

Disfunción de los puntos de chequeo (*checkpoints*) G2 causada por 5-aminouracilo (5AU) y bloqueo de la entrada en mitosis hasta la reparación del ADN

Antonio del Campo* y Jorge Guíñez O.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,
Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 05-04-00 Aceptado: 27-10-00

Resumen

Los meristemas radiculares de *Allium cepa*, L., recibieron un doble tratamiento con cafeína 5 mM con el fin de obtener una población 8n distribuida en células con 2 núcleos (4n-4n), 3 núcleos (2n-4n-2n) ó 4 núcleos (2n-2n-2n-2n). Estas poblaciones que inician la replicación de su ADN de una manera sincrónica, recibieron un tratamiento con 5-aminouracilo (5AU), 0,5 mM, análogo de la timina, incorporándose a la cadena de ADN y estudiándose los efectos de este compuesto. Otra población recibió un tratamiento con 5AU seguido de otro con cafeína 3 mM, inhibidor de la reparación en G2-profase, potenciando el daño causado por el 5AU al genoma. El análisis de los resultados obtenidos permitió observar retraso profásico inducido por el 5AU, así como la presencia de mitosis heterofásicas, mientras que se observó una reversión de este retraso mitótico cuando la población meristemática recibió, además, un tratamiento con cafeína, estimándose el % de metafases, anafases y telofases aberrantes. Se observó así, la influencia de la replicación tardía sobre el desarrollo de la mitosis y la acción de la cafeína que cancela el retraso mitótico producido por el 5AU inhibiendo algunos de las rutas de reparación del ADN.

Palabras clave: *Allium cepa*, L.; 5-aminouracilo; cafeína; reparación del ADN.

Unworking G2 caused by 5-aminouracil and blocking of the entrance to mitosis until DNA repair

Abstract

Radicular meristems of *Allium cepa*, L., were twice treated with a solution of 5 mM caffeine in order to produce 8n populations of cells with 2 nuclei (4n-4n), 3 nuclei (2n-4n-2n) or 4 nuclei (2n-2n-2n-2n). These populations, that initiate replication of their DNA in a synchronic manner, received treatment with 5-aminouracil (5AU), 0.5 mM, analog of timine, including it in the DNA chain to determine its effect. Another population of cells were treated with 5AU followed by a treatment with 3 mM caffeine, an repair inhibitor in the G2-prophase, increasing the damage caused to the genome by the 5AU. The analysis of the results showed a prophasic delay induced by 5AU as well as the presence of heterophasic mitosis, whereas a reversion of this mitotic delay was observed when the meristematic populations received moreover, a treatment with caffeine by the % of metaphase, anaphase and telophase aberrants. The influence of delayed replication

* Autor para la correspondencia.

on mitosis development and the action of caffeine cancelling the delay of mitosis produced by 5AU (which inhibit some of the reparation routes of DNA), were also observed.

Key words: *Allium cepa*, L.; 5-aminouracil; caffeine; DNA repair.

Introducción

Las células eucarióticas poseen una alta capacidad de reparación de su genoma que opera tanto en situación de control como después de dañar su ADN.

En estas poblaciones 8n (bi-, tri- o tetranucleadas) existen reguladores, tanto positivos como negativos, que controlan la progresión de estas células a través del ciclo proliferativo. Los reguladores negativos o *checkpoints* retardan la entrada a mitosis en nuestro caso, hasta que se completen procesos de reparación o replicación del genoma (1-4). Muchos de estos efectos reguladores se obtienen al activar o bloquear, de forma reversible, las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (5).

La existencia de estos controles de seguridad durante el ciclo proliferativo supone que las células pueden reconocer daño en su ADN e impedir, de acuerdo con ello, la iniciación de replicación o de mitosis. Para conseguir esto, las señales intracelulares generadas inhiben las correspondientes ciclinas y CDKs.

El control G2 es muy estricto; después del uso de un agente genotóxico, 5AU o cafeína en nuestro caso, se detecta preferentemente una inhibición en la entrada a mitosis de las células en las que el ADN no está completamente replicado o reparado (5); por ello, los núcleos más rápidos en replicar alargan su permanencia en G2 hasta que se complete la replicación o la reparación postreplicativa llegue a su término en los núcleos más lentos. Sin embargo, el empleo de análogos de las purinas inutilizan este mecanismo de seguridad tanto en células animales (6, 7) como en vegetales (8, 9). La abolición de este control de seguridad lleva a que las células entren indebidamente a mitosis con su ADN dañado.

La disección de las rutas de chequeo existentes en G2 llevará sin duda, a su valoración clínica posterior; al evitar el funcionamiento de los mecanismos de reparación por los que la célula controla la integridad de su propio ADN, las células resultantes de una mitosis con ADN previamente dañado se convierten en inviables.

En este trabajo se determina, 1º la relación entre daño, duración de la parada G2 y capacidad de reparación, medida ésta por la diferencia entre el daño producido y el remanente detectado en mitosis y 2º el comportamiento de la cafeína como inhibidor preferencial de la reparación del ADN que tiene lugar durante el bloqueo G2 con 2 acciones preferenciales: impedir que la célula detecte el daño y reducción del ritmo de la biosíntesis reparadora.

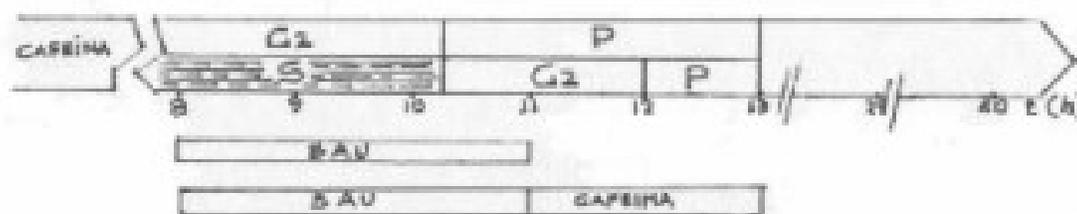
Materiales y Métodos

Materiales

Como material de estudio se utilizaron bulbos de *Allium cepa*, L. no germinados, colocándolos de forma que sus bases permanecieron sumergidos en recipientes de 90 mL de capacidad y llenos de agua desionizada a temperatura constante de 25°C ± 0,5 y en oscuridad. Los bulbos permanecieron oxigenados por burbujeo de aire a razón de 15 a 20 mL/min. Se utilizaron los tejidos meristemáticos cuando las raíces alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm; en estas condiciones de desarrollo se llega al equilibrio dinámico de forma que todos los parámetros del ciclo permanecen constantes (10).

Tratamientos

Una vez que las raíces alcanzaron 2 ó 3 cm de longitud se sumergieron, aún unidas al bulbo, en las diferentes soluciones de tratamiento sin alterar las otras condiciones



Duración G2 (h)	R.M. ⁽¹⁾	A.C. ⁽²⁾	D. Reparado ⁽³⁾		
			Hora 25	Hora 40	D. Res. ⁽⁴⁾
1,6	-	-	-	-	-
3,9	2,3	11,6	3,6	3,6	7,0
2,1	0,5	17,7	4,9	4,6	12,9

(1) retardo mitótico; (2) aberraciones cromosómicas, (3) daño reparado, (4) daño residual.

Figura 1. Efecto del tratamiento con 5AU, 5×10^{-4} M, a una población meristemática de *Allium cepa*, L., 8n y de un doble tratamiento con 5AU + cafeína, $5 \cdot 10^{-3}$ M, a otra población, también 8n. Se detallan el retardo mitótico, el daño reparado y el daño residual.

ambientales de oscuridad, temperatura y aireación.

Tratamiento con cafeína: Las raíces fueron sometidas a un doble tratamiento con cafeína 5 mM mediado un ciclo de 15 h, durante 2 h el primero y 1 h el segundo con el fin de inhibir 2 citocinesis consecutivas ya que la cafeína impide la fusión de las pequeñas vesículas de Golgi (11) obteniéndose una población 8n: binucleada 4n-4n (55%), trinucleada 2n-4n-2n (30%) y tetranucleada 2n-2n-2n-2n (15%).

Otra solución de cafeína 3 mM, se utilizó para dar un tratamiento de 2 h después del tratamiento con el 5AU con la finalidad de estudiar su efecto sobre el daño producido por este análogo de la timina al genoma. Este tratamiento se dio durante el periodo de reparación del ADN, es decir, durante parte del G2 y profase, Figura 1.

Tratamiento con 5-aminouracilo (5AU): La solución de 5AU, 0,5 mM, fue preparada con agua destilada. Los tratamientos con la droga duraron 3 h a partir de la hora 8 después del segundo tratamiento con la cafeína 5 mM, correspondiente al final del periodo S de los núcleos más lentos en replicar.

Con la finalidad de obtener una concentración óptima de 5AU, se prepararon 3 soluciones diferentes: 10^{-3} M, 5×10^{-4} M y 10^{-4} M; la 1ª y 3ª concentraciones se descartaron porque en el primer caso el tratamiento deprime considerablemente el crecimiento mientras que en el segundo, aunque se adquieren nuevos equilibrios proliferativos, estos se aproximan a los valores de los controles permaneciendo estables a lo largo del tiempo; se escogió la concentración 5×10^{-4} M porque aunque deprime el crecimiento presenta una tasa del 46,6%, estable en el tiempo, Tabla 1.

Tratamiento con timidina tritiada (H^3 TdR): A las horas 6, 8 y 10 después del segundo tratamiento con la cafeína 5 mM, las raíces en crecimiento recibieron pulsos de 15 min con solución de H^3 TdR preparada a una concentración de 370 KBq/mol y una actividad específica de 925 GBq/mol. Para detectar la incorporación del isótopo radiactivo los portaobjetos fueron cubiertos con emulsión autoradiográfica NTB-2 de Kodak diluida 1:1 (v/v) con agua destilada. Una vez secas las preparaciones fueron colocadas durante 2 semanas a -70°C ; posteriormente fueron reveladas con revelador D-19 de Ko-

Tabla 1
Evolución de las distintas fases de la mitosis en la población control y en las tratadas con distintas concentraciones de 5AU. El tratamiento con la droga fue continuo. Se expresan los porcentajes

	Hora	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Totales
Controles	12	83,2	8,6	2,4	1,2	4,6	956
	14	82,3	10,8	3,9	1,1	2,0	729
	16	78,3	10,8	4,5	2,1	3,9	684
	18	84,9	9,3	2,9	0,9	3,2	899
	20	80,5	10,5	3,9	0,8	4,4	775
	24	82,8	5,5	1,6	2,1	7,7	604
	34	82,0	9,1	2,2	2,9	3,7	672
10^{-3} M	12	99,7	0,4	-	-	-	557
	18	99,3	0,7	-	-	-	579
	24	95,9	3,0	0,8	0,4	-	266
	34	90,2	5,6	2,3	0,6	1,4	353
5×10^{-4} M	12	99,7	0,3	-	-	-	1024
	14	99,3	0,7	-	-	-	817
	16	93,3	5,5	0,6	0,3	0,2	1893
	18	91,6	6,7	0,9	0,3	0,3	1261
	20	82,7	6,5	3,3	2,4	4,9	1360
	24	85,7	6,5	2,6	2,1	3,0	779
	34	88,2	6,1	1,6	1,1	2,9	171
10^{-4} M	12	97,0	2,8	0,2	0,1	-	1451
	14	98,3	1,5	0,1	0,1	-	1174
	16	82,0	7,0	2,6	2,3	6,1	1142
	18	82,4	9,0	3,2	1,7	3,6	736
	20	82,4	9,7	1,4	1,8	4,6	266
	24	81,9	8,7	2,3	1,4	5,7	528
	34	82,5	10,0	2,5	2,5	2,5	840

dak y fijadas con fijador ultrarápido también de Kodak.

Técnicas citológicas

Para los análisis citológicos, las raíces separadas del bulbo, fueron fijadas en una mezcla de etanol-ácido acético glacial 3:1. Posteriormente, los meristemos fueron coloreados con orceína acético-clorhídrica y extendidos en una monocapa sobre un portaobjetos.

Las preparaciones definitivas se hicieron sobre hielo seco y deshidratadas en alcoholes de 50°, 75°, 96° y 100°.

Resultados y Discusión

Las células eucarióticas en proliferación poseen un mecanismo de seguridad

que interrumpe su paso de G2 a mitosis si el ADN no se encuentra totalmente replicado o reparado (12). Pero este control negativo se cancela al emplear análogos de las bases nitrogenadas con el resultado de que las células alcanzan mitosis con alteraciones en su genoma que se van a analizar (13).

Para estudiar el daño producido al ADN y las modificaciones en la duración del periodo premitótico G2, se dio un tratamiento con 5AU durante 3 horas, desde la hora 8 después del segundo tratamiento con la cafeína hasta la hora 11, tiempo que corresponde a la replicación tardía de los núcleos más lentos en replicar, Figura 1; esto permitió evidenciar la presencia de un *checkpoint* G2 que controla la entrada en prometafase de una manera sincrónica, Figura 2.

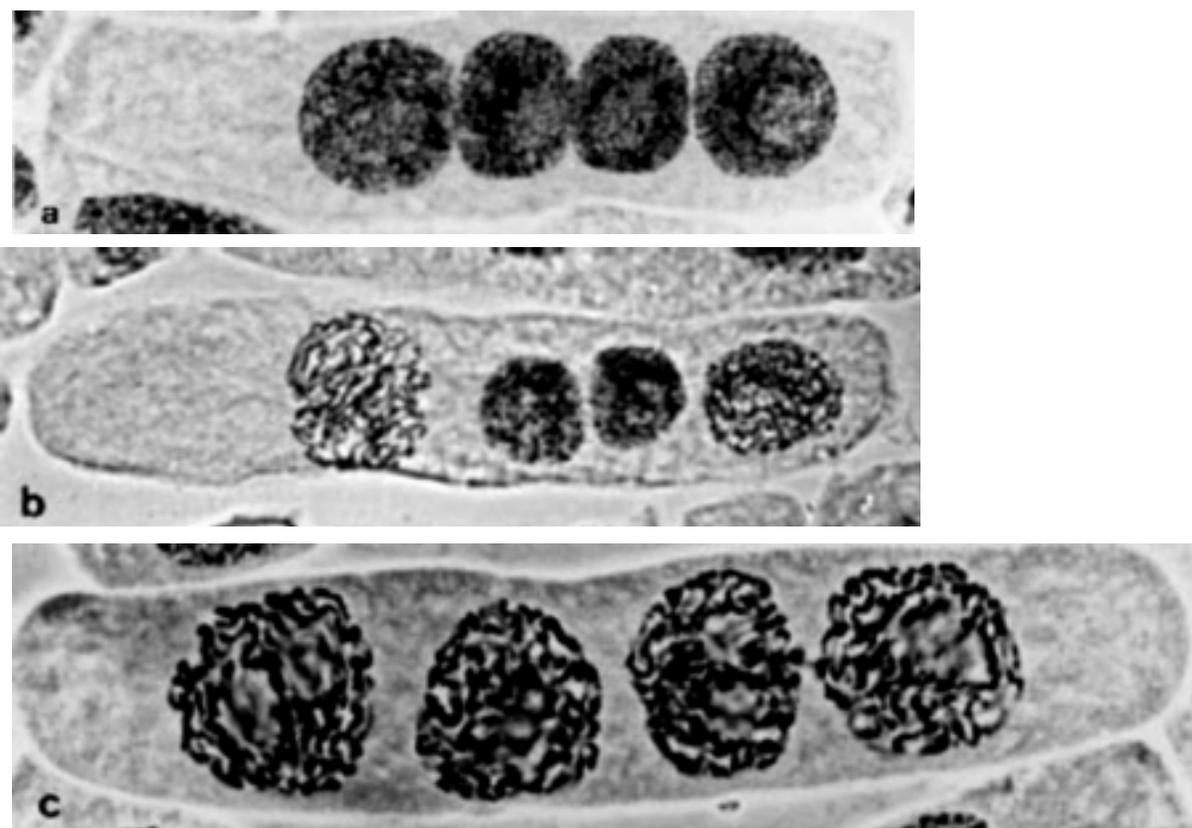


Figura 2. Células 8n tetranucleadas: a. núcleos en interfase, b. núcleos centrales en interfase y laterales en profase, y c. núcleos en profase.

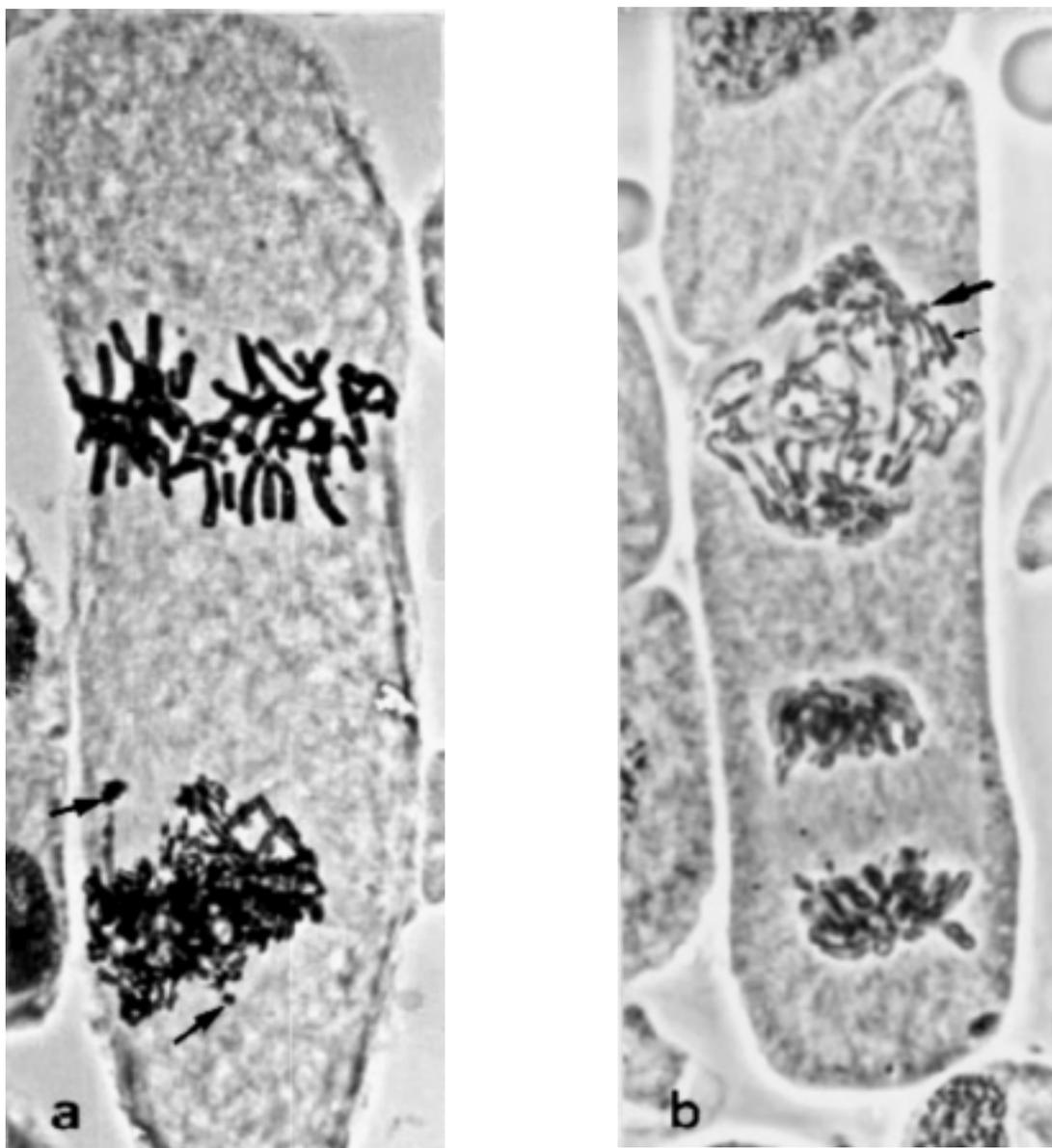


Figura 3. Células 8n (4n-4n) en mitosis con los núcleos más lentos en replicar, en prometafase: **a.** el núcleo inferior sufrió prematura condensación de la cromatina encontrándose en un estado de prometafase; la cromatina rota corresponde posiblemente, a segmentos no replicados; **b.** el núcleo superior tratado también con 5AU, se presenta en anafase con un huso aparentemente funcional; probablemente las roturas cromosómicas observadas impidieron la migración de las grandes masas cromosomales.

Como se observa en la Figura 3a y b, después de un retardo de 2,3 horas, los núcleos más lentos en replicar llegaron a mito-

sis pero observándose polimitosis heterofásicas lo que indica que el *checkpoint* G2 se debilitó durante el tratamiento con el 5AU.

En la Figura 3a, uno de los núcleos sufrió una condensación cromosómica prematura observándose en un estado semejante a prometáfase ya que su membrana nuclear está aparentemente rota; las roturas cromosómicas que aparecen, corresponden probablemente a segmentos no replicados. En la Figura 3b el núcleo más lento, aparentemente en anafase, presenta huso funcional pero las roturas en los brazos de algunos cromosomas impidieron la migración a los polos del huso; en consecuencia, solamente los kinetocoros y algunos subdominios centroméricos migraron hacia los polos celulares, hecho que ha sido observado también en algunas células de mamíferos (14).

Otras aberraciones cromosómicas observadas, además de las roturas, fueron c-mitosis, puentes cromosómicos, cromosomas rezagados y cromosomas aglutinados (*stickiness*), Tabla 2 y Figura 4.

En este trabajo se ratifica la existencia de un control negativo a nivel de G2, efectivo durante 3,7 horas y que impide la entrada a profase hasta que los núcleos completen su replicación y se confirma también la existencia de un segundo control negativo que dispara la entrada sincrónica en prometáfase (5); sin embargo, el hecho de que núcleos lentos en replicar desarrollen otras fases de

la mitosis, Figura 3a y b, indica el debilitamiento de estos controles negativos lo que sugiere que existe inducción de mitosis pero que el *checkpoint* que frena la entrada a mitosis hasta que se produzca el reconocimiento de la terminación de replicación, no es funcional en estas condiciones.

El doble tratamiento con 5AU + cafeína potenció el daño cromosómico inducido por el 5AU aumentando considerablemente la formación de metafases, anafases y telofases anormales y reduciendo el retardo mitótico inducido por el 5AU, Figura 1, como consecuencia del bloqueo de algunas rutas de reparación del ADN (15) y/o en la disminución en los niveles de ATP (16)

A la hora 25 después del segundo tratamiento con la cafeína, Figura 1, periodo G2-profase, apareció un daño reparado de 3,8% con el consiguiente daño residual del 7,8%, pero las células tratadas con 5AU + cafeína presentaron un daño reparado del 4,9% y un daño residual del 12,8%; estos datos se repitieron a las hora 40 (3er. ciclo) por lo que se puede concluir que el daño fue irreversible a partir del 2° ciclo lo que demuestra la caducidad de los *checkpoints* como ocurre en otras sistemas celulares (17) y que puede ser relevante para el bienestar de la célula debido a que la pérdida de un

Tabla 2

Porcentaje de aberraciones cromosómicas derivadas de los distintos tratamientos con 5AU y con 5AU + cafeína, a una población meristemática 8n. Se leyeron 719 células por concentración

A.C. ⁽¹⁾	5AU			
	10 ⁻³ M	5 x 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	5AU + cafeína
c-mitosis	-	2,7	2,2	4,5
Micronúcleos	4,8	-	-	-
Puentes crom. ⁽²⁾	4,8	1,4	-	0,5
Crom. Rez. ⁽³⁾	4,8	1,7	1,2	6,1
Roturas crom. ⁽⁴⁾	9,5	2,7	2,2	2,1
Crom. Aglut. ⁽⁵⁾	4,8	3,1	1,1	4,5

(1): aberraciones cromosómicas; (2): puentes cromosómicos; (3): cromosomas rezagados; (4) = roturas cromosómicas; (5): cromosomas aglutinados.

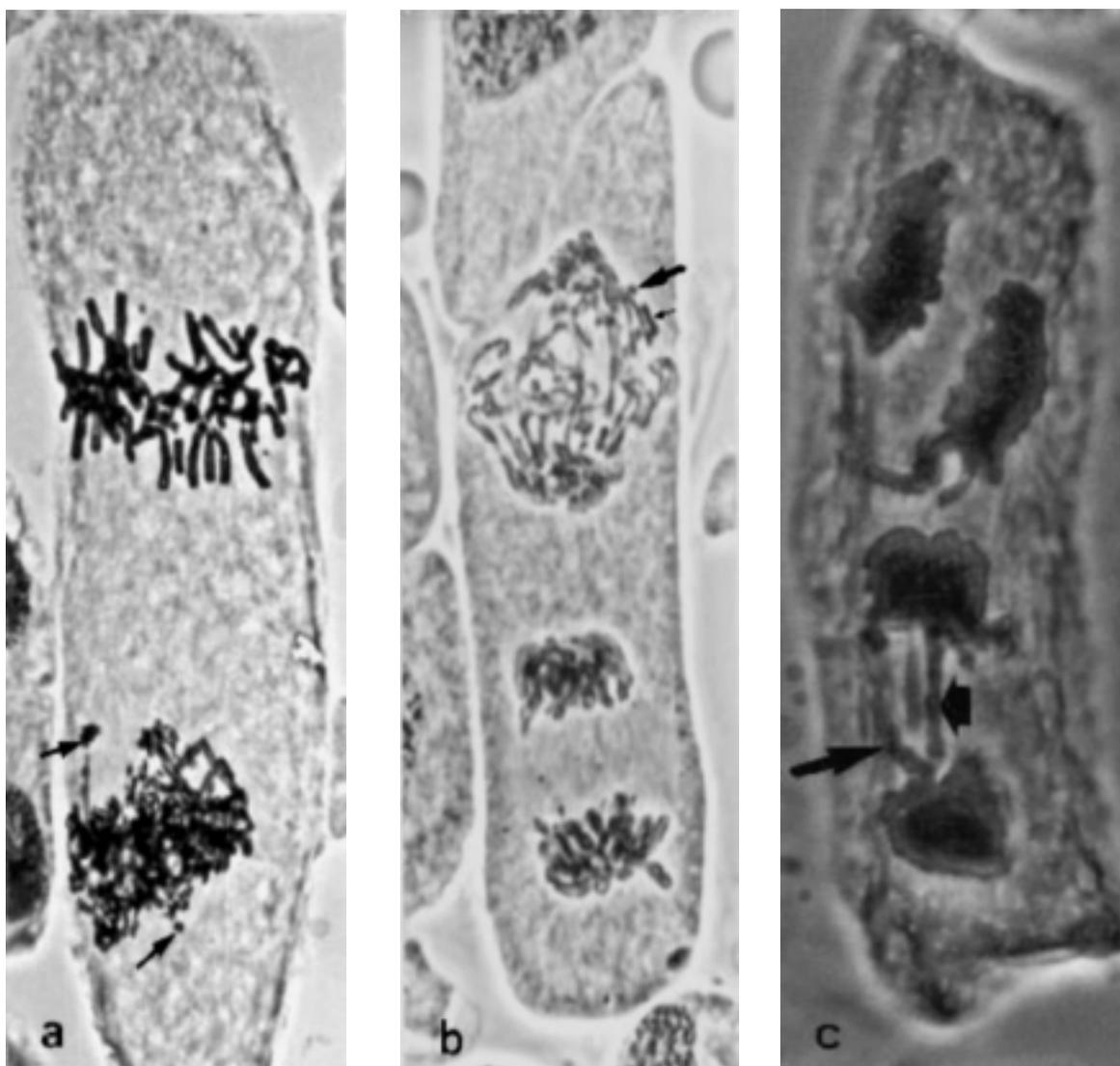


Figura 4. Aberraciones cromosómicas: a. cromosomas rezagados (flecha fina) y roturas (flecha gruesa); b. cromosomas aglutinados (*stickiness*); y c. cromosomas rezagados (flechas finas) y puentes cromosómicos (flecha gruesa).

checkpoint funcional bloquea automáticamente la reparación del ADN lo que puede llevar a la activación de un programa de autodestrucción en las células afectadas por el daño (18).

Agradecimiento

Los autores agradecen la colaboración prestada por Joseph Jay Ewald y las ayudas

recibidas por la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia, LUZ.

Referencias Bibliográficas

1. DEL CAMPO G.A., MARCANO L. **Ciencia** 2000.
2. LI J.J., DESHAIES R.J. **Cell** 74: 223-226, 1993.

3. LYDALL D., WEINERT T. **Science** 270: 1488-1491, 1995.
4. NURSE P. **Cell** 79: 547-550, 1994.
5. DEL CAMPO A., GIMÉNEZ-MARTÍN G., LÓPEZ-SÁEZ J.F., DE LA TORRE C. **Eur J of Cell Biol** 74: 289-293, 1997.
6. RAO P.N., JOHNSON R.T. **Nature** 255: 159-164, 1971.
7. ANDERSEN P.R., MARGOLIS R.L. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 2272-2276, 1992.
8. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ A., HERNÁNDEZ P., LÓPEZ-SÁEZ J.F. **Mutation Res** 149: 275-281, 1985.
9. PINCHEIRA J., RODRÍGUEZ M., BRAVO M., NAVARRETE M.H., LÓPEZ-SÁEZ J.F. **Clin Genet** 45: 25-31, 1994.
10. DE LA TORRE C., GIMÉNEZ-MARTÍN, G. **Cell Biology Int Reports** 1(3): 211-223, 1977.
11. LÓPEZ-SÁEZ J.F., RISUEÑO M.C., GIMÉNEZ-MARTÍN G. **J Ultrastruct Res** 14: 85-92, 1966.
12. MURRAY A.W. **Nature** 359: 599-604, 1992.
13. LYDALL D., WEINERT T. **Science** 270: 1488-1491, 1995.
14. BRINKLEY B.R., ZINKOWSKI R.P., MOL-LON W.L., DAVIS F.M., PISEGNA M.A., PERSHOUSE M., RAO P.N. **Nature** 336: 251-254, 1988.
15. DEL CAMPO A., ROMERO J. **Ciencia** 2(1): 7-16, 1994.
16. LÓPEZ-SÁEZ J.F., MINGO R., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ A. **Eur J Cell Biol** 27:185-190, 1982.
17. SANDELL L.L., ZAKIAN V.A. **Cell** 75: 729-739, 1993.
18. BATES S., VOUSDEN K.H. **Curr Opin Genet Dev** 6: 12-19, 1996.