



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la genotoxicidad del arsénico, níquel y
cadmio en la raíz de *Vicia faba* empleando la
electroforesis unicelular y los marcadores moleculares
para Caspasa-3 y ERK.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

SANTIAGO SALAS FADUL

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. JOSEFINA CORTÉS ESLAVA

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	6
1. Metales Pesados	6
2. Toxicidad de los metales pesados	7
3. Daños a la salud por metales	8
4. El Cd	9
4.1 Fuentes y usos del cadmio	9
4.2 Paso del cadmio a la cadena trófica	11
4.3 Toxicidad del cadmio	12
5. El As	14
5.1 Fuentes y usos del arsénico	15
5.2 Paso del arsenico a la cadena trofica	16
5.3 Toxicidad del arsenic	16
6. El Ni	18
6.1 El papel del níquel en las plantas	18
6.2 Toxicidad del níquel	19
7. Los vegetales como sistemas biológicos de prueba	20
8. La electroforesis unicelular	21
8.1 Fundamentos de la técnica	22
8.2 Detección de daño al ADN	24
8.3 Reparación del AND	25
8.4 Análisis de resultados	25
9. Muerte celular programada y apoptosis	26
10. Actividad tipo Caspasa-3 en plantas	28
11. Proteínas ERK	29
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
VII. RESULTADOS	36
VIII. DISCUSIÓN	39
IX. CONCLUSIONES	43
X. REFERENCIAS	45
XI. CUADROS	53
XII. FIGURAS	56
XIII. ANEXO	77

RESUMEN

En los últimos años, los metales pesados se han convertido en un tema de importancia a nivel mundial tanto por los daños que ocasionan a la salud humana y al ambiente, como por su uso desmedido en la industria. Veintitrés de los treinta y cinco metales que preocupan a las sociedades modernas se incluyen en la categoría de metales pesados. Estos en general llevan a cabo un papel biológico en algunos organismos, sin embargo, dependiendo del elemento, una concentración que rebase la normal resulta en daños a la salud a diferentes niveles fisiológicos. Además de esto, se ha encontrado que estos metales son bioacumulados en la cadena trófica, aumentando su concentración en cada nivel, hasta llegar a ser consumidos por los seres humanos.

En este trabajo se evaluó el daño sobre el ADN de células vegetales producido por metales pesados, particularmente el arsénico, el níquel y el cadmio. Estos tres elementos son componentes de muchos agroquímicos, que son utilizados en países en desarrollo como México de forma indiscriminada, sobrepasando sus concentraciones seguras en el suelo y el agua.

Los resultados que se obtuvieron demuestran que tanto el arsénico, como el níquel y el cadmio ocasionaron daño al ADN, evaluado mediante la electroforesis unicelular; así como sobreexpresión de proteínas asociadas a eventos de muerte celular programada y subexpresión de proteínas asociadas a la salud y al desarrollo celular; así como daño físico en las células de la raíz de *Vicia faba*, analizado mediante técnicas de inmunocitoquímica.

ABSTRACT

Over the past years, heavy metals have consistently been gaining attention around the world, both for the human health issues related to them and the environmental pollution concerns, as well as for their excessive industrial use. Twenty three out of the thirty five metals that concern modern societies fall under the category of heavy metals. In general, heavy metals develop a function within certain organisms, nevertheless, depending on the element, concentrations above normal result in health damages to the organism at different physiological levels. Furthermore, it has been found that these metals accumulate somewhat in the trophic chain, increasing their concentration at every level until it is consumed by humans.

In this work, the damage heavy metals induce on the DNA of plant cells is assessed, particularly the ones created by arsenic, cadmium and nickel. These three elements are components of different agrochemicals utilized indiscriminately in developing countries such as Mexico, surpassing the concentrations considered safe in soil and water.

The results obtained from this study show that all arsenic, cadmium and nickel have genotoxic effects on the DNA of plant root tips, as evaluated by the comet assay. They also show the overexpression of proteins associated with programmed cell death (PCD) events, as well as underexpression of proteins associated with cell health and development. Physical damage was also evident, as revealed by immunocytochemical assays.

I. INTRODUCCIÓN

La preocupación por evaluar el daño ocasionado por los metales pesados se ha ido incrementando gracias a la capacidad de las técnicas analíticas de detectarlos en concentraciones muy pequeñas, lo cual ha hecho que los investigadores puedan determinarlos y seguir sus efectos en seres humanos, animales y plantas. Con los niveles de metales pesados incrementándose a nivel mundial debido a actividades humanas y naturales, diferentes ecosistemas están siendo contaminados con ellos. Actividades tales como la disposición controlada y no controlada de residuos, derrames accidentales, uso de fertilizantes y plaguicidas contribuyen a dicha contaminación. La utilización de plaguicidas en el tratamiento de vegetales aumenta la concentración de diversos metales pesados (CHIROMA 2007), lo que provoca cambios fisiológicos en ellos, con impacto en la salud humana. Los agentes genotóxicos son un tema de salud pública no sólo por las alteraciones genéticas que provocan en el organismo, sino por el hecho de que estas alteraciones pueden ser heredables, alterando así generaciones posteriores (Leme y Marin-Morales 2009).

Según la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos de América, un plaguicida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga (EPA 2011). Asimismo, la EPA advierte sobre los posibles daños a la salud que pueden tener los plaguicidas o algunos de sus componentes. Dependiendo de su composición, los plaguicidas pueden afectar el sistema nervioso, irritar la piel, los ojos y los sistemas respiratorio y reproductor, inclusive pueden afectar los sistemas endócrino e inmunológico.

Algunos actúan como mutagénicos y carcinógenos (Martínez-Valenzuela, et al. 2009).

II. ANTECEDENTES

II. 1 METALES PESADOS

El término metales pesados se refiere a los elementos de transición y post-transición incluyendo metaloides como el arsénico y el selenio. Tienen una densidad mayor a cinco y superior que metales ligeros. Presentan un estado de oxidación diferente en agua, aire y suelo (INE 2011).

Es una expresión que no posee una definición estricta, ya que cuenta con muchas acepciones. Los elementos que se agrupan en la definición son componentes principales de la corteza terrestre. Asimismo, la definición comprende un gran grupo de elementos con diferentes propiedades químicas y diversos niveles de toxicidad. Mientras algunos son considerados tóxicos a cualquier concentración, otros lo son únicamente en altas concentraciones y algunos tienen poca actividad en los seres vivos, positiva o negativa (Sherameti 2009).

Actualmente, un metal es considerado un nutriente esencial en vegetales cuando la planta no es capaz de completar su ciclo de vida en ausencia de él y éste no puede ser substituido por ningún otro nutrimento (Eskew et al. 1983).

II. 2 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS

Según el grado en que una sustancia provoca daños en un organismo, se le agrupa en una clasificación de toxicidad.

En general, se considera que la toxicidad es aguda cuando se tiene la reacción consecuente de una exposición única y masiva a un veneno, mientras que la toxicidad crónica se refiere a una exposición a largo plazo a niveles “bajos” donde no se apreciarían síntomas por una exposición única. La toxicidad crónica es el resultado de la exposición a agentes químicos que poseen una de las dos propiedades siguientes: se acumulan en el material biológico o inducen daño acumulado irreversible, por lo que el efecto sobrepasa el tiempo que permanece el agente en el cuerpo. Los carcinógenos son un claro ejemplo de venenos que producen una alteración que se manifiesta mucho tiempo después de la exposición (Fauci 2008).

Se ha acuñado una tercera categoría de toxicidad, denominada subcrónica. Los agentes químicos dentro de esta definición provocan efectos adversos después de exposiciones repetidas, o una exposición por un período significativo de tiempo con respecto a la duración de vida del organismo (usualmente no más de 10 %) (University 2011).

La forma química en la que se encuentre el metal puede implicar grandes consecuencias en la potencia que éste tenga como veneno. Se pueden encontrar de forma elemental, sales o compuestos orgánicos, y aunque tengan esta versatilidad química, en el ambiente persiste mayormente alguna de ellas (Das y Karthika 2008).

Los metales pesados tienen la característica de poder ser acumulados en la cadena trófica. Cuando organismos “inferiores” que los consumen no

son capaces de metabolizarlos o excretarlos y son ingeridos por el siguiente nivel de la cadena, los metales se concentran en ese otro nivel y así sucesivamente hasta que el tope de la cadena alimenticia termina por ser el que contiene la mayor concentración (Prince et al. 2002).

II. 3 DAÑOS A LA SALUD POR METALES

La contaminación por metales puede causar diversos efectos en la salud dependiendo del elemento que se considere. Los de mayor preocupación en México son mercurio, el plomo y el cadmio debido a su alta toxicidad y disponibilidad para la población (INE 2011). Además, otros treinta y dos metales se consideran riesgosos por la posible exposición ocupacional o residencial, de los cuales trece son definidos como metales pesados: antimonio, arsénico, bismuto, cerio, cromo, cobalto, cobre, galio, oro, hierro, manganeso, níquel, platino, plata, telurio, talio, estaño, uranio, vanadio y zinc (Glanze 1996).

Aunque varios de estos elementos son comunes en el ambiente y en la dieta humana, siendo algunos incluso necesarios para una buena salud, cantidades grandes de ellos pueden causar daño. Las consecuencias de la toxicidad por estos metales en la salud humana son reducción y alteraciones en las funciones mentales y del sistema nervioso central, bajos niveles de energía y daño en la composición de la sangre, en pulmón, hígado, riñón y otros órganos vitales. La exposición por períodos prolongados puede resultar en procesos lentos y degenerativos de tipo físico, muscular y neurológico, con resultados comparables a enfermedades como Alzheimer, Parkinson, distrofia muscular y esclerosis múltiple. Las alergias no son poco comunes y

exposiciones repetidas y/o largas a algunos de estos elementos pueden causar cáncer (International Labour Organization 1999).

II. 4 EL Cd

Fue descubierto en 1817 por Friedrich Strohmeyer. Es un metal suave y plateado, inodoro e insípido. Su número y masa atómicos son 48 y 112.411, respectivamente. En la tabla periódica pertenece al grupo IIB y presenta un estado de oxidación de tipo II (Sarkar 2002). Su elevada masa atómica, su capacidad de dañar células y su tendencia a acumularse en la cadena alimenticia, han hecho que se incluya entre los metales pesados (Duffus 2002).

El cadmio es uno de los metales pesados que atrae mayor atención por su potencial tóxico para el hombre ya que se acumula en el suelo, pasa a plantas y animales y finalmente a seres humanos. Pertenece al grupo I según las Monografías IARC, dándole la calidad de carcinógeno en seres humanos (IARC 2010).

II. 4.1 FUENTES Y USOS DEL CADMIO

Es un elemento escaso, con una distribución media de 0.1 mg/kg en la corteza terrestre. Muchos de sus compuestos inorgánicos son solubles en agua, por ejemplo cloruros, sulfatos y acetatos, mientras que los óxidos y sulfidrilos son considerados insolubles en agua (Wagner y Donald 1993).

La exposición a bajas concentraciones de cadmio se debe a un proceso natural, así como a actividades humanas como la minería, la quema de combustibles fósiles y los usos industriales. Es particularmente importante

en la producción de pinturas, de pilas Ni-Cd y de reveladores en la industria fotográfica. Es utilizado como recubrimiento protector de acero, hierro y cobre, entre otros (Pinto et al. 2004).

Las industrias que han presentado mayor riesgo, por la presencia de cadmio, según su rama o tipo, son las siguientes: baterías y acumuladores, cables eléctricos, células fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes de cadmio, producción de metales ferrosos y no ferrosos y de zinc, producción y uso de fertilizantes fosfatados, equipos para ruedas, equipos nucleares, fusibles, joyería, laminados a vapor, soldadura, tapones de extinguidores (Hutton 1983).

En el ambiente, el cadmio se encuentra en el aire debido al incremento de desechos domésticos, a su emisión industrial y a la producción de energía a través de la quema de combustibles fósiles. Las partículas de cadmio pueden ser transportadas por el aire a grandes distancias, por lo que suelos y cuerpos de agua pueden ser contaminados aún estando alejados de la fuente (Sarkar 2002).

México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en cuanto a la extracción de cadmio, representando el 7.48 % de la extracción mundial (Economía 2008).

El uso de fertilizantes, especialmente los fosfatados que contienen hasta 300 mg/kg de cadmio (Fergusson 1990) son la principal fuente de contaminación por Cd en suelos agrícolas, su remoción es considerada cara, por lo que no se realiza. El hecho de que este metal se pueda incorporar a la cadena trófica, ha provocado que se determinen límites entre 35 y 450 mg/kg de cadmio (Mortvedt 1996).

II. 4.2 PASO DEL CADMIO A LA CADENA TRÓFICA

Se puede encontrar este metal disuelto en el suelo, absorbido en superficies orgánicas e inorgánicas, dentro de minerales, precipitado con otros compuestos del suelo o incorporado a estructuras biológicas. Las plantas absorben el cadmio por la raíz, y existen diferentes parámetros que son decisivos en su absorción: su concentración, pH, contenido de arcillas, el potencial redox, contenido de materia orgánica, temperatura, cantidad de agua y otros ligandos. Existe un riesgo mayor de acumulación inclusive con concentraciones bajas de cadmio cuando hay un pH menor a 6.5. Se ha encontrado que la acidificación de suelos y sedimentos que contienen cadmio, incrementa la concentración del metal en cuerpos de agua superficiales y en las cosechas (World Health Organization 1997). Asimismo, la capacidad de absorción de cadmio disminuye considerablemente a pH básico (Jensen y Bro-Rasmussen 1992).

Existen diferencias considerables en cuanto a la tendencia acumuladora de diferentes plantas. Debido a esto, serán de importancia para el paso a la cadena trófica aquellas que acumulen cantidades de Cd tóxicas para seres humanos y animales, pero no fitotóxicas (Prince et al. 2002).

El cuadro 1 presenta una lista de vegetales con su respectiva tendencia acumuladora.

El cadmio se acumula diferencialmente dentro de la misma planta, en sus distintos órganos: raíz > tubérculos > hojas > brotes > frutas > semillas.

En los seres humanos, los alimentos representan la fuente de exposición más importante para los individuos de la población general no expuestos ocupacionalmente. Las determinaciones hechas en algunos

países, demostraron que la ingesta de cadmio puede ser de 10 a 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ para una persona de 70 Kkg, en algunas partes se han encontrado casos con ingestión de hasta 150 $\mu\text{g}/\text{día}$. Entre 90 y el 95 % del cadmio que ingresa al organismo es eliminado por las heces, logrando que su ingestión sea significativa únicamente cuando existe un alto índice de contaminación ambiental, ya que repercute en los niveles del elemento en los alimentos (Galvão 1987).

II. 4.3 TOXICIDAD DEL CADMIO

La principal forma de exposición ocupacional al cadmio, ocurre a través de partículas aéreas y gases. Los trabajos que tienen el mayor potencial de ocasionar daño son la producción y el refinamiento del cadmio, la elaboración de baterías de Ni-Cd y otras líneas en que el metal es parte central del proceso. Aunque las exposiciones ocupacionales al elemento se han reducido de manera general en las últimas dos décadas y que sus niveles en orina y sangre de la gente no fumadora que está expuesta a él de manera ocupacional es generalmente menor, las fuentes más importantes de contacto para la población en general son el humo del cigarro y la ingesta de alimentos contaminados (World Health Organization 1997).

En los seres humanos, respirar cadmio en grandes cantidades daña los pulmones de forma irreversible y puede causar la muerte. El ingerirlo en concentraciones altas en agua o alimentos, irrita el estómago y causa vómito y diarrea. Se acumula en los riñones, pudiendo causar nefrotoxicidad, daño renal severo, formación de piedras, enfermedades óseas como osteomalacia y osteoporosis, así como proteinuria persistente. El cadmio tiene una vida

media en el cuerpo humano considerada grande. En sangre es de dos meses y medio, por lo que es un buen indicador de exposición reciente, mientras que en orina se refleja la acumulación a largo plazo (Laboratory 2011).

El cadmio y sus compuestos son carcinógenos humanos. Se ha llegado a esta conclusión a partir de numerosos estudios, como los revisados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), en los que se ha encontrado relación entre la exposición al cadmio y sus compuestos y el cáncer de pulmón (World Health Organization 1997). A estos compuestos se les ha asociado con cáncer de próstata, de riñón y de vejiga, sin embargo, algunos estudios han demostrado inconsistencias en los resultados (Siemiatycki et al. 1994, Mandel et al. 1995, van der Gulden et al. 1995), por lo que la IARC lo consideró suficiente evidencia para cáncer de pulmón y limitada para cáncer de próstata y de vejiga (Straif, et al. 2009).

En algunos experimentos con animales, los compuestos del cadmio provocaron cáncer de pulmón de manera directamente proporcional a las concentraciones utilizadas. Se observó la misma tendencia en ratas suministradas con cadmio en forma oral, provocando leucemia y tumores testiculares. En estudios con inyecciones de cadmio en diferentes partes del cuerpo de los animales, se provocaron tumores prostáticos, testiculares, linfomas, así como tumores en pulmones, hígado y glándula adrenal (Waalkes y Rehm 1994, World Health Organization 1997).

Diferentes estudios en cultivos celulares han demostrado que compuestos de cadmio provocan daños al material genético, rompimientos en el ADN, mutaciones, daño cromosómico, transformación celular y daño en los mecanismos de reparación del ADN (World Health Organization 1997). Se ha

visto también que diversos compuestos de cadmio inducen efectos clastogénicos y aneugénicos en linfocitos periféricos (Palus et al. 2003).

La Agencia para la Protección al Ambiente (EPA 2011) de los Estados Unidos de América no permite el cadmio en los pesticidas y la Administración de Alimentos y Medicamentos (USFDA 2011) limita la cantidad de cadmio en colorantes comestibles a 15 ppm.

II. 5 EL As

Puro es un metaloide cristalino, con características intermedias entre un elemento metálico y uno no metálico. Es capaz de combinarse con otras sustancias, tanto metálicas como no metálicas, así como formar compuestos orgánicos estables (Friis 2007).

Es representativo del grupo V de la tabla periódica de los elementos, compartiendo características con el nitrógeno, el fósforo, el antimonio y el bismuto. Su número atómico es 33 y su masa molecular de 74.91.

El arsénico se encuentra en pequeñas cantidades en toda la corteza terrestre, en un promedio de 2 ppm, bajo la forma del mineral y principalmente como impureza de otros minerales. Según sea su valencia (trivalente o pentavalente) o sus combinaciones, presenta mayor o menor riesgo para los seres vivos. En la naturaleza se encuentra más comúnmente en su forma pentavalente, la cual es relativamente poco tóxica. El arsénico de origen industrial se da normalmente en su forma trivalente, que es mucho más tóxica para el ser humano. La combinación del arsénico con otros compuestos químicos, altera su toxicidad y biodisponibilidad. Es importante mencionar que este elemento se encuentra en diferentes formas químicas,

tanto orgánicas como inorgánicas y que éstas tienen diversos niveles de toxicidad y vida media en los distintos ambientes en que se encuentran (Hurtado-Jiménez 2006, Fang-Jie et al. 2010). En general, se considera que las formas inorgánicas del arsénico, predominantes en los mantos acuíferos, son más peligrosas que las orgánicas (ATSDR 2005).

El As está bien reconocido como un elemento de preocupación pública. La principal vía de entrada al cuerpo humano es la ingesta, aunque la inhalación puede ser bastante importante también cuando se habla de exposiciones ocupacionales. En contraste con otros elementos con potencial tóxico, el arsénico es tóxico tanto en regiones enriquecidas de manera natural como en las zonas contaminadas por actividades industriales (Buat-Ménard 1987).

En México, existe una zona de aproximadamente 32,000 km² con niveles naturalmente elevados de arsénico en mantos acuíferos. La población potencialmente expuesta es de 400,000 personas. La concentración de arsénico es de 8 a 620 µg/L y las causas principales son los sedimentos volcánicos de la zona, así como un pH oxidante (Smedley y Kinniburgh 2002). Las zonas donde se han reportado los mayores niveles de arsénico en mantos acuíferos han sido reportados son: La Comarca Lagunera (7 a 740 µg/L), Valle del Guadiana (5 a 167 µg/L), Valle de Zimapán (14 a 1097 µg/L) y Hermosillo (305 µg/L) (Hurtado-Jiménez 2006).

II. 5.1 FUENTES Y USOS DEL ARSÉNICO

La arsenopirita y loellingita son minerales arsénicos que se utilizan para producir arsénico elemental. Tanto el elemental como el trióxido de

arsénico son producidos de manera comercial, siendo este último la materia prima para la elaboración de numerosos compuestos arsenicales. El arsénico elemental es utilizado para hacer aleaciones con plomo y cobre.

Los compuestos de arsénico tienen diferentes usos industriales, incluyendo: aplicaciones en catalizadores, bactericidas, herbicidas, fungicidas, conservadores en comida animal, inhibidores de corrosión, fármacos y medicamentos de uso veterinario, agentes bronceadores y preservadores para madera, entre otros.

Los medicamentos que contenían arsénico fueron los primeros en ser efectivos contra la sífilis y son utilizados aún en contra de la disentería y el arsobal, un organoarsénico que es el medicamento más efectivo para tratar la tripanosomiasis africana (Manahan 2003).

II. 5.2 PASO DEL ARSÉNICO A LA CADENA TRÓFICA

Se ha propuesto que debido a la llamada barrera suelo/planta, las concentraciones elevadas de arsénico en los suelos reduciría la producción sustancialmente antes de que ocurriera una acumulación en la cadena trófica (Chaney 1984).

II. 5.3 TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

El arsénico se considera un veneno humano desde el S. IV y dosis de más de 60,000 ppb causan la muerte. Exposiciones crónicas a altos niveles de arsénico (300 a 30,000 ppb en agua) provocan gran variedad de problemas en la salud humana como irritación del estómago e intestinos, dolor de estómago, náusea, vómito y diarrea. El síntoma más característico

de una exposición a largo plazo es un patrón de cambios en la piel que incluyen parches de piel oscura, formación de verrugas en las palmas, plantas y torso, asociadas a cambios en las venas de la piel. Se puede desarrollar cáncer de piel y se ha observado que aumenta el riesgo de padecer cáncer de hígado, vejiga y pulmón. El respirar altos niveles de arsénico inorgánico produce irritación en vías aéreas, así como el desarrollo de los síntomas antes mencionados. Exposiciones largas llevan a los efectos cutáneos característicos e induce enfermedades de los sistemas circulatorio y nervioso. No hay indicios de que el contacto directo con la piel provoque síntomas más allá de irritación e inflamación de la zona en contacto (ATSDR 2007).

Estudios de genotoxicidad en humanos muestran una incidencia por arriba de lo normal de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos después de una exposición inhalada así como oral (Beckman 1977, Nordenson 1978). En sistemas vegetales, la incidencia de intercambio de cromátidas hermanas aumenta de una manera dosis-dependiente cuando son expuestos a concentraciones de arsénico en agua por arriba de los niveles permisibles (Gómez-Arroyo et al. 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye en su reporte de "Criterios para la Salud Ambiental 224: Arsénico y Compuestos del Arsénico" diversos estudios donde se concluye en experimentos *in vivo* e *in vitro* que el arsénico y sus compuestos tienen efectos genotóxicos, mutagénicos y cancerígenos (World Health Organization 2004). Lo mismo reporta El Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (Council 2001).

II. 6 EL Ni

Es un metal de transición con diversos usos esenciales en aleaciones, catalizadores y otras aplicaciones industriales. Aunque se sospecha que forma parte de los elementos traza esenciales para el hombre, no se ha comprobado dicha cualidad.

El Ni tiene un importante papel toxicológico al ser considerado la causa de cáncer en las vías respiratorias de mineros y trabajadores en las refinerías de níquel. Los primeros estudios epidemiológicos que revelaron su papel como cancerígeno, arrojaron cifras de 150 veces la ocurrencia de cáncer nasal en casos ocupacionales y 5 veces en cáncer de pulmón.

El Ni tiene aún otro papel como agente tóxico, al ser causante de dermatitis por contacto, producida al contacto de la piel con el metal, siendo del 5 al 10 por ciento de la gente susceptible a esta enfermedad.

II. 6. 1 EL PAPEL DEL NÍQUEL EN PLANTAS

El Ni fue establecido como un nutriente esencial en plantas en 1987. Su deficiencia reduce la capacidad de la cebada para producir semillas viables, debido a la obstaculización del crecimiento embrionario, particularmente la raíz embrionaria se desarrolla pobremente o incluso no llega a desarrollarse. Adicionalmente se observó la actividad deshidrogenasa reducida (Brown 1987).

Previamente, en 1970, el Ni había sido demostrado como un constituyente de la ureasa, metaloenzima involucrada en la hidrólisis de la urea (Polacco 1999). Estudios más recientes han demostrado que es

necesaria una cantidad esencial de Ni para la activación de la ureasa (Dixon 1975, Mobley 1995).

La deficiencia de Ni en el medio y la consecuente baja actividad de la ureasa, modifican el metabolismo del nitrógeno y conducen a la acumulación tóxica de urea en los brotes. Fenotípicamente, esto se manifiesta como necrosis en la punta de las hojas y clorosis en hojas viejas (Welch 1981). Ninguno de los metales Al, Cd, Sn, V, Cr y Pb pudo substituir al Ni en su papel fisiológico (Eskew 1984).

En algunas leguminosas, pequeñas cantidades de Ni son esenciales para la formación de nódulos en la raíz y la activación de hidrogenasas. La eficiencia de fijación de nitrógeno depende directamente de la actividad de hidrogenasas, ya que la oxidación del hidrógeno es la que provee el ATP requerido para la reducción del nitrógeno a amoníaco. La deficiencia de Ni reduce la actividad hidrogenasa en los nódulos (Dalton 1985).

II. 6.2 TOXICIDAD DEL NÍQUEL

A diferencia de los demás metales pesados, que no forman parte de enzimas, el Ni es un componente de la ureasa. El contenido de Ni en dicha enzima es de 0.01 a 5 µg/g peso seco.

Adicionalmente a la toxicidad general propia de los metales pesados, el Ni presenta toxicidad específica dadas sus propiedades físicas y químicas, siendo una de ellas su preferencia de unión a nitrógenos aromáticos.

El níquel es un elemento que provoca reacciones alérgicas de 10 a 20 % de la población. La reacción se debe al contacto con la piel y normalmente resulta en un enrojecimiento de la zona, aunque en algunas personas

provoca ataque de asma. Trabajadores de refinerías de níquel o de plantas de procesamiento del metal han desarrollado bronquitis crónica y funcionamiento reducido de pulmones (ATSDR 2005).

En ensayos con bacterias, se ha encontrado que el níquel no provoca lesiones mutagénicas. Sin embargo, sí lo hace en sistemas celulares de mamíferos. En estos últimos, incluyendo células humanas, se han reportado diversos tipos de aberraciones cromosómicas, entrecruzamientos ADN-proteína e intercambio de cromátidas hermanas con preferencia en las regiones centroméricas heterocromáticas (World Health Organization 1991). Iones de níquel han mostrado potenciar los efectos mutagénicos de otros agentes, así como evitar que se repare el ADN (Rossman 1994).

El níquel también ha mostrado ser un cancerígeno, particularmente en los sitios de inyección donde es administrado (IARC 2010). Aunque en los estudios de carcinogénesis por ingesta, la evaluación de los mismos es difícil debido a la alta tasa de mortalidad y a la falta de datos sobre la causa de muerte.

Un estudio importante concluyó que exposiciones a níquel sulfídrico y oxídico a altas concentraciones causa cáncer nasal y de pulmón, sin embargo, no sucede lo mismo con el níquel metálico (ICNCRM 1990).

II. 7 LOS VEGETALES COMO SISTEMAS BIOLÓGICOS DE PRUEBA

Los sistemas de prueba se pueden dividir en dos dependiendo del modelo biológico que se utilice y de las conclusiones finales a las que se quiera llegar en cuanto al daño genético detectado. Bioensayos con procariontes permiten la detección de agentes químicos que produzcan

mutaciones y daños primarios al ADN, mientras que con eucariontes se puede detectar mayor número de efectos, que van desde mutaciones, daño en cromosomas y aneuploidias (Houk 1992).

Las plantas superiores presentan algunas características que las favorecen como modelos genéticos para evaluar contaminantes ambientales, tales como la sensibilidad para detectar mutágenos y la posibilidad de revelar múltiples alteraciones genéticas en diferentes tejidos. Algunos de los modelos de plantas superiores más utilizados son: *Vicia faba*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* y *Hordeum vulgare* (Grant 1994). Los modelos de plantas superiores necesitan de menos recursos y tiempo que los modelos mamíferos (Grant 1981). Los vegetales ofrecen además una ventaja en cuanto al papel que tienen en la cadena trófica, ya que son productores de energía y sirven de alimento a diversos organismos, permitiendo la estimación de su papel en transportar contaminantes hacia niveles tróficos más elevados (Kovalchuk 2008).

Vicia faba ha sido utilizada como modelo experimental en diversas investigaciones y publicaciones para el estudio de agentes químicos en la producción de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, aneuploidías, cometas (daño directo al ADN), peroxidación de lípidos, producción de especies reactivas de oxígeno, metalotioneínas y enzimas con actividad antioxidante (referencias tomadas de Beraud et al. 2007).

II. 8 LA ELECTROFORESIS UNICELULAR

El ensayo cometa, también llamado electroforesis unicelular en gel es un método sencillo y sensible para estudiar el daño y la reparación del

ADN (Singh et al. 1988). En esta técnica, un pequeño número de células suspendidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos son sometidas a lisis, electroforesis y teñidas con algún colorante fluorescente que se une al ADN. Los núcleos con daño aumentado en su ADN muestran mayor migración del mismo durante la electroforesis, dando como resultado una figura en forma de cometa (Fig.1). En su versión alcalina, la cual es la más utilizada, se evidencian rompimientos en la cadena sencilla de ADN, así como sitios sensibles al álcali. A su vez, la magnitud de migración se relaciona con el grado de daño al ADN.

II. 8.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

Las células de interés, embebidas en un gel de agarosa y colocadas sobre un portaobjetos, son lisadas por medio de detergentes y altas concentraciones de sal.

El ADN liberado se somete a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino.

Si existe daño al ADN, se formarán pequeños fragmentos que al ser sometidos a una corriente eléctrica y dada la carga del ADN (+), migrarán hacia el ánodo (-).

Al ser observadas al microscopio, las células tienen la apariencia de cometas con una cabeza en la región nuclear y una cauda que contiene los fragmentos.

La Figura 1 representa las imágenes de ensayo cometa, una célula que no presenta daño (A) y una que presenta daño significativo (B).

El ensayo cometa combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para detectar rompimientos en la cadena de ADN y/o sitios sensibles al álcali con el enfoque unicelular de los ensayos citogenéticos (Collins et al. 1997).

La Figura 2 es el esquema general del ensayo cometa, en particular el ensayo alcalino, sugerido por su versatilidad en la detección de daño al ADN.

Las ventajas del ensayo cometa son:

1. Permite obtener información del daño inducido a células aisladas.
2. No es necesario trabajar con células en proliferación.
3. Fácil aplicación en cualquier tipo celular.
4. Utilización en estudios *in vivo* e *in vitro*.
5. Alta sensibilidad.
6. Se requieren bajas cantidades de células.
7. Relativamente poco tiempo para la obtención de resultados.
8. Bajo costo.

El ensayo cometa ya ha sido utilizado en diversos campos y tiene una amplia aplicación en estudios de genotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*, estudios para evaluar el daño y reparación inducidos por diferentes agentes, biomonitoreo ambiental y monitoreo de poblaciones humanas (Collins et al. 1997).

La versión alcalina (pH>13) del ensayo, introducida por Singh y col., en 1988, detecta un amplio espectro de lesiones en el ADN, tales como rompimientos sencillos, de doble cadena y sitios sensibles al álcali que pueden ser detectados únicamente cuando el desenrollamiento y la

electroforesis son a un $\text{pH} > 13$, debido a que ésto facilita la desnaturalización de dichos sitios, haciéndolos visibles posteriormente (Fairbairn et al. 1995). Versiones modificadas del ensayo introducidas por Olive y col., en 1990, cambian el pH de la preelectroforesis y la electroforesis a neutro y a menos alcalino (12.1) para detectar rompimientos dobles y sencillos, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de los agentes genotóxicos induce principalmente rompimientos sencillos y sitios sensibles al álcali, por lo que la versión alcalina ($\text{pH} > 13$) ha sido la que muestra mayor sensibilidad para detectar el daño y ha sido la recomendada para las evaluaciones de genotoxicidad (Miyamae et al. 1997).

II. 8.2 DETECCIÓN DE DAÑO AL ADN

Existe un amplio espectro de agentes que incrementan la migración de ADN en el ensayo cometa: radiación ionizante, peróxido de hidrógeno y otros agentes químicos formadores de radicales, agentes alquilantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros agentes que inducen aductos, varios metales y luz UV (Collins 2004).

En principio, la versión alcalina ($\text{pH} > 13$) puede detectar cualquier lesión directa capaz de ser traducida a rompimientos sencillos y dobles. Los enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas pueden causar problemas en la prueba, al reducir la habilidad del ADN para migrar en el gel de agarosa al estabilizarlo. Los enlaces cruzados pueden ser detectados ajustando la duración del desenrollamiento y/o electroforesis. Un tratamiento con proteinasa K permite distinguir entre los enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteína (Merk et al. 2000).

Algunas lesiones específicas se pueden detectar utilizando el ensayo cometa en conjunto con endonucleasas lesión-específicas. Estas enzimas son aplicadas directamente a los portaobjetos posteriormente a la lisis, cortan el ADN en sitios de alteración de bases específicos y los resultantes rompimientos sencillos son cuantificados en el ensayo cometa (Tice et al. 2000).

II. 8.3 REPARACIÓN DEL ADN

Para determinar la reparación del ADN, se monitorea la disminución de lesiones después de ser tratados con un agente genotóxico. El ensayo cometa ha sido utilizado para dar seguimiento a la reparación de rompimientos sencillos (Bichler et al. 2007). También se ha hecho uso de enzimas específicas de reparación y extractos celulares, permitiendo la detección de la reparación de tipos específicos de ADN. Además, dada su alta sensibilidad, es posible analizar la reparación a niveles pequeños (fisiológicos). Se usan también inhibidores de reparación o células deficientes en su sistema de reparación.

La combinación del ensayo con la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) permite la visualización de regiones específicas del genoma tanto para daño como para reparación (Santos 1997).

II. 8.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los portaobjetos son analizados mediante alguno de los programas para computadora disponibles. Los programas arrojan datos como el

momento de la cauda, longitud del cometa, longitud de la cauda, % de ADN tanto en cabeza como cauda, entre otros.

Los datos que se utilizan generalmente son el momento de la cauda y el % de ADN en la cauda. El momento de la cauda es igual al valor integrado de la densidad de ADN en la cola multiplicado por la distancia de migración.

La Figura 3 es la imagen de una célula que muestra daño genético con el ensayo cometa y sus principales componentes: cabeza, cauda y momento de la cauda.

II. 9 MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS

La muerte celular programada (MCP) es un programa genético utilizado durante el desarrollo y la respuesta al estrés ambiental o al ataque patogénico, en la que la célula dirige su propia muerte (Korthout et al. 2000; Lockshin y Zakeri 2004).

En las plantas, la MCP interviene en procesos de desarrollo floral, embriogénesis, germinación de semillas, formación de conductos y en la respuesta hipersensible a ataques patogénicos (Beers 1997, Lam 2004).

Existen distintos tipos de muerte celular, y que difieren entre sí por el tipo de proceso de auto destrucción activa que lleven a cabo (Lockshin y Zakeri 2004). La muerte programada Tipo 1, también denominada “apoptosis”, es aquella en la que hay una condensación del citoplasma, pero se preservan los organelos celulares, dándose una desintegración de elementos del citoesqueleto en etapas tempranas. La muerte celular programada Tipo 2, también llamada “autofágica”, incluye la degradación del aparato de golgi, del retículo endoplásmico y de los polirribosomas, lo que

provoca la desintegración del núcleo. En esta actividad, los microfilamentos y los filamentos intermedios se mantienen, presumiblemente porque son necesarios para que la célula asuma la morfología propia de la autofagocitosis (Bursch et al. 2000). Los dos tipos de muerte celular programada pueden darse simultáneamente. Existe una tercera clasificación, denominada “necrosis” o Tipo 3, identificada generalmente como una muerte descontrolada y caótica. Es consecuencia de un estrés celular externo abrumador, donde la célula no es capaz de activar las vías apoptóticas. Durante la necrosis, las células se ensanchan, en lugar de contraerse, característica que se atribuye a la incapacidad de la célula de osmorregularse, permitiendo la entrada de iones y agua hacia el citoplasma (Lennon et al. 1991).

En los dos primeros tipos de MCP, hay una cascada de señalización determinada que provoca los diferentes efectos típicos de cada una de ellas. En el Tipo 1, la muerte celular se lleva a cabo por la activación de enzimas catabólicas, predominantemente proteasas en cascadas de señalización que llevan a la rápida destrucción de organelos característica de la apoptosis, que además de lo descrito anteriormente concluye con una condensación nuclear como efecto de la compactación cromatínica o picnosis, así como la fragmentación nuclear o cariorrhexis (Green 2005) y la división eventual en los denominados “cuerpos apoptóticos” (Adrain y Martin 2001). En mamíferos, el grupo de proteinasas cisteínicas que señalizan la destrucción celular se han denominado caspasas (Wolf 1999) y la activación de éstas puede ser por receptores de muerte extrínsecos o por vías intrínsecas controladas, en parte, por la mitocondria y la excreción de citocromo c, activando así la

formación del apoptosoma el cual es un complejo activador de caspasas en el citoplasma (Adrain y Martin 2001).

En el Tipo 2, la muerte por autofagia, partes del citoplasma y algunos organelos celulares, son secuestrados por vacuolas autofágicas o autofagosomas, para ser expuestas a lisosomas y ser degradadas (Shintani y Klionsky 2004). En la autofagia, se pueden diferenciar dos procesos que llevan a distintos resultados y que se pueden distinguir morfológicamente con un microscopio electrónico. La microautofagia, es el proceso por el cual un lisosoma invagina su membrana, introduciendo componentes del citosol pudiendo incluir organelos adyacentes a la vacuola. En plantas, este mecanismo se ha observado en plántulas y en hojas senescentes (Harrison-Lowe y Olsen 2006).

II. 10 ACTIVIDAD TIPO CASPASA-3 EN PLANTAS

A diferencia de la autofagia, que es un proceso muy conservado dentro de las células eucarióticas, la apoptosis en plantas no se lleva a cabo de la misma forma que en mamíferos, en el sentido de que comúnmente no se forman los cuerpos apoptóticos. Aunque no hay evidencia de que existan caspasas en los genomas de plantas ya secuenciadas, se han descubierto moléculas tipo caspasa, además de que los sustratos de caspasas son rotos durante la muerte celular programada en plantas (Sanmartin et al. 2005). También es importante mencionar que el ADN es cortado y diversos genes involucrados en la apoptosis parecen funcionar en la MCP en plantas (Danon et al. 2000). Considerando las similitudes en la MCP en mamíferos y en plantas, y también sus diferencias, se ha propuesto la utilización del término

muerte celular programada tipo apoptótica MCP-TA (apoptotic-like PCD, AL-PCD) para este tipo distinto de morfología (Danon et al. 2000).

El tiempo en que se lleva a cabo la MCP-TA es mayor que en mamíferos, sin embargo, es de apenas seis horas de comienzo a fin (Burbridge et al. 2006).

Actividades tipo-caspasa han sido detectadas por varios grupos (Chichkova et al. 2004, Danon et al. 2004).

Otra característica de MCP-TA es la degradación del ADN, así como la desnaturalización de la polimerasa poli(ADP-ribosa) ó PARP, involucrada en la reparación del ADN y que además es un sustrato de la actividad de caspasa-3 (Thomas y Franklin-Tong 2004).

II. 11 PROTEINAS ERK

La familia de las proteínas MAP cinasas comprende un conjunto de enzimas que coordinan la señalización extracelular hacia el interior de la célula. Las señales que transmiten son las de expresión génica, mitosis, metabolismo, motilidad, supervivencia y apoptosis, así como la proliferación y la diferenciación celular (Roux y Blenis 2004).

Las proteínas ERK1 y ERK2 son parte fundamental de las vías de señalización que responden a factores de crecimiento y ésteres de forbol y están asociadas a la proliferación y a la diferenciación celular. La activación de ERK1/2 depende de la casacada de señalización que comienza cuando un receptor membranal externo asociado a una proteína GTPasa cambia el sustrato GDP por GTP, internalizando la señal externa.

Las vías de activación y señalización de MAP cinasas han sido estudiadas en gran medida en mamíferos y en levaduras, sin embargo en años recientes se han publicado trabajos de las MAP cinasas de plantas y

asociándolas a distintos procesos de señalización como respuesta a estrés, desarrollo, proliferación y diferenciación (Wilson y Heberle-Bors 2000, Segui-Simarro et al. 2005, Sinha et al. 2011). Las llamadas ERKs de plantas son homólogas de las ERKs de mamíferos y guardan gran similitud en cuanto a la secuencia genómica (Ligterink y Hirt 2001). Además, han sido encontradas también en tabaco y se ha demostrado que son reconocidas por los anticuerpos para MAP cinasas humanas (Lebrun-Garcia et al. 1998).

ERK1/2 han sido asociadas directamente a la proliferación y diferenciación de la maduración del polen, así como al inicio de la embriogénesis del polen (Coronado et al. 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, ha habido interés creciente en arsénico, cadmio y níquel, para conocer sus efectos en concentraciones crónicas así como su acción genotóxica en diversos organismos, principalmente los seres humanos.

La genotoxicidad en células animales y humanas es una de las líneas de investigación del Laboratorio de Genotoxicología Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Si bien, la electroforesis unicelular ha sido utilizada desde hace varios años para células animales, recientemente, el laboratorio se ha propuesto introducir la electroforesis unicelular como una metodología de evaluación de genotoxicidad en células vegetales, principalmente para analizar los efectos de diversos agroquímicos y metales pesados, todos ellos contaminantes

ambientales. Concretamente se analizan metales pesados para comprobar su toxicidad y establecer concentraciones mínimas de daño al ADN.

IV. HIPÓTESIS

Dado que los metales pesados planteados para la investigación han mostrado que provocan daño a diferentes niveles en células de diversos organismos, incluyendo plantas, entonces se espera observar daño al ADN mediante electroforesis unicelular en células de la raíz de *Vicia faba* tratada con níquel, cadmio y arsénico.

Por otro lado, dado que se ha detectado actividad tipo caspasa-3 en plantas frente a diferentes tipos de estrés, entonces los anticuerpos para Caspasa-3 brindarán información acerca de la presencia de proteínas como producto del estrés inducido por los metales pesados. Asimismo, se espera que si es afectada la homeostasis de la célula con el aumento de la concentración de los metales, entonces la proteína ERK se expresará en menor medida y por lo tanto su marcaje inmunológico disminuirá con relación al testigo negativo.

V. OBJETIVOS

1. Determinar el efecto del arsenito de sodio, del nitrato de cadmio y del nitrato de níquel en la estructura del ADN mediante la electroforesis unicelular en el modelo vegetal *Vicia faba*.
2. Analizar el efecto del nitrato de cadmio y del nitrato de níquel en la detección de dos marcadores moleculares: Caspasa 3 y ERK.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Vicia faba* se obtuvieron de diversos comerciantes en mercados del estado de Tlaxcala, certificando que durante su cultivo o almacenamiento no les aplicaron plaguicidas (ie. orgánicas). Las semillas fueron escogidas a mano para obtener las más frescas y sanas. Posteriormente fueron lavadas con agua de la llave para remover tierra, polvo y esporas de hongos. Se esterilizaron con hipoclorito de sodio (10µl/L) durante veinte minutos. Posteriormente se lavaron para remover el hipoclorito de sodio y fueron sumergidas en agua de la llave por 24 horas en oscuridad a 19-20 °C para acelerar la germinación. Una vez embebidas, fueron acomodadas en charolas limpias en una cámara húmeda de algodón por tres días a temperatura ambiente (19 a 20 °C).

ENSAYO COMETA

Las raíces de las plántulas de *Vicia faba* fueron sometidas al tratamiento correspondiente durante dos horas. Las concentraciones utilizadas para el nitrato de cadmio fueron 1, 2, 4 y 8 mM; para el arsenito de sodio se utilizaron 0.25, 0.5, 5, 10 y 20 mM y para el nitrato de níquel, de 10, 50 y 100 mM. En todos los ensayos se incluyeron testigos negativo (agua destilada) y positivo (dicromato de potasio 5 mM).

Al finalizar el tiempo de tratamiento, las plántulas fueron lavadas cuidadosamente en agua de la llave por algunos segundos y colocadas en un recipiente con agua de la llave para evitar su deshidratación. Una vez que todas las raíces estuvieron fuera de sus respectivos tratamientos, se procedió a secarlas cuidadosamente, se cortaron 2 cm de largo desde la punta del

meristemo y se colocaron en los vasos de precipitado que contenían el amortiguador de fosfatos (PBS) frío, con el fin de mantener el pH.

Las preparaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: en una caja con hielo, se colocó la base de una caja de Petri inclinada y fría (4 °C), en donde se pusieron 250 µL de PBS y de dos a tres raíces del mismo tratamiento y se procedió a hacer los cortes con el bisturí frío. Los cortes se hicieron de 1 a 2 mm procurando no dañar la raíz y dejando que los cortes estuvieran siempre en contacto con el PBS para que los núcleos se precipitaran al fondo por gravedad. Una vez terminados los cortes, con una micropipeta de con la punta cortada para ensanchar su orificio se tomaron 50 µL de la suspensión de núcleos y se mezclaron con 50 µL de agarosa de punto de fusión bajo (al 1 % a 40 °C), incorporándolos cuidadosamente. De la mezcla se colocaron 80 µL en un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal (1 %), se colocó encima el cubreobjetos teniendo cuidado de no provocar burbujas. Se puso en una placa metálica fría hasta que solidificó.

Posteriormente se aplicó una última capa de agarosa de punto de fusión bajo (0.5 % a 37 °C), se dejó por 5 min y se removió de nuevo el cubreobjetos. Se colocaron las preparaciones en las cajas coplin en una solución de lisis (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10, Tritón X-100 al 1 % y DMSO al 10 %, los dos últimos componentes se añaden antes de usarse) durante al menos una hora, a 4 °C. Transcurrido el tiempo de lisis celular, se sacaron las laminillas de las cajas coplin, se secaron por la parte posterior con papel absorbente y se colocaron en una cámara horizontal de electroforesis con amortiguador alcalino (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH>13).

Se dejó incubar por 15 min para permitir el desenrollamiento del ADN. Posteriormente se inició la electroforesis a 25 V y 300 mA por 20 min en oscuridad y a 4 °C.

Al finalizar, se sacaron los portaobjetos, se escurrió el exceso de amortiguador y se secó la cara posterior. Se colocaron en una charola extendida y se hicieron 3 lavados de 5 min cada uno con un amortiguador neutralizante (Tris 0.4 M a pH 7.5 y 4 °C). Se fijaron con etanol 100 % frío en cajas coplin por 15 min. Se dejaron secar al aire en la campana y se guardaron hasta ser teñidas.

Para teñir las laminillas, se humedecieron con agua desionizada estéril y fría, se escurrieron y se les puso 50 µL de bromuro de etidio (2µg/mL). Se preparó una caja para guardar y transportar las laminillas en una cámara húmeda y con papel aluminio cubriendo la caja para prevenir que se secan y que el fluorocromo decayera.

Para cada laminilla, se tomaron al azar 50 núcleos utilizando un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515 a 560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Se empleó el sistema computarizado de análisis de imágenes para medir el daño al ADN de PERCEPTIVE INSTRUMENTS llamado "Comet Assay IV". El daño es expresado por el valor del momento de la cauda (tail moment ó TM) que es una medida utilizada a nivel mundial para reportar el daño al ADN y que los resultados puedan ser comparables entre laboratorios.

Se evaluaron tres laminillas por cada tratamiento que se realizó al menos dos veces, y se obtuvo el promedio del momento de la cauda. Para la evaluación de los testigos negativos, testigos positivos y tratamientos sólo

fueron considerados los núcleos que tuvieran una estructura conservada y cuando hubo cometas, se consideraron sólo aquellos cuya cabeza presentaran buena intensidad, según las capacidades de la cámara y lo que el programa pudiera registrar.

Los valores promedio de los momentos de la cauda de ambos experimentos para cada tratamiento se compararon entre sí mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y de comparación múltiple de Newman-Keuls a $\alpha=0.001$.

ANÁLISIS POR INMUNOFLORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Se realizó la inmunofluorescencia en secciones de 30 μM realizados en vibratomo. Los cortes fueron obtenidos de raíces de algunos de los tratamientos utilizados para la electroforesis unicelular, que fueron fijadas por 24 h en paraformaldehído 4 % (peso/volumen) después de terminado el tratamiento correspondiente y se transfirieron a paraformaldehído 0.1 % y mantuvieron a 4 °C. Los cortes obtenidos con el vibratomo fueron colocados en laminillas cubiertas con 3-aminopropiltrietoxisilano. Las muestras fueron tratadas de la siguiente manera para facilitar su permeabilización siempre a 4 °C: primero deshidratadas con series de PBS: etanol 30 %, 50 %, 70 % y 100 % (v/v) y rehidratadas con la misma solución en el siguiente orden 100 %, 70 %, 50 % y 30 %. Posteriormente fueron tratadas con celulosa 2 % (p/v) en PBS por 5 min. Los cortes fueron tratados con tritón X-100 0.5 % en PBS por 20 min y lavados en PBS por 5 min, dos veces. Una vez realizado esto, se incubaron con suero bovino 5 % (v/v) en PBS por 5 min y finalmente con los anticuerpos policlonales anti-Caspasa-3 y anti-ERK en BSA al 1 % por 1 hora

a temperatura ambiente en oscuridad en cámara húmeda. Después de lavar dos veces con PBS por 10 min, la señal fue detectada por anticuerpos anti-ratón diluidos 1:25 en 1 % BSA por 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Por último se lavaron dos veces con PBS por 10 min, marcados con DAPI (4, 6-diamina-2-fenilindol) por 10 min, lavados con agua grado milli-Q y montados con Mowiol 4-88. Los ensayos fueron observados por microscopio confocal de laser y se recolectaron imágenes en serie de 0.5 a 1 M. Se tomaron entre 15 y 20 secciones ópticas. También se obtuvieron imágenes de Contraste Diferencial de Interferencia (CDI).

Es importante mencionar que las muestras fueron tratadas y fijadas en México y analizadas en el microscopio confocal del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid, España y dado que el tiempo de uso de dicho equipo era limitado y los costos elevados, se escogieron tratamientos claves (nitrato de cadmio 80 mM, nitrato de níquel 100 mM 2 h y 24 h, testigos negativos y positivos) para tratar de explicar los fenómenos y verificar la hipótesis de este trabajo.

VII. RESULTADOS

Se realizó la electroforesis unicelular para concentraciones crecientes del arsenito de sodio (0.25, 0.5, 5, 10 y 20 Mm) con el fin de evaluar la genotoxicidad del compuesto químico en células de la raíz de *Vicia faba* en tratamientos de 2 h. El cuadro II muestra la media de al menos 150 valores del momento de la cauda de 3 laminillas diferentes \pm error estándar de las mismas para el tratamiento con arsenito de sodio. La figura 4 es la representación de las medias exhibidas en el cuadro II en una gráfica de

barras. Se obtiene un valor $P < 0.001$ al comparar cada tratamiento con el testigo negativo.

El cuadro III expone los resultados promedio de la genotoxicidad de diferentes concentraciones de nitrato de cadmio (1, 2, 4 y 8 mM) en células de la raíz de *Vicia faba* mediante la electroforesis unicelular, expresados como el momento de la cauda. Las medias fueron obtenidas de al menos 150 células de 3 laminillas diferentes. La figura 6 es la representación gráfica de los resultados del cuadro III. Se realizó el análisis de comparación múltiple Neuman-Keuls, obteniendo valores $P < 0.001$ para todas las comparaciones con el testigo negativo.

En el cuadro IV se enlistan los resultados de la prueba de genotoxicidad del nitrato de níquel mediante la electroforesis unicelular. Las concentraciones evaluadas fueron 10, 50 y 100 mM. La media representa al menos 150 momentos de la cauda de 3 laminillas diferentes, así como el error estándar entre ellas. La figura 6 es la representación gráfica de los resultados del cuadro IV. Se llevó a cabo el análisis de comparación múltiple Neuman-Keuls, obteniendo valores $P < 0.001$ para todas las comparaciones con el testigo negativo.

En el análisis de los marcadores moleculares se obtuvieron imágenes de diferentes profundidades en el microscopio confocal. Para los ensayos con anti Caspasa-3, éstos mostraron una clara tendencia a disminuir la localización de la proteína tipo Caspasa-3 conforme aumentó la duración de los tratamientos. Así mismo, es clara la diferencia que existe entre las fotografías del testigo negativo (Figura 7) con el testigo positivo (Figura 8), teniendo el testigo positivo una localización más intensa y generalizada. El

testigo positivo de 24 h muestra una presencia en prácticamente todas las células del campo (Figura 9), además de que dicha localización se aprecia confinada a las membranas internas de las células, sugiriendo la expansión de las vacuolas y la constricción de los citoplasmas.

Las imágenes para el tratamiento con nitrato de cadmio 80 mM (Figura 10) muestran una localización generalizada y evidente de anti Caspasa-3. Algunas células tienen localización en vacuola. Dada el área del citoplasma, no se ha empezado el proceso de expansión de vacuola. En la Figura 11, se expone un acercamiento del mismo tratamiento demostrando que no han comenzado eventos que dañen a la célula estructuralmente.

La detección de anti Caspasa-3 para el tratamiento de 2 h con nitrato de níquel 100 mM (Figura 12) muestra una vez mas una localización hacia las membranas de la mayoría de las células, sin un daño estructural mayor en los núcleos. Es evidente el contraste con el resultado del mismo compuesto por un periodo de 24 h (Figura 13), en donde no hay localización alguna.

Además de la inmunolocalización de anti Caspasa-3, se realizó la localización del anticuerpo de ERK. Para el testigo negativo (Figura 14), es evidente una localización total en la mayor parte de las células. Se realizó la detección en el testigo positivo 24 h (Figura 15) para contrastar y poder comparar mejor lo que sucedió en el tejido de la raíz con un tratamiento de mayor duración. Se observa en la Figura 15 que no hay localización de anti ERK.

La detección de anti ERK en el tratamiento de nitrato de cadmio 40 mM (Figura 16) muestra un estado intermedio en los dos testigos anteriores,

si bien hay detección en algunas células, no es tan intensa como la detectada en el testigo negativo y la proporción de células marcadas es baja.

En el tratamiento con nitrato de níquel 100 mM por 2 h, se observa muy poco el anticuerpo y que es asociado exclusivamente a la membrana (Figura 17), mientras que para el mismo compuesto en 24 h de tratamiento (Figura 18), no se localiza anti ERK en ninguna célula y los núcleos parecen no presentar daño estructural importante.

XIII DISCUSIÓN

La identificación de los síntomas de toxicidad por metales pesados en plantas es relativamente fácil, sin embargo, el estudio fisiológico durante este tipo de estrés no lo es. La actividad de un metal pesado en el citoplasma es afectado por los aminoácidos y ácidos carboxílicos en el medio, así como por el pH (Das et al. 1997). Se ha establecido que la fitotoxicidad de los metales pesados se relaciona con el pH del suelo, así como con el contenido de materia orgánica y fosfatos en el mismo (Foy et al. 1978).

Los plaguicidas contienen metales pesados que contribuyen a la genotoxicidad total de la mezcla (Nicholson et al. 2003). Entre estos metales, el cadmio, el níquel y el arsénico son considerados muy importantes en temas de salud humana y considerados cancerígenos en diferentes modelos experimentales, así como en células humanas y en estudios en personas ocupacionalmente expuestas.

Los plaguicidas utilizados en los campos de países como México, no solo son absorbidos por la planta sino incorporados al núcleo de las células, provocando daño directo al ADN. Esta genotoxicidad modifica la expresión de

proteínas constitutivas propias de un desarrollo celular sano, como son las cinasas de la familia ERK. También se altera la expresión de proteínas tipo Caspasas que parece ser conducen a la destrucción celular como la apoptosis al incrementar la sensibilidad de la célula a los agentes genotóxicos (Tinel 2004) e incluso necrosis (Connell 2011).

Elementos como el arsénico aumentan substancialmente la preocupación sobre la salud pública, ya que su concentración aumenta, aunque no es exclusiva, en lugares donde existe una sobre explotación de los mantos acuíferos.

Algunos estudios han demostrado la acumulación de metales pesados en la cadena trófica (Chen 2000, Tulonen 2006, van den Brink 2009), lo que aumenta aun mas la preocupación que pueda tener el uso excesivo de plaguicidas con altas concentraciones de metales pesados, no únicamente en las personas que se encuentran expuestas a ellos de manera ocupacional, sino a una mayor parte de la población como los consumidores.

Dados estos antecedentes, el presente estudio evaluó el daño al ADN provocado por sales de los metales cadmio, arsénico y níquel en la raíz de *Vicia faba*, *in vivo*, haciendo uso de la electroforesis unicelular alcalina que se ha caracterizado por ser una forma rápida y eficiente de evaluar la mayoría de los efectos a nivel molecular de la genotoxicidad de diferentes compuestos con dosis bajas, además de ser una investigación de bajo costo. Se evaluó también la modificación en los niveles de enzimas tipo Caspasa-3 que revelan parte del estrés al que está sometida la célula, así como la familia de las proteínas ERK, que brindan una percepción de un estado saludable y de proliferación celular.

Los resultados del momento de la cauda obtenidos, muestran una clara relación concentración-respuesta en los tres compuestos probados. Si bien la relación no es lineal, el incremento de la genotoxicidad con respecto a la concentración demostró ser muy significativa ($P < 0.0001$) para todos los ensayos con el análisis de varianza. La no linealidad de los resultados, se puede deber a que la célula tenga mecanismos individuales de defensa a nivel molecular que le permiten resistir con diferente intensidad, distintas concentraciones genotóxicas de los metales.

Cuando se evaluó la diferencia de las medias de los testigos negativos con todos los tratamientos, con la prueba de comparación Neuman-Keuls, se encontró que son significativos ($P < 0.001$). Lo mismo es cierto para la comparación de los testigos positivos con los testigos negativos de cada tratamiento.

Los resultados obtenidos mediante la inmunolocalización son de gran ayuda para confirmar y sustentar los resultados de genotoxicidad. Si bien no proveen información directa de la misma, sí ayudan a confirmar la situación de estrés en que se encuentra la célula por la presencia de proteínas tipo Caspasa-3. Los resultados de la enzima tipo Caspasa-3 en tejidos vegetales concuerdan con lo esperado si fuera un modelo de mamífero, ya que al incrementar la concentración de los tratamientos, se puede observar una mayor cantidad de marcas fluorescentes que en tratamientos con concentraciones menores, e incluso el testigo negativo. Es de particular interés el caso de las imágenes obtenidas en los tratamientos de nitrato de níquel 100 mM (24 h), ya que se elimina prácticamente por completo la fluorescencia, cuando se esperaría encontrar en mayor medida. Una posible

explicación es que la concentración sea muy alta y esté afectando en tal forma a la célula que ya no existe siquiera expresión de proteínas apoptóticas y que la célula esté pereciendo por otra vía no detectada en este trabajo.

La detección de la proteína ERK se realizó debido a que existen estudios que vinculan la proliferación y la diferenciación a esta proteína, lo que podría llevarla a ser una referencia hacia la determinación de la salud celular. Así mismo, estudios (Rosas et al. 1984) han demostrado que metales pesados, en particular el cadmio, inhiben la proliferación celular. La detección de esta proteína en los tratamientos del presente estudio dieron resultados que apoyan una vez mas los obtenidos por la electroforesis unicelular, ya que en general, los tratamientos con las concentraciones bajas de los metales pesados tuvieron una detección mayor a la de los tratamientos con concentraciones altas. Esto indicaría, según la hipótesis, que a concentraciones bajas del metal pesado, la radícula de la plántula prolifera y sus células se diferencian de una manera mas cercana a la "normal" (testigo negativo) debido a que la proteína ERK se localiza en grandes cantidades. Sin embargo, conforme los períodos de los tratamientos aumentan, la proteína ERK pierde localización dentro de la célula, indicando que hay un factor que impide que ésta se diferencie con normalidad y evite que haya una proliferación adecuada para la etapa en la que se encuentra el organismo.

Se evaluó la integridad nuclear por medio de la tinción de las células de *Vicia faba* con azul de toluidina. En la Figura 19, se observan células sin tratamiento, las cuales tienen una vacuola grande asociada a la membrana, así como un núcleo sano. En las células tratadas con dicromato de potasio como testigo positivo (Figura 20) se pueden apreciar algunos síntomas de

apoptosis como lo son el núcleo condensado, la separación de la vacuola de la membrana y la desintegración de la misma en múltiples vacuolas pequeñas.

IX. CONCLUSIONES

Se encontró una importante relación de concentración respuesta en todos los tratamientos realizados, tanto para Cd, Ni y As. Esta relación no es directamente proporcional, sin embargo los variados mecanismos de defensa contra estrés podrían estar involucrados como sobreexpresión de enzimas protectoras de agentes oxidantes (super óxido dismutasa, tioredoxinas y enzimas del sistema glutatión, entre otras).

Se logró detectar por inmunofluorescencia y microscopía confocal la presencia de proteínas tipo Caspasa-3, posiblemente asociadas con una vía de muerte celular programada en plantas. No sólo se pudieron detectar proteínas de este tipo, sino que se aprecia el incremento de ellas conforme los tratamientos aumentan de duración.

Para algunos tratamientos con nitrato de cadmio y nitrato de níquel, fue posible detectar mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, la presencia de proteínas tipo ERK, asociadas con la proliferación y la división celular. Contrariamente a los resultados de los experimentos para anti Caspasa-3, los niveles de ERK disminuyeron conforme aumentó el tiempo de exposición.

Los resultados obtenidos tanto con la electroforesis unicelular como con la inmunofluorescencia, concuerdan con los experimentos de genotoxicidad en otros vegetales y con otros metales pesados en

concentraciones genotóxicas (World Health Organization 1991, World Health Organization 1997, World Health Organization 2004).

X. REFERENCIAS

- Adrain, C., Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**: 390-7.
- Anthony S. Fauci, E. B., Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Medical.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2005). *ToxFAQ's for Nickel*. P. H. S. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007). *Toxicological profile for Arsenic*. P. H. S. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA.
- Beckman, G. B. L. Nordenson, I. (1977). Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ Health Perspect* **19**: 145-6.
- Beers, E. P. (1997). Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* **4**: 649-61.
- Beraud, E. S. Cotelle, P. Leroy, J.F. Férard (2007). Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat Res* **633**: 112-6.
- Bichler, J.,Cavin, C., Simic, T., Chakraborty, A., Ferk, F., Hoelzl, C., Schulte-Hermann, R., Kundi, M., Haidinger, G., Angelis, K., Knasmuller, S. (2007). Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem Toxicol* **45**: 1428-36.
- Brown, P. H., Welch, R.M., Cary, E.E. (1987). Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiology* **85**: 801.
- Buat-Ménard, P. (1987). Group Report: Arsenic. Gran Bretaña, Scientific Comitee on Problems of the Environment.
- Burbridge E, Diamond M, Dix PJ, McCabe PF. (2006). Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. *Plant Science* **171**: 139-146.
- Bursch, W. Ellinger, A. Gerner, C. H. FroHwein, U. Schulte-Hermann, R. (2000). Programmed Cell Death (PCD): Apoptosis, Autophagic PCD, or Others? *Annals of the New York Academy of Sciences* **926**: 1-12.
- Chaney R.L.(1984). Potential effects of sludge-borne heavy metals and toxic organics on soils, plants, and animals, and related regulatory guidelines. In *Proc. Pan*

American Health Organization Workshop on the International Transportation, Utilization or Disposal of Sewage Sludge.

- Chen. C. Y. Stemberger, R. S. Klaue B. Blum J. D. Pickhardt P. y Folt C.L. (2000). Accumulation of Heavy Metals in Food Web Components across a Gradient of Lakes Limnology and Oceanography **45**: 1525-1536.
- Chichkova, N. V. Kim, S. H. Titova, E. S. Kalkum, M. Morozov, V. S., Rubtsov, Y. P. Kalinina, N. O. Taliansky, M. E. Vartapetian, A. B. (2004). A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* **16**: 157-71.
- Chiroma, T. M. (2007). The Impact of Pesticide Application on Heavy Metal (Cd, Pb and Cu) Levels in Spinach. Chemical Engineering Department, Federal University of Technology, Yola, Nigeria.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* **26**: 249-61.
- Collins, A. R. Dobson, V. L. Dusinska, M. Kennedy, G. Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* **375**: 183-93.
- Connell, P. P., Weichselbaum, R. R. (2011). A downside to apoptosis in cancer therapy? *Nat Med* **17**: 780-2.
- Coronado, M. J. G.-M., P. Segui, J. M. Ramirez, C. Barany, I. Testillano, P. S. Risueno, M. C. (2002). MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *J Struct Biol* **140**: 200-13.
- Council, N. R. (2001). Arsenic in Drinking Water: 2001 update, National Academy Press, Washington D.C.
- Dalton, D. A., Evans, H.J. y Hanus, F.J. (1985). Stimulation by Nickel of Soil Microbial Urease Activity and Urease and Hydrogenase Activities in Soybeans Grown in a Low Nickel Soil. *Plant Soil* **88**: 245-258.
- Danon, A. Delorme, V. Mailhac, N. Gallois, P. (2000). Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 647-655.
- Danon, A. Rotari, V. I. Gordon, A. Mailhac N. Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *J Biol Chem* **279**: 779-87.
- Das N, Vimala R, Karthika P. (2008). Biosorption of heavy metals—An overview. *Indian Journal of Biotechnology* **7**: 159-169.

- Das, P. Samantaray, S. Rout, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut* **98**: 29-36.
- Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zerner B. (1975). Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* **97**: 4131-3.
- Duffus, J. H. (2002). Heavy metals a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* **74**: 793-807.
- Economía, S. d. (2008). DIRECCIÓN DE CONTROL DOCUMENTAL, INFORMÁTICA Y ESTADÍSTICA. 2010.
- EPA. (2011). About pesticides. 2011, de <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.
- Eskew DL, Welch RM, y Cary EE (1983). Nickel: An Essential Micronutrient for Legumes and Possibly All Higher Plants. *Science* **222**.
- Eskew DL, Welch RM, y Norvell WA. (1984). Nickel in Higher Plants: Further Evidence for an Essential Role. *Plant Physiology* **76**.
- Fairbairn, D. W. Olive, P. L. O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* **339**: 37-59.
- Fang Jie Z, McGrath SP, Meharg AA. (2010). Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 535-559.
- Fauci, E. B., Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Medical.
- Fergusson, J. E. (1990). *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Pergamon, Oxford.
- Foy, C. D. Chaney, R. L. White, M. C. (1978). The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **29**: 511-566.
- Friis, R. H. (2007). *Essentials of Environmental Health*. Jones and Bartlett, Sudbury Reino Unido.
- Galvão, L. A. C. (1987). 4 Cadmio. *Metepoc*, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud.
- Glanze, W. D. (1996). *Mosby Medical Encyclopedia*. St Louis MO, C.V. Mosby.
- Gómez-Arroyo, S. Armienta, M. A. Cortés-Eslava, J. Villalobos-Pietrini, R. (1997). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutat Res* **394**: 1-7.

- Grant, WF. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res* **310**: 175-85.
- Grant, WF, Zinov'eva-Stahevitch A.E. y Zura K.D (1981). Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. Springer, New York.
- Green, D. R. (2005). Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell* **121**: 671-674.
- Harrison-Lowe, N., Olsen, L. J. (2006). Isolation of glyoxysomes from pumpkin cotyledons. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**: Unit 3 19.
- Houk, V. S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* **277**: 91-138.
- Hurtado-Jimenez, R. y Gardea-Torresdey, J. L. (2006). Arsenic in drinking water in the Los Altos de Jalisco region of Mexico. *Rev Panam Salud Publica* **20**: 236-247.
- Hutton, M. (1983). Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **7**: 9-24.
- IARC. (2010). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–100. 2010.
- ICNCM (1990). Report of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man. *E. H. Scandinavian Journal of Work*. **16**: 1-82.
- INE. (2011). Metales Pesados. de www.ine.gob.mx.
- Irena Sherameti, A. V. (2009). Soil Heavy Metals, Springer.
- Jensen, A., y F. Bro-Rasmussen (1992). Environmental cadmium in Europe. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: 101-108.
- Korthout, Henrie A. A. J. Berecki, G. Bruin, W. van Duijn, B. Wang, M. (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS letters* **475**: 139-144.
- Kovalchuk, I. K., Olga (2008). Transgenic Plants as Sensors of Environmental Pollution Genotoxicity. *Sensors* **8**: 1539-1558.
- Laboratory, S. T. E. a. M. (2011). Cadmium. 2011, from <http://www.trace-elements.org.uk/Cadmium.htm>.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 305-315.
- Lebrun-Garcia, A. O., F. Chiltz, A. Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* **15**: 773-81.

- Leme, D. M. y Marin-Morales M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res* **682**(1): 71-81.
- Lennon, S. V, Martin, S. J, Cotter T.J. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* **24**: 203-14.
- Ligterink, W. y H. Hirt (2001). Mitogen-activated protein [MAP] kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol* **201**: 209-75.
- Lockshin, R. A. y Z. Zakeri (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2405-19.
- Manahan, S. E. (2003). *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. Lewis Publishers, USA.
- Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Mellempgaard A, Helmert U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer* **61**: 601-5.
- Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R, Alvarez-Torres A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International* **35**: 1155-1159.
- Merk, O. Reiser, K. Speit, G. (2000). Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **471**: 71-80.
- Miyamae, Y. Iwasaki, K. Kinae, N. Tsuda, S. Murakami, M. Tanaka, M. Sasaki, Y. F. (1997). "Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition." *Mutat Res* **393**: 107-13.
- Mobley, H. L. Island, M. D. Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* **59**: 451-80.
- Mortvedt, J. (1996). Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **43**.
- Nicholson, F. A. Smith, S. R. Alloway, B. J. Carlton-Smith, C. Chambers, B. J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment* **311**: 205-219.
- Nordenson, I. Beckman, G. Beckman, L. Nordstrom, S. (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas* **88**: 47-50.
- International Labour Organization (1999). CIS documents. Programme on Safety and Health at Work and the Environment (SAFEWORK), from www.ilo.org.

- Palus, J. Rydzynski, K. Dziubaltowska, E. Wyszynska, K. Natarajan, A. T. Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* **540**: 19-28.
- Pinto, A. P. Mota, A. M. de Varennes, A. Pinto, F. C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of The Total Environment* **326**: 239-247.
- Polacco, J. C., Freyermuth, S.K., Gerendas, J., y Cinzio, S. (1999). Soybean genes involved in nickel insertion into urease. *Journal of Experimental Botany* **50**.
- Prince, W. K., P.; Doberschütz, K.; Subburam, V. (2002). Cadmium Toxicity in Mulberry Plants with Special Reference to the Nutritional Quality of Leaves. *Journal of Plant Nutrition* **25**: 12.
- Rosas I, Carbajal ME, Gómez-Arroyo S, Belmont R, Villalobos-Pietrini R. (1984). Cytogenetic effects of cadmium accumulation on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Environ Res* **33**: 386-95.
- Rossmann, T. (1994). Metal Mutagenesis. In: *Toxicology of Metals*. Springer-Verlag, Berlin.
- Roux, P. P. y J. Blenis (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-44.
- Sanmartin, M. Jaroszewski, L. Raikhel, N. V. Rojo, E. (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiol* **137**: 841-7.
- Santos, S. J. Singh, N. P. Natarajan, A. T. (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* **232**: 407-11.
- Sarkar, B. (2002). *Heavy Metals in the Environment*. Marcel Dekker Inc, Nueva York.
- Segui-Simarro, J. M. T., P. S. Jouannic, S. Henry, Y. Risueno, M. C. (2005). Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochem Cell Biol* **123**: 541-51.
- Shintani, T., Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990-5.
- Siemiatycki, J. Dewar, R. Nadon, L. Gerin, M. (1994). Occupational risk factors for bladder cancer: results from a case-control study in Montreal, Quebec, Canada. *Am J Epidemiol* **140**: 1061-80.
- Singh, N. P. McCoy, M. T. Tice, R. R. Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**: 184-91.

- Sinha, A. K. J., M. Raghuram, B. Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav* **6**: 196-203.
- Smedley, P. L. y Kinniburgh D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* **17**.
- Straif, K. Benbrahim-Tallaa, L. Baan, R. Grosse, Y. Secretan, B. El Ghissassi, F. Bouvard, V. Guha, N. Freeman, C. Galichet, L. Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol* **10**: 453-4.
- Thomas, S. G., Franklin-Tong, V. E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature* **429**: 305-9.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**: 206-21.
- Tinel, A., Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress. *Science* **304**: 843-846.
- Tulonen, T, Pihlstrom, M, Arvola, L, Rask, M. (2006) Concentrations of heavy metals in food web components of small, boreal lakes *Boreal Environment Research* **11**: 185-194.
- University, O. (2011). The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory. Chemical and Other Safety Information, from msds.chem.ox.ac.uk.
- U. S. Food and Drug Administration (2011) de www.fda.gov.
- van den Brink, N. L., D. Dimmers, W. Boerwinkel, M. van der Hout, A. Effects of soil properties on food web accumulation of heavy metals to the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). (2009) *Environmental Pollution* **158**: 245-251.
- van der Gulden, J. W. Kolk, J. J. Verbeek, A. L. (1995). Work environment and prostate cancer risk. *Prostate* **27**: 250-7.
- Waalkes, M. P. y Rehm S. (1994). Chronic toxic and carcinogenic effects of cadmium chloride in male DBA/2NCr and NFS/NCr mice: strain-dependent association with tumors of the hematopoietic system, injection site, liver, and lung. *Fundam Appl Toxicol* **23**: 21-31.
- Wagner, G, Donald J, Sparks L. (1993). Accumulation of Cadmium in Crop Plants And Its Consequences to Human Health. *Advances in Agronomy, Academic Press*. **51**: 173-212.

- Welch, R. M. (1981). The Biological Significance of Nickel. *Journal of Plant Nutrition* **3**.
- Wilson, C. y E. Heberle-Bors (2000). MAP kinases in pollen. *Results Probl Cell Differ* **27**: 39-51
- Wolf, B. B. y Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**: 20049-52.
- World Health Organization, W. (1991). Nickel. *Environmental Health Criteria*. I. P. o. C. Safety. Geneva, WHO.
- World Health Organization, W. (1997). Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **volume 58**.
- World Health Organization, W. (2004). *Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds*. Geneva. **2nd ed.**

CUADROS

Cuadro I. Tendencia acumulativa de cadmio en algunas muestras de cultivo.		
Tendencia acumulativa del cadmio		
Baja	Mediana	Alta
Col blanca y de bruselas	Col rizada	Lechuga
Brócoli, colrábano	Cebollín	Espinaca, perejíl
Papa, rábano	Apio, zanahoria	Eneldo
Calabacín, fríjol	Remolacha	Ruibarbo
Calabaza, tomate	Trigo	
Manzana, pera		
Ciruela, maíz		
Avena, cebada		
Centeno		

Cuadro II. Genotoxicidad inducida por arsenito de sodio en células de la raíz de *Vicia faba*, evaluada mediante la electroforesis unicelular.

	$\bar{x} \pm E.E. ^a$
Testigo negativo	0.5 ± 0.1
Testigo positivo	11.7 ± 0.5
Tratamientos ^b	
0.25	5.8 ± 0.4 *
0.5	7.8 ± 0.3 *
5	14.3 ± 0.5 *
10	16 ± 0.4 *
20	17.6 ± 0.5 *

a Promedio del momento de la cauda de al menos dos experimentos independientes ± error estándar.

b Na As O₂. arsenito de sodio en concentraciones mM

* Se obtuvieron diferencias significativas entre el promedio de los testigos negativos y los tratamientos por un análisis de varianza F=233 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls, P<0.0001.

Cuadro III. Genotoxicidad inducida por nitrato de cadmio en células de la raíz de *Vicia faba*, evaluada mediante la electroforesis unicelular.

	$\bar{x} \pm E.E. ^a$
Testigo negativo	0.0 ± 0.0
Testigo positivo	12.4 ± 0.5
Tratamientos ^b	
1	4.5 ± 0.3 *
2	10.7 ± 0.6 *
4	12.3 ± 0.6 *
8	14.7 ± 0.9 *

a Promedio del momento de la cauda de al menos dos experimentos independientes ± error estándar.

b Cd(NO₃)₂. Nitrato de cadmio en concentraciones mM

* Se obtuvieron diferencias significativas entre el promedio de los testigos negativos y los tratamientos por un análisis de varianza F=106 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls, P<0.0001.

Cuadro IV. Genotoxicidad inducida por nitrato de níquel en células de la raíz de *Vicia faba*, evaluada mediante la electroforesis unicelular.

	$\bar{x} \pm E.E. ^a$
Testigo negativo	1.9 \pm 0.2
Testigo positivo	11.1 \pm 0.5
Tratamientos ^b	
10	9 \pm 0.4 *
50	17.4 \pm 0.8 *
100	25.6 \pm 0.5 *

a Promedio del momento de la cauda de al menos dos experimentos independientes \pm error estándar.

b Ni(NO₃)₂. Nitrato de níquel en concentraciones mM

* Se obtuvieron diferencias significativas entre el promedio de los testigos negativos y los tratamientos por un análisis de varianza F=310 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls, P<0.0001.

FIGURAS

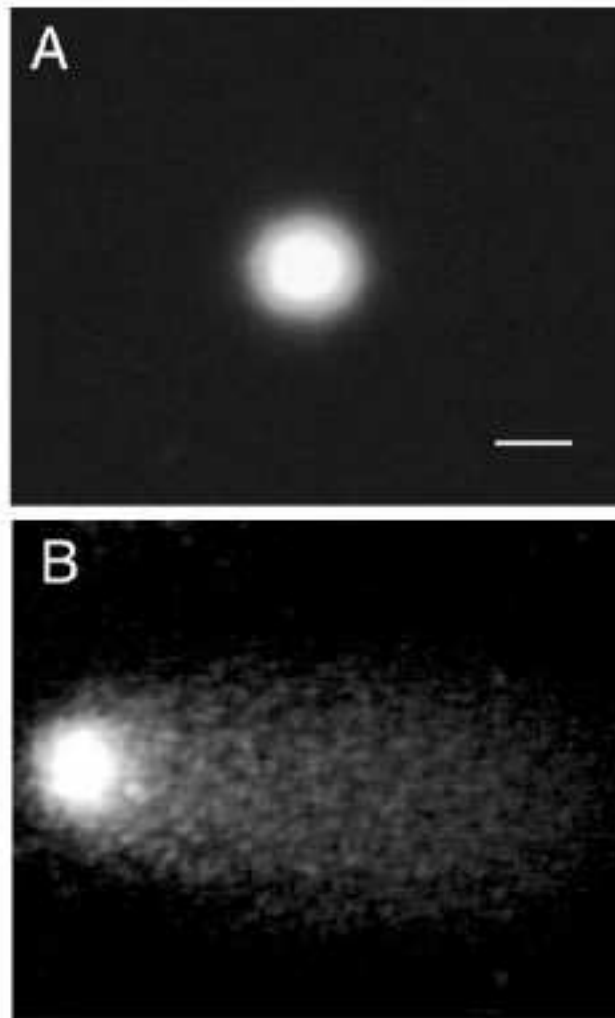


Fig.1 Fotomicrografías de células en ensayo cometa. (A) Testigo negativo. (B) Célula exhibiendo migración de ADN como respuesta a tratamiento con un agente mutagénico. Barra representa 25 μm .

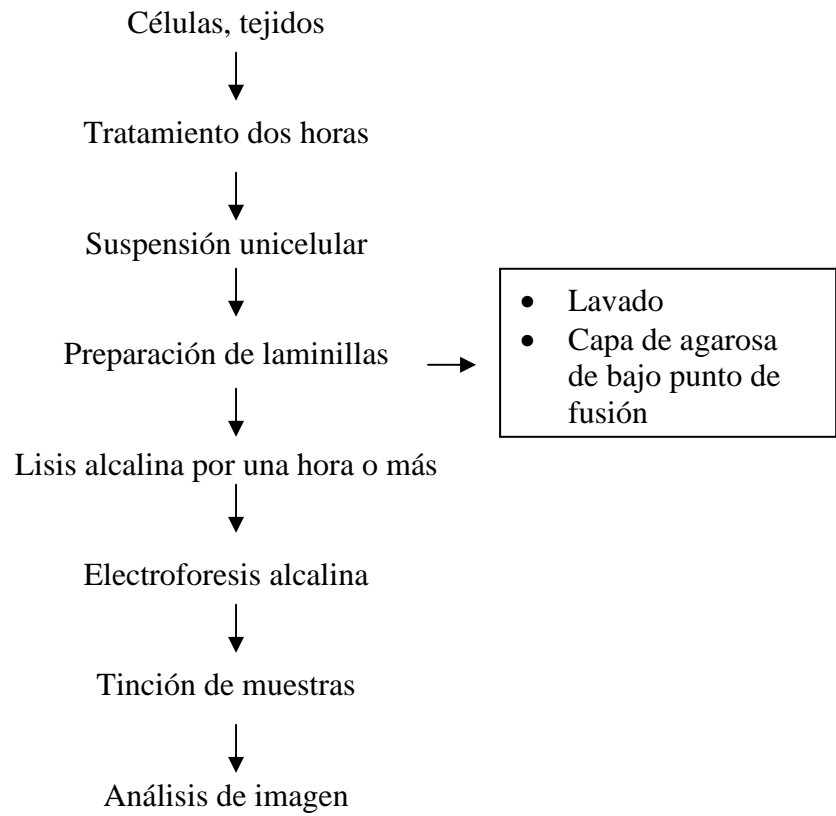


Fig.2 Esquema de la metodología general del ensayo cometa alcalino.

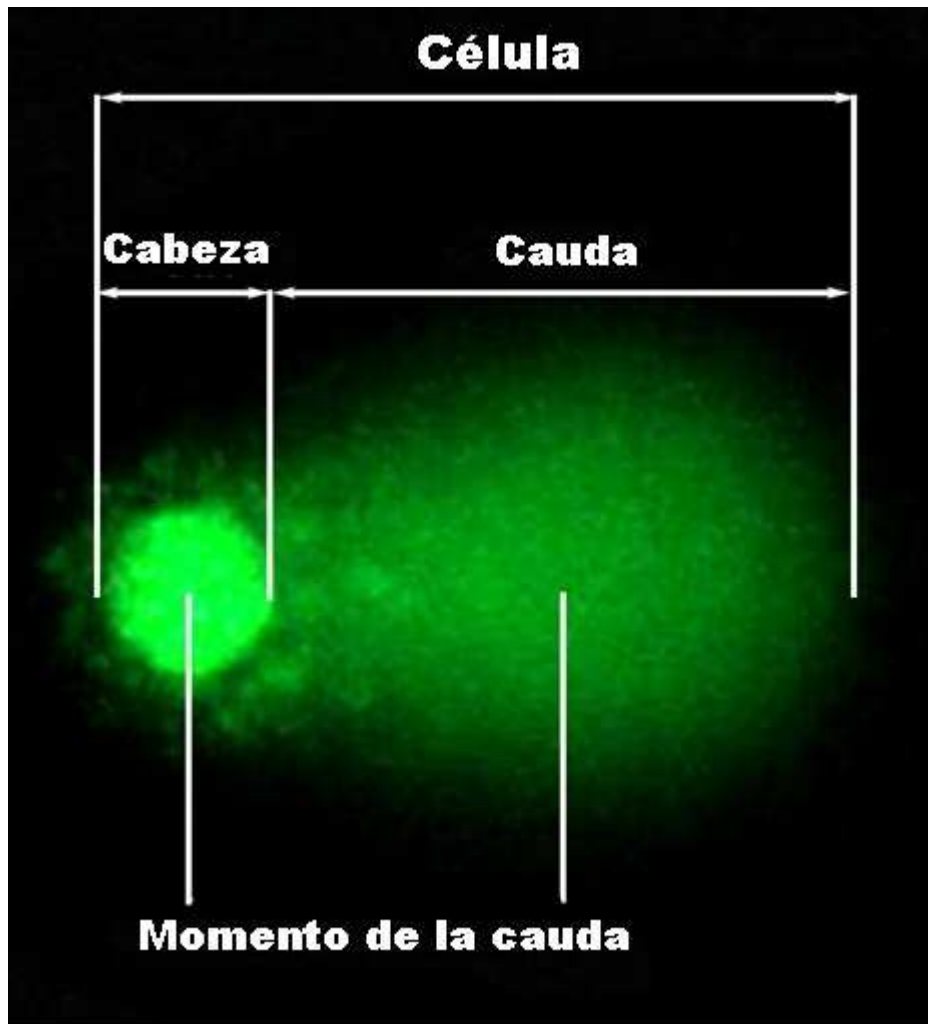


Fig. 3 Componentes del “cometa” visualizado en el programa de medición.
(Imagen mofidicada de Cell Biolabs Inc.)

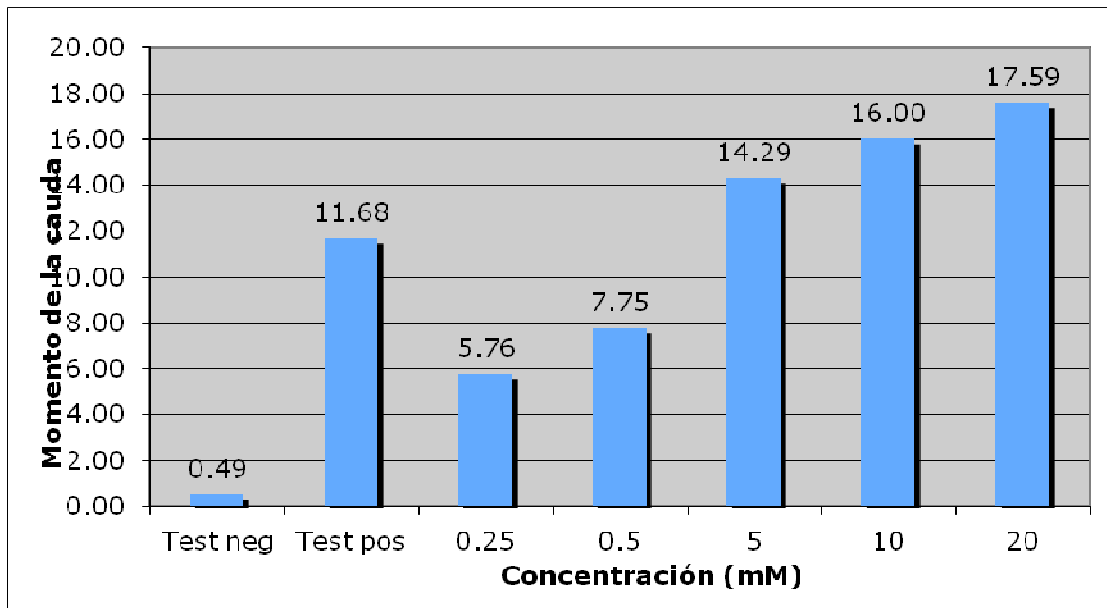


Figura 4. Genotoxicidad detectada por el ensayo cometa en células de raíz de *V. faba* tratadas por dos horas con arsenito de sodio a diferentes concentraciones.

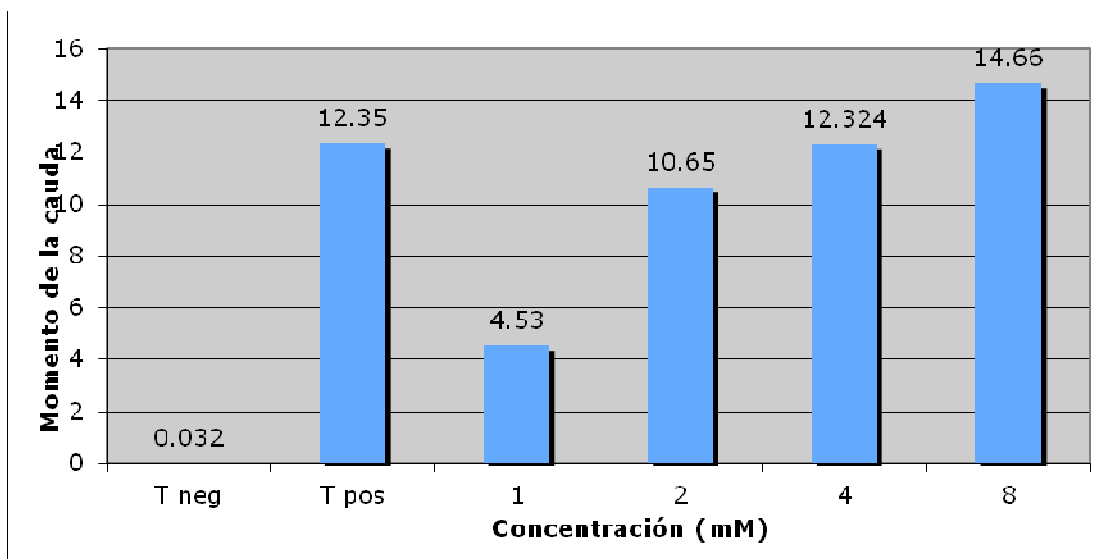


Figura 5. Genotoxicidad detectada por el ensayo cometa en células de raíz de *V.faba* tratadas por dos horas con nitrato de cadmio a diferentes concentraciones.

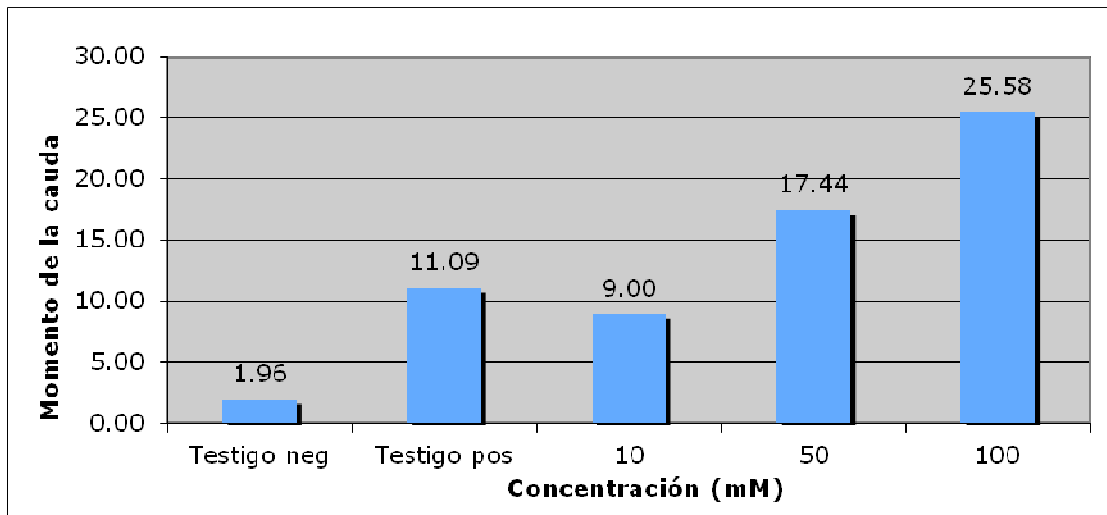


Figura 6. Genotoxicidad detectada por el ensayo cometa en células de *V.faba* tratadas por dos horas con nitrato de níquel a diferentes concentraciones.

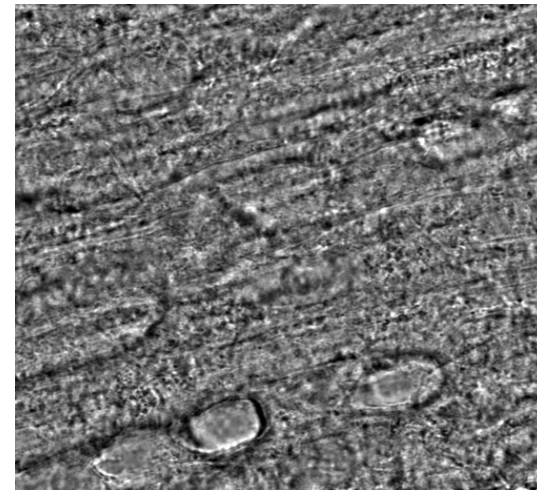
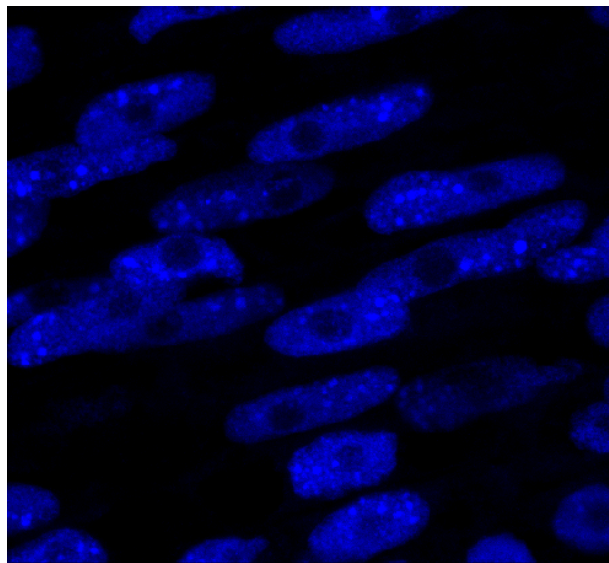
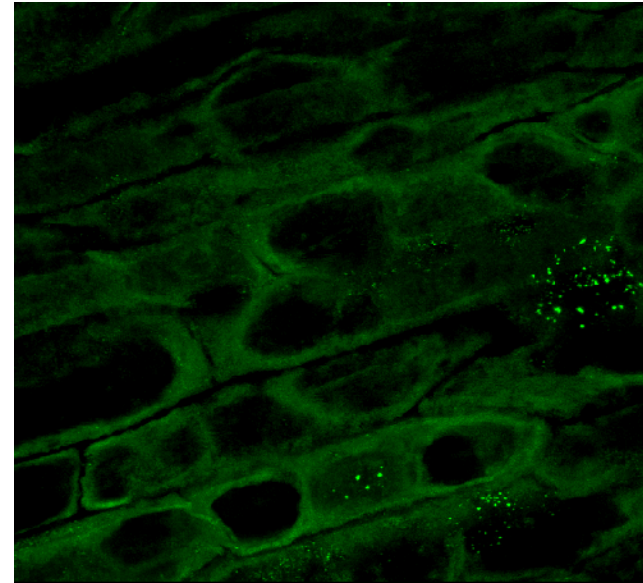
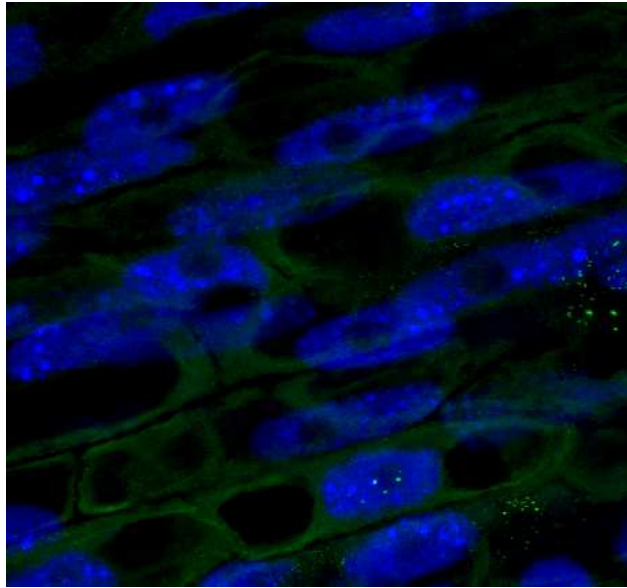


Figura 7. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa-3 en Testigo negativo en células de la raíz de *Vicia faba*.

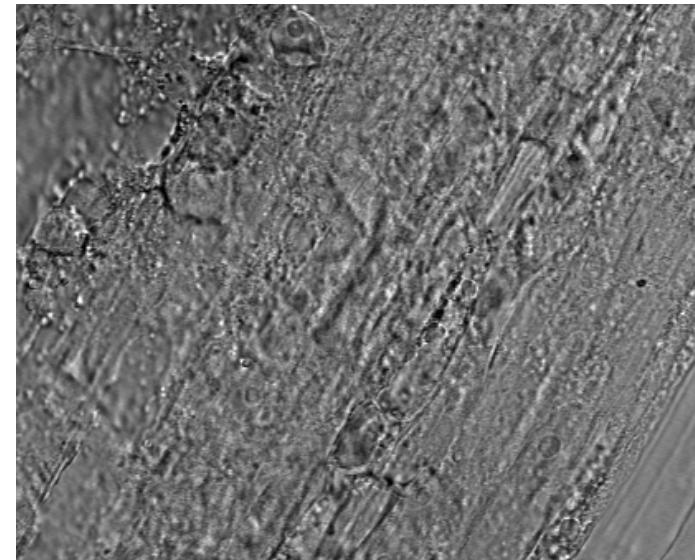
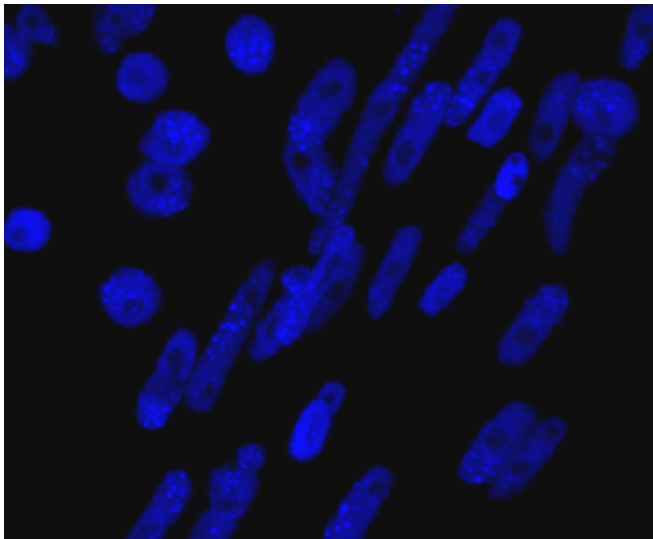
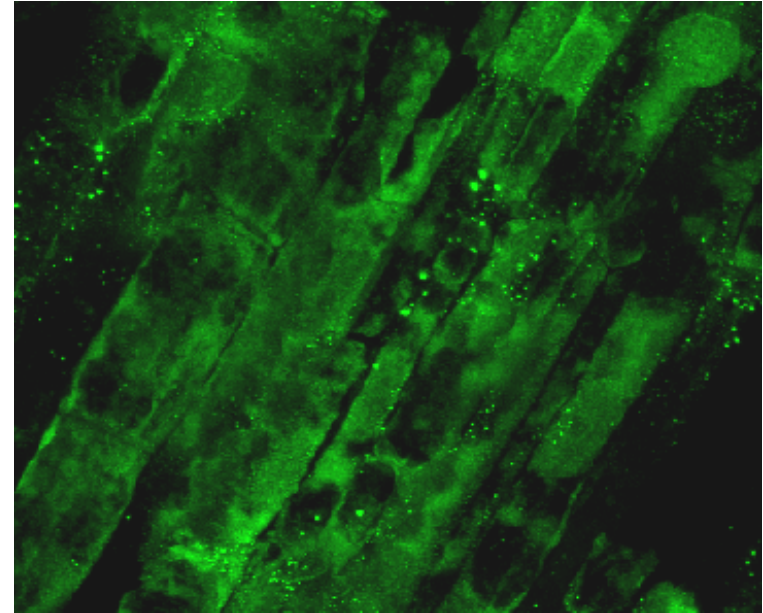
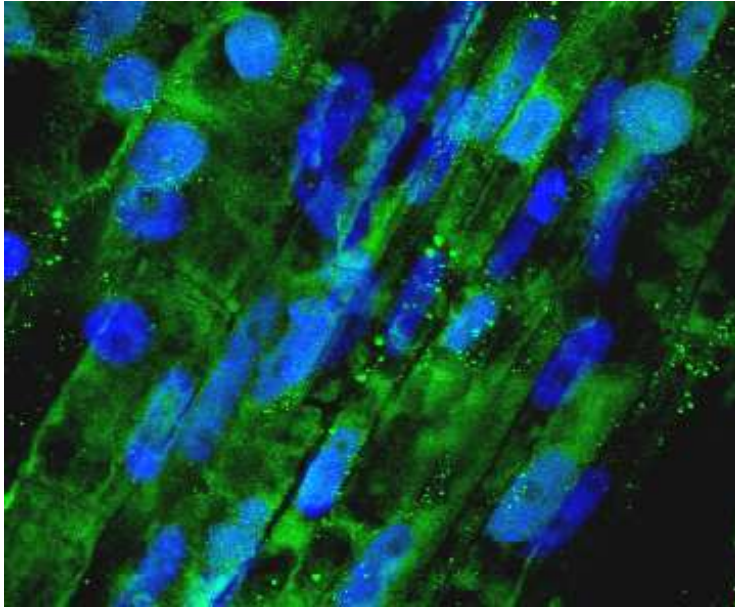


Figura 8. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa-3 Testigo positivo en células de la raíz de *Vicia faba*.

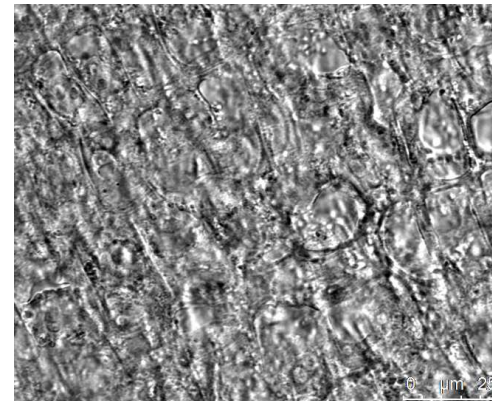
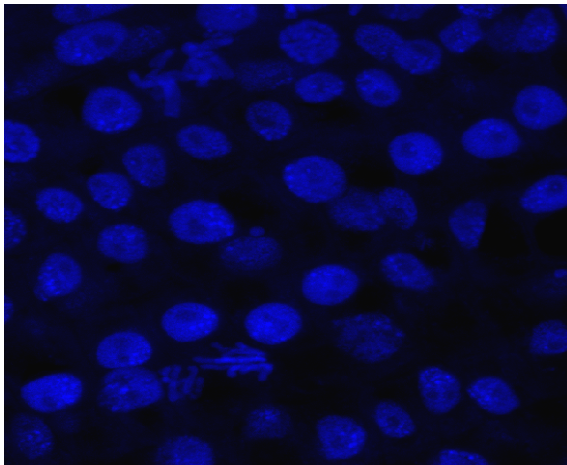
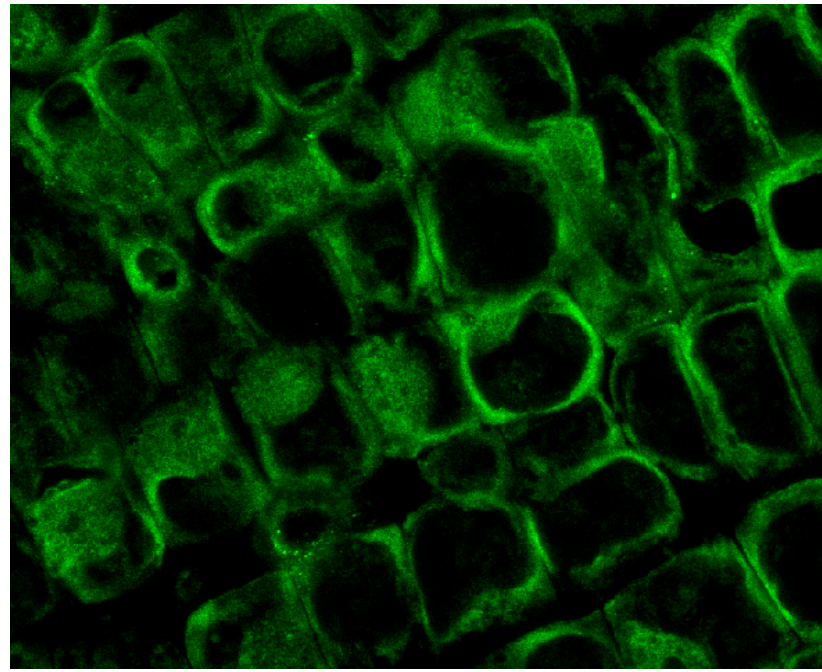
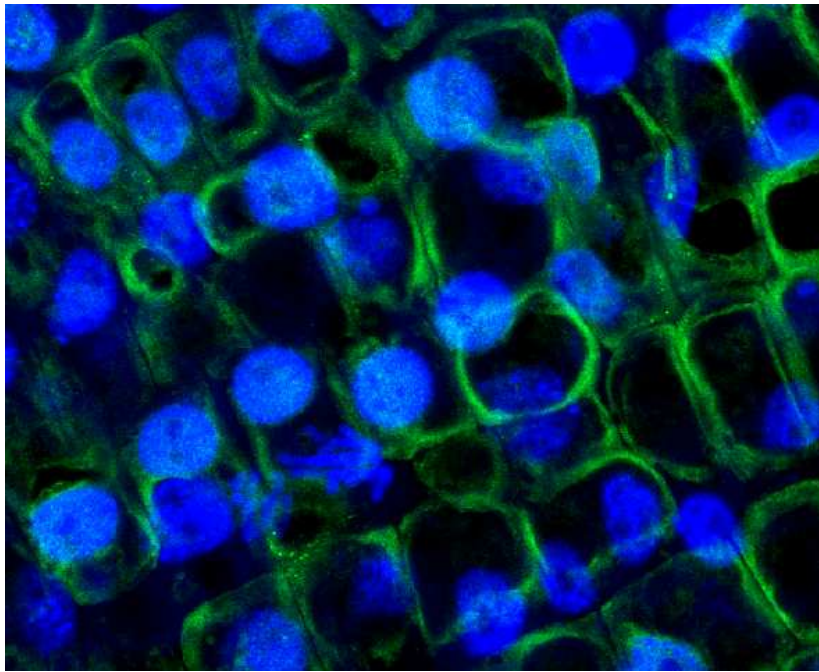


Figura 9. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa-3 Testigo positivo 24 h en células de la raíz de *Vicia faba*.

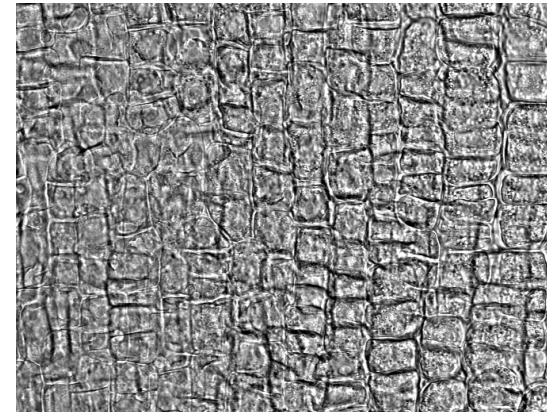
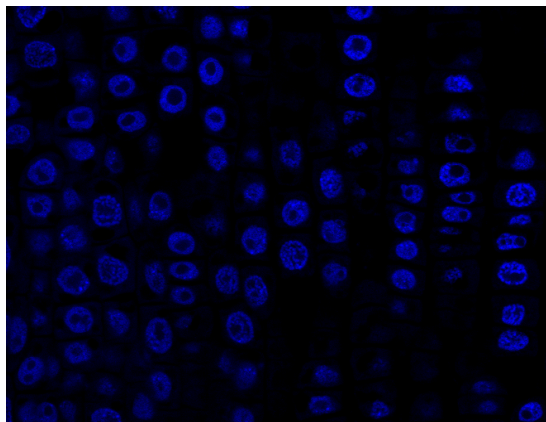
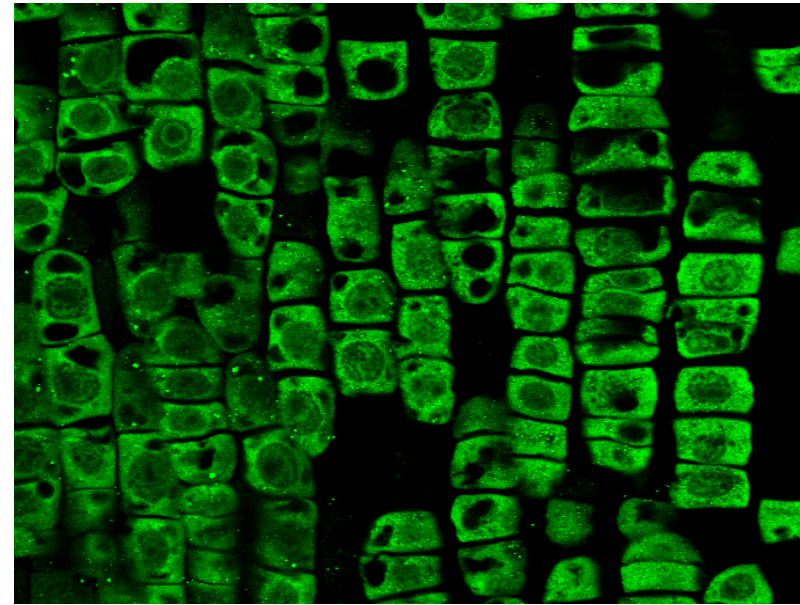
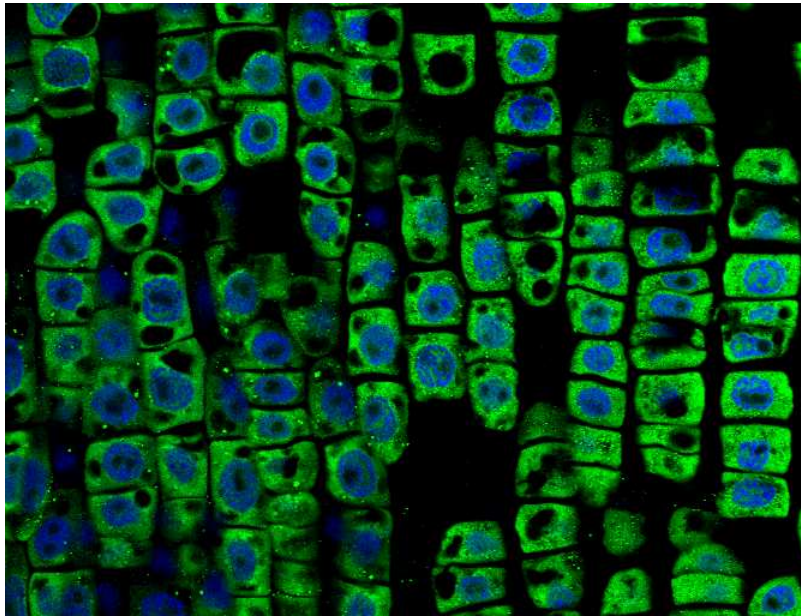


Figura 10. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa -3 en células de la raíz de *Vicia faba*.

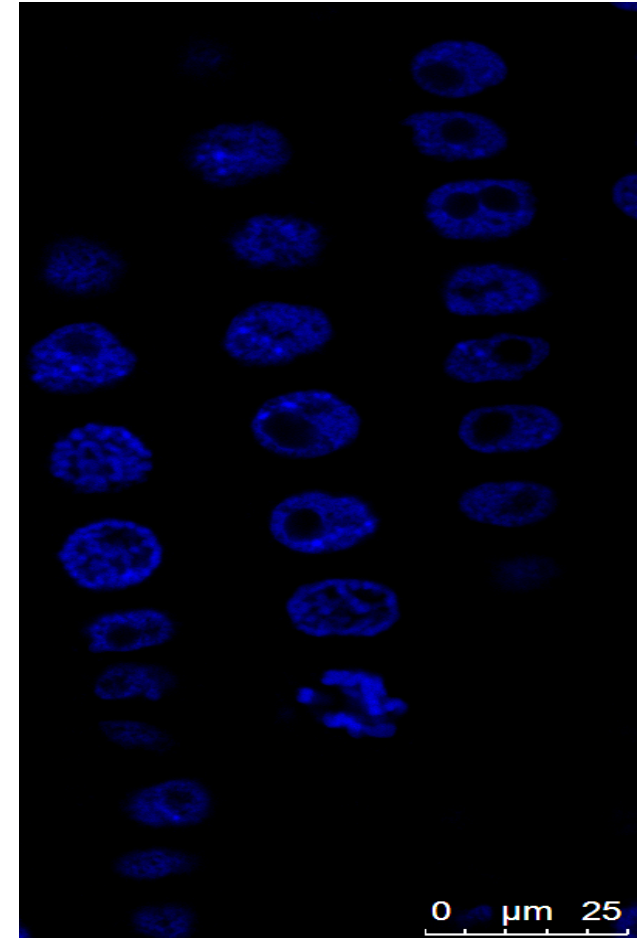
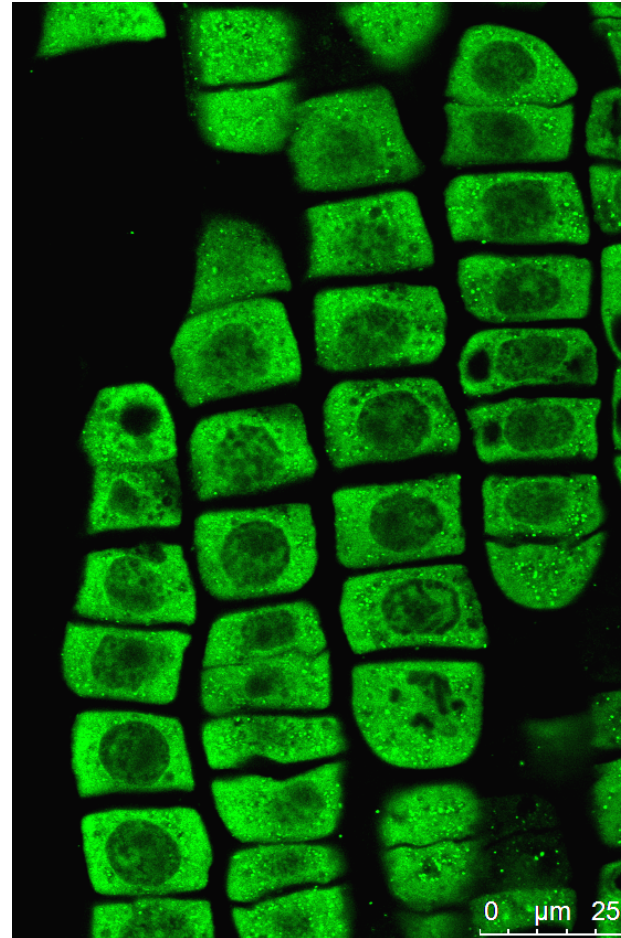
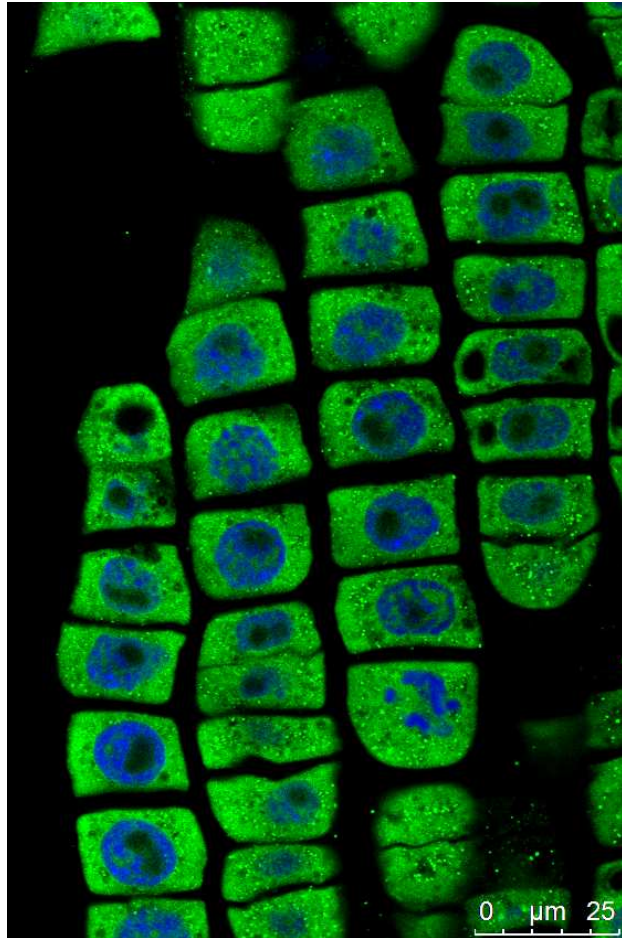


Figura 11 Detección por microscopía confocal de anti Caspasa -3 en células de la raíz de *Vicia faba*.

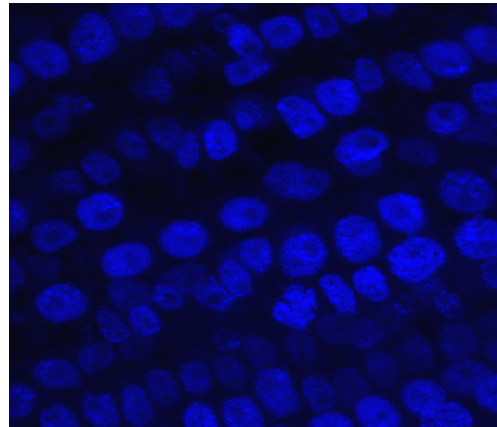
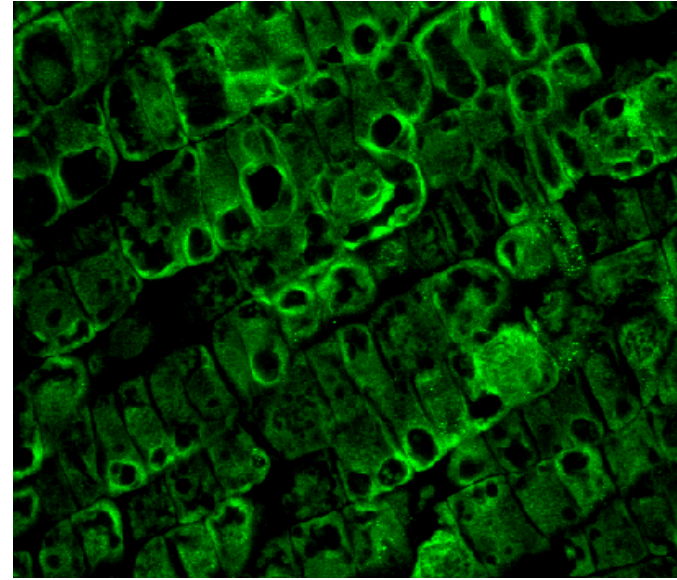
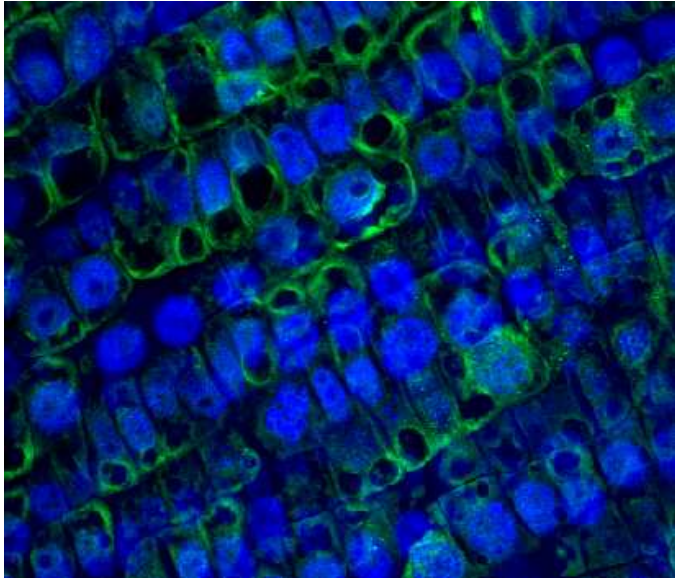


Figura 12. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa- 3 nitrato de níquel 100 mM (2 h) en células de la raíz de *Vicia faba*.

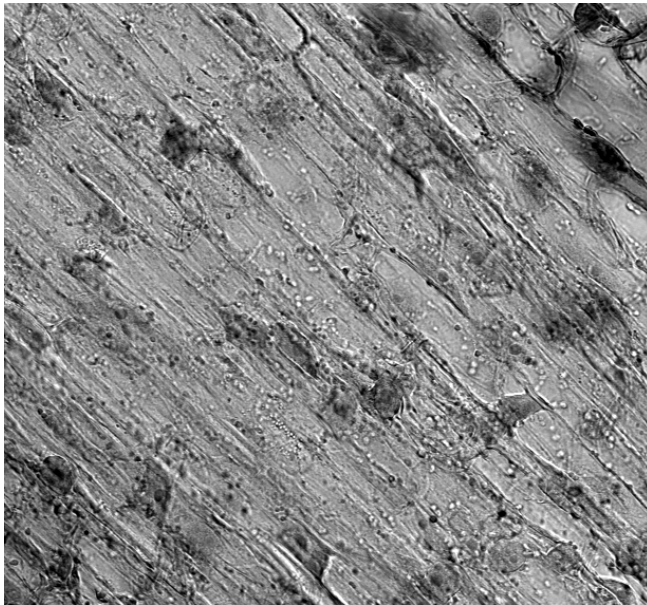
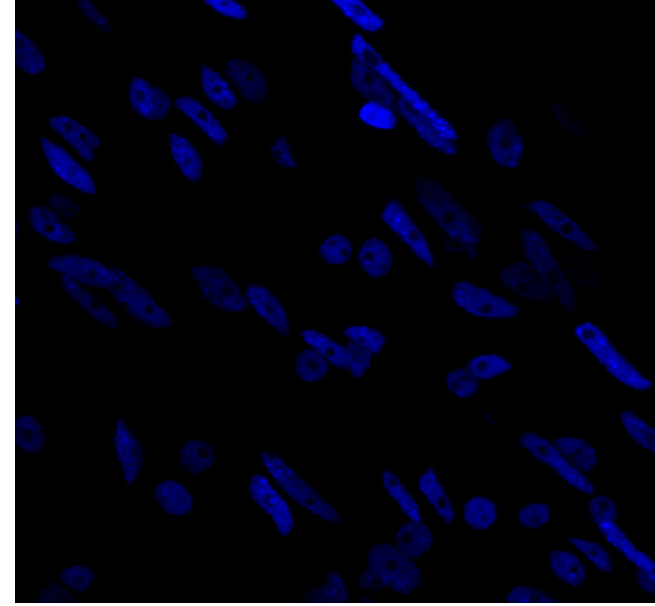
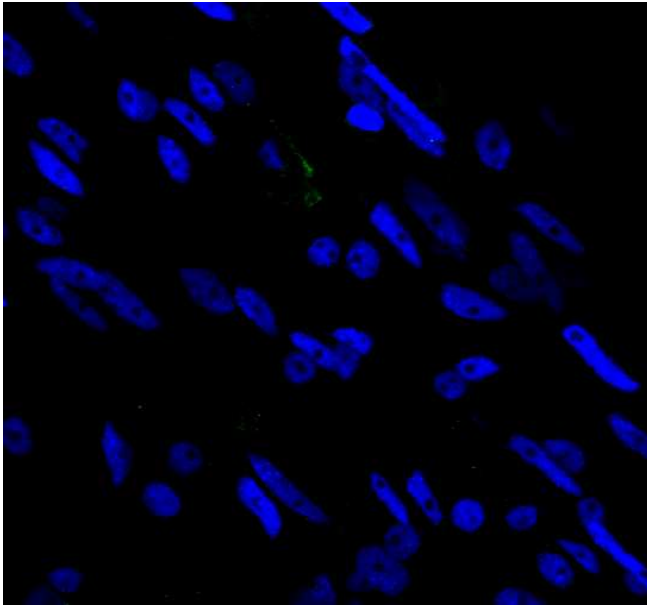


Figura 13. Detección por microscopía confocal de anti Caspasa -3 nitrato de níquel 100 mM (24 h) en células de la raíz de *Vicia faba*.

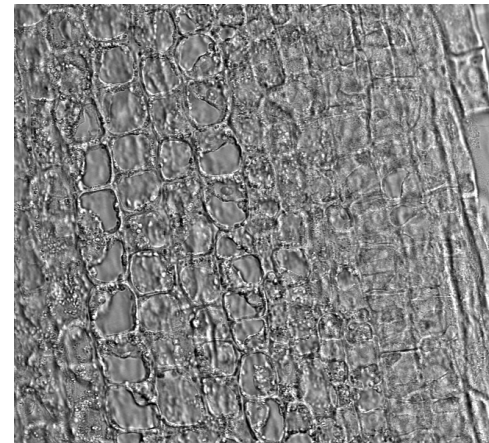
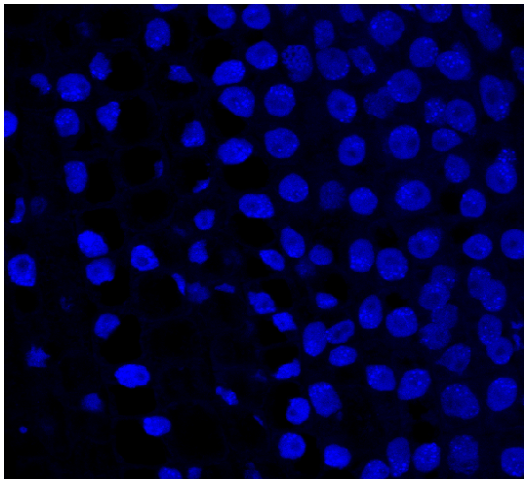
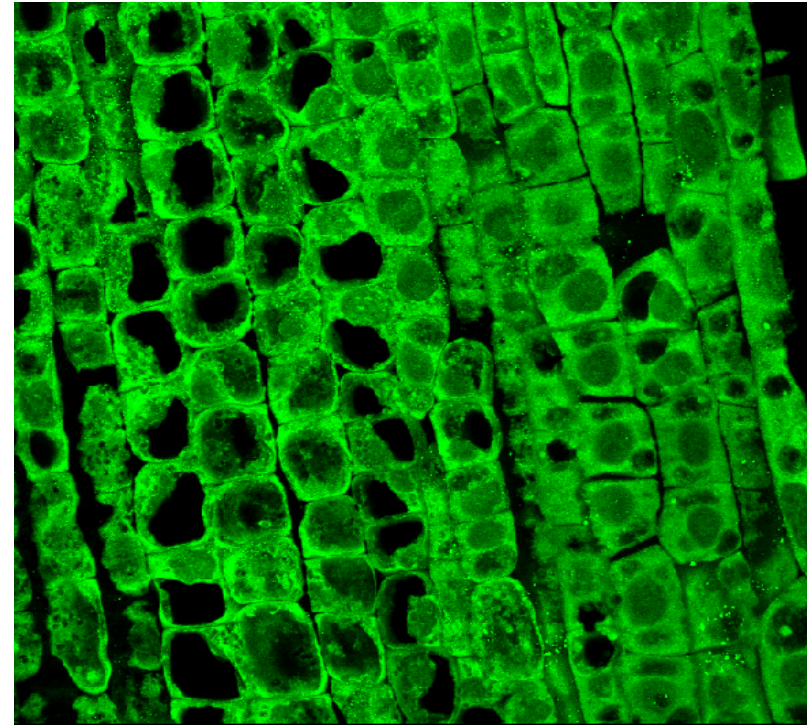
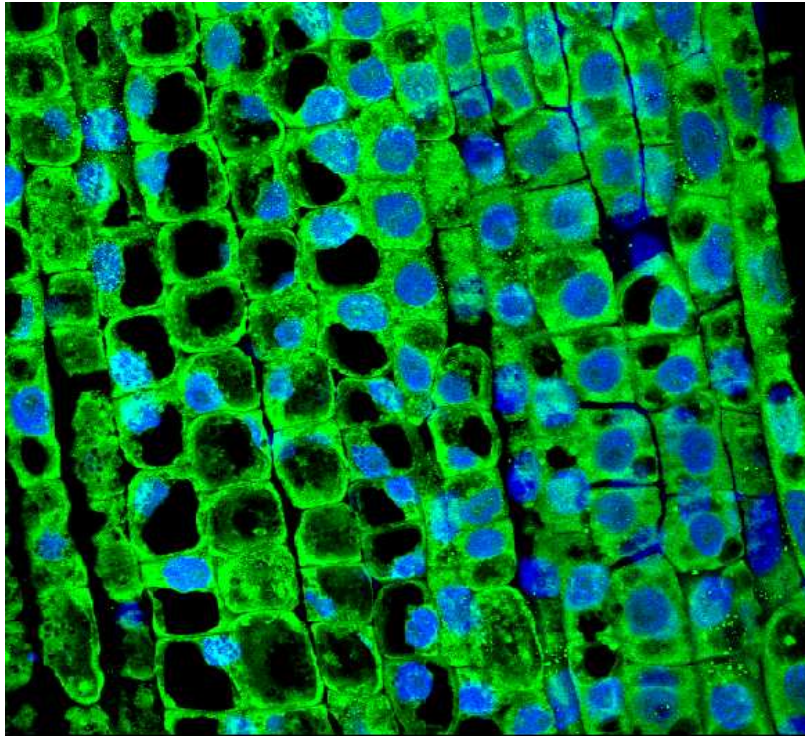


Figura 14. Detección por microscopía confocal de anti ERK Testigo negativo en células de la raíz de *Vicia faba*.

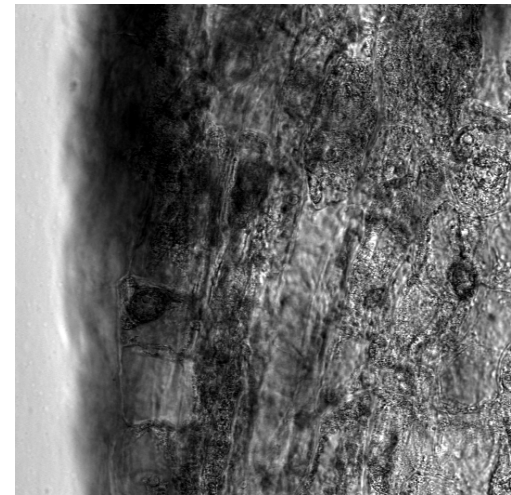
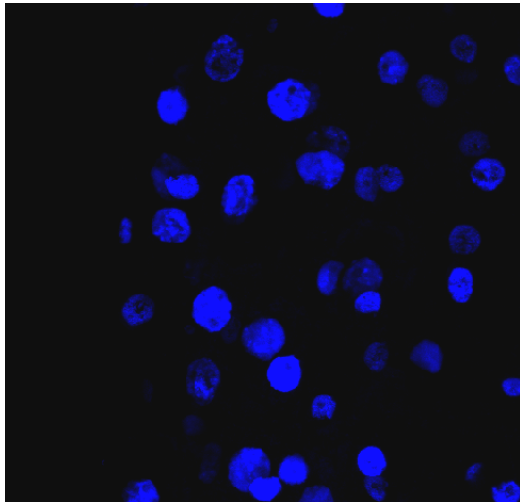
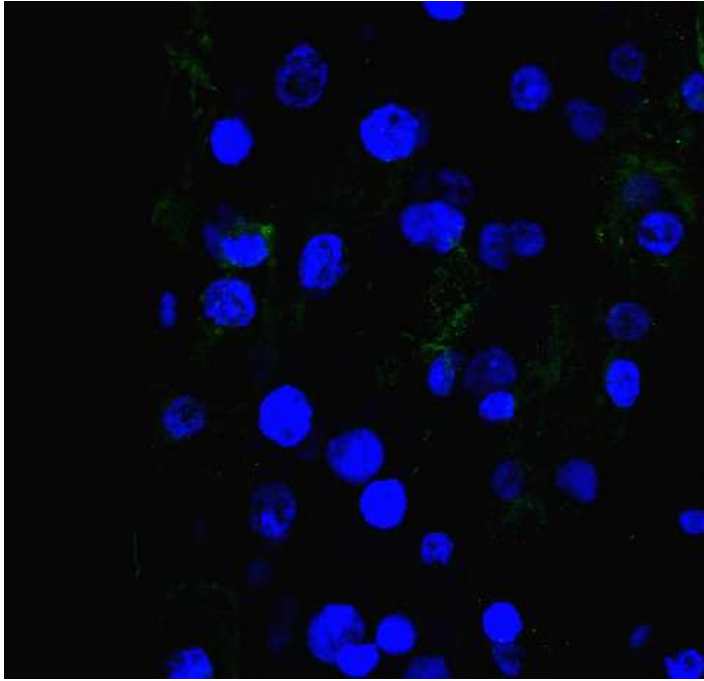


Figura 15. Detección por microscopía confocal de anti ERK Testigo positivo (24 h) en células de la raíz de *Vicia faba*.

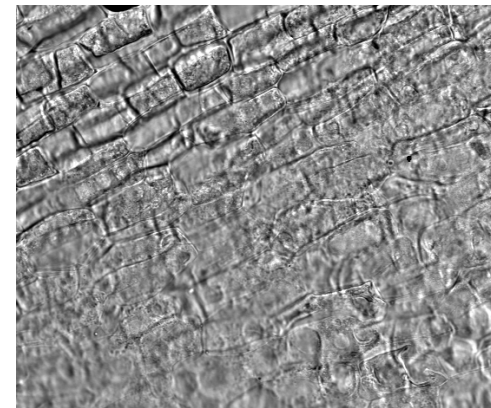
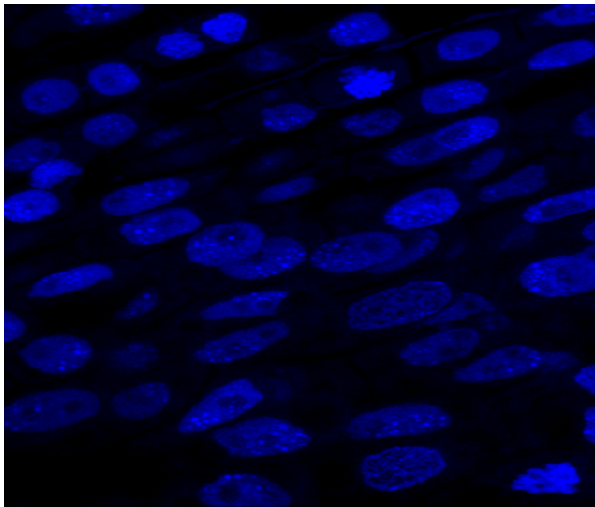
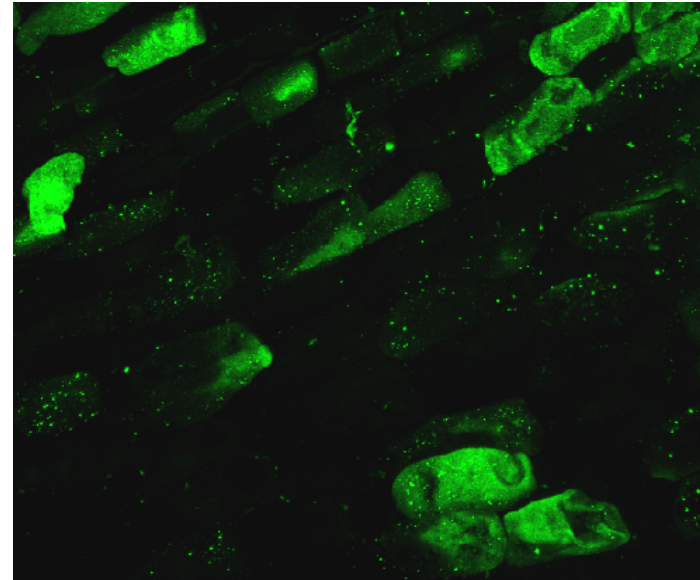
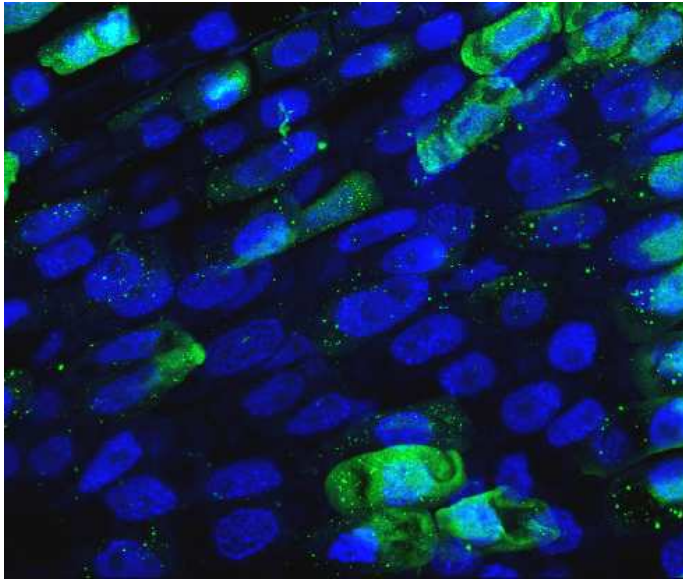


Figura 16. Detección por microscopía confocal de anti ERK nitrato de cadmio 40 mM en células de la raíz de *Vicia faba*.

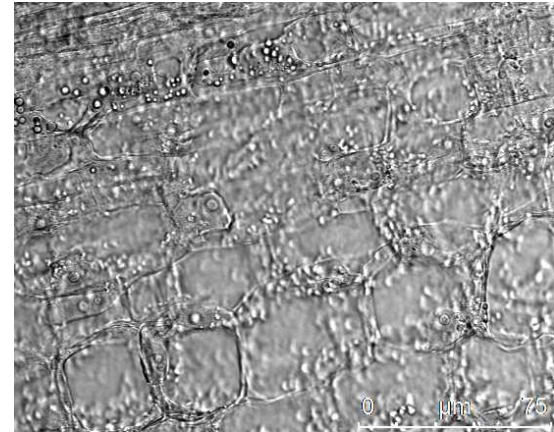
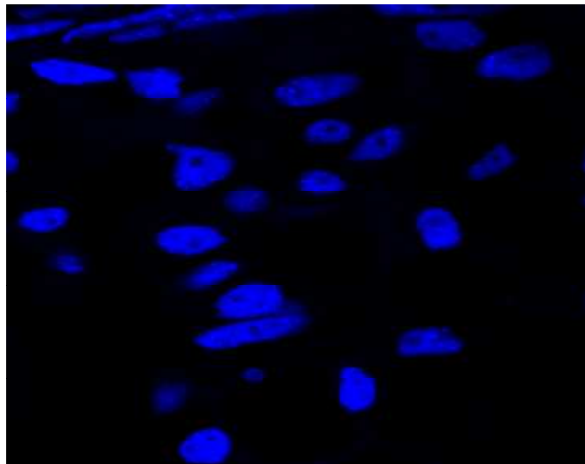
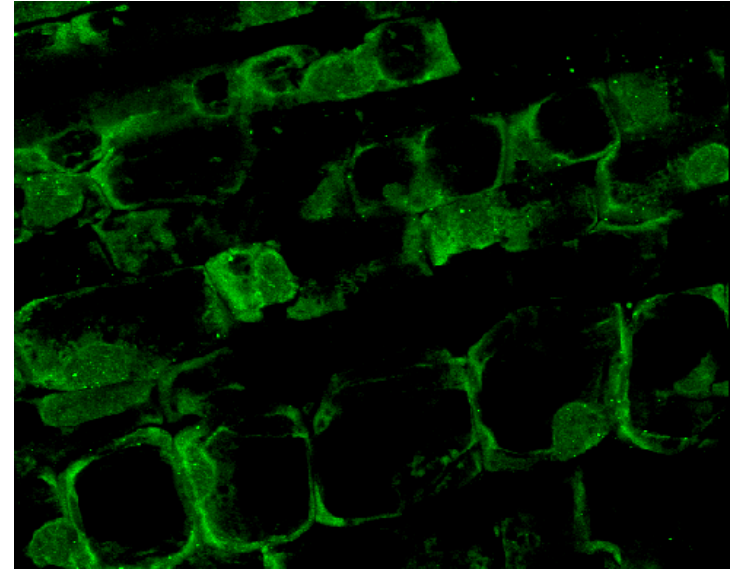
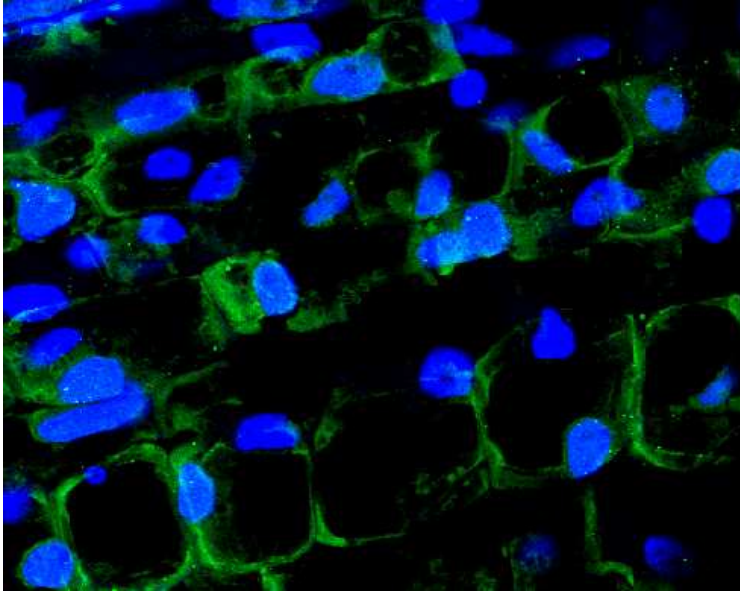


Figura 17. Detección por microscopía confocal de anti ERK nitrato de níquel 100 mM 2 h en células de la raíz de *Vicia faba*.

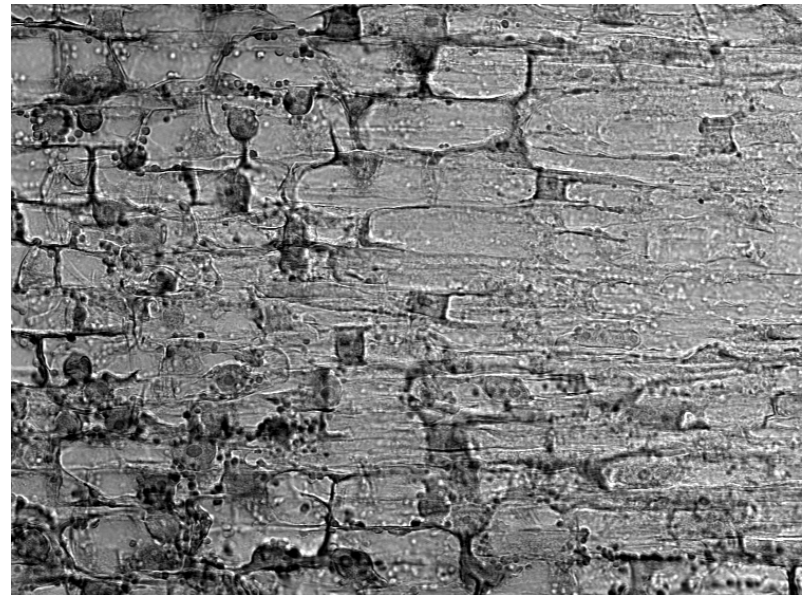
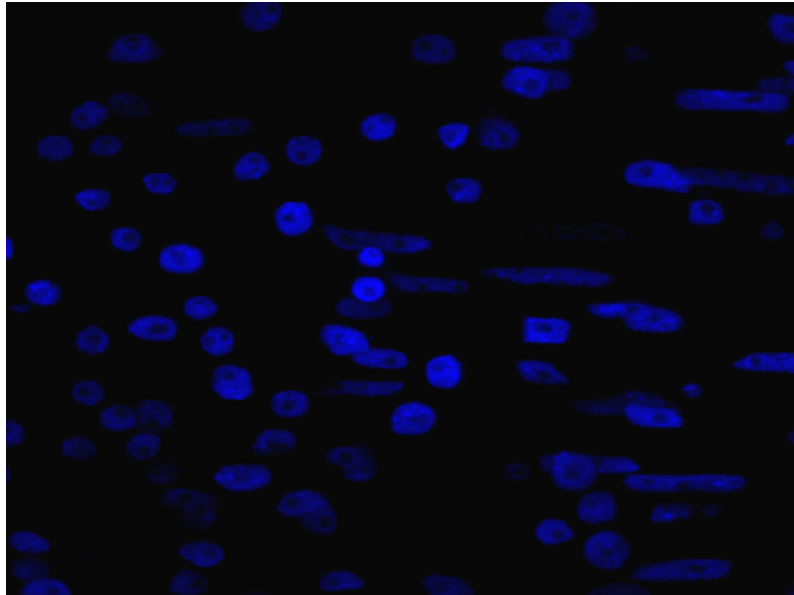
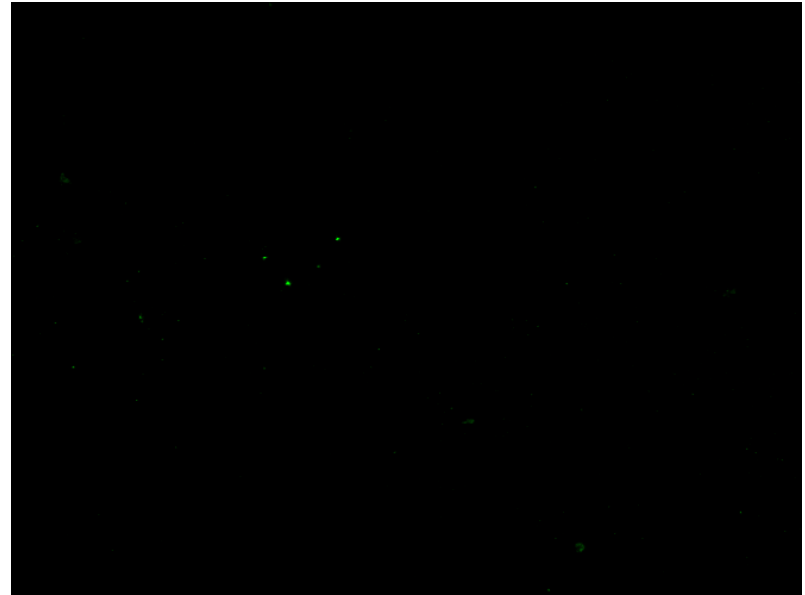
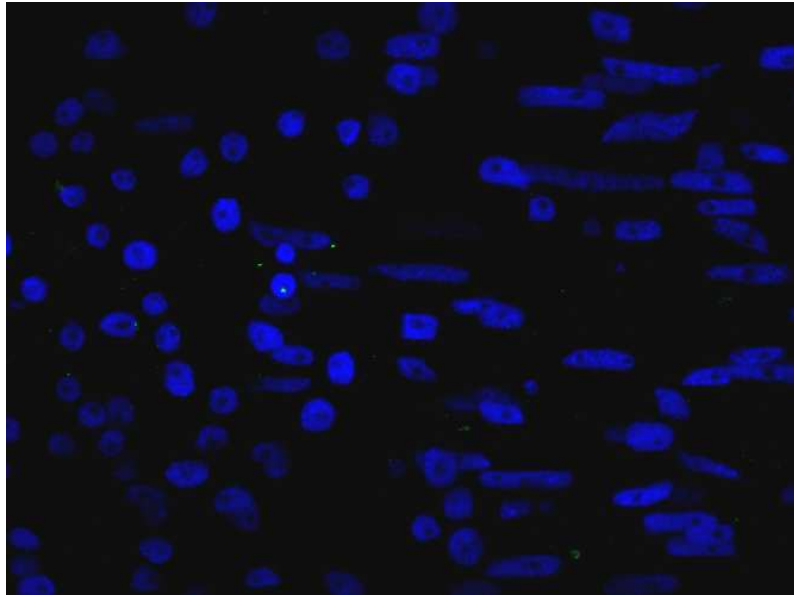


Figura 18. Detección por microscopía confocal de anti ERK nitrato de níquel 100 mM 24 hen células de la raíz de *Vicia faba*.

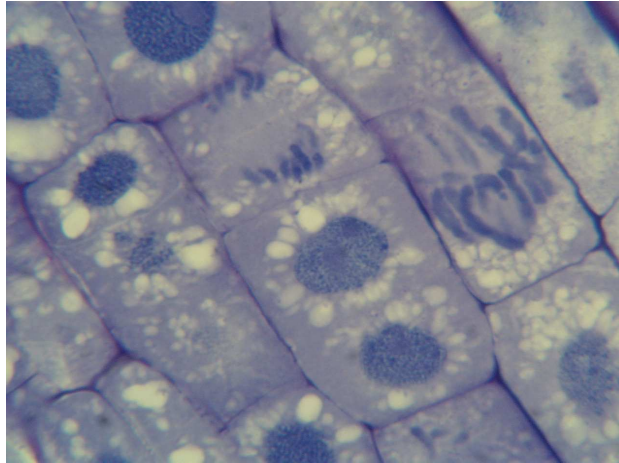


Figura 19. Fotografía de las células de *Vicia faba* en testigo negativo mediante tinción con azul de toluidina.

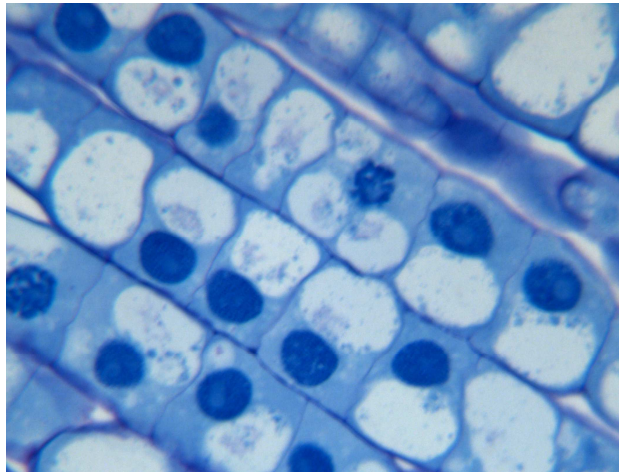


Figura 20. Cambios estructurales de las células de *Vicia faba* después del tratamiento con dicromato de potasio (testigo positivo), mediante tinción con azul de toluidina.

ANEXO

PREPARACION DE SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ENSAYO

Agarosa de punto de fusión normal (NPMA) 1 %	
Reactivo	Cantidad
Agarosa de punto de fusión normal	0.1 g
Agua desionizada	10 mL

Disolver en un frasco de boca ancha, calentar en microondas hasta disolver.
Refrigerar hasta ser usado.

Agarosa de punto de fusión bajo (LPMA)		
Reactivo	Cantidad	
Agarosa de punto de fusión bajo	0.1 g	0.05 g
PBS	10 mL	10 mL
Concentración	1%	0.50%

Disolver en un frasco de boca ancha, calentar en microondas hasta disolver.
Refrigerar hasta ser usado.

Hidróxido de sodio 10 N	
Reactivo	Cantidad
NaOH	20 g
Aforar con agua desionizada	50 mL

Disolver las perlas de NaOH en 40 mL y después ajustar volumen.

EDTA 200 mM (pH 10)	
Reactivo	Cantidad
EDTA	0.74 g

Disolver con ~7 mL de agua desionizada, ajustar el pH y aforar a 10 mL.

Amortiguador de electroforesis	
Solución	Cantidad
NaOH 10 N	30 mL
EDTA 200 mM (pH 10)	5 mL

Llevar la mezcla a 980 mL con agua desionizada, revisar que el
pH = ó >13 y ajustar a 1000 mL.

Solución de lisis	
Reactivo	Cantidad
NaCl	14.6 g
EDTA	3.72 g
Tris	0.12 g
NaOH	0.8 g
DMSO	10 mL
Tritón X-100	1 mL

Disolver los primeros 4 reactivos en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 10 y llevar el volumen a 89 mL. Media hora antes de hacer las laminillas, agregar el Tritón X-100 y el DMSO y enfriar.

Solución de tinción (10X)	
Reactivo	Cantidad
Bromuro de etidio	4 mg
Agua destilada	20 mL

Disolver el bromuro de etidio en polvo y mantener en refrigeración y protegido de la luz.

Tris 0.4 M (pH 7.5)			
Reactivo	Cantidad		
Tris	16.98 g	24.25 g	33.95 g
Agua desionizada	350 mL	500 mL	700 mL

Disolver el polvo en un 75% de agua desionizada, ajustar el pH con HCL 100% aforar y mantener en refrigeración.