

Cafeína como antirreparador del DNA, en la valoración de genotoxicidad del ciclo celular de meristemas de *Allium cepa*

Caffeine as antirepairer of DNA, in the assessment of
genotoxicity of meristem cell cycle of *Allium cepa*

José González Cabeza^{1,6}, Armando Araujo Jiménez²,
Lennis Reyna López³, Pablo Chuna Mogollón⁴,
Elio Ávila Vereau⁵

RESUMEN

Algunos resultados epidemiológicos proveen información sobre el daño que puede ocasionarse al genoma ciertas sustancias químicas; sin embargo, la información se obtienen tardíamente, cuando ya han sido afectadas las poblaciones. En tal sentido se evaluó la cinética antirreparadora de la cafeína con previo daño cromosómico durante el ciclo celular; y proponer el empleo de una prueba de ensayo *in vivo* para valorar la genotoxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa*, la cual se sustenta en las propuestas de Bender y el empleo de inhibidores de la reparación. La evaluación de aberraciones cromosómicas se realizó analizando la cinética de proliferación a través del Equilibrio Dinámico y la Sincronía Celular.

Palabras clave: Reparación del DNA, genotoxicidad.

ABSTRACT

Some epidemiological findings provide information about the damage that can occur due to certain chemicals genome, however, the information obtained late, when people have been affected. In this article we evaluated the kinetics of caffeine anti restorative with previous chromosomal damage during the cell cycle, and propose the use of an *in vivo* test assay to assess genotoxicity in *Allium cepa* meristematic cells, which is based on proposals Bender and the use of inhibitors of repair. Evaluation of chromosomal aberrations was performed by analyzing the kinetics of proliferation through Dynamic Balance and Cell Synchrony.

Key words: DNA repair, genotoxicity.

¹ Biólogo. Doctor en Biotecnología. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología- Dpto. de Ciencias. UPAO.
² Microbiólogo. M.Sc. Gestión Ambiental. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología- Dpto. de Ciencias. UPAO
³ Microbiólogo. M.Sc. Microbiología Clínica. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología- Dpto. de Ciencias. UPAO.
⁴ Biólogo. M.Sc. Reproducción Animal. Lab. De Biología Celular y Molecular-Dpto. de Ciencias. UPAO.
⁵ Microbiólogo. Grupo de Microbiología Molecular y Biotecnología-Dpto. de Ciencias. UPAO.
⁶ Correspondencia: gonzalezbiotec@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

La toxicogenética tiene por objeto el de pronosticar y valorar el daño potencial que puede ocasionarse al genoma, bajo la influencia de sustancias tóxicas; sin embargo, el éxito de esta disciplina depende directamente del desarrollo de investigaciones fundamentales sobre la naturaleza molecular del proceso mutagénico, así como del fomento de los sistemas de control y de los sistemas test⁽⁶⁾.

Los sistemas de ensayo de genotoxicidad se vienen empleando desde hace varias décadas; sin embargo, en sistemas vegetales superiores también han demostrado ser muy útiles para el entendimiento de la mutagénesis y la detección de mutágenos ambientales, siendo esto válido tanto para agentes físicos como químicos; los cuales constituyen un serio problema de salud pública⁽²⁵⁾.

Uno de los más eficientes sistemas para evaluar el daño cromosómico es llevado a cabo en *Vicia faba*, el cual representa cerca de un tercio de los estudios en vegetales para el análisis de aberraciones cromosómicas en la actualidad. Habiendo sido propuesto en programas de genotoxicidad ambiental a nivel mundial. La característica de *Vicia faba* como biomonitor, está basado en su sensibilidad a ensayos de corto tratamiento, existiendo una metodología estandarizada, mostrando excelentes resultados. Otra característica es que representa un sistema que no requiere equipamiento sofisticado⁽¹³⁾.

Respecto a este último punto, se propone el empleo de un diseño de prueba *in vivo* de valoración de genotoxicidad en células meristemáticas de *Allium cepa*, basado en la conjunción de 2 conceptos: 1) Las propuestas de Bender de clastogénesis *in vivo*; donde postula y explica que la aparición de aberraciones cromosómicas son producto de la amplificación de lesiones primarias a nivel del DNA y 2) Los mecanismos de reparación; mediante el empleo de agentes, como la cafeína, que potencian el daño cromosómico por inhibición de la reparación⁽⁸⁾. Por lo tanto, la frecuencia de aberraciones cromosómicas detectadas en la mitosis siguiente al período de interfase en que ocurren los fenómenos antes mencionados, estaría dada por el número de lesiones primarias en el DNA menos el número de lesiones que fueron eficientemente reparadas o que no fueron amplificadas. De tal manera, que cuando se rompe el equilibrio entre el daño genético y

la capacidad de reparación, la frecuencia de aberraciones aumenta considerablemente⁽¹⁾.

En el Perú no existe referencias acerca de la creación de un test de genotoxicidad a nivel celular. El presente trabajo pretende explicar la cinética antirreparadora de la cafeína con diferentes concentraciones de ésta durante el ciclo celular, previo a la inducción de daño cromosómico con radiación ultravioleta, el cual será evaluada durante el período mitótico y producto de esto, proponer el diseño de una prueba o test de genotoxicidad evaluado en células meristemáticas de raicillas de *Allium cepa*. Este tipo de biotecnologías *in vivo* de toxicidad genética constituye una forma de abordar el problema de riesgo genético ocasionado por la exposición a mutágenos o posibles cancerígenos contaminantes presentes en el ambiente; por este motivo, estos ensayos como los de otro tipo son en cierto modo ineludibles en la valoración de genotoxicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sistema biológico de pruebas. Células meristemáticas procedentes de raicillas de *Allium cepa*; Var. Roja Arequipeña.

Instalación de los sistemas de ensayos. Cada sistema de ensayo estuvo representado por un bulbo, con un peso aproximado de 15-30 g cada uno; donde los primordios radiculares fueron sumergidos en agua potable, empleándose recipientes de vidrio de 100 mL de capacidad, con renovación de agua cada 24 h. Asimismo; se mantuvieron con aireación artificial a razón de 10-20 mL/min y colocados en una estufa a $25 \pm 0,5$ °C, en obscuridad. Se consideran óptimos para el estudio, aquellos sistemas de ensayo que generaron más de 15 raicillas por bulbo y que presentaron uniformidad en su crecimiento.

Obtención del índice mitótico e índice de fases. El Índice Mitótico (IM) es la expresión porcentual de células en período mitótico de la población celular a analizar. El índice de fase (Índice de Profase, Índice de Metafase, Índice de Anafase e Índice de Telofase) son producto de la expresión porcentual de células en cada fase dentro del conteo de células en mitosis.

Marcación de una población sincrónica y estimación del Tiempo del Ciclo (CT) celular. Las células se marcaron por una alteración de las características nucleares; los sistemas fueron sumergidos en una

solución acuosa de cafeína (1,3,7-trimetilxantina) al 0,1%, durante una hora, con la finalidad de obtener una subpoblación de células binucleadas. Se empleó la técnica de células binucleadas de Kihlman para medir la duración media del ciclo mitótico^(2,5,28). La población de células binucleadas fue monitoreada a lo largo del tiempo, mediante el análisis citológico; para tal efecto, se emplearon cinco sistemas de ensayo. Se consideró a la Interfase Binucleada (I-B), como el período desde la hora cero (final de una hora de tratamiento con cafeína), hasta la aparición de las primeras células en bipro-fase^(6,11,27). Esto permitió marcar el período teórico en el cual todas las células estaban en interfase, para la exposición de los diversos tratamientos.

Inducción de daño cromosómico. Se empleó como agente inductor de aberraciones estructurales, una fuente de radiación ultravioleta (UV) de 280 nm, a la que se expusieron las raicillas de los bulbos de manera invertida en placas Petri, a 15 cm. de la fuente.

Tratamiento. Los sistemas se expusieron a la fuente de luz UV durante cinco, diez y quince minutos, durante las dos, cuatro, y seis horas previas al inicio de la división celular (bimitosis). En la cuantificación del daño cromosómico se analizó la sumatoria total de anafases y telofases de la onda bimitótica; a partir de la cual, se obtuvo la frecuencia de Anafases y Telofases Anormales (ATA).

Efecto de una segunda exposición con cafeína. La primera exposición fue necesaria para obtener una subpoblación de células marcadas (binucleadas), la segunda correspondió al efecto antirreparador de este alcaloide. Para esta finalidad, se realizaron tratamientos continuos, extendiéndose por dos, cuatro y seis horas antes del inicio de la división celular (bimitosis); estableciéndose tres tratamientos, cada uno formado por tres grupos para cada concentración de cafeína de 0,1%, 0,05% y 0,033%.

Efecto de la cafeína sobre el daño cromosómico inducido por radiación UV. Optimizada las alteraciones cromosómicas obtenidas de los tratamientos con radiación UV, estas se sometieron al efecto combinado con cafeína como agente antirreparador.

Obtención de preparados citológicos. Las raicillas fueron fijadas en alcohol - ácido (etanol, 3 vol.: ácido acético, 1 vol.) y coloreadas con orceína acetoclorhídrica al 1%, según la técnica rápida de Tjio y Levan^(27,28).

Análisis citológico. En la discriminación de células meristemáticas mononucleadas de aquellas que entran a diferenciación, se siguieron los criterios ya establecidos en este tipo de estudio^(5,23,27).

Las lecturas del conteo celular fueron realizadas cada dos horas durante la onda bimitótica; en base a un promedio de 300 células binucleadas producto de los tres sistemas de ensayo de cada grupo, en los tratamientos con UV; mientras que los sistemas de ensayo que recibieron una segunda exposición de cafeína, se contabilizaron entre 800-1200 células binucleadas, según la concentración y tiempos a que fueron sometidos^(12,14,24,27).

Tratamiento estadístico. Durante los análisis se estimaron las principales medidas de tendencia central (Media = \bar{X}) (Media Geométrica = X_g) y de dispersión (Varianza = S^2 , Error Estándar = ES), previa transformación angular de los porcentajes originales. La comparación de los efectos de daño cromosómico en el ciclo fue mediante la prueba X^2 , elaborándose tablas de contingencia 2×2 y 2×3 , siendo necesaria la corrección de Yates.

RESULTADOS

A. Parámetros del ciclo celular

La población meristemática de *Allium cepa* se encuentra en equilibrio dinámico proliferativo, donde los diferentes periodos en que se divide el ciclo celular permanecen constantes en su duración; de tal manera, que el número de células en cada momento existente en cada fase, es también constante. Con los índices que se obtienen, se establecen las duraciones relativas de los diferentes períodos del ciclo celular, Cuadro 1.

B. Inducción de células binucleadas y estimación de los tiempos de ciclo rápido y medio

En la inducción de células binucleadas de una población en proliferación, se pueden emplear diversos tratamientos; tanto físicos como químicos. El marcado celular es la manera como se "etiquetan" las células en un momento dado del ciclo celular; por lo tanto, es posible realizar su seguimiento en periodos siguientes de tiempo, desde su marcado.

Una manera de marcado celular consiste en la inhibición del proceso citocinético (división citoplas-

Cuadro 1
ESTIMACIÓN DE ÍNDICE INTERFÁSICO, MITÓTICO Y DE FASES
EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE ALLIUM CEPA, A 25 °C

Bulbo	Interfase	Mitosis	Índices			
			Profase	Metafase	Anafase	Telofase
A	86,06	13,94	50,96	11,91	6,40	31,45
B	85,85	14,06	43,82	17,73	8,96	29,48
C	86,44	13,56	43,87	15,64	9,86	30,61
D	86,37	13,62	51,51	10,03	10,03	27,96
E	87,51	12,51	48,73	14,64	7,88	28,73
Xg	86,44	13,54	47,78	13,99	8,62	29,64

Cuadro 2
ÍNDICES BIMITÓTICOS PRODUCTO DEL ANÁLISIS CITOLÓGICO DURANTE LA 10:00 Y
12:00 DE MUESTREO EN LA ESTIMACIÓN DE LA INTERFASE BIMITÓTICA (I-B)

Periodo	Lectura a las 10:00 h de muestreo					Lectura a las 12:00 h de muestreo				
	Bulbos					Bulbos				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Bimitosis	11	4	12	11	14	116	107	147	129	114
Interfase	227	272	199	295	227	171	222	140	172	142
TOTAL	238	276	211	306	241	287	329	287	301	256
Ind. Bimitot.	4,62	1,45	5,69	3,59	5,81	40,4	52,5	51,22	42,9	44,53
	Xg = 3,8					Xg = 46,07				

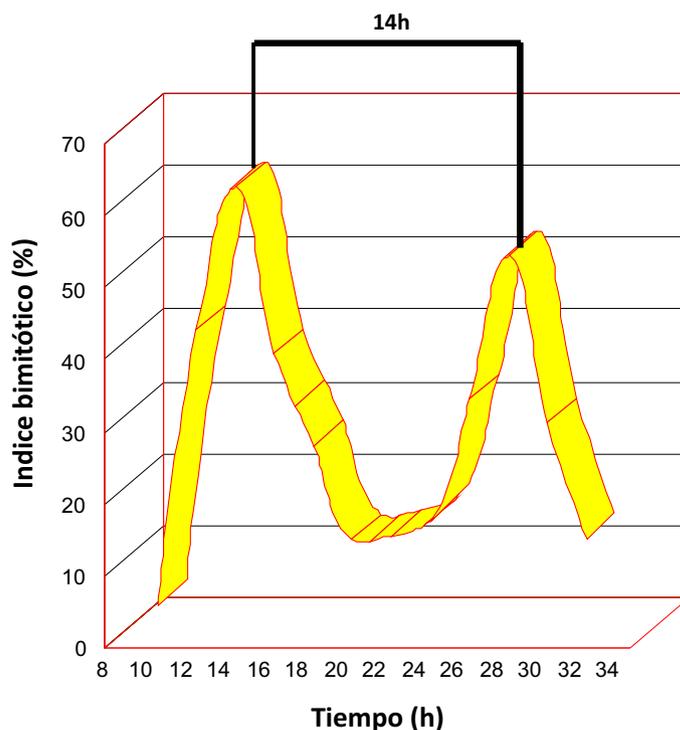
Cuadro 3
ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS EN LA
ESTIMACIÓN DEL TIEMPO MEDIO DEL CICLO CELULAR, DE
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE ALLIUM CEPA A 25 °C

Hora	Índice bimitotico	S ²	ES
8	0		
10	4,23	8,35	1,29
12	42,31	15,73	1,77
14	62,2	8,94	1,33
16	39,05	11,2	1,49
18	26,43	5,66	1,06
20	13,33	3,79	0,87
22	13,87	3,79	0,87
24	16,06	14,55	1,7
26	32,7	14,49	1,7
28	52,66	17,24	1,85
30	29,5	4,1	0,9
32	13,35	13,49	1,64

mática) mediante cafeína (0,1%) durante una hora; resultando células espontáneamente sincrónicas las que atraviesan por telofase durante el tratamiento. Estas, quedan permanentemente marcadas como tales dentro de la población de células mononucleadas. Esta población de células binucleadas permite establecer el tiempo de la interfase - B, la cual es considerada desde el preciso momento en que concluyó el tratamiento de una hora con cafeína (0,1%), hasta el momento en que aparecen las primeras células biprofasicas. El tiempo entre estos dos eventos citológicos lo constituye la Interfase-B y consecuencia de esto se establece el tiempo real interfásico de las células más rápidas. El establecimiento de la I-B, se estimó a través

de las dos primeras lecturas positivas de un conjunto de bulbos (Cuadro 2).

La estimación teórica de la I-B se efectuó por extrapolación de las dos primeras lecturas, deduciéndose el momento preciso en que entra la primera célula a mitosis. De otro lado, teniendo el conocimiento previo de los valores del índice mitótico e índice interfásico (Cuadro 1), es posible la estimación del tiempo real del ciclo rápido, tanto de la interfase como de la mitosis, Cuadro 4. Con el seguimiento de la población binucleada, se obtiene las lecturas del Cuadro 3; la que graficada, se obtiene una curva con dos picos máximos mitóticos, mediante los cuales se estableció el tiempo medio del ciclo celular de meristemos de *Allium cepa*. Gráfica 1.



Gráfica 1. Curvas bimitóticas, producto del tratamiento con Cafeína al 0.1% durante una hora; en el establecimiento del tiempo medio del ciclo celular de meristemos de *Allium cepa*.

Cuadro 4

DURACIÓN DEL CT RÁPIDO Y MEDIO, EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa* A 25 °C

Tiempo de ciclo (CT)	Periodo interfásico (h)	Periodo mitótico (h)	Duración del ciclo celular (h)
Rápido	9,85	1,54	11,39
Medio	11,84	1,86	13,7

Cuadro 5
INDICES BIMITÓTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS ONDAS BIMITÓTICAS,
PRODUCTO DE TRATAMIENTOS CON CAFEÍNA (0,1%, 0,05%, 0,033%),
DURANTE LA 06:00-12:00 HORAS DEL CICLO CELULAR

Tratamiento con cafeína al 0,1%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	4,58	2,84	4,05	3,75	1,839	0,784
	12,35	9,72	11,61			
12	11,41	7,83	8,84	9,24	3,2	1,03
	19,74	16,25	17,29			
14	20,2	12,02	13,75	15	11,33	1,94
	26,71	20,28	21,77			
16	7,15	11,87	11,53	9,93	6,67	1,49
	15,51	20,15	19,8			
18	4,34	5,63	9,52	6,15	9,04	1,73
	12,02	13,73	17,97			
20	5,44	8,93	3,88	5,32	9,31	1,76
	13,5	17,38	11,52			

Tratamiento con cafeína al 0,05%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0,6	3,86	3,38	1,98	14,3	2,18
	4,44	11,33	10,59			
12	14,33	17,85	16,15	16	1,98	0,79
	22,24	24,99	23,69			
14	35,89	21,78	23,69	26,5	23,27	2,78
	36,75	27,82	29,12			
16	10,19	16,89	15,9	14	9,38	1,77
	18,62	24,27	23,5			
18	11,53	8,26	6,02	8,31	8,01	1,63
	19,85	16,7	14,2			
20	10,81	7,03	10,28	9,21	4,33	1,2
	19,19	15,37	18,71			

Tratamiento con cafeína al 0,033%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	6,77	4,04	2,46	4,07	9,25	1,76
	15,08	11,59	9,02			
12	27,76	21,81	23,34	24,2	4,18	1,18
	31,79	27,84	28,89			
14	42,95	31,73	34,98	36,3	11,73	1,98
	40,95	34,28	36,26			
16	20,47	21,94	32,01	24,3	19,55	2,56
	26,9	27,9	35,01			
18	7,79	11,81	8,87	9,34	4,03	1,16
	16,2	20,1	17,32			
20	20,23	12,18	14,8	15,4	10,22	1,84
	26,73	20,43	22,63			

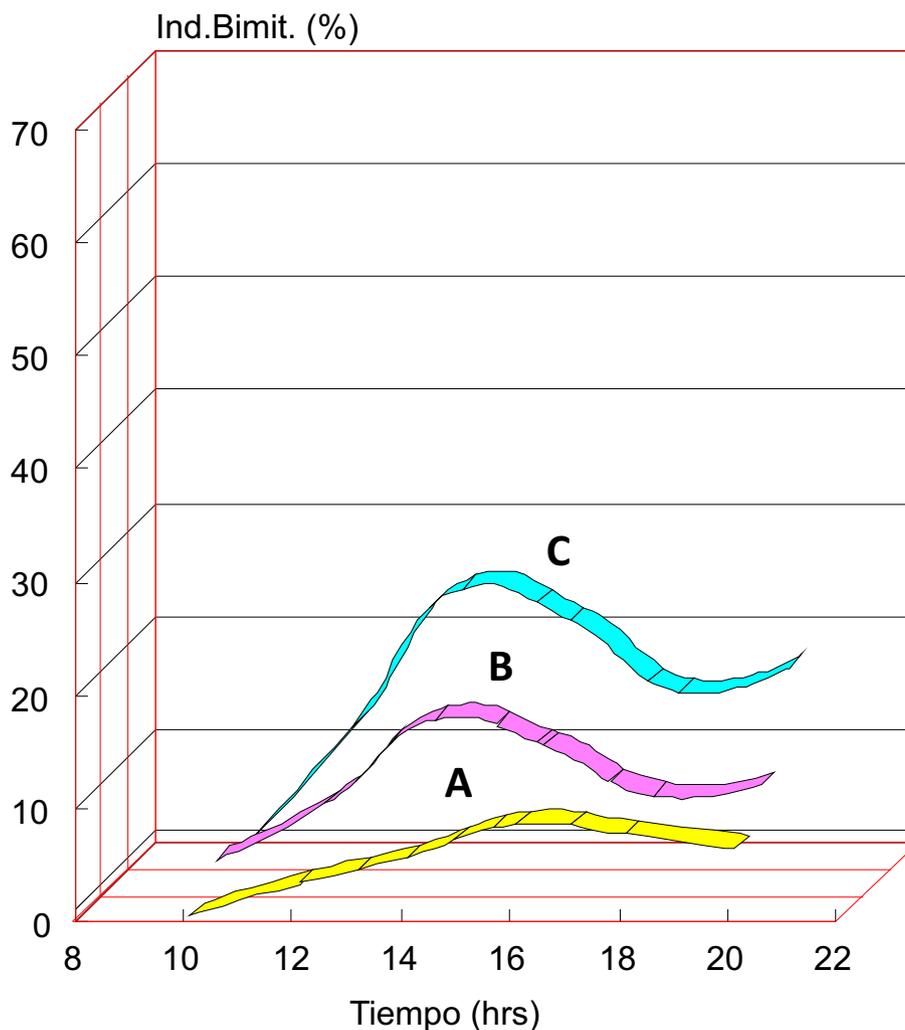
Por este procedimiento no se logra la información del tiempo real del período interfásico y del período mitótico, de igual manera que en el caso anterior se recurre al Cuadro 1; para obtener los tiempos reales de la interfase y de la mitosis del ciclo celular medio. Los resultados, tanto del tiempo de ciclo rápido como medio aparecen en el Cuadro 4.

C. Cinética celular por efecto de la cafeína como antirreparador

Los resultados de la cinética celular por efecto de la cafeína como antirreparador del DNA, con tratamientos durante la 06:00-12:00, 08:00-12:00 y 10:00-12:00 h. del ciclo celular con concentraciones

de 0,033%, 0,05% y 0,1% en cada uno de estos periodos previos al inicio de la bimitosis, se muestran a continuación en los Cuadros 5, 6, y 7; asimismo, se muestran los Gráficos 2, 3 y 4, que describen cada una de los análisis citológico.

En todos ellos se observa una disminución de los índices bimitóticos, siendo la concentración de 0,033% de cada uno de los tratamientos, la que ocasiona una menor deflexión de la proliferación celular; evidenciándose una relación inversa entre la concentración recibida y los índices mitóticos; considerándose por esta razón, la concentración de 0,033% como la óptima antirreparadora para los futuros tratamientos combinados.



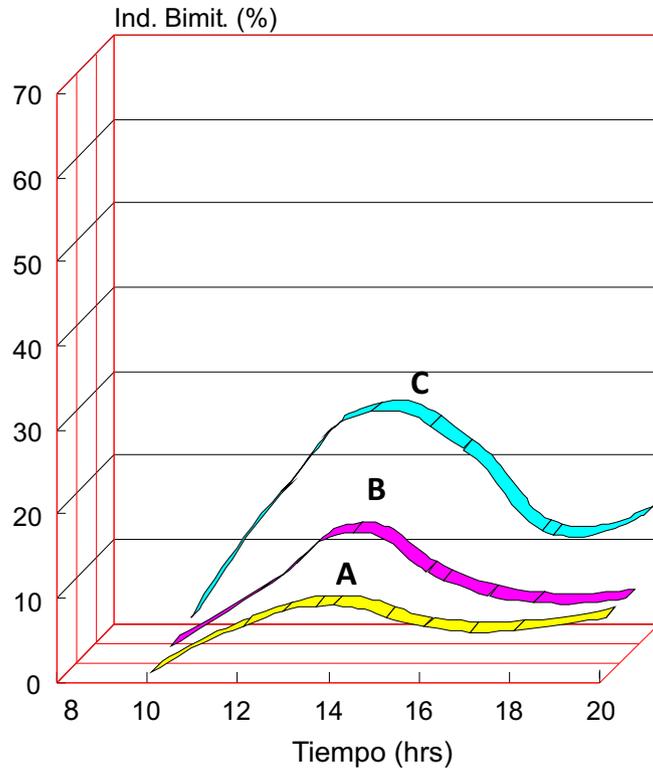
Gráfica 2. Curvas bimitóticas producto de tratamientos con cafeína (A = 0,1%, B = 0,05%, C = 0,033%), durante la 06:00-12:00 horas del CT.

Cuadro 6
ÍNDICES BIMITÓTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS ONDAS BIMITÓTICAS
PRODUCTO DE TRATAMIENTOS CON CAFEÍNA (0,1%, 0,05%, 0,033%),
DURANTE LA 08:00-12:00 HORAS DEL CT

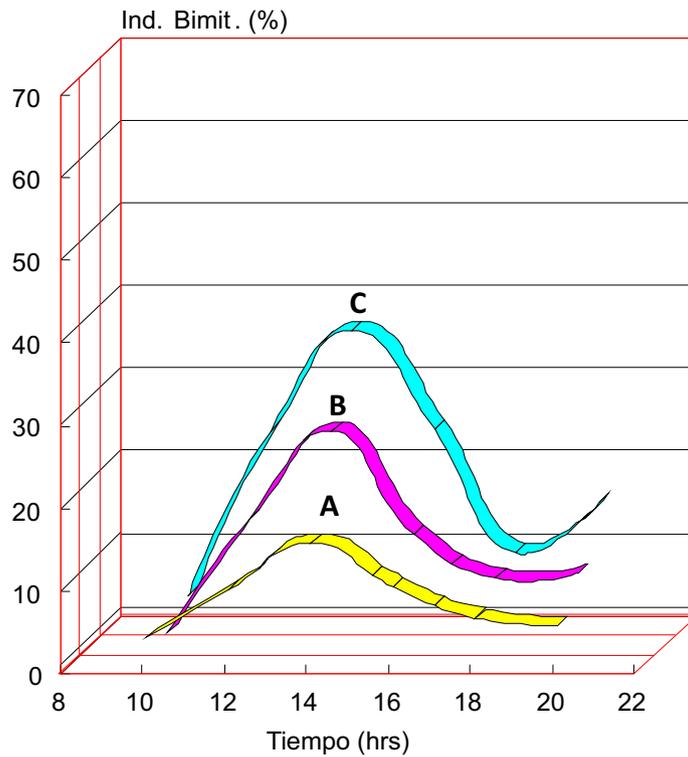
Tratamiento con cafeína al 0,1%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	1,26	0,23	1,23	0,71	4,46	1,22
	6,45	2,75	6,37			
12	8,39	7,01	3,88	6,11	8,02	1,63
	16,84	15,35	11,86			
14	6,76	10,16	9,13	8,56	3,29	1,04
	15,07	18,59	17,59			
16	4,83	7,46	6,14	6,05	2,48	0,91
	12,7	15,85	14,35			
18	5,38	5,9	5,57	5,61	0,1	0,18
	13,42	14,06	13,65			
20	9,26	7,03	5,75	7,2	3,76	1,12
	17,72	15,38	13,87			

Tratamiento con cafeína al 0,05%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0,53	5,24	1,13	1,46	22,77	2,75
	4,17	13,23	6,1			
12	9,52	8,52	8,39	8,8	0,38	0,35
	17,97	16,97	16,84			
14	21,47	12,97	12,02	15	16,03	2,31
	27,6	21,11	20,29			
16	9,08	13,24	6,75	9,32	10	1,82
	17,54	21,34	15,06			
18	4,49	7,71	8,45	6,64	6,25	1,44
	12,23	16,12	16,9			
20	9,79	6,46	5,77	7,14	5,29	1,32
	18,23	14,72	13,9			

Tratamiento con cafeína al 0,033%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	1,45	2,55	3,95	2,44	5,15	1,31
	6,92	9,19	11,46			
12	21,65	15,67	15,77	17,5	6,48	1,47
	27,73	23,32	23,32			
14	35,96	22,6	23,94	26,9	21,58	2,68
	36,85	28,39	29,29			
16	19,47	22,78	25,61	22,5	4,47	1,22
	26,18	28,51	30,4			
18	15,76	14,47	8,31	12,4	12,8	2,06
	23,4	22,36	16,75			
20	19,56	13,3	12,14	14,7	9,8	1,81
	26,25	21,39	20,39			



Gráfica 3. Curvas bimitóticas producto de tratamientos con Cafeína (A = 0,1%, B = 0,05%, C = 0,033%), durante la 08:00-12:00 horas del C.T.



Gráfica 4. Curvas bimitóticas producto de tratamientos con cafeína (A = 0,1%, B = 0,05%, C = 0,033%), durante la 10:00-12:00 horas del C.T.

Cuadro 7
ÍNDICES BIMITÓTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE ONDAS BIMITÓTICAS,
PRODUCTO DE TRATAMIENTOS CON CAFEÍNA (0,1%, 0,05%, 0,033%),
DURANTE LA 10:00-12:00 HORAS DEL CT

Tratamiento con cafeína al 0,1%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0	0	0	0	0	0
	0	0	0			
12	2,35	3,74	2,59	2,83	1,53	0,71
	8,82	11,15	9,26			
14	6,14	4,55	4,92	5,16	1,12	0,61
	14,35	12,32	12,82			
16	8	7,58	7,62	7,73	0,06	0,14
	16,43	15,98	16,02			
18	9,18	7,05	5,7	7,17	3,7	1,11
	17,64	15,4	13,81			
20	5,25	5,39	7,39	5,94	1,98	0,81
	13,25	13,42	15,77			

Tratamiento con cafeína al 0,05%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	3,21	2,18		2,65	1,67	0,91
	10,32	8,49	10,59			
12	9,57	7,46	6	7,54	3,7	1,11
	18,02	15,85	14,18			
14	16,29	19,01	10,86	15	11,44	1,95
	23,8	25,85	19,24			
16	15,31	9,29	14,32	12,7	8,11	1,64
	23,03	17,75	22,24			
18	13,56	7,53	5,49	8,25	17,11	2,39
	21,61	15,93	13,56			
20	12,67	9,63	6,26	9,14	10,16	1,84
	20,85	18,08	14,49			

Tratamiento con cafeína al 0,033%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S²	ES
	MI	MII	MIII			
10	2,16	0,91		1,4	4,44	1,48
	8,45	5,48				
12	15,61	10,5	10,86	12,1	5,86	1,4
	23,27	18,91	19,26			
14	27,53	21,75	23,74	24,2	3,81	1,12
	31,65	27,8	19,16			
16	27,44	18,11	19,01	21,1	12,36	2,03
	31,58	25,19	26,34			
18	14,86	18,44	17,52	16,9	2,05	0,82
	22,67	25,43	20,73			
20	25,52	14,84	13,38	17,2	23,21	2,78
	30,34	22,66	21,46			

D. Daño cromosómico y cinética celular por efecto de la radiación ultravioleta

El efecto de la radiación UV sobre el ciclo celular se manifiesta de diversas maneras, siendo las observaciones más importantes para los fines de este estudio, las que correspondieron a la aparición de aberraciones cromosómicas de tipo estructural; de estas, la evidencia de daño consistió mayormente en fragmentos acéntricos (FgAc), y escasos puentes cromatínicos.

De los nueve ensayos propuestos, solo tres resultaron positivos, los que correspondieron a las exposiciones con UV, durante los 5 primeros minutos de la

10:00 h, 10 primeros minutos de la 08:00 h y 10 primeros minutos de la 10:00 h del ciclo celular. El análisis citológico de tales resultados positivos aparecen en los Cuadros 8, 9 y 10; y Gráficos 5, 6 y 7.

Se muestra la frecuencia de ATA registradas en la onda bimitótica (Cuadro 11) y paralelamente, se efectuó el análisis X^2 , el cual reveló que no existía diferencias significativas de daño frente a las distintas exposiciones (Cuadro 12). Durante la cuantificación de ATA, también se evidenció células binucleadas que ya habían atravesado el período mitótico con presencia de daño cromosómico y este se manifiesta a manera de micronucleos (MN).

Cuadro 8

ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO DE TRATAMIENTOS CON UV, DURANTE CINCO MINUTOS AL INICIO DE LA 10:00 HORAS DEL CT

Tratamiento con cafeína al 0,1%						
Hora	Índice mitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	3,6	0,75	0,61	2,6	24,46	2,86
	10,94	4,97	14,78			
12	31,75	32,15	22,82	28,6	11,55	1,96
	34,3	34,54	28,54			
14	54,18	55,12	59,82	56,3	3,06	1,01
	47,4	47,94	50,66			
16	38,97	44,81	46,1	43,2	4,86	1,27
	38,63	42,02	42,76			
18	29,72	32,12	32,9	31,6	1,05	0,59
	33,04	34,52	35			
20	22,22	24,18	26,76	24,3	2,3	0,88
	28,12	29,45	31,15			

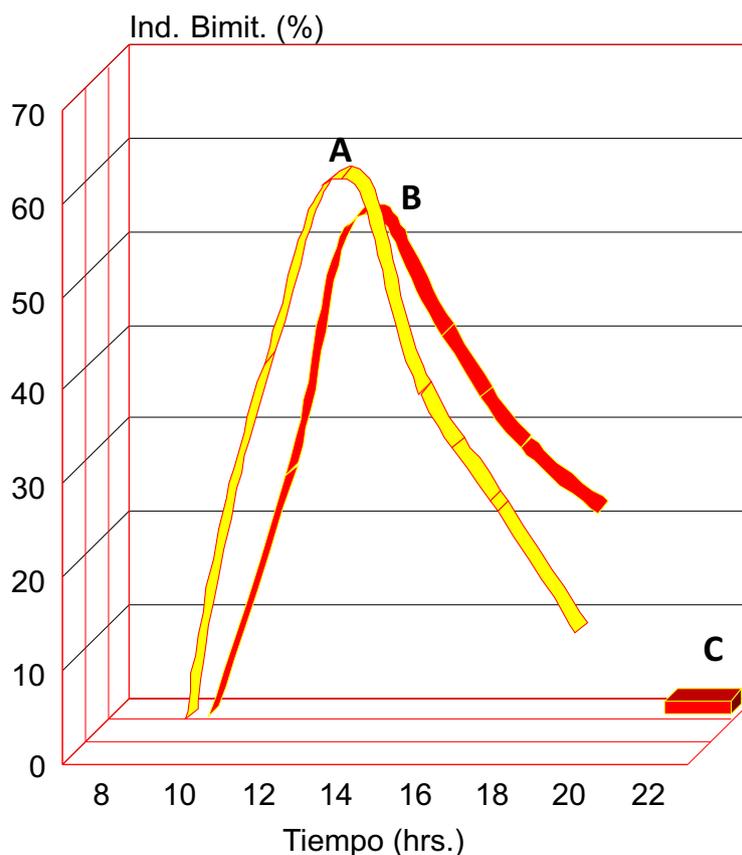
Cuadro 9

ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO DE TRATAMIENTOS CON UV, DURANTE DIEZ MINUTOS AL INICIO DE LA 08:00 HORA DEL CT

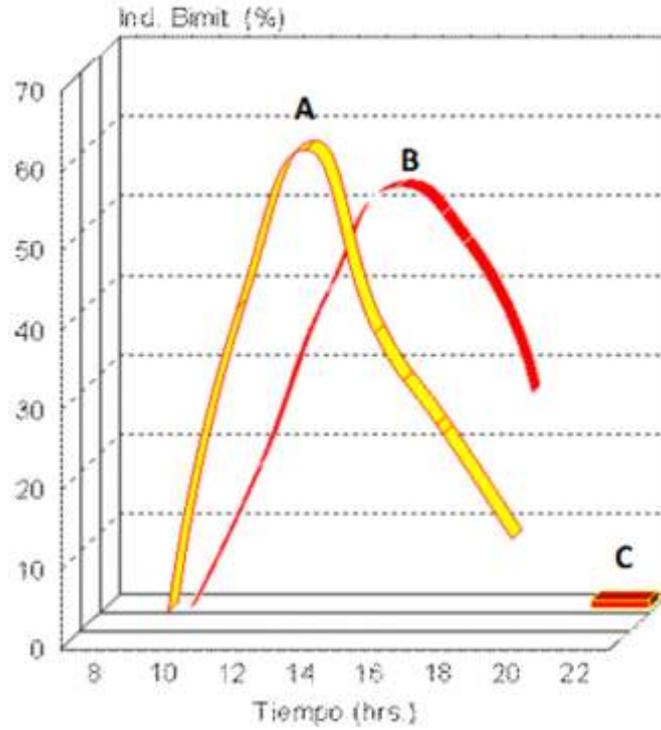
Tratamiento con cafeína al 0,05 %						
Hora	Índice mitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	3,6	2,4	1,07	2,1	6,33	1,45
	10,94	8,91	5,94			
12	19,78	19,15	23,08	20,6	2,19	0,86
	26,41	25,95	28,71			
14	45,78	44,97	37,87	42,7	6,41	1,46
	42,58	42,11	37,98			
16	59,61	54,13	53,58	55,7	3,72	1,11
	50,54	47,37	47,05			
18	46,91	47,89	49,78	48,2	0,7	0,48
	43,23	43,79	44,87			
20	33,06	28,97	27,52	29,8	3,2	1,03
	35,1	32,56	31,64			

Cuadro 10
ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO
DE TRATAMIENTOS CON UV, DURANTE DIEZ MINUTOS AL
INICIO DE LA 10:00 HORA DEL CT

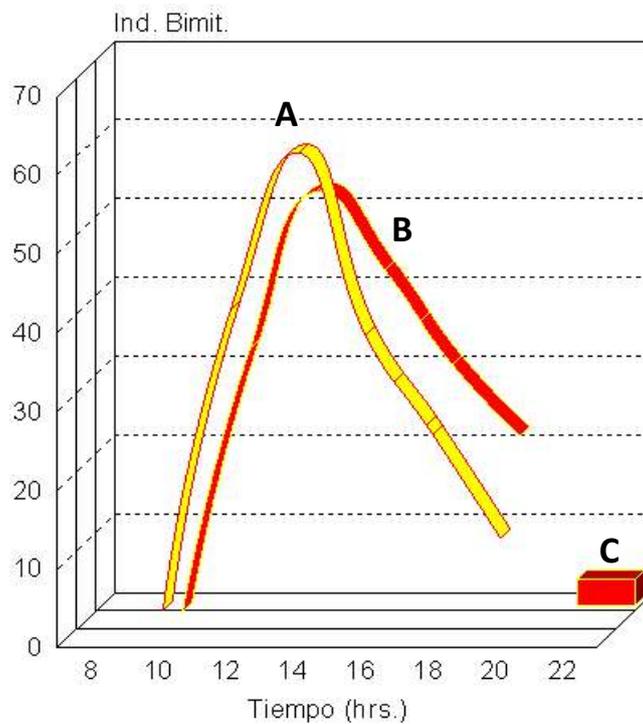
Hora	Tratamiento con cafeína al 0,033 %					
	Índice mitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	2,67	0,99	1,61	1,62		
	9,4	5,71	7,29		3,44	1,07
12	39,15	36,71	31,53	35,7		
	38,73	37,29	34,16		5,47	1,35
14	59,78	55,26	50,8	55,2		
	50,64	48,02	45,56		6,71	1,5
16	49,32	42,77	45,19	46,7		
	44,61	40,84	42,24		3,63	1,1
18	36,94	31,98	32,8	33,8		
	37,43	34,44	34,94		2,57	0,97
20	29,13	18,74	25,74	24,1		
	32,66	25,65	30,49		12,88	2,07



Gráfica 5. Curvas bimitóticas y daño cromosómico, producto del tratamiento con UV durante cinco minutos al inicio de la 10:00 horas del CT. (A = Curva control, B = Curva por tratamiento, C = ATA).



Gráfica 6. Curvas bimitóticas y daño cromosómico, producto del tratamiento con UV durante diez minutos al inicio de la 08:00 horas del CT. (A = Curva control, B = Curva por tratamiento, C = ATA).



Gráfica 7. Curvas bimitóticas y daño cromosómico producto del tratamiento con UV durante diez minutos, al inicio de la 10:00 horas del CT. (A = Curva control, B = Curva por tratamiento, C = ATA).

Cuadro 11
FRECUENCIA DE DAÑO CROMOSÓMICO (ATA) POR INDUCCIÓN DE UV EN
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*; DONDE
ATn = ANATELOFASES NORMALES, ATA = ANATELOFASES ANORMALES

Tiempo al inicio de interfase	Tratamiento		
	C1 5 min 10:00 h	C2 10 min 8:00 h	C3 10 min 10:00 h
ATn	112 (98,25%)	128 (98,46%)	130 (94,20%)
ATA	2 (1,75%)	2 (1,54%)	8 (5,8%)
Total	114	130	138

Cuadro 12
CONTINGENCIA Y ESTIMACIÓN DE X² EN LA EVALUACIÓN
DEL DAÑO CROMOSÓMICO INDUCIDO POR UV EN
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*

Tiempo al inicio de interfase	Tratamiento			
	C1 5 min 10:00 h	C2 10 min 8:00 h	C3 10 min 10:00 h	
ATn	112	128	130	370
	110,42	125,92	133,66	
ATA	2	2	8	12
	3,58	4,08	4,34	
Total	114	130	138	382

E. Tratamientos combinados de cafeína [antirreparador] + Daño cromosómico

El daño cromosómico o ATA, si bien no existió mayor evidencia estadística de que algún tratamiento con UV originara un mayor número de alteraciones; se escogió arbitrariamente el tercer tratamiento, considerándolo como el daño basal, es decir con una frecuencia del 5,80% (Cuadro 11).

Analizando la cinética de proliferación, cuando se somete a la acción combinada del tratamiento donde se obtuvo el daño basal mas cafeína (como antirreparador), no se evidenció mayores cambios entre las curvas de proliferación (Cuadros 13, 14 y 15; y Gráficas 8, 9 y 10).

En el conteo de ATA producto de tales tratamien-

tos combinados se presentaron frecuencias más elevadas respecto al daño basal (Cuadro 16), las que fueron confirmadas posteriormente a través del análisis estadístico. En primer lugar se realizó el comparativo del daño basal (C), tratamientos combinados (T1, T2, T3); hallándose diferencias significativas entre ellos; mientras que cuando solo se efectuó el análisis entre los tratamientos combinados (T1 x T2 x T3) mostró cierta similitud (Cuadro 17).

Resultó interesante el comparativo de cada tratamiento combinado (T1, T2, T3) frente al daño basal (C), hallándose en todos ellos diferencias significativas. La calidad de daño cromosómico ocasionado por el UV + Cafeína fue la misma a la producida por el UV solo, presentándose mayormente fragmentos acéntricos en anafases y telofases.

Cuadro 13
ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO DE TRATAMIENTOS
COMBINADOS CON CAFEÍNA (0,033%) DURANTE 06:00-12:00 h del CT + UV
DURANTE DIEZ MINUTOS AL INICIO DE LA 10:00 hora del CT

Tratamiento con cafeína al 0,033 %						
Hora	Índice bimitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0,05	1	0,4	0,27	4,97	1,29
	1,28	5,74	3,63			
12	11,76	15,2	10,44	12,3	4,43	1,22
	20,06	22,95	18,85			
14	26,13	19,14	23,2	22,6	5,82	1,39
	30,74	25,94	28,79			
16	18,56	16,12	12,11	15,4	6,82	1,51
	25,52	23,67	20,36			
18	11,79	13,91	18,32	14,4	7,14	1,54
	20,08	21,9	25,34			
20	17,85	20,13	16,67	28,2	1,69	0,75
	24,99	26,66	24,1			

Cuadro 14
ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO DE TRATAMIENTOS
COMBINADOS CON CAFEÍNA (0.033%) DURANTE 08:00-12:00 h del CT + UV
DURANTE DIEZ MINUTOS AL INICIO DE LA 10:00 hora del CT

Tratamiento con cafeína al 0,033 %						
Hora	Índice bimitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0,91	1,3	0,4	0,78	2,18	0,85
	5,47	6,55	3,63			
12	16,38	17,84	12,38	15,4	5,19	1,32
	23,87	24,98	20,6			
14	26,17	28,8	30,39	28,4	1,84	0,78
	30,77	32,46	23,45			
16	25,16	17,85	21,13	21,2	6,55	1,48
	30,11	24,99	27,37			
18	13,84	11,52	7,49	10,6	9,19	1,75
	21,84	19,84	15,88			
20	11,11	10,15	18,42	12,8	13,82	2,15
	19,47	18,58	25,42			

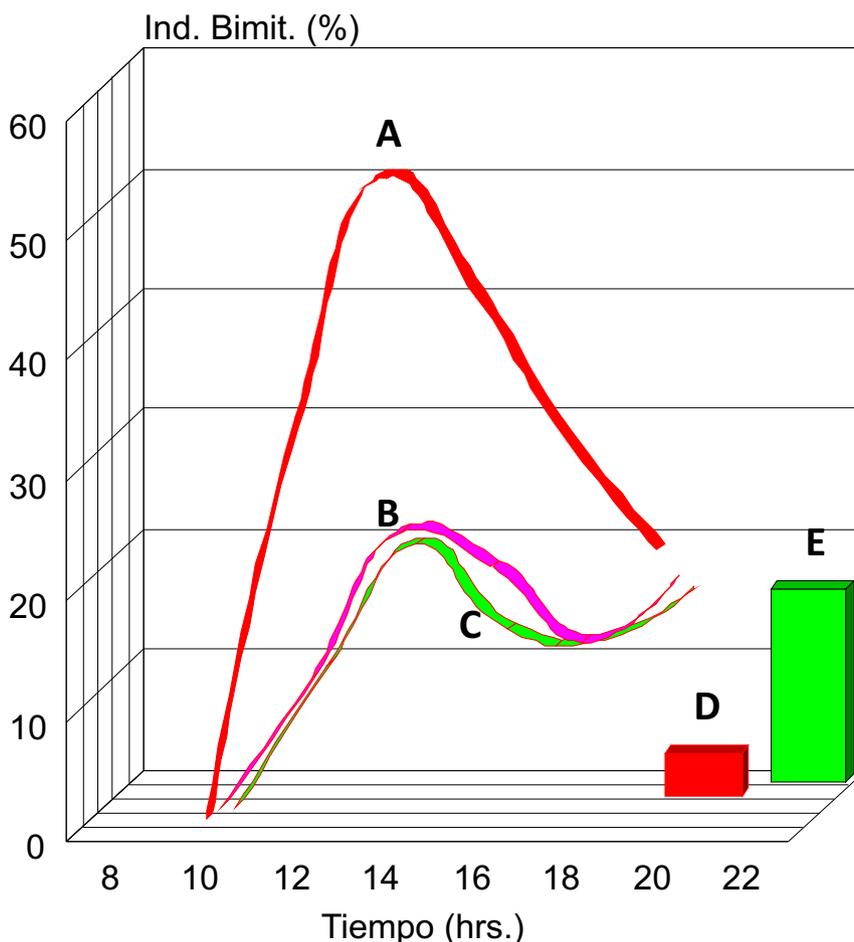
Cuadro 15
ANÁLISIS CITOLÓGICO DE ÍNDICES MITÓTICOS, PRODUCTO DE TRATAMIENTOS
COMBINADOS CON CAFEÍNA (0.033%) DURANTE 10:00-12:00 h del CT + UV
DURANTE DIEZ MINUTOS AL INICIO DE LA 10:00 hora del CT

Tratamiento con cafeína al 0,033 %						
Hora	Índice bimitótico			Xg	S ²	ES
	MI	MII	MIII			
10	0,98	0,5	0,06	0,33	4,66	1,25
	5,68	4,05	1,4			
12	18,56	22,3	26,5	20,2	1,81	0,78
	25,52	28,18	26,5			
14	35,6	37,71	42,87	38,6	4,82	1,27
	36,63	37,89	40,9			
16	40,24	41,36	37,99	39,8	1,01	0,56
	39,37	40,02	38,05			
18	10,42	12,17	14,21	12,2	2,75	0,96
	18,83	20,42	22,15			
20	13,75	9,89	13,52	12,3	3,73	1,12
	21,77	18,33	21,57			

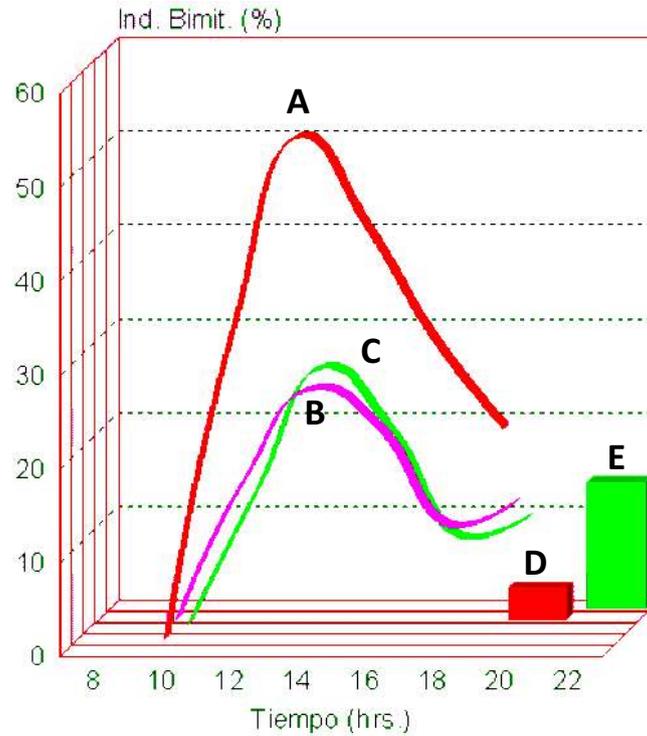
Cuadro 16

FRECUENCIA DE DAÑO CROMOSÓMICO (ATA) POR TRATAMIENTOS COMBINADOS DE CAFEÍNA + UV EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*; DONDE AT_n = ANATELOFASES NORMALES, ATA = ANATELOFASES ANORMALES

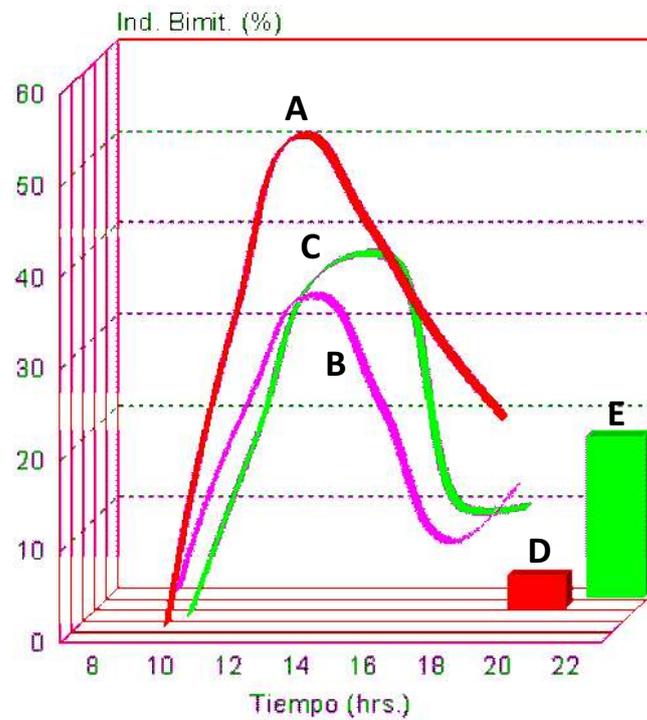
Ultravioleta Periodo del ciclo Caf.(0,033%)	Tratamiento		
	T1 10 min 10 h + 06-12 h	T2 10 min 10 h + 08-12 h	T3 10 min 10 h + 10-12 h
AT _n	97	123	93
ATA	21 (17,8%)	19 (13,38%)	15 (13,9%)
Total	118	142	108



Gráfica 8. Curvas bimitóticas y daño cromosómico producto de tratamientos combinados de cafeína (0,033%) durante 06:00-12:00 h del CT + UV durante diez minutos al inicio de la 10:00 hora del CT, en células meristemáticas de *Allium cepa*; donde A = Curva control, B = Tratamiento combinado, C = Cafeína (antirreparador), D = Daño basal, E = Daño potenciado.



Gráfica 9. Curvas bimitóticas y daño cromosómico producto de tratamientos combinados de cafeína (0,033%) durante 08:00-12:00 h del CT + UV durante diez minutos al inicio de la 10:00 hora del CT, en células meristemáticas de *Allium cepa*; donde A = Curva control, B = Tratamiento combinado C = Cafeína (antirreparador), D = Daño basal, E = Daño potenciado.



Gráfica 10. Curvas bimitóticas y daño cromosómico producto de tratamientos combinados de cafeína (0.033%) durante 10:00-12:00 h del CT + UV durante diez minutos al inicio de la 10:00 hora del CT, en células meristemáticas de *Allium cepa*; donde A = Curva control, B = Tratamiento combinado, C = Cafeína (antirreparador), D = Daño basal, E = Daño potenciado.

Cuadro 17

TABLAS DE CONTINGENCIA Y EVALUACIONES COMPARATIVAS DE X^2 PRODUCTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE CAFEÍNA + UV EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa* (DONDE, ATn = ANATELOFASES NORMALES, ATA = ANATELOFASES ANORMALES)

	C	T1	T2	T3	TOTALES
ATn	130 (120,8)	97(103,3)	123(124,3)	93(94,5)	443
ATA	8 (17,18)	21 (14,69)	19 (17,68)	15 (13,45)	63
TOTAL	138	118	142	108	506
$X^2_{w,0,05} = 9,02$		$X^2_{TAB,0,05} = 7,82$			

	T1	T2	T3	TOTALES
ATn	97 (100,36)	123(120,8)	93(91,8)	313
ATA	21 (20,20)	19 (24,31)	15 (18,49)	63
TOTAL	118	142	108	368
$X^2_{w,0,05} = 2,02$		$X^2_{TAB,0,05} = 5,99$		

	C	T1	TOTALES
ATn	130 (22,37)	97 (104,63)	227
ATA	8 (15,63)	21 (13,37)	29
TOTAL	138	118	256
$X^2_{w,0,05} = 7,58$		$X^2_{TAB,0,05} = 3,84$	

	C	T2	TOTALES
ATn	130 (22,37)	123 (128,31)	253
ATA	8 (15,63)	19 (13,69)	27
TOTAL	138	142	280
$X^2_{w,0,05} = 3,88$		$X^2_{TAB,0,05} = 3,84$	

	C	T3	TOTALES
ATn	130 (22,37)	123 (97,90)	223
ATA	8 (15,63)	15 (10,10)	23
TOTAL	138	108	246
$X^2_{w,0,05} = 9,75$		$X^2_{TAB,0,05} = 3,84$	

Cuadro 18

ANÁLISIS DE LOS VALORES DE X^2 COMPARATIVOS, EN FUNCIÓN AL DAÑO CROMOSÓMICO (ATA), PRODUCTO DE TRATAMIENTOS COMBINADOS DE UV (DAÑO) + CAFEÍNA (ANTIRREPARADOR)

Comparación de Tratamientos	$X^2_w = 0,05$
C x T1 x T2 x T3	9,02*
T1 x T2 x T3	2,02
C x T1	7,58*
C x T2	3,88*
C x T3	9,75*

(*) p = 0,05

DISCUSIÓN

La población de células meristemáticas de *Allium cepa* se encuentran sujetas a un equilibrio dinámico estable, hallándose asincrónicamente distribuidas a través del ciclo celular; por lo tanto, los índices hallados proporcionan el tiempo relativo de cada período y fase del ciclo celular, Cuadro 1.

La cafeína y metilxantinas relacionadas son bien conocidas por su habilidad de inhibir la formación de la placa celular durante la citocinesis en células vegetales⁽⁵⁾, probablemente por interferir con el Ca^{2+} y Mg^{2+} activado y actividad ATP_{asa} ; los cuales son requeridos para la fusión de las vesículas del golgi durante la fase de coalescencia^(15,17), lo que permite emplearla para obtener una subpoblación de células binucleadas que progresan a través de la siguiente interfase altamente sincronizadas, siendo la mitosis nuestra ventana de observación en el registro de los diversos tratamientos a que son sometidos.

Se estableció un período de tiempo aproximado de 10 h y 14 h promedio para la I-B y el CT respectivamente (Cuadros 2, 3 y 4 y Grafico 1); tiempos que concuerdan con los obtenidos por otros autores^(7,12,14,24,29) resultando este método de estudio muy útil en el análisis del efecto de diversas drogas en el ciclo celular.

La cinética celular por parte de la cafeína por segunda vez, es decir, como antirreparador, merma los índices bimitóticos (Cuadros 5, 6 y 7 y Gráficos 2, 3 y 4); los antecedentes señalan que cuando existe exposiciones hasta por cuatro horas, la marcación de binucleadas es lineal, entre cuatro y seis horas, decrece levemente; mientras que exposiciones por tiempos mayores se reduce notablemente. El otro factor es el de existir un solapamiento de células binucleadas que se están formando durante éste segundo tratamiento. De lo anterior se deduce que la concentración de 0,033% de cafeína, genera una menor merma de los índices bimitóticos; razón por la cual fue escogida

como concentración adecuada en los futuros tratamientos combinados.

Muchos agentes pueden estar induciendo continuamente lesiones a nivel del DNA, las cuales no se hacen objetivos a nivel microscópico^(19,21). Bender propone que producida las alteraciones, se ponen en marcha diversos mecanismos de reparación con la finalidad de subsanar la estructura alterada del DNA^(9,10,16); que pueden estar actuando dependiente o independientemente del período del ciclo celular donde se ha producido el daño. Para que se manifieste como aberraciones cromosómicas de tipo estructural es necesario de una amplificación de las lesiones primarias, las que ocurren por replicación incompleta, reparación errónea o falta de reparación.^(8,18,20)

En cuanto al daño infligido sobre el DNA, es ampliamente conocido el efecto de la radiación ultravioleta, la cual produce una distorsión de la molécula y una acumulación de rupturas, presumiblemente como resultado de la formación de los llamados dímeros de de pirimidina o dipirimidinas de ciclobutano^(3,4,10). El análisis arrojó que el patrón de proliferación se ve ligeramente disminuido por acción del UV (Cuadros 8, 9 y 10 y Gráficos 5, 6 y 7); y considerando que los tres períodos de la interfase representan el 25%, 65% y 10% del G_1 , S y G_2 respectivamente^(22,24,26), el daño se está generando en el período S_2 , S_3 y G_2 del C.T.

Estadísticamente, no se registró mayores diferencias entre estos momentos de inducción de daño (Cuadros 11,12) y de manera arbitraria se consideró el tercer tratamiento (G_2) como el que sirvió para los posteriores tratamientos combinados, considerándose como daño basal el 5,80% de ATAs. De esto se deduce que la frecuencia de aberraciones cromosómicas que se puede hallar no es la misma a la producida a nivel molecular; cuando la capacidad de reparación está por encima del daño producido en el DNA no se traducirá en aberraciones cromosómicas; pero si el daño es mayor que la capacidad de reparación, se produce un desbalance, manifiesto en aberraciones de tipo estructural.

ABERRACION CROMOSOMICA → LESION PRIMARIA - LESION REPARADA

LESION PRIMARIA < CAPAC. DE REPARACION → "0" ABERRACIÓN CROMOSOMICA

LESION PRIMARIA > CAPAC. DE REPARACION
→ FRECUENCIA ABERRACIONES ABERRACIONES CROMOSOMICAS > de 0

Complementariamente, al efecto inhibitor del proceso citocinético por la cafeína, la cinética celular de las curvas de los tratamientos combinados no muestran mayores cambios (Cuadros 13, 14, 15 y 16; y Gráficos 8, 9 y 10); sin embargo, como mencionamos, este alcaloide se comporta como un efectivo inhibidor de los procesos de reparación post-replicativa; como se demuestra a través del análisis realizado (Cuadros 17 y 18; y Gráficos 8, 9 y 10); tal fenómeno se sustentaría en el hecho de que bloquea la etapa de cierre de las rupturas producidas en una cadena del DNA durante la reparación post-replicativa, y/o el tamaño del DNA sintetizado es apreciablemente menor a la de células sin daño cromosómico⁽¹⁾.

Virtud a lo señalado anteriormente, se propone emplear este alcaloide basados en experiencias comprobadas de laboratorio^(14,22) para potenciar objetivamente el daño producido en la molécula del DNA a través de aberraciones estructurales de los cromosomas tanto en una población celular asincrónica, como sincrónica.

A continuación señalamos el protocolo a seguir durante el estudio de algún agente problema, el cual puede abordarse en una población celular asincrónica como sincrónica:

- I. Estudio en una población celular en equilibrio dinámico
 1. Tratamiento con el agente problema por un período de tiempo de dos horas _____ A
 2. Tratamiento combinadas del agente problema por dos h + cafeína 0,033% por cuatro h (dos horas con agente problema y dos horas posteriores) _____ A
 3. Tratamiento con el agente problema por un período de tiempo de diez horas _____ A
 4. Tratamiento combinadas del agente problema por diez horas + cafeína 0,033% por cuatro horas (cuatro horas últimas con agente problema) _____ A

- II. Estudio en una población de células sincronizadas con un tratamiento con cafeína 0,1 % durante una hora
 5. Tratamientos puntuales de dos horas con agente problema, en diferentes fases del período interfásico _____ A

6. Tratamientos continuos de cuatro, seis, ocho, y diez horas con agente problema, en diferentes fases del período interfásico _____ A
7. Tratamientos combinados, de agente problema por dos horas en diferentes fases del período interfásico + cafeína 0,033% durante seis últimas horas del período interfásico _____ A
8. Tratamientos combinados, de agente problema por cuatro, seis, ocho y diez horas del período interfásico + Cafeína 0.033% durante las seis últimas horas del período interfásico _____ A

A. Evaluación cinética: Que se efectúa en cinco muestras cada dos horas, posterior al tratamiento. Graficar

- A.1. Bloqueo de la proliferación celular estimada a través de los índice mitótico e índice de Fases _____ B
- A.2. No existe bloqueo de la proliferación celular estimada a través del ind. Mitótico e Ind. de Fases _____ B

B. Comportamiento cromosomico

- B.1. Presencia de alteraciones cromosómicas que se hacen más evidentes durante anafases y telofases (puentes, fragmentos acéntricos, cromosomas retardados u otro tipo de alteración cromosómica) _____ GENOTOXICO.
 - B.2. Ausencia de alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas de los cromosomas durante la mitosis^(*).
 - B.2.a. En caso de proceder de 1 _____ 2
 - B.2.b. En caso de proceder de 2 _____ 3
 - B.2.c. En caso de proceder de 3 _____ 4
 - B.2.d. En caso de proceder de 4 _____ 5
 - B.2.e. En caso de proceder de 5 _____ 6
 - B.2.f. En caso de proceder de 6 _____ 7
 - B.2.g. En caso de proceder de 7 _____ 8
 - B.2.h. En caso de proceder de 8 _____
- POSIBLEMENTE NO GENOTOXICO.**

(*) Si procede de A.1., entonces el agente problema posee gran actividad citotóxica (inviabilidad metabólica).

Como apreciamos, se puede monitorear la sustancia problema de una manera rápida en una población asincrónica; sin embargo, en el caso de realizar un estudio pormenorizado del agente problema en el ciclo

celular; como por ej., determinar en que momento del ciclo se está induciendo daño cromosómico, si se está afectando algún punto de transición, bloqueo, regulación, etc.; se propone exponerlo a una población de células sincrónicas.

La estrategia es similar a la seguida durante la realización del trabajo, debiéndose dar un golpe con cafeína 5 mM (0,1%) durante una hora, con la finalidad de obtener una subpoblación de células binucleadas, las que se originan producto de la inhibición del proceso citocinético de células que transitaban durante la telofase a interfase. Sobre esta subpoblación marcada se realizan tratamientos puntuales (tratamientos de dos horas) cada dos horas de la interfase y tratamientos continuos (tratamientos de 4, 6, 8 y 10 horas previas a la mitosis), realizando muestreos cada dos horas durante la 10 a 20 hora. La duración media del ciclo celular de meristemos ha sido establecido en 13.7 h; siendo 11.84 h para la interfase y 1.86 h para la mitosis^(14,24).

Durante el seguimiento, uno de los problemas a presentarse es la concentración a utilizar; en tal sentido, cuando se trate de una sustancia desconocida de composición química compleja, se debe realizar una prueba previa sobre el comportamiento proliferativo, en caso de no ser afectado drásticamente, seguir con el diseño ya establecido, de ser lo contrario realizar diluciones de la muestra; si se tratara de un producto químicamente puro (posible iniciador) el rango se establece entre 10^{-3} - 10^{-7} M. Aún así; es posible que pueda estar produciendo una toxicidad general, la cual se manifiesta por un bloqueo de las curvas de proliferación, durante la cual pueden o no aparecer aberraciones cromosómicas.

En la actualidad no existe un test de ensayo ideal, el cual pueda discriminar fehacientemente la no genotoxicidad de una sustancia de naturaleza química compleja o algún tipo de iniciador, pensamos que la propuesta debe ir acompañada de un complemento de pruebas adicionales, las que permitan concluir el verdadero efecto del agente problema.

CONCLUSIONES

La cafeína se comporta como un amplificador de aberraciones cromosómicas, previo daño cromosómico con UV, la que se evidencia por el incremento de anafases y telofases anormales (ATA), durante la mitosis del ciclo celular de células meristemáticas de *Allium cepa*.

De las tres concentraciones de cafeína ensayadas como antirreparador del DNA, la de 0,033% es la más adecuada en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Andrew, M.; Grant, W. 1972. Cytological Effects of the Pesticides Phosdrin and Bladex on *Tradescantia* and *Vicia faba*. *Journal Genet. Cytol.* 14:157-165.
- 2 Becerra, J.; Lopez Saez, J. 1981. Calcium and Plant Cytokinetics. En Anghileri Eds. *The Rol of Calcium in Biological Systems*. Vol.I. CRS.Press. INC. Florida, pp. 241-251.
- 3 Carrier, W. 1981. Measurement Of Pyrimidine Dimers By Paper Chromatography. En Friedberg y Hanawalt. *DNA Repair*. New York. Vol. I.
- 4 Cerutti, P. 1981. Measurement Of Thymine Damage Induced By Oxigen Radicak Species. En Friedberg y Hanawalt. *DNA Repair*. New York. Vol. I. p.p.
- 5 De La Torre, C.; Gonzalez Fernandez, A.; Gimenez Martin, G. 1971. Cell Flow and its Application to the Estimate of Cell Cycle Parameters in Meristems. *Biologisches Zentralblatt* 90:707-710.
- 6 De La Torre, C.; Gimenez Abian, M.; Gimenez Martin, G. 1988. A Novel Approach to Study the Regulation of Cell Proliferation. *An Aula Dei*. 19(1-2):19-30.
- 7 De La Torre, C.; Gonzalez Fernandez, C.; Gimenez Martin, G. 1989. Stringency at Four Regions of the Plant Cell Cycle were Proteins Regulating its Progression are Synthesized. *Journal of Cell Science*. 94:259-265.
- 8 Dulot, F.; Pastori, M.; Olivero, O.; Von Guradze, H. 1982. Los Ensayos Citogenéticos in vivo en estudios de Mutagénesis Química. *Actas del V Cong.Latinoam. de Genética*. Stgo de Chile. pp.209-225.
- 9 Farland, W.; Sutherland, B. 1981. Analysis Of Pyrimidine Dimers Content Of Isolated Dna By Nuclease Digestion. En Friedberg y Hanawalt. *DNA Repair*. New York. Vol. I. p.p.
- 10 Friedberg, E.; Hanawalt. 1981. *DNA Repair*. Tomo I y II. Edit.Marcel Dekker. New York. EEUU.
- 11 Gimenez Martin, G.; Meza, J.; Lopez Saez, F.; Gonzalez Fernandez. 1969. Kinetics of Binucleate Cell Production by Caffeine. *Cytologia* 34:972-972.
- 12 Gimenez Martin, G.; Gonzalez Fernandez, A.; De La Torre, C. 1971. The Phases Numbers and Their Variation Under Different Treatments. *Experientia* 27:972-974.
- 13 Gomez, S.; Villalobos, R. 1994. Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in *Vicia faba* Monitors of Environmental Pollutants. *Mutation Research. Genetic Toxicology Testing* 95-113.p.
- 14 Gonzalez Cabeza, J. 1994. Efecto Antirreparador de la Cafeína sobre el Daño Cromosómico Inducido por el Herbicida 2,4-D Sal Amina (U-46) en el Ciclo Celular de Meristemos de *Allium cepa*. Tesis para optar el Grado Acad. de Bachiller en C.C.B.B. Univ. Nac. de La Libertad. Trujillo - Perú.
- 15 Gonzalez fernandez, a.; lopez saez, J. 1980. The Effects of Adenosine on Caffeine Inhibition of Plant Citokinesis. *Enviromental and Experientia Bolanns*. Vol. 70:455-461.

- 16 Howard,E; Flanders. 1982. Reparación Inducible del DNA. En Cairns (Eds.) El Cáncer, p.p. 36-46. Libros de Investigación y Ciencia. Prensa Científica. España.
- 17 Hepler, P; Bonsignore, C. 1990. Caffeine Inhibition of Citokinesis: Ultrastructure of Cell Plate Formation/ Degradation. *Protoplasma* 157:182-192.
- 18 Korte, C.; Jalal, S. 1982. 2,4-D Induced Exchanges in Cultured Human Lymphocytes. *The Journal of Heredity*. 73:224-226.
- 19 Lafuente, N.; Ellahueñe, M.; Garcia, M.; Valdivia, R. 1982 Modificaciones de la Fibra de Cromatina en Células Germinales, por la Acción de Agentes Químicos. *Actas del V Cong. Latinoamer. de Genét. Stgo. de Chile*. pp. 226-242.
- 20 Lawley, P; Warren W. 1981. Measurement Of Alkylation Products. En Friedberg y Hanawalt. *DNA Repair*. New York. Vol. I. p.p.
- 21 Liang, G.; Liang, Y. 1972. Effects of Atrazine on Chromosomal Behaviour in Sorghum. *Journal Genét. Cytolog.* 14:423-427.
- 22 Lopez, N.; Zuleta, M. 1979 Influencia de la Cafeína en la Producción de Traslocaciones Inducidas por Rayos Gama en Espermatozoides de *Drosophila melanogaster*. *Actualidades Biológicas. Univers. de Antioquia, Medellín*. Vol. 8, Nº 29-39:23-27.
- 23 Lopez Saez, J.; Gimenez Martin,G.; Gonzalez Fernandez, A. 1966. Duration of the Cell Division Cycle and its Dependence on Temperature. *Z. Zellforschung* 75:591-600.
- 24 Navarrete, M.; C. De La Torre; J. Schavaratzman. 1978. Compartmentalizing the S Period. *Cell Biology International Reports*. Vol. 2. Nº6:607-613.
- 25 OMS. 1978. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Ed. World Health Organization. Part. I. 273 p.p.
- 26 Paterson, M.; Smith, B.; Smith, P. 1981. Measurement Of Enzime-Sensitive Sites In Uv-Or Irradiated Human Cells Using *Micrococcus luteus* Extracts. En Friedberg y Hanawalt. *DNA Repair*. New York. Vol. I. p.p.
- 27 Sans,J.; Gimenez Martin,G.; De La Torre,G. 1980. Onset Proliferationin Dormant Roots of *Allium cepa* L. Bulbs. *Kinetics Analysis. Biol. Cell.* 38:99-104.
- 28 Van'T Hoff, J. 1968. Experimental Procedures for Measuring Cell Population Kinetic Parameters in Plant Roots Meristems. In *Methods in Cell Physiology*. Vol. III:95-116.
- 29 Zuleta, M. 1979. Toxicología Genética. *Actualidades Biológicas. Univ. de Antioquia. Medellín*. Vol. 8, Nº 29 y 30.