

## Efectos de la cafeína y de la novobiocina durante el proceso de reparación del ADN dañado por el 5-aminouracilo y su incidencia en el tránsito celular durante el período G2 y profase

Antonio Del Campo y José Romero

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias  
La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

Recibido: 15-04-94 Aceptado: 9-05-94

### Resumen

La cafeína es un inhibidor de la reparación G2-profase cuyo mecanismo radica en la existencia de dos acciones cooperativas: 1. cancela el retraso mitótico producido por el 5-aminouracilo y 2. inhibe algunas de las rutas de reparación potenciando el daño del gen — Con el fin de analizar ambas vías de acción atribuidas a la cafeína se estudió su efecto clastogénico y la cancelación del retraso mitótico en ADN lesionado por el 5AU y tratado posteriormente con el antibiótico novobiocina, inhibidor de síntesis de proteínas. El estudio en poblaciones meristemáticas binucleadas de *Allium cepa* permitió la evaluación del retraso profásico inducido por el 5AU, así como su reversión por la cafeína; el daño genómico se estimó por el porcentaje de metafases, anafases y telofases aberrantes. Tratamientos posteriores solamente con novobiocina no afectaban prácticamente el desarrollo normal de la mitosis; sin embargo, cuando se incubaron los meristemas en una maceta de cafeína y novobiocina después del tratamiento con 5AU, se bloqueó el daño genómico. El ensayo de meta-, ana- y telofases aberrantes es un buen sistema para poner de manifiesto el fenómeno de daño genético y su modulación por la novobiocina.

**Palabras claves:** Novobiocina, inhibición de la reparación, cafeína, aberraciones cromosómicas

## Effects of caffeine and novobiocin during DNA repair damaged by 5-aminouracil and its incidence on cell transit through G2 and prophase

### Abstract

Caffeine is an inhibitor of G2-prophase whose mechanism depends of the presence of two cooperative actions: 1. cancellation of mitotic delay due to the presence of 5-aminouracil and 2. inhibition of some of the reparation pathways increasing the genome damage. With the intention of analyzing both actions attributed to caffeine, the clastogenetic effect and the cancellation of mitotic delay in DNA damage by action of 5AU and later treated with the antibiotic novobiocin an inhibitor of protein synthesis, were studied. The study of binucleated meristematic populations of *Allium cepa* permitted an evaluation of prophase delay induced by

5AU, as well as its reversion by caffeine. The damage to the genome was estimated by determining percentages of damaged meta-, ana- and telophases. Posterior treatments had little effect on the normal development of mitosis, only with novobiocin. Nevertheless, when the meristems were incubated in a mixture of caffeine and novobiocin after a treatment with 5AU, the potencial genome damage was avoided. The use of aberrations in the meta-, ana- and telophases is a good method to demonstrate the genetic damage phenomenon and its modulation by novobiocin.

**Key words:** Novobiocin, repair inhibition, caffeine, chromosome damage.

### Introducción

Los mecanismos biológicos que permiten la recuperación de las células después de exponerlas a agentes que producen lesiones en la molécula de ADN es complejo y objeto de numerosos estudios.

La reparación de los daños causados al ADN por los diversos agentes clastogénicos se efectúa durante el final del periodo replicativo (S) y durante G2 y profase (1-7). Por otra parte, la cafeína potencia el daño cromosómico producido por otras drogas, tanto en plantas como en animales (8-12).

Los estudios realizados por De Marco y Cozzi (13) y por De Marco y Polani (14) en *Drosophyla melanogaster* y por Pincheira y López-Sáez (6) en linfocitos irradiados llegaron a las mismas conclusiones; los efectos observados en estos materiales de estudio son similares a los descritos por Khilman (15) en células de plantas y animales tratadas con cafeína.

González-Fernández y López-Sáez (3) y González-Fernández y col. (4) demostraron en células vegetales que el daño cromosómico producido por el 5-Aminouracilo (5AU) se hace mayor con postratamientos con cafeína durante G2 y profase y que la reparación de las lesiones inducidas por el 5AU, que pueden traducirse en aberraciones cromosómicas, no se ve afectada por la cafeína antes del periodo G2.

Estos mismos autores postulan que la cafeína podría tener dos efectos sobre las

células que cursan el periodo premitótico (G2) con el ADN dañado: cancelación del retardo mitótico producido por el 5AU e inhibición de los mecanismos de reparación del ADN. La reversión parcial, por la novobiocina (NVB), del efecto antirreparador de la cafeína sugiere que este efecto no es una acción directa sobre el genoma sino que se debe a una probable competencia entre la trimetilxantina y algún nucleótido necesario en el mecanismo de reparación G2-profase.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos de la cafeína y de la novobiocina sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y sobre el retardo mitótico inducido por el 5AU en tejidos meristemáticos de *Allium cepa*.

### Materiales y Métodos

Como material de estudio se utilizó meristemo radicular de *Allium cepa* crecido en agua destilada, en oscuridad y a temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . El medio de cultivo fué removido cada 24 horas y aireado mediante burbujeo a razón de 15-20 ml de aire/min.

En cuanto a la metodología implementada, se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas anteriormente durante los diversos tratamientos con 5AU, 0.5 mM, cafeína 3 mM ó 5 mM, y con novobiocina 0.7 mM



cultivo donde permanecieron hasta el final del experimento, mientras que las restantes poblaciones fueron tratadas durante 3 horas con 5AU a partir de la hora 8 de recuperación, Figura 1, tratamientos A-D; posteriormente, algunos meristemos se pasaron a condiciones normales de crecimiento (A), mientras que el resto se sometió a post-tratamientos con NVB durante 2 horas (B), con cafeína (C) o bien con una solución combinada de cafeína + NVB (D); a una quinta población se la trató solamente con NVB, a partir de la hora 11 de recuperación (E).

Como criterios de evaluación se tomaron las bimetafasas, bianafases y bitelofases aberrantes.

Con el fin de estudiar la capacidad de recuperación de células dañadas durante G2 y profase, así como su tránsito por estas fases del ciclo se han utilizado el 5AU 0.5 mM que es un agente inductor de daño en la molécula de ADN, cafeína 3 mM y NVB 0.7 mM.

### Técnicas citológicas

Para el análisis citológico, las raíces fueron fijadas en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1) y coloreadas posteriormente con orceína aceto-clorhídrica según la técnica de Tjio y Levan (16). Se utiliza el término de "meta-, ana- y telofases anormales" para señalar a aquellas células que presentan aberraciones cromosómicas (puentes, roturas, etc.). Se ha determinado el porcentaje de estas figuras anormales en relación al total de meta-, ana- y telofases de 8 meristemos.

### Estudio de las preparaciones

Las observaciones microscópicas se hicieron con un microscopio Leitz y con objetivo de inmersión.

## Resultados y Discusión

González-Fernández y col. (4) proponen dos acciones cooperativas durante el mecanismo de reparación del ADN: retardo mitótico asociado al daño genómico y remoción de las lesiones con la consiguiente recuperación de la estructura normal del ADN. Bajo condiciones fisiológicas, ambos mecanismos están coordinados aunque controlados por diferentes factores. Por otra parte, la acción de la cafeína podría radicar en la existencia de dos acciones también cooperativas: cancelación del retardo mitótico e inhibición de algunas de las rutas de reparación; sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten la recuperación de las células después de exponerlas a agentes clastogénicos, son complejos y objeto de numerosos estudios. En células proliferantes eucarióticas este proceso se realiza durante el periodo postreplicativo (G2) y comienzo de la mitosis.

Para analizar las dos vías de acción postuladas para la cafeína, se analizó el efecto potenciador de daño cromosómico y la cancelación del retraso mitótico en genoma lesionado por el 5AU.

### Efecto de la cafeína y de la NVB sobre la reparación del ADN durante el período G2 y profase

Mucha de la información sobre el particular viene de los experimentos genéticos realizados en bacterias expuestas a radiaciones UV (11) y de los estudios bioquímicos sobre replicación y reparación del ADN (16-18). Los estudios en eucariontes, por su alto grado de organización, resultan fragmentarios ya que la presencia de una cromatina con una gran versatilidad estructural y funcional a través del Ciclo de División Celular, es el condicionante que determina que junto a una lesión genética se exprese una intrincada red de interacciones moleculares.

Tabla 1  
Efecto de la novobiocina sobre la capacidad reparadora de aberraciones en metafase (M), anafase (A) y telofase (T)

Tratamiento	Postratamiento	Total de M-A-T contadas	% Aberraciones	Fp
A. Control		536	0,2	-
B. -	NVB	494	1,0 ± 0,2	-
C. 5AU	-	445	18,6 ± 2,3	-
D. 5AU	Cafeína (mM)	350	53,8 ± 4,7	2,9
E. 5AU	NVB + caf.	468	30,1 ± 2,9	1,6
F. 5AU	NVB	375	14,7 ± 2,1	0,8

Fp = factor de potenciación

En la Tabla 1 se ponen de manifiesto los efectos aberrantes de los distintos tratamientos, así como la capacidad reparadora de la NVB.

El estudio de estos resultados indica la no existencia de aberraciones cromosómicas (0.2%) en las células meristemáticas que crecen bajo condiciones de equilibrio dinámico (A) y un pequeño porcentaje de aquellas (1.92%) en los meristemas tratados con NVB durante 2 horas (B); sin embargo, cuando las células fueron tratadas con 5AU se provocó un daño correspondiente al 18.6% (C) evaluado como roturas cromosómicas, puentes cromosómicos y otros daños. Estos niveles de daño se incrementaron en células postratadas con cafeína 53.8% (D) para disminuir con otros tratamientos, 30.1% (E) y 14.7% (F).

La capacidad de la cafeína para incrementar severamente la frecuencia de aberraciones inducidas por el 5AU, Figura 2, puede expresarse mediante un "factor de potenciación" (Fp) definido como la relación entre el tratamiento combinado (5AU y ca-

feína) E (i+p) y la suma de los efectos del inductor (Ei = 5AU) y el agente potenciador (Ep = cafeína), dados separadamente.

$$Fp = E(i+p)/Ei+Ep \quad [1]$$

que para el caso D (Tabla 1), es:

$$Fp = E(i+p)/Ei = 0,538/0,186 = 2,9$$

que expresa la magnitud con que la cafeína potencia las aberraciones cromosómicas inducidas por el 5AU, triplicando la frecuencia de meta-, ana- y telofases anormales (Tabla 1, D) y reduciendo el retardo mitótico inducido por este, Figura 1, tratamiento C.

Los resultados expresados en la Tabla 1 indican que la capacidad potenciadora de daño por parte de la cafeína disminuyó al incubarse a los meristemas en una solución combinada de cafeína y NVB, lo que sugiere que la acción de la trimetilxantina requiere de síntesis de proteínas para alcanzar sus efectos.

En resumen, en el presente trabajo se confirma que la cafeína es capaz de inducir

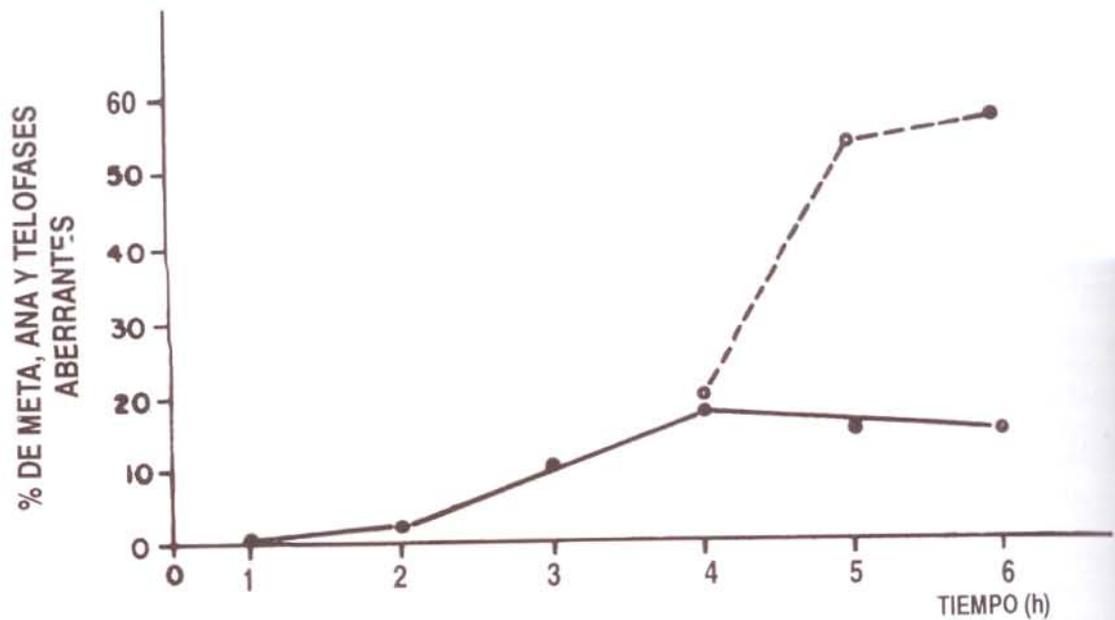


Figura 2. Porcentaje de mitosis anormales después de 3 horas de tratamiento con 5AU, 0.5 mM (—●—) seguido de 2 horas de tratamiento con cafeína 3 mM (---○---).

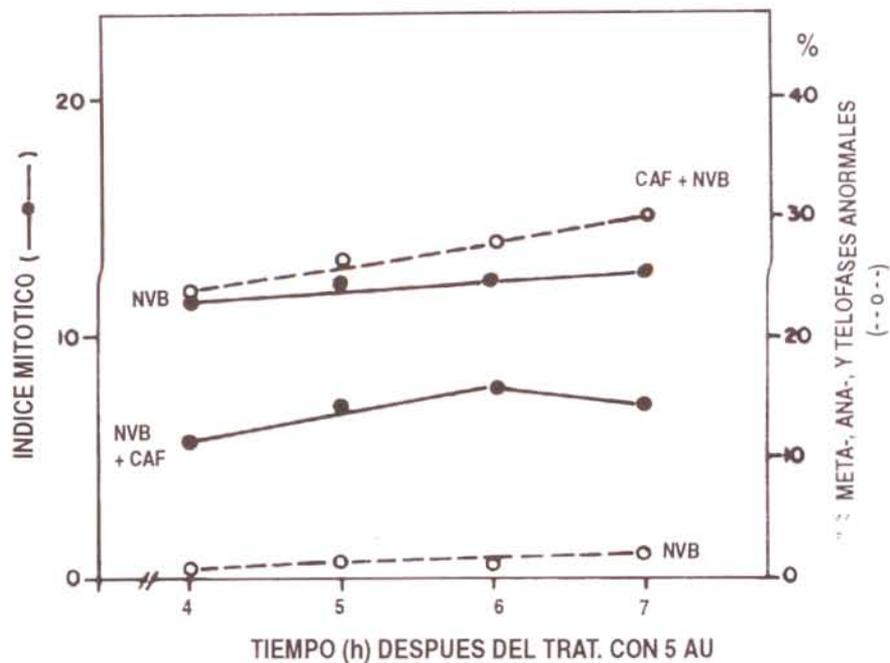


Figura 3. Acción combinada de la cafeína + NVB y de la NVB sola: índice mitótico (—●—) y anomalías cromosómicas (---○---) después de un tratamiento de 3 horas de duración con 5AU, 0.5 mM.

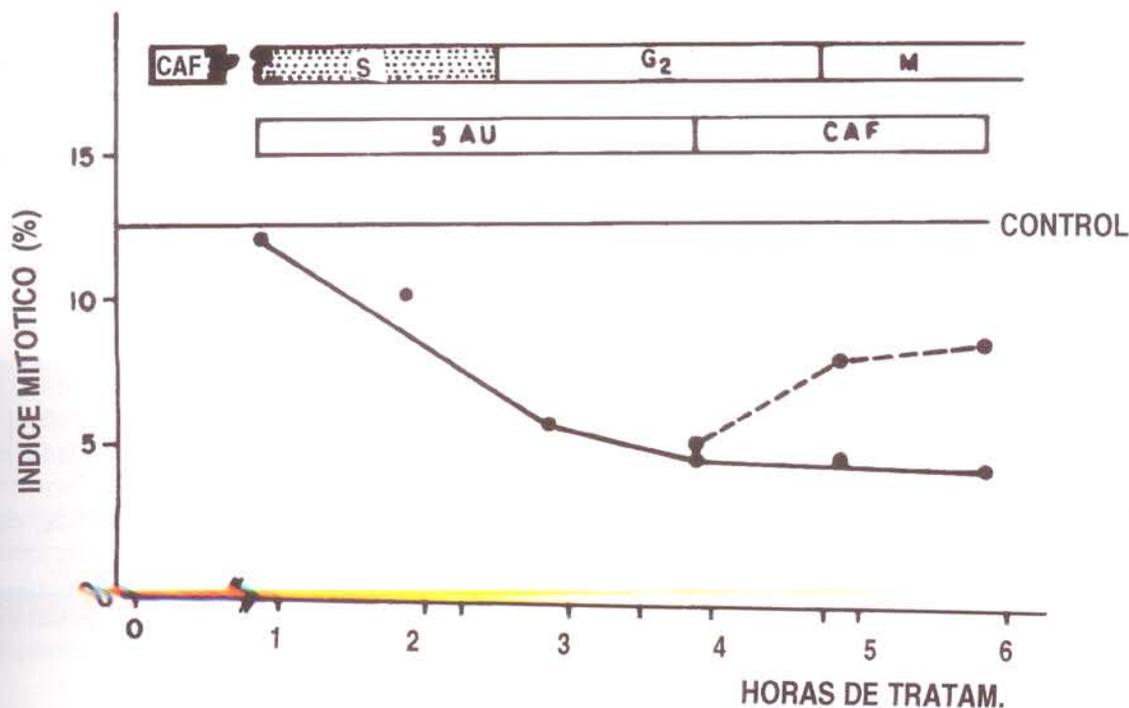


Figura 4. Índice mitótico después de 3 horas de tratamiento con 5AU (●-) y postratamiento con cafeína 3 mM (○-).

daño genómico en células que cursan G2 y profase potenciando el daño causado por 5AU. Tratamientos con NVB solamente, no causan ni daño ni retardo mitótico (Tabla 1,B) y Figura 3.

Además, y como una consecuencia del bloqueo de algunas de las rutas de reparación del ADN que aumenta el daño causado por el 5AU, está la cancelación parcial del retraso mitótico y la tendencia a normalizar el índice mitótico (IM), Figura 4.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Utsumi, H. y col. (20), Kapiszewska, M. y Lange, C. (21) y Nordenberg, J. y col. (22).

#### Efecto de la cafeína y NVB sobre el tránsito celular por G2 y profase

En general, cuanto mayor sea el potencial de una droga para causar daño cromosómico más fuerte es su acción negativa sobre el ciclo de división celular y cuando este daño se traduce en aberraciones cromosómicas mayor es la duración del G2 (17).

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo del retraso mitótico inducido por el tratamiento con 5AU, así como la cancelación parcial de este mediante un postratamiento con cafeína y los efectos de la NVB sobre el mismo, se estudió la cinética de llegada de los núcleos de las células binucleadas 2n-2n a profase.

La Figura 1 muestra que en los meristemos control, el tránsito por G2 se realiza

en 2.2 h, mientras que la incubación de los bulbos con 5AU durante 3 h provoca un alargamiento de ese período postreplicativo, de 6.12 h. Este cuadro de retraso fue parcialmente cancelado cuando después del tratamiento con el agente inductor se dió un postratamiento de 2 h con cafeína. Bajo estas condiciones experimentales se observa que la duración del período G2 es de 5.1 h. Estos resultados coinciden con los de otros autores (23,24) quienes comprobaron que la exposición de las células a la cafeína y a análogos de la cafeína reducen el retardo de entrada a división inducido por radiación y otros agentes; sin embargo, cuando las células fueron incubadas en una mezcla de cafeína + NVB, después del tratamiento con el 5AU se bloqueó la potenciación del daño con una reducción del retardo mitótico, Figura 1, tratamiento D y de las aberraciones cromosómicas, Tabla 1,E.

Se ha demostrado que el 5AU tiene dos efectos relacionados: 1. inhibe la replicación tardía responsable de la sincronización premetafásica (25) y 2. induce retraso en el tránsito postreplicativo por inducción de lesiones en el genoma, con un descenso considerable del índice mitótico hasta el 3.4%, Figura 4; estos valores se duplican (7.8%) cuando se dan postratamientos con cafeína 3 mM, lo que puede interpretarse como que las células tratadas con el 5AU presentan un daño que las hace sensibles a la cafeína y que una fracción importante de las lesiones producidas por el 5AU se reparan cuando las células se encuentran en la última fase del período G2. Esta reparación es menos sensible a la presencia de la cafeína por lo que al ser inhibida por esta droga, las células llegan a mitosis con los tipos de lesiones antes mencionados y no reparados.

López-Sáez y col. (26) han propuesto que la acción de la cafeína puede deberse a una disminución en los niveles de ATP.

Se sugiere con estos resultados, que la cafeína impide que las células dañadas por el 5AU se reparan al acortarse el tiempo

necesario para su recuperación antes de entrar a mitosis por lo que las células tratadas con la droga son inducidas a entrar a división con el genoma dañado. La NVB, por su parte, al inhibir síntesis de proteínas estaría bloqueando la potenciación del daño producido por el 5AU.

Este efecto "rebote" de la NVB encaja entre los descritos para este antibiótico.

### Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Consejo de de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), de la Universidad del Zulia. Este agradecimiento se hace extensivo a los profesores Joseph J. Ewald y Darío Espina M. y a los achilleros Richard Chávez y Marco Nava por la colaboración prestada.

### Referencias Bibliográficas

1. KHILMAN B.A., ANDERSON H.C.: G2 repair and the formation of chromosomal aberrations. II. The effect of hidroxurea and caffeine on streptonigrin and 8-ethoxycaffeine-induced chromosome damage in *Vicia faba*. *Environ Exp Eot* 20:271-286, 1980.
2. MURNANE J.P., BIFIELD J.E., WARD J.F., CALABRO-JONES P.: Effect of methylated xantines on mammalian cells treated with bifunctional alkylating agents. *Nature* 285:326-329, 1980.
3. GONZALEZ-FERNANDEZ A., LOPEZ-SAEZ J.: Effect of caffeine on G2 repair and its reversion by adenosine. *Mutat Res* 106:255-264, 1982.
4. GONZALEZ-FERNANDEZ A., HERNANDEZ P., LOPEZ-SAEZ J.F.: Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: mitotic delay and chromosome damage. *Mutat Res* 149:275-281, 1985.

5. SCHIANO M.A., SERIN B.U., PERRAS J., PAMOS R., WOLLOCH E.H., AVERETTE H.E.: In vitro enhancement of cis-platinum antitumor activity by caffeine and pentoxifiline in a human ovarian cell line. *Gynecol Oncol* 43:37-45, 1991.
6. PINCHEIRA J., LOPEZ-SAEZ J.F.: Effects of caffeine and cycloheximide during G2-prophase in control and X-ray-irradiated human lymphocytes. *Mutat Res* 251:71-77, 1991.
7. GRENET J., DE LA TORRE C., SANS J.: Effect of caffeine and isobutylmethyl-xanthine on production of binucleate cells and on post-replicative repair. *Cytobios* 69: 35-39, 1992.
8. TIMSON J.: Caffeine. *Mutat Res* 47:1-52, 1977.
9. SWIETLINSKA Z., ZUK J.: Effect of caffeine on chromosome damage induced by chemical mutagens and ionizing radiation in *Vicia faba* and *Secale cereale*. *Mutat Res* 26:89-97, 1974.
10. NILSON K., LEHMANN A.R.: The effect of methylated oxypurines on the size of newly-synthesized DNA and on the production of chromosome aberrations after UV irradiation in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 30:255-266, 1975.
11. SELBY C.P., SANCAR A.: Mechanisms of caffeine inhibition of DNA repair in *E. coli*. *Prog Clin Biol Res* 340A: 179-193, 1990.
12. SPIVAK I.M., KOSTETSKY T.E., SHPIELVAYA S.P., KORDIUM V.A., ZHETYAMKOV V.D.: Caffeine-induced reduction of the survival of gamma-irradiated HeLa cells. *Mutat Res* 246:103-107, 1991.
13. DE MARCO A., COZZI R.: Chromosomal aberrations induced by caffeine in somatic ganglia of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 69:55-69, 1980.
14. DE MARCO A., POLANI, S.: Cell-stage-specific enhancement by caffeine of the frequency chromatid aberrations induced by X-rays in neural ganglia of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 84:91-99, 1981.
15. KHILMAN B.A.: *Caffeine and chromosome*. Elsevier, Amsterdam, 1977.
16. TJIO J., LEVAN A.: The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anu Est Exp Aula Dei* 2:21-64, 1950.
17. RAO P.N.: The molecular basis of drug-induced G2 arrested in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 29:47-57, 1980.
18. TOBEY R.A.: Different drugs arrested cells at a number of distinct stages in G2. *Nature* 254:245-247, 1975.
19. WALTERS R.A., GURLEY R.L., TOBEY R.A.: Effects of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell cycle traverse of mammalian cells. *Biophys J* 14:99-118, 1974.
20. UTSUMI H., SHIBUYA M.L., KOSAKA T., BUDDENBAUM W.E., ELKIND M.: Abrogation by novobiocin of cytotoxicity due to the topoisomerase II inhibitor amsacrine in Chinese hamster cells. *Cancer Res* 50:2577-2581, 1990.
21. KAPISZEWSKA M., LANGE C.S.: Novobiocin treatment reverses radiation-induced alteration in higher order DNA structure in L5178Y nucleoids. *Radiat Res* 127:285-291, 1991.
22. NORDENBERG J., ALBUKREK D., HADAR T., FUX A., WASSERMAN L., NOVOGRODSKY A., SIDI Y.: Novobiocin-induced antiproliferative and differentiating effects in melanoma B16. *Br J Cancer* 65:183-188, 1992.
23. LÜCKE-HULE C.: Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery. *Radiat Res* 89:298-308, 1982.
24. KIMLER B.F., LEEPER D.B., SNYDER M.H., ROWLWY R., SCHNEIDERMAN M.H.: Modification of radiation induced division delay by caffeine analogues and

- dibutyryl cyclic AMP. *Int J Radiat Biol* 41: 47-58, 1982.
25. DEL CAMPO A.: Acción del 5-aminouracilo sobre la sincronización premetafásica y su efecto durante la reparación del ADN en células binucleadas  $4n-4n$  de meristemas radicales de *Allium cepa*. *Ciencia* 1(2):73-82, 1993.
26. LOPEZ-SAEZ J.F., MINGO R., GONZALEZ-FERNANDEZ A.: ATP level and caffeine efficiency on cytokinesis inhibition in plants. *Eur J Cell Biol* 27:185-190, 1982.