

Acción genocontaminante del agroquímico metamidofos y del saborizante glutamato monosódico en el ciclo nucleolar de *Allium cepa* L.

Action genocontaminante of the agrochemical methamidophos and the flavoring monosodium glutamate in the *Allium cepa* L. nucleolar cycle

Raúl A. Beltrán Orbegoso¹, Lidia M. Lizarzaburu Montero²

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar la acción genocontaminante del plaguicida metamidofos 0,05; 0,1 y 0,15 ml/L y del saborizante glutamato monosódico 1,0; 2,0 y 3,0 g/L, en los índices de fases del ciclo nucleolar de una población celular mononucleada de *Allium cepa* L. Se usó el diseño experimental en estímulo creciente; los genotóxicos se aplicaron tomando como referencia las duraciones teóricas de los ciclos celular y nucleolar de *A. cepa* L. Luego, las muestras se sometieron a la técnica de coloración de impregnación argéntica. Se halló que metamidofos 0,05 ml/L altera los índices de fases del ciclo nucleolar y que las concentraciones de 0,1 y 0,15 ml/L retienen a la población celular en las fases del nucléolo organizado y en desorganización, anormales. Así mismo, metamidofos 0,1 ml/L induce la generación de células interfásicas con cuatro y cinco nucléolos, evidenciando un probable efecto genocontaminante en las regiones organizadores del nucléolo (NOR). El glutamato monosódico 1,0; 2,0 y 3,0 g/L inducen variaciones en los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. pero no generan formas anormales; incluso, se presentan figuras mitóticas de profase, metafase, anafase y telofase, lo cual evidencia que el saborizante no tiene efecto citostático. La prueba de los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. se podría usar como un test complementario a la prueba de las aberraciones cromosómicas, para identificar los perfiles ecotoxicológicos de los productos químicos que hoy se usan masivamente en Perú.

Abstract

This research evaluates the likely genotoxic effect of pesticide metamidophos 0.05; 0.1 and 0.15 ml/L and flavoring monosodium glutamate 1.0; 2.0 and 3.0 g/L, on *Allium cepa* L. mononucleada cell population nucleolar cycle indexes. Used experimental design in growing; stimulus the genotoxic applied by reference to theoretical durations cell cycles and nucleolar of *A. cepa* L.; then the samples submitted to colouring of impregnation technique. We found that metamidophos 0,05 ml/L alters nucleolar cycle rates and concentrations of 0.1 and 0.15 ml/L retain the cell population in the phases of the organized nucleolus and disorganization, abnormal. Likewise, metamidophos 0.1 ml/L induces cell interphase with four and five-generation nucléolos, showing a probable regions genotoxic effect organizers of the nucleolus (NOR). Monosodium glutamate 1.0; 2.0 and 3.0 g/L induce changes in indices of nucleolar a. cycle of *A. cepa* L., but do not generate abnormal; forms even occur mitóticas figures in prophase, metaphase, anaphase and telophase, which evidence that the flavoring has cytostatic effect. Indexes of nucleolar test of *A. cepa* L. could be used as a supplementary proof of chromosomal aberrations, test to identify the chemicals that are today used massively ecotoxicological profiles in Perú.

Introducción

El nucléolo es la estructura del núcleo interfásico eucariota generado por la actividad transcripcional de genes codificantes del ARN ribosómico (Alberts y col., 2002; Paniagua y col., 2007). Durante el ciclo celular, el nucléolo presenta una progresión de diversas formas denominadas en conjunto ciclo nucleolar, dichas formas reflejan los diversos grados de intensidad que alcanza la actividad transcripcional durante el ciclo vital de una célula.

¹ Universidad Nacional de Trujillo, rbeltran@unitru.edu.pe

² Oficina Central de Investigación Universitaria, Universidad San Pedro

Recibido: 2 de octubre del 2013

Aceptado: 20 de diciembre del 2013

El ciclo nucleolar, convencionalmente, ha sido secuenciado en cuatro fases: a) la del nucléolo visible u organizado, asociado a las fases G₁, S y G₂ de la interfase, en donde se evidencia una intensa actividad transcripcional de los genes mencionados; b) la del nucléolo en desorganización, asociado al momento final de la fase G₂, en donde el proceso transcripcional disminuye; c) del nucléolo ausente, relacionado con la etapa de la división celular, en donde la transcripción es escasa; y, d) la del nucléolo en reorganización, relacionado con el momento terminal de la telofase, en donde la actividad transcripcional se reanuda (Alberts y col., 2002; Berkaloﬀ y col, 1996; Paniagua y col, 2007).

Investigaciones recientes han asociado el nucléolo con la regulación del envejecimiento celular mediante su relación con la telomerasa (Rosete y col., 2007), y la modulación de las respuestas de ciertos vertebrados al stress celular ocasionado por cambios estacionales (Álvarez y col., 2003; Álvarez, 2004). Sus regiones argirófilas se usan como indicadores tempranos de carcinomas en tejidos linfoides humanos (Pich y col., 1995; Kawasaki y col., 2000), de su transcriptoma y proteoma (Andersen y col., 2002; Andersen y col., 2005; Gracey y col., 2004).

Precisamente, el presente trabajo se orienta a usar las fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. como criterio para medir la citotoxicidad de productos químicos como plaguicidas, hidrocarburos, fármacos, productos de limpieza, solventes de la industria del calzado, golosinas, saborizantes alimentarios que actualmente se expenden y usan, en forma masiva y sin control, en las diversas actividades agrícolas, mineras, industriales, sanitarias y domésticas, de nuestro país y de la región La Libertad (Calderón y col., 2009; Ianacone y Albariño, 2009; Quispe, 2008; Rodríguez, 2009).

En la región La Libertad, en los valles de Moche y Virú en el sur, en los valles de Chicama y Jequetepeque en el norte y en la cuenca alta del río Moche al este de la región, los agricultores usan intensamente pesticidas organofosforados y organoclorados como el metamidofos para el control de plagas y de malezas en cultivos de hortalizas, frutas y legumbres de intensa demanda en el consumo diario (Beltrán, 1996; Ministerio de Agricultura, 1999).

En cuanto a los saborizantes, el glutamato monosódico (GMS), conocido por el nombre comercial de ajinomoto, y el aspartamo constituyen los potenciadores alimentarios con mayores volúmenes de venta en los principales centros de abastos y supermercados de la región La Libertad. El GMS se expende como tal y también se halla habitualmente en sopas de sobre, cóctiles “mágicos”, papitas especiales, snacks, o productos “diet” o sin azúcar; algunos estudios reportan su carácter de agente causante del “síndrome del restaurant chino” y de efectos nocivos en el sistema nervioso, otros reportes aseguran su inocuidad.

Por tanto, la interrogante fue ¿Cuáles son los efectos del agroquímico metamidofos a las concentraciones de 0,05; 0,1 y 0,15 ml /L y del saborizante GMS a las concentraciones de 1,0; 2,0 y 3,0 g/ L, en los índices de fases del ciclo nucleolar de *Allium cepa* L.?, formulándose la hipótesis estocástica causal: Basado en las estructuras químicas del metamidofos y del GMS, es de esperarse que ambos productos químicos induzcan variaciones en los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. El objetivo de la investigación fue determinar los efectos del agroquímico metamidofos y del saborizante glutamato monosódico en los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L.

Materiales y métodos

Selección y adecuación del material biológico a ser usado como biosensor de los productos químicos. 50 bulbos frescos de *Allium cepa* L. var. “roja arequipeña” se mantuvieron en agua fresca, aireación constante y temperatura ambiental promedio de 20°C para inducir el crecimiento de raicillas; cuando éstas, alcanzaron los tres cm de longitud, se constituyeron en las unidades experimentales.

Diseño experimental. Las raicillas se trabajaron en dos sistemas experimentales I: *A. cepa*, sometido al metamidofos y II: *A. cepa* sometido al glutamato monosódico. Cada sistema estuvo constituido por un grupo testigo y tres grupos experimentales A, B, C. Las raicillas fueron mantenidas en los productos químicos desde las 0 a las 11,0 horas, tiempo en que las células meristemáticas transcurren por las fases G1 y S de la interfase. De las 11,0 a las 17,0 horas, las raicillas se pasaron a agua fresca para su recuperación. A partir de las 17,0 horas, los ápices de las raicillas fueron disectados para ser tratados a la técnica de impregnación argéntica.

Técnica de impregnación argéntica para coloración del nucléolo. a) Fijación en una mezcla 1:1 de formol al 10% e hidroquinona al 1%. b) Lavado de los ápices, tres veces, con agua destilada. c) Sumergir los ápices en AgNO₃ acuoso al 2%, en una estufa a 70°C por diez horas. d) Lavado de los ápices, tres veces, con agua destilada. e) Postfijación en formol-hidroquinona por una hora. f) Aplastamiento de los ápices en ácido acético al 50% en laminillas de vidrio.

Determinación de los índices de fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico Olympus con los objetivos de 4X, 10X, 40 X y 100X. Los índices de las cuatro fases del ciclo nucleolar de *A. cepa* L. se determinaron mediante el recuento de 1000 células mononucleadas; los datos obtenidos fueron sometidos a las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (varianza, desviación standard y error standard), previa transformación arco sen de los datos originales para ajustarlos a una distribución normal.

Resultados

Tabla 1. Índices promedio, reales y angulares, de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *A. cepa* L. testigo.

	Células mononucleadas de <i>A. cepa</i> L. con				
	nucléolo organizado	nucléolo desorganizado	nucléolo ausente	nucléolo reorganizado	
Bulbo A	79,4	4,1	3,9	12,6	100,0
	63,00	11,68	11,38	20,79	
Bulbo B	83,3	3,9	3,5	9,3	100,0
	65,87	11,38	10,78	17,75	
Bulbo C	80,4	4,9	3,2	11,5	100,0
	63,72	12,78	10,30	19,82	
Promedios	81,0	4,3	3,5	11,2	100,0
	64,20	11,95	10,82	19,45	

S ²	4,10	0,28	0,12	2,82
	2,23	0,54	0,29	2,40
S	2,03	0,52	0,35	1,68
	1,49	0,73	0,54	1,55
ES	1,12	0,31	0,2	0,97
	0,864	0,426	0,313	0,89

Fuente: elaboración propia

Tabla 2. Índices promedio, reales y angulares, de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *A. cepa* L. sometida al plaguicida metamidofos.

		Células con					
		nucléolo organizado	nucléolo en desorganización	nucléolo ausente	nucléolo en reorganización		
Meta- midofos 0,05 ml/L	Bulbo A	80,4	14,2	3,1	2,3	100	
	Bulbo B	88,5	8,8	1,8	0,9	100	
	Bulbo C	86,5	7,1	2,9	3,5	100	
	Promedios		85,1	10,0	2,6	2,3	100
			67,4	18,28	9,22	8,31	
	S ²	11,00	11,96	1,73	7,25		
	S	3,32	3,46	1,31	2,70		
	ES	1,92	1,99	0,76	1,55		
	Meta- midofos 0,1 ml/L	Bulbo A	85,7	14,3	-----	-----	100
		Bulbo B	91,6	8,4	-----	-----	100
Bulbo C		89,5	10,5	-----	-----	100	
Promedios			88,9	11,1	-----	-----	100
			70,67	19,32	-----	-----	
S ²		7,34	7,34				
S		2,71	2,71				
ES		1,56	1,56				
Meta- midofos 0,15 ml/L		Bulbo A	92,3	7,7	-----	-----	100
		Bulbo B	87,2	12,8	-----	-----	100
	Bulbo C	93,3	6,7	-----	-----	100	
	Promedios		90,9	9,1	-----	-----	100
			72,6	17,4	-----	-----	
	S ²	10,05	10,05				
	S	3,17	3,17				
	ES	1,83	1,83				

Tabla 3. Índices promedio, reales (%) y angulares, de las cuatro fases del ciclo nucleolar de la población mononucleada de *A. cepa* L. sometida al saborizante glutamato monosódico.

		Células con				
		nucléolo organizado	nucléolo en desorganización	nucléolo ausente	nucléolo en reorganización	
Glutamato monosódico 1,0 g/L	Bulbo A	85,4	2,0	2,5	10,1	100
	Bulbo B	80,1	5,3	2,9	11,7	100
	Bulbo C	80,4	4,4	3,1	12,1	100
	Promedios	82,0	3,9	2,8	11,3	100
		64,92	11,18	9,68	19,63	
	S ²	5,14	7,35	0,28	0,94	
	S	2,27	2,71	0,53	0,97	
ES	1,31	1,56	0,3	0,56		
Glutamato monosódico 2,0 g/L	Bulbo A	83,6	3,7	2,4	10,3	100
	Bulbo B	84,9	3,9	3,7	7,5	100
	Bulbo C	89,2	2,9	1,9	6,0	100
	Promedios	85,9	3,5	2,7	7,9	100
		68,02	10,76	9,57	16,26	
	S ²	6,12	0,28	0,07	2,82	
	S	2,47	0,52	0,27	1,68	
ES	1,42	0,31	0,15	0,97		
Glutamato monosódico 3,0 g/L	Bulbo A	83,8	3,8	2,0	10,4	100
	Bulbo B	79,9	4,6	3,3	12,2	100
	Bulbo C	89,7	3,1	3,2	4,0	100
	Promedios	84,5	3,8	2,8	8,9	100
		66,97	11,25	9,63	16,93	
	S ²	16,04	1,26	1,70	22,49	
	S	4,00	1,12	1,30	4,74	
ES	2,31	0,65	0,75	2,73		



Figura 1. Cuatro células meristemáticas mononucleadas de *A. cepa* L., sometidas al agroquímico metamidofos 0,1 ml/L, mostrando entre cuatro y cinco nucléolos en la fase del nucléolo organizado, 1000X.

Discusión

La tabla 1, presenta los índices promedio reales de las cuatro fases del ciclo nucleolar hallados en la población meristemática mononucleada, testigo, los cuales son de 81,0%; 4,3%; 3,5% y 11,2% de células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente. Los índices de las fases nucleolares hallados en el presente trabajo son similares a los determinados en investigaciones sobre el nucléolo, lo cual indica que la proporcionalidad de las fases es constante a la temperatura en la cual se trabaje, siendo la duración del ciclo lo variable (Liu y col., 1994; Liu y Jiang. 1991; Liu, 1994).

En la tabla 2, se presentan los índices promedio reales de las cuatro fases del ciclo nucleolar hallados en la población meristemática sometida al plaguicida organofosforado metamidofos en las concentraciones de 0,05 ml/L; 0,1 ml/L y 0,15 ml/L. Metamidofos es uno de los plaguicidas más usados en la agricultura peruana (Ministerio de Agricultura, 1999), se le expende con dos formulaciones de diferente categoría toxicológica [Monofos®, categoría Ia (extremadamente peligroso) y Tamaron®, categoría (altamente peligroso)] (Ministerio de Agricultura, 1997. Su uso se ha prohibido en la comunidad europea, pero en Sudamérica se emplea como acaricida e insecticida.

El metamidofos 0,05 ml/L genera 85,1%; 10,0%; 2,6% y 2,3% de células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente. Al comparar los valores de la tabla 2 con los del grupo testigo, se evidencia un importante incremento de la fase del nucléolo en desorganización y una disminución de la fase del nucléolo en reorganización, lo cual nos indica que el agroquímico ha afectado la dinámica celular de los meristemos. El efecto se agudiza en la población celular sometida a las concentraciones de 0,10 y 0,15 ml/L, en donde el agroquímico evidencia un fuerte efecto citostático, al detener el ciclo celular en las fases nucleolares de organización y desorganización, pues no se hallaron células en las fases de nucléolo ausente ni del nucléolo en reorganización.

En el análisis de ciertos campos microscópicos se pudo visualizar a 1000X, a células mostrando cuatro o cinco nucléolos en su núcleo, tal como se observa en la figura 1. La anormal expresión de los nucléolos, se debe a una anormal expresión de las regiones AgNORs y por tanto a un probable efecto genotóxico del metamidofos 0,1 ml/L en los bucles del ADN encargados de la síntesis del ARN ribosómico (Lodish y col, 1999). Esta disgregación de las regiones AgNORs se podría constituir en un segundo criterio de evaluación para determinar la citotoxicidad de los productos químicos, tomando como referencia el ciclo nucleolar. En recientes investigaciones sobre la relación del nucléolo con carcinomas y melanomas, las alteraciones de los AgNORs han sido consideradas como índice biológico de agresividad de un tumor (Pich y col., 1995; Kawasaki y col., 2000).

En la tabla 3, se presentan los índices promedio reales de las cuatro fases del ciclo nucleolar hallados en la población meristemática sometida al saborizante glutamato monosódico en las concentraciones de 0,1 g/L, 0,2 g/L y 0,3 g/L. El glutamato monosódico (GMS) es el saborizante más consumido en el Perú y el mundo, es la sal sódica del aminoácido ácido glutámico o glutamato que se encuentra de forma natural en numerosos alimentos como los tomates, setas, verduras, proteínas e incluso la leche materna. Su fórmula es $C_5H_8NO_4Na$ y su nombre químico es sodio (2S)-2-amino-5-hidroxi-5-oxo-pentanoato. El GMS es uno de los productos industriales más polémicos pues mientras que un grupo de científicos sostienen su carácter de inocuo, otro grupo de

investigadores lo considera como una sustancia capaz de inducir cuadros de alteraciones psicológicas (Berk y col, 2001; Tanaka y col, 1997; Paul y Skolnick, 2003).

Al comparar los promedios reales de este grupo experimental con los del grupo testigo, no existen diferencias significativas. El GMS 0,1 g/L genera 82,0%; 3,9%; 2,8% y 11,3% de células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente; y a las concentraciones de 0,2 g/L y 0,3 g/L presenta una ligera disminución de la fase del nucléolo en reorganización. Sin embargo, la cinética y proporción celular de las cuatro fases nucleolares es similar al testigo. Los resultados muestran que el GMS no tendría efecto citotóxico, lo cual no concuerda con investigaciones recientes que señalan su carácter tóxico para la salud; sin embargo, habría que realizar pruebas complementarias para formular una conclusión definitiva.

Conclusiones

El agroquímico metamidofos 0,05 ml/L afecta los índices de fases nucleolares de *Allium cepa* L. generando 85,1%; 10,0%; 2,6% y 2,3% de células con índices nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente.

El metamidofos 0,10 y 0,15 ml/L evidencia un fuerte efecto citostático, al detener el ciclo celular de *A. cepa* L. en las fases nucleolares de organización y desorganización; así mismo, a la concentración de 0,1 ml/L induce la generación de células interfásicas con cuatro y cinco nucléolos, evidenciando un probable efecto genotóxico en las regiones organizadores del nucléolo (NOR).

El saborizante glutamato monosódico 0,1; 0,2 y 0,2 g/L no genera un índice significativo de fases nucleolares anormales. Sin embargo, su probable inocuidad debería evaluarse con pruebas complementarias.

Referencias bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. (2ª Ed.). New York: Garland Science.
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M. & Vera, M.I. (2003). An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys.* 301: 152–158.
- Alvarez, M., Molina, A., Quezada, C., Pinto, R., Krauskopf, M. & Vera, M.I. (2004). Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function. *J. Therm. Biol.* 29: 663–667.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. & Lamond, A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 8(3): 1–11.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I. & Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* (London); 433, 77–83.
- Beltrán O., R. (1996). Ensayos para la evaluación de genotoxicidad química en meristemos de *Allium cepa* L. *Resúm. Inf. Invest. Univ. Nac. de Trujillo*. Perú.

- Beltrán O., R. (2009). Perfiles ecotoxicológicos de solventes de la industria del calzado y de plaguicidas agroquímicos mediante los biomonitores *Vicia faba* y *Allium cepa* en la región La Libertad. Libro de resúmenes, Cong. Intern. de Ecología y Medio Ambiente. pp 152.
- Berk, M., Plein, H. & Ferreira D. (2001). Platelet glutamate receptor supersensitivity in major depressive disorder. *Clin. Neuropharmacology*. 24: 129-132
- Calderón, A., Vásquez, G., Llontop, L. y Saavedra, M. (2009). Número, tipo de envases y cantidad de residuos tóxicos de plaguicidas abandonados en dos agroecosistemas de hortalizas en Chiclayo, Peru 2007-2009. Libro de resúmenes del Cong. Intern. de Ecología y Medio Ambiente. pp 151.
- Gracey, A.Y., Fraser, E.J., Li, W., Fang, Y., Taylor, R., Rogers, J., Brass, A. & Cossins, A.R. (2004). Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 101, 16970–16975
- Ianacone, J. y Alvarino, L. (2009). La Ecotoxicología acuática en el Perú. Libro de resúmenes del Congreso Internacional de Ecología y Medio Ambiente. pp 33.
- Kawasaki, F., Onoda, N., Ishikawa, T., Ogawa, Y., Ikelda, K., Sugamo, S., Kato, Y. & Chung, K.H. (2000). Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence. *Oncol. Rep.*; 7(4): 853-857.
- Liu, W., Jiang, W., Wang, F., Zhio, C. & Lu. (1994). Effect of lead on root growth, cell division and nucleolus of *Allium cepa*. *Environ. Poll.* ; 86: 1-4.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, S., Ziapursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnell, J. (1999). *Molecular Cell Biology*. New York: Edit. Scientific American Books. INC.
- Ministerio de Agricultura. (1999). Diagnóstico del uso de plaguicidas en el valle Moche. Edit. Lima, Perú.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría M., Fraile, B., Anadón, R. & Sáez, F.J. (2007). *Biología Celular*. (3ª Ed.) Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.
- Paul, I.A. & Skolnick, P. Glutamate and Depression. *Ann N Y Acad Sci*. (2003) Nov; 1003:250-72. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684451>
- Pich, A., Chiusa, L. & Margaria, E. (1995). Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect and Prevent*; 19(3): 282-291.
- Quispe Ch., J.M. (2008). Efecto del sorbato de potasio a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el índice mitótico en *Allium cepa*; Tesis para optar el título de Biólogo. Univ. Nac. de Trujillo. Perú.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Hori S., Takimoto, M. & Wada, K. (1997). Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1; *Science*; 276: pps.1699-1702.