

# MICRONÚCLEOS, ÍNDICE MITÓTICO Y ABERRACIONES CROMOSÓMICAS COMO BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD EN HABA (*Vicia faba* L.) POR EFECTO DE CADMIO

## MICRONUCLEI, MITOTIC INDEX AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS AS BIOMARKERS OF GENOTOXICITY IN HABA (*Vicia faba* L.) BY EFFECT OF CADMIUM

**María Y. Sánchez-Zepeda<sup>1</sup>, Maritza López-Herrera\*<sup>2</sup>, Alberto J. Gordillo-Martínez<sup>1</sup>,  
Juan C. Gaytán-Oyarzún<sup>2</sup>, Francisco Prieto-García<sup>1</sup>, Pablo Octavio-Aguilar<sup>2</sup>**

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, (1) Área Académica de Química, (2) Área Académica de Biología, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, C. P. 42076, Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo - México

\*autor de contacto: (email: maritzah@gmail.com)

Recibido: 26/10/2018 - Evaluado: 13/11/2018 - Aceptado: 26/11/2018

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio es utilizar *Vicia faba* como un bioensayo de efectos genotóxicos mediante biomarcadores. Se evaluó el efecto genotóxico de tres concentraciones (0.112, 0.056 y 0.028ppm) de Cd<sup>2+</sup> mediante la prueba de micronúcleos en células meristemáticas, a 2 y 4 horas de exposición, aparición de aberraciones cromosómicas e índice mitótico. Al analizar frecuencia de células micronucleadas se observó un 30% con un solo micronúcleo, 33% con dos, 23% con tres y 14% hasta con cuatro micronúcleos; no se observaron aberraciones cromosómicas. El efecto de concentraciones se apreció a 4 horas de tratamiento, con el mayor número de células con micronúcleos. Esto sugiere la necesidad de incrementar tiempos de tratamientos para observar la transición de profase a metafase y poder estimar si se potencia el efecto genotóxico del mutágeno. Se concluye que *V. faba* resultó sensible al Cd<sup>2+</sup> como agente tóxico, a las concentraciones expuesta, en el tiempo de exposición del genotóxico.

### ABSTRACT

The objective of the present study is to use *Vicia faba* as a bioassay of genotoxic effects by means of biomarkers. The genotoxic effect of three concentrations (0.112, 0.056 and 0.028ppm) of Cd<sup>2+</sup> was evaluated by means of the micronucleus test in meristematic cells, at 2 and 4 hours of exposure, appearance of chromosomal aberrations and mitotic index. When analyzing the frequency of micronucleated cells, 30% were observed with a single micronucleus, 33% with two, 23% with three and 14% with up to four micronuclei; no chromosomal aberrations were observed. The effect of concentrations was appreciated at 4 hours of treatment, with the highest number of cells with micronuclei. This suggests the need to increase treatment times to observe the transition from prophase to metaphase and be able to estimate if the genotoxic effect of the mutagen is enhanced. It is concluded that *V. faba* was sensitive to Cd<sup>2+</sup> as a toxic agent, at the exposed concentrations, at the genotoxic exposure time.

Palabras clave: biomarcador, micronúcleos, biondicador, citotóxico, genotóxico

Keywords: biomarker, micronuclei, biondicator, cytotoxic, genotoxic

## INTRODUCCIÓN

Numerosas acciones humanas contaminan el suelo con metales, como el uso de aguas residuales para riego, aplicación de agroquímicos, minería, fundición, galvanoplastia, aplicación de lodos industriales y municipales al suelo, entre otras. Los problemas de contaminación ambiental son de gran importancia para el desarrollo de diferentes cultivos en zonas agrícolas (NOM-001-ECOL-1996; Lorenzo, 2015). La absorción de metales depende en gran medida de la biodisponibilidad de éstos, debido a que pueden formar parte de la cadena trófica (Kucharski *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2015; López-Herrera *et al.*, 2015; Tirado *et al.*, 2015). Youning *et al.* (2014), describen que los metales pueden ser almacenados en las plantas o en algunos casos, transformarse en sustancias menos perjudiciales, en gases no tóxicos al medio ambiente e incluso, formar metabolitos secundarios de interés biotecnológico.

La toxicidad de algunos metales pesados ha sido conocida desde hace muchos años. El cadmio, por ejemplo, es un metal pesado que produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aun en concentraciones muy pequeñas. Las vías de exposición de los metales son a través del aire, agua, polvo y los alimentos, y por la alteración de la forma bioquímica de muchos de ellos, lo que incrementa su acumulación y concentración (Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011). Algunos de los metales son elementos esenciales para su metabolismo celular: otros muchos son constituyentes no esenciales (Nadgórska-Socha *et al.*, 2013).

El cadmio está distribuido en la corteza terrestre en una concentración de 0.15 a 0.2 ppm (Galvao & Corey, 1987), no existe en estado puro, sino que forma compuestos iónicos con oxígeno, cloruros o sulfuros. Se liberan anualmente 300,000 toneladas de cadmio al medio ambiente, de las cuales 4,000 a 13,000 toneladas son derivadas de las actividades humanas como; emisiones industriales, aplicación de fertilizantes y aguas negras en sembradíos. De este modo, la población está expuesta al cadmio por dos vías: oral, a través de la ingesta de agua o comida contaminada con cadmio (hojas de vegetales, granos, cereales, frutas, vísceras animales y pescado); y a través de la inhalación de humo de cigarro o actividades industriales que contienen cadmio (Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011).

El cadmio es uno de los metales pesados más contaminantes debido a su movilidad en el suelo, al potencial de bioacumulación y a la alta toxicidad para los seres vivos (Kucharski *et al.*, 2005; Rodríguez, 2011; Conde *et al.*, 2015; López-Herrera *et al.*, 2015; Tirado *et al.*, 2015; González, 2015; González *et al.*, 2015), y quedar almacenado en los órganos de las plantas o en algunos casos, transformarse en sustancias menos perjudiciales (Youning *et al.*, 2014).

La absorción de cadmio es similar al proceso de absorción de metales esenciales como el calcio, hierro y zinc (Galvao & Corey, 1987); esta absorción se potencia cuando existen bajas concentraciones de calcio y hierro en el organismo o en dietas bajas en proteínas; el cadmio es transportado por la sangre y distribuido hacia el hígado y riñón donde produce diversas afecciones, así como en pulmones, huesos, testículos, placenta, y sistema nervioso central y periférico. El cadmio tiene una vida media de 17 a 30 años en humanos (Méndez-Armenta & Ríos, 2007).

En consecuencia, las plantas han desarrollado diferentes respuestas ante la presencia y acumulación de metales, ya que forman complejos estables menos tóxicos o dañinos con los quelantes (fitoquelatinas, ácidos orgánicos, aminoácidos o fenoles de tipo flavonoides); secuestran compuestos desde el citoplasma de la planta hacia el interior de las vacuolas o en la pared celular, donde no ocasionan efectos adversos (Jiménez *et al.*, 2013; González, 2015), incluso funcionan como bioindicadores de la calidad ambiental, donde su sensibilidad a los cambios por la contaminación, provoca respuestas positivas o negativas, función que depende de: composición genética del organismo, estado de desarrollo, condiciones ambientales, y diferencia de respuesta entre plantas. Finalmente, en grado extremo, la muerte de ellas (Pernía *et al.*, 2008; Azpilicueta *et al.*, 2010).

Algunos autores (Álvarez-Menéndez *et al.*, 2006; Probst *et al.*, 2009; García *et al.*, 2012), enfatizan la importancia del uso de especies de leguminosas, entre ellas el haba (*Vicia faba* L.), para evaluar el efecto de los metales en los procesos metabólicos, daños genotóxicos y distribución particular de los metales (Corchado, 2015). De ahí que el haba ha sido muy utilizada como modelo biológico, debido a que es un organismo que por sus características, permite obtener resultados de la citotoxicidad (daño de las células) o genotoxicidad (daño de la información genética), provocada por diversos componentes químicos en sus meristemas radiculares en cortos tiempos; pueden ser mantenidos en espacios pequeños a bajo costo y son fáciles de trabajar para la observación de células en división, posee pocos cromosomas (que son grandes), y por lo tanto permite visualizar daños asociados al material genético con relativa facilidad. De las alteraciones citogenéticas, en células de raíz de habas, expuestas a contaminantes se encuentran alteraciones en el índice mitótico, la formación de micronúcleos y la presencia de mitosis atípicas, que son conocidas como biomarcadores, que permiten evaluar la intensidad de exposición o riesgo para la salud (Ramírez, 2006; Nadgórska-Socha *et al.*, 2013). Los biomarcadores se clasifican según su exposición, su efecto y la susceptibilidad que presente (Tabla 1)

Tabla 1: Tipos de biomarcadores

Biomarcador de exposición	Biomarcador de efecto	Biomarcador de susceptibilidad
Es la sustancia o su metabolito o el producto de la interacción entre un agente xenobiótico y una molécula o célula diana que se mide en un compartimento de un organismo (Timbrell, 1998).	Es una alteración bioquímica, fisiológica, conductual dentro de un organismo, que se puede asociar a un deterioro o enfermedad establecida o temprana (Timbrell, 1998). Ejemplo de estos biomarcadores están las aberraciones cromosómicas, los micronúcleos, el intercambio de cromátides hermanas.	Es la capacidad de respuesta ante un desafío de la exposición a una sustancia xenobiótica específica (Pavanello & Clonfero, 2000; Sakai, 2006; Mussali-Galante <i>et al.</i> 2013).

Los micronúcleos (MN), son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Tienen un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras (Corchado, 2015). Durante la división celular el material genético contenido en el núcleo, se replica y divide equitativamente lo que da lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse equivocadamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, roturas cromosómicas, efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas; lo que trae como consecuencia, pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo (Matheus & Bolaños, 2014). Las roturas cromosómicas dan lugar a fragmentos acéntricos cromosómicos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos de las células hijas. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio óptico (Zalacain *et al.* 2005) (Figura 1).

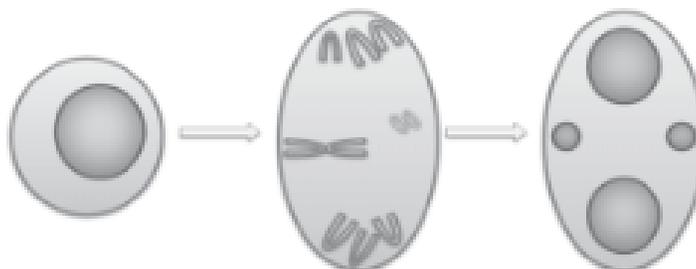


Fig. 1: Formación de micronúcleos en el curso de la división celular (Matheus & Bolaños, 2014).

Se han descrito criterios de selección para reconocer los MN que presenten las características necesarias para que el recuento sea fiable y objetivo, y que se muestran en la Tabla 2 (Matheus & Bolaños, 2014).

Tabla 2: Criterios de selección para micronúcleos

---

<ul style="list-style-type: none"><li>• El diámetro que oscile entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal</li><li>• No refractarios</li><li>• Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior</li><li>• Forma similar a los núcleos de la célula binucleada</li><li>• No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada</li><li>• Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada, pero no solaparse con ellos</li></ul>
---

---

El ensayo de micronúcleos se realiza *in vivo* y permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas. Como todo ensayo *in vivo* posee las ventajas de que se pueden reproducir los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto. Así también, posee la desventaja de la extrapolación a otras especies (Bello & López de Cerain, 2001). Por lo tanto, el tener información sobre la respuesta de cultivos de haba a la contaminación por cadmio, garantiza la seguridad alimentaria de la población en general. Así también, caracterizar plantas que puedan ser bioindicadoras de contaminación ambiental, y ser utilizadas en estudios como bioensayos que permitan determinar de manera rápida y segura, la presencia de contaminantes y así anunciar, el potencial de riesgo para la salud en áreas de la toxicología ambiental y genética (Gaytán, 1993).

## MATERIALES Y METODOS

Para determinar el potencial genotóxico del Cd<sup>2+</sup>, se utilizó el ensayo de inducción de micronúcleos (MN) en meristemos radicales de semillas de haba. Para esta investigación se utilizaron semillas certificadas de *Vicia faba* L. var. mayor (obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias, INIFAP, del estado de Hidalgo), las cuales se hicieron germinar bajo condiciones controladas de laboratorio en bandejas de plástico con algodón humedecido; una vez que las raíces alcanzaron una longitud de 3-4 cm, fueron sometidas a tres concentraciones del contaminante (CdSO<sub>4</sub>): 0.028, 0.05, 0.112 ppm y un testigo negativo (agua destilada) (Marcano *et al.*, 2001; Ünyayar *et al.*, 2006; B'éraud *et al.*, 2007), por periodos de 2 y 4 horas; se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Al cumplir el tiempo de tratamiento (2 y 4 horas), se realizó el corte de los meristemos apicales (2 mm de las raíces primarias), enseguida se inhibió la división celular con colchicina (0.05%) durante 3 horas, posteriormente se realizó la fijación de los cortes apicales, con solución de etanol:ácido Acético (3:1) por 24 horas bajo refrigeración (García *et al.*, 2012). Luego, se colocaron los meristemos en etanol al 70% por 15 min, y de ahí se pasaron a portaobjetos cóncavos, en donde se maceraron con bisturí e hidrolizaron con ácido clorhídrico al 5 M a 28°C durante 25 min con agitación continua, pasado ese tiempo, se decantó el excedente de ácido clorhídrico y se enjuagaron los meristemos tres veces con agua destilada. Una vez realizado lo anterior, se procedió a la tinción con aceto-orceína, por 25 minutos en oscuridad, de ahí se pasaron los meristemos a un portaobjetos plano, donde se les agregó ácido acético al 45%, y con un cubreobjetos se realizó la técnica de "squash" o aplastamiento de las raíces en monocapa (Prieto-García *et al.*, 2005; Gaytán, 2006).

Para favorecer la conservación de la preparación (hasta su observación), se utilizó solución salina fisiológica al 9% y se sellaron los bordes del cubreobjetos con barniz transparente. Finalmente, se realizó la debida identificación de la muestra. La observación microscópica de las muestras se realizó a 400x; para el caso del índice mitótico, se cuantificaron al menos 1000 células, se registraron cada una de las etapas de la división celular, incluyendo la interfase; así también, se buscaron alteraciones cromosómicas como: fragmentos sencillos y dobles, puentes cromosómicos sencillos y dobles, cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas (Gómez-Arroyo & Villalobos-Pietrini, 1983).

Los datos obtenidos se procesaron con el software Statistica (v. 10); los datos de frecuencia de micronúcleos se sometieron a una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (Díaz-Paez & Ortíz, 2003), y se estandarizaron con la fórmula  $z=(x-X)/s$ , y se generó así una distribución ortogonal. Posteriormente se realizó un Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFD) para los atributos relacionados con los micronúcleos (Uriel & Manzano, 2002; Murtagh & Legendre, 2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Daño genotóxico*

El daño genotóxico se determinó a través de la frecuencia de micronúcleos, mediante su identificación en 1000 células en interfase (Figura 2, Tabla 3), por medio de la siguiente fórmula (Espinoza,2016):

$$FMN = nMN / (nMN + nCM) \quad (1)$$

Donde, FMN corresponde a la frecuencia de micronúcleos, nMN indica el número de micronúcleos y nCM entrega el número de células en mitosis.

En la Figura 2, se observan de 1 hasta 4 micronúcleos por células meristemáticas, que son indicativos de la toxicidad de  $Cd^{2+}$  a bajas concentraciones, aún por debajo de los límites máximos permisibles en agua, propuestos en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

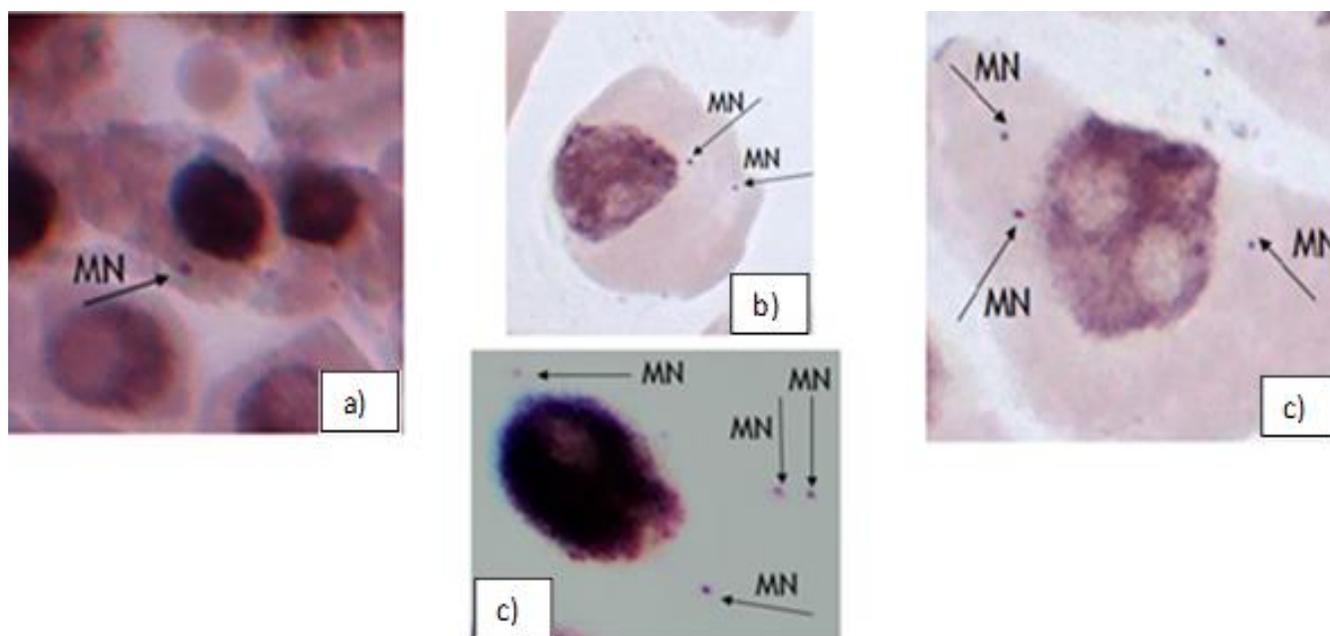


Fig. 2: Micronúcleos (MN) en células meristemáticas de raíz de *V. faba* en interfase en concentraciones; a) 0.028, b) 0.056 y c) 0.112 ppm de  $CdSO_4$  (400x).

En la propia figura, se puede apreciar que las células meristemáticas de la raíz no mostraron alteraciones cromosómicas, esto posiblemente, porque el tiempo de exposición a la concentración de  $Cd^{2+}$  probada no fue suficiente para que se generara y apreciara un efecto genotóxico. Gaytán (2006), menciona que las células presentan aberraciones anafásicas, según la sensibilidad de las etapas del ciclo celular, así como el

comportamiento del agente físico químico y el tiempo en el que éstas se presentan; este autor señala que, dicho tiempo, varía de 4-8 horas de exposición mínima con el tratamiento y alcanza su máxima respuesta entre las 8 y 48 horas. Sin embargo, este autor también señala que se observó un efecto clastogénico, entendido como la capacidad que tienen ciertas sustancias químicas para inducir rupturas cromosómicas que dan como resultado la formación de micronúcleos pequeños (Valencia-Quintana *et al.*, 2013).

Los datos de FMN sometidos a la prueba de normalidad, no cumplieron con el supuesto (Kolmogorov-Smirnov: 0.20780,  $p < 0.05$ ), por lo que se estandarizaron con la fórmula  $z=(x-X)/s$ , generando así una distribución ortogonal, es decir; con la misma media (0) y la misma desviación estándar (1), acotado el 95% de los datos a 1.96. Con estos mismos datos, se realizó un Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFD) para los atributos obteniendo lo que se observa en la Figura 3 y Tabla 3.

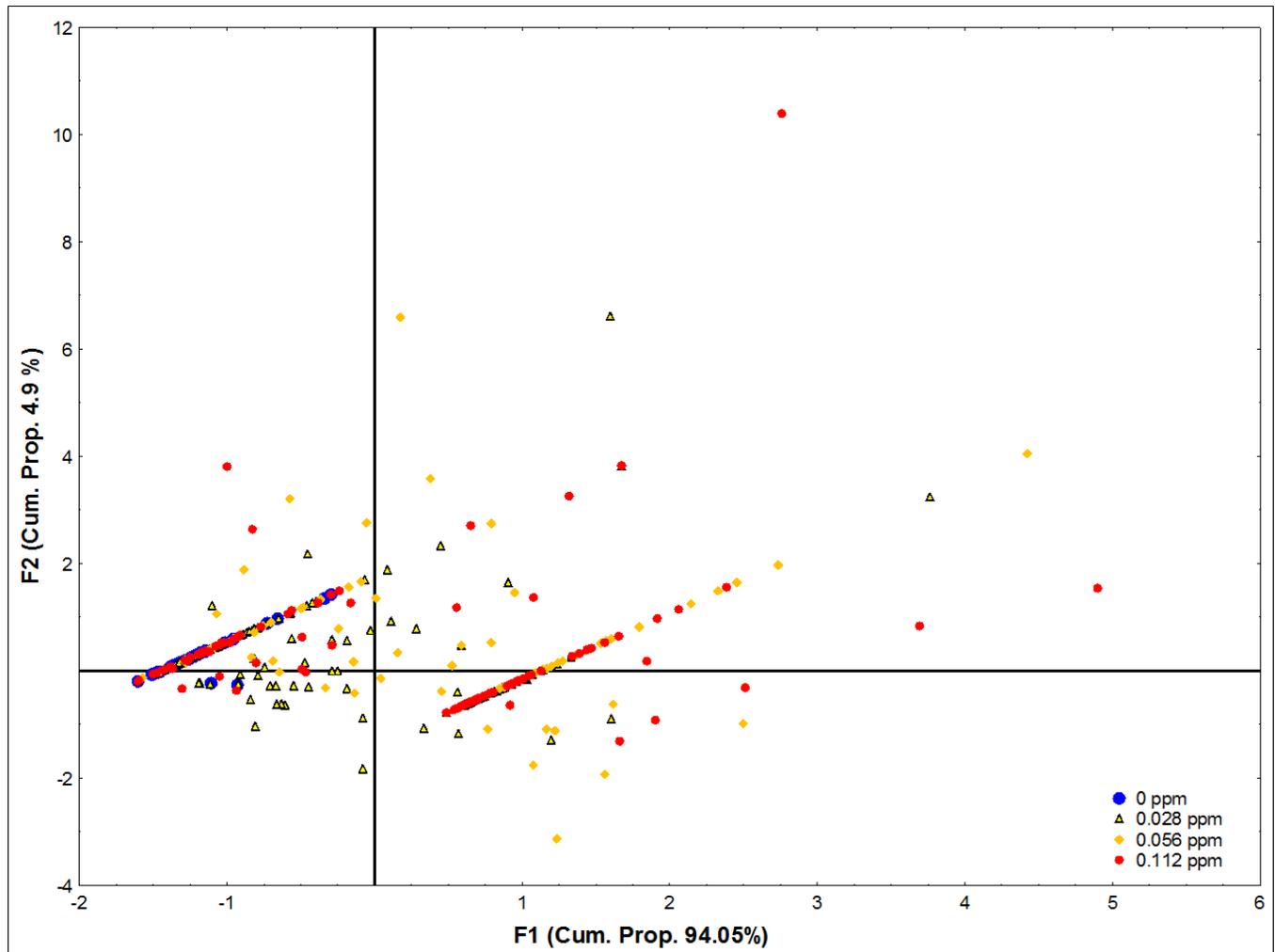


Fig. 3: Análisis de Funciones Discriminantes Generalizado (AFDG)

En la Figura 3, se observa una correlación positiva, dada por la función discriminante 1 (correspondiente al tiempo con 94.05%), que indica que a menor tiempo de tratamiento (2 horas) existe un mayor número de células que no presentan micronúcleos, caso contrario a mayor tiempo de tratamiento (4 horas), mayor número

de células que poseen desde uno a más de 3 micronúcleos. Esto se avala con los resultados de Marcano *et al.* (2001), quienes reportan que, al incrementar las concentraciones de Cd<sup>2+</sup> y el tiempo de exposición, el efecto es evidente por las alteraciones celulares producidas no solo en *Allium cepa*, sino también en *Vicia faba*.

Tabla 3: Coeficientes de correlación obtenidos por el AFDG. Se aprecia el valor explicativo para cada factor resultante (Eigenvalue) y la varianza acumulada (Cum. Prop.).

	Efecto	Función 1	Función 2	Función 3
<b>0 MN</b>		0.301604	<b>-0.764013</b>	0.392585
<b>1 MN</b>		0.331995	<b>0.754757</b>	-0.554178
<b>2 MN</b>		0.230583	0.108079	<b>0.671843</b>
<b>3 MN</b>		0.139264	<b>0.663691</b>	<b>0.671843</b>
<b>Tiempo</b>	2 horas	<b>0.751357</b>	-0.426324	0.271150
<b>Eigenvalue</b>		0.211436	0.01102	0.00234
<b>Cum. Prop.</b>		0.9405554	0.98958	1.00000

Para en el caso de la función discriminante 2, se observa una correlación inversamente proporcional con la frecuencia de células sin micronúcleos, la cual se repite al tiempo 1 y 2. Sin embargo, destaca que todos los campos analizados provenientes del control se presentan a dos horas y en su mayoría no tienen micronúcleos. Esto explica por qué el control difiere del resto de los tratamientos. La concentración más baja también tiene menor cantidad de micronúcleos. Finalmente, los tratamientos a concentración media y alta no difieren en las proporciones de micronúcleos (Tabla 4).

Los resultados mostraron que el daño del genoma es algo que se produce aún en el control y en bajas concentraciones de Cd<sup>2+</sup>, por lo que es importante establecer un nivel de daño independiente del genotóxico, a partir de una concentración umbral. Para ello se agruparon a las células de acuerdo a la cantidad de micronúcleos, independientemente del tratamiento. Esto se realizó mediante un análisis de agrupamiento (Cluster), se consideró un método de amalgamamiento de Ward basado en distancias euclidianas. Este agrupamiento permitió clasificar a las células en tres grupos con daños ascendentes (Figura 4).

Estos grupos están conformados por diferente cantidad de casos (N) lo que permitió describirlos en cuanto a la proporción de micronúcleos (MN) y asociarlos a los factores: tratamiento (ppm) y tiempo (t) (Tabla 5). El primer grupo es el más grande (455 casos) de los cuales el 97.1% no tuvo micronúcleos, 2.68% tiene un solo micronúcleo y menos del 1% tiene más de dos micronúcleos. El segundo grupo (121 casos), presenta un 85.65% de células sin micronúcleos, 12.54 % con al menos un micronúcleo y casi un 2% con más de dos micronúcleos, El grupo tres (17 casos) presenta un 65.15% de células sin micronúcleos, 28.35% con al menos un micronúcleo, 4.29 % con dos micronúcleos y hasta un 2.2% con más de tres micronúcleos (Tabla 5, Figura 5a, b y c).

Tabla 4: Valores de F y p, calculados mediante el AFDG (con 4 y 586 grados de libertad). Se aprecian las comparaciones pareadas entre tratamientos, incluyendo al control (0.000 ppm).

	<b>0.028 ppm</b>	<b>P</b>	<b>0.056 ppm</b>	<b>p</b>	<b>0.112 ppm</b>	<b>p</b>	<b>0.000 ppm</b>	<b>p</b>
<b>0.028 ppm</b>			8.34165	0.000002	2.91840	0.020777	14.95739	0.000000
<b>0.056 ppm</b>	8.34165	0.000002			2.31697	0.056036	29.39939	0.000000
<b>0.112 ppm</b>	2.91840	0.020777	0.230583	0.056036			19.33230	0.000000
<b>0 ppm</b>	4.95739	0.000000	29.39939	0.000000	19.33230	0.000000		

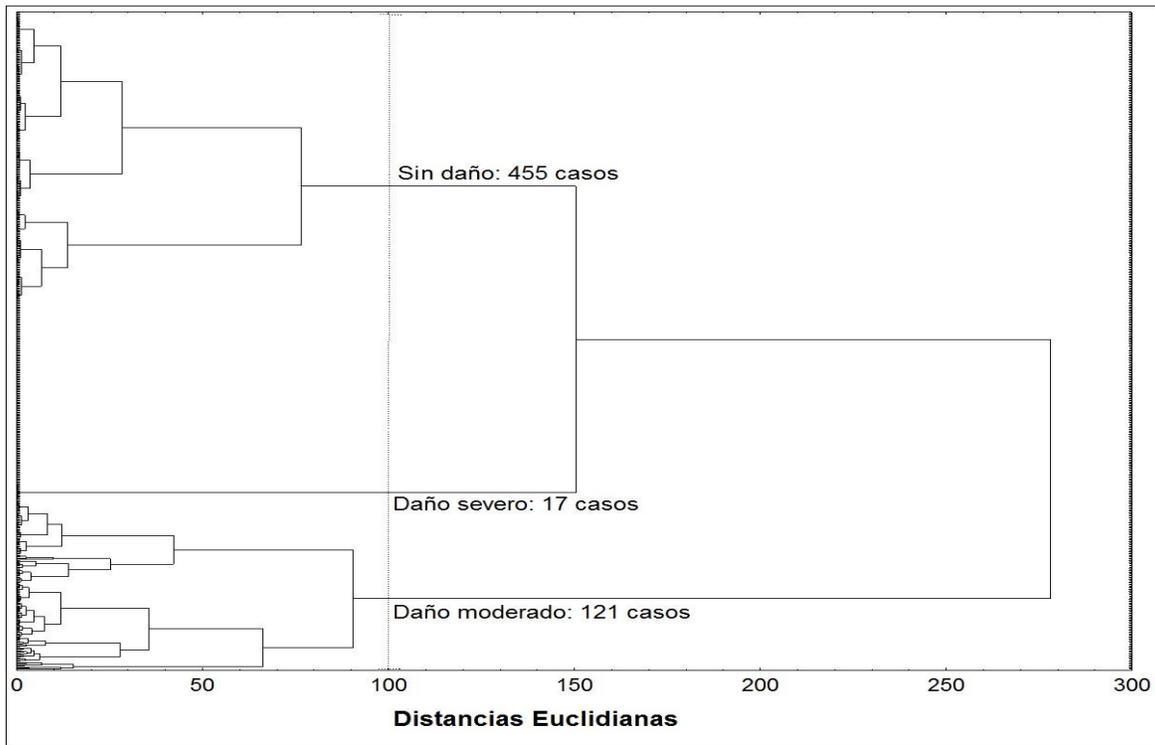


Fig. 4: Análisis de agrupamiento, que conforma tres clústeres: sin daño, daño moderado y daño severo.

Tabla 5: Proporciones promedio de células por campo para los grupos obtenidos por el análisis de agrupamiento.

	MN	ppm	t	N			
<b>Grupo 1: Sin daño</b>	0	97.10	0	9.67	2	55.60	455
	1	2.68	0.028	41.98	4	44.40	
	2	0.20	0.056	25.27			
	>3	0.01	0.112	23.08			
<b>Grupo 2: Daño moderado</b>	0	85.65	0	4.13	2	33.06	121
	1	12.54	0.028	28.93	4	66.94	
	2	1.52	0.056	42.15			
	>3	0.29	0.112	24.79			
<b>Grupo 3: Daño severo</b>	0	65.15	0	0.00	2	23.53	17
	1	28.35	0.028	23.53	4	76.47	
	2	4.29	0.056	35.29			
	>3	2.20	0.112	41.18			

Leyenda: MN: micronúcleos, ppm: concentración de CdSO<sub>4</sub>, t: tiempo, N: cantidad de casos.

El primer grupo tiene células del control y de los tres tratamientos, aunque es preponderante (41.98 %) la dominancia de células tratadas con 0.028 ppm. El segundo grupo tiene preponderancia (42.15%) de células tratadas con 0.056 ppm, el tercer grupo está conformado preponderantemente (41.18%) por células tratadas con 0.112 ppm y no presenta células del control (Figura 5).

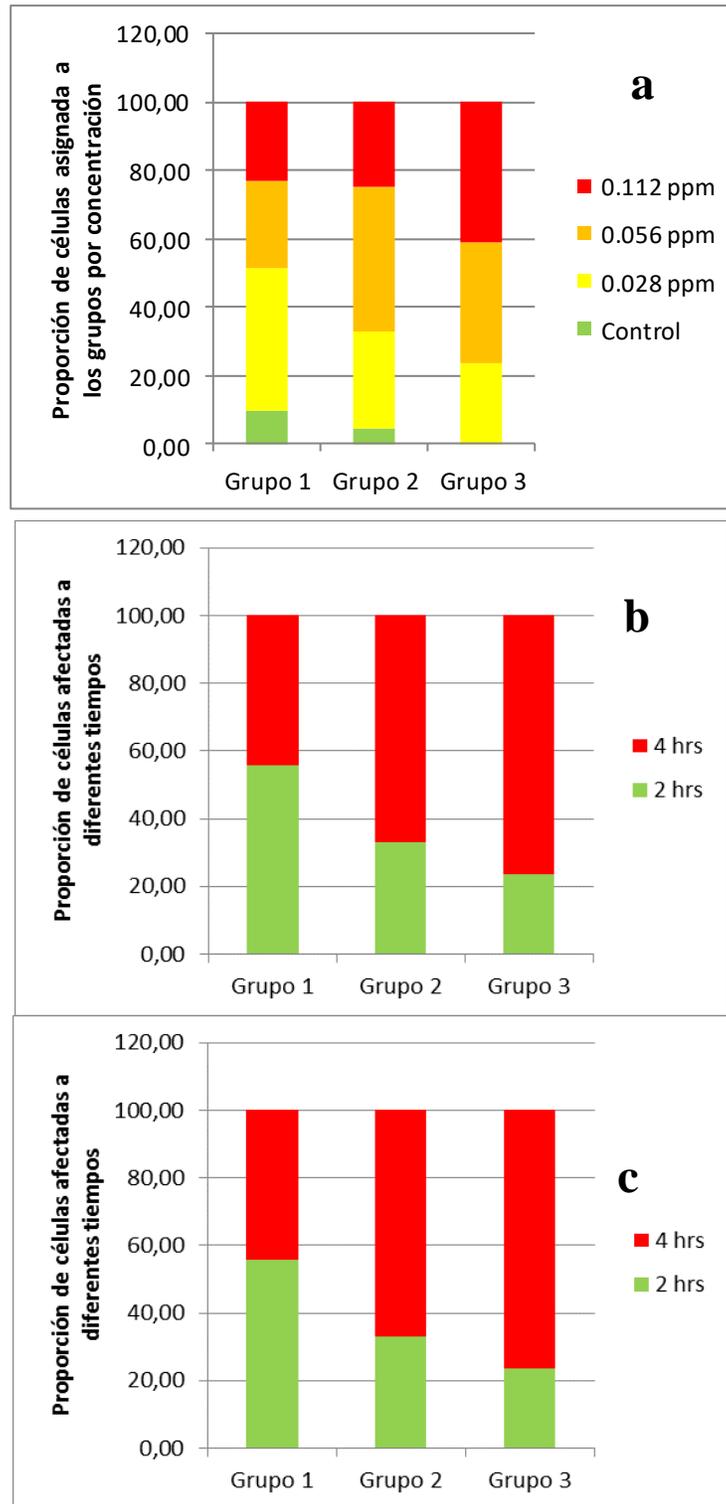


Fig. 5: Proporción de casos por grupo. a) proporción de células con MN por grupo, b) proporción de casos por concentración dentro de cada grupo, c) proporción de casos por tiempo dentro de cada grupo

*Citotoxicidad*

Con las mismas preparaciones realizadas para determinar la genotoxicidad, se evaluó la capacidad citotóxica del Cd<sup>2+</sup> (en forma de CdSO<sub>4</sub>) mediante la determinación del índice mitótico (IM), entendido como el número total de células en división (Valencia-Quintana *et al.*, 2013). Esto para detectar el daño fisiológico que pudiera estar enmascarado (Figura 6 y Tabla 6). Se utilizó la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{nCD}{nCT} \tag{2}$$

En donde: nCD corresponde al número de Células en División y nCT al número de Células Totales.

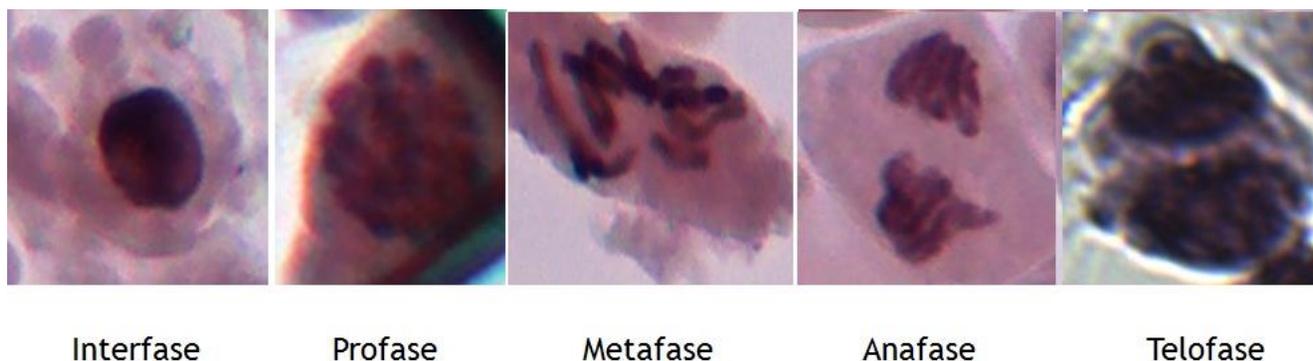


Fig. 6: Etapas mitóticas de la raíz de *Vicia faba* var. mayor.

Tabla 6: Índice mitótico obtenido en tres concentraciones de Cd<sup>2+</sup> en células meristemáticas de *Vicia faba* con 2 y 4 horas de tratamiento.

Tiempo de exposición al metal (horas)	IM (%)			
	Concentración de Cd <sup>2+</sup> (en forma de CdSO <sub>4</sub> )			
	0.000	0.028 ppm	0.056 ppm	0.112 ppm
2	1.9	2.7	1.58	6.92
4	3.5	0.08	3.56	3.74

IM= Índice mitótico.

En la Tabla 6, se observa el aumento del IM después de 2 h de exposición al Cd<sup>2+</sup> aun en la muestra control 0.000 ppm, hasta la concentración 0.056 ppm donde se observa una disminución en el IM. En la concentración de 0.112 ppm, se observa un incremento considerable. A 4 horas de tratamiento, las células se comportaron de una manera similar que a las 2 horas de tratamiento. Datos similares son mencionados por Causil *et al.* (2017), en donde las variaciones en el IM son un criterio aceptable de citotoxicidad para todos los sistemas biológicos. Por ejemplo, los valores en el IM por debajo del testigo negativo pueden indicar que el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos ha sido afectado por el agente evaluado. Una disminución de más del 50% usualmente tiene efectos subletales; sí el IM disminuye a menos del 22% del valor presentado en el testigo negativo, significa que se están provocando efectos letales en los organismos expuestos. Por el contrario, los IM por sobre los valores del testigo negativo, son el resultado de la estimulación de la división celular, lo cual puede caracterizar un evento dañino para las células, que conlleva a una proliferación descontrolada (Serpil & Sevet, 2006; Béraud *et al.*, 2007; Valencia-Quintana *et al.*, 2013; Causil *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

El ensayo de micronúcleos realizado permitió evaluar la capacidad que tiene el Cd<sup>2+</sup> para inducir alteraciones cromosómicas. Los efectos de genotoxicidad en células meristemáticas en raíz de *Vicia faba*, fueron observados, por tanto, presentaron de 1-4 micronúcleos tanto en el control como en la concentración baja (0.028 ppm de Cd<sup>2+</sup>, adicionado en forma de CdSO<sub>4</sub>). Así como en la concentración alta de 0.112ppm de Cd<sup>2+</sup> a 4 horas.

Con respecto al índice mitótico se vio incrementado desde las 2 primeras horas de exposición y el mayor porcentaje se obtuvo en la concentración de 0.112 ppm con 69.2%. Finalmente, y hasta el momento, *V. faba* ha resultado ser buena bioindicadora al ensayo de micronúcleos al cual ha sido expuesta, lo que contribuye de manera favorable al desarrollo de los objetivos propuestos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte de un proyecto de Tesis Doctoral de María Yesenia Sánchez Zepeda. Agradecemos a las instituciones y dependencias a las que pertenecen los autores, asimismo, la estudiante de doctorado Sánchez Zepeda, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el apoyo otorgado y la beca para la realización de la presente investigación.

## REFERENCIAS

- Álvarez-Menéndez, M.D., Mateos-Martín, J., Peinado de Diego, M.V. & Capó-Martí, M.A. (2006). *Vicia Faba* L.: Capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metilmercurio. *Observatorio Medioambiental*, 9, 111-123. file:///C:/Users/Administrador/Documents/Downloads/22574-22593-1-PB%20(1).PDF
- Azpilicueta, C., Pena, L. & Gallego, S. (2010). *Los metales y las plantas: entre la nutrición y la toxicidad*. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. 20:12-17 URL: [www.ag.ndsu.edu](http://www.ag.ndsu.edu), NDSU Agriculture Communication, R.J. Goos / Rich Mattern. (Consulta: 25 Abril 2016).
- Bello, J. & López de Cerain, A. (2001). *Fundamentos de la ciencia Toxicológica*. Díaz de Santos. pp. 148-149.
- Béraud, E., Cotellet, S., Leroy, P. & Féraud, J.F. (2007). Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research*, 633, 112–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.05.013>.
- Causil, V.L.A., Coronado, G.J.L., Verbel, M.L.F., Vega, J.M.F., Donado, E.K.A. & Pacheco, G.C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11 (1), 97-104. Doi: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>
- Conde, A.A., Herrera, E. & Fernández, R. (2015). Hortalizas y pescados. ¿Alimentos seguros? *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 1 (2), 1-16. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57936208.pdf>
- Corchado, R.J. (2015). *Biomonitoreo citogenético de trabajadores del CBQ mediante el ensayo de micronúcleos*. Tesis de diploma. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas Facultad de Ciencias Agropecuarias Departamento de Biología. Santa clara. Villa Clara, Cuba.
- Díaz-Páez, H. & Ortiz, J.C. (2003). Evaluación del estado de conservación de los anfibios en Chile Assessment of the conservation status of amphibians in Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76, 509-525. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnat/v76n3/art14.pdf>
- Espinoza F. (2016). El ensayo de micronúcleos en células uroteliales como indicador diagnóstico de riesgo genotóxico. Tesis Doctoral. Facultad de Bioceincias. Universidad de Barcelona. Disponible en: [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl\\_10803\\_400756/fes1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl_10803_400756/fes1de1.pdf)
- [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/)

Galvao, L.A.C. & Corey, G. (1987). *Serie vigilancia 4. Cadmio*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Metepec, México.

García, G.E., García, E., Juárez, L.F., Juárez, L., Montiel, J.M.R. & Gómez, M.A. (2012). La respuesta de haba (*Vicia faba* L.) cultivada en un suelo contaminado con diferentes concentraciones de cadmio. *Rev. Inter. Cont. Ambien.*, 28 (2), 119-126. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v28n2/v28n2a2.pdf>.

Gaytán, J.C. (1993). *Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina C (MMC) por las vitaminas A y C en células meristemáticas de ala de Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 80 p. [https://www.uaeh.edu.mx/nuestro\\_alumnado/icbi/doctorado/documentos/Evaluacion%20ecotoxicologica.pdf](https://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icbi/doctorado/documentos/Evaluacion%20ecotoxicologica.pdf) (Consultado 11 de diciembre 2017).

Gaytán, J.C. (2006). *Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera*. Tesis de Doctorado en Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 85 p. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/66/Evaluacion%20ecotoxicologica.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Consultado 11 de diciembre 2017)

Gómez-Arroyo, S. & Villalobos-Pietrini, R. (1983). Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia*, 48, 185-195.

González, I.G. (2015). *Fitoextracción de metales pesados de un suelo agrícola por Ricinus communis: el efecto de sustancias húmicas*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 120 p.

González-Salazar, I.G., López-Herrera, M., Monks, S. & Pulido-Flores, G. (2015). *Presencia de metales pesados en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México*. Estudios en Biodiversidad. Página en red: <http://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/13/>; (consultada: 10 diciembre del 2015).

Jiménez, B., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo, M L. & Rivas, A. (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Research International*, 54, 1860–1867.

Kucharski, R., Sas-Nowosielska, A., Malkowski, E., Japenega, J., Kuperberg, J.M., Pogrzeba, M., *et al.* (2005). The use of indigenes plant species and calcium phosphate for stabilization of high metal polluted sites in southern Poland. *Plant Soil*, 273, 291-305. DOI 10.1007/s11104-004-8068-6.

López-Herrera, M., Romero-Bautista, L., Ayala-Sánchez, N., Soria-Mercado, I.E. & Portillo-López, A. (2015). Estudios en Biodiversidad. University of Nebraska - Lincoln Página en red: <http://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/12/> (consultado: 10 diciembre 2016).

Lorenzo, G.S. (2015). La Problemática de los Suelos en España. *Revista CT*, 7, 179-191. (Disponible en file:///C:/Users/Administrador/Documents/Downloads/Dialnet-LaProblematicaDeLosSuelosEnEspana-5256742. pdf

Marcano, L., Carruyo, I. & Montiel, X. (2001). Cytological alterations induce by cadmium on meristemic cells of onion roots (*Allium cepa* L). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 18, 247-257. <http://revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre-diciembre2001/ra4016.pdf>

Matheus, T. & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18 (2), 18-26. <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v18n2/art05.pdf>

Méndez-Armenta, M. & Ríos, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 23 (3), 350-8.

- Murtagh, F. & Legendre, P. (2014). Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *Journal of Classification*, 31, 274-295. <https://doi.org/10.1007/s0035>
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M. & Rojas del Castillo, E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambiental*, 29 (1), 117-140. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n1/v29n1a8.pdf>
- Nadgórska-Socha, A., Kafel, A., Kandziora-Ciupa, M., Gospodarek, J. & Zawisza-Raszka, A. (2013). Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 1124–1134. DOI 10.1007/s11356-012-1191-7
- Nava-Ruíz, C. & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)*, 16 (3), 140-147. <http://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2011/ane113f.pdf>
- Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996). Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales, Diario Oficial, 23 de abril de 2003, Distrito Federal, México. (consulta: 02 marzo 2016).
- Pavanello, S. & Clonfero, E. (2000) Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.*, 463, 285–308. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018745>
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R. & Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33 (2), 112-119. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33933205.pdf>
- Prieto, F., Lechuga, M.A., Méndez, M.A, Barrado, E. & Gaitán, J.C. (2005). Daños tóxicos en tejidos vegetales sensibles producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapan, Hidalgo, México. *Bioagro*, 17 (3), 137-141. <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28855.pdf>
- Probst, A., Liu, H., Fanjul, M., Liao, B. & Hollande, E. (2009). Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environ. Exper. Bot.*, 66, 297-308. DOI: 10.1016/j.enxvexbot.2009.02.003
- Ramírez, A.V. (2006). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67 (1), 49-58. <file:///C:/Users/Administrador/Documents/Downloads/1294-4519-1-PB.pdf>
- Rodríguez, C.J. (2011). *Respuesta radicular a la deficiencia de Fe y la toxicidad por cadmio*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Repositorio de la Universidad de Zaragoza-Zaguan <http://zaguan.unizar.es>
- Sakai, S-i., Hirai, Y., Aizawa, H., Ota, S. & Muroishi, Y. (2006). Emission inventory of deca-brominated diphenyl ether (DBDE) in Japan. *J. Mater. Cycles Waste Manage.*, 8, 56–62.
- Serpil, S. & Servet, G.S. (2006). *Physical Properties of Foods*. Ed. Dennis R. Heldman, Heldman Associates, San Marcos, California. ISBN-13: 978-0387-30780-0 United States
- Timbrell, J.A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129, 1–12.
- Tirado, L.R., González-Martínez, F.D., Martínez, L.J., Wilches, L.A. & Celedón-Suárez, J.N. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Rev. Nac. Odontol.*, 21, 83-99. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/od.v11i21.895>.

Ünyayar, S., Çelik, A., Çekiç, F.Ö. & Gözel, A. (2006). Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21 (1), 77–81, <https://doi.org/10.1093/mutage/gel001>

Uriel, E. & Manzano, A.J. (2005). *Análisis Multivariante Aplicado*. Thomson. Madrid. ES. 531 p. ISBN: 84-9732-372-6 [dspace.ucbscz.edu.bo](http://dspace.ucbscz.edu.bo).

Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Waliszewski S.M., Fernández S., *et al.* (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Rev. Int. Contam. Amb.* 29 (Número especial sobre plaguicidas), 133- 157. <http://www.redalyc.org/html/370/37028958008/index.html>

Younging, H., Wang, D., Wei, L., Zhang, X. & Song, B. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in plant leaves from Yan'an city of the Loess Plateau, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 82–88. DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.08.021

Zalacain, M., Sierrasesúмага, L. & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sist. Sanit. Navar*, 28 (2), 227-236. <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v28n2/revision2.pdf>