

Efecto citoreparador sinérgico de *Solanum tuberosum* L. "papa" y *Croton lechleri* L. "sangre de grado" en *Allium cepa* L. "cebolla" con daño cromosómico inducido por ácido acetilsalicílico "aspirina"

Effect repaircell of *Solanum tuberosum* L. "papa" and *Croton lechleri* L. "sangre de grado" tissue of *Allium cepa* L. "cebolla" with chromosomal damage induced by acetylsalicylic acid "aspirina"

Luis F. Gonzales LLontop¹, Elizabeth Hernández Alva¹ y Raúl A. Beltrán Orbegoso²

Resumen

Se determinó el efecto citoreparador de *Solanum tuberosum* L. "papa" y *Croton lechleri* L. "sangre de grado" en tejidos de *Allium cepa* L. "cebolla" con daño cromosómico inducido por ácido acetilsalicílico "aspirina" donde se seleccionó raicillas de 2,5 cm. de 45 bulbos de *Allium cepa* L. a fin de asegurar una cinética de mitosis constante de la muestra. Se usó un diseño con tres grupos experimentales, fijándose las raicillas cada 10 minutos para detectar las células en diversos momentos de mitosis de la siguiente onda de división; luego, se aplicó la técnica de coloración rápida de Tjio y Levan. Los tejidos de *A. cepa* L. "cebolla" que fueron tratados con ácido acetilsalicílico "aspirina" 1% exhibieron: puente (15,8%), fragmentaciones (5,2%), reordenamiento (14,6%) y sin aberraciones (64,4%) mientras el grupo cuatro que recibió aspirina 1% más el extracto presentó: puente (7,6%), fragmentaciones (2,3%), reordenamiento (4,4%) y sin aberraciones (85,7%). Se confirmó el notable efecto citoreparador de *S. tuberosum* L. y *C. lechleri* L. al detectar que el daño cromosómico inducido con aspirina disminuyó porcentualmente convirtiéndose el uso de este extracto en una estrategia terapéutica para el diagnóstico clínico de enfermedades que aquejan al ser humano.

Palabras clave: reparación celular; daño cromosómico, *Solanum tuberosum* L.; *Croton lechleri* L.; ácido acetilsalicílico "aspirina".

Abstract

The effect repaircell of *Solanum tuberosum* L. "potato" and *Croton lechleri* L. "sangre de grado" tissue of *Allium cepa* L. "Onion" with chromosomal damage induced of acetylsalicylic acid "aspirin" which was selected rootlets of 2.5 cm. of 45 bulbs of *A. cepa* L. to ensure mitosis kinetics constant of the sample. Experimental design was used with three groups, setting the rootlets every 10 minutes to detect cells in mitosis at different times of the next wave of division, then applied the quick staining technique and Tjio Levan. Tissues of *A. cepa* L. "Onion" that were treated with acetylsalicylic acid "aspirin" 1% exhibited: bridge (15.8%), fragmentation (5.2%), rearrangement (14.6%) and without aberrations (64.4%) while group four received aspirin 1% plus extract noted: bridge (7.6%), fragmentation (2.3%), rearrangement (4.4%) and without aberrations (85.7%). We confirmed the remarkable restorative effect of *S. tuberosum* L. and *C. lechleri* L. to detect the damage chromosomal induced by acetylsalicylic acid "aspirin" became decreased percentage use of this extract in a therapeutic strategy for the clinical diagnosis of diseases that afflict humans.

Keywords: repaircell effect, chromosomal damage, *Solanum tuberosum* L. "potato", *Croton lechleri* L. "sangre de grado", acetylsalicylic acid "aspirin."

¹ Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, luisfego@hotmail.com

² Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo

Introducción

Actualmente uno de los principales problemas de la biósfera lo constituye la creciente genotoxicidad celular por mutágenos químicos, los cuales al actuar sobre el ADN, generan puntuales mutaciones en la secuencia nucleotídica o gruesas aberraciones en la organización intra o intercromosomal (De Robertis *et al.*; 2006).

Hace 20 años en California, EE.UU., científicos lograron la primera transformación de células normales en cancerosas usando el virus del Polioma en fibroblastos de Hamster (Weinberg, R. 1998). Las investigaciones sobre transformación celular en células animales realizadas por Devoret (1999) y Howard-Flander (1999) llegaron a determinar que la transformación celular inducida era posible realizarla en el laboratorio comprendiendo el daño del ADN, y por ende la alteración cromosómica.

Entre las aberraciones intracromosómicas más raras se halla el fragmento cromosómico, el cual es una manifestación morfológica de la ruptura previa de un cromosoma que se fusiona después con su homólogo (Alberts *et al.*, 2005; De Robertis & De Robertis, 2006). Según lo evidenciado experimentalmente en *Zea mays* “maíz” (King, 1969), en *Musculus cepa* Walker “ratón” (Goldstein *et al.*, 1999) y en *A. cepa L* “cebolla” (González, 2004); los fragmentos se observan durante la anafase mitótica o meiótica “conectando” los materiales de las futuras células hijas (Gonzales, 2007)

Ante la invasión de múltiples agentes químicos utilizados por el hombre en distintas áreas de la industria agroalimentaria y conociendo que los diversos procesos transformantes celulares se han detectado por el efecto de estos productos ingresados a través del medio ambiente y siendo el cacao uno de los vegetales de mayor consumo humano en sus diversas presentaciones, es menester conocer los efectos mutagénicos que en la molécula del ADN puedan estar ocasionando este producto químico (Croce, 1985).

En la actualidad existen trabajos sobre alteraciones cromosómicas, habiéndose dilucidado ya algunos mecanismos transformantes entre los que destaca los estudios en *Zea mays* “maíz” (King, 1969), *Mus musculus cepa* Walter “ratón” (Goldstein *et al.*, 1999), linfocitos humanos (Korte & Jalal, 1982) y *Allium cepa L.* (González, 2004); de allí que el objetivo del presente estudio es inducir daño cromosómico en tejidos de *Allium cepa L.* usando como agente mutágeno la aspirina aportando evidencias sobre el supuesto daño celular y determinando el grado de genotoxicidad de esta sustancia.

Croton lechleri L. “sangre de grado” (Lezaeta, 2001) presenta una riqueza de componentes orgánicos activos presentes en las hojas y en la savia (corteza) de esta planta tales como: la taspina, la 3-4-O-Dimetilcedrusina, los polifenoles (Catequinas y Proantocianidinas) y su látex (savia pura); además posee los 11 aminoácidos esenciales principio clave en la activación eficiente de la reparación celular de toda célula eucarionte (De Robertis *et al.*, 2006).

Se determinó el efecto efecto citoreparador de *Solanum tuberosum L.* “papa” y *Croton lechleri L.* “sangre de grado” en tejidos de *Allium cepa L.* “cebolla” con daño cromosómico inducido por ácido acetilsalicílico “aspirina”.

Material y métodos

Tratamiento de las raicillas de *Allium cepa* L. : Se trabajó con 45 bulbos de *A. cepa* L. “cebolla” variedad arequipeña. El número de bulbos utilizado por tratamiento fue de 09 y se hicieron 05 tratamientos. Los bulbos fueron mantenidos en agua constantemente, renovada bajo permanente aireación en oscuridad y a temperatura de 20°C. Tres días después se seleccionaron solamente las raicillas que tuvieron una longitud promedio de 1,5 cm para todos los grupos, a fin de asegurar muestras con cinética de mitosis constante.

Determinación del tiempo del ciclo celular promedio de la población mononucleada de *A. cepa* L.: Se determinó tomando como base la duración de la onda celular binucleada de *A. cepa* L. usando cafeína 0,1% por una hora de iniciado los tratamientos. Para tal efecto, se estableció previamente los índices interfásicos y mitótico promedio como se muestra en la Tabla 1; determinándose luego las duraciones promedio de la interfase y de las cuatro fases de la mitosis (De La Torre *et al.*; 1999).

Inducción de la genotoxicidad química con ácido acetilsalicílico “aspirina” 1%: Una vez conocidas las duraciones de los eventos celulares, en el grupo experimental A, las raicillas de *A. cepa* L., fueron sometidas a la acción de la aspirina 1% a partir de la 4ta. hora hasta la 6ta. hora en la etapa “S” del periodo inicial de la etapa de interfase a fin de inducir la formación de alteraciones cromosómicas deseadas; simultáneamente en el grupo experimental C dichas raicillas se sometieron a la acción combinada de la aspirina 1% como agente causante de daño cromosómico y de *C. lechleri* L. “sangre de grado” y de *S. tuberosum* L. “papa blanca” 1% con el fin de lograr la reparación cromosómica esperada, para tal efecto se usó un diseño experimental mostrado en la figura 1 (Beltrán & Gonzales, 1995).

Concentración y cuantificación óptima de extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado”: Se empleó el extracto de *S. tuberosum* L. “papa” del cual se obtuvo a través de varias papas multifragmentadas y/o rayadas con el uso de un cuchillo y un rayador común de cocina. Luego se procedió a extraer el extracto de papa mediante el uso de una tela blanca limpia y esterilizada, para luego presionar periódicamente la papa fragmentada hasta que se logró un extracto puro de papa. Según el diseño experimental se utilizó 150 mL de extracto de papa en cada tratamiento. El extracto de sangre de grado previamente fue obtenido de la corteza de la planta, proveniente de la ciudad de Iquitos. La extracción y concentración de principios activos se realizó disolviendo 0,5 ml y 1 ml de la savia pura en 100 mL de agua destilada, acidulada con ácido clorhídrico al 5%. Se decantó separando los residuos y luego se filtró. Se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad por dos semanas hasta que se consiguió la formación de un extracto puro y moderadamente diluido. Se lavó con acetato de etilo para eliminar las impurezas que quedaron y se calentó suavemente a una temperatura no mayor de 35°C hasta lograr un extracto fluido adecuado. Se utilizó 20 μ L de extracto de sangre de grado para cada tratamiento.

Determinación de índice de células mononucleadas normales que fueron sometidas a la acción de la aspirina 1%: Se empleó los índices del ciclo celular y de las fases mitóticas de la población mononucleada de *A. cepa* L. del ciclo celular de *A. cepa* realizada y calculada por De La Torre *et al.* (1999) y Gonzáles (2004). Terminado los tratamientos con la sustancia química ensayada y del reparador natural, las raicillas fueron disectadas según el diseño experimental hasta alcanzar aproximadamente las 13 horas de duración del ciclo celular, prosiguiéndose según la técnica rápida de Tjio y Leván que tienen los siguientes pasos: fijación de las raicillas en carnoy, coloración con

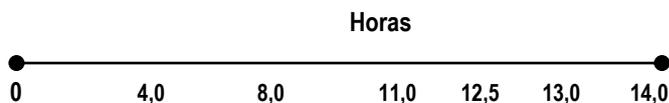
orceína acética clorhídrica 1%, aplastamiento o squash de las raicillas, observación en microscopio a 400x y 1000x y fotografiado de las fases celulares deseadas.

Cálculo del índice mitótico: Se aprecia en la Tabla 1 los índices promedio de los periodos del ciclo celular y de las fases de la mitosis de *A. cepa*; a partir del 14,6% de células mitóticas halladas, se determinaron los índices de cada fase mitótica siendo profase y anafase la más y menos numerosa (44,6% y 9,2%), respectivamente. Dichos valores permitieron calcular a su vez, las duraciones promedio en horas de dichas fases.

Análisis estadístico e interpretación de datos

Los datos obtenidos fueron sometidos a las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (varianza, error estándar), previa transformación arco seno de los porcentajes originales.

SISTEMA EXPERIMENTAL	Grupos de trabajo		Ciclo celular de la población de células meristemáticas de las raicillas de las semillas de <i>A. cepa</i> L. a 21 +/- 2°C				
			Interfase			Mitosis	Onda celular
			G1	S	G2		
I	Testigo					*	* * *
	Grupos experimentales	A				*	* * *
		B				*	* * *
		C				*	* * *



- = raicilla de las semillas de *A. cepa* en agua fresca.
- = raicilla de las semillas de *A. cepa* en ácido acetilsalicílico “aspirina” 1%.
- = raicilla de las semillas de *A. cepa* en *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Crotón lechleri* L. “sangre de grado” 1%.
- = raicilla de las semillas de *A. cepa* en *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Crotón lechleri* L. “sangre de grado” 2%.
- * = Fijación de raicillas.

Figura 1: Diseño Experimental usado para la inducción del efecto citoreparador de *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Crotón lechleri* L. “sangre de grado” en tejidos de *Allium cepa* L. “cebolla” con daño cromosómico inducido por ácido acetilsalicílico “aspirina”.

El diseño experimental mostrado en la figura 1 es un diseño clásico donde se utilizó tres grupos experimentales y un testigo. Se tomó en consideración que las aberraciones cromosómicas pueden ser adecuadamente inducidas en el periodo terminal de la duplicación del ADN (Stent & Calendar, 1997); (Alberts *et al.*, 2005).

Resultados

Tabla 1: Índices y duraciones promedio de los periodos y fases del ciclo celular de la población celular mononucleada de *Allium cepa* L.

Indicadores	Ciclo celular		Fases de la mitosis			
	Interfase	Mitosis	Profase	Anafase	Anafase	Telofase
Índices promedio	85.4	14.6	44.6	15.4	9.2	30.8
Varianza	3.1	2.8	3.2	1.4	1.8	2.7
Error estándar	0.7	0.75	0.80	0.530	0.60	0.73
Duraciones promedio (HS)	11.2	2.0	0.89	0.32	0.18	0.61

Tabla 2: Porcentajes promedio de los tipos de aberraciones cromosómicas halladas en tejidos meristemáticos de *Allium cepa* L. “cebolla” tratadas con ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% y *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Crotón lechleri* L. “sangre de grado”

	Puentes Cromosómicos		Fragmentaciones cromosómicas		Reorganización cromosómica		Sin aberraciones	
	A	D	A	D	A	D	A	D
CELULAS ANAFASICAS	15,8	7,6	5,2	2,3	14,6	4,4	64,4	85,7
VARIANZA	4,1	1,1	0,9	0,5	1,6	0,6	1,3	0,7
ERROR STANDARD	0,81	0,05	0,23	0,11	0,53	0,7	0,49	0,7

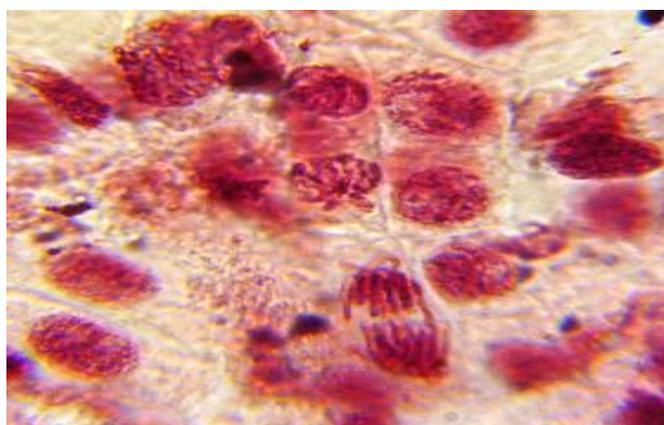


Fig.2. Tejido meristemático de *Allium cepa* L. “cebolla” mostrando puentes cromosómicos causadas por efecto del ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% (1000X).

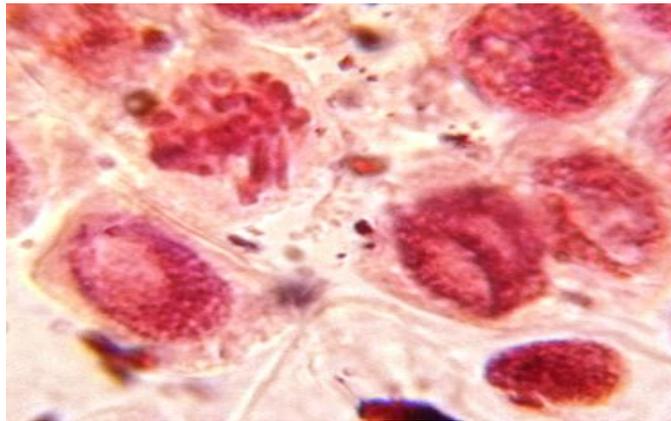


Fig.3. Tejido meristemático de *Allium cepa* L. “cebolla” exhibiendo fragmentaciones cromosómicas causadas por efecto del ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% (1000X).

Discusión

Se determinó en la tabla 1 los índices del ciclo celular y de las fases mitóticas de la población mononucleada de *A. cepa* calculados por Gonzales (1995, 2004 y 2007); dichos índices expresaron las duraciones de 11,2 hs. para interfase y de 2,0 hs. para mitosis, habiendo sido tomados como base en este trabajo para enfrentar a los bulbos de *A. cepa* con el ácido acetilsalicílico “aspirina” y a diferentes concentraciones tal como se aprecia en la Figura 1. Tomando en consideración que las aberraciones intracromosómicas pueden ser adecuadamente inducidas en el periodo terminal de la duplicación del ADN (Stent & Calendar, 1997; Alberts *et al.* 2005) se separó el período duplicativo “S” en dos grandes segmentos llamados temprano y terminal buscando inducir tanto el daño cromosómico por el ácido acetilsalicílico “aspirina” así como la acción regeneradora del extracto de *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Crotón lechleri* L. “sangre de grado”.

Referente a la tabla 2 el grupo de células de *Allium cepa* L. que recibió tratamiento con el ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% presentó anomalías cromosómicas tales como: puentes (15,8%), fragmentaciones (5,2%) y reordenamiento (14,6%) y sin aberraciones (64,4%). Estos resultados al ser confrontados con los valores obtenidos en la misma tabla, las anomalías cromosómicas halladas fueron: puentes (7,6%), fragmentaciones (2,3%), reordenamiento (4,4%) y sin aberraciones (85,7). Se demostró el alto poder regenerativo que tiene el extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado” que al estimular la reparación celular pudo corregir los errores cromosómicos y genéticos que pudo haberse producido en la doble hebra del ADN (De la Torre *et al.*, 1999).

En los grupos 2 y 3, según la tabla 2 se realizaron tratamientos continuos con el ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% así como el extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado” lográndose inducir una mayor presencia de daño cromosómicos como puentes (figura 2) y fragmentación cromosómica (figura 3), así mismo se demostró el alto poder de reducción de tales aberraciones; esto concuerda con De Robertis (2006) quien manifiesta que con tratamientos continuos se logra una mayor cantidad de alteraciones cromosómicas que con tratamientos intermitentes (Tortora &

Grawosky, 2006); discrepándose con dicho autor por los resultados del efecto citoreparador del extracto empleado

El tipo de aberración depende del periodo del ciclo en que se encontraba la célula en el momento de la exposición. Aquí se indujo tales aberraciones así como la reparación celular en el periodo terminal “S” (síntesis del ADN) (Stent & Calendar, 1997). Entonces sí se sometió las células meristemáticas de *Allium cepa* L. antes de la “G₂” (Sans *et al.*, 1999) se habría logrado la ruptura cromosómica que comprende las dos cromátidas.

La exposición al ácido acetilsalicílico “aspirina” 1% determinó por lo general lesiones localizadas, como la inducción de fragmentaciones cromosómicas tal como se aprecia en la figura 3. Aquí no existe reparación celular, las lesiones son estables y se visualizan en el microscopio con notable claridad (grupo 4, testigo). En el grupo 5 las raicillas de *Allium cepa* L. al ser sometidas al mismo tiempo al agente mutágeno como al extracto, las lesiones podrían haberse reparado eficientemente tal como se puede comprobar en la tabla 2 donde hubo disminución del porcentaje de las diferentes aberraciones cromosómicas halladas (Howard & Flanders, 1999).

En la figura 2 se observa que los puentes cromosómicos formados no se rompieron con lo cual se deduce la alta incidencia de desorden cromosómico con lo que dicha célula pudo haber ingresado a su próxima onda de división celular.

En todos los tratamientos se observó un alto grado de porcentaje de células meristemáticas sin aberraciones, esto podría deberse a las células mononucleadas ingresaron a la subetapa de G₀ (interfase) debido a la influencia de factores externos del ambiente (aspirina 0,5% y 1%, pH, Temperatura y otros) e internos (actividad fosforilante y desfosforilante de ciertas enzimas clave del ciclo celular); y la alta incidencia de células mononucleadas saludables podría deberse a la poderosa estimulación de la maquinaria de reparación celular que la hizo muy eficiente debido a los factores biológicos como: nutrientes, sales minerales, vitaminas A, B y C, la taspina (alcaloide) y los polifenoles (catequinas y proantocianidinas) presentes en el extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado”.

Los resultados de este trabajo nos ha permitido valorar el efecto dañino del ácido acetilsalicílico “aspirina” y el efecto citoreparador del extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado”; lo cual nos permite sugerir que deberá tenerse en cuenta lo encontrado en este estudio y se aplicará una estrategia terapéutica contra las diversas dolencias que afectan a los seres humanos reemplazando el uso de ciertos fármacos (con efectos colaterales) por productos naturales de comprobada eficacia. El objetivo de la aplicación de la medicina natural y alternativa será proteger, preservar y garantizar la perpetuidad de una raza humana más saludable que garantice a nuestros hijos una herencia sana y libre de enfermedades irreversibles.

Conclusiones

El efecto citoreparador de un extracto de *Solanum tuberosum* L. “papa” y *Croton lechleri* L. “sangre de grado” 1% con alteraciones cromosómicas inducida por el ácido acetilsalicílico “aspirina” produjo excelentes efectos en términos de porcentaje.

El grupo control de *Allium cepa* L. que fue tratado con aspirina 1% presentó alteraciones cromosómicas como: puentes, fragmentaciones, reordenamiento y sin aberraciones en porcentajes de: 15,8%, 5,2%, 14,6%, y 64,4% mientras que el grupo comparativo que recibió aspirina 1% más el extracto de *S. tuberosum* L. “papa” y *C. lechleri* L. “sangre de grado” presentó: puentes (7,6%), fragmentaciones (2,3%), reordenamiento (4,4%) y sin aberraciones (85,7%) respectivamente.

Referencias bibliográficas

- Alberts, B.; Lewis, M. Raff Robertis; J. D. Watson. 2005. Biología Celular. Edit. Omega S.A. Barcelona. España.
- Beltrán, R., Gonzáles, L. 1995. Inducción de puentes cromosómicos permanentes en meristemos de *Allium cepa* L. REBIOL. Vol 15 (1-2) pp 9-17 UNT.
- Croce, C; Klein. 2001. Translocaciones cromosómicas y cáncer humano. En Cairns Eds. El cáncer pp. 117-123. Prensa Científica. España.
- De la Torre. C. ; Gimenez Abian, MG; Giménez Martin, G. 1999. Stringency at Four Regions of the Plant Cell Cycle were Proteins Regulating its Progresión are Synthesized. Journal of cell Science. 94: 259-265.
- De Robertis, E. D. P. y E. M. F. De Robertis. 2006. Biología Celular y Molecular. Edit. Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
- Goldstein, A., L. Aronow y S.M. Kalman. 1999 Farmacología. 1ra. Reimpres. Edit. Limusa. México.
- Devoret, R. 1999. Test bacterianos de sustancias potencialmente cancerígenas. En Cairns Eds. El cáncert pp. 46-56. Prensa científica. España.
- Dubinín, N. 1998. Genética General. Tomo I y II. Edit. MIR. Moscú. Rusia.
- Gonzáles Ll. L. 1997. Efecto citotóxico del herbicida 2,4-D sobre meristemos de *Allium cepa* L. y *Vicia faba* L. REBIOL. Vol 17(1-2) 1-127 pp. 15-21. UNT
- Gonzáles Ll. L. 2004. Procesos de Transformación celular en *Allium cepa* L. UNT.
- Gonzáles Ll. L. 2007. Efecto reparador de *Aloe vera* “sábila” en tejidos mitóticos de *Allium cepa* con daño cromosómico por efecto del ibuprofeno. Chachapoyas- Perú.
- Howard, F. Flanders. 1999 Reparación Inducible del DNA. En Cairns Eds. El cáncer pp. 36-46 Prensa Científica. España.
- King, R.C. 1999. Genética. Espasa-Calpe S.A. Madrid.
- Korte, M.C y S. Jalal, S. 1982. 2, 4-D Induced exchanges in cultured human lymphocytes. The Journ heredity. 73: 224-226.
- Lezaeta, M. 2001. La medicina natural al alcance de todos. 10 ma. Edición. Editorial Keir. S.A. Buenos Aires. Argentina.
- Sans, J. Gimenez Martin, G.; De La Torre, C. 1995. Onset of Cell Proliferation in Dormant Roots of *Allium cepa* L. Bulbs Kinetics Analysis. Biol. Cell 38: 99-104.
- Stent, G. S. y R. Calendar. 1997. Genética molecular. Ed.Omega S.A. Barcelona.
- Tortora y Grawosky. 2006. Principios de Anatomía y Fisiología. Edit. Mosby. España.
- Weinberg, R. 1998. Base Molecular del Cáncer. El Cáncer. Prensa científica. España.