



EFFECTO DE LA CAFEINA EN LA PRODUCCION DE LETALES DOMINANTES EN RATONES TRATADOS CON TRIETHYLENE MELAMINE

Por: De La Hoz Marina (1)
Zuleta B. Margarita (2)

RESUMEN

El efecto potenciador de la cafeína (200 mg/kg de peso) en la producción de letales dominantes fue estudiada en ratones machos de 10 semanas de edad tratados con Triethylene Melamine (TEM). Tanto la cafeína como el TEM se disolvieron en agua y fueron suministrados oralmente durante cinco días. Se utilizaron cinco grupos de animales para los cuatro tratamientos y el control negativo: agua, cafeína, TEM, cafeína - TEM, TEM - cafeína. El quinto día del tratamiento cada macho se cruzó con tres hembras vírgenes de la misma edad de los machos y el décimo tercer día el cruce se realizó de disección de las hembras y se contó el número de cuerpos lúteos, embriones vivos y embriones muertos.

Los resultados muestran claramente que la cafeína sólo no es mutagénica. La sobrevivencia embrionaria es similar entre el control y el grupo tratado con cafeína; en cambio la sobrevivencia embrionaria disminuyó considerablemente en el grupo tratado con TEM y el promedio de embriones muertos por hembra fértil fue mayor, lo que confirma investigaciones anteriores las cuales han reportado que el TEM es un compuesto altamente productor de letales dominantes en ratones. La cafeína incrementó la producción de mutaciones letales dominantes en ratones tratados con TEM en relación con los tratados con TEM únicamente; esto fue evidente por el descenso en la sobrevivencia post-implantación, en el promedio de embriones muertos por hembra fértil y en el índice de letales dominantes.

Se observó además que la cafeína es potenciadora del daño genético, ya sea suministrada media hora antes o media hora después del tratamiento con TEM. Se sugiere que el efecto de la cafeína perdura en el núcleo del espermatozoide hasta que ocurra la fecundación.

(1) Bióloga, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia.

(2) Profesora del Departamento de Biología, Universidad de Antioquia.

INTRODUCCION

La mayor parte de la población mundial está expuesta a la cafeína (1, 3, 7 trimetilxantina), debido a que dicha sustancia está presente en diversas plantas usadas en la preparación de bebidas estimulantes como té, cocoa y café. Además es utilizada en combinación con algunas drogas para producir un efecto reanimante (Blacow, 1972).

La cafeína se distribuye en los tejidos del cuerpo en proporción a su contenido de agua (Axelrod, 1953). Ha sido identificada en ovario, testículo, plasma materno, fetos de 7 a 8 semanas (Goldstein, 1962) y en el fluido amniótico de humanos (Sommer, 1975). El hombre tiene la capacidad de transformarla casi totalmente y sólo se encuentra en la orina el 10% de la cafeína ingerida (Axelrod, 1953 y Cornish, 1957). Como no se presenta acumulación por el consumo diario, se considera que la cafeína no representa un riesgo serio como mutágeno (Kihlman, 1974).

La cafeína afecta el material genético de diferentes maneras. Según Ts'o (1964) y Sleigh, (1974), la cafeína se une preferencialmente a la cadena simple del DNA y aumenta su desnaturalización. También se ha observado que la cafeína interfiere con la duplicación semiconservativa del DNA durante la fase S en células de pulmón de embrión humano expuestas a Metil N nitroso guanidina (MNNG) (Lee, 1971).

Se han obtenido numerosos resultados en relación con los efectos mutagénicos de la cafeína pero algunos de estos son contradictorios. Por ejemplo, varios investigadores han mostrado actividad mutagénica de la cafeína en microorganismos tales como bacterias y hongos (Demerec, 1951; Koch, 1956; Fries, 1970).

Pero no existen datos homogéneos sobre su capacidad de inducir mutaciones puntuales en cultivo celular (Timson, 1977; Kihlman, 1977). En cambio si hay claras evidencias de que la cafeína induce aberraciones cromosómicas en células de organismos superiores (animales y plantas). Se han observado dos tipos de ruptura cromosómica. Uno identificado por Ostertag (1967) en células HeLa y cultivo de linfocitos humanos. Confirmado por Kihlman (1971) en células de Hamster Chino tratadas con cafeína a 37°C en la fase S. El tipo de daño observado en este caso consiste en una fragmentación cromatídica y producción de brechas. La inducción de este daño parece limitarse a la fase S y no depende del ATP. Se ha sugerido que este efecto es altamente específico y sólo ocurre en determinadas condiciones del cultivo celular. Nunca se ha encontrado in vivo (Adler, 1969; Matter 1974b). El segundo tipo de daño producido por la cafeína se ha evidenciado en plantas y células de mamíferos y larvas de *Drosophila*, tratadas con cafeína a temperaturas por debajo de 30°C durante la fase G₂ y la profase. Los daños cromosómicos producidos en estas fases son sensibles a la temperatura y dependientes del ATP. En su mayoría son rupturas cromatídicas y subcromatídicas (De Marco, 1980).

Los estudios en términos de pérdida cromosómica y no disyunción sólo se han hecho en *Drosophila melanogaster* observando los hijos de padres tratados. A este respecto, también se han obtenido resultados contradictorios (Kihlman, 1977; Timson, 1977).

Pero el efecto más importante de la cafeína parece ser su habilidad de potenciar la acción mutagénica y la ruptura cromosómica producida por mutágenos. Dulout y col. (1981) encontraron un aumento considerable de metafases anormales en células de ratón tratadas con cafeína y TEM. El incremento del daño genético refleja la acción de la droga sobre los sistemas de reparación del DNA. La interacción de la cafeína sobre los mecanismos de reparación se ha estudiado intensamente; sin embargo, aun no se tiene una idea clara de la manera como se ejerce ese efecto, pero si es evidente que la cafeína inhibe varios sistemas de reparación del DNA aunque su efecto depende del organismo probado. Por ejemplo, en bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, la reparación por escisión es bloqueada por la cafeína (Sideropoulos, 1968; Williams, 1971; Grigg, 1972; Seeberg 1976). En cambio, algunas evidencias indican que la cafeína no inhibe la reparación por escisión en células de mamíferos (Cleaver, 1969; Roberts, 1973; Lehmann, 1976) ni en *Drosophila melanogaster* (Boyd, 1974). Sin embargo, tanto en *Drosophila* como en cultivo de células de mamífero se ha observado que la reparación post-replicativa si es sensible a la cafeína (Lehmann, 1976; Trosko, 1973; Boyd, 1976; Fujiwara 1975b y 1975c; Sturelid, 1976).

López y Zuleta (1980) encontraron que el tratamiento con cafeína reduce la recuperación de traslocaciones producidas por el efecto de los rayos gamma en *Drosophila melanogaster*. Se cree que la reducción se debe a que la cafeína bloquea la reunión de las rupturas cromosómicas provocadas por la radiación, impidiendo así la formación de traslocaciones. En tal caso se espera que la cafeína aumente los riesgos de mortalidad celular y de letales dominantes cuando actúa combinada con clastógenos.

Aún existen muchos interrogantes respecto al efecto potenciador de la cafeína. En la mayoría de los casos éste solamente se ha determinado cuando se aplica la cafeína después del tratamiento con el mutágeno. No está claro por qué potencia unas aberraciones y reduce otras. Casi todas las investigaciones sobre la acción combinada de la cafeína con mutágenos se han llevado a efecto en plantas (Swietlinska, 1973; Kihlman, 1973, 1974), en cultivo de células (Hartley - Asp, 1978; Kihlman, 1973; Roberts y Sturrock 1973) o en *Drosophila* (López, 1980), pero muy pocos trabajos se han hecho en mamíferos in vivo (Adler, 1969; Frei 1975; Hansson, 1978; Matter, 1974b; Rohrborn, 1976).

El estudio del sinergismo de la cafeína con mutágenos en mamíferos in vivo es interesante, no solamente desde el punto de vista teórico, sino también por la importancia de la cafeína en la dieta humana (Kihlman, 1977). El objetivo de la presente investigación es evaluar in vivo el efecto potenciador de la cafeína en la producción de



mutaciones letales dominantes en ratones tratados con el agente alquilante altamente mutágeno, triethylene melamine (TEM) (Cattanach, 1968; Soares, 1977), buscar si este efecto depende del tiempo transcurrido entre el pretratamiento y el mutágeno (cafeína - TEM) o entre la aplicación del mutágeno y el postratamiento (TEM-cafeína), y analizar si la acción de la cafeína perdura en el espermatozoide hasta que éste fecunde el óvulo.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales.

Los experimentos se efectuaron con ratones de 9 a 10 semanas de edad de la cepa albino suiza tipo BAGG (Wisconsin, U.S.A.) con un peso aproximado de 30 grs por ratón. Fueron alimentados con nutrican y la temperatura promedio, bajo la cual se mantuvieron durante el experimento, fue de 23 a 25 grados centígrados.

Para evitar homocigosis recesiva en la F1 se cruzaron machos y hembras de diferentes líneas de la misma cepa. Esto se llevó a cabo en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Antioquia, de donde se trasladaron los ratones cuando tenían seis semanas de edad, para realizar el experimento en el Departamento de Biología dos semanas después.

2. Sustancias Utilizadas.

La cafeína se obtuvo en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Antioquia y el TEM fue proporcionado por el doctor Sidney Green de la U.S. Environmental Protection Agency. El tratamiento con cafeína se administró en cinco dosis de 200 mg/kg de peso; el TEM se aplicó en porciones de 0.02 mg/0.2 ml lo que equivale a dosis de 0.67 mg/kg de peso.

Tanto la cafeína como el TEM se suministraron oralmente. Con tal fin las sustancias se disolvieron en agua destilada y se administraron en volúmenes de 0.2 ml, aplicados mediante una jeringa con aguja roma, para evitar lastimar el esófago del animal.

3. Procedimiento.

Se utilizaron cinco grupos de animales para los cuatro tratamientos y el control negativo. Grupo A: control negativo con agua destilada; Grupo B: Cafeína; Grupo C: TEM; Grupo D: Cafeína y 30 minutos después TEM; Grupo E: TEM y 30 minutos después cafeína. Para cada grupo se utilizó un número de 50 machos aproximadamente.

En cada grupo los machos se trataron durante cinco días con la sustancia respectiva y cada uno se cruzó con tres hembras vírgenes de la misma edad de los machos. Pasados tres días los machos se separaron de las hembras.

Después del decimotercer día del cruce se mataron las hembras por estrangulamiento y se realizó la disección de las mismas, para contar en cada una de ellas los cuerpos lúteos, embriones vivos y embriones muertos (Ver Fotografía 1)

Los resultados fueron evaluados por los siguientes parámetros:

- Total número de embriones por hembra fértil.
- Embriones muertos por hembra fértil.
- Porcentaje de embriones muertos.
- Índice de letales dominantes (ILD), según la siguiente fórmula dada por Rohrborn (1970):

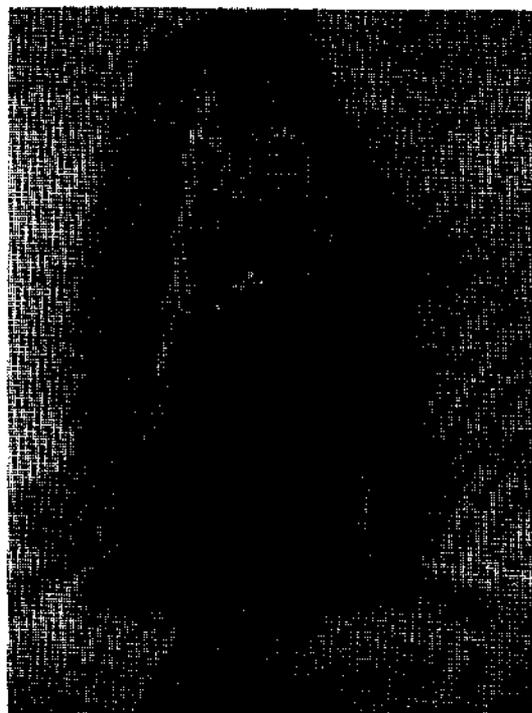
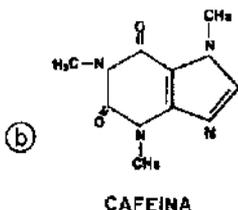
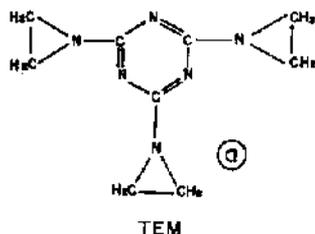


Fig. 1 Se observa un útero con 3 embriones vivos de 14 días de edad (los de mayor tamaño) y 4 embriones muertos (los de tamaño pequeño).

$$ILD = \frac{\text{No. E. Vivos grupo tratado/No. total Embriones implantados en grupo tratado}}{\text{No. E. Vivos grupo control/No. total Embriones implantados en grupo control.}}$$

— Sobrevivencia embrionaria completa

$$(SEC) = \frac{\text{No. embriones vivos}}{\text{No. cuerpos lúteos}}$$

— Sobrevivencia post-implantación

$$(SPI) = \frac{\text{No. Embriones vivos}}{\text{No. Total de implantaciones}}$$

Los experimentos se hicieron en subgrupos de 10 a 12 machos tratados. A los resultados de los subgrupos se les aplicó la prueba de Student con el fin de buscar homogeneidad y poderlos juntar en una sóla muestra. A los promedios de cuerpos lúteos, embriones vivos, embriones muertos, total de embriones y sobrevivencias, se les buscó la desviación estándar con el fin de averiguar si pertenecen a una misma población.

Se comparó el promedio de embriones muertos, los índices de mutaciones letales dominantes, y las sobrevivencias entre el control y los grupos tratados con cafeína, TEM y TEM - cafeína. Esto para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos tratados y el control.

RESULTADOS

Como todos los embriones examinados fueron concebidos entre el primero y el cuarto día después del tratamiento paterno, todos los embriones analizados derivan de espermatozoides maduros tratados (Oakker, 1957).

La tabla 1 muestra que la sobrevivencia embrionaria tanto completa como postimplantación fue muy similar entre el control y el grupo tratado con cafeína, en cambio fue mucho más baja en todas las series tratadas con TEM. Con base en el test de Student, se encontró que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.001$) en las cuatro comparaciones (control Vs TEM, cafeína Vs TEM, control Vs TEM - cafeína, control Vs cafeína - TEM). La sobrevivencia postimplantación se ilustra en el histograma de la Fig. 1.

Las comparaciones de sobrevivencia completa y post-implantación entre el control y los grupos tratados con cafeína o TEM y entre los diferentes grupos tratados con TEM, que

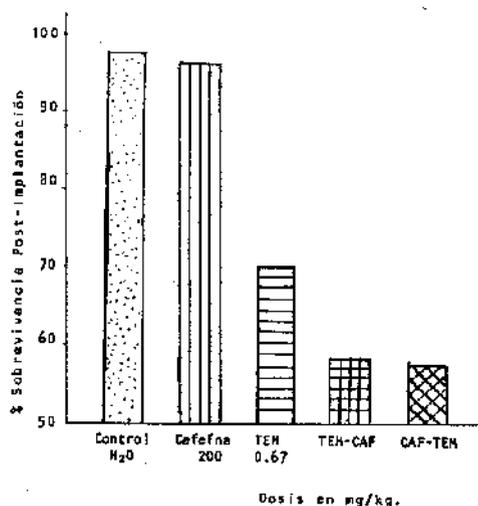


Fig. 1: Sobrevivencia Post-implantación en los Grupos CONTROL y tratados con: CAFEÍNA; TEM; CAFEÍNA-TEM; TEM-CAFEÍNA.

TABLA 1. SOBREVIVENCIA EMBRIONARIA COMPLETA Y POST-IMPLANTACION EN EL CONTROL Y LOS GRUPOS TRATADOS

TRATAMIENTO	No. Hem. F.	No. C. L.	No. Tot. E.	No. E. V.	No. E. M.	Sob. Comp. ± DE	Sob. Post. Imp. ± DE
CONTROL	133	1.424	1.375	1.357	18	0.95 ± 0.01	0.98 ± 0.01
CAFEÍNA	127	1.477	1.460	1.403	57	0.94 ± 0.07	0.96 ± 0.06
TEM	96	1.050	882	594	288	0.55 ± 0.16	0.70 ± 0.24
CAF - TEM	112	1.271	1.111	651	460	0.50 ± 0.16	0.57 ± 0.15
TEM - CAF	139	1.525	1.313	763	550	0.50 ± 0.15	0.58 ± 0.16

C.L.: Cuerpos Lúteos; E.V.: Embriones Vivos; E.M.: Embriones Muertos; Hem. F.: Hembras Fértiles; D.E.: Desviación Estándar de las Medias.

aparecen en la tabla 2 se hicieron utilizando la prueba χ^2 en tabla de contingencia de 2x2.

En la tabla 3 aparece el promedio de cuerpos lúteos, embriones vivos y embriones muertos por hembra fértil. Ninguno de los tratamientos con cafeína, TEM, TEM - cafeína o cafeína - TEM incidió en la fertilidad de los machos ya que el porcentaje de fertilidad fue prácticamente igual entre estos grupos y el control.

Respecto a los embriones muertos por hembra fértil no se observó diferencia significativa entre el control y el grupo tratado con cafeína, pero sí hubo una alta diferencia entre todos los grupos tratados con TEM respecto al control ($P = 0.001$) y al grupo tratado con cafeína ($P = 0.001$). El histograma de la fig. 2 representa el índice de mutaciones letales dominantes en los diferentes grupos experimentales.

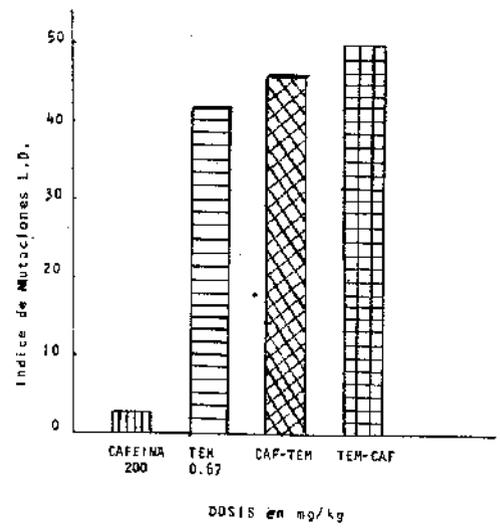


Fig.2: Índice de Mutaciones Letales Dominantes en los Grupos Tratados con CAFEINA; TEM; CAFEINA-TEM; TEM-CAFEINA

DISCUSION

La sobrevivencia embrionaria completa y post-implantación (mayor que 94o/o) lo mismo que el bajo índice de letales dominantes de la cafeína. (Ver tablas 1 y 2), indica claramente que esta sustancia a una concentración 200 mg/kg de peso no es mutagénica en ratones. Hallazgos similares fueron reportados por Epstein (1968), quien realizó el test de letales dominantes en ratones tratados con cafeína a una concentración de 168 mg/kg de peso. Teniendo en cuenta que el daño cromosómico es la causa principal de las mutaciones letales dominantes (Datta, 1970), puede decirse que estos resultados también están de acuerdo con otros autores quienes no han encontrado evidencia de que la ca-

feína sea capaz de inducir daño cromosómico. Por ejemplo, Cattanaach (1962) y Adler y Rohrborn (1969) observaron que la cafeína no produce efectos en los cromosomas meióticos. Matter y Grauwler (1974) reportaron efectos negativos en la producción de micronúcleos, Frei y Venitt (1975) y Hansson (1978) analizaron el efecto de la cafeína, sobre cromosomas de células de médula ósea de ratón y Rohrborn y Bucker (1976) investigaron las aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de Hamster tratadas con cafeína inyectadas intraperitonealmente.

TABLA 2. COMPARACIONES ESTADISTICAS ENTRE LA SOBREVIVENCIA EMBRIONARIA DEL CONTROL Y LOS GRUPOS TRATADOS Y ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS TRATADOS CON TEM

GRUPOS COMPARADOS		Sobrev. Completa		Sobrev. Post-imp.	
		χ^2	P	χ^2	P
		No. E. V. No. C. L.		No. E. V. No. Tot. E.	
CONTROL	CAF	0.0018	N.S.	0.480	N.S.
CONTROL	TEM	37.3000	0.001	389.000	0.001
CAFEINA	TEM	47.6000	0.001	53.100	0.001
CAF-TEM	TEM	1.0500	N.S.	6.010	0.001
TEM-CAF	TEM	2.1400	N.S.	7.280	0.001
TEM-CAF	CAF-TEM	0.0700	N.S.	0.023	N.S.

N.S.: No Significativo P = Probabilidad

En este trabajo fue evidente la mutagenicidad del TEM. La sobrevivencia embrionaria post-implantación de 70o/o y preimplantación de 55o/o en el grupo tratado con TEM disminuyó significativamente ($P < 0.001$) en relación con el control y con el grupo tratado con cafeína.

Estos resultados confirman investigaciones anteriores las cuales han reportado que el TEM es un compuesto altamente productor de letales dominantes en ratones (Batteman, 1960; Matter, 1974; Hitotsumachi, 1977; Green, 1977).

En la tabla 3 puede verse que el promedio de embriones muertos por hembra fértil en los animales tratados con TEM fue de 3.1 lo cual concuerda con los resultados encontrados por Green (1977) quien usó dosis de 0.75 mg/kg de peso y encontró un promedio de embriones muertos por hembra fértil de 3.75.

Con base en las diferencias altamente significativas entre los resultados del grupo tratado con solo TEM, frente a

los grupos tratados con la combinación TEM - cafeína se puede concluir, que la cafeína incrementa las mutaciones letales dominantes producidas por TEM. Respecto a lo anterior se observaron los siguientes datos: La sobrevivencia postimplantación en el tratamiento con TEM sólo fue de 0.70, la del tratamiento combinado TEM - Cafeína fue de 0.58 y la del tratamiento cafeína - TEM fue de 0.57. Las comparaciones respectivas se hicieron utilizando la prueba X^2 y en ambos casos se obtuvo desviación altamente significativa (ver tabla No. 2).

Esta conclusión también puede sustentarse por el aumento significativo de embriones muertos por hembra fértil en los grupos tratados con TEM-cafeína y cafeína - TEM. Como puede verse en la tabla 3, el promedio de embriones muertos por hembra fértil en el grupo tratado solo con TEM fue de 3.1; en cambio en el grupo con cafeína - TEM fue de 4.18 y con TEM - cafeína de 4.05. En la tabla No. 3 también se observa que los índices de letales dominantes son mucho más bajos en los tratamientos con TEM sólo, que en los tratamientos combinados de TEM - cafeína y

TABLA 3. PROMEDIO DE CUERPOS LUTEOS, TOTAL EMBRIONES, EMBRIONES VIVOS Y EMBRIONES MUERTOS POR HEMBRA FERTIL E INDICE DE LETALES DOMINANTES POST-IMPLANTACION

TRATAMIENTO	Hem. F.		C. L.	TOT. E.	E. V.	E. M.	o/o E. M.	I. L. D. Post-Imp.
	Tot. Hem.	o/o	Hem. F. ± D. E.					
CONTROL	133/							
	141	94	10.7±1.6	103.±1.4	10.2±1.5	0.13±0.29	1.3	
0.2 ml H ₂ O								
CAFEINA	127/							
	123	96	11.53±1.4	11.38±1.4	10.97±1.5	0.41±0.67	3.48	3
200 mg/kg								
TEM	96/							
	100	96	11.02±1.9	9.29±2.7	6.18±2.0	3.10±1.78	32.04	42
0.67 mg/kg								
CAF - TEM	112/							
	115	97	11.35±1.6	9.52±2.1	5.53±1.9	4.18±1.67	43.37	46
TEM - CF	139/							
	147	94	11.08±1.7	9.41±2.2	5.37±1.8	4.05±1.70	43.26	50

D.E.: Desviación Estándar de las Medias; Indice L. D. = Indice de Mutaciones Letales Dominantes:

$$I. L. D. = 1 \cdot \frac{\text{No. E. V. t/No. Tot. E. Tratados}}{\text{No. E. V. C./ No. Tot. E. control}}$$

$$o/o E. M. = \frac{\text{No. Tot. E. M.}}{\text{No. Tot. E.}} \times 100$$

cafeína - TEM. Algunos autores también han encontrado la habilidad de la cafeína para potenciar el daño genético in vivo, pero utilizando otros mutágenos distintos del TEM como inductores de la lesión primaria en el DNA y tratando las hembras con cafeína, en lugar de los machos. Por ejemplo, Mendelson y Sobels (1974) observaron que el tratamiento con cafeína en hembras de *Drosophila melanogaster* aumenta la frecuencia de letales dominantes inducidos por rayos X en genomas paternos. Roberts (1974) reportó que la cafeína incrementa las mutaciones letales producidas por N-metil N-nitrosourea (MNU), en Hamster chino. Sciraishi (1979) observó en cultivos de linfocitos humanos aumento de las brechas y rupturas producidas por mitomicina C en la primera fase S, si las células se dejan replicar dos veces en presencia de cafeína. Indirectamente, López y Zuleta (1980), también observaron in vivo que la cafeína aumenta el daño cromosómico que conduce a letales dominantes.

Se cree que la habilidad de la cafeína para potenciar el efecto mutagénico se deba a que impide el relleno de las brechas que debe realizarse en la reparación post-replicativa (Kihlman, 1974 y Robert y Sturrok, 1973). En esta forma se explica el aumento de las aberraciones cromosómicas tipo de lección que conduce a las mutaciones letales dominantes.

Se sugiere además que la cafeína podría bloquear el mecanismo de reparación inhibiendo la timidina kinasa (Sanmi 1980) y consecuentemente impidiendo la conversión de timidina en dTTP lo que interferiría con la síntesis del DNA (Timson 1977) la cual es necesaria para la reparación de las brechas (Kihlman, 1974; Robert y Sturrock, 1973). Alternativamente se ha propuesto que la cafeína puede adherirse físicamente a la cadena simple del DNA opuesta a la cadena que lleva la lesión primaria, (Robert, 1975 y Ehmann, 1976). Kihlman en 1977 reporta que las oxypurinas (entre ellas la cafeína) pueden producir aberraciones cromosómicas al competir con el componente cromatídico (Histona H1) por los sitios en la cadena sencilla del DNA.

Solberg (1978) demostró que la actividad nucleásica de la DNA polimerasa I fue inhibida por cafeína, mientras que la actividad polimerisadora no fue afectada; sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que la DNA polimerasa sea también inhibida por la cafeína ya que esta polimerasa requiere ATP para la estabilidad de sus subunidades (Wickner, 1976), y la cafeína, siendo un análogo del ATP, podría interferir.

Teniendo en cuenta que en este trabajo, el tratamiento con cafeína y TEM solo se hizo en los machos; que el efecto potenciador de la cafeína es producto de la interferencia con los sistemas de reparación, que las lesiones genéticas ocurridas en los espermatozoides solo pueden repararse en el óvulo fecundado donde existen las condiciones necesarias para esta función (Generoso 1980; Smith y otros 1981), puede concluirse que la influencia de la cafeína en la inhibición de la reparación perdura en el núcleo del espermatozoide hasta que ocurra la fecundación. No es por lo tanto válido aducir que la cafeína no representa un riesgo serio como potenciador de la mutagénesis por no acumularse en el organismo, pues este trabajo indica que el efecto de la cafeína en la reparación del daño genético no depende de la duración del metabolismo de la cafeína ya que su acción perdura en el núcleo mucho tiempo.

En este trabajo también puede concluirse que la cafeína produce el mismo efecto potenciador del daño genético tanto cuando se aplica media hora antes del tratamiento con el mutágeno, como cuando se aplica media hora después de dicho tratamiento. En la tabla 2 se observa que no hay diferencia significativa en la sobrevivencia embrionaria de los ratones tratados con cafeína antes o después del TEM. Esto está de acuerdo con la conclusión de que la cafeína perdura por algún tiempo en el núcleo.

Para hacer un estudio más completo sobre la duración del efecto potenciador del daño genético de la cafeína es necesario hacer otros trabajos en donde se deje transcurrir más tiempo entre el tratamiento con cafeína y la aplicación del mutágeno.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, I. D. 1969. Does caffeine induce dominant lethal mutations in mice? *Humangenetik*, 7, pp 137-148.
- Arlett, C., and S. Harcourt. 1972. The induction of 8 Azaguanine-resistant mutants of cultured Chinese hamster cells by ultraviolet light, *Mutation Res.*, 14, pp 431-437.
- Axelrod, J. and J. Reichenthal. 1953. The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material, *J. Pharm. Exptl. Therap*, 107, pp 519-523.
- Bateman 1960. The induction of Dominant Lethal mutations in rats and mice with triethylene melamine (TEM): *Genet. Res.* 1, pp 381-392.
- Blacow, N. W. (Ed) Martindale 1972. The extra Pharmacopoeia 26th edn, the Pharmaceutical Press, London, pp. 350-353-230-703-1110-249.
- Boyd, J. 1974. Repair replication and photore pair of DNA in larvae of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 77, pp 687-700.
- Brogger, A. 1974. Caffeine-induced enhancement of chromosome damage in human Lymphocytes Treated with methyl methanesulphonate, mitomycin C and X-rays, *Mutation Res.*, 23, pp. 353-360.
- Cattanach, B.M. 1962. Genetical effects of caffeine in mice, *Z. Vererbungsl.*, 93, pp. 215-219.
- Cattanach, B. M., C.E., Pollard and J.H., Isaacs. 1968. Ethyl methanesulfonate - induce chromosome breakage in the mouse, *Mutation Res.*, 6, pp. 297-307.
- Clark y Clark 1968. The genetic effects of caffeine on *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 6, pp. 227-234.
- Clarke, C.H. 1967. Caffeine and amino-acid effects upon Try^+ revertant yield in U.V. - irradiated her^+ and hermutants of *E. coli* B/r *Mol. Gen. Genet*, 99, pp. 97-108.
- Cleaver, J. E. 1968. Single strand interruptions in DNA and the effects of caffeine in Chinese Hamster cells, irradiated with ultraviolet light, *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 36, pp. 203-208.
- Cleaver, J. E. 1969. Repair replication of mammalian cell DNA: Effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair, *Radiat. Res*, 37, pp. 334-348.
- Cornish, H. H. and A. A., Christman 1957. A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man, *J. Biol. Chem.*, 228, pp. 315-323.
- Datta, P., Frigger, H. and Scheiermacher, E. (1970), The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse, in vivo. In *Chemical Mutagens in Mammals and Man*, F. Vogel and G. Rohrborn, Eds., Springer Verlag, Berlin - New York.
- De Marco y Cozzi. 1980. Chromosomal aberrations induced by caffeine in somatic ganglia of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res*, 69, pp. 55-69.
- Demerec, M., G. Bertani and J. Flint (1951). A survey of chemicals for mutagenic action in *E. coli*. *Am. Nat.*, 85, pp. 119-136.
- Dulout y col. 1981. Effects of caffeine on the frequency of chromosome aberrations induced in vivo by triethylmelamine (TEM) and Adriamycin (ADR) in mice *Mutation Res*, 82, pp. 295-304.
- Ehman, U. 1976. Caffeine, cyclic AMP and post-replication repair of mammalian cell DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 447, pp. 133-138.
- Epstein 1968. Chemical mutagens in the human environment; *Nature (London)*, 219, pp. 385-387.
- Frei y Venitt 1975. Chromosome damage in the bone marrow of mice treated with the methylating agent methyl methanesulfonate and N-methyl - N-nitrosourea in the presence or absence of caffeine, and its relationship with thymine induction, *Mutation Res*, 29, pp. 89-96.
- Fries, N. 1970. "The production of mutations by caffeine". *Hereditas* 36: 134-150 pp.
- Fujiwara, Y. 1975 a. Caffeine-sensitive post-replication repair of N-methyl - N-nitrosourea damage in mouse L cells, *Mutation Res*, 31: pp. 260-261.
- Fujiwara, Y. 1975 b. Post-replication repair of alkylation damage to DNA of mammalian cells in culture, *Cancer Res.*, 35, pp. 2780-2789.
- Fujiwara, Y. 1975 c. Post-replication repair of ultraviolet damage to DNA, DNA-chain elongation, and effects of metabolic inhibitors in mouse L cells, *Biophys. J.*, 15, pp. 403-415.

- Fujiwara, Y., and Tatsumi 1976. Replicative by pass repair of ultraviolet damage to DNA of mammalian cells: Caffeine sensitive and caffeine resistant mechanism, *Mutation Res.*, 37, pp. 91-110.
- Generoso, W. 1980. Repair in fertilized eggs of mice and its role in the production of chromosomal aberrations. En el libro: DNA repair and mutagenesis in Eukaryotes Plenum Publishing Corp. Cap. 28.
- Goldstein, A., and R., Warren. 1962. Passage of caffeine in to human gonadal and fetal tissue, *Biochem. Pharmacol* 11, pp. 166-168.
- Green, S. 1977. A new approach to Dominant Lethal Testis Toxicology and applied pharmacology, 39, pp. 549-552.
- Grigg, G. W. (1972) Effects of coumarin, pyronin and caffeine on excision repair and recombination repair in *Escherichia coli*. *J. Gen Microbiol.*, 70, pp. 221-230.
- Hansson. 1978. Caffeine enhancement of chromosomal aberrations induced by thiotepa in bone marrow cells of mice, *Hereditas*, 89, pp. 129-131.
- Hartley-Asp, B. and B.A. Kihlman, 1978. Caffeine derivatives and chromosomal aberration, IV. Synergism between mitomycin C and caffeine in Chinese Hamster cells, *Hereditas*, 69, pp. 179-191.
- Hitotsumachi, S. 1977. Chromosome aberration and Dominant lethality of mouse embryos after paternal treatment with triethylene melamine *Mut. Res.*, 42, pp. 117-124.
- Ishii, Y., and M.A., Bender. 1979. Caffeine-inhibition of Pre-replication repair of mitomycin C-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes, *Mutation Res.*, 51, pp. 419-425.
- Kato, H. 1974. Induction of sister chromatid exchanges chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.*, 85, pp. 239-247.
- Kihlman, B.A. 1971. Caffeine and 8 ethoxycaffeine produce different types of chromosome-breaking effects depending on the treatment temperature, *Mutation Res.*, 12, pp. 463-468.
- Kihlman, B.A. 1973. The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberration induced in plant and animal cells by chemical and physical agents, *Mutation Res.*, 26, pp. 105-122.
- Kihlman, B.A. 1974. Effects of caffeine on the genetic material *Mut. Res.*, 26: pp. 53-71.
- Kihlman, B.A. 1977. Caffeine and chromosomes, Elsevier, Amsterdam.
- Kihlman, B.A. and S., Sturelid 1978. Effects of caffeine on the frequencies of chromosomal aberration and sister chromatid exchanges induced by chemical mutagens in root tips of *Vicia faba*. *Hereditas*, 88, pp. 35-41.
- Koch, A.L. 1956. The metabolism of methyl purines by *Escherichia coli*, I. Tracer studies, *J. Biol. Chem.* 219; pp. 181-188.
- Lee, S. (1971). Chromosome aberrations induced in cultured human cells by caffeine, *Japan. J. Genetic*, 46. pp. 337-344.
- Lehmann, 1974. Effects of caffeine and theophylline on DNA synthesis in unirradiated and U.V. - irradiated mammalian cells, *Mutation Res.*, 26, pp.73-82.
- Lehmann, A.R. 1976. Post-replication repair of DNA in mammalian cells: A discussion of the mechanisms and biological importance in: J. Kiefer (Ed.), *Radiation and Cellular Control Processes*, Springer, Berlin, pp. 147-158.
- López, N. y Zuleta, M. 1980. Influencia de la cafeína en la producción de translocaciones inducidas por rayos gamma en espermatozoides de *Drosophila melanogaster*, *Actualidades Biológicas*, Vol. 8, No. 29 y 30 pp. 23.
- MacPhee 1973. Effects of R. factor and caffeine on ultraviolet mutability in *Salmonella typhimurium* *Mutation Res.*, 18, pp. 367-370.
- Matter 1974 a. Effects of dose on the induction of dominant lethal mutations with triethylene melamine in male mice, *Genetic*, 77, pp. 753-763.
- Matter y Grauwiler 1974 b. Micronuclei in bone cells, A simple in vivo model for the evaluation of Drug-induced chromosomal aberrations, *Mut. Res.*, 23, pp. 239-249.
- Mendelson y Sobels 1974. The inhibiting effect of caffeine on the maternal repair of radiation-induced chromosome breaks in *Drosophila*, *Mutation Res.*, 26, pp. 123-128.
- Myhr, B.C. and J.A., DiPaolo 1978. Mutagenesis by N-acetoxy-2-acetyl-amino-fluorene of Chinese hamster V 79 cells is unaffected by caffeine, *Chem. Biol. Interact.*, 21 pp. 1-18.
- Oakberg, E. F. 1957. Duration of Spermatogenesis in the mouse, *Nature (London)* 180, pp. 1137-1139.

- Ostertag. 1967. Der Frzeugung von Chromatidbuchen durch caffenin in Leukozytenkulturen des Menschen, *Humangenetik*, 3, pp. 282-294.
- Roberts, J.J. 1975. Repair of alkylated DNA in mammalian cells, In: A Hdlander, P.C. Hanawalt, and R.B. Setlow (Eds), *Molecular Mechanisms for repair of DNA*, Plenum Press, New York, London, pp. 611-615.
- Roberts, J.J. 1977. Inhibition by caffenine of post-replication repair in Chinese hamster cell treated with 7-bromomethylbenz (a) anthracene: Enhancement of toxicity.
- Roberts, J.J. y Sturrok 1973. Enhancement by caffenine of N-methyl - N-nitrosourea induced mutation and chromosome aberrations in Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 20, pp. 243-255.
- Roberts, J.J. y Ward 1973. Inhibition of post-replication repair of alkylated DNA by caffenine in Chinese hamster cells but not in HeLa cells, *Chem. Biol. Interact.*, 7, pp. 241-264.
- Rohrborn H. 1970. *The Dominant Lethals: Method and Cytogenetic Examination of Early Cleavage Stages en: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man* (Editado por F. Vogel y G. Rohrborn Springer - Verlag. New York).
- Rohrborn y Bucker 1976. Investigation on the frequency of chromosome aberrations in bone marrow cells of *Chinese hamster* after simultaneous application of caffenine and cyclophosphamide, *Hum. Genet.*, 33, pp. 113-119.
- Sanmi, I. y Solbert 1980. The effect of caffenine on cell growth and metabolism of thymidine in *Escherichia coli* *Mutation Res.*, 73, pp. 29-41.
- Searle, A. G. 1981. The effects of radiation dose-rate and quality on the induction of dominant lethals in mouse spermatids, *Mut. Res.*, 81, pp. 403-410.
- Seesberg, E. 1976. Excision repair of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in plasmolyzed cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 125, pp. 787-795.
- Shiraishi, Y. 1979. Effects of caffenine on chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C in Brd U-labeled human chromosomes, *Mutation Res.*, 62, pp. 139-149.
- Shiraishi, Y. 1980. Effects of caffenine-induced defective DNA Replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mutation Res.*, 72, pp. 251-256.
- Sideropoulos, A.S. 1968. Mechanism of caffenine enhancement of mutations induced by sublethal ultraviolet dosages, *J. Bacteriol.*, 96, pp. 198-204.
- Sleigh, M. 1974. Induction of local denaturation in DNA in vivo by Phleomycin and caffenine, *FEBS. Lett.*, 39, pp. 35-38.
- Smith, D.P., Dusenbery, R., Cooper, F. y Baumen, C. 1981. Examng the mechanism of mutagenesis in DNA repair-Deficient strains of *Drosophila melanogaster*, en el libro *Enviromental mutagens and carcinogens*, University of Tokyo Press, Tokyo Alan R. Liss, Inc, New York. pp. 147-155.
- Soares. 1977. Triethylene melamine induced dominant lethals in mice-comparisons of oral versus intraperitoneal injection, *Mut. Res.*, 43, pp. 247-254.
- Solber 1978. "Effect of caffenine on DNA polymerase from *Eschrichia coli*, Studies in vitro and in vivo" *Mut. Res.*, 51: 1-10pp.
- Sommer, K. R., R. M., Hill and M. G., Horning. 1975. Identification and quantification of drugs in human amniotic fluid, *Res., Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*; 12 pp. 583-595.
- Sturelid, S. 1976. Enhancement by caffenine of cell Killing and chromosome damage in chinese hamster cell treated with thiotepa, *Hereditas*, 84, pp. 157-162.
- Swietlinska. 1973. Induction of chromosome aberrations in root meristems and germinating seeds of *Vicia faba*, *Mutation Res.*, 17, pp. 199-205.
- Timson, J. 1977. Caffenine, *Mut. Res.*, 47, pp. 1-52.
- Trosko, 1971. Effects of caffenine on the induction of Mutations in Chinese hamster cells by Ultraviolet Ilgth, *Mutation Res.*, 12, pp. 337-340.
- Trosko, J.E., P., Frank, E.H.Y., Chu and J.E., Becker 1973. Caffenine inhibition of post-replication repair of N-acetoxy 2-acetylamino-fluorene-damaged DNA in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 33, pp. 2444-2449.
- T s 'o. P. O. P y P. Lu. 1964. Interaction of nucleic acids, I. Physical binding of thymine, adenine, steroids and aromatic hydrocarbons to nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 51, pp. 17-24.
- Vanden Berg, H.W. and J.J., Roberts, 1975. Post-replication repair of DNA in Chinese hamster cells treated with cis-platinum II diamine dichloride, Enhancement of toxicity and chromosome damage by caffenine, *Mutation Res.*, 33, pp. 279-284.

- 
- Van Zeeland, A.A. 1978. Post-treatment with caffeine and the induction of gene mutations by ultraviolet irradiation and ethyl methanesulphonate in V79 Chinese hamster cells in culture, *Mutation Res.*, 50, pp. 145-151.
- Waksvik, H.A., brogger and J. Stene, 1977. Psoralen/UVA treatment and chromosomes I aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and syner gris with caffeine, *Hum. Genet.*, 38, pp. 195-207.
- Wickner 1976. "Mechanism of DNA elongation catalized by *Escherichia coli* DNA polymerase III, DNA Z protein, and III". *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 73: 3511-3515.
- Williams, P.H. and C.H., Clarke. 1971. The effect of caffeine on mutation frequency decline, *Photochem. Photobiol.* 14, pp. 663-665.