

Alteraciones citológicas inducidas por el cadmio en células meristemáticas de raíces de cebolla (*Allium cepa* L)

Cytological alterations induce by cadmium on meristemic cells of onion roots (*Allium cepa* L)

L. Marcano, I. Carruyo y X. Montiel

Resumen

A mediados del presente siglo, la producción y el uso del cadmio en el ámbito industrial se ha extendido rápidamente; por sus efectos tóxicos es considerado un contaminante ambiental de alta incidencia en problemas de salud ocupacional. En el presente trabajo se realizó un análisis descriptivo de los cambios morfológicos y ultraestructurales producidos por el metal en meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa* L.), a objeto de dilucidar el posible mecanismo por el cual se ejerce su citotoxicidad. Los bulbos se cultivaron en agua filtrada, renovada cada 24 h a 25 °C, por cuatro días; las raíces desarrolladas fueron tratadas con una solución de cloruro de cadmio a concentraciones de 3,4 – 7,4 y 9,9 x 10⁻⁵ M. por 4, 8, 12 y 24 h; para cada tiempo y concentración se realizó un control donde el metal fue sustituido por agua. El análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), reveló variaciones de la morfología celular con respecto al control, las cuales se hacen más severas a medida que se aumenta la concentración y el tiempo de exposición. Mediante el análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) se observaron cambios en la ultraestructura celular: vacuolas de diferentes tamaños, núcleo con cromatina muy condensada, nucléolos colapsados y variaciones en mitocondrias, golgi y retículo endoplasmático. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el cadmio produce un efecto citotóxico en la población celular analizada, induciendo posibles cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática.

Palabras clave: Células meristemáticas, cadmio, citotoxicidad, alteraciones, ultraestructura.

Recibido el 6-6-2000 ● Aceptado el 20-2-2001

Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología. Telefax (0261) 7598110.

Abstract

From the middle of the present century, the production and use of cadmium in the industrial field has been extended rapidly; as a consequence of its toxic effects, it is considered as an environmental pollutant of high incidence in the occupational health problems. Due to the existing reports about its toxicity, in the present work it was performed a descriptive analysis of the morphological and ultrastructural changes produced by this metal in the radical meristems onion cells (*Allium cepa* L.), in order to elucidate the possible mechanism by which it performs its toxic effect. In order to reach these objectives, the bulbs were cultured in filtered water at 25 °C which, was renewed each 24 h during four days; the developed roots were treated with cadmium chloride solutions at concentrations of 3,4 - 7,4 and 9,9 x 10⁻⁵ M during 4, 8, 12 and 24 hours; for each period of time and concentration a control was carried out where the metal was substituted by water. The Electronic Microscopy Scanner (EMS) analysis, revealed some cellular morphology variations respect to the control, which were more severe as the cadmium concentrations and the exposition time increased. Through an Electronic Microscopy Transmissions (EMT) analysis some changes were also observed in the cellular ultrastructure: vacuoles of different sizes, nuclei with very condensed chromatin, collapsed nucleolus and mitochondria, Golgy and endoplasmatic reticule variations. The obtained results allow us to suggest that cadmium produces a citotoxic effects in the cell population, possibility inducing changes in the permeability of the plasmatic membrane.

Key words: Meristematic cells, cadmium, citotoxicity, alterations, ultrastructure.

Introducción

El cadmio es un metal pesado con alto potencial contaminante y toxicidad, por lo que ha sido objeto de interés en muchos estudios relacionados con la salud humana (1, 2). En 1992, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (22) estableció los niveles de exposición permisibles para el Cd⁺² los cuales no deben exceder de 5 mg de Cd/L; sin embargo, los estudios de exposición ocupacional al metal reportan un rango de 0,31 a 22,2 mg/L de cadmio en sangre (7, 25).

Los principales órganos donde se

acumula el cadmio son el hígado y el riñón (6), de forma que una exposición prolongada puede causar daño en túbulo renal y alteraciones en el metabolismo de la vitamina D (20). Cuando se alcanzan niveles críticos del metal en sangre (> 100 mg/g de tejido en humanos), se producen nefropatías, proteinurias y glucosurias (6). Si existe un período de exposición prolongado, se alcanza una concentración crítica, debido a que el metal se acumula de manera continua, de tal forma que, concentraciones entre 5 a 10 ppm, pueden ser tóxicas si los animales son

expuestos por largos períodos (4, 10). Akenson *et al.* (1) encontraron que el cadmio afecta el transporte de iones a través de la membrana plasmática, en este sentido, Koizumi *et al.* (9), señalan cambios bifásicos inducidos por el cadmio en el pH celular, según estos autores ocurre una acidificación inmediatamente después de la exposición al metal y una alcalinización después de un tiempo prolongado. Jugo (8) estableció que el cadmio inicialmente afecta el sistema de transporte de iones a través de la membrana alterando el flujo de sodio y potasio, pudiendo modificar el metabolismo energético, así como la síntesis de DNA y RNA.

Los alimentos pueden contaminarse con el cadmio, pasando desde el suelo y/o agua contaminados a los vegetales y de estos a los animales y al hombre; también, el uso de fosfatos con alto contenido de cadmio como fertilizante, la deposición atmosférica del metal sobre las cosechas en lugares cercanos a fuentes de emisión y el vertido de lodos contaminados sobre la tierra y el mar, contribuyen a la contaminación de los alimentos (24). Los sistemas acuáticos también son una cadena de acumulación biológica del cadmio a través de los crustáceos y

moluscos, que ingieren plancton que puede contener cadmio y lo acumulan en su organismo (12). Es de destacar la fácil transferencia de dicho metal del suelo a los vegetales (23), sobre todo en suelos ácidos existiendo reportes de intoxicación crónica por la ingesta de vegetales y agua contaminados por cadmio procedente de zonas mineras (24).

Estudios preliminares han revelado una alta toxicidad del cadmio en vegetales, Marcano *et al.* (16) señalan un efecto mitotóxico y genotóxico en meristemos radiculares de *Allium cepa*; dicho efecto resultó mas dependiente de la concentración que del tiempo de exposición, valorado por el bloqueo en el índice mitótico y la inducción de aberraciones cromosómicas (15); alteraciones similares han sido descritas igualmente en *Vicia faba* (19) y *Hordeum vulgare* (27), lo cual refleja la susceptibilidad de los vegetales a la toxicidad del metal.

El objetivo del presente trabajo fue analizar las posibles variaciones morfológicas y ultraestructurales inducidas por el cadmio en las células radiculares de *Allium cepa* L. (cebolla) a fin de dilucidar el posible mecanismo de citotoxicidad en células vegetales.

Materiales y métodos

Como material de estudio se utilizó meristemos radiculares de cebolla (*Allium cepa* L) considerado como uno de los mejores modelos biológicos para el estudio del efecto de contaminantes ambientales (5). Los meristemos radicales de 12 a 14 bulbos,

se sumergieron en agua filtrada renovada cada 24 horas, en una incubadora (Lab-line) a temperatura constante de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y aireación continua suministrada por un equipo de aireación a razón de 10 a 20 ml de aire por min. Una vez que las raíces

alcanzaron un estado de equilibrio dinámico (de 2 a 3 cm de longitud), se colocaron en una solución acuosa de cloruro de cadmio (CdCl_2), a concentraciones de $3,4 \times 10^{-5}$ M, $7,4 \times 10^{-5}$ M y $9,9 \times 10^{-5}$ M, durante 4, 8, 12 y 24 horas. Los tratamientos se obtuvieron de la combinación de la concentración y tiempo de exposición y para cada uno se realizó un control, en el cual la solución de cadmio fue sustituida por agua destilada. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado, analizando un promedio de 2 raíces para cada control y tratamiento.

Procesamiento para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Con el fin de determinar los cambios morfológicos que se producen en las células expuestas al metal, se realizó un análisis con MEB para lo cual, tanto las raíces controles como las tratadas, se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% p/v en buffer cacodilato 0,025 M a pH 7, por tres horas y luego lavadas tres veces en el mismo buffer.

En un portaobjeto limpio y seco se efectuó el aplastamiento de la masa celular de una manera convencional, formando una monocapa homogénea. Se fijó la preparación al portaobjeto mediante la técnica de evaporación en

hielo seco, procediéndose a cortar con lápiz de diamante, cuadrados de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ de longitud, conteniendo la muestra; el trozo de vidrio se adhirió, con cinta doble adherente 3 M, a un porta espécimen de aluminio (Stub), el cual fue colocado en una estufa a 42°C por una hora; y posteriormente en un covertedor iónico marca EIKO IB3 para ser metalizado con película de oro con un espesor de 100 a 200 \AA . Las observaciones se hicieron en un MEB Hitachi - 2300 entre 10 y 15 KV.

Procesamiento para Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

A objeto de determinar los cambios en la ultraestructura celular se realizó un análisis con MET, para tal fin, las raíces, una vez finalizados los tratamientos, fueron fijadas inicialmente en una solución acuosa de glutaraldehído al 2,5 % en buffer cacodilato 0,025 M pH 7, por una o dos horas a temperatura ambiente y post-fijación en tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer por una hora; posteriormente se efectuó la deshidratación en etanol y óxido de propileno e infiltración en Araldita 502. Se cortaron secciones entre 200 - 400 \AA , las cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, para luego ser analizadas en un MET Hitachi 7000.

Resultados y discusión

Cambios en las células observadas con MEB

El análisis morfológico de la población celular estudiada, revela variaciones de las células expuestas al cadmio. En la figura 1 se observan las

células del control, caracterizadas por su forma rectangular y superficie irregular. A una concentración de $3,4 \times 10^{-5}$ M, no se produjeron cambios morfológicos para ninguno de los tiempos utilizados. A $7,4 \times 10^{-5}$ M y



Figura 1. Micrografía Electrónica de Barrido de células control. Obsérvese su forma rectangular y superficie irregular. 20 mm.

tiempo de exposición de 12 horas se observó, en la figura 2, células de formas variables (ovoides, cuadradas, entre otras.), con notables depresiones en su superficie, algunas de gran tamaño, que ocuparon casi todo el cuerpo celular. Al aumentar el tiempo de exposición (24 h), las depresiones se acentuaron llegando incluso a simular especie de perforaciones en su superficie (figura 3), efecto que se hizo más severo a medida que se aumentó la concentración y el tiempo de exposición hasta valores de $9,9 \times 10^{-5}$ M por 24 h. Las depresiones y perforaciones señaladas podrían corresponder a un marcado proceso de vacuolización producido por el cadmio, existen reportes que establecen que el Cd^{+2} altera el metabolismo de H_2O_2 , ocasionando cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática tanto en células vegetales (23) como en células animales (13).

Cambios en las células observadas con MET

La figura 4 muestra las características de varias células control, donde se observa la integridad de los diferentes organelos celulares. Alteraciones en la ultraestructura

celular de los meristemos se evidenciaron, en las células expuestas al Cd^{+2} a concentraciones de $3,4 \times 10^{-5}$ M por 4 y 8 h (figura 5a), se aprecian vacuolas de diferentes tamaños, un núcleo electrodensito con cromatina en un estado de condensación mayor que en las células controles y nucléolos colapsados; las mitocondrias, con una configuración de tumefacción amplia, posiblemente producto de la entrada de agua, que induce a que estas se hinchen causando una reducción y desorientación de las crestas mitocondriales; estos cambios podrían conducir a la muerte celular; los resultados coinciden con los señalados por otros autores (11, 15), quienes establecieron que el Cd^{+2} indujo alteración de la función mitocondrial en hepatocitos, conduciendo a la pérdida del potencial de membrana y de la viabilidad celular, considerando a las mitocondrias como sitios primarios de la citotoxicidad producida por el cadmio. En la micrografía a mayor aumento (figura 5b), se observó la dilatación de la membrana nuclear, del aparato de golgi, retículo endoplasmático y membrana mitocondrial; lo cual podría ser

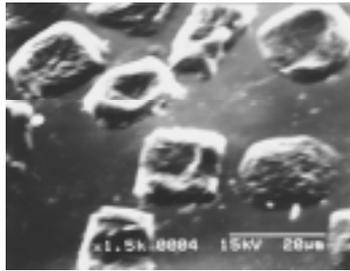


Figura 2. Micrografía Electrónica de Barrido de células expuesta a una concentración de $3,4 \times 10^{-5}$ M de cloruro de cadmio por 12 horas. Se observa la variabilidad de formas celulares, con depresiones en su superficie. 20mm.

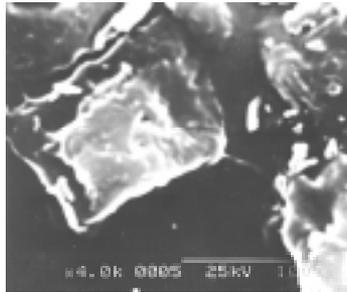


Figura 3. Micrografía Electrónica de Barrido de células expuesta a una concentración de $3,4 \times 10^{-5}$ M de Cadmio por 24 horas. Se observan aparentes perforaciones en la superficie celular. 20mm.

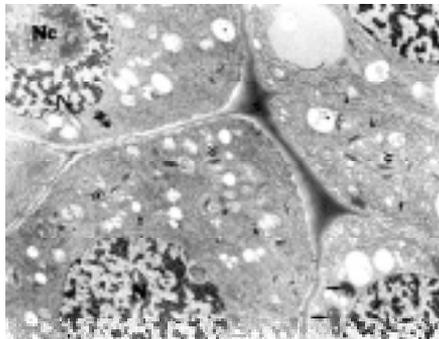


Figura 4. Micrografía Electrónica de Transmisión de células control. Se observa la integridad de los diferentes organelos celulares tales como núcleo (N), nucléolo (Nc), mitocondrias (*), retículo (ä), lisosomas (P), dictiosomas (»). 1mm.

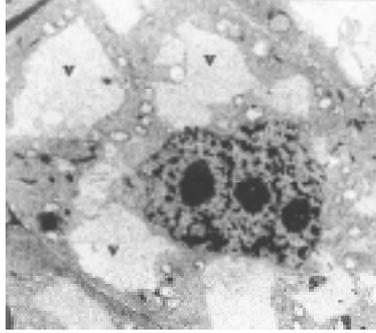


Figura 5a. Micrografía de células expuestas al cadmio a una concentración de $3,4 \times 10^{-5}$ M por 8 horas se muestran vacuolas de diferentes tamaños (v), núcleo electrondenso (N) y nucléolos colapsados (Nc); y las mitocondrias en estado de tumefacción (hinchadas) (*). 3mm.

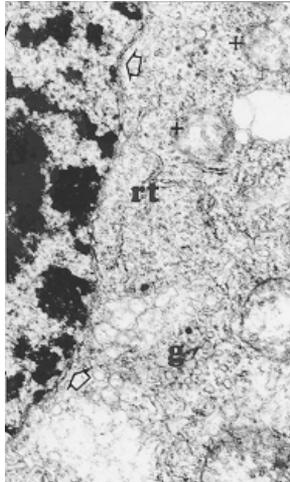


Figura 5b. Micrografía de células expuestas al cadmio a una concentración de $3,4 \times 10^{-5}$ M por 8 horas. Micrografía aumentada de la figura anterior: obsérvese la dilatación de las membranas: nuclear (í), golgi (g), retículo (rt) y mitocondrial (9). 1mm.

originado por cambios en la osmolaridad inducidos por el metal sobre algún sistema de transporte a nivel de las membranas celulares. Koizumi *et al.* (9), reportaron alteraciones en la permeabilidad celular por la acumulación de H_2O_2 y de H^+ en hepatocitos de rata; condiciones fisiológicas también causadas por el cadmio en guisantes (23), en meristemos radiculares de la especie *Thlaspi caerulescens* (21) y en plantas del género *Arabidopsis* (26).

A concentración de $7,4 \times 10^{-5}$ M por 12 h, se aprecia un núcleoseudolobulado con cromatina condensada y un nucléolo colapsado (figura 6); el resto de los organelos presentaron características similares a las descritas anteriormente, sin embargo se observó una mayor vacuolización, la cual se hizo más evidente conforme se aumentó la concentración del metal; las células expuestas a cuatro horas de tratamiento, a una concentración de $9,9 \times 10^{-5}$ M, mostraron una aparente fusión de vacuolas (figura 7) preservándose las relaciones de vecindad, estando las células separadas por un material moderadamente electrondenso, de aspecto homogéneo que corresponde a la pared celular; los organelos se presentaron con una desorganización interna y adosados a la pared celular, manteniendo su integridad el núcleo, aunque la cromatina y el nucléolo se

evidenciaron muy electrondensos debido a un mayor estado de condensación, característica que según algunos autores es consecuencia de una disminución de su actividad biosintética (14).

Con los resultados obtenidos se pudo demostrar el efecto citotóxico inducido por el cadmio en la población celular estudiada; un posible mecanismo mediante el cual el cadmio ejerce su toxicidad, podría ser por su acción inhibitoria sobre la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ y ATPasa Mg^{+2} , que ha sido reportado por Carfagna *et al.* (3). Otra posibilidad sería por su acción inhibitoria sobre la actividad de las enzimas responsables de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos, ya que se ha establecido que el cadmio, altera el gen que codifica la enzima ganmaglutamilmcisteina sintetasa, requerida para la biosíntesis de glutatión reductasa en células meristemáticas (26). Meir *et al.* (18), señalan que el cadmio forma enlaces covalentes con los grupos tioles (S-H) de la cisteína, estableciendo un efecto antagónico con el Selenio (Se^{++}), cofactor requerido por la glutatión reductasa para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del lipoperóxido (L-00H) a glutatión reducido (GSH). Tanto el peróxido como el lipoperóxido son tóxicos para todos los tejidos, al oxidarse se transforman en compuestos no metabolizables por las células (13).

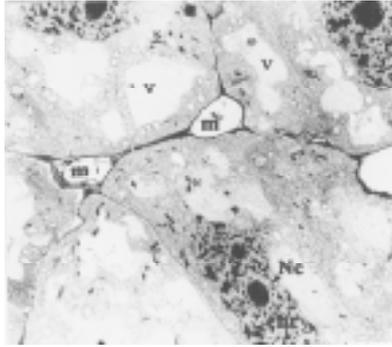


Figura 6. Micrografía de células expuestas al cadmio a una concentración de $7,4 \times 10^{-5}$ M por 12 horas, se observan dictiosomas (»), material extracelular (m), mayor vacuolización del citoplasma (v), núcleoseudolobulado con cromatina condensada (chr) y nucléolo colapsado (Nc). 3mm.

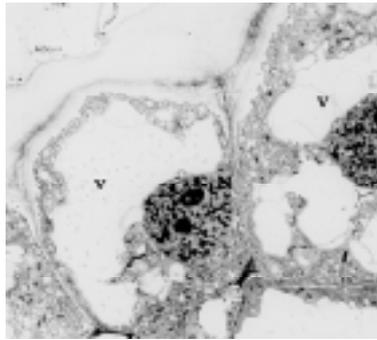


Figura 7. Células expuesta a una concentración de $9,9 \times 10^{-5}$ M de cadmio por 4 horas; se observan células con una evidente vacuolización (v) y desorganización de los organelos; el núcleo (N) mantiene su integridad. 3mm.

Conclusiones

Se concluye que el cadmio produce un efecto citotóxico en meristemas radiculares de *Allium cepa* L., por el grado de sensibilidad de esta especie a la contaminación por cadmio, representando un factor de riesgo para

la salud humana, el consumo de este y otros vegetales cultivados en regiones contaminadas. El efecto fue evidenciado por las alteraciones celulares producidas, tanto en su morfología, como en su ultraestructura, entre los

cuales se pueden mencionar: vacuolización, dilatación de membranas celulares,seudolobulación del núcleo, condensación de la cromatina y nucléolos colapsados, estos tres últimos característicos de una

necrosis celular; el efecto fue mas severo a medida que se aumentó la concentración y el tiempo de exposición, hasta valores de $9,9 \times 10^{-5}$ M por 24 horas.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias y al Consejo

Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento parcial de éste trabajo.

Literatura Citada

1. Akensson, A., P. Stal., y M. Vahter. 2000. Phlebotomy increase uptake in hemochromatosis. *Environ. Health. Perspect.* 108:289-291.
2. Benin, A., J. Sargent, M. Dalton, y S. Roda. 1999. High concentrations of heavy metals in neighbourhoods nears ore smelters in Northern Mexico. *Environ. Health. Perspect.* 107: 279-284.
3. 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.
4. Croute, F., B. Beau, C. Arrabit, Y. Gaubin, F. Delmas, J. Murran y J. Soleilhavoup. 2000. Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short - or long-term exposure to cadmium. *Environ. Health. Perspect* 108: 55-60.
5. Feskesjö, G. 1985. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* 102: 99-112.
6. Goyer, A., G. Cherian y R. Delaquerriere. 1984. Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium - induce nephropathy in rats. *JEPTO* 5: 89-100.
7. Hassler, E., B. Lind y M. Piscator. 1983. Cadmium in blood and urine related to present and past exposure. A study of workers in alkaline battery factory. *Br. J. Ind. Med.* 40:420 - 425.
8. Jugo, S. 1977. Metabolism of toxic heavy metals in growing organisms: a review. *Environ. Res.* 13: 36-46.
9. Koizumi, T., H. Shirakura, H. Kumagai, H. Tatsumoto y T. Suzuki. 1996. Mechanism of cadmium induce cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium induce active oxygen - related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology.* 114: 125 - 134.
10. Kojima, S., Y. Sumura, H. Hirukawa, M. Kiyozumi, H. Shimada y T. Funakoshi. 1992. Effects of dithiocarbamate on testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *Toxicol. Appel. Pharmacol.* 116: 24-29.
11. Korotkov, S., I. Skuiskii y V. Giazunov. 1998. Cd⁺² effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations. *J. Inorg. Biochem.* 70: 17 - 23.
12. Lorenz, H. 1979. Binding forms of toxic heavy metals, mechanisms of entrance of heavy metals into the food chain, and possible measures to reduce levels in foodstuff. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 3: 47-58.

13. Malorino, M., F. Chu., y F. Ursoni. 1991. GP-PH is the 18 Kds seleno proteins expressed in human tumor cell lines. *J. Biol. Chem.* 266: 7728 - 7732.
14. 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: 73-82.
15. Marcano, L., I. Carruyo, X. Montiel, M. Bracho y L. Soto. 1999. Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 16: 463-475.
16. 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.
17. Martel, J., M. Marion y F. Denizeau. 1990. Effect of cadmium on membrane potential in isolate rat hepatocytes. *Toxicology.* 60: 161-172.
18. Meir, B. and R. Gabbianelli. 1998. *In vitro* incorporation of different transition metal ions into a cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. *J. Inorg. Biochem.* 70: 57-61.
19. Mo, W., y L. Li. 1992. Effects of CdCl₂ on the growth and mitosis of root tip cells in *Vicia faba*. *Chin. Bull. Bot.* 9: 30-34.
20. Moon, J. 1994. The role of vitamin D in Toxic metal absorption: a review. *J. Am. Col. Nutr.* 13: 559-569.
21. Nedelkoska, T. y P. Doran. 2000. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol-Bioeng.* 67: 607-615.
22. Occupational Safate y Health Administration. 1992. Occupational Exposure to Cadmium. OSHA. Std. 29 CFR. 1910 - 1927.
23. Romero-Puertas, M., I. McCarthy, L. Sandalio, J. Palma, F. Corpas, M. Gomez y L. Del Río. 1999. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free-Radic-Res.* 31: 25-31.
24. Sherlock, J. 1984. Cadmium in foods and the diet. *Experientia* 40: 152-156.
25. Thun, M., A. Osorio y A. Schober. 1989. Nephropathy in cadmium workers: Assesment of risk from airborne occupational exposure to cadmium. *Br. J. Ind. Med.* 46: 489-687.
26. Vernoux, T., R. Wilson, K. Seeley, J. Reichheld, S. Muroy, S. Brown, S. Maughan, C. Cobbett, M. Van-Montagu y D. Inze. 2000. Cadmium sensitive gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant-Cell.* 12: 97-110.
27. Zhang, Y. y X. Yang. 1994. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutation Res.* 312: 121-126.