

ACCION DE DERIVADOS PURINICOS SOBRE EL PROCESO  
DE MITOSIS EN *VICIA FABA*

P O R

MARIO I. ALARCON (\*)

R E S U M E N

Se estudia en meristemas radicales primarios de *Vicia faba* la acción de derivados purínicos sobre la frecuencia de fases de la mitosis y se determina en estos casos el Índice Mitótico.

De los análisis realizados, se concluye que en general ejercen un efecto mistostático en profases tardías y que con excepción de la teobromina, la acción conserva una relación proporcional inversa con los I.M.

A B S T R A C T

The effect of purine derivatives on the mitotic frequency of the primary radicle meristems of *Vicia faba* are studied and the mitotic indices are established.

From the analysis, it is concluded that, excepting teobromine, the mitostatic effect on the late prophase is inversely proportional to the mitotic indices.

I N T R O D U C C I O N

Es ya concenso general que el creciente empleo de sustancias químicas, como fármacos, desinfectantes preventivos, tanto en productos vegetales como animales, como asimismo el empleo de sustancias sintéticas que se incorporan a los organismos con diferentes motivos, está conduciendo a los seres vivos a un contacto que ya deja

(\*) Dpto. de Biología Celular, Instituto Central de Biología, Universidad de Concepción.

de ser inaparente y se transforma en acción significativa sobre sus procesos fisiológicos y bioquímicos normales.

La presencia de compuestos de desechos industriales en las atmósferas poblacionales, se añade a lo ya señalado. Este conjunto de acciones predispone a los organismos a estar en permanente contacto con productos químicos que pueden afectar, a no dudarlo, una amplia gama de circuitos biológicos.

En trabajos recientes hemos establecido en forma general, alteraciones citológicas de varias drogas con núcleo químico de importancia terapéutica, determinando modificaciones en los índices mitóticos (Alarcón, M. y Moya, N. 1970).

Sin embargo, los efectos a nivel citológico pueden manifestarse estableciendo variadas acciones sobre los sistemas enzimáticos celulares como asimismo pueden afectar loci celulares bien definidos y de diferente ubicación en la estructura celular.

En forma destacada se aprecia en las revisiones bibliográficas la acción de agentes mutagénicos, especialmente desde los trabajos de Auerbach y Robson (1944) con mostazas nitrogenadas. Aunque la mayor parte de las experiencias se han efectuado de preferencia en *Drosophila*, *Neurospora*, bacterias y virus, no hay duda de que por interpolación de resultados y por comprobaciones experimentales sus acciones también alcanzan a otros grupos de seres vivos.

Los cambios mutagénicos, se estima hoy, se producen por las sensibilidades a las acciones químicas del ácido desoxi-ribonucleico, al que alteran en sus bases secuenciales. Se conoce ya los efectos inhibitorios en la síntesis del ADN por los clásicos agentes mutágenos: radiaciones ultravioletas y mostazas nitrogenadas (Brachet, J. 1957).

Es frecuente que la acción de un mutágeno traiga aparejada fragmentación cromosómica. El análisis citológico permite precisar la sensibilidad del ciclo mitótico especialmente a la acción de estos agentes. Clásicos son al respecto los trabajos de Darlington y McKish (1951) que señalan como punto sensible a la acción de un agente de esta naturaleza (hidrazida maleica) el brazo corto del cromosoma "M" en *Vicia faba*.

Correlaciones similares se han informado por Wilson, G.B. 1960. Sin embargo, existe dificultad de confrontación de experiencias, ya que siendo un fenómeno de gran sensibilidad que ocurre dentro de la célula, hay variaciones cuando se emplean sustancias químicas de pureza diferente, tejidos elegidos para la experimentación, sensibilidad diferencial manifestada para el ciclo mitótico, condiciones de experimentación, etc..

En un trabajo anterior (Alarcón, M., Moya, N. 1970), se han establecido condiciones experimentales en la comparación de varias sustancias químicas. En general los cuadros comparativos de diferentes autores no pueden cotejarse con facilidad, dado que las experiencias

se han hecho sobre una amplia gama de horarios, lo que afecta los ritmos circadianos, concentraciones y duración del tratamiento.

En estudios preliminares se encontró una manifiesta acción diferenciada de dos sustancias purínicas sobre el índice mitótico: cafeína y teofilina.

Mientras la teofilina muestra una acción inhibitoria bloqueando la mitosis en metafase, efecto mitoclásico evidente y de acuerdo a otros autores (Mangenot, G. y Carpentier, S. 1945; Deysson, G. 1968; Hughes, A. F. W. 1952; Gelfant, S. 1963), la cafeína mostró valores confusos, lo que sugeriría una acción química muy diferente a la acción mitoclásica.

Se ha considerado conveniente revisar esta acción y agregar además las modificaciones que podrían producirse con teobromina y aminofilina para esclarecer en estas condiciones de trabajo la acción efectiva de estos derivados purínicos sobre las variaciones mitóticas, ya sea un efecto mitoclásico, cromatoclásico o una estatmocinecís.

### MATERIALES Y METODOS

Se emplea la técnica señalada por MacLeod y Davinson, D. 1968, adaptada por Alarcón, M.; Moya, N. 1970 y se efectúa el recuento directo en los aplastados en los que se ha empleado la técnica de Feulgen (Humanson, G. 1962).

Los derivados purínicos, cafeína, teofilina, teobromina, aminofilina, son agentes que farmacológicamente corresponden a las acciones señaladas en la Tabla N° 1. La dosificación usada para efectos de comparación es, aproximadamente, la empleada en terapia humana, lo que permite seguir a posteriori estudios comparativos con trabajos efectuados anteriormente (Alarcón, M. y Moya, N. 1970). (Tabla N° 2).

### RESULTADOS

Tabla N° 1

#### NUCLEOS PURINICOS EMPLEADOS Y SU CLASIFICACION FARMACODINAMICA

Derivado Purínico	Clasificación farmacodinámica
Cafeína	Estimulante cerebral
Teobromina	Diurético heterocíclico
Teofilina	Diurético heterocíclico
Aminofilina	Diurético heterocíclico y coadyudante de la función cardiotónica

TABLA N<sup>o</sup> 2

DOSIFICACION DE DERIVADOS PURINICOS EMPLEADOS SOBRE  
CARIOQUINESIS, EN *VICIA FABA*

Derivado Purínico	Dosis empleada
Cafeína	1.0 %
	0.5
	0.1
Teofilina	1.0 %
	0.5
	0.1
Teobromina	1.0 %
	0.5
	0.1
Aminofilina	1.0 %
	0.5
	0.1

Desarrollando la técnica ya señalada se procedió a efectuar aplastados en 5 preparaciones para cada dosis de droga considerada y luego se efectuaron recuentos en cada una de ellas; se procedió a promediar los valores (Tabla N<sup>o</sup> 3). Se efectuaron controles en cada preparación con dosificación diferente.

TABLA N<sup>o</sup> 3

FRECUENCIA MITOTICA EN MERISMAS RADICULARES DE *VICIA FABA*  
TRATADOS CON DERIVADOS PURINICOS

	I	P	M	A	T	I.M.	
T/M Control	3608	194	46	29	27	7.9	
Cafeína	1%	3519	43	14	2	—	1.7
	0.5%	4689	100	29	10	—	2.8
	0.1%	3923	92	91	11	—	4.7
Teofilina	1%	3265	43	12	1	—	1.6
	0.5%	1655	30	39	9	—	4.5
	0.1%	1827	104	14	9	1	6.8
Teobrimina	1%	1588	42	14	—	—	3.5
	0.5%	2524	129	28	—	—	6.2
	0.1%	2971	62	29	1	1	3.1
Aminofilina	1%	3532	51	11	—	—	1.7
	0.5%	1551	47	20	8	—	4.8
	0.1%	1391	41	25	9	—	5.3

## DISCUSION

El análisis del proceso mitótico clásico ha permitido separar diferentes fases y hacer un estudio morfológico, fisiológico y bioquímico de ellas, utilizando lo que Grassé ha llamado "diseción bioquímica" mediante el empleo de sustancias inhibitorias que en determinadas condiciones detienen el proceso en fases bien definidas y por acciones precisas (C-mitosis o un veneno cromosómico). Grassé, P. et al. 1969.

Mucho se ha informado al respecto, ya sea en el análisis mismo del proceso divisional (Gelfant, S. 1963; Swann, M. 1952), o bien, de la acción de sustancias químicas sobre la mitosis (Kihlman, Bengt. 1949; Kihlman, B. 1955; Kihlman, B. A. 1956; Wilson, G. 1960; Ostertag, W. et al. 1965; Deysson, G. 1968; Mariani, A. 1969; Davinson, O. 1969; Matagne, R. 1969).

Como hemos centrado la acción en los derivados purínicos, los resultados obtenidos recaban de un análisis previo.

Todos los estudios implican bloqueos mitóticos por cafeína o teofilina en metafase, lo que a menudo ocurre con formación de células binucleadas. A la microscopía electrónica se ha detectado que la presencia de cafeína inhibe la migración de vesículas Golgi a la placa ecuatorial (Deysson y Benbadis, 1966); esto impediría la formación membranosa separatriz de las nuevas células y justificaría la presencia de células binucleadas.

De acuerdo a lo planteado con anterioridad, la acción de estos núcleos químicos interviene en acciones enzimáticas específicas lo que se traduce en una expresión citológica que detectamos como bloqueo en metafase del ciclo mitótico.

A nivel molecular, la cafeína tiene un marcado efecto sobre la actividad glicolítica con un aumento leve inicial y luego una acción inhibitoria sobre este proceso (Wilson, G. B. 1960).

Sin embargo, de los recuentos efectuados en las condiciones experimentales señaladas, cabe destacar que en todos los derivados purínicos experimentados existe una tendencia significativa a detener el proceso mitótico en profases tardías más que en metafases (Tabla N° 3).

Con cafeína la dosificación usada se demuestra óptima, pues al 1% se detecta un I.M. de 1.7, lo que está indicando una activa mitoinhibición, la graduación observada en el aumento de este valor en las dosificaciones menores contempladas revela que, sin duda alguna, existe una relación directa entre concentración y porcentaje de inhibición del proceso mitótico. Se destaca que la ausencia de figuras demostrativas de las fases tardías de la mitosis es significativa para afirmar que el proceso sí se detiene en las fases tempranas; a medida que disminuye la concentración comienza a aparecer una desviación

a la derecha y a completarse la representatividad de las figuras. Los índices mitóticos también se elevan demostrando la tendencia a recuperar la normalidad.

La experimentación con teofilina permite concluir que sus efectos son bastante similares a los que manifiesta la cafeína, sin embargo, su acción es de intensidad menor, pues sus índices mitóticos a las concentraciones mediana e inferior demuestran claramente que la recuperación es más rápida que con cafeína.

La acción de la teobromina en condiciones similares demostró resultados muy diferentes en cuanto a su proporcionalidad de acción, siendo notoria la elevación de I.M. a la concentración media. Sin embargo, la distribución del diagrama de las distintas fases mitóticas mantiene la proporcionalidad de los otros derivados purínicos experimentados y también podemos indicar una detención del proceso en profases tardías más que en placas metafásicas.

Aminofilina, reveló resultados experimentales muy similares a cafeína y teofilina (Tabla N<sup>o</sup> 3), de lo que podría desprenderse que su acción es más de núcleo que de los radicales químicos diferenciales, con excepción del radical metilo. Sin embargo, si analizamos el caso de la teobromina con respecto a los otros derivados purínicos, vemos que, representando todos ellos derivados de la 2-6 dioxipurina, para la acción citológica detectada, es necesaria la presencia del radical metilo en posición 1. Careciendo la teobromina de este radical en esa posición (teobromina: 3-7 dimetil, 2-6 dioxipurina), podríamos suponer que la alteración a la proporcionalidad del índice mitótico se debe a algún efecto no bien determinado derivado de la falta de este radical metilo.

La aminofilina (teofilina etilenodiamina), no manifiesta alteración por la presencia del grupo etilenodiamina, y conserva sí, de acuerdo con la hipótesis sugerida, su acción sobre el proceso mitótico, en igual forma que la teofilina que representa su núcleo básico (1-3 dimetil, 2-6 dioxipurina).

Siendo la cafeína 1-3-7- trimetil 2-6 dioxipurina, es claro concluir que la presencia del radical metilo en posición 7 no afecta los resultados generales observados. Sólo la posición 1 del radical metilo en este núcleo purínico parece ser significativa. Para completar este análisis sería interesante analizar la acción de derivados 2-6 dioxipurínicos con radicales metilos en la posición 1 y 7 o bien derivados monometilados en las posiciones señaladas.

No cabe duda que los resultados encontrados citológicamente, obtenidos a través de los recuentos, revelan una acción muy similar sobre el proceso mitótico y podemos afirmar su acción mitostática sobre los meristemas radiculares de *Vicia faba* en las condiciones experimentales que nos hemos planteado y que concuerdan con las de otros autores como MacLeod y Davinson (1968), cuyos trabajos se han hecho clásicos.

Esto resulta muy conveniente para efectuar estudios comparativos, pues la diversidad de métodos y condiciones de experimentación hace difícil concluir resultados definitivos a nivel citológico por las variables a que están sometidos los sustratos biológicos en el ambiente.

### CONCLUSIONES

1.— Se estudia la acción de cuatro derivados purínicos sobre el proceso de mitosis en meristemas radiculares de *Vicia faba*.

2.— Establecidas las frecuencias de las figuras mitóticas, se expresó este proceso en índice mitótico (I.M.) pudiendo concluir además, que en las condiciones experimentales establecidas, se produce un efecto mitostático en profase tardías más que en metafase como lo señalan otros autores.

3.— Sólo la teobromina (3-7 dimetil, 2-6 dioxipurina) mostró alteración no proporcional del índice mitótico a las diferentes concentraciones experimentadas.

Siendo la teobromina el único derivado 2-6 dioxipurínico que carece del radical metilo en posición 1, se atribuiría a esta ausencia la alteración del I.M.

### BIBLIOGRAFIA

- ALARCON, M. I. y MOYA, N.  
1970 Variaciones cariotípicas en *Vicia faba* inducidas por acción de algunas sustancias químicas de importancia terapéutica. Bol. Soc. Biol. Concepción, 42:287-306.
- AUERBACH, C. and ROBSON, J. M.  
1944 Production of Mutation by Allyl Isothiocyanate. Nature 154:81.
- BRACHET, JEAN  
1957 Biochemical Cytology. Academic Press. Inc. Publishers, New York. 194-206.
- DARLINGTON, C. D. and McLEISH, J.  
1951 Action of Maleic Hydrazide on the Cell. Nature 167:407-408.
- DAVIDSON, D.  
1969 The Differential Response of Meristems of *Vicia faba* to Colchicine. Caryologia 22(3):213-221.
- DEYSON, GUY  
1968 Antimitotic Substances, Intern. Rev. Cytol. 24:99-148.
- DEYSSON, GUY and BEMBADIS, M. C.  
1966 Details of the Inhibitory Action of Caffeine on Mitosis in Meristem Radicles of *Allium sativum* L: Electron Microscope Studies. J. Microscop. 5:511-518.
- GRASSE, PIERRE, P., LAVIOLETTE, PIERRE; HOLLANDE, ANDRE;  
NIGON, VICTOR et WOLFF, ETIENNE.  
1970 Biología General. Toray-Masson, S.A. Barcelona. España 149-150.

- GELFANT, S.  
1963 Inhibition of Cell Division. A critical and Experimental Analysis. Intern. Rev. Cytol. 14:1-39.
- HUGHES, ARTHUR  
1952 The Effects of Purines and Related Substances upon Cells in Chick Tissue Cultures. Exptl. Cell Res. 3:108-120.
- HUMANSON, GRETCHEN, L.  
1962 Animal Tissue Techniques. W. H. Freeman and Company San Francisco and London. 293-295.
- KIHLMAN, BENGT  
1949 The Effect of Purine Derivatives on Chromosome. Hereditas 35: 393-396.  
1950 8-Ethoxycaffeine, an Ideal Inducer of Structural Chromosome Changes in the Root Tips of *Allium cepa*. Exptl. Cell. Res. 1: 135-138.
- KIHLMAN, B.  
1955 Chromosome Breakage in *Allium* by 8-ethoxycaffeine and X-rays. Exptl. Cell. Res. 8:345-368.
- KIHLMAN, B. A.  
1956 Factors Affecting the Production of Chromosome Aberrations by Chemicals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2:543-555.
- MAC LEOD, R. D. and DAVIDSON, 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.
- MANGENOT, G. and CARPENTIER, S.  
1944 On the Mitotic Effects of Caffeine and Theophylline. C. R. Seances Soc. Biol. Filiales, 138:105-107.
- MARIANI, ANNA and MANNUCCI, ALESSANDRA  
1969 Sensitivity of the Mitotic Cycle to Monocrotaline-preliminary Data on *Vicia faba*. Cariologia 22(2):113-118.
- MATAGNE, R.  
1969 Aberrations de Structure Chromosomique Induites par le L-diépoxybutane Chez *Vicia faba* en Relation avec le Cycle Mitotique. Caryologia 22(2):169-176.
- OSTERTAG, W., DUISBERG, E. and STUERMANN, M.  
1965 The Mutagenic Activity of Caffeine in Man. Mutation Res. 2: 293-296.
- SWANN, M. M.  
1952 Structural Agents in Mitosis. Intern. Rev. Cytol. 1:195-210.
- WILSON, G. B.  
1960 The Study of Drug Effects at the Cytological Level. 9:293-304.