

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOSINTÉTICA NUCLEOLAR INDUCIDA POR EL PLOMO EN MERISTEMOS RADICULARES DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.)

Letty Marcano¹, Ingrid Carruyo¹, Xiomara Montiel¹
y Patricia Moreno²

¹Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia. Telefax: (061) 483012. E-mail: letty@iamnet.com.

²Cátedra Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

Resumen. Se estudió el efecto del Plomo sobre la morfología nucleolar en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.), para tratar de determinar la acción del metal sobre la actividad biosintética. Los bulbos se cultivaron en agua filtrada a 25°C; el tratamiento con PbCl₂ se realizó a concentraciones de 5, 10 y 20 ppm por 4, 8, 12 y 24 horas de exposición. El análisis revela variaciones de la morfología nucleolar, las cuales se hicieron más severas a medida que se aumentó la concentración y el tiempo de exposición, entre estas se pueden mencionar: segregación nucleolar, aumento de centros fibrilares y nucléolos colapsados, considerados manifestaciones morfológicas relacionadas con una disminución de la actividad biosintética del nucléolo. También se observó condensación de la cromatina yseudobulación del núcleo, manifestaciones estas de una necrosis celular. Los resultados obtenidos evidencian un efecto tóxico del metal posiblemente como consecuencia de un bloqueo de la actividad biosintética del nucleolo.
Recibido: 4 Diciembre 2000, *aceptado:* 7 Marzo 2001.

Palabras clave: alteraciones, meristemos, nucleolo, plomo, toxicidad.

INHIBITION OF BIOSYNTHETIC NUCLEOLAR ACTIVITY INDUCED BY LEAD IN MERISTEMATIC ONION CELLS (*Allium cepa* L.)

Abstract. The effect of lead on the nucleolar morphology of onion (*Allium cepa* L) meristematic cells was studied to determine the metals action on biosynthetic activity. The bulbs were cultures in filtered water at 25°C; the treatments with PbCl₂ were made at concentrations of 5, 10 and 20 ppm, for 4, 8, 12 and 24 h of exposure. The analysis shows variations in nucleolar morphology, which were more severe as concentration and exposition time increased. These changes include: nucleolar segregation, increase in fibrillar centers and collapsed nucleolus. These morphological manifestation are considered to be related to a decrease in the biosynthetic activity of the nucleolus. Chromatin condensation and pseudo-lobulation of nucleus were also observed, which might indicate cellular necrosis. The results possibly evidence a toxic effect of metal as a consequence of a blockage in the biosynthetic activity of the nucleoli. *Received:* 4 December 2000, *accepted:* 7 March 2001.

Key words: alterations, lead, meristematics cells, nucleoli, toxicity.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se han convertido en los últimos años en un serio problema de índole ambiental. Con el desarrollo industrial, su presencia se ha incrementado considerablemente, hasta tal punto que la Organización Panamericana de la Salud (OPS 1979) los considera determinantes en los problemas de salud ocupacional. Entre los metales pesados considerados como contaminantes ambientales, el Plomo (Pb⁺²) presenta gran interés desde el punto de vista de la toxicología, debido a su gran versatilidad de usos en la fabricación de contenedores de alimentos, alambiques, baterías, pinturas, cueros, aleaciones, etc (Codina *et al.* 1993, García-Fernández *et al.* 1997). Adicionalmente, con el desarrollo de la industria petrolera, el uso de compuestos alquílicos como antidetonantes de la gasolina (ej. Tetraetilo de Plomo), lo ha convertido actualmente en uno de los meta-

les de mayor riesgo tóxico (Saltzman *et al.* 1985, Ladrón de Guevara y Moya 1995).

Estudios realizados en Venezuela, reportan que las concentraciones de Plomo en la gasolina oscila entre 700 a 800 mg/L (Granadillo y Romero 1986), lo cual supera siete u ocho veces los niveles plúmbicos permitidos en Europa y Estados Unidos (< 100 mg/L) (Layman 1983), trayendo como consecuencia que las concentraciones del metal en el ambiente en ciudades como Maracaibo (500 a 600 mg/kg), presente valores comparables a los reportados en ciudades con mayor densidad de tráfico automotor, como Río de Janeiro (700 mg/kg) y Manchester (970 mg/kg) (Granadillo y Romero 1986, González *et al.* 1988).

Una de las poblaciones con mayor probabilidad de contaminación por Pb^{+2} es la infantil debido a su contacto directo con materiales manufacturados con el metal tales como, pinturas, juguetes, plásticos, etc. (Granadillo *et al.* 1994). Según la Academia Americana de Pediatría, de cada tres a cuatro millones de niños en los Estados Unidos, seis tienen niveles de plomo en la sangre que podrían limitar su desarrollo (Ernhart *et al.* 1989, Shorten y Hooven 2000).

El aumento de la exposición materna al Pb^{+2} ha sido considerado significativo en el embarazo, ya que un nivel del metal mayor a 10 $\mu\text{g/dL}$ en el cordón umbilical, se correlaciona con una deficiencia del desarrollo temprano (Lughman 1988, Mata *et al.* 1996, Han *et al.* 2000). En los niños son características de una intoxicación por plomo: irritabilidad, dolor abdominal, náuseas, ataxia marcada y crisis convulsiva o pérdida del conocimiento (Ladrón de Guevara y Moya 1995).

La sintomatología aguda en los adultos a menudo se asocia con Pb a niveles de 40 $\mu\text{g/dL}$ o mayores (Nriagu 1979, Baghurst *et al.* 1992); caracterizada por: dolor de cabeza, náuseas, anorexia (pérdida de peso), estreñimiento, fatiga, cambios en la personalidad y pérdida de la audición. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades consideran que 10 $\mu\text{g/dL}$ es un nivel que requiere atención (Shannon y Graef 1992).

La intoxicación por plomo afecta prácticamente a todos los órganos, pero sobre todo, al sistema nervioso central y periférico, los riñones y la sangre; niveles altos en sangre (mayores a 70 $\mu\text{g/dL}$), puede causar encefalopatía e incluso la muerte (Ladrón de Guevara y Moya 1995); una vez que el plomo ingresa al organismo, se asocia a los eritrocitos alterando el sistema hematopoyético e interfiriendo con la formación del grupo hem con consecuente producción de anemia (Dietrich *et al.* 1987, Shukla *et al.* 1991); en hombres expuestos ocupacionalmente, se ha reportado impotencia, teratospermia, hipospermia y astenopermia (Barry *et al.* 2000). También se ha involucrado la intoxicación por el metal con la inhibición del crecimiento pre y postnatal y la inducción de cáncer en animales en experimentación y en humanos (Dietrich *et al.* 1987, Environmental Protection Agency 1989, Shukla *et al.* 1991). En cultivos de células animales, se ha demostrado la inducción de lesiones cromatídicas, genotoxicidad y apoptosis (Hartwig *et al.* 1990, Wise *et al.* 1992, Blankenship *et al.* 1997). En plantas, se ha reportado: reducción del crecimiento, retardo en la división celular, pérdida del potasio intracelular, entre otros (Romaniuk y Gabara 1988, Steinkellner *et al.* 1998).

El mecanismo de acción intracelular del plomo esta relacionado con un papel antagónico con iones intracelulares, tales como el Ca^{+2} y Zn^{+2} , donde el Pb^{+2} se une a los grupos $-\text{SH}$ convirtiéndolo en un potente inhibidor enzimático, entre las cuales las más frecuentemente inhibidas, son las enzimas encargadas de la síntesis del grupo Hem, produciéndose alteraciones en los procesos eritropoyéticos (Dietrich *et al.* 1987) y la 5-nucleotidasa, responsable de la degradación del ARN, induciendo la formación de gránulos basófilos en los hematíes (Cook *et al.* 1987).

Son muchos los trabajos reportados sobre el efecto tóxico del Plomo y su relación con los problemas de contaminación y salud ocupacional, pero el mecanismo molecular básico por el cual el metal ejerce su toxicidad no está completamente establecido. Fundamentado en los reportes que establecen al nucléolo como uno de los mejores organelos para estudiar la relación estructura-función en organismos eucariotas, por ser uno de los primeros en alterarse cuando

se someten las células a inhibidores del metabolismo celular (Moreno Díaz de la Espina y Risueño 1977, Marcano y Del Campo 1995), en el presente trabajo se realizó un estudio de las alteraciones nucleolares inducidas por el metal en células meristemáticas de *Allium cepa* L. con el propósito de evidenciar el efecto tóxico producido por el metal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Como material de estudio se utilizó meristemas de cebolla *Allium cepa* L., el cual se considera como uno de los mejores modelos biológicos para el estudio del efecto de los contaminantes ambientales (Fiskesjo 1985, Liu *et al.* 1995).

Los bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) se sumergen 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 han alcanzado de 2 a 3 cm de longitud se sumergen en una solución acuosa de (PbCl_2), a concentraciones de 3.4, 7.4 y 9.9×10^{-5} M (5, 10 y 20 ppm respectivamente). Se realizaron tratamientos de 4, 8, 12 y 24 horas de duración. Para cada concentración y tiempo de tratamiento se realizó un control en el cual la solución de plomo fue sustituida por agua destilada. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado, analizando un promedio de dos bulbos, con seis a ocho meristemas por bulbo y un aproximado de 3000 células por meristemo.

PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA POR LA TÉCNICA DE TINCIÓN CON AgNO_3

Con el objeto de observar las alteraciones nucleolares inducidas por el Plomo se aplicó la tinción específica con Nitrato de Plata (AgNO_3) (Fernández-Gómez *et al.* 1969); para lo cual para cada tiempo y concentración se tomaron de 4 a 5 raíces de cada tratamiento, y se fijaron por separado en una mezcla de formol (10%) - hidroquinona (1%) en proporción 1:1 por un tiempo no menor de 2 horas.

Luego se transfirieron las raíces a una solución de AgNO_3 al 2% por 12-15 horas a 70°C ; después de este tiempo se colocaron de nuevo en el fijador indicado anteriormente (aproximadamente por 2 horas); se lavaron con agua destilada por 10 minutos, se incluyó en parafina realizándose cortes de 2 a 3 μm que fueron observadas al microscopio óptico. En el caso de los controles, y con el objeto de observar un mayor campo, se les realizó un squash, agregándole una gota de ácido acético al 50%, para su observación al microscopio.

PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Las raíces, una vez finalizado el tratamiento, fueron fijadas inicialmente en glutaraldehído al 3% en buffer cacodilato 0,025 M a pH 7, por 1 o 2 horas a temperatura ambiente y luego fueron post-fijadas en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer por 1 hora.

Posteriormente se realizó la deshidratación en etanol y óxido de propileno para ser infiltrada en la resina poliéster Araldita 502. Se realizaron cortes de 200 a 400 Å los cuales fueron teñidos por la técnica convencional con acetato de uranilo y citrato de plomo (Venable y Gogeshal 1965), para luego ser observadas al microscopio electrónico Hitachi H-500 operando a 100 KV.

RESULTADOS

ALTERACIONES ESTRUCTURALES

La morfología de los nucleolos de las células control, en diferentes etapas del ciclo celular bajo la técnica de impregnación argénica, se muestra en la Fig. 1: en células interfásicas (I), los nucléolos se observan teñidos de marrón oscuro, dentro de un núcleo que toma una coloración más clara; estos se presentan como cuerpos esféricos densos de 2 a 4 μm de diámetro, con sus componentes nucleolares con características de núcleos activos. En las células en profase (P), el nucléolo toma una forma estrellada o amorfa; en metafase (M) y anafase (A) no se observa nucléolo, y en telofase (T) se observan los cuerpos prenucleolares en los núcleos en formación. En las células

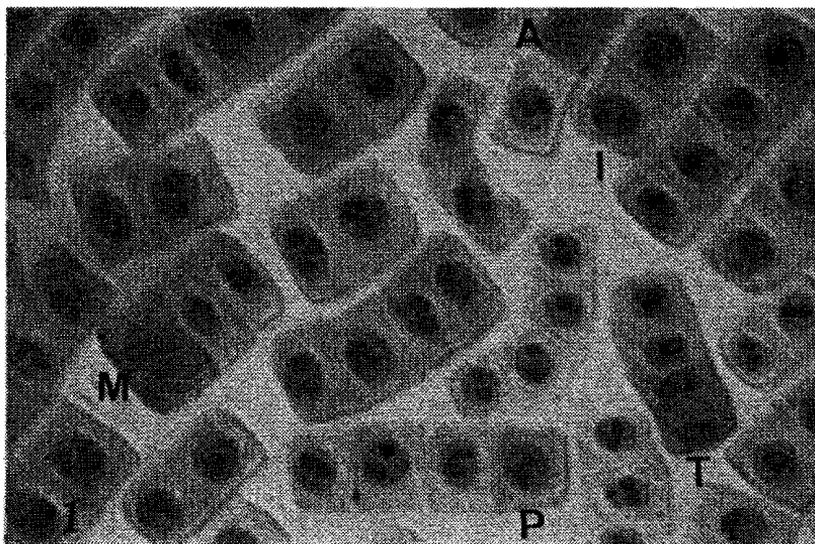


FIGURA 1. Se muestran nucleolos de células control, por microscopía óptica, en diferentes etapas del ciclo celular mediante la técnica de squash: Interfase (I), Profase (P), Metafase (M), Anafase (A) y Telofase (T). Tinción AgNO_3 . 100 X.

tratadas con Plomo, para todos los tiempos y concentraciones utilizados, se observa una redistribución de los componentes nucleolares en las células en interfase (Fig. 2), dándose el fenómeno conocido como segregación nucleolar. Este fenómeno se ha reportado como una manifestación morfológica típica del nucléolo cuando se someten las células a algún agente tóxico (Giménez-Abian *et al.* 1985, Marcano y Del Campo 1995).

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES

Para observar en detalles los cambios inducidos en el nucléolo de células expuestas al metal, se realizó un análisis de la ultraestructura de células interfásicas; la Figura 3 muestra el núcleo de una célula control, obsérvese el nucléolo bien definido, con sus componentes: granular (G) y fibrilar (F) entremezclados, zonas claras correspondientes a las vacuolas nucleolares (\downarrow) y lo conocido como centros fibrilares (Cf) los cuales se asocian con sitios donde se localizan los genes que no son transcritos, estando relacionados con la activi-

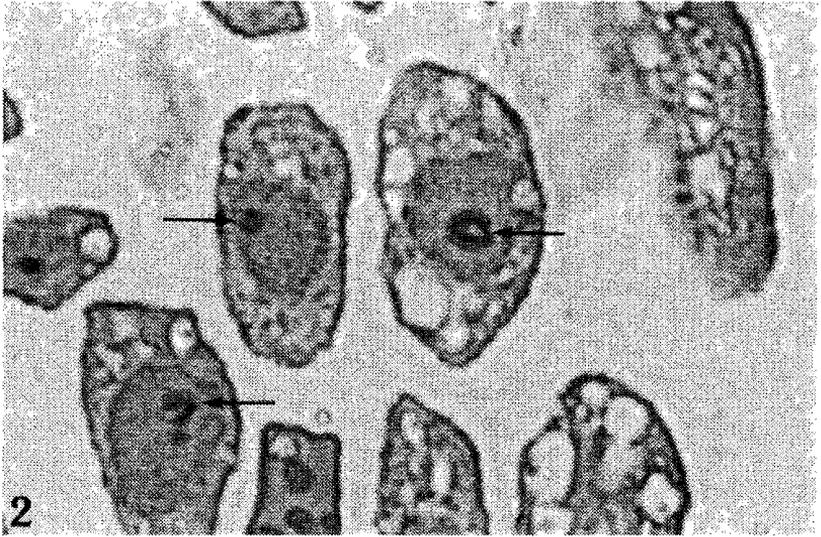


FIGURA 2. Cortes de tejido meristemático tratado con plomo: se observa la segregación nucleolar (\downarrow), en células interfásicas. Tinción AgNO_3 . 500 X.

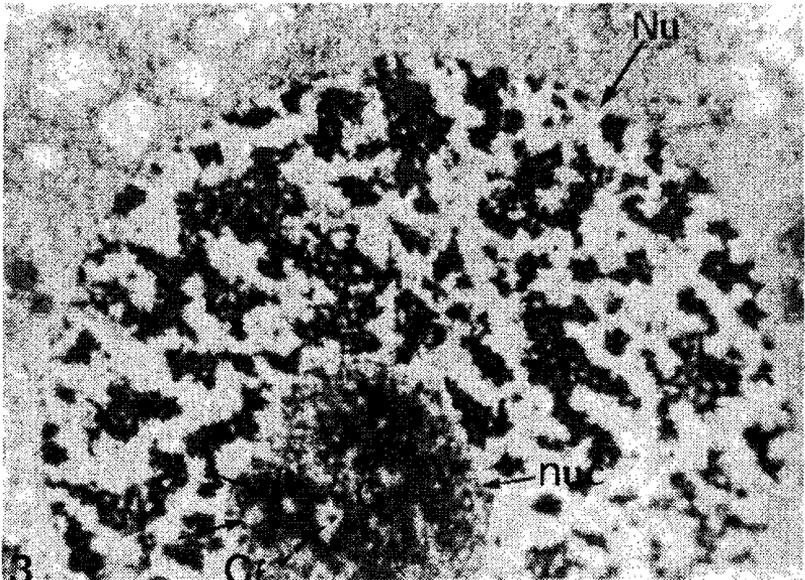


FIGURA 3. Ultraestructura de célula interfásica control, se observa el núcleo (Nu) con un nucléolo (Nuc) bien definido; componentes: granular (G) y fibrilar (F) entremezclados, vacuolas nucleolares (\downarrow) y Centros fibrilares (Cf). 30.000 X.

dad biosintética de las células, ya que su frecuencia y tamaño varía de acuerdo a la tasa metabólica. (Risueño *et al.* 1982). En las células expuestas a 5 ppm por 4 horas (Fig. 4), se muestra en detalle la segregación nucleolar descrita anteriormente, el componente granular (G) se dispone periféricamente rodeando al componente fibrilar (F); se observa también un aumento en el número de centros fibrilares (Cf), en los cuales se asume que está presente la cromatina de la región del organizador nucleolar (NOR), en estado inactivo, entremezclado con una porción de cromatina (Risueño *et al.* 1982). La Figura 5 muestra las alteraciones del núcleo en las células expuestas al Pb^{+2} a una concentración de 10 ppm por 8 horas; se observa un núcleo (Nu), con la cromatina en un estado de condensación mayor al característico de las células en interfase, el nucléolo (Nuc) con un componente fibrilar colapsado, ausencia de componente granular y zonas de baja densidad electrónicas que podrían ser considerados como centros fibrilares (Cf) inactivos.

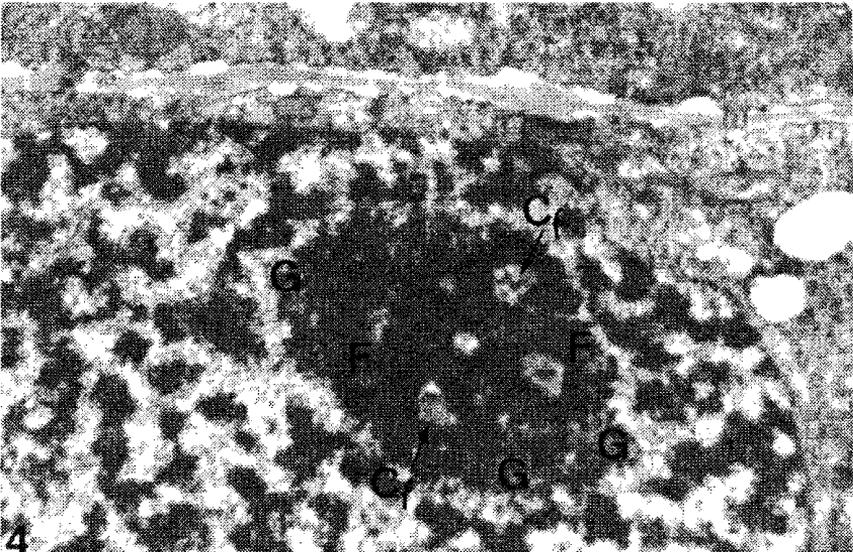


FIGURA 4. Células expuestas a 5 ppm por 4 horas: Se muestra en detalle la segregación nucleolar, el componente granular (G) se dispone periféricamente rodeando al componente fibrilar (F), se observa también un aumento en el número de Centros fibrilares (Cf).40.000 X.

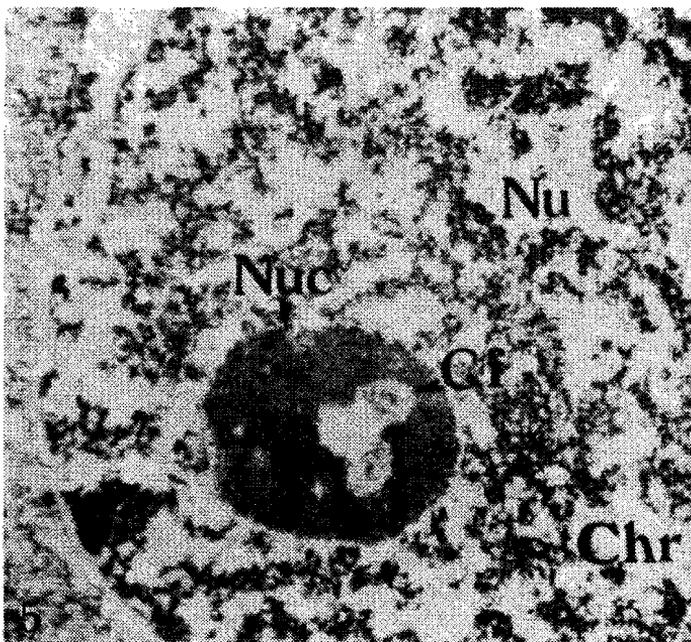


FIGURA 5. Células expuestas a 10 ppm por 8 horas: Se observa el núcleo (Nu) con cromatina condensada, el nucléolo (Nuc), con un componente fibrilar (F) colapsado y Centros fibrilares inactivos (Cf). 30.000 X.

Al aumentar la concentración y tiempo de exposición los cambios observados son más drásticos, la Figura 6 muestra una célula expuesta a una concentración de 20 ppm del metal por 8 horas: se observa el núcleo con cambios en su morfología y el nucléolo en un estado colapsado similar al descrito anteriormente. La Figura 7 presenta los cambios cuando las células son expuestas a 20 ppm por 24 horas, obsérvese las características de necrosis celular, con pseudolobulación del núcleo (Nu) y degradación de la cromatina (Chr), el nucléolo (Nuc) toma un aspecto tan colapsado que es imposible identificar sus componentes.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tanto por microscopía óptica como electrónica, muestran la segregación nucleolar que se produce cuan-

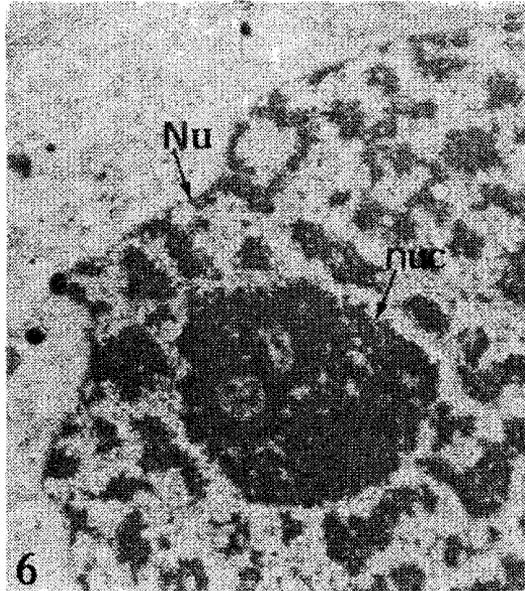


FIGURA 6. Células expuestas a 20 ppm por 8 horas: Obsérvese el núcleo (Nu) con cambios en su morfología, nucléolo (Nuc) colapsado sin aparente componente granular. 26.000 X.

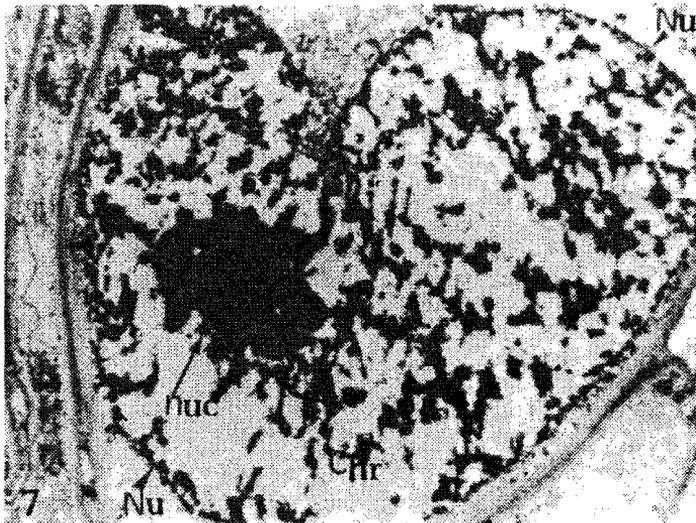


FIGURA 7. Células expuestas a 20 ppm por 24 horas: Se observa las características de necrosis celular pseudolobulación del núcleo (Nu) y degradación de la cromatina (Chr); el nucléolo (Nuc) colapsado. 30.000 X.

do las células son expuestas al Plomo a 4 ppm por 4 horas (Figs. 2 y 4). Como se puede observar el componente fibrilar toma una topografía central rodeado por el componente granular. Según los reportes de algunos autores, la segregación nucleolar parece ser una respuesta fija de las células al ser expuestas a varios inhibidores metabólicos tales como: inhibidores de la síntesis de ARN como la α -amanitina (Moreno Díaz de la Espina *et al.* 1976); síntesis de proteínas como la cicloheximida (Marcano y Del Campo 1995) y de agentes físicos como la hipoxia (Gimenes-Abian *et al.* 1985). En el caso del plomo se ha reportado su efecto antagónico con otros metales divalentes que participan en el metabolismo celular, al parecer el ion compite con el Ca^{+2} alterando la función del metabolito (Mahaffey *et al.* 1982), por otro lado se une a los grupos $-\text{SH}$ convirtiéndolo en un potente inhibidor enzimático (Heinz *et al.* 1983), e interfiere con el Zn^{+2} , inhibiendo las metaloenzimas (Ladrón de Guevara y Moya 1995); su interacción con los grupos sulfhidrilos y con los átomos de Zinc presentes en las proteínas que participan en los procesos de transcripción del ARN conocidas como “dedos de Zinc”, podrían alterar los mecanismos de reconocimiento y unión al ADN por la ARN polimerasa, bloqueando de esta manera la transcripción, lo cual coincide con los reportes de Hartwig *et al.* (1990), quienes establecen un efecto genotóxico inducido por el plomo producto de una inhibición de los mecanismos de reparación del ADN; Blankenship *et al.* (1997), señalan el efecto apoptótico inducido por el metal por activación de endonucleasas e inhibición de enzimas relacionadas con los procesos de replicación del ADN; el efecto clastogénico inducido por el metal también ha sido reportado por Wise *et al.* (1992). En las condiciones experimentales expuestas, la segregación nucleolar observada se presenta con un aumento en el número de centros fibrilares, los cuales están relacionados con un bloqueo de la actividad biosintética del nucléolo (Risueño *et al.* 1982, Marcano y Del Campo 1995) y van acordes con la presunción de que el Plomo podría actuar ejerciendo su toxicidad por su efecto bloqueador sobre la síntesis de ARN dependiente del ADN.

Al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, las alteraciones inducidas por el metal son más drásticas, la Figura 5 muestra, además de un estado de mayor condensación de la cromatina, un nucléolo colapsado, sin aparente componente granular y con un solo centro fibrilar vacuolizado, estas características morfológicas podrían ser consideradas como evidencias de una actividad nucleolar bloqueada según lo expuesto anteriormente, la cual se incrementa conforme se aumenta la concentración y tiempo de exposición al Pb^{+2} (Fig. 6). El efecto se hace relevante cuando se observan los cambios morfológicos característicos de una necrosis celular que se muestran en la Fig. 7. La necrosis observada cuando se someten las células a concentraciones altas de plomo (20 ppm) y a tiempo prolongado (24 h), van acordes con los reportes establecidos por otros autores, quienes establecen las propiedades carcinogénicas del metal en trabajadores expuestos ocupacionalmente (U.S. Environmental Protection Agency 1989, Hartwig *et al.* 1990, Wise *et al.* 1992, U.S. Department of Health and Human Services 1992).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten corroborar la extrema toxicidad inducida por el plomo en los cultivos celulares expuestos, el efecto tóxico podría ser consecuencia de un bloqueo de la actividad biosintética del nucléolo, inhibiendo la transcripción del ARN ribosomal.

LITERATURA CITADA

- BAGHURST P. A., A. J. MCMICHAEL y M. R. WIGG. 1992. Environmental exposures to lead and children's intelligence at the age of seven years. *New Engl. J. Med.* 327: 1279-1284.
- BLANKENSHIP L. J., D. L. CARLISLE, J. P. WISE, J. M. ORENSTEIN y L.E DYE. 1997. Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: differential effects, genotoxicity and survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146(2): 270-80.

- BARRY RYAN P., N. HUET, y D. L. MACINTOSH. 2000. Longitudinal Investigation of Exposure to Arsenic, Cadmium and Lead in Drinking Water. *Environm. Health Perspect.* 108(8): 731-735.
- CODINA J. y A. PÉREZ. 1993. Los metales pesados como polucionantes tóxicos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 250-254.
- COOK L. R., S. J. STOHS, C. R. ANGLE, T. I. HICKMAN y R. C. MAXELL. 1987. Erythrocytemembrane microviscosity and phospholipid composition in lead workers. *B. J. Ind Med.*, 44:12. 841-4.
- DIETRICH K. N., K. M. KRAFFT y R. L. BORNSCHEIN. 1987. Low-level fetal lead exposure effect on neurobehavioral development in early infancy. *Pediatrics* 80: 721-730.
- ERNHART C.B., M. MORROW-TLUCAK, A.W. WOLF, D. SUPER y D. DROTAR. 1989. Low lead exposure in the prenatal and early preschool periods: Intelligence prior to school entry. *Neurotoxicol. Teratol.* 11:161-170.
- FERNANDEZ-GOMEZ M. E., J. C. STOCKERT, J. F. LOPEZ-SAEZ y G. GIMENEZ-MARTÍN. 1969. Staining plant cell nucleoli with AgNO_3 after formalin-hidroquinone fixation. *Stain Techn.* 44: 48-49.
- FISKESJO, G. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-112.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ A. J., M. MOTAS-GUZMAN, I. NAVAS, M. P. MOJICA y J. A. SÁNCHEZ-GARCÍA. 1997. Environmental exposure and distribution of lead in four species of raptors in southeastern Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 76-82.
- GIMENES-ABIAN M. I., J. S. RUFAS y C. DE LA TORRE. 1985. The plant nucleolar cycle under hipoxia. *Protoplasma* 126: 47-53.
- GONZÁLEZ H., A. FERNÁNDEZ y R. A. ROMERO. 1988. Niveles de plomo total sedimentado en los suelos de la ciudad de Maracaibo. *Ciencia* 6: 63-75.
- GRANADILLO, V. y R. A. ROMERO. 1986. Blood levels in the Maracaibo population: Comparative methods of analysis. 13th FACSS Meeting, No. 611 St. Louis, USA.
- GRANADILLO V. A., J. E. TAHAN y R. A. ROMERO. 1994. Plomo en materiales químicos y ambientales, evaluados por Espectrometría de Absorción Atómica Electrodermica. Laboratorio de Instrumentación Analítica

- (L.I.A.). Facultad Experimental de Ciencias. LUZ. Serie L.I.A. No. 6, Maracaibo.
- HAN, S., D. H. PFIZENMAIER, E. GARCÍA, M. L. EGUEZ, M. LING, F. W. KEMP y J. D. BOGDEN. 2000. Effects of Lead Exposure before Pregnancy and Dietary Calcium during Pregnancy on Fetal Development and Lead Accumulation. *Environm. Health Perspect.* 108(86): 527-531.
- HARTWIG A., R. SCHLEPEGRELL y D. BEYERSMANN. 1990. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 241(1): 75-82.
- HEINZ, G., T. S. HASEL., L. SILEO. 1983. Altered avoidance behavior of young black duck fed cadmium. *Envirom. Toxicol. Chem.* 2: 419-421.
- LAYMAN, P. L. 1983. Use of lead in gasoline in Europe, heads for possible phaseout. *Chemical and Engineering News.* 4: 7-13.
- LADRÓN DE GUEVARA J. y P. V. MOYA. 1995. *Toxicología Médica (Clínica y Laboral)*. Interamericana Mc. Graw-Hill, 1ª edición en Español. Madrid-España.
- LIU D., W. JIANG, W. WANG, L. ZHAI, D. H. LIU, W. S. JIANG, W. WANG y L. ZHAI. 1995. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium* test. *Israel J. Plant. Sci.* 43(2): 25-133.
- LUGHMAN A. 1988. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. Division of Nephrology and Hypertension, Department of Internal Medicine, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah 84132, USA.
- MAHAFFEY K. R., J. F. ROSEN, R. W. CHESNEY, J. T. PEELER, C. M. SMITH y H. F. DELUCA. 1982. Association between age, blood lead concentration, and serum 1, 25 -Dihydroxy cholecalciferol levels in children. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1327-1331.
- MARCANO L. y A. DEL CAMPO. 1995. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* (L.) tratadas con inhibidores metabólicos. *Ciencia* 3(2): 73-82.
- MATA L., L. SANCHEZ y M. CALVO. 1996. Plomo en leche y otros alimentos. *Tecnología y Bioquímica de los alimentos*. Universidad de Zaragoza. España.

- MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., M. C. RISUEÑO, M. E. FERNÁNDEZ-GÓMEZ y C. J. TANDLER. 1976. Ultrastructural study of the nucleolar cycle in meristematic cells of *Allium cepa*. *J. Microscopie Biol. Cell* 25: 265-278.
- MORENO DIAZ DE LA ESPINA S. y M. C. RISUEÑO. 1977. Fibrillar bodies in *Allium cepa*: an ultrastructural study. *Biol. Cell.* 30(2): 93-102.
- NRIAGU JO. 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* 279: 409-411.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1979. Criterios de Salud Ambiental 3. Plomo. Publicación Científica No. 388. Washington.
- RISUEÑO M. C., F. J. MEDINA y S. MORENO DÍAZ DE LA ESPINA. 1982. Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells. Ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Science.* 58: 313-329.
- ROMANIUK J. y B. GABARA. 1988. Heavy metal action on the dry mass content and surface area cytoplasm during differentiation of cortex cells in pea (*Pisum sativum* L.) roots. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 26(4): 263-73.
- SALTZMAN B. E., J. CHOLAK J., L. J. SHAFER, D. W. YEAGER, B. G. MEINERS, y J. SVETTIC. 1985. Concentration of six metals in the air of eight cities. *Environ. Scienc. Tech.* 19: 328-333.
- SHANNON M. W. y J. W. GRAEF. 1992. Lead intoxication in infancy. *Pediatrics* 89: 87-90.
- SHORTEN C. V. y M. K.HOOVEN. 2000. Methods of Exposure Assessment: Lead- Contaminated Dust in Philadelphia Schools. 108: 663-666.
- SHUKLA R., K. M. DIETRICH, R. L. BORNSCHEIN, O. BERGER y P. B. HAMMOND. 1991. Lead exposure and growth in the early preschool child: A follow up report from the Cincinnati Lead Study. *Pediatrics* 88: 886-892.
- STEINKELLNER H., K. MUN SIK, C. HELMA, S. ECKER y S. KNASMULLER. 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31(2): 183-91.
- U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 1992. Public Health Service. A Public Health Service Progress Report on Healthy People 2000: Environmental Health. Washington, D. C.

- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989. Evaluation of the Potential Carcinogenicity of Lead and Lead Compounds: In Support of Reportable Quality Adjustments Pursuant to CERCLA Section 102, Washington D. C. Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development.
- VENABLE J. U. y R. GOGESHAL. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscope. *J. Cell Biol.* 25: 407-408.
- WISE J. P., J. C. LEONARD y S. R. PATIEMO. 1992. Clastogenicity of lead chromate particles in hamster and human cells. *Mutat. Res.* 278(1): 69-79.