

## INDUCCION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CELULAS CHO POR EFLUENTES INDUSTRIALES DE LA VIII REGION. CHILE \*

### Chromosome aberrations in CHO cells induced by industrial effluents in the VIII Region. Chile

W. VENEGAS; M.A. GARCIA; Y M. ALARCON \*\*

#### RESUMEN

El río Bío Bío, que recorre una de las hoyas hidrográficas más importantes de Chile, presenta concentraciones de algunos agentes químicos que sobrepasan los valores máximos establecidos por la norma chilena. La zona terminal del río está altamente industrializada y los efluentes se descargan directamente al río, la mayor parte sin previo tratamiento. Este río es la fuente principal de abastecimiento de agua potable de aproximadamente un millón de personas en la VIII Región.

A objeto de evaluar el posible efecto genotóxico de los efluentes líquidos de una industria de la celulosa y el papel se utilizó un bioensayo de respuesta rápida que utiliza líneas celulares como modelo. Los resultados que aquí se presentan corresponden a ensayos realizados *in vitro* con células de la línea CHO. Se determinó la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas en anafase y telofase, inducidas por diferentes concentraciones del efluente industrial señalado.

Los resultados indican un aumento altamente significativo de daño cromosómico en este modelo. Se discute el alcance de estos resultados y se comparan con los obtenidos, por este y otros efluentes, en otros sistemas biológicos.

#### ABSTRACT

The Bio Bio river, which runs through one of the main hydrographical basins of Chile, presents concentrations of some chemical agents exceeding the maximum levels established by the Chilean norm. The lower part of the river is highly industrialized and effluents are discharged directly into the water, some of them without receiving any kind of treatment. This river is the main hydric resource as drinking water for about 1 million people living in the VIII Region.

In order to evaluate the possible genotoxic effect of the effluents of one paper and mill industry, a quick response bioassay using cell lines as study model was used. The results correspond to *in vitro* bioassays in CHO cells. Frequency of cells presenting chromosome aberrations in anaphase and telophase induced by different concentrations of the industrial effluent in study was determined.

The results indicate a significant increase of chromosome damage. The consequences of these results are analyzed and compared to the ones obtained by this and other industrial effluents, in other biological systems.

**KEYWORDS:** Genotoxicity. Chromosome aberration. Industrial effluent.

\* Financiado por los proyectos FONDECYT 91-0366; 92-0285 y Dirección de Investigación Universidad de Concepción 93.31.49-1.3.

\*\* Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 152-C, Concepción, Chile.

## INTRODUCCION

En Chile aparte de la contaminación urbana de grandes ciudades como Santiago, Valparaíso y Concepción, existe un grave problema de contaminación de los cuerpos de aguas continentales. En efecto, se ha detectado en importantes ríos, lagos y lagunas, concentraciones de algunos agentes químicos que sobrepasan la norma y que provienen de la descarga de desechos industriales, de desperdicios de uso doméstico y del uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas en la agricultura y actividad forestal (Venegas *et al.*, 1990).

Uno de los sistemas hídricos más afectados en Chile es el río Bío Bío. Este representa el recurso dulceacuícola más importante de la VIII Región. Su hoya hidrográfica incluye aproximadamente 24.000 km<sup>2</sup> dedicada principalmente a la agricultura y forestación. En el tercio inferior del río Bío Bío se encuentran instaladas industrias de importancia económica que utilizan grandes volúmenes de agua para sus procesos industriales y los efluentes líquidos descargados al río están provocando un deterioro de la calidad de esos cuerpos de aguas. La gravedad que esto reviste se manifiesta en el hecho de que este río es la principal fuente de agua potable de aproximadamente un millón de personas.

Los estudios sobre contaminación química en aguas continentales en el país han sido muy limitados. En la VIII Región existen antecedentes que indican la presencia de una gran variedad de agentes químicos en el Bío Bío (Sanlés, 1984; Weinert, 1988; Venegas *et al.*, 1990; Céspedes, 1993), sin embargo, no existen antecedentes de investigaciones relacionadas con los efectos genotóxicos de las mezclas complejas de agentes químicos presentes en estos cuerpos de aguas.

El presente trabajo tiene como objetivo detectar el posible efecto genotóxico de los efluentes industriales líquidos de una industria de la celulosa y el papel que descarga sus efluentes al río Bío Bío. Para ello se utilizó un bioensayo de genética toxicológica de respuesta rápida, inducción de Aberraciones Cromosómicas (AC) en Anafase y Telofase (A-T) en células de la línea CHO.

## MATERIALES Y METODOS

El efluente líquido proveniente de la industria fue llevado al laboratorio en una caja térmica en el más breve tiempo a objeto de evitar la degradación o alteración de la muestra. Posteriormente, parte de

ella fue separada para los análisis químicos, por medio de los cuales se determinó la presencia o no de compuestos organoclorados. Otra parte fue utilizada para los estudios de genética toxicológica. Esta última se liofilizó a sequedad y se resuspendió en medio de cultivo, filtrando posteriormente con membrana de 0.4 y 0.2  $\mu\text{m}$ ., a objeto de descartar la presencia de contaminación bacteriana (May *et al.*, 1992). De esta manera, los agentes químicos presentes en el efluente quedaron incorporados al medio de cultivo y disponibles para ser utilizados en los tratamientos de las células CHO en cultivo, que requieren estrictas condiciones de esterilidad.

### Células CHO. Determinación de AC en AT

Células de la línea CHO, provenientes de ovario de Hamster chino (*Cricetus griseus*) se cultivaron en medio Mc Coy 5A, suplementado con suero bovino fetal y antibióticos. El cultivo se hizo a 37°C en una atmósfera saturada de humedad que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. En cada placa de Petri de 60 mm de diámetro se colocó una lámina estéril de 22x22 mm y se sembraron  $1 \times 10^4$  células (Venegas, 1984; Venegas *et al.*, 1985; Galloway *et al.*, 1987). 20 horas más tarde, cuando las células estaban en multiplicación exponencial, se hizo el tratamiento. Las diluciones finales del efluente en el cultivo fueron de 1/5, 1/10 y 1/20 de la concentración original. Con fines comparativos se utilizó como control positivo Etil Metano Sulfonato (EMS) a la concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Como control negativo se utilizó medio de cultivo solo. Los cultivos se montaron en duplicado. Después de 12 horas de tratamiento y sin presencia de colchicina las células se fijan adicionando al medio de cultivo 2 ml de fijador recién preparado constituido por una mezcla de metanol y ácido acético en la proporción de 3:1. Después de 10 minutos, el fijador se reemplaza por fijador fresco. Las láminas se retiran de las placas de Petri y se secan al aire. Al día siguiente se colorea con Giemsa al 3% en buffer fosfato y se montan definitivamente con euparal. 100 células en A-T fueron analizadas bajo fotomicroscopio por concentración determinándose de esta manera la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas inducidas. Se determinó también el índice mitótico (IM), se contó el número de células en división por cada 1.000 células de cada tratamiento, el resultado se expresó en porcentaje (Dulout y Olivero, 1984). El protocolo experimental de base se presenta en la Figura 1.



Figura 1. Protocolo experimental. Cultivo, tratamiento y obtención de preparados histológicos de células CHO tratadas con el efluente industrial.

### Análisis estadísticos

Para determinar si hubo o no diferencias significativas entre la frecuencia de AC inducidas por las diferentes diluciones del efluente, comparadas con el control negativo, los resultados fueron procesados estadísticamente mediante el test de  $X^2$ .

### RESULTADOS

La inducción de AC determinadas en los períodos A-T de células CHO tratadas con muestras de

efluentes de una industria de la celulosa y el papel, se presenta en la tabla I. Se encontraron AC que son características de períodos A-T alterados, tales como fragmentos acéntricos ubicados en el plano ecuatorial de anafases y telofases, puentes anafásicos o telofásicos con o sin fragmentos acéntricos. Además se pudo detectar la presencia de cromosomas rezagados y figuras multipolares. Algunas de las alteraciones encontradas se muestran en la figura 2. En la Tabla II se presenta un análisis estadístico comparativo de la frecuencia de aberraciones inducidas por los efluentes industriales en células CHO.

Tabla I. Frecuencia de AC inducidas en células CHO por afluentes de industrias de la celulosa. Se analizaron 100 células en A-T por dosis

C	IM%	CA	TA	P	FA	SM	AM
Control	5,2	4	4	4	-	-	-
EMS	2,6	60	60	8	4	12	36
DE 1/20	4,4	8	12	4	4	4	-
DE 1/10	3,6	28	40	4	20	16	-
DE 1/5	3,2	40	60	20	20	16	4

C = Concentración; IM = Índice mitótico; CA = Células anormales; TA = Total de aberraciones; P = Puentes anafásicos o telofásicos con o sin fragmentos acéntricos FA = Fragmentos acéntricos y cromosomas rezagados; SM = Segregación multipolar; AM = Alteraciones múltiples; EMS = Etil metano sulfonato; DE = Dilución del efluente industrial.

Tabla II. Análisis estadístico comparativo de las frecuencias de células aberrantes inducidas por las diferentes diluciones del efluente industrial en células CHO.

Control Negativo	**X <sup>2</sup> = 72 p < 0.001			
1/20	**X <sup>2</sup> = 60.2 p < 0.001	X <sup>2</sup> = 1.4 p < 0.30		
1/10	**X <sup>2</sup> = 20.7 p < 0.001	**X <sup>2</sup> = 21.4 p < 0.001	**X <sup>2</sup> = 13.5 p = 0.001	
1/5	*X <sup>2</sup> = 8.0 p < 0.01	**X <sup>2</sup> = 37.0 p < 0.001	**X <sup>2</sup> = 28.0 p < 0.001	X <sup>2</sup> = 3.2 p < 0.1
	Control Positivo	Control Negativo	1/20	1/10

\*\* = Altamente significativo (p < 0.001)

\* = Significativo (p < 0.01)

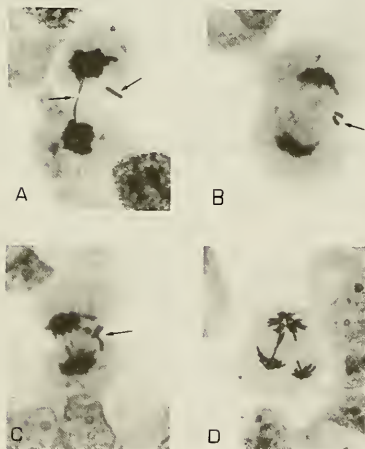


Figura 2. Células de la línea CHO con aberraciones cromosómicas en A-T, inducidas por efluentes de una industria de la celulosa y el papel. A) Las flechas indican la presencia de un puente telofásico y un fragmento acéntrico. B) La flecha indica dos fragmentos acéntricos en una célula en telofase temprana. C) La figura muestra una telofase temprana, en el plano ecuatorial se observa un cromosoma rezagado. D) La microfotografía muestra una anafase tripolar.

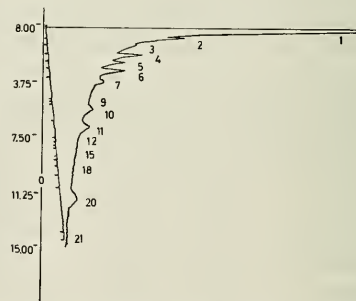


Figura 3. Análisis químico del efluente industrial mediante cromatografía de gas con detector de captura electrónica. Los peaks 4, 5 y 6 muestran la presencia de compuestos organoclorados, probablemente generados en los procesos químicos industriales de deslignificación de la madera.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los estudios de genética toxicológica llevados a cabo en el presente trabajo a través de la medición de aberraciones cromosómicas en A-T en células de la

línea CHO inducidas por efluentes de una industria de la celulosa y el papel, muestran como resultado una clara actividad genotóxica. La frecuencia de ACs inducidas por las diluciones de 1/5 y 1/10 de la concentración original del efluente industrial, muestran una respuesta estadística altamente significativa si se les compara con los resultados obtenidos con el control negativo; cuando el efluente se diluye en 1/20, si bien hay un aumento en el índice de aberraciones cromosómicas, la diferencia con el control negativo no es estadísticamente significativa. Los resultados anteriores están en íntima relación con el IM. En efecto, este valor es menor a menor dilución del efluente industrial, por lo tanto, hay una mayor citotoxicidad cuando el efluente industrial está más concentrado. Los tipos de daños genéticos inducidos por este efluente industrial ponen en evidencia la presencia de agentes clastógenos en esta mezcla compleja de agentes químicos; la alta frecuencia de puentes y fragmentos acéntricos observada es un indicador de lo señalado. Por otro lado, la detección de cromosomas rezagados está sugiriendo la presencia de otro tipo de agente químico cuyo probable mecanismo de acción sea el de actuar como venenos mitóticos, interfiriendo en la polimerización de las proteínas, que como la tubulina, intervienen en la formación de los microtúbulos que tienen su origen en el cinetocoro (Berkaloff *et al.*, 1981; Rattner, 1991). De esta manera estos compuestos impiden el desplazamiento de algunos cromosomas en la anafase, quedando estos retenidos en el plano ecuatorial; en la nomenclatura oficial se les conoce con el nombre de cromosomas rezagados (Figura 2C). Es importante señalar, además, que la detección relativamente alta de figuras multipolares estaría indicando la presencia, en estos efluentes, de moléculas que actúan interfiriendo en la génesis y/o funcionamiento parcial o alterado de los complejos centriolares. Una de las actividades fisiológicas más importantes de estos es la de regular o controlar el plano divisional de la célula. En este caso, esta actividad se ve notoriamente alterada por esos agentes químicos que actúan a este nivel induciendo la formación de figuras tripolares, tetrapolares y multipolares (Figura 2D).

Cabe señalar que en las actividades llevadas a cabo en esta investigación no se consideraron experiencias con activadores metabólicos, por lo tanto, aquí sólo se midió la presencia de mutágenos directos. El uso de S9-mix podría haber generado una respuesta mayor del efecto clastógeno detectado. La acción enzimática pudo haber puesto de manifiesto la presencia de promutágenos o mutágenos indirectos

que requieren la presencia de un activador metabólico para ponerse en evidencia.

El atenuante a lo que se informa en esta investigación, está en que estos efluentes sufren una gran dilución en contacto con el cuerpo de agua receptor, en este caso el río Bío Bío, pero es necesario recalcar que los volúmenes de efluentes vertidos por el total de industrias de la celulosa y el papel al río Bío Bío son muy elevados, alrededor de 200.000 m<sup>3</sup>/d. por cada industria; se deduce por lo tanto, que hay un flujo permanente de esta mezcla de agentes químicos que es llevado por el río Bío Bío y algunos de sus afluentes, hasta el mar.

El test de A-T en células de la línea celular CHO exhibe una serie de ventajas como modelo experimental, entre las que destacan el bajo costo de realización, es un bioensayo de respuesta rápida, las células utilizadas para el recuento de aberraciones cromosómicas no sufren ningún tipo de alteración por manipulación del experimentador ya que ellas crecen, se desarrollan y dividen en las láminas estériles colocadas en las placas de Petri de cada experiencia. Además, con este bioensayo, es posible detectar no sólo la presencia de agentes químicos clastógenos en un ambiente acuático contaminado, sino la presencia de agentes químicos que actúan perturbando las actividades del huso mitótico, efecto que no es posible detectar con ningún otro test citogenético. En lo referente a la sensibilidad para detectar compuestos mutagénicos, este test ha sido comparado favorablemente con el test de Ames y el test de Intercambio de Cromátidas Hermanas (Kocan *et al.*, 1982).

Las actividades clastógenas demostradas y las otras que intervienen alterando la fisiología normal de la división celular se pueden explicar si se considera que en estos efluentes industriales se detectó la presencia de algunas moléculas de acción mutagénica. En efecto, los análisis químicos de estos efluentes revelaron la presencia de varios tipos de compuestos organoclorados, tal como se muestra en la Figura 3. Es interesante señalar que en otras investigaciones en que se utilizaron otros modelos experimentales, con los mismos efluentes, los resultados son del mismo orden de magnitud, habiendo diferencias que se explican dado el diferente grado de sensibilidad de los modelos biológicos utilizados (Venegas *et al.*, 1993; Venegas *et al.*, 1993a; Venegas, 1993b; Mondaca, *et al.*, 1993). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Nestmann, 1979, 1980, 1983, 1984, 1985; Monarca, 1984; Langi, 1988; Stewart, 1992) que informan efectos genotóxicos en otros sistemas biológicos,

inducidos por efluentes de la industria de la celulosa y el papel, en algunos países del Hemisferio Norte.

En relación a los efectos genotóxicos determinados tanto *in vitro* como *in vivo*, de éste y otros efluentes industriales de la celulosa y el papel en Chile, la situación es considerada preocupante si se tiene en consideración que cuando estas plantas están descargando al río en condiciones de bajo caudal, ciertamente están ejerciendo una fuerte presión sobre el equilibrio biológico del curso del agua. Se debe tener en cuenta que entre los años 1991-1992 se duplicó la capacidad de producción y, en consecuencia, independientemente de que las plantas estén dotadas de dispositivos anticontaminantes, hay un notable incremento de la cantidad de contaminante total descargado. De acuerdo a los resultados obtenidos de campañas analíticas realizadas por el proyecto EULA durante 1991 y 1992, se puede estimar que el aporte de DQO al río, solamente por parte de las industrias de la Celulosa y Papel, es de 325 toneladas de DQO por día, esto equivale a la descarga de aguas servidas urbanas no tratadas de una población de aproximadamente 3 millones de

habitantes. Una carga contaminante de esta magnitud es ciertamente una fuerte influencia en la calidad del agua del cuerpo receptor (Céspedes, 1993).

Este aumento de la carga contaminante pone a prueba la capacidad autodepuradora del río Bío Bío. Sobre todo preocupa el problema de los compuestos organoclorados, por sus efectos a mediano y largo plazo sobre la biocenosis acuática y, en especial, los derivados del consumo de agua por el hombre. Es indispensable que se preste extrema atención a este problema con un control sistemático de los AOX en el agua y los sedimentos. Considerando que el agua superficial es destinada a diferentes usos, uno de ellos, el aprovisionamiento de agua potable de las poblaciones que viven en la parte terminal del río, no puede olvidarse los problemas causados por la presencia de importantes cantidades de AOX, cloratos y reductores. Teniendo en cuenta los usos a los cuales el agua del río está destinada, debe mantenerse una extrema cautela en las proyecciones a futuro de establecimientos industriales de este tipo y cuyos efluentes sean descargados al río Bío Bío.

## BIBLIOGRAFIA

- Berkaloff, A., Bourguet, J., Favard, N., Lacroix, J.-C. 1981. Biologie et Physiologie cellulaire. Tomo III. Hermann Editeurs. Paris. Págs. 1-181.
- Céspedes, J., Munari, S., Rivera, S. 1993. La industria de la Celulosa y el Papel en la Región del Bío Bío. Informe de subproyecto. Proyecto EULA. En prensa.
- Dulout, F., Olivero, F. 1984. Anafase-Telofase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. Environmental Mutagenesis. 6: 299-310.
- Galloway, S., Armstrong, M., Reuben, C. 1987. Chromosome aberrations and SCE in CHO cells. Evolution of 108 chemicals. Env. Mol. Mut. 10: 1-175.
- Kocan, R.M., Landolt, M.L., Sabo, K.M. 1982. Anaphase aberration: A measure of genotoxicity in mutagen-treated fish cells. Environ. Mutagen. 4: 181-189.
- Langi, A., and Priha, M. (1988). Mutagenicity in pulp and paper mill effluent and in recipient. Water Sci. Technol., 20: 143-152.
- May, W.E., Benner, B.A., Wise, S.A., Schuetzle, D. and Lewtas, J. 1992. Standard reference materials for chemicals and biological studies of complex environmental samples. Mut. Res. 276: 11-22.
- Monarca, S., Hongslo, J., Kringstad, A and Carlber, G. 1984. Mutagenicity and organic halogen determination in body fluids and tissues of rat treated with drinking water and pulp mill bleaching effluent concentrates. Chemosphere. 13: 1271-1281.
- Mondaca, M.A., Herrera, R., and Venegas, W. 1993. Genotoxicity assessment of industrial effluent from the Bio-Bio river. Concepción. Chile. Enviado a la revista Environmental Toxicology and Water Quality.
- Nestmann, E.R., Lee, E.G., Mueller, J.C., and Douglas, D. J. 1979. Mutagenicity of resin acids identified in pulp and paper mill effluents using the Salmonella/mammalian-microsome assay. Environ. Mutagen. 1: 361-369.
- Nestmann, E.R., Lee, E.G., Matula, T.I., Douglas, G.R. and Mueller, G.R. (1980) Mutagenicity of constituents identified in pulp and paper mill effluents using the Salmonella/mammalian-microsome assay. Mutat. Res. 79: 203-212.
- Nestmann, E.R., and Lee, E.G. 1983. Mutagenicity of constituents of pulp and paper mill effluent in growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 119, 273-280.
- Nestmann, E.R., Kowbel, D.J., Kamraa, O.P. and Douglas, G.R. 1984. Reduction of mutagenicity of pulp and paper mill effluent by secondary treatment in an aerated lagoon. Hazard Waste. 1: 67-72.
- Nestmann, E.R., and Lee, E.G. 1985. Genetic activity in *Saccharomyces cerevisiae* of compounds found in effluents of pulp and paper mills. Mutat. Res. 155: 53-60.

- Rattner, J.B. 1991. The structure of the mammalian centromere. Review. *Bio Essays*, 13 (2): 51-56.
- Sanlés, C. 1984. Contaminación por mercurio de las aguas del río Bío Bío. Tesis de Magister con mención en Saneamiento Ambiental. Departamento de Salud Publica. Universidad de Chile. Págs. 1-76.
- Stewart, H.V. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A Review. *Mutat. Res.* 277: 91-138.
- Venegas, W. 1984. Relation entre la structure chimique et les activites mutagene et carcinogene de cinq naphthofurannes. Etude dans une batterie de test. Tesis de Doctorado. Universidad de París VII. Francia. Págs. 1-173.
- Venegas, W., Lasne, C., Lowy, R., Buisson, J-P., and Choroulinkov, I. 1985. Naphthofurans induced chromosomal aberrations detected in metaphase and telophase V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 157: 53-62.
- Venegas, W., Hermosilla, I., Gavilán, J.F. Almonacid, E., Venegas, V. 1990. Amphibians and plants as model for detection of genotoxic and teratogenic agents present in continental water bodies of Chile. *Revista Latinoamericana de Genética*. 1: 169-179.
- Venegas, W., Hermosilla, I., Quevedo, L., Montoya, G. 1993. Genotoxic and teratogenic effect of pentachlorophenol, pollutant present in continental water bodies in the south of Chile. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 51(1): 107-114.
- Venegas, W., Alarcón, M., Duk, S., Valladares, J. Hermosilla, I. 1993a. Actividad genotóxica de efluentes líquidos no concentrados provenientes de la industria de la celulosa y el papel en Chile. Informe final proyecto FONDECYT-91-0366. Anexo 2. Págs. 1-25.
- Venegas, W. 1993b. Micronúcleos y aberraciones cromosómicas en *Allium cepa* inducidos por agentes químicos presentes en efluentes de la industria de la celulosa y el papel. VIII Región, Chile. Informe final proyecto FONDECYT- 91 - 0366. Anexo 2. Pás 1-26.
- Weinert, O. 1988. Río Bío Bío: Información disponible y requerimientos sobre calidad del agua. Origen, uso y perspectivas del río Bío Bío. Tomo I. 61-70.