

**EFFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR
EL PLOMO EN MERISTEMOS RADICULARES
DE CEBOLLA (*ALLIUM CEPA*)**

INGRID CARRUYO, YUSMARY FERNÁNDEZ, LETTY MARCANO,
XIOMARA MONTIEL Y ZAIDA TORREALBA

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del
Zulia, Apartado 526, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela
Telefax: (58-261) 7598109, yncarr24@hotmail.com

Resumen. Se determinó el efecto mitotóxico, citotóxico y genotóxico del plomo en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa*). Los bulbos crecieron en agua filtrada, renovada cada 24 h, a temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, en oscuridad y con aireación constante. El tratamiento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales, utilizando solución acuosa de cloruro de plomo a 0,25; 0,50; 0,75 y 1,0 ppm por 0, 12, 24, 48 y 72 h. Los meristemas se fijaron en alcohol-ácido acético (3:1) y se colorearon con la técnica de Feulgen. El crecimiento de la raíz y el índice mitótico disminuyeron, al aumentar la concentración y el tiempo de exposición al metal. También se observaron alteraciones morfológicas, irregularidades nucleares y morfología cromosomal anormal como estekinesis, puentes anafásicos y micronucleos. Los resultados infieren un efecto mitotóxico, citotóxico y genotóxico dependiente de la concentración y tiempo de exposición inducido por el plomo.

Palabras clave: *Allium cepa*, cebolla, citotóxico, genotóxico, mitotóxico, meristemas, plomo.

**TOXIC EFFECT OF LEAD
IN MERISTEMATIC ONION CELLS (*ALLIUM CEPA*)**

Abstract: We determined the mito-, cyto- and genotoxic effects of lead in onion root cells (*Allium cepa*). Bulbs were cultivated in filtered water (renewed every 24 h), $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ temperature, darkness, and with constant aeration. Treatments were carried out under similar experimental conditions, using 0.25,

Recibido: 23 Febrero 2006 / Aceptado: 02 Noviembre 2006
Received: 23 February 2006 / Accepted: 02 November 2006

0.5, 0.75 and 1.0 ppm lead chloride solutions for 0, 12, 24, 48 and 72 h. After treatment, meristems were fixed with alcohol-acetic acid (3:1) and colored using the Feulgen technique. Root growth and mitotic index were inversely proportional to lead concentration and exposure time. Also, morphological alterations, nuclear irregularities and abnormal chromosomal morphology were observed as stickiness, anaphase chromosome bridges and micronuclei. The results infer a mito-, cyto- and genotoxic effect directly proportional to lead concentration and exposure time.

Key words: *Allium cepa*, cytotoxic, genotoxic, lead toxicity, mitotoxic, onion cells, root tips.

INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb^{+2}) es un elemento de gran interés toxicológico, ya que la exposición al mismo puede causar un variado rango de efectos adversos a la salud humana, como aumento de la presión sanguínea, problemas de fertilidad, desordenes nerviosos, dolores musculares y de las articulaciones, irritabilidad y problemas en la concentración o la memoria (Borjesson *et al.*1997). Los niños son más vulnerables a enfermarse debido a que su sistema nervioso central está aún en formación (Patocka y Cerny 2003). Aún a muy bajos niveles de exposición, puede causar reducción del coeficiente intelectual (IQ), trastornos en el aprendizaje, déficit de atención, problemas de conducta, retardo en el crecimiento, daños en el riñón e incluso la muerte a niveles altos de exposición (García y Dorrsonso 2002, Patocka y Cerny 2003). Su gran versatilidad de usos en la fabricación de contenedores de alimentos, alambiques, baterías, pintura, cueros, aleaciones, llevan a considerar la contaminación por este metal como un problema de salud ocupacional (Borjesson *et al.*1997, USEPA 2000).

Estudios llevados a cabo en plantas han demostrado que el plomo se absorbe fundamentalmente del suelo y solamente en pequeñas cantidades del aire, afectando la absorción de nutrientes minerales, el crecimiento y procesos metabólicos, tales como la fotosíntesis, la respiración, la actividad amitótica y la división celular de semillas en germinación de varias especies de plantas (Wierzbicka 1999, Wong y Li 2002). Xiong (1997), en estudios realizados con *Sonchus oleraceus*, observó una disminución en el contenido de clorofila, longitud y

biomasa, con un aumento de la actividad de peroxidasas (POD), cuando el contenido de plomo en el tejido de las plantas se incrementó. Donghua *et al.* (1994), en meristemas de *Allium cepa*, reportaron que el metal inhibe el crecimiento de las raíces y causa anomalías cromosómicas, incluyendo c-mitosis, puentes anafásicos y estekinesis. Marcano *et al.* (2001) encontraron una inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducida por el metal.

Con el propósito de ampliar los conocimientos del efecto del plomo en cultivos de células meristemáticas, se determinó las alteraciones producidas por este metal a diferentes tiempos y concentraciones sobre el crecimiento, índice mitótico, morfología nuclear y cromosomal en cultivos de *Allium cepa*. Esta especie se considera uno de los mejores modelos biológicos para el estudio de contaminantes ambientales (Fiskesjo 1985), y permite de evidenciar la toxicidad del metal en sus células, debido a que los vegetales son uno de los primeros eslabones en la cadena trófica, por consiguiente una ruta de ingesta del contaminante para los humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los bulbos de cebolla se colocaron en agua filtrada, renovada cada 24 h a una temperatura constante de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, en oscuridad y con flujo de aire continuo de 10–20 mL/min. Cuando las raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm, se colocaron en una solución acuosa de cloruro de plomo (Cl_2Pb_2) de 0,25; 0,50; 0,75 y 1,0 ppm por 0, 12, 24, 48 y 72 h. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y cada combinación contó con su respectivo control, donde la solución de plomo se sustituyó por agua destilada. Se seleccionaron de 3 a 6 raíces de los bulbos para determinar la longitud radical de cada uno de los tratamientos. Se colocaron en cápsulas de petri, se midieron con una regla milimétrica, y se usaron tres bulbos para cada tratamiento (Fiskesjo 1985).

Se cortaron cuatro raíces para realizar cada estudio citológico por cada tiempo de exposición y concentración. Seguido del tratamiento, las raíces se colocaron en una solución de etanol (99%) con ácido acético

glacial (3:1) por 24 h, se lavaron con agua destilada (3 veces) y teñidas con orceina acética-clorhídrica. La técnica de aplastamiento (squash) se aplicó para el estudio de IM, y se analizó un promedio de 3.000 células por cada raíz de cada tratamiento. Las alteraciones morfológicas (citotoxicidad) e inducción de aberraciones cromosómicas (genotoxicidad) se determinaron evaluando simultáneamente, los cambios morfológicos de las células interfásicas y los cromosomas de las células mitóticas de los meristemos expuestos al metal y comparándolas con su respectivo control. Los datos se presentaron como medias \pm SD. Se evaluaron las diferencias estadísticas por un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. En todos los casos, las diferencias se consideraron al obtener un $P < 0,05$.

RESULTADOS

Se observó que a medida que aumenta la concentración del metal y el tiempo de exposición, se produce una reducción en el crecimiento de la raíz (Fig.1). Los meristemos expuestos a concentraciones de 0,75 y 1,0 ppm por 48 h o más, se oscurecieron, se engrosaron y finalmente se encorvaron progresivamente en forma de gancho.

Los resultados del efecto del plomo sobre el índice mitótico (IM) se presentan en la Figura 2. En los controles se observó la tendencia a disminuir significativamente el IM en los tiempos mayores a 48 h ($P < 0,05$). En las células expuestas al metal se evidencia que el IM disminuye a medida que aumenta la concentración para todos los tiempos de exposición, siendo significativo a partir de 24 h ($P < 0,01$). La prueba de Duncan mide el efecto del plomo sobre el IM, a tiempos similares y diferentes concentraciones (Tabla 1). Se observa un descenso en el IM a medida que se incrementa la concentración, siendo significativa a partir de 0,75 ppm, lo cual refleja dependencia entre las dos variables. La valoración del efecto de la misma concentración a diferentes tiempos muestra un descenso significativo en el IM que se hace más severo con el curso del tiempo (Tabla 2).

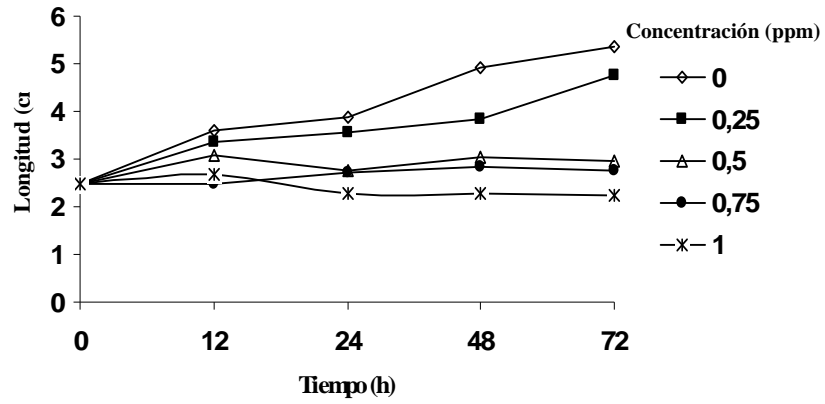


Figura 1. Efecto de la concentración (ppm) y tiempo de exposición al plomo sobre la longitud de la raíz en *Allium cepa*.

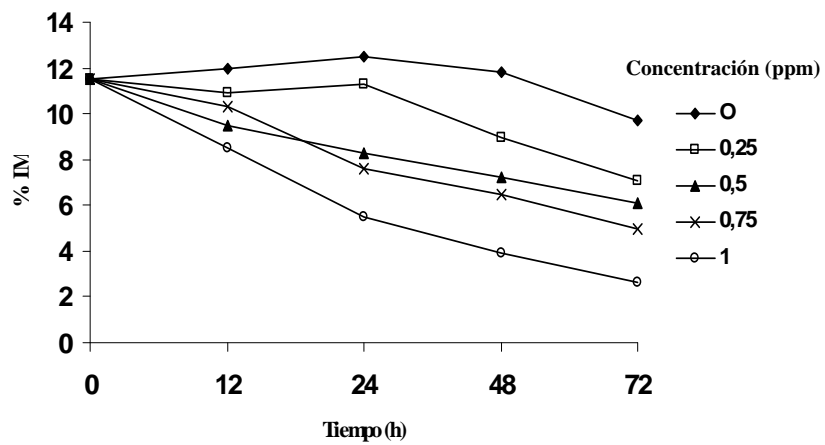


Figura 2. Efecto de la concentración (ppm) y tiempo de exposición al plomo sobre el índice mitótico (IM) en meristemos de *Allium cepa*.

Tabla 1. Efecto del plomo sobre el Índice Mitótico (IM) de células radiculares de *Allium cepa*, a un mismo tiempo (24 h) y diferentes concentraciones.

Concentración (ppm)	% IM(X±DS)
0	12,5 ± 1,2
0,25	*11,31 ± 1,65
0,50	*8,5 ± 2,51
0,75	**7,6 ± 2,23
1,00	**6,5 ± 2,65

Tabla 2. Efecto del plomo sobre el Índice Mitótico (IM) de células radiculares de *Allium cepa*, a una sola concentración (0,5 ppm) y diferentes tiempos.

Tiempo (h)	% IM (X±DS)
0	11,5 ± 0,52
12	*9,50 ± 0,24
24	*12,00 ± 0,98
48	**33,00 ± 1,87
72	**30,30 ± 2,76

Prueba de Duncan * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Los efectos citotóxicos del plomo se ilustran en la Figura 3a, donde se observa las características de una célula control, con su núcleo limitado por una envoltura que lo separa del citoplasma y la presencia de uno o dos nucleolos bien definidos. En el caso de las células expuestas al plomo, se presentan variaciones en la morfología nuclear que difieren con la concentración y tiempo de exposición. La Figura 3b muestra células interfásicas expuesta a 0,75 ppm por 24 h, con un núcleo atípico y heteropignótico. La membrana nuclear pierde su integridad y no se observa la presencia de nucleolos como estructuras

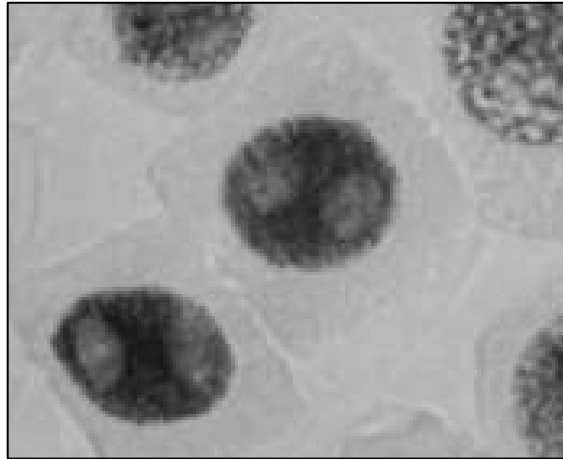
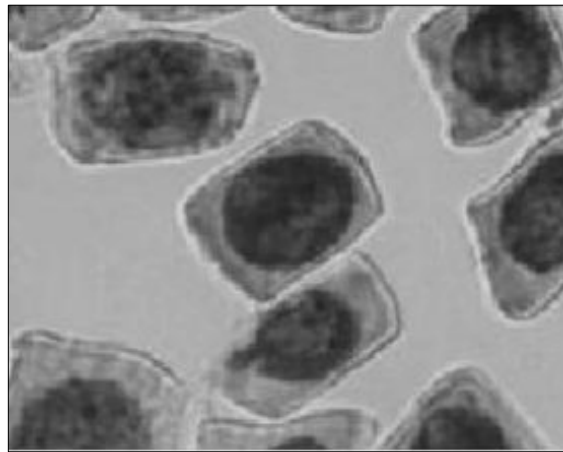
**3a****3b**

Figura 3a y b. Efecto citotóxico inducido por el plomo en células interfásicas de *Allium cepa*. 3a: Células interfásicas control, 3b: Células expuestas a 0,75 ppm de Pb²⁺ por 24 h. 3c: Células expuestas a 0,75 ppm de Pb²⁺ por 48 h.

definidas. A mayor tiempo de exposición se observaron cambios morfológicos más drásticos, caracterizados por pérdida de la integridad celular, vacuolización citoplasmática y núcleo con morfología pseudolobulada y en algunos casos ruptura de la membrana nuclear y nucleolos muy difusos (Fig. 3c).

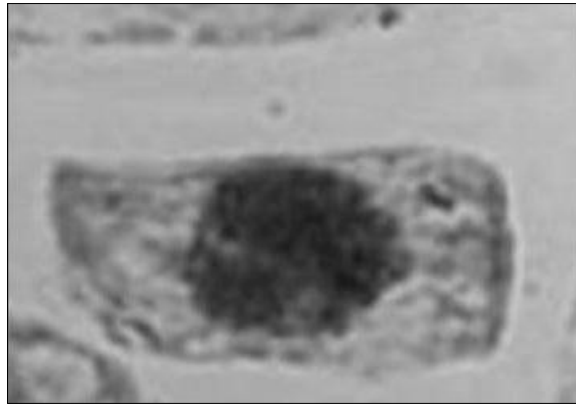
**3c**

Figura 3c. Efecto citotóxico inducido por el plomo en células interfásicas de *Allium cepa*. Células expuestas a 0,75 ppm de Pb^{2+} por 48 h.

La Figura 4 muestra un incremento significativo ($P < 0,01$) en el porcentaje de células con alteraciones, proporcional a la concentración y el tiempo de exposición. Sin embargo, disminuye significativamente después de 72 h de tratamiento para concentraciones de 0,75 y 1,0 ppm.

En la Figura 5 se presenta la frecuencia de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas (AC) a distintos tiempos de exposición. Se observó que la estekinesis (Fig. 6a) es la más frecuente aberración para todos los tiempos analizados. Adicionalmente, también se evidenció la inducción de puentes anafásicos (Fig. 6b) y micronúcleos (Fig. 6c). En forma similar la Figura 7 muestra el porcentaje de AC para las diferentes concentraciones del metal. Aunque todas las concentraciones producen la inducción de AC, la frecuencia se hace significativa ($P < 0,05$) a partir de 0,50 ppm, con tendencia a incrementarse con la concentración, siendo la estekinesis la anomalía más frecuente.

Con el propósito de corroborar el efecto de la concentración de Pb^{+2} y tiempo de exposición sobre la inducción de AC, un análisis de varianza fue realizado (Tabla 3). Ambos efectos fueron significativos ($P < 0,05$). Sin embargo, el efecto de la concentración es más deletéreo que el tiempo de exposición. La correlación existente entre las diferentes anomalías cromosómicas inducidas por el metal (Tabla 4),

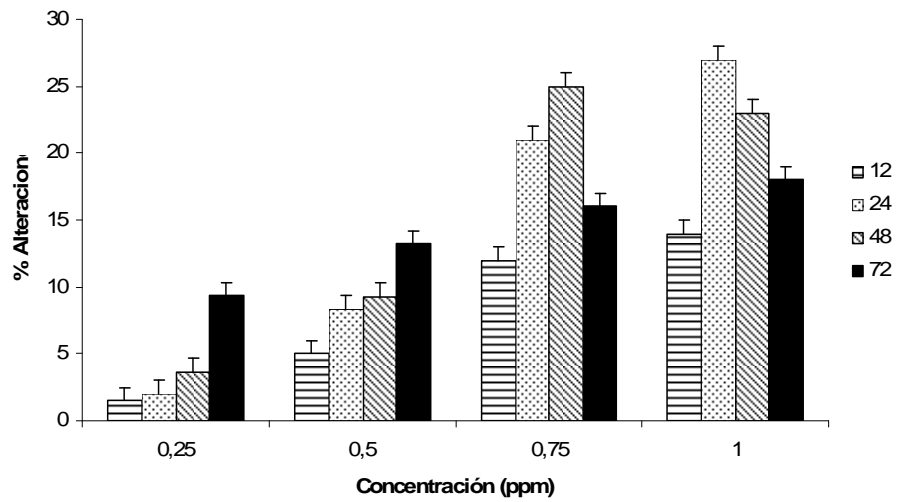


Figura 4. Frecuencia de alteraciones en la morfología celular a diferentes concentraciones y tiempos de exposición con plomo.

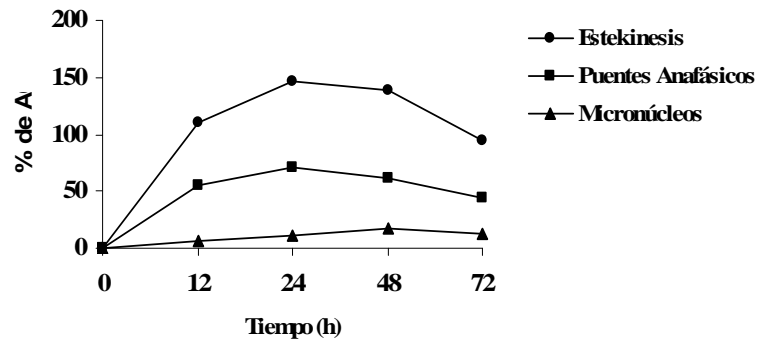


Figura 5. Efecto del tiempo de exposición al plomo sobre el porcentaje de aberraciones cromosómicas (AC) en meristemos de *Allium cepa*.

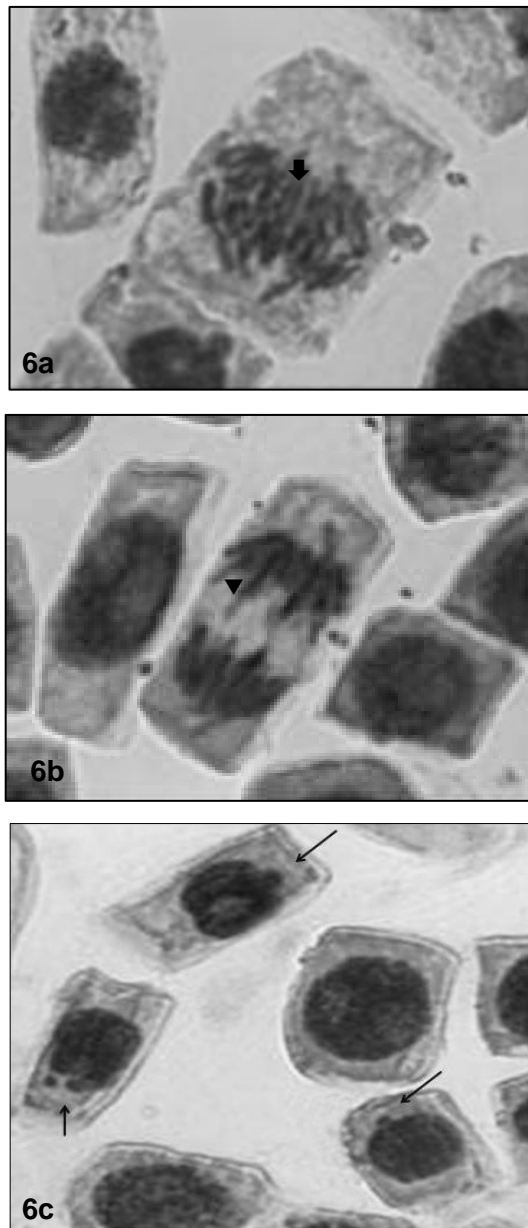


Figura 6. Aberraciones cromosómicas inducidas por el plomo en meristemas radiculares de *Allium cepa*. 6a: Estekinesis, 6b: Puentes anafásicos, y 6c: Micronucleos, 1.000 X.

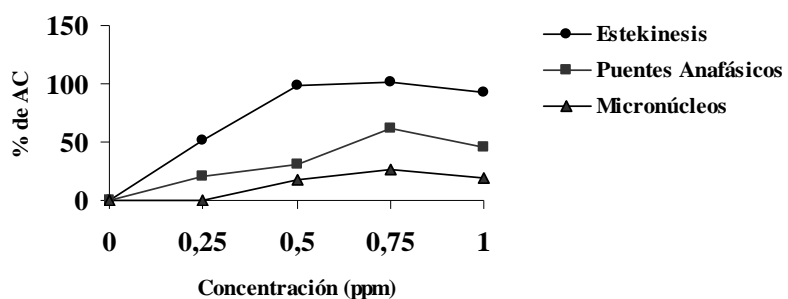


Figura 7. Efecto de la concentración de plomo sobre el porcentaje de aberraciones cromosómicas (AC) en meristemos de *Allium cepa*.

Tabla 3. Análisis de varianza del efecto de la concentración de plomo y tiempo de exposición sobre la inducción de Aberraciones Cromosómicas (AC).

AC	Fuente de variación	DF	SS	MS	F	p
Estekinesis	Concentración	4	17.346,9	4.336,72	142,34	< 0,01
	Tiempo	4	8.259,68	2.064,92	67,78	< 0,01
Puentes cromosómicos	Concentración	4	65,67	16,42	10,13	< 0,01
	Tiempo	4	15,80	3,95	2,44	< 0,05
Micronúcleos	Concentración	4	49,03	2,04	15,62	< 0,05
	Tiempo	4	13,89	3,73	12,62	< 0,01

reflejó una correlación positiva altamente significativa entre la estekinesis y la formación de puentes cromosómicos, corroborando así la dependencia entre ambas. No obstante, no existe correlación entre la estekinesis y la formación de micronúcleos.

Tabla 4. Coeficiente de correlación (r), nivel de confianza, (P) y coeficiente de determinación (R^2) cuando se relacionan los daños cromosómicos.

Fuente de variación	r	P	R^2
Puentes cromosómicos	0,5077	< 0,01	0,2577
Micronúcleos	0,3251	> 0,05	0,1056

Variable predictiva: Estekinesis

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados mostró un efecto deletéreo del plomo sobre el crecimiento de la raíz, observándose cambios morfológicos indicadores de necrosis celular, acorde con lo reportado por otros autores con éste y otros metales (Marcano *et al.* 1998, Wierzbicka 1999 Rucinska 2004).

El IM es un parámetro que no solo refleja la velocidad de crecimiento, sino también la frecuencia de la división celular, por lo que cualquier agente capaz de causar alteración en este, es considerado mitotóxico. Se observó en los controles una disminución del IM, que refleja un comportamiento normal en cultivos bajo las condiciones experimentales descritas; ya que después de un tiempo, el crecimiento y el IM se hacen menores a causa de la pérdida del equilibrio dinámico. De igual manera, en las células expuestas al plomo se observa una disminución en el IM, siendo ésta más severa con el curso del tiempo y la concentración; esto refleja el efecto deletéreo ejercido por el metal. Estos hallazgos permiten establecer un efecto mitotóxico inducido por el metal sobre los meristemos expuestos y coinciden con los reportes de otros autores en diversos sistemas biológicos (Wierzbicka 1999, Wilczek *et al.* 2004).

Las alteraciones observadas son compatibles con una necrosis celular tal y como los reportan Hartwig *et al.* (1994) y Wise *et al.* (1992). La vacuolización presente sugiere que los cambios de osmolaridad que ocurren en el interior de la célula, posiblemente son consecuencias del efecto del metal sobre algunos sistemas de transporte a nivel de membrana. Carfagna *et al.* (1996) señalan que el Cd^{+2} y el Pb^{+2} inducen inhibición de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ originando alteraciones que modifican sus condiciones fisiológicas. El alto porcentaje de células con alteraciones morfológicas pone de manifiesto la citotoxicidad del plomo en el tejido analizado, y está de acuerdo con reportes en otros sistemas biológicos (Patocka y Cerny 2003, Rucinska 2004).

Las aberraciones cromosómicas observadas reflejan la genotoxicidad inducida por el metal. La estekinesis, se caracteriza por un aspecto aglutinado de los cromosomas en metafase, provocado por un mal desdoblamiento de las cromátidas hermanas que permanecen unidas, formando fibras cromatínicas o puentes anafásicos (Fiskesjo 1985, Marcano *et al.* 2004).

Los micronúcleos, posiblemente originados por ruptura de los cromosomas que continúan su ciclo (Marcano *et al.* 2004), se observan pero con menor frecuencia. Las variables analizadas (tiempo y concentración) muestran un efecto tóxico sobre el tejido estudiado. Sin embargo, la concentración resultó más deletérea ocasionando daños, posiblemente irreversibles, donde las células no pueden recuperarse, indicativo de un sistema de reparación desactivado, incrementando las aberraciones cuando un nuevo ciclo comienza (Heddle 1991). Resultados similares se han observado con otros agentes tóxicos en el mismo modelo biológico (Marcano *et al.* 1998, 2004). El efecto observado puede explicarse por reportes que indican la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN, bien interactuando directamente con las enzimas responsables (ligasas, topoisomerasas y otras) o al actuar competitivamente con el calcio, catión involucrado en la regulación de esos procesos (Hartwig 1994, Marcano *et al.* 2001, Rucinska *et al.* 2004).

CONCLUSIÓN

Se concluye que se presenta una toxicidad inducida por el plomo, dependiente de la concentración y tiempo de exposición, sobre los meristemos radiculares de *Allium cepa*, manifestada por un bloqueo en el crecimiento e índice mitótico, alteraciones en la morfología nuclear y la inducción de aberraciones cromosómicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, por el financiamiento de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- BORJESSON, J., S. MATTSSON, U. STROMBERG, L. GERHARDSSON, A. SCHUTZ Y S. SKERFVING. 1997. Lead in Fingerbone: A tool for retrospective exposure assessment. *Arch. Environ. Health* 52: 104–112.
- CARFAGNA, M, G. PONSIER Y B. MUHOBERAC. 1996. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. *Chem. Biol. Interac.* 100: 53–65.
- DONGHUA, L., J. WUSHENG, W. WEI, Z. FEGMEI Y L. CHENG. 1994. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. *Environ. Pollution* 117: 255–259.
- FISKESJO, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99–112.
- GARCIA, I. Y C. DORRONSONO. 2002. Contaminación por metales pesados. *Edafología* 3: 47–54.

- HARTWIG, A., R. SCHLEPEGRELL Y R. BEYERSMANN. 1994. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 241: 75–82.
- HEDDLE, J. 1991. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakege syndromes. *Mutat. Res.* 247: 221–229.
- MARCANO, L., X. MONTIEL, I. CARRUYO, M. BRACHO Y L. ATENCIO. 1998. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Ciencia* 6: 93–99.
- MARCANO, L., I. CARRUYO, X. MONTIEL Y P. MORENO. 2001. Inhibición de la actividad biosintética nucleolar inducidas por el Plomo en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa* L.). *Bol. Centro Invest. Biol.* 35: 65–81. Univ. del Zulia, Maracaibo.
- MARCANO, L., I. CARRUYO, X. MONTIEL Y A. DEL CAMPO. 2004. Cytotoxicity and possible action mechanisms of the Maleic Hydracid (MH) in radicular meristems of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94: 221–226.
- PATOCKA, J. Y K. CERNY. 2003. Inorganic lead toxicology. *Acta Médica (Hradec Kralove)* 46: 65–72.
- RUCINSKA, R., R. SOBKOWIAK Y E. GWOZDZ. 2004. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9: 519–528.
- USEPA. 2000. Environmental Protection Agency. Lead Compounds. Terms of Environment. Washington D.C.
- WIERZBICKA, M. 1999. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Poland. Environ. Pollut.* 104: 41–52.
- WILCZEK, G., A. BABCZYNSKA, M. AUGUSTYNIAK Y P. MIGULA. 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-

dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollution* 132: 453–461.

WISE, P., C. LEONARD Y R. PATIEMO. 1992. Clastogenicity of lead chromate particles in hamster and human cells. *Mutat. Res.* 278: 69–79.

WONG, C. Y X. LI. 2002. Metals heavy in agricultural soils of the Delta of the river Pearl, south of China. *Environ. Pollution* 119: 33–44.

XIONG, Z. 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L., Republic of China. *Environ. Pollution* 9: 275–279.