

Estandarización de un bioindicador para la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por fármacos en meristemas de semilla de lenteja (*Lens culinaris*)

RESUMEN: Actualmente existe un mayor interés en desarrollar pruebas *in vitro* (bioindicadores) para conocer y estudiar los efectos genotóxicos que causan diversos fármacos, extractos de plantas medicinales, plaguicidas u otras sustancias tóxicas en las células. El objetivo de este trabajo fue estandarizar el uso, como bioindicador, de los meristemas de la radícula de lenteja (*Lens culinaris*) para la evaluación de los efectos genotóxicos ocasionados por diversas sustancias. Para ello se embebieron las semillas de lenteja, en una solución al 1% del fármaco colchicina, como control negativo, ya que se sabe que la colchicina daña el citoesqueleto de las células evitando su división y, por otro lado, se utilizó agua purificada como control positivo, con el fin de observar la división celular. Los meristemas de la radícula recién germinada se observaron al microscopio con tinción de orceína, se identificaron y se cuantificaron las diferentes fases de la mitosis con el fin de calcular el índice mitótico (IM) y así poder evaluar el efecto genotóxico. Este bioindicador tiene la característica que se puede utilizar a futuro para la evaluación de los efectos genotóxicos de fármacos, extractos de plantas y plaguicidas.

PALABRAS CLAVE: Colchicina, Genotóxico, Índice mitótico, *Lens culinaris*, Meristemo, Bioindicador.



Colaboración

Rosario Areli Rivera Antonio; Julia Martínez Grajales; Arturo Cabrera Hernández; Heidi Anabel Jácome Sánchez, María Cristina López Méndez, Instituto Tecnológico Superior de Misantla

ABSTRACT: Nowadays there is a great interest in developing *in vitro* tests (bioindicators) to know and study the genotoxic effects on cells that cause various drugs (extracts of medical plants, pesticides or other toxic substances) in the cells. The objective of this work was to standardize the use, as a bioindicator, of the meristems of the lentil radicle (*Lens culinaris*) for the evaluation of the genotoxic effects caused by various substances. For this, the seeds were embedded, in a 1% solution of the drug colchicine, as a negative control, since it is known that colchicine damages the cytoskeleton of the cells preventing their division and on the other hand, purified water was used as a positive control, in order to observe cell division. The meristems of the recently germinated radicle were observed under an optical microscope with orcein dyeing, were identified and quantified the different phases of mitosis in order to calculate the mitotic index (MI) and thus be able to evaluate the genotoxic effect.

This bioindicator has the characteristic that can be used in future for the evaluation of the genotoxic effects of various drugs, plant extracts and pesticides.

KEYWORDS: Colchicine, Genotoxic, Mitotic index, *Lens culinaris*, Meristem, Bioindicator.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen muchos problemas de salud debido a la exposición de ciertos agentes genotóxicos y tratamientos médicos con los que las personas se automedican para minimizar los males comunes [1].

Por lo anterior se han realizado estudios que respaldan la inhibición del ciclo celular por medio de daños al ADN y a la formación de huso mitótico, causados por la ingesta de fármacos sin prescrip-

ción médica, estos estudios se basan en modelos in vivo o in vitro que incluyen el uso de roedores a los cuales se les induce un tipo de "cáncer", lo cual implica el sufrimiento y muchas veces el sacrificio del animal. Otra alternativa implica el uso de tejidos y/o microorganismos además de diferentes materiales que implican un mayor costo e inversión en el equipo y la técnica utilizada para dichas pruebas.

Un modelo simple que ha sido comúnmente utilizado para estudios iniciales es el uso de meristemos de la punta de la raíz de cebolla (*Allium cepa* test) o la germinación de haba (*Vicia faba*), estas pruebas tienen la característica de ser un tejido de células en división y gracias a esta particularidad se puede realizar dicha validación.

Sin embargo, debido a la falta de biodisponibilidad de estas plantas en la región, el tratamiento fisicoquímico de los bulbos de la cebolla para su almacenamiento, así como la poca relación en el costo-beneficio al utilizar estas plantas comestibles, generan algunas limitantes para utilizar especies de *Vicia faba* (haba) y *Allium cepa* (Cebolla) como pruebas genotóxicas.

Debido a dichas limitantes, en la presente investigación se empleó y estandarizó un bioindicador de estudio in vitro realizando una adaptación del modelo de *Allium cepa* test la cual implica la utilización, el estudio y la validación de germinación en semillas de lenteja (*Lens culinaris*). Esta semilla tiene la característica que ha sido poco estudiada, de poca importancia económica y de fácil acceso.

El bioindicador propuesto de esta semilla promueve a futuro el desarrollo de una prueba genotóxica, rápida y económica para el examen preliminar de medicamentos y además poder utilizar dicho modelo como monitoreo de diversos agentes toxicológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron diez semillas de *Lens culinaris* en buen estado fitosanitario, con un peso aproximado de 45 mg y 6.40 mm de diámetro.

Germinación

La primera fase de la germinación es la absorción de agua por la semilla o imbibición [2]. Esta se realizó sumergiendo las semillas en agua purificada y en colchicina al 1% como control negativo durante seis horas a temperatura ambiente [3], transcurrido este tiempo se retiraron y con el fin de mantenerlas hidratadas durante todo el experimento se les agregó aproximadamente 1.5 mL de solución cada ocho horas hasta que las radículas en ambos grupos alcanzaron aproximadamente los 6-8 mm. Se registró la longitud de la radícula en lapsos de 8 horas durante un período de 56 horas con el fin de observar la cinética de crecimiento de las raíces.

Tinción

Para la tinción de los meristemos de la raíz, se utilizó orceína acética al 2%, se seleccionaron las raíces con una longitud mayor desarrollada y se procedió a realizar los siguientes pasos; se cortaron de 1-2 mm de raíz y se sumergieron en un tubo de ensayo con 0.2 mL de orceína acética, posteriormente se dejó actuar durante 3 minutos [4], la solución de la orceína acética con la radícula se calentó sobre un mechero hasta la emisión ligera de vapores y se dejó enfriar sin permitir que se seque la raíz.

Finalmente se colocaron los meristemos en portaobjetos y se realizó el aplastamiento en monocapa denominado "squash" [5], la cual se fundamenta en ejercer presión uniforme con la yema del pulgar sobre la laminita evitando la formación de burbujas.

Observación de la preparación

Los frotis obtenidos se observaron en un microscopio óptico con objetivo 100X y aceite de inmersión. Se tomaron diversas fotografías para su posterior conteo de las 4 fases de mitosis [6].

RESULTADOS

Cinética de germinación

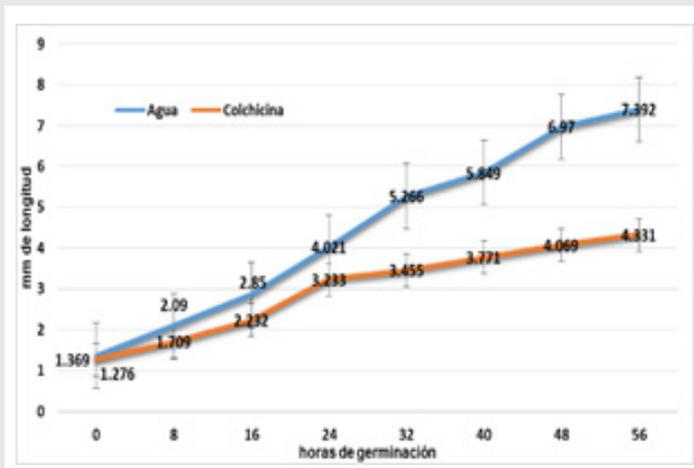
Cuando se controla una hidratación adecuada en las semillas de lenteja se genera una elongación significativa en la raíz ya que las células se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas la división celular de los meristemos radiculares puede llegar a inhibirse, esto depende del grado de toxicidad y el tiempo de exposición. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación [7].

El contacto de raíces con sustancias químicas las hace sufrir alteraciones de sus características normales como forma, longitud y coloración [8].

Después de la primera etapa de la germinación ya sea en agua purificada o en solución de colchicina al 1%, transcurrieron 12 horas para el brote de la raíz de la semilla, posteriormente se registró el crecimiento de la raíz cada 8 horas durante 56 horas.

En la gráfica 1 se muestra la comparación de crecimiento en promedios por horas de los dos tratamientos, en los cuales la colchicina ocasionó un efecto retardado en el desarrollo de las raíces, debido a una inhibición en actividades de quinasas de tipo A, cuya función es regular el ciclo celular, mientras que en el control de agua se mantuvo un crecimiento positivo. Este tipo de pruebas in vitro donde las raíces se crecen en contacto con sustancias tóxicas que causan un posible daño al DNA podrían relacionarse con los efectos de estas en los seres humanos, puesto que los cromosomas de las plantas y animales son morfológicamente similares y

parecen responder a tratamientos con agentes tóxicos de forma similar a mamíferos y otras eucariotas [9].



Gráfica 1. Comparación de crecimiento de la raíz de lenteja (n=10).

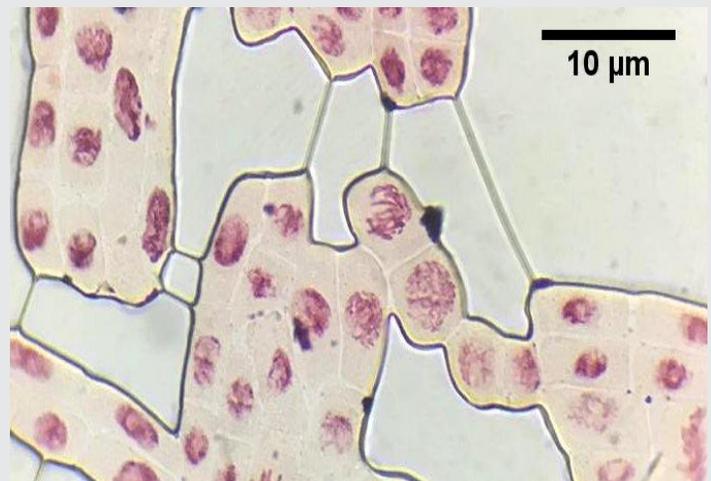


Figura 2. Células correspondientes al grupo control en profase observadas a objetivo 100X

OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS EN MICROSCOPIO.

De los frotis obtenidos, se lograron evaluar un total de 115 células para ambos grupos, seleccionando aquellos que mostraran una proliferación de células meristemáticas y de esa forma cuantificar el porcentaje de células por cada fase de la mitosis. (Urteaga y Lallana, 2005) [10].

Las figuras 1, 2, 3 y 4 son muestras representativas de los meristemos observados en colchicina con su respectivo grupo control.

En las imágenes 1 y 2 se puede observar con claridad como la colchicina produjo un daño citotóxico en el huso mitótico inhibiendo el ciclo celular y además no se logró observar ninguna célula en anafase o metafase.

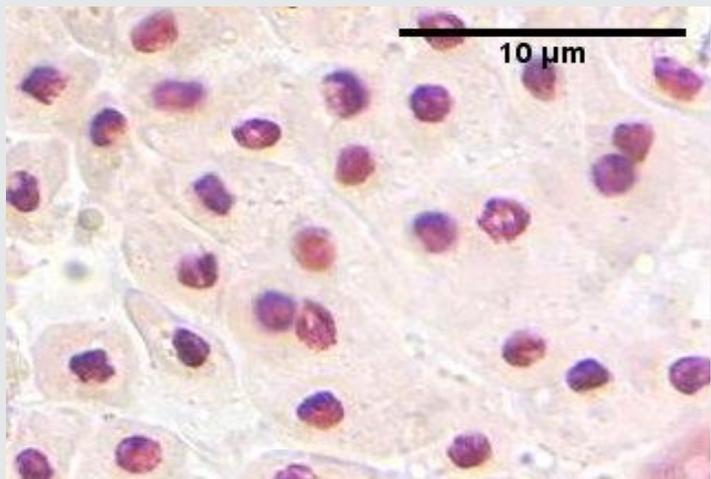


Figura 3. Inhibición en el ciclo celular por colchicina observadas al microscopio óptico 100X

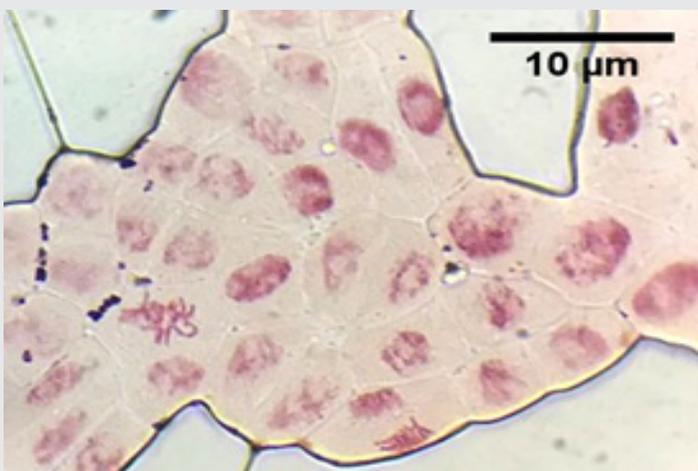


Figura 1. Células en metafase y telofase encontradas en grupo control con objetivo 100X.



Figura 4. Efecto citotóxico causado por colchicina, observación óptica 100X

Los gráficos 2 y 3 resumen lo encontrado en porcentaje de células evaluadas para grupo control y grupo de prueba (colchicina), en donde hubo una diferencia significativa en la regulación del ciclo ya que no se encontraron células en división para el grupo de prueba a diferencia de su grupo control que mantuvo una actividad mitótica considerable.

Tabla 1 Efecto del extracto acuoso de *J. spicigera* sobre *C. albicans*

Tratamiento	Profase %	Metafase %	Anafase %	Telofase %	Fase S	Índice mitótico (IM)	No. de células contadas
Agua	13.30	4.34	2.60	5.21	76.55	0.2347	115
Colchicina	11.30	0	0	0	88.70	0.113	115

La inhibición de la actividad mitótica podría atribuirse al deterioro de la síntesis de ADN o al bloqueo de la fase G2, evitando que la célula entre en ciclo mitótico [11] o una alteración de la síntesis de nucleoproteínas y un nivel reducido de ATP para proporcionar energía al alargamiento de microtúbulos que conforman las fibras del huso lo que muy probablemente aminoraría el movimiento cromosómico [12].

CONCLUSIONES

Lens culinaris es una semilla que gracias a la característica de germinación rápida en condiciones normales de temperatura y luz permitió la estandarización de un bioindicador experimental in vitro efectivo de implementar en laboratorios y utilizarlo como una prueba preliminar, de ese modo conocer el efecto genotóxico de ciertas sustancias como son fármacos, plaguicidas, entre otros. Además de conocer las concentraciones límites permisibles de los extractos de plantas medicinales que hoy en día se utilizan sin ningún control y que por desconocimiento se cree que por ser naturales no producen ningún efecto a nivel celular, dañando la salud de quien lo consume en tiempos prolongados.

Por otro lado, cabe resaltar que en nuestro modelo de estudio se logró observar lo reportado por estudios previos de algunos autores, que la colchicina actúa como un buen control negativo en la inhibición del ciclo celular y gracias a esto va a permitir comparaciones y observaciones específicas que afectan la fase M en presencia de diversas sustancias a evaluar [13].

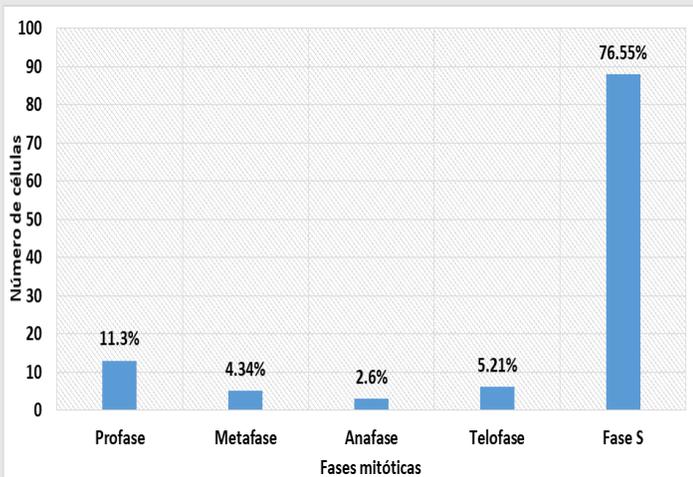
BIBLIOGRAFÍA

[1] Zalacain, M. Sierra, L. Patiño A. (2005). *El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos*, (pp. 227-236).

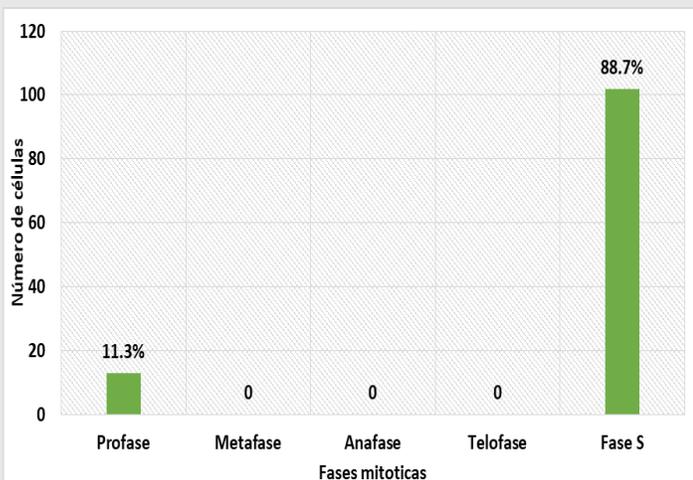
[2] Besnier Romero, F. (1989). *Semillas. Biología y Tecnología*. Ed. Mundi-Prensa. (p.637) Madrid.

[3] Delgado, Lina & Uribe, Marcela & Angel, Marta. (2010). *Estandarización de la técnica citogenética squash para conteo de cromosomas mitóticos en rubus glaucus Benth. Universidad Tecnológica de Pereira*.

[4] Muñoz-Solarte, D. M. y Guerrero-Pepinosa, N. (2013). *Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células me-*



Gráfica 2. Porcentaje de células evaluadas para grupo control (n=115 células)



Gráfica 3. Porcentaje de células tratadas con colchicina 1% (n=115)

La tabla 1 expresa a *Lens culinaris* en condiciones con una efectiva actividad mitótica, se obtuvieron porcentajes significativos del índice mitótico para cada grupo, así como en la fase M haciéndose notable en profase con un 13.30% y telofase con 5.21%, mientras que en tratamiento prueba (colchicina) se presentó una inhibición en el ciclo celular, encontrándose la mayoría de las células en profase (11.30%) e interfase dañadas (88.70%) lo que pone en un papel de control negativo a colchicina en una concentración de 1%.

risteméticas de *Allium cepa*. Universidad de Antioquia.

[5] D. Colombera (1970) A Squash Method for Chromosomes of Ascidians (Tunicata), *Caryologia*, Universidad de Padova, Italia.

[6] Segura, María; Cruz, Sarai; López, Roberto; Zavala, Guadalupe; Jiménez, Luis. (2008). Visualización de la mitosis con el microscopio de fuerza atómica pp. 87-90. México.

[7] Restrepo, R., D. Reyes, M.C. Ortiz, F.A.R. Ruiz y V.V. Kouznetsov. 2012. Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas. *Universitas Scientiarum* 17 (3), 253-261. Doi: 10.11144/javeriana.SC17-3.aceb.

[8] Khanna, N. y S. Sharma. 2013. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: A review. *Indian J. Pharm. Biol.* 1 (3), 105-119.

[9] Hemachandra, C.K y A. Pathiratne. 2015. Assessing toxicity of copper, cadmium and chromium levels relevant to discharge limits of industrial effluents into inland Surface waters using common onion, *Allium cepa* bioassay. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 94(2), 199-203. Doi. 10.1007/s00128-014-1373-8.

[10] Urteaga, F. y Lallana, V. (2005). Optimización de una técnica de tinción para determinación de efectos citogenéticos en ápices radicales de *Allium cepa*. *Revista Científica Agropecuaria*, 9(1), 63-70.

[11] Haq, I., S. Kumar, A.Raj, M.Lohani y G.Satyana-rayana. 2017. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. *Chemosphere* 169, 642-650. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.101.

[12] Hemanth, N.K., M. Taj y S. Jagannath. 2015. Clastogenicity of sugar factory effluent using *Allium* assay. *Res. Plant Biol.*

[13] Sun, Y., Cheng, S. and Liang, G. 1994. Induction of autotetraploid plants of *Sorghum versicolor*, *Cytologia* 59: 109-114