

INTERFERENCIA DEL CICLO CELULAR POR ACCION DE
CLORURO DE CADMIO SOBRE MERISTEMAS RADICULARES
SECUNDARIOS DE *VICIA FABA* L. MODIFICACION DEL
INDICE MITOTICO*

Cellular cycle interference caused by Cadmium chloride on *Vicia faba* L.
secondary radicular meristemes: mitotic index modification.

MARIO I. ALARCON A., GUIDO CEA C.** y ALDO RODRIGUEZ E.***

RESUMEN

Se hace un estudio de las interferencias sobre el desarrollo del ciclo celular, como también de las acciones clastógenas del cloruro de Cadmio en meristemas radicales secundarios de *Vicia faba* L. En las condiciones experimentales planteadas se detecta un efecto inhibitorio sobre el Índice Mitótico (I. M.) del cloruro de Cadmio. No existe proporcionalidad entre los valores del I. M. y la absorción del cloruro de Cadmio por los meristemas radicales, determinados por absorciometría atómica. Así mismo, no se observan alteraciones clastógenas.

ABSTRACT

A study of the interferences on the cellular cycle development and the clastogenics action of Cadmium chloride on secondary root tips of *Vicia faba* L. is made. Under the experimental conditions used, an inhibitory effect on the Mitotic Index (M. I.) is detected. There is no proportionality between the M. I. values and Cadmium chloride absorption in the root tips determined by atomic absorptiometry, neither clastogens alterations are observed.

Keywords: *Vicia faba*. Cellular cycle. Cadmium. Mitotic index. Mutagenesis.

INTRODUCCION

Estudios sobre acciones tóxicas en circuitos biológicos por incorporación de sales de Cadmio ha sido informado desde comienzos de siglo y generalmente asociado a acciones de otros metales pesados, productos de desechos o contaminantes industriales considerados ellos en seres vivientes como oligoelementos no esenciales.

*Proyecto 2.08.78. Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Concepción.

**Depto. Biología Celular. Instituto de Biología. Universidad de Concepción.

***Depto. Análisis Instrumental. Escuela de Química y Farmacia. Universidad de Concepción.

Los procesos de incorporación de estos elementos a sistemas biológicos superiores se producen en poblaciones en contacto con los desechos señalados, o bien por nutrición deficiente y poco variada en sitios geográficos en donde estos elementos están significativamente representados. Así lo informan principalmente las investigaciones realizadas por Schroeder, H. A. y Balassa, J. J. (1961); Kendrey, G. y Roe, F. J. C. (1969); Nilsson, R. (1970); Flick, D. F. (1971); John, M. K. (1972); Buchauer, M. J. (1973).

En líneas generales, hoy en día es cada vez más compleja la presencia de abundantes polutantes ambientales y que llega por vía inaparente a los seres vivos.

La información bibliográfica destaca la acción del Cadmio, como agente contaminante significativo en muchas áreas geográficas, señalándose que sus acciones, además de tóxicas, pueden llegar a ser mutágenas. Así, ha sido preocupación de muchos investigadores detectar estos efectos. (Bui, T. H. y Lindsten, J. (1975); Parizek, J. (1961); Schroeder, H. A. et al (1967); Miller, W. J. y Lampp, B. (1967). Ante la significancia de estos resultados se ha extendido sus estudios a los efectos teratogénicos. Fern, V. M. y Carpenter, S. J. (1967); Holmberg, E. R. et al (1969); Ishizu, S. y Miname, M. (1972); Barr, M. (1973); Chernoff, N. (1973).

En análisis espectrográficos se ha revelado concentraciones de Cadmio variables en distintas poblaciones que están relacionadas con el tipo de alimentación (en Estados Unidos 40 miligramos por Kg. de peso húmedo, Japón, 80 miligramos por Kg. de peso húmedo). (Schroeder, H. A. y Balassa, J. J. (1961).

En estas condiciones y ante la ingesta en forma significativa de este elemento en forma inaparente parece importante detectar sus acciones que vayan más allá de los niveles tóxicos, ya que está claramente determinado la selectividad que tiene el Cadmio por el tejido testicular de mamíferos y la necrosis que produce en él, lo que conlleva la esterilización en los machos (Parizek, J., 1961).

La acción tóxica del Cadmio se centra en los testículos y riñones, siendo los primeros los más sensibles con los efectos ya señalados (Gunn, S. A., Clark, T. y Handersson, W. A. D., 1968). Se ha establecido un probable mecanismo de acción en la competencia en grupos coenzimáticos que normalmente llevan Zn, de ahí que tanto este elemento como el Selenio se han señalado como antidotos en procesos de intoxicación aguda (Holmberg, E. R., 1969); Fern, V. H., 1967).

En el último tiempo ha sido preocupación el determinar sus efectos clastogénicos o mutagénicos en mamíferos superiores, encontrándose información contradictoria y muchos casos no selectivos al Cadmio ya que obviamente la experimentación a nivel humano especialmente está referida a casos accidentales o de intoxicación crónica laboral. (Bauchinger, M., Schmid, E., Einbrodt, H. J. y Dresp, J. (1976); Patton, G. R. y Allison, A. C. (1972); Mitchell, M. et al (1961); Carrol, R. E. (1966); Shimada, T. et al, (1976); Shiraischi, Y. (1972).

Estos variados efectos demuestran la importancia de detectar exhaustivamente acciones mutágenas de este elemento pues el contacto que los seres humanos y los mamíferos superiores tienen en forma inaparente con este elemento, constituye un hecho que puede tener signi-

ficiencia biológica insospechada. Así por ejemplo, es conocida la necesidad de amplias zonas agrícolas de fertilizantes superfosfatados, lo que se suministra con largueza. Estos fertilizantes contienen cantidades relativamente altas de Cadmio, lo que lleva a aceptar que este elemento llega vía alimenticia a los animales, especialmente a través de los granos (Schroeder, H. A. y Balassa, J. 1963).

El análisis de alimento y agua ha llevado a determinar que las mayores concentraciones parecen estar en alimentos marinos (Molúscos y Crustáceos) y granos. Las aguas en general no lo llevan sino en trazas y en forma esporádica.

La contaminación que producen los superfosfatos lo llevan a circuitos biológicos tan disímiles, pero no improbables como órganos de fauna y flora silvestre que se encuentra en zonas arrastre de terrenos de cultivo. No cabe duda que los vegetales usualmente fertilizados con superfosfatos alcanzan niveles relativamente altos de este metal.

Estudios de tipo mutágenos y clastógenos son contradictorios, en muchos casos las experiencias son producto de acciones conjuntas, con otros metales pesados especialmente asociados a Plomo y Mercurio, además de Cadmio (Yamani, A., Kawahara, H., 1971; Bui, T. H. y Lindsten, J., 1975; Bauchinger, M. et al 1976; Patton, G. R. y Allison, A. C., 1972; Shimada, T. et al 1976; Shiraischi, Y., 1972). De ahí que haya sido considerado de relevancia, dado las vías de entrada a circuitos biológicos superiores, estudiar la acción que este elemento pueda tener sobre los cromosomas de *Vicia faba* L. como primera instancia, ya que podría ser un elemento significativo en estos tejidos vegetales de fácil experimentación y que pueden conducir a extrapolación de resultados en vegetales y analizar los niveles de concentración tóxica y/o mutagénica que puede alcanzar en mamíferos superiores.

De acuerdo a lo señalado por Kihlman en 1975, el uso de este sustrato es práctico y permite analizar los complejos cromosómicos con comodidad.

Se realiza esta investigación como una primera aproximación al análisis citogenético de *Vicia faba* L., mediante inducciones alterativas de Cloruro de Cadmio. Las alteraciones que pueden lograrse sobre el índice mitótico (I. M.), reflejarán las interferencias que este elemento pueda tener sobre el ciclo celular.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

Se hace uso de la técnica señalada por Mac Leod, R. D. y Davinson, D.(1968); para recuento celular de los meristemas radiculares secundarios de *Vicia faba* L. y determinación de I. M., y siguiendo las recomendaciones de Khilman, B. A., 1975; para la obtención de los meristemas radiculares en óptimas condiciones de experimentación. Los aplastados se obtienen empleando la técnica de Feulgen descrita por Humanston, G. en 1962.

La determinación del I. M. en las condiciones experimentales usadas resulta incrementada ya que en los medios colchicinados se detiene el proceso mitótico en placa metafásica. Se hace un recuento de 3.000 células promedio de cada concentración en tres aplastados.

Para determinar los niveles de penetración de Cd^{++} , a los tejidos meristemáticos radiculares, se procede a la determinación de Cadmio por espectroscopía atómica de absorción, para lo cual se emplea:

- a) Una bomba de digestión 4745 (Parr Instrument Co., Moline I11 61265).
- b) Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer, modelo 305, con quemador para acetileno-aire.

Todas las condiciones instrumentales, incluyendo longitud de onda, ranura y flujo de gases, corresponden a los recomendados por Perkin Elmer (1968).

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS ABSORCIOMETRICO.

Se tritura la muestra en mortero, se pesa en Balanza Sauter y se transfiere a una cápsula de teflón, se adiciona ácido, se tapa y se coloca en bomba de digestión, se sella y se calienta durante una hora a $130^{\circ}C$. Una vez frío el contenido de la cápsula de teflón se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml.

Se prepara una serie de soluciones estándares para la curva de calibración en un rango de 0.5 a 5 p.p.m. (mg/l). Se prepara un blanco de reactivos realizando el mismo tratamiento que para las muestras. El contenido de Cadmio se determina por aspiración directa de las muestras.

La técnica empleada posee una sensibilidad de aproximadamente 0.40 u.g./ml. por 1% de absorción. La determinación límite es de 0.004 u.g./ml.

RESULTADOS

TABLA Nº 1.-

Acción de concentraciones decrecientes de Cl_2Cd sobre meristemas radiculares de *Vicia faba* L. Colchicina: 0.025%.

Concentración	Interfase	P	M	A	T	I.M.
Control	2560	204	20	—	—	8.0
$1 \times 10^{-2}M^*$	1500	—	—	—	—	—
$1 \times 10^{-3}M$	2990	18	3	—	—	0.5
$1 \times 10^{-4}M$	2947	15	—	—	—	0.5
$1 \times 10^{-5}M$	2843	120	15	—	—	4.5
$1 \times 10^{-6}M$	2728	128	28	—	—	5.4
$1 \times 10^{-7}M$	2409	407	136	—	—	8.8

* No hay actividad divisional: tejido destruido, irregular distribución.

P= Profase; M= Metafase; A= Anafase; T= Telofase; I. M.= Índice Mitótico.

TABLA Nº 2.-

Concentración de Cd⁺⁺ incorporado a tejidos meristemáticos radiculares secundarios de *Vicia faba* L. determinados por absorciometría atómica.

CONCENTRACION DE EXPOSICION	I.M.	Cd ⁺⁺ , CONCENTRACION IN SITU GRS. %	MUESTRA EN 10 ML. EXP. EN GRS.
Control	8.0	—	—
1 x 10 ⁻² M	—	—	0.22557
1 x 10 ⁻³ M	0.7	0.04	0.16267
1 x 10 ⁻⁴ M	0.5	0.0029	0.13798
1 x 10 ⁻⁵ M	4.5	0.006	0.10765
1 x 10 ⁻⁶ M	5.4	0.00013	0.74825
1 x 10 ⁻⁷ M	8.8	No detecta	0.16225

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se ha procedido a determinar el índice mitótico en meristemas radiculares secundarios de *Vicia faba* L., previamente tratadas en soluciones de concentración decrecientes de cloruro de Cadmio, a objeto de analizar la incidencia del catión sobre este índice. Existe un índice mitótico aumentado, ya que se ha tratado previamente con colchicina (de acuerdo a Davinson, D. y MacLeod, R. D., 1966).

De todas maneras los I. M. revelan una proporcionalidad con las concentraciones de Cadmio a que se han expuesto los meristemas, no revelando lo mismo la concentración de Cadmio alcanzado in situ por la célula desde sus niveles de exposición. Esto deberá estudiarse siguiendo la ruta del Cadmio una vez que penetra a *Vicia faba* L. vía radicular, pues podría deberse a factores fisiológicos que movilicen este elemento a distintas velocidades desde los meristemas radiculares.

Esto indica que este oligoelemento no esencial inhibe el proceso divisional del ciclo celular. Sin embargo, un análisis exhaustivo de las preparaciones no han revelado alteración clastogénica del pool cromosómico. Más aún, a concentraciones altas (sobre 1 x 10⁻²M) de cloruro de Cadmio, se inhibe totalmente el proceso divisional no pudiendo observarse alteraciones cromosómicas, y sí mucha destrucción de tejido.

Las determinaciones experimentales señaladas permiten concluir que este elemento penetra a las células meristemáticas radiculares y por lo tanto, a los circuitos metabólicos de la planta, de ser así, los vegetales capaces de absorber este elemento serán vía hacia los animales superiores con todas las alteraciones metabólicas que ya se han señalado.

La metodología experimental permite concluir, sin lugar a dudas, la absorción del Cd⁺⁺ por parte de los meristemas radiculares, su acción inhibitoria sobre el I. M. de este tejido y su efecto clastógeno negativo sobre el complejo cromosómico de *Vicia faba* L.

Cabe agregar también, que la acción clastógena y/o mutágena sobre los vegetales sea más difícil de detectar, ya que ellos son más resistentes a la acción de injurias químicas y los niveles de tolerancia pueden

ser mayores, tal como lo indica Simon, E. (1977). Trabajos anteriores (Alarcón, M. 1977), permiten suponer que mediante sustancias que disuelvan el cemento intercelular, no sólo se logra una dispersión más homogénea de las células, sino que también facilitaría la entrada de sustancias en solución.

Sin embargo, existiendo el control de penetración de Cd^{++} por absorciometría, es fácil detectar concentraciones significativas en el interior de las células meristemáticas y de este modo poder afirmar las acciones que el Cadmio tiene sobre la célula vegetal y que ya han sido señaladas.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, M., 1977. "Un Método para un Fácil Recuento Celular en Meristemas Radiculares de *Vicia faba* L. Germinación Experimental. Boletín Sociedad de Biología. Tomo L. I (1): 7-11.
- Barr, M. Jr., 1973. "The Teratogenicity of Cadmium Chloride in Two Stocks of Wistar rats". *Teratology* 7: 237-242.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Einbrodt, H. J. and Dresp, J., 1976. "Chromosome Aberration in Lymphocytes After Occupational Exposure to Lead and Cadmium". *Mutation Research*. 40: 57-62.
- Buchauer, M. J., 1973. "Contamination of Soil and Vegetation Near a Zinc Smelter By Zinc, Cadmium, Copper and Lead". *Environ. Science Technology* 7: 131-135.
- Bui, T. H. and Lindsten, J., 1975. "Chromosome Analysis of Lymphocytes from Cadmium Workers and Itai-itai Patients. *Environ. Res.* 9: 187-195.
- Carroll, R. E., 1966. "The Relationship of Cadmium in the Air to Cardiovascular Disease Death Rates". *J. A. M. A.* 198: 267-269.
- Chernoff, N., 1973. "Teratogenic Effects of Cadmium in Rats". *Teratology* 8: 29-32.
- Davinson, D. and MacLeod, R. D., 1966. "Changes in Mitotic Indices in Roots of *Vicia faba*. I: Antagonistic Effects of Colehicine and I. A. A. Chromosome (Berl.). 18: 421-437.
- Ferm, V. H. and Carpenter, S. J., 1967. "Teratogenic Effect of Cadmium and its Inhibition by Zinc". *Nature* 216 (5120): 1123.
- Flick, D. F., Kraybill, H. F. and Dimitroff, J. M., 1971. "Toxic Effects of Cadmium: A Review. *Envi. Res.* 4: 71-85.
- Gunn, S. A., Clark, T. and Anderson, W. A. D., 1968. "Specificity in Protection Against Lethality and Testicular Toxicity from Cadmium". *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* 128(2): 591-595.
- Holmberg, R. E. and Fern, V. H., 1969. "Interrelationships of Selenium, Cadmium and Arsenic in Mammalian Teratogenesis (*Cricetus auratus*)". *Arch. Environ. Health.* 18(1): 873-877.
- Humanson, C. L., 1962. "Animal Tissue Techniques". W. H. Freeman and Company. San Francisco and London. 293-295.
- Ishizu, S., Minami, M., Suzuki, A. and Yamada, M., 1972. "An Experimental Study on the Teratogenic Effect of Cadmium". *J. Tokyo Wom. Med. Coll.* 42: 744-752.
- John, M. K., 1972. "Factors Effecting Plant Uptake and Phytotoxicity of Cadmium Added to Soil". *Environ. Sci. Technol.* 6: 1005-1009.
- Kendrey, G. and Roe, F. J. C., 1969. "Cadmium Toxicology". *The Lancet* 1(7607): 1206-1207.
- Kihlman, B. A., 1975. "Root Tips of *Vicia faba* for the Study of the Induction of Chromosomal Aberrations". *Mutation Research.* 31(6): 401-412.

- MacLeod, R. D. and Davinson, D., 1968. "Changes in Mitotic Indices in Roots of *Vicia faba* L. III. Effects of Colchicine on Cell Cycle Times". *Exptl. Cell. Res.* 52: 541-554.
- Miller, W. L., Lampp, B., Powell, G. W., Salotti, C. A. and Blackmon, D. M., 1967. "Influence of a High Level of Dietary Cadmium on Cadmium Content in Milk, Excretion and Cow Performance". *J. Dairy Sci.* 50(9): 1404-1408.
- Mitchell, P. H. Jr., Tipton, I. H., Schroeder, H. A., Steiner, R. L. and Cook, M. J., 1961. "Variation in the Concentration of Cadmium in Human Kidney as a Function of Age and Geographic Origin". *J. Chron. Dis.* 14(2): 259-271.
- Nilson, R., 1970. "Aspects on the Toxicity of Cadmium and its Compounds. A Review". *Bull. Ecol. Res. Comm.* 4: 1-58.
- Parizek, J., 1961. "Sterilization of the Male by Cadmium Salts". *J. Reprod. Fertil.* 1: 294-309.
- Patton, G. R. and Allison, A. C., 1972. "Chromosome Damage in Human Cell Cultures Induced by Metal Salts". *Mutation Research.* 16: 332-335.
- Perkin-Elmer Corp., 1968. "Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry".
- Schroeder, H. A. and Balassa, J. J., 1963. "Cadmium: Uptake by Vegetables from Superphosphate in Soil". *Sciences* 140 (3568): 819-820.
- Schroeder, H. A., Nason, B. A., Tipton, I. H. and Balassa, J. J., 1967. "Essential Trace Metals in Man: Zinc Relation to Environmental Cadmium". *J. Chron. Dis.* 20: 179-210.
- Shimada, T., Watanabe, T. and Endo, A., 1976. "Potencial Mutagenicity of Cadmium in Mammalian Oocytes". *Mutation Research* 40(4): 389-396.
- Shiraishi, Y., Kurahashi, H. and Yosida, T. H., 1972. "Chromosomal Aberrations in Cultured Human Leucocytes Induced by Cadmium Sulfide". *Proc. Japan Acad.* 48: 133-137.
- Simon, E., 1977. "Cadmium Tolerance in Populations of *Agrostis temis* and *Festuca ovina*". *Nature.* 265(5592): 328-330.
- Yamagami, A. and Kawahara, H., 1971. "Cytotoxic Actions of Mercuric Chloride and Cadmium Chloride on the Cell Population". *J. Dent. Res.* 50(5). I. suppl.: 1147.