestra que el IM de las raíces tratadas con cadmio, disminuye a medida que aumenta la concentración de cadmio de forma altamente significativa tanto para la concentración de cadmio como con respecto al aumento del tiempo ( $F= 60,53$ ,  $p< 0,01$ ; y  $F= 147,43$ ;  $p< 0,01$  respectivamente). El efecto es acumulativo, produciéndose un bloqueo completo de la división celular a una concentración de  $9,9 \times 10^{-5}$  M y por tiempo prolongado (48 horas). Los resultados coinciden con los reportados por otros autores en otros sistemas biológicos (17, 10, 11, 8), reflejando la extrema toxicidad que presenta el cadmio en las células expuestas y van acorde con los reportes en los cuales se involucra al cadmio como un agente causal de varias enfermedades (6, 19, 20, 21).

#### Cambios morfológicos nucleares

Los resultados muestran que, a concentraciones de  $7,4$  y  $9,9 \times 10^{-5}$  M, el cadmio induce cambios morfológicos en el núcleo de las células tratadas. La Figura 4a muestra la morfología típica del núcleo de una célula control en interfase; en la Figura 4b se observa que el tamaño y la forma del núcleo se incrementan hasta adquirir un aspecto

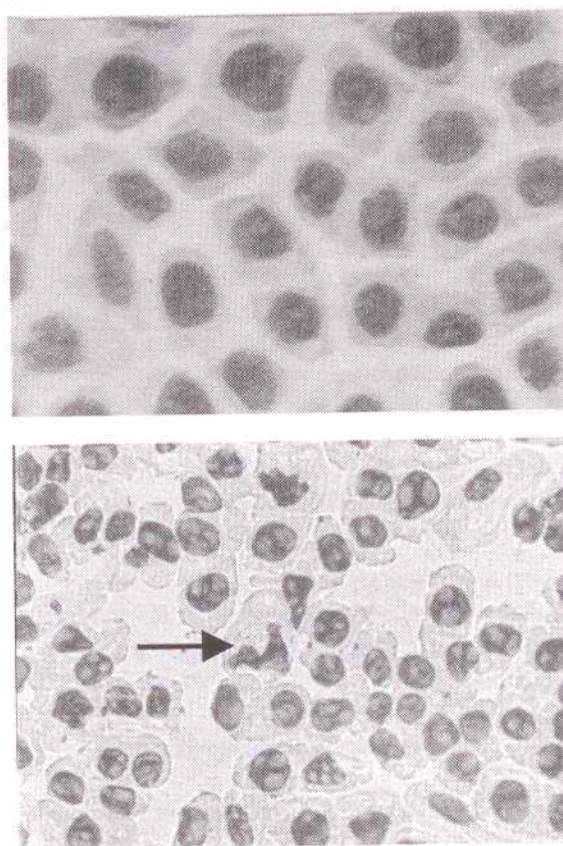


Figura 4. Fotografía de células interfásicas. a. Núcleo de célula control (40X). b. Núcleo de células tratadas con  $Cd^{+2}$  (40X).

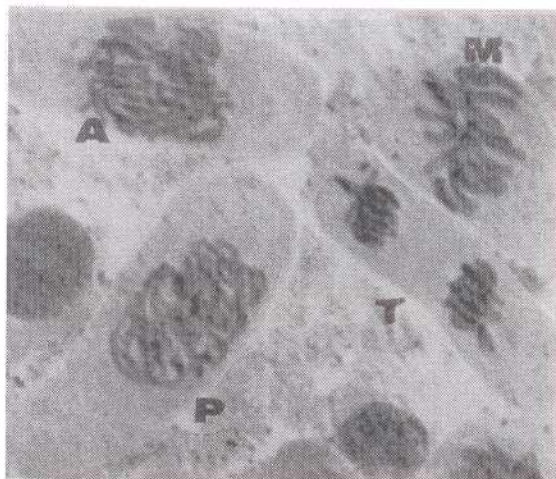


Figura 5. Fotografía que muestra las características morfológicas del núcleo en las células control en diferentes etapas del ciclo de división celular: Profase (P); Metafase (M); Anafase (A); Telofase (T) (100 X).

pseudolobulado. Este efecto está acompañado por un aumento de la condensación de la cromatina, distribuida irregularmente en la periferia del núcleo. Estos cambios coinciden con los reportados en la literatura como características morfológicas asociados con apoptosis en células de mamíferos por efecto del cadmio (9); sin embargo, se requieren mayores estudios para confirmar esta posibilidad.

### Cambios en los cromosomas

Todas las concentraciones utilizadas afectan la morfología y organización de los cromosomas. La Figura 5 muestra las características morfológicas del núcleo en las células en diferentes etapas del ciclo de división celular y los diferentes cambios en la organización y morfología de los cromosomas en las células expuestas al cadmio se observan en la Figura 6. Se pudo evidenciar inducción de "Stekinesis" (Figura 6a), fenómeno que se produce por un doblamiento erróneo de las fibras de los cromosomas dentro de las cromátidas hermanas, de tal forma que los cromosomas permanecen

unidos unos con otros por puentes subcromátidos (22). Este efecto es irreversible e indicativo de alta toxicidad, lo cual probablemente conduzca a muerte celular (13). A concentraciones de  $4,9 \times 10^{-5}$  M para todos los tiempos de exposición, se observa el fenómeno conocido como c-mitosis (Figura 6b). Esta anomalía se produce como resultado del bloqueo en la formación de las fibras del huso, de tal manera que se inhibe la migración de los cromosomas en anafase, y debe su nombre a que se describió por primera vez en células tratadas con colchicina (23). También se observó la formación de puentes cromosómicos en anafase, que pueden producirse bien sea por la ruptura de los cromosomas o de las cromátidas, o como consecuencia de la Stekinesis descrita anteriormente. Se observaron dos tipos de puentes anafásicos: uno donde se involucran uno o más cromosomas (Figura 6c), y otro donde se observa la anafase con Stekinesis (Figura 6d), estas anomalías se presentan a partir de 48 horas de exposición para todas las concentraciones utilizadas. También se pudo observar lo que se conoce como cromosomas aislados (Figura 6e), los cuales también son indicativos de toxicidad y probablemente sean producto del fenómeno c-mitótico, siendo considerada su presencia como un inductor de aneuploidías y poliploidías (13). Estas alteraciones del número cromosómico también fueron observadas en este trabajo, aunque con muy poca frecuencia, bajas concentraciones ( $3,4 \times 10^{-5}$  M) y con poco tiempo de exposición (24 horas) (Figura 6f y 6g). Otra aberración cromosómica observada a concentraciones altas  $4,9$  y  $9,9 \times 10^{-5}$  M y con un tiempo de exposición prolongado (48 y 72 horas), fue la presencia de micronúcleos (Figura 6g), posiblemente producto de la aneuploidía o a la desigual distribución del material genético. Estos resultados corroboran lo anteriormente expresado en relación con la extrema toxicidad del cadmio en el crecimiento, efecto mitotóxico, así como por su efecto genotóxico, al inducir diferentes tipos de aberraciones, reversibles o no, que pueden conducir a la muerte celu-

lar. Resultados similares se han obtenido en otros sistemas biológicos. Zhang y Yang (11), reportaron varias anomalías similares a las descritas en este trabajo. Liu y Jiang (14), utilizando semillas de *Allium cepa* expuestas a cloruro de cadmio, sólo observaron el efecto c-mitótico y la Stekinesis; en nuestras condiciones experimentales la sensibilidad de los meristemos al cadmio fue mayor, ya que se observó una gran variedad de aberraciones en todas las concentraciones utilizadas y en todos los tiempos de exposición.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el cadmio produce efectos mitotóxicos y genotóxicos en las células meristemáticas de *Allium cepa* L, los cuales se reflejan en un bloqueo del crecimiento e índice mitótico, alteraciones morfológicas del núcleo y la inducción de diferentes aberraciones cromosómicas que demuestran la alta toxicidad del metal.

### Agradecimiento

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia y al CONDES por el financiamiento parcial de esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. RENGEL DE ZAMBRANO I., CHUNG K., BOLAÑOS J., FERMIN J. *Ciencias* 1:13-25, 1993.
2. KOJIMA S., KAMINAKA K., KIYOZUMI M., HOND T. *Toxicol Appl Pharm* 83:516-524, 1986.
3. RUPARELIA S.G., VERMA Y., SAIYED S.R., RAWALD V.M. *Environ Contam Toxicol* 45:305-312, 1990.
4. GHAZALY K S. *Water Air Soil Pollu.* 64:551-559, 1992.
5. WANG Z., TEMPLETON D.M. *Toxicol Appl Pharm* 139:115-121, 1996.
6. WILSON A.K., CERNY E.A., SMITH D. *Toxicol Appl Pharm* 140:451-460, 1996.
7. SMITH J.B., SMITH L., PIJUAN V., ZHUAN G., CHEN Y.C. *Environ Health Persp* 102 (Suppl 3):181-189, 1994.
8. DEAVEN L.L., CAMPBELL E.W. *Cytogenet Cell Genet* 26:251-260, 1980.
9. HAMADA T., SASAGURI T., TANIMOTO A., ARIMA N., SHIMAJIRI S., ABE T., SAGURI Y. *Biochem Bioph Res Co* 219:829-834, 1996.
10. MO W.H., LI M. *Chinese Bull Bot* 9:30-34, 1992.
11. ZHANG Y., YANG X. *Mutation Res* 312:121-126, 1994.
12. LIU D., JIANG W., WANG W., ZHAI L., LIU D. H., JIANG W. S., WANG W., ZHAI L. *Israel J Plant Sci* 43(2):125-133, 1995.
13. FISKESJÖ G. *Hereditas* 102:99-112, 1985.
14. LIU D. H., JIANG W. S. *Hereditas* 115: 213-219, 1991.
15. LI M.X. *Bull Biol* 5:53-xx, 1982.
16. TIJO J., LEVAN A. *Analysis Ann Estac Exptl Aula Dei* 2:21-64, 1950.
17. CHAKRAVARTY B., SRIVASTAVA S. *Mutation Res* 283:287-294, 1992.
18. STOEPLER M. Metals and Their Compounds in the Environment. VGH. E. Mariam (De). Weinheim. pp. 803-851, 1991.
19. TSUCHIYA K. (a). Causation of ouch-ouch disease I. Keijo. *J Med*: 18-81, 1969.
20. TSUCHIYA K. (b). Causation of ouch-ouch disease II. Keijo. *J Med*: 18-195, 1969.
21. WALKES M., REHM S., SAAS B., KONISHI N., WARD M. *Research* 55:40-50, 1991.
22. KLASTERSKA I., NATARANJA A.T., RAMEL C. *Hereditas* 83:153-162, 1976.
23. LEVAN A. *Hereditas* 24:471-486, 1938.

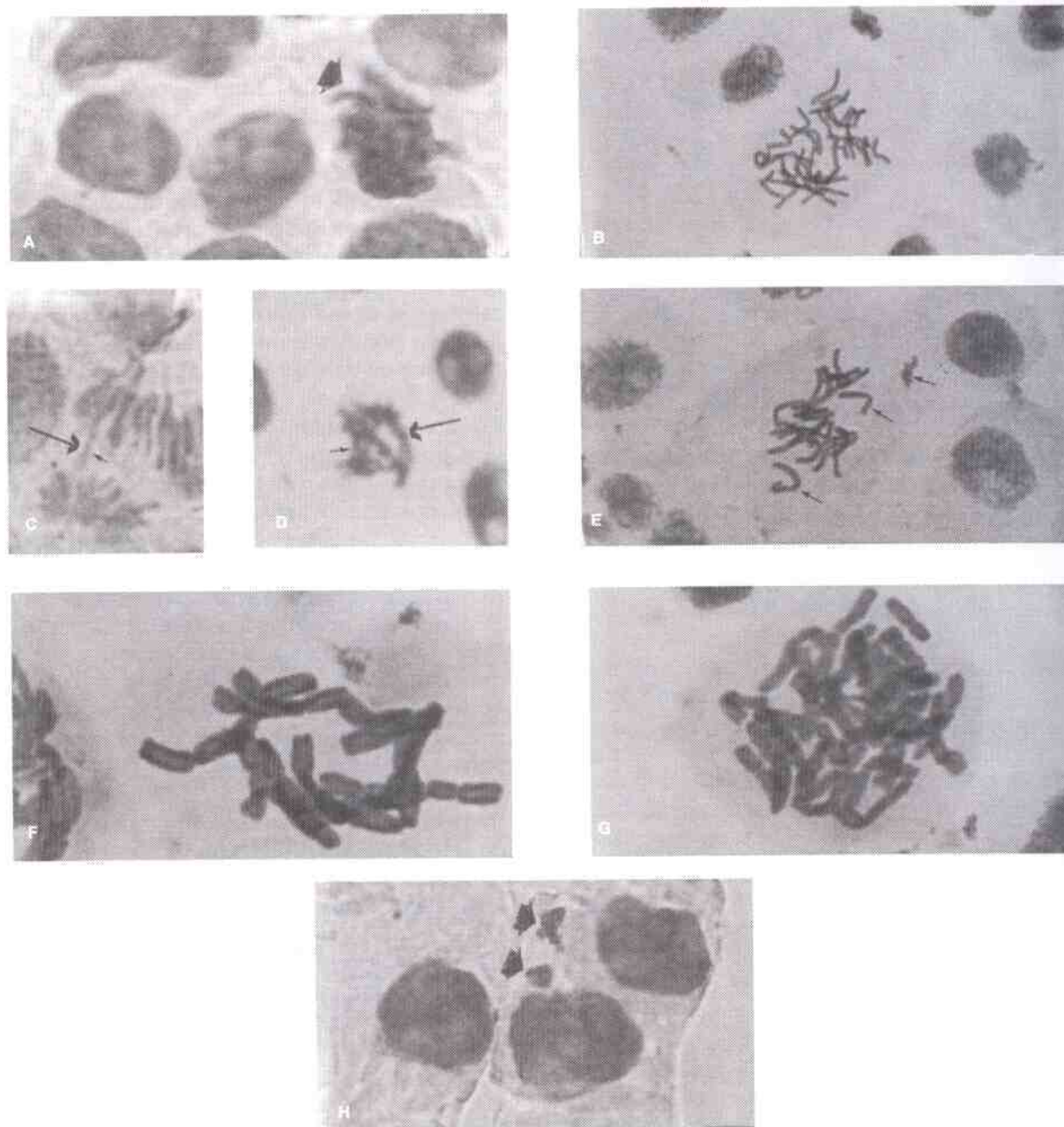


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de cloruro de cadmio sobre la organización y morfología de los cromosomas en meristemas radiculares de *Allium cepa* L.

- a. cromosoma en estekinesis ( $9,9 \times 10^{-5}$  M. 48 h).
- b. efecto C-mitótico ( $4,9 \times 10^{-5}$  M. 24 h).
- c y d. puentes anafásicos ( $4,9 \times 10^{-5}$  M. 48h).
- e. cromosomas aislados ( $4,9 \times 10^{-5}$  M. 48 h).
- f. aneuploidía ( $3,4 \times 10^{-5}$  M. 24h).
- g. poliploidía ( $3,4 \times 10^{-5}$  M. 24h).
- h. micronúcleo ( $9,9 \times 10^{-5}$  M. 72h) (100 X).