

Inmunodetección de Hidrácida Maleica (HM) en meristemos de cebolla (*Allium cepa* L), utilizando una cepa de *S. aureus* (Cowan I), como revelador

Letty Marcano^{1*}, Richard Colmenares² y Jorge Guíñez O.²

¹Laboratorio de Biología Celular. ²Laboratorio de Inmunología. Departamento de Biología Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 23-11-98 Aceptado: 04-11-99

Resumen

La Hidrácida Maleica (HM), es un agente químico catalogado como clastogénico por su capacidad de inducir diferentes tipos de Aberraciones Cromosómicas (AC). A pesar de su efecto genotóxico, es ampliamente utilizada en la agricultura como herbicida y como un inhibidor del crecimiento de los brotes en vegetales. El objetivo del presente trabajo es desarrollar una técnica para la determinación de HM en los alimentos de consumo humano (papas, cebollas, apio, tabaco, etc.), como un aporte para los organismos de control de calidad de los alimentos. Se cultivaron células meristemáticas de *Allium cepa*. L. (cebolla), en agua filtrada a 25°C; una vez alcanzada la longitud de 3 cm, los meristemos fueron tratados con HM a una concentración de 5×10^{-4} M por 1 hora; se realizó un control donde la HM fue sustituida por agua. Finalizado el tratamiento tanto los meristemos tratados como el control se incubaron por 10 minutos en cámara húmeda con anticuerpo anti- HM; posteriormente se realizó una incubación de 10 minutos con una cepa de *S. aureus*, (Cowan I), este actúa como revelador de la reacción por la propiedad de presentar gran cantidad de Proteína-A de alta afinidad por la región Fc γ de la IgG. Los resultados muestran las células control con una morfología típica, caracterizadas por una forma rectangular y superficie lisa. En la porción de tejido tratado con HM se observa claramente la presencia del *S. aureus* (Cowan I) unido a las células como consecuencia de la interacción del Ag (HM) con el complejo AC-Cowan I. Se puede concluir que la utilización del Cowan I como revelador es eficaz para la detección antigénica de HM en células meristemáticas de *Allium cepa* L.

Palabras clave: Determinación antigénica; hidrácida maleica; proteína-A.

Immunodetection of Maleic Hidracic (MH) in meristematic cells of onion (*Allium cepa* L) using a strain of *S. aureus* (Cowan I) as developer

Abstract

Maleic hidracid (MH) is an clastogenic chemical agent due to its capacity to induce different types of chromosomic aberrations (CA). In spite of its genotoxic effect MH is commonly use in agriculture as herbicide and as inhibitor of growth in plant buds. The objective of this paper is to develop a technique for HM determination in some vegetables (potatoes, onions, tobacco,

* Autor para la correspondencia. Telefono: 061-483012. E-mail: lemarc@cantv.net

etc.) for human feeding as a tool for food quality control. Meristematic cells of *Allium cepa* L., were cultivated in filtered tap water at 25°C. Once the roots reached 3 cm in length, they were treated with 50mM MH for 1 hour, negative controls were done substituting MH with water. After treatment, the roots were incubated with antiMH antibodies for 10 minutes and again with *S. aureus* strain Cowan I for another 10 minutes. This bacterial strain acts as a developer for the immunological reaction due to greater amount of Protein-A with high affinity for Fc γ region of IgG. Results shown the control cells with a typical morphology, rectangular shape and smooth surface. In the portion of plant tissue treated with MH can be seen *S. aureus* attached to plant cells because of MHAg -antiMHAb-Cowan I Complex interaction. Application of technique using Cowan I as developer proved to be efficient for antigenic detection of MH in meristematic cells of onion (*Allium cepa*).

Key words: Antigenic; cowan I; maleic hidracic.

Introducción

La Hidrácida Maleica (HM) es un compuesto aromático heterocíclico de 6 elementos, definido químicamente como 1,2-dihidro-3,6 piridazone (1). Este compuesto es frecuentemente utilizado como herbicida y regulador del crecimiento sintético para las plantas, con el fin de retardar el crecimiento de los brotes, y de esta manera aumentar la posibilidad de llegar los alimentos al consumidor como un producto fresco (2). Se han propuesto varias maneras por la cual la Hidrácida Maleica retarda el crecimiento de los brotes entre las cuales se puede mencionar: Como una antiauxina (3); como inhibidor de sistemas enzimáticos (4); bloqueando la transcripción (2); como inhibidor de la división celular (5). A pesar de los beneficios de orden económico que para el sector agrícola puede aportar el uso de este herbicida, estudios realizados han reportado que la Hidrácida Maleica es un agente químico clastogénico debido a su capacidad de inducir diferentes aberraciones cromosómicas (6,7); micronúcleos (8), intercambio de cromátidas hermanas (9,10); producción de tumores en mamíferos (11). No obstante su efecto genotóxico la HM continúa siendo frecuentemente utilizada en la agricultura como un herbicida en Europa, Canadá, Estados Unidos (12-14).

Debido a la amplia utilización de HM en los cultivos y en respuesta al efecto tóxico reportado para este compuesto, la Agencia de Protección al Medio Ambiente, han evaluado los niveles de HM en los alimentos estimando que, para un adulto, la dosis mínima debe ser de 20 g/Kg/día. Sin embargo, estudios realizados reportan que cada adulto ingiere aproximadamente 630 mg/día de HM entre papas, cebollas y la inhalación del humo de 40 cigarrillos, y esta dosis es 20 veces mayor a las encontradas por ellos para producir cáncer en ratón (11). Estos datos han generado un interés por parte de las instituciones encargadas de la supervisión y control de calidad de los alimentos y protección al medio ambiente por lo que se han desarrollado diversas metodologías para detectar HM tanto en los alimentos como en los suelos donde se han cultivado, entre los cuales se destacan: colorimetría (15), cromatografía (14,1), inmunológicos (12), etc.

Sobre la base de lo expuesto en el presente trabajo se desarrolló una técnica para la fácil y rápida determinación de HM en los alimentos de consumo humano (papas, cebollas, apio, tabaco, etc.), como un aporte para los organismos de control de calidad de los alimentos. Para esto se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* Cowan I como revelador de la reacción antígeno-anticuerpo. La técnica se fundamenta en la elevada afinidad de la Proteína A por la región Fc de las

inmunoglobulinas de conejo (16). Sistemas inmunoaderentes basados en Proteína A han sido implementados con anterioridad para la detección de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* (17), para el serodiagnóstico de amibiasis (18) y para la detección de quitinasas de superficie en hongos miceliales (19), estableciéndose su aplicabilidad como revelador de la reacción antígeno- anticuerpo.

Materiales y Métodos

Material biológico

Como material de estudio se utilizó meristemos radicales obtenidos de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.), crecidos en agua filtrada renovada cada 24 horas, en oscuridad, a temperatura de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y aireación por burbujeo constante con un flujo de aire de 10-20 ml/min para evitar la hipoxia. Las condiciones de cultivo se mantuvieron hasta que las raíces alcanzaron de 3 a 4 cm de longitud.

Tratamiento con HM

Una vez que los meristemos alcanzaron la longitud pre-establecida, se colocaron en una solución acuosa de HM (Sigma, Co.), a una concentración de 5×10^{-4} M por una hora, concentración y tiempo mínimos en la cual se evidenció cualitativamente la reacción antígeno-anticuerpo.

Montaje de la preparación

Finalizado el tratamiento, se cortaron 3 mm de cada uno de los meristemos (6-7 por bulbo), y se colocaron en un portaobjeto con una gota de HCl 0,1 N, se coloca un cubreobjeto y con la punta de un lápiz se realizó un aplastamiento o "Squash", con el fin de disgregar el tejido. Posteriormente se procedió a fijar la preparación sobre el portaobjeto colocándola sobre hielo seco pulverizado hasta la formación de escarcha, y con la ayuda de un bisturí se levanta el cubreobjeto, quedando la preparación fijada.

Inmunohistoquímica

Los meristemos fijados al portaobjeto, se incubaron por 10 min, en cámara húmeda con una dilución 1:4 de un suero policlonal anti-HM de conejo, producido en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad Experimental de Ciencias, a través de un programa de inmunización contra hapteno-modificado, (20); posteriormente se realizó una incubación de 10 min con una suspensión de 5×10^9 cél/mL de *S. aureus* Cowan I NCTC 8530, cedida por el laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia, incubada en Caldo Nutriente por 48 h, a 37°C en aerobiosis. La cepa fue inactivada por incubación en *p*-formaldehído al 2% y por calentamiento a 80°C por 5 min en PBS pH 7,2 y lavada por triplicado por centrifugación en PBS (16,17).

Controles del ensayo

Se utilizaron controles negativos constituidos de la siguiente manera: Un control de especificidad del anticuerpo, basado en la utilización de suero de conejo no inmune a HM, y un control para la bacteria reveladora, utilizando una cepa de *S. aureus* cepa Wood 46 carente de proteína A. Adicionalmente se implementó un control para el ensayo de adherencia, carente de anticuerpo.

Ensayo

Se dispensaron 20 μL de antisuero y/o suero control en cada Squash y se incubó por 5 min. Se realizó un suave lavado con PBS pH 7,4 para eliminar el exceso de anticuerpo. Se agregó 20 mL de la suspensión de *S. aureus*. Se realizó un nuevo lavado con PBS para eliminar el exceso de bacterias, no inmunoaderidas.

Observación al microscopio óptico:

La preparación fijada al portaobjeto, fue teñida por un minuto con azul de metileno al 1% en solución alcohólica 2,3 (19). Se lavó con agua destilada por 5 segundos y se observó al microscopio óptico, modelo Olympus con objetivo de 40 X y 100 X.

Observación al microscopio electrónico de barrido: En la preparación fijada al portaobjeto, previa observación al microscopio óptico, se realizaron cortes cuadrados de aproximadamente 0,5 cm² de longitud conteniendo la muestra a observar; el pequeño trozo de vidrio se fijó con cinta 3M a un porta espécimen de aluminio (Stub), sellando los bordes con acetato de amilo y se secó en estufa a 42°C por una hora. El Stub se introdujo en un coversor iónico marca EIKO IB3 para el metalizado con película de oro de aproximadamente 100 a 200 Å. Las observaciones se realizaron con un MEB Hitachi-2300 entre 10 y 15 KV.

Resultados y Discusión

Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. Se puede observar por microscopía óptica del tejido control, que las células presentan una morfología típica con una superficie lisa (Figura 1). En la Figura 2, se muestra una porción de tejido tratado con HM donde se observa claramente puntos teñidos de azul intenso, que representan la unión de *S. aureus* Cowan I a las células meristemáticas, como consecuen-

cia de la interacción del Ag (HM) con el complejo Ac-Cowan I. Esto fue corroborado con las observaciones obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (MEB), la Figura 3 muestra una porción de tejido tratado con HM donde se observa claramente la presencia de *S. aureus* (Cowan I), unido a las células (Flechas). Estos resultados demuestran que la aplicación de la técnica utilizando esta bacteria como revelador, permite la detección cualitativa de la HM presente en la pared celular, de forma análoga al sistema reportado para la detección de quitinasas de superficie (19), sin embargo, en este trabajo, la molécula detectada es un compuesto aromático, no inmunogénico en condiciones naturales. Por otra parte, la utilización de un antisuero policlonal obtenido tras un programa de inmunización contra hapteno, sugiere la aplicación de esta técnica, no sólo para detectar la presencia de sustancias inmunogénicas (proteínas, polisacáridos, etc), sino moléculas orgánicas sencillas, siempre y cuando estas últimas sean capaces de reaccionar con inmunoglobulinas G con un Fcγ de elevada afinidad por la Proteína A estafilocócica.

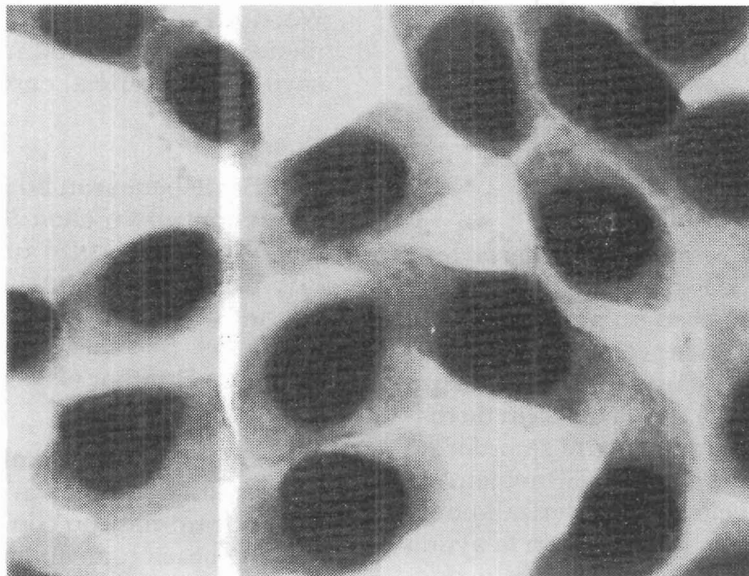


Figura 1. Porción de tejido de meristemas radiculares de *Allium cepa*. L., sin HM (control) observada al microscopio óptico (100 X). Se muestra la morfología típica de las células con una superficie lisa.

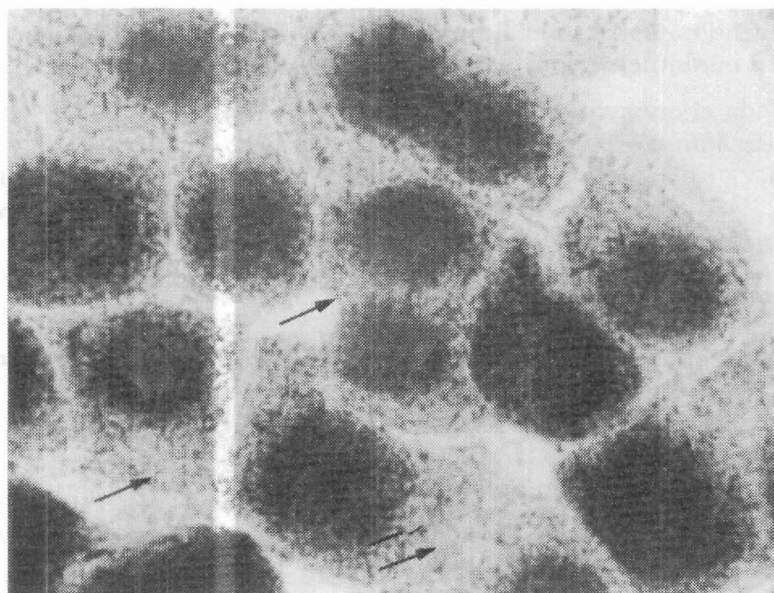


Figura 2. Porción de tejido de meristemas radiculares de *Allium cepa*. L., tratada con HM observada al microscopio óptico (100 X). Se muestra los puntos teñidos de azul intenso, representando el *S. aureus* unido a las células (↓).

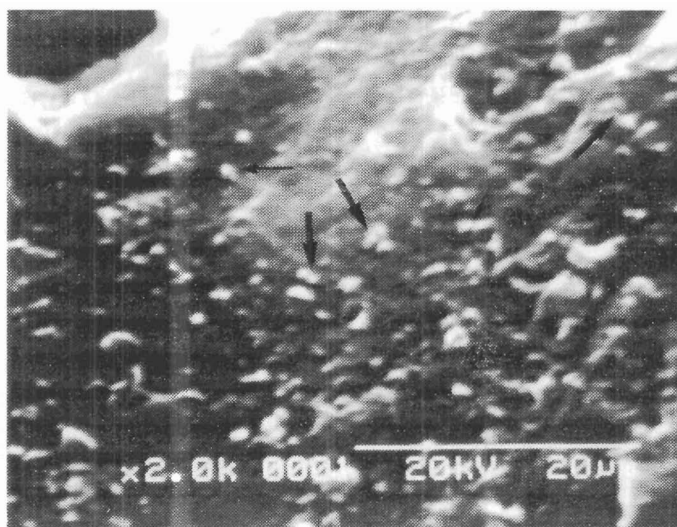


Figura 3. Micrografía de una porción de tejido de meristemas radiculares de *Allium cepa*. L., tratado con HM observado por MEB. Se observa en detalle el cocobacilo adherido a la superficie del tejido (↓).

Conclusiones

El sistema de Inmunodetección empleado resulta eficaz en la determinación de la presencia de HM asociada a la pared celu-

lar. Este sistema, representa una alternativa poco costosa y rápida (18-20 min), con elevada afinidad, obtenida por la técnica de inmunización utilizada. La metodología involucrada en esta técnica, resulta sencilla, y

los reactivos utilizados, son esencialmente omnipresentes en cualquier laboratorio.

Se recomienda el ensayo de la técnica en otros tejidos de *Allium cepa*. L y en otros tejidos vegetales.

Agradecimiento

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento parcial de este trabajo y a Olivar Castejón del CIADANA, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua por la colaboración prestada en la observación de las muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido.

Referencias Bibliográficas

1. RENAUD J.M., KELLER., VUILLAUME G.J. **Chromatogr** 604: 243-246, 1992.
2. RAKITIN Y.V., VLADIMIRSEVA S.V., NIKO-LAEVA L.N. **Sov Plant Physiol** 21(3): 1974.
3. LEOPOLD A.C., KLEIN W.H. **Science** 114:9, 1951.
4. HOFFMAN I., PARUP, E.V. **Residues Reviews** 7:96, 1964.
5. HARBER A., WHITE Y.D. **Plant Physiol.** 35:495, 1960.
6. EVANS J. H., SCOTT S. **Genetics** 49:48-61, 1963.
7. NATAJARÁN A.T., AHNSTRÖM G. **Chromosomas** 28:48-61, 1969.
8. DE MARCO A., DE SIMONE C., RAGLIONE M., TESTA A., TRINCA S. **Mut Res** 279:9-13, 1992.
9. DEL CAMPO A. **Biología del Ciclo de División Celular**, 1988.
10. GONZÁLEZ G., NAVARRETE M.H. **Mut Res** 163:57-61, 1986.
11. EPTEIN S., ANDREA J., JAFFE H., JOSHI S., FALK H., **Nature**. 215:1388-1390, 1967.
12. HARRISON R., BRIMFIEL & NELSON J. **J Agric Food Chem** 37:958-964, 1989.
13. JENKINS P.P. **Tropical Science** 24:17-28, 1992.
14. CESSNA A.J. **Pesticide-Science** 33:69-17, 1991.
15. IHNAT M. THOMPSON B. **Journal A.O.A.A.C.** 58:1235-1243, 1974.
16. GODING J. **J Immun Methods** 20: 241-253, 1978.
17. CAMARGO E, MATTEI D, YOSHIDA N, CALAUDA L. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 77: 825-827, 1983.
18. PARIJA S, KASINATHAN S, RAO R. **J Microbiol Methods** 10(1): 53-57, 1989.
19. GUIÑEZ-O J.R., LEDESMA-A A. Un sistema inmunoadherente: (EASAC-1), para la detección de quitinasas de superficie en hongos miceliales. **XLIV Convención Anual de la AsoVAC**. Coro (Venezuela), pp 188, 1994.
20. CABRERA A., COLMENARES R., GUIÑEZ J., PIRELA M. MARCANO L. Producción de anticuerpos anti-hidrazida maleica empleando un programa de inmunización anti-hapteno modificado. **XLVII Convención Anual de la AsoVAC**. Valencia (Venezuela), pp 106, 1997.