

Inducción de aberraciones cromosómicas (CA) durante la fase replicativa del genoma (S) por la azida sódica (SA) en meristemos radicales de *Allium cepa*, L

Antonio Del Campo G.* y Rina Coletto O.

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

Recibido: 19-03-97 Aceptado: 29-06-99

Resumen

La acida sódica (SA) utilizada a concentraciones finales de 10^{-4} M y 10^{-5} M se comporta como agente clastogénico y genotóxico produciendo diversos tipos de aberraciones cromosómicas (CA) en meristemos radicales de *Allium cepa*, crecidos en condiciones constantes de temperatura, humedad y oscuridad. Cuando los meristemos alcanzaron su cinética de equilibrio dinámico recibieron los diversos tratamientos: 1. sólo con el herbicida para el análisis de las CA originadas o 2. postratamientos con cafeína para el estudio de la evolución del índice mitótico (MI) y su acción potenciadora de daño cromosómico. Los resultados obtenidos demuestran que: 1. la SA presenta una proyección polivalente que dimana de su actividad sobre la cadena respiratoria, 2. el efecto inmediato del herbicida sobre las células meristemáticas parece consistir en un bloqueo al comienzo de la reparación del genoma disminuyendo su velocidad de progresión en el ciclo y 3. la falta de uniformidad sobre los efectos de la SA entre los diversos materiales de estudio puede deberse a su escasa estabilidad en solución.

Palabras clave: Acida sódica; *Allium cepa*; cafeína; ciclo de división celular.

Induction chromosomal aberrations during replication phase (S) by sodium azide in root meristems of *Allium cepa*, L

Abstract

Sodium azide (SA) used at concentrations of 10^{-4} M and 10^{-5} M it acts as a clastogenic and genotoxic agent producing diverse types of chromosomal aberrations (CA) in radical meristems of *Allium cepa* grown under conditions of constant temperature, humidity and darkness. When the meristems reached their dynamic cinetic equilibrium they were subjected to different treatments: 1. only with the herbicide to determine levels of CA o 2. posteriorly treated with caffeine to determine the evolution of the mitotic index (MI) and potential chromosome damage. The results obtained showed that: 1. sodium azide presents a polyvalent projection that acts on the respiratory chain, 2. the immediate effect of SA on meristematic cells appears to have a blocking action at the beginning of the genome reparation reducing its velocity of progression in the cy-

* Autor para la correspondencia.

cle, and 3. the uniformity lack on the effects of the SA between the diverse materials under study could be caused by the lack of stability in the solution.

Key words: *Allium cepa*; caffeine; cell cycle division; sodium azide.

Introducción

Entre la diversidad de plantas superiores seleccionadas para los distintos bioensayos utilizados para la detección e identificación de daños cromosómicos, los meristemas radicales de *Allium cepa* presentan ventajas que se han utilizado en este trabajo: la gran cantidad de raíces por bulbo, la presencia de células isodiamétricas relativamente grandes, pocos cromosomas en número, grandes en tamaño e iguales en forma, a excepción de los portadores de los organizadores nucleolares, ofrecen un material fácilmente manejable para este y otros tipos de estudio.

Desde la década de los años 50 se conocen los efectos mutagénicos de las azidas sobre diversos materiales vegetales ya que desde entonces eran utilizadas como potente veneno respiratorio. Tanto Simon y Bevers (1) como Spencer (2), trabajando con SA en *Hordeum vulgare* concluyeron que el herbicida inhibe la catalasa y peroxidasa en solución tamponada a pH = 3 o induce plántulas deficientes en clorofila hasta la generación M2, retornando a la normalidad después de 16 horas de germinación (2). En 1980, Khalatkar y Kashilar (3) quienes utilizaron *Petunia hybrida* como material de estudio, obtuvieron también mutantes deficientes en clorofila y con variantes en el color de la flor en la generación M1. Resultados parecidos obtuvieron Afsar *et al.* (4) en *Oryza sativa*. En 1993, Duncanson *et al.* (5) lograron aislar mutantes de cebada (*Hordeum vulgare*) inducidos por la acida, capaces de acumular nitritos en sus hojas por una mutación recesiva de un solo gen llamado *Nir 1*; también Olsen *et al.* (6) detectaron 21 sustituciones de bases en 12.704 nucleótidos secuenciados.

Se ha reportado acción mutagénica de la SA en una gran variedad de plantas como guisantes (7), trigo diploide, soya, haba, etc. (8).

Más recientemente, diversos investigadores han coincidido en estos efectos de la azida sódica: Bennet y Rose (9,10) la incluyen como un inhibidor selectivo de la citocromo oxidasa; bloquea la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ dependiente (11), de la ATPasa-K⁺ dependiente (12), de la ATPasa-Mg²⁺ dependiente (13) y de la ATPasa vacuolar (14); interviene en la oxidación de la cisteína a ácido cístico (15); actúa como inhibidor de la glucólisis (16) y de la endocitosis (17). También en roedores y primates se ha demostrado que es un inhibidor de la citocromo oxidasa que produce selectivamente lesiones dañando la fosforilación oxidativa (18). En general bloquea la transferencia de electrones a nivel mitocondrial y por lo tanto, la producción de energía para los procesos vitales de la célula.

Se puede afirmar, por la literatura revisada, que la SA actúa de distintos modos según el tipo de vegetal, sin poder precisar la razón de estos resultados tan ambiguos; posiblemente la escasa estabilidad de la azida sódica en solución, podría ser la razón de esta realidad (19). Entonces, aunque los mecanismos de acción no están muy claros, sí lo están los efectos que produce en la célula y que ya quedaron reseñados en párrafos anteriores.

Con el presente trabajo se trata de: 1. determinar la acción clastogénica y genotóxica de la SA a diferentes concentraciones, que permitan clasificar a este compuesto como agente químico capaz de producir diferentes tipos de aberraciones cromosómicas; 2. determinar el momento del ciclo de división celular en el que es más efectivo el

herbicida y a qué concentración; y 3. analizar el bloqueo de la entrada de las células en mitosis, después de un tratamiento con la SA y detectado mediante postratamientos con cafeína.

Materiales y Métodos

El material utilizado fueron los meristemas radicales de *Allium cepa* crecidos en oscuridad, a temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ y en cilindros de vidrio de 80 mL de capacidad que contenían agua destilada y aireada por burbujeo a una tasa de 20 mL/min. Los bulbos, de 20-30 g de peso, fueron colocados de tal forma que solamente sus bases permanecían en contacto con el agua. Cuando las raíces desarrollaron 20 mm de longitud, recibieron los tratamientos correspondientes por encontrarse en cinética de equilibrio dinámico.

Las condiciones de cultivo descritas anteriormente, se mantuvieron durante los distintos tratamientos con SA, cafeína y colchicina.

Tratamientos con azida sódica (SA)

Identificada químicamente como NaN_3 , es una sal inorgánica conocida por su toxicidad sobre la cadena respiratoria.

Se le 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 de trabajo; se disolvió en agua destilada a razón de 10^{-3} M como solución madre y a partir de esta se fueron preparando las distintas diluciones.

Para conocer el daño causado por la SA se aplicó un tratamiento de 1 h, seguido de observaciones a las horas 3,6,9,12,15 y 18 de recuperación; para el análisis de la progresión del índice mitótico se aplicaron tratamientos conjuntos con cafeína 3 mM. Todos estos estudios se hicieron con concentraciones del herbicida a 10^{-4} M y 10^{-5} M. Para la cuantificación de las CA los meristemas recibieron tratamientos de 1 h de duración a esas mismas concentraciones.

Tratamiento con cafeína

La cafeína es una droga que utilizada a nivel de telofase media y tardía bloquea la citocinesis, originándose células mononucleadas $4n$ o binucleadas $2n-2n$, pero utilizada en otras condiciones actúa como inhibidora de la reparación del genoma durante los periodos G2 y profase del ciclo de división celular. En este trabajo se utilizó a una concentración de 3 mM y se suministró a los meristemas durante 2 h después de un tratamiento con SA de 1 h de duración con el fin de conocer la evolución del índice mitótico con este tratamiento conjunto y con relación a tratamientos controles con sólo SA y con sólo cafeína.

Con la finalidad de estudiar la presencia de células en c-mitosis se dieron tratamientos con colchicina, 0,05%.

Estudios citológicos

Recuento de las aberraciones cromosómicas: Tomando en cuenta todas las células meristemáticas en metafase, anafase y telofase de cada preparación, se determinó el número de cada una de ellas que mostraba algún tipo de daño cromosómico, calculándose el porcentaje de estas anomalías.

Tinción de las preparaciones: Para los estudios citológicos, las raíces tratadas con las distintas soluciones, fueron fijadas previamente en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1) y coloreadas posteriormente mediante la técnica de Feulgen-Rossembeck.

Resultados y Discusión

Consideraciones preliminares

Los meristemas radicales de *Allium cepa* tienen una cinética de equilibrio dinámico caracterizada por un constante crecimiento que determina el mantenimiento de un número siempre fijo de células en cada fase del ciclo.

Se ha observado que concentraciones de SA a 10^{-4} M y 10^{-5} M, aunque deprimen el

Tabla 1
Evolución del índice mitótico, después de 2 h de tratamiento con la acida sódica (SA)
a diferentes concentraciones y con relación al control

Horas	(SA)					Control
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	
3	0,7*	$5,8 \pm 1,1$	$8,0 \pm 3,4$	$11,6 \pm 2,7$	$13,2 \pm 6,1$	$12,1 \pm 3,3$
6	0,9*	$2,4 \pm 0,7$	$7,9 \pm 2,6$	$8,3 \pm 3,9$	$14,6 \pm 5,4$	$14,6 \pm 4,8$
9	0,8*	$1,6 \pm 0,2$	$9,0 \pm 3,1$	$10,7 \pm 4,0$	$13,8 \pm 4,8$	$14,5 \pm 2,6$
12	0,9*	$4,8 \pm 1,0$	$9,9 \pm 2,7$	$11,4 \pm 4,1$	$12,6 \pm 3,5$	$13,7 \pm 4,1$
15	1,0*	$4,3 \pm 0,9$	$11,4 \pm 3,6$	$9,9 \pm 3,3$	$13,1 \pm 5,0$	$13,2 \pm 4,9$
18	0,9*	$6,1 \pm 2,1$	$11,6 \pm 5,2$	$11,2 \pm 2,7$	$13,0 \pm 4,8$	$13,2 \pm 2,8$
X _(IM) **	0,9*	$4,2 \pm 1,0$	$9,6 \pm 3,5$	$10,5 \pm 3,5$	$13,2 \pm 4,8$	$13,5 \pm 3,8$
X _(c.l.) ***	8.199	9.132	7.409	7.863	8.171	5.642

(*) No se tomaron en cuenta las SD por ser inapreciables. (**) Promedio del índice mitótico. (***) Promedio de células leídas.

crecimiento por un descenso del índice mitótico adquiriendo nuevos equilibrios proliferativos, estos permanecen constantes a lo largo del tiempo, por lo que se han escogido estas concentraciones para los estudios citológicos de este trabajo.

Cinética celular en meristemas radicales sometidos a tratamientos con SA

Desde 1952 se conocen los efectos clastogénicos y genotóxicos de las azidas sobre muchos materiales vegetales y animales (1-20) en tratamientos de 1 y 2 h. En este trabajo se decidió valorar el efecto del herbicida a las concentraciones de $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M durante 1 h y su incidencia sobre el índice mitótico. Los resultados se expresan en la Tabla 1 en la que se observa una fuerte depresión a $5 \cdot 10^{-4}$ M y que llega a 0,9% de células en mitosis; a pesar de que las concentraciones 10^{-4} M y 10^{-5} M deprimen también el índice mitótico, más en el primer caso que a 10^{-5} M, se adquieren sin embargo, nuevos equilibrios proliferativos que son estables a través del tiempo; concentraciones inferiores no afectan prácticamente la velocidad de crecimiento con relación a los controles.

Aberraciones cromosómicas producidas por la SA

La toxicidad de productos clastogénicos se hace evidente por la alteración de parámetros determinados en la cinética celular y que se expresan de diferentes formas: mutaciones y aberraciones como células c-mitóticas y relacionadas con éstas los cromosomas retardados, roturas cromosómicas, puentes cromosómicos y "stickyness" que tienen que ver con la falta de descondensación de la cromatina, Figura 1a,b,c,d, e,f y g.

En la Figura 2 se muestra el efecto de la SA, 10^{-4} M y durante 1 h de tratamiento, seguido de otro con cafeína 3 mM durante 2 h, en las células meristemáticas de *Allium cepa* sobre la producción de aberraciones cromosómicas. Como era de esperar, el control con cafeína presenta un cierto % de daño cromosómico aunque mucho menor que el observado en las células sometidas al tratamiento conjunto. Ahora bien, la SA no solamente produce aberraciones cromosómicas sino que en algunos materiales de estudio se presenta como fuerte mutágeno; Sander *et al.* en 1978 (2), Khaltkar y Kasikar en 1980 (3) y Duncanson *et al.* en 1993 (5) lograron aislar

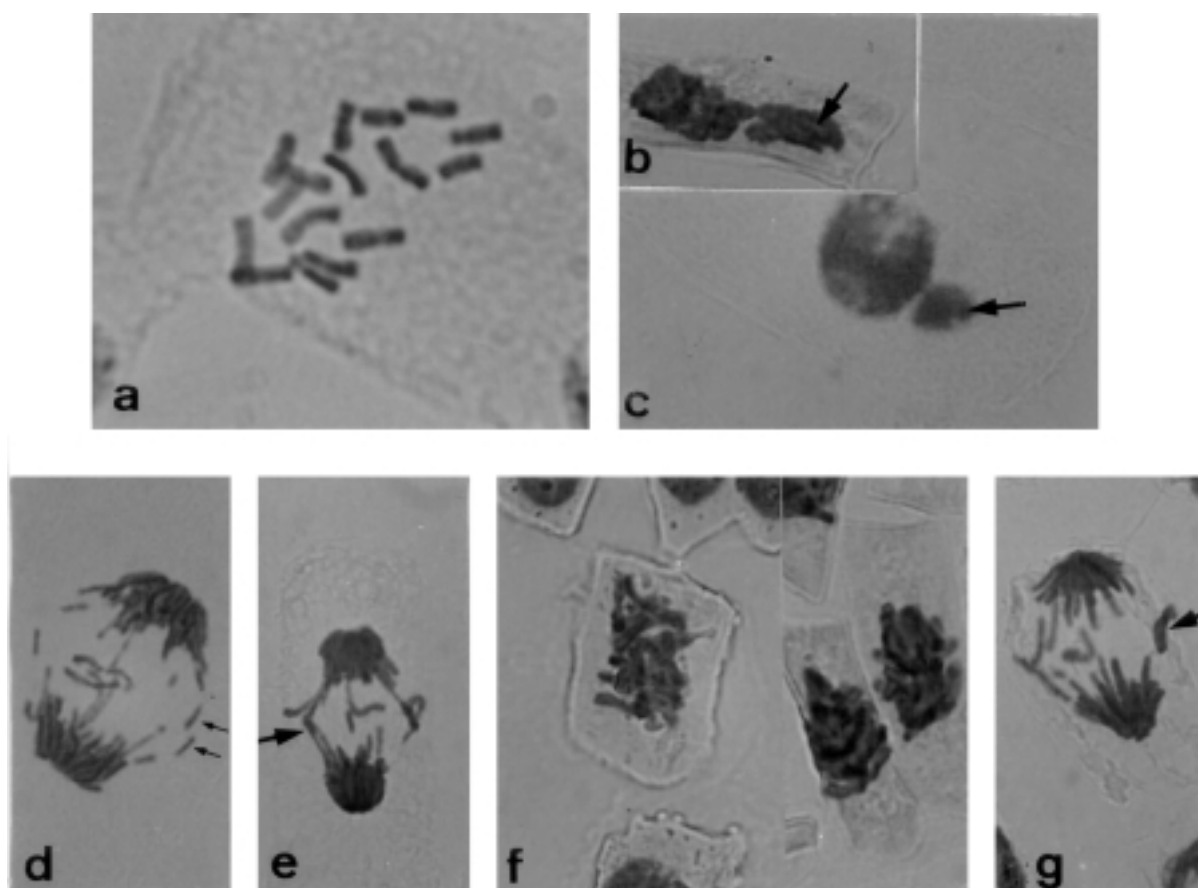


Figura 1. Aberraciones cromosómicas producidas por la azida sódica:

- a. c-mitosis
- b. micronúcleo en fase mitótica (flecha)
- c. micronúcleo en interfase (flecha)
- d. roturas cromosómicas (flechas)
- e. puentes anafásicos (flecha)
- f. styckiness
- g. cromosomas "rezagados"

mutantes de *Hordeum vulgare* inducidos por el herbicida y capaces de acumular nitritos en sus hojas; en otras variedades de plantas: guisantes (7), trigo, soya, etc. (8) la SA es también fuertemente mutagénica.

En *Allium cepa* el herbicida no parece ser mutagénico aunque la variedad de aberraciones cromosómicas que causa es mayor que la de otros clastógenos, por ejemplo, hidrácida maleica. Como se observa en la Tabla 2 y Figura 1a,b,c,d,e,f y g, los diversos tipos de daño causados a las células varían

con las distintas concentraciones; así, mientras que las roturas de cromosomas y los "stickyness" se hacen presentes a $5 \cdot 10^{-4}$ M y 10^{-4} M, la presencia de puentes cromosómicos se limita a 10^{-5} M y 10^{-6} M; las c-mitosis y la presencia de cromosomas "rezagados" detectados en todas las concentraciones utilizadas, van disminuyendo a medida que las concentraciones son menores. La presencia de células en c-mitosis y la de cromosomas "rezagados", presentes a las distintas concentraciones del herbicida, se

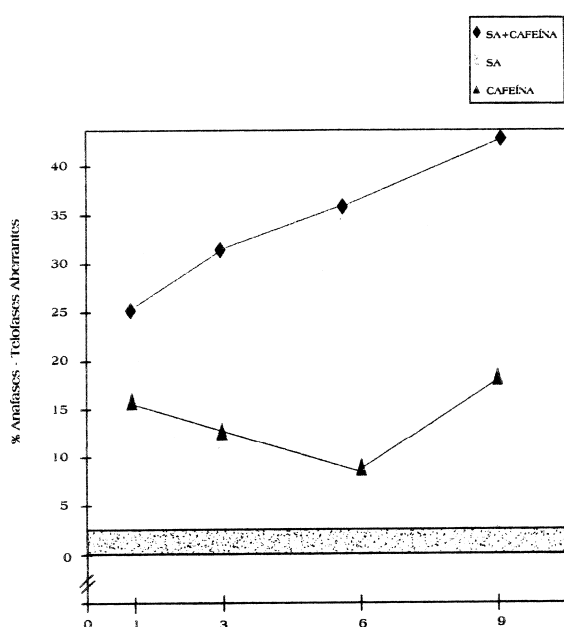


Figura 2. Efecto de la azida sódica (SA), 10^{-4} M y tratamiento de 1 h de duración, seguido de tratamiento con cafeína 3 mM en meristemas radicales de *Allium cepa*. Las células fueron sometidas a tratamiento conjunto o tratadas sólo con cafeína o con SA. La barra horizontal sombreada representa el rango de valores correspondientes a la normalidad.

asocia a la acción de la SA sobre el huso acromático, estructurado por proteínas y ARN entre algunos de sus componentes, por lo que este herbicida incidiría sobre la síntesis de ARN e indirectamente sobre la síntesis de las proteínas que codifica y en definitiva, sobre el ensamblaje del huso mismo; la presencia de "stickyness" puede deberse a un efecto de la droga sobre la estructura de la cromatina bloqueando su descondensación o ser el resultado de las mismas roturas cromosómicas unidas por algún tipo de ligasas; la presencia de núcleos aneuploides (micronúcleos) y cromosomas "rezagados" podría deberse a un inicio de la anafase antes de que los cromosomas se encuentren alineados en la región ecuatorial de la célula por bloqueo de los controles de regulación negativa (checkpoints) causado por los distintos tratamientos; en cualquier caso, nuevos estudios son necesarios para puntualizar estos resultados.

Sin embargo, este herbicida no induce aberraciones cromosómicas en *Vicia faba* ni en otras plantas superiores (18,20). Estos diferentes resultados pueden explicarse por la escasa estabilidad de la SA en solución o deberse a las diferentes condiciones de pH o diferentes lapsos de exposición lo que convierte a este compuesto como único entre los considerados genotóxicos y clastogénicos;

Tabla 2

Tipos de aberraciones cromosómicas producidas por la azida sódica (SA) a las distintas concentraciones ensayadas. Los % están relacionados con la totalidad de metafases, anafases y telofases presentes

[SA]	Aberraciones cromosómicas					
	M-A-T(1)	c-mitosis	R.C.	P.C.	Styc.	Mcn.(2)
$5 \cdot 10^{-4}$	87,4 ± 6,1	5,4 ± 1,3	3,1	-	4,1	-
10^{-4}	84,3 ± 9,7	12,1 ± 4,2	0,2	-	2,1	-
10^{-5}	93,0 ± 12,8	5,2 ± 0,9	-	0,9	-	1,3
10^{-6}	95,7 ± 10,6	3,42 ± 1,2	-	0,3	-	0,9
10^{-7}	99,0 ± 9,0	1,0 ± 0,2	-	-	-	-

(1) metafases, anafases y telofases normales. (2) R.C. = roturas cromosómicas; P.C. = puentes cromosómicos; Styc.= styckiness; Mcn. = micronúcleos.

de todas las formas, los resultados reportados por los distintos laboratorios en relación a este herbicida, son confusos y equívocos.

Aberraciones cromosómicas por bloqueo de las rutas de reparación del ADN

Durante el periodo (G2) tienen lugar procesos de reparación del ADN (21-22) por lo que las células tratadas con este herbicida, al llegar a este periodo postreplicativo, retrasan su entrada en mitosis con el fin de reparar el ADN lesionado y poder desarrollar el siguiente ciclo como células normales. Para comprobar la veracidad de esta hipótesis se utilizó la cafeína a una concentración de 3 mM; se sabe que esta xantina es un agente inhibidor de la reparación postreplicativa del ADN. Para ello, las células meristemáticas creciendo en cinética de equilibrio, se trataron con SA 10^{-4} M durante 1 h y posterior tratamiento con cafeína durante 2 h, siendo fijadas las raíces en horas sucesivas con el fin de estudiar la progresión del índice mitótico y la producción de aberraciones cromosómicas después de estos tratamientos; fueron considerados como control, por una parte, meristemas que sólo se trataron con SA 10^{-4} M durante 1 h y por otra, bulbos sometidos únicamente al tratamiento con cafeína durante 2 h.

En la Figura 3 se representa la progresión del índice mitótico después del tratamiento conjunto con los 2 agentes (SA + cafeína) y en los 2 controles. Se puede observar que las células tratadas con SA + cafeína continúan entrando en mitosis aunque con un índice mitótico disminuido en las horas siguientes al tratamiento con cafeína; sin embargo, las células tratadas únicamente con SA sufren las mismas modificaciones en su índice mitótico observadas en los experimentos anteriores, Tabla 1; las células sometidas al tratamiento con cafeína muestran menor variabilidad. Estas diferencias en el índice mitótico se corresponden también con una diferencia en la producción de daño cromosómico: las células tratadas sólo con SA

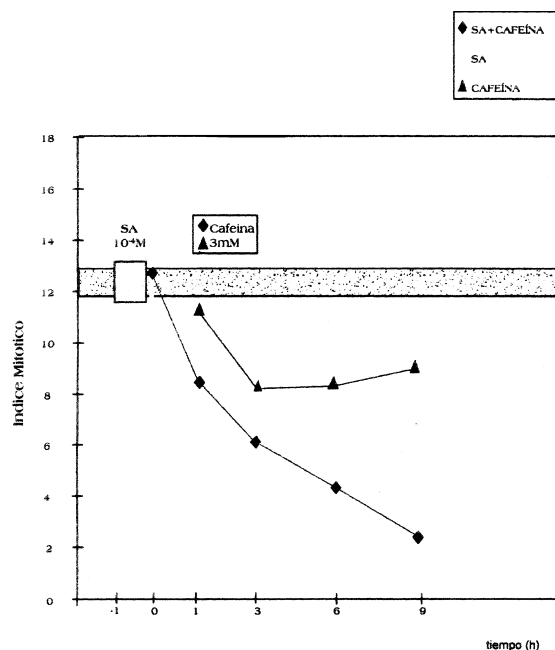


Figura 3. Modificación del índice mitótico después de un tratamiento de los meristemas de *Allium cepa* con azida sódica (SA) 10^{-4} M durante 1 h seguido de otro con cafeína 3 mM de 2 h o después de un único tratamiento con SA o con cafeína. La barra horizontal representa el índice mitótico de los controles.

presentan las A-Ta normales para este caso, Tabla 2; el control con cafeína presenta un % de aberraciones menor que el observado en las células sometidas al tratamiento conjunto, Figura 3, cuando la cantidad de A-Ta llegó al 42,1% a la hora 9 de recuperación.

La cafeína anuló, supuestamente, el bloqueo de entrada en mitosis que se observa después de un tratamiento con la SA; posiblemente, estas células se encontraban detenidas en G2 para reparar los daños producidos por el herbicida por lo que el efecto inmediato de la SA sobre las células meristemáticas, parece consistir en un bloqueo al comienzo de la reparación del genoma, disminuyendo la velocidad en su progresión en el ciclo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) el aporte económico para el desarrollo de este proyecto, así como el apoyo logístico para el mismo; se agradece también, la valiosa ayuda prestada por Joseph J., Ewald del Departamento de Biología de la FEC.

Referencias Bibliográficas

1. SIMON E.W., BEEVERS R. *New Phytologist* 51:163-190, 1952.
2. SANDER C., NILAN R.A., KLEINNOFS A., VIG B.K. *Mutation Research* 50: 67-75, 1978.
3. KALTKAR A.S., KASIKAR S.G. *Mutation Research* 79: 81-85, 1980.
4. AFSAR A.M., KONSAK C.F., RUTGERAND J.N., NILAN R.A. *Crop Science* 20: 663, 1980.
5. DUNCANSON E., GILKES A.F., KIRK D.W., SHERMAN A., WRAY J.L. *Molecular Genitic* 236(23): 275-282, 1993.
6. OLSEN O., WANG X., VON WETTSTEIN D. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17): 8043-8047, 1993.
7. SANDER C., MUEHLBANER F.J. *Environ Exptl Bot* 17: 43- 47, 1977.
8. KLEINHOF A., SMITH J.A. *Mutation Research* 29: 497-500, 1975.
9. BENNET M.C., MLADY G.W., FLESNHER M., ROSE G.M. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3): 1330-1334, 1996.
10. BENNET M.C., MLADY G.W., KWON Y.H., ROSE G.M. *J Neurochem* 66(6):2606-2611, 1996.
11. ROHN T.T., HINDS T.R., VINCENZI F.F. *Free Radic Biol Med* 18(4): 655-667, 1995.
12. FITZGERALD E.M., DJAMGOZ M.B. *J Neurosci Methods* 59(2): 273-277, 1995.
13. BEIL W., BIRKHOLZ C., WAGNER S., SEWINGK.F. *Pharmacology* 50(5): 333-337, 1995.
14. VASILVEYA E., FORGAC M. *J Biol Chem* 11(37):23823-23829, 1998.
15. MANNEBERG M., LAHM H.W., FOUNTOLAKIS M. *Anal Biochem* 224(1): 122-127, 1995.
16. CONTE M.P., LONGHI C., MARCHETTI M., VALENTI P., SEGANTI L. *Acta Microbiol Hung* 39(3-4): 281-287, 1992.
17. TAI J.H., ONG S.J., CHANG S.C., SU H.M. *Exptl Parasitol* 76(2): 165-174, 1993.
18. BROUILLET E., HYMAN B.T., JENKINS B.G., HENSHAW D.R., SCHULZ J.B., SODHL P., ROSEN B.R., BEAL M.F. *Exptl Neurol* 129(2): 175-182, 1994.
19. KANAYA H., GILL B.S., GROVER I.S., MURIN A., OSIECKA R., SANDHU S.S., ANDERSON H.C. *Mutation Research* 310(2): 231-247, 1994.
20. LUNDAVIST-GUSTAFSSON H., BENGTSOHN T. *J Leukoc Biol* 65(2):196-204, 1999.
21. GONZALEZ-FERNANDEZ A., HERNANDEZ P., LOPEZ-SAEZ J.F. *Mutation Research* 149: 275-281, 1986.
22. DEL CAMPO A., ROMERO J. *Ciencia* 2(1): 7-16, 1994.