

Valoración del efecto tóxico de pentóxido de vanadio en meristemos de cebolla (*Allium cepa* L.)

Xiomara Montiel, Ingrid Carruyo, Yusmary Fernández, Letty Marcano
y Zaida Torrealba

Departamento de Biología, Laboratorio Biología Celular. Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia, Venezuela.

Recibido: 13-02-06 Aceptado: 13-12-06

Resumen

Se estudió el efecto del vanadio sobre poblaciones meristemáticas de cebolla a fin de determinar la correlación entre la concentración y el tiempo de exposición sobre el crecimiento, índice mitótico (IM) y la inducción de aberraciones cromosómicas (AC). Los bulbos crecieron en agua filtrada a 25°C, el tratamiento fue llevado a cabo en las mismas condiciones experimentales, utilizando soluciones de pentóxido de vanadio a 0,25; 0,50; 0,75 y 1,0 ppm por 0, 12, 24, 48 y 72 h. Un control fue llevado a cabo donde la solución metálica fue sustituida por agua destilada. Después del tratamiento los meristemos fueron fijados con una solución alcohol-acido acético (3:1) y coloreada de acuerdo a la técnica de Feulgen. Los resultados muestran una correlación positiva entre la concentración y tiempo de exposición sobre la longitud de la raíz y una correlación negativa con el IM. El análisis de varianza (ANOVA) demostró un efecto deletéreo de la concentración y tiempo de exposición usado. Cada tiempo y concentración produjo diferentes tipos de AC: estekinesis, puentes anafásicos y efecto c-mitótico. La prueba de Duncan mostró un incremento significativo de la frecuencia de aberraciones cromosómicas con el curso del tiempo y la concentración. Se encontró también una correlación positiva entre la estekinesis y la formación de puentes anafásicos, pero no con el efecto c-mitótico. Se concluye un efecto tóxico del vanadio sobre la población celular estudiada dependiente de la concentración y tiempo de exposición.

Palabras clave: *Allium cepa*; células meristemáticas; toxicidad; vanadio.

Valoration of toxic effect of vanadium pentoxide in onion meristems (*Allium cepa* L.)

Abstract

The effects of vanadium over populations of onion (*Allium cepa*) were investigated in order to discover the correlation between concentration and time over root growth, interruption of Mitotic Index (MI) and induction of chromosomal aberration (CA). Meristematic cells were grown in filtered water at 25°C and treatments were carried out under the same experimental conditions, using solutions of vanadium pentoxide at 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 ppm for 0, 12, 24, 48 and 72 h. A control was carried out where metal solution was substituted by distilled water. After the treatment the meristems were fixed with alcohol - acetic acid (3:1) and colored according

* Autor para la correspondencia. Telf: 058 261-7420686 E-mail: xyo_mon@cantv.net

to the technique of Feulgen. Results showed a positive correlation between concentration and time of exposure on length of the roots and negative correlation with MI. The analysis variance (ANOVA) demonstrated a deleterious effect of exposure time and concentration used. Each time and metal concentration used produced different types of CA: Stickiness, anaphases bridges and c- mitotic effect. The Duncan test observed a significant increment of the frequency of aberrations with the course of the time and concentration. It was also found a positive correlation between stickiness and formation of anaphases bridges, but not with c-mitotic effect. It was conclude a toxic effect of vanadium on the cell population studied dependent of the concentration and time of exposition.

Key words: *Allium cepa*; meristematic cells; toxicity; vanadium.

Introducción

El vanadio es un elemento relativamente abundante con una amplia distribución en la naturaleza, es emitido principalmente por fuentes naturales y por la quema de aceites combustibles; a nivel industrial es utilizado como catalizador en procesos de oxidación, particularmente en la conversión del dióxido de sulfuro a trióxido durante la fabricación del ácido sulfúrico; también se utiliza en algunos pigmentos y tintas de la industria de la cerámica, los cuales pueden contener cerca del 15% del metal (1). El metal puede encontrarse en el ambiente, en algas, plantas, invertebrados, peces entre otras (2). La principal vía de incorporación es por inhalación produciendo efectos tóxicos cuya gravedad depende de la concentración en el ambiente y el tiempo de exposición (3, 4); en las áreas industrializadas (petroleras), trabajadores y pobladores han manifestado síntomas tales como: lagrimeo, lengua verde, rinitis, traqueo bronquitis, faringitis, bronquitis, insuficiencia respiratoria y cardíaca (5). Las pruebas de laboratorio en animales han mostrado que el Vanadio puede causar daño en riñón, hígado y en el sistema reproductivo (6); en humanos se han reportado alteraciones en el comportamiento neuronal (7), inhibición de la proliferación de fibroblastos en cultivos (8, 9) y efectos genotóxicos en células de sangre periférica humana (10). Su mecanismo de acción toxicológica no ha sido aún bien esclarecido, sin embargo se han dado reportes que relacio-

nan al metal con muchos procesos metabólicos, actuando como un potente inhibidor de algunas enzimas incluyendo las ATPsas, fosfatasas, kinasas, deshidrogenadas y ribonucleasas (10, 9, 4).

Basado en estudios previos los cuales establecen que alteraciones en parámetros tales como: índice mitótico, bloqueo en el crecimiento e inducción de aberraciones cromosómicas, son dosímetros biológicos que permiten evaluar el potencial toxicológico de contaminantes ambientales (11), en el presente trabajo se evaluó la influencia de la concentración y tiempo de exposición al vanadio sobre los referidos parámetros, utilizando como modelo biológico meristemas radiculares de cebolla (*Allium cepa* L.)

Materiales y Métodos

Bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) se colocaron en agua filtrada renovada cada 24 horas, a temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y aireación continua a razón de 10 - 20 mL /min. Una vez que las raíces alcanzaron de 2 a 3 cm de longitud, se colocaron en una solución acuosa de pentóxido de vanadio (V_2O_5), a concentraciones de 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 ppm por 0, 12, 24, 48 y 72 horas de exposición; para cada una de las concentraciones utilizadas se realizó un control donde la solución de vanadio fue sustituida por agua destilada, realizándose los ensayos por duplicado. Cada una de las raíces fueron medidas y para cada tiempo y concentración se cortaron cuatro raíces

para realizar el estudio citológico, se fijaron en una mezcla de alcohol-ácido acético glacial a una proporción 3:1 por 24 horas, lavadas con agua destilada tres veces, para luego ser teñidas por la técnica de fucsina básica (12). Se realizó el aplastamiento o "squash" para el estudio del efecto sobre índice mitótico (IM) y la inducción de aberraciones cromosómicas (AC).

Análisis estadístico

Se evaluó un promedio de 3.000 células por meristemo y con los datos recolectados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una correlación simple para determinar el efecto del metal y la relación entre el tiempo de exposición, la concentración y los parámetros evaluados. Así mismo se realizó la prueba de Duncan para establecer comparaciones de medias entre los valores obtenidos de los meristemos tratados y los controles, estableciendo un nivel de significancia de $p < 0,05$

Resultados y Discusión

Efecto del vanadio sobre la longitud de la raíz

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos al valorar la concentración de vanadio con la longitud de la raíz a diferentes tiempos. Se observa una correlación positiva altamente significativa, entre la longitud de la raíz con respecto al tiempo, para los controles ($r = 0,9639$; $p < 0,01$). El coeficiente de determinación ($R^2 = 92,91$) indicó que el 92,91% de las variaciones observadas se debieron al paso del tiempo, considerado como el proceso normal de crecimiento de las raíces de cebolla bajo las condiciones empleadas. Para el caso de los meristemos expuestos, la relación entre la concentración de vanadio y la longitud de la raíz es positiva y altamente significativa para todas las concentraciones utilizadas; sin embargo se observa una disminución paulatina del coeficiente de correlación a medida que aumenta la concentración, lo que indica que, al

someter las raíces a diferentes concentraciones de vanadio, el proceso de crecimiento normal dependiente del tiempo se ve afectado, aún cuando dicho crecimiento continúe; el mayor efecto se ve a partir de 0,75 ppm, ya que para los mismos tiempos de muestreo, el coeficiente de determinación R^2 ha disminuido de 92,91% (0 ppm) a 48,97%, lo que infiere un efecto deletéreo de la concentración de vanadio sobre la longitud de la raíz a partir de esta concentración, esto fue corroborado al realizar el análisis de varianza (Tabla 2), donde se determinó el efecto de la combinación de estos parámetros (tiempo y concentración), sobre el crecimiento de los meristemos ($F = 15,62$; $p < 0,01$). Los resultados coinciden con los reportes de otros autores quienes establecen el efecto tóxico del vanadio en cultivos celulares, reflejado por un bloqueo en el crecimiento de las raíces (13,14). La toxicidad del metal a concentraciones bajas podría explicarse debido al poder de penetración del vanadio en las plantas (15).

El efecto deletéreo del metal sobre el crecimiento de las raíces expuestas, es debido posiblemente a que el vanadio induce alteraciones en la ruta de absorción de nutrientes necesarios para el crecimiento de los meristemos, al respecto se han reportado efectos perjudiciales sobre las plantas, que alteran el proceso de fijación de nitrógeno (5) e induciendo deficiencia de hierro (14), que afecta la nutrición dependiente de estos elementos.

Efecto del vanadio sobre el Índice Mitótico (IM)

En la Tabla 3 se muestra los resultados obtenidos cuando se correlacionó el índice mitótico con la concentración de vanadio a los diferentes tiempos, se pudo observar en las raíces control (0 ppm), una correlación negativa altamente significativa entre el tiempo y el IM ($r = -0,5932$; $p < 0,01$), por lo que, para el tamaño de las raíces seleccionadas el IM disminuye con el transcurso del tiempo, lo cual puede ser explicado por que

Tabla 1
Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (p) y coeficiente de determinación (R^2) al relacionar longitud de la raíz versus concentración de vanadio a diferentes tiempos.

Concentración V_2O_5 (ppm)	r	p	% R^2
0	0,9639	< 0,01	92,91
0,25	0,9543	< 0,01	91,06
0,50	0,9405	< 0,01	88,45
0,75	0,6998	< 0,01	48,97
1,00	0,5867	< 0,01	34,42

Tabla 2
Análisis de varianza del efecto de la concentración y tiempo de exposición al Vanadio sobre la longitud de la raíz y el Índice Mitótico (IM).

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	p
Longitud	24	49,0321	2,04301	15,62	< 0,001
IM	16	85,5552	5,34720	73,15	< 0,001

Tabla 3
Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia (p) y coeficiente de determinación (R^2) al relacionar índice mitótico con concentración de vanadio a diferentes tiempos.

Concentración V_2O_5 (ppm)	r	p	% R^2
0	- 0,5932	< 0,01	35,18
0,25	- 0,9572	< 0,01	91,62
0,50	- 0,9286	< 0,01	86,22
0,75	- 0,9159	< 0,01	83,38
1,00	- 0,8667	< 0,01	75,11

se pierde el equilibrio dinámico, de manera que el número de células que pasan a diferenciación superan a las que entran a división. A partir de 0,25 ppm se presenta una disminución en el IM de una manera altamente significativa con el aumento de la concentración, lo que indica la dependencia entre los dos parámetros; el coeficiente de determinación (R^2) evidencia que a medida que aumenta la concentración, las variacio-

nes en el IM se hacen mas dependientes de esta, disminuyendo con respecto al tiempo, lo cual quedó demostrado al observar que en los meristemos no expuestos sólo el 35,18% de las variaciones en el IM dependen del tiempo, mientras que a 0,25 ppm el 91,62% dependen de la concentración; la disminución paulatina del coeficiente de determinación observada a concentraciones mayores, puede deberse a la inducción de necrosis ce-

lular por efecto del metal. Para corroborar el efecto deletéreo del metal se realizó un análisis de varianza (Tabla 2), revelando un efecto significativo ($F= 73,15$ $p< 0,01$) de la concentración y tiempo de exposición sobre el índice mitótico. Los resultados coinciden con los reportes de otros autores en diversos sistemas biológicos (14, 10, 4).

El efecto citotóxico inducido podría ser explicado al considerar que el metal interfiere con los complejos enzimáticos del molibdeno (16), y del hierro (17), causando desordenes a nivel celular que pueden conllevar a daños en el ADN, por otro lado, Nielsen y Uthus (18) en 1990, reportan la estrecha similitud del vanadio con el fósforo y el impacto que este ejerce sobre las reacciones de fosforilación, procesos indispensables en la regulación del ciclo celular, que aseguran la progresión del mismo posterior a la reparación del daño genético. También han sido establecidos daños en el ADN causados por el metal (8,10), lo que conlleva a un bloqueo de la entrada de las células en mitosis como un mecanismo de control celular intrínscico.

Efecto del vanadio sobre la inducción de aberraciones cromosómicas (AC)

En las Figuras 1 y 2 se muestra la frecuencia de aberraciones causadas por el vanadio. Se puede observar que se producen cambios morfológicos en los cromosomas para todos los tiempos y concentraciones utilizadas y entre las cuales, el fenómeno conocido como estekinesis resultó la más frecuente. Las cromátidas hermanas, al permanecer unidas por puentes subcromatínicos originan otras aberraciones como puentes anafásicos, en algunos casos con ruptura cromosómicas. También se pudo observar el efecto conocido como c- mitosis, caracterizado por un bloqueo en la segregación de los cromosomas en metafase. La presencia de aberraciones cromosómicas refleja un efecto genotóxico del metal que conducen a la necrosis celular, posiblemente debido al daño causado por el metal directamente sobre el ADN (19, 8, 10) o bien por su efecto

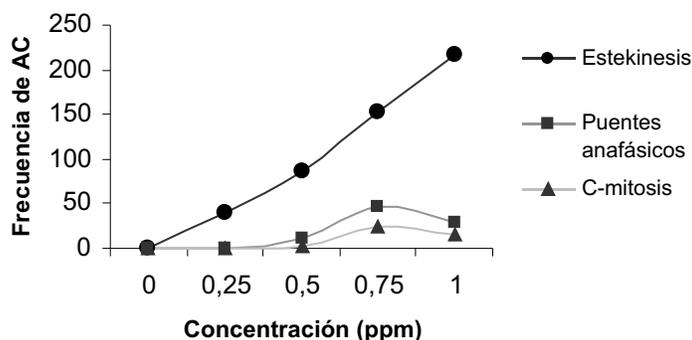
sobre enzimas encargadas de la reparación del mismo (20, 21).

Interacción entre la concentración de vanadio y el tiempo de exposición sobre la inducción de aberraciones cromosómicas

Los resultados del análisis realizado por una prueba de Duncan para medir el efecto del vanadio a una sola concentración (0,5 ppm) y diferentes tiempos, o el efecto de diferentes concentraciones a un mismo tiempo (24 h), se muestran en las Tablas 4 y 5. Se pudo evidenciar un incremento de la frecuencia de aberraciones con el transcurso del tiempo, el cual se hace significativo después de 12 horas de tratamiento (Tabla 4). De forma similar, a partir de 0,25 ppm, al aumentar la concentración de vanadio se produce un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Tabla 5). Al correlacionar los diferentes tipos de aberraciones entre sí (Tabla 6), se observó una correlación positiva altamente significativa entre la estekinesis y la formación de puentes anafásicos ($r= 0,7648$; $p < 0,01$), lo cual demuestra la dependencia entre ellas. La no dependencia del efecto c-mitótico con las otras aberraciones cromosómicas inducidas, podría ser explicado si se considera que el metal se comporta fisiológicamente como un antagonista del calcio (22,5), este último indispensable para la formación del huso mitótico (14). Los resultados de la genotoxicidad inducida por el metal van acorde con los reportes de otros autores quienes señalan la capacidad del vanadio en inducir alteraciones cromosomales en diversos sistemas biológicos (23, 24, 20, 14, 8,10). También se ha reportado la inducción de este tipo de anomalías con otras sustancias tóxicas en este modelo biológico (20, 25, 26, 27).

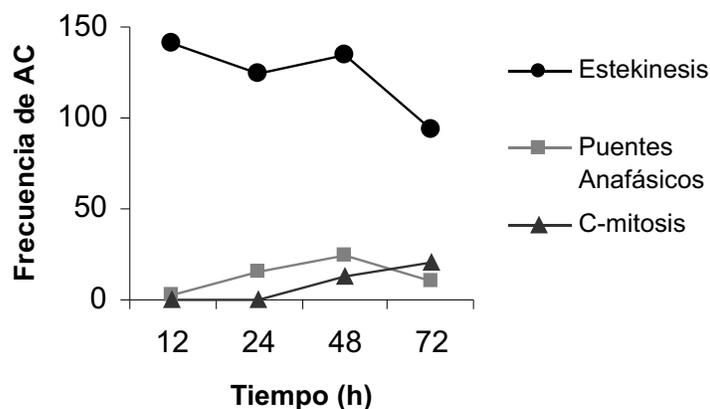
Conclusiones

Se establece un evidente efecto tóxico del vanadio en los cultivos de células meristemáticas de *Allium cepa L.*, valorado por un efecto sobre la longitud, el índice mitótico y



* Los puntos representan el valor promedio para cada concentración.

Figura 1. Frecuencia de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas (AC) a las diferentes concentraciones de vanadio.



* Los puntos representan el valor promedio para cada tiempo.

Figura 2. Frecuencia de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas (AC) inducidas por vanadio a los diferentes tiempos de exposición.

Tabla 4

Comparación del efecto del vanadio sobre el % de Aberraciones Cromosómicas (AC) a una misma concentración (0,5 ppm) y diferentes tiempos de exposición.

Tiempo (h)	% AC (X±DS)
0	0.00
12	*10,00 ± 0,24
24	*12,00 ± 0,98
48	**33,00 ± 1,87
72	**30,30 ± 2,76

Prueba múltiple de Duncan * p < 0,05; ** p < 0,01.

Tabla 5

Comparación del efecto del vanadio sobre el % de Aberraciones Cromosómicas (AC) a un mismo tiempo (24 h) y diferentes concentraciones.

Concentración (ppm)	% AC (X±DS)
0	0.00
0,25	*7,30 ± 1,65
0,50	*12,00 ± 2,51
0,75	**43,60 ± 3,23
1,00	**66,30 ± 4,65

Prueba múltiple de Duncan *p < 0,05; **p < 0,01.

Tabla 6
Coeficiente de correlación (r), nivel de significancia, (p) y coeficiente de determinación (R²) al relacionar los daños cromosómicos entre si.

Fuente de variación	r	p	R ²
Puentes Cromosómicos	0,7648	< 0,01	0,5849
C- mitosis	0,2531	> 0,05	0,06405

Variable predictora: Estekinesis.

la inducción de aberraciones cromosómicas; en todos los casos, correlacionado con la concentración y tiempo de exposición. Esto demuestra la sensibilidad de la especie a la contaminación por el metal, lo que permite inferir un factor de riesgo para la salud humana el consumo de vegetales cultivados en regiones contaminadas. También se puso de manifiesto la relación entre los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas, por lo que se puede establecer que, cualquier tipo de anomalía que se presente puede ser tomada como indicador de genotoxicidad en los estudios de contaminación ambiental. En el caso particular de los meristemos de *Allium cepa*, se pueden sugerir como un modelo idóneo para el estudio de contaminación por metales pesados.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia por el financiamiento de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. IPCS. International Chemical Safety Card - Vanadium pentoxide. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (ICSC 0596). 1999.
2. MORENO M. Toxicología Ambiental. Ediciones McGraw-Hill. 1ª Edición. Madrid (España), pp. 235-246, 2003.
3. LERDA E., PROSPERI C. *Water Res* 30: 819-824. 1996.
4. OKESON D., RILEY M., RILEY-SAXTON E. *Toxicol* 18: 673-680, 2004.
5. WHO. Environmental health criteria 118: Inorganic vanadium. World Health Organization. pp. 169, 2001.
6. BORGES G., MENDOCA P., JOAQUIM N., COUCELO J., AURELIANO M. *Arch Environ Con Tox* 45: 415-422, 2003.
7. BARTH A., SCHAFFER A., KONNARIS C., BLAUENSTEINER B., WINKER R., OSTERODE W., RÜDIGER HW. *J Toxicol Env Health* 65: 677-683, 2002.
8. IVANCSITS S., PILGER A., DIEM E., SCHAFFER A., RÜDIGER H. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutat* 19: 25-35, 2002.
9. KLEINSASSER N., DIRSCHEDL P., STAUDENMAIER R., HARRÉUS U., WALLNER B. *Int J Environ Health Res* 13: 373-379, 2003.
10. RODRÍGUEZ-MERCADO J., ROLDÁN-REYES E., ALTAMIRANO-LOZANO M. *Toxicol Lett* 144: 359-369, 2003.
11. MO W.H., LI M. *Chin Bull Bot* 9: 30-34, 1992.
12. LI M. *Bull Biol* 5: 53-55, 1982.
13. CORTIZO M., ETCHEVERRY B. *Mol Cell Biochem* 145: 7-102, 1995.
14. WANG J., LIU Z. *Plant Soil* 216: 47-51, 1999.
15. MONTIEL X., CARRUYO I., FERNÁNDEZ Y., MARCANO L., SALAS J., TORREALBA Z. Eighth Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Brazil (Rio de Janeiro), pp. 67-68, 2004.

16. CHAN M., KIM J., REES D. **Science** 260: 792-794, 1993.
17. TUDARES C., VILLALOBOS H. **Invest Clínicas** 39: 29-38, 1998.
18. NIELSEN F., UTHUS E. Vanadium in Biological Systems, Chasteen N., Ed. **Kluwer Academic Press**, Dordrecht. pp. 51-62, 1990.
19. MARCANO L., CARRUYO I., MONTIEL X., BRACHO M., SOTO L. **Rev Fac Agron LUZ** 16(5): 476- 487, 1999.
20. ZHONG B., GU Z., WALLACE W., WHONG T. **Mutat Res** 321: 35-42, 1994.
21. LEOPARDI P., SINISCALCHI E., CORDELLI P., VILLANI E., VESCHETTI E., CREBELLI **Toxicol Lett** pp. 134-144, 2003.
22. U.S.EPA. Environmental Protection Agency. Toxicological profiles for vanadium. 1992.
23. OWUSU-YAW J., COHEN M., FERNANDO S., WEI C. **Toxicol Lett** 50: 327-336, 1990.
24. MIGLIORE L., BOCCIARDI R., MACRI C., LO JACONO F. **Mutat Res** 319: 205-213, 1993.
25. DONGHUA L., WUSHENG J., WEI W., FENGMEL Z., CHENG L. **Environ Pollut** 86: 1-4, 1994.
26. MARCANO L., MONTIEL X., CARRUYO I., BRACHO M., ATENCIO L. **Ciencia** 6(2): 93-99, 1998.
27. MARCANO L., CARRUYO I., MONTIEL X., DEL CAMPO A. **Environ Res** 94: 221-226, 2004.