

La bromosustitución del DNA seguida de radiación UV bloquea el disparo sincrónico a prometafase originándose polimitosis heterofásicas en plantas superiores

Antonio del Campo Gredilla y Letty Marcano

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

Recibido: 26-11-99. Aceptado: 17-04-01

Resumen

El ciclo de división celular (CDC) es un claro ejemplo de las relaciones núcleo-citoplasmáticas existentes en la organización celular. En este trabajo de investigación se utilizaron poblaciones plurinucleadas homocarióticas (8n) con 2, 3 ó 4 núcleos, obtenidas después de un doble tratamiento con cafeína 5 mM espaciados durante 15 horas, tiempo que corresponde a la duración de un ciclo a 25°C; de esta forma se bloquean dos citocinesis consecutivas. La entrada en metafase es un evento estrictamente sincrónico en estos sistemas; sin embargo, los núcleos que comparten el mismo citoplasma y que inician la replicación sincrónicamente, se van asincronizando, de forma que los núcleos más rápidos completan su replicación antes que el resto; esto quiere decir que existen mecanismos de sincronización que operan durante G2. El presente trabajo demuestra que existen dos puntos de regulación negativa (*checkpoints*) antes de la prometafase: uno que impide la entrada de los núcleos rápidos en replicar, a profase hasta que los más lentos hayan completado su replicación y el otro que asegura la entrada sincrónica en prometafase. Mediante el uso de 5´bromodeoxiuridina (BrUdR) y posterior radiación con luz UV de $\lambda=313$ nm, se bloquearon los controles que regulan la sincronización nuclear en los núcleos centrales encontrándose los laterales en distintas fases de la mitosis. Estos núcleos centrales que son incapaces de responder a los mecanismos sincronizadores, parecen tener su capacidad funcional permanentemente perdida en orden a completar su ciclo.

Palabras clave: *Allium cepa*; ciclo de división celular; 5´bromodeoxiuridina; puntos de regulación negativa(*checkpoint*)

DNA bromosubstitution followed by UV irradiation stops triggering to prometaphase resulting in heterophasic

Abstract

Cell Division Cycle(CDC) is a clear example of the nucleo-cytoplasmic relationship present in cellular organization. In this research 8n multinucleate cells were obtained with 2,3 or 4 nuclei as a result of double treatment with caffeine 5 mM, administered over a period of 15 hours,

* Autor para la correspondencia.

the time required to affect a complete cycle at 25°C, blocking two consecutive cytokinesis. Initiation of metaphase is a synchronic event in these systems. Nevertheless, the nuclei present in the same cytoplasm which initiate the synchronic replication became asynchronous as the more rapid nuclei complete their replication before the rest. This indicates that mechanisms of synchronization exist that operate during G2. The present work demonstrates that two checkpoints exist before the prometaphase: one that impedes the entrance of rapid nuclei in prophase replication until the slower nuclei have completed their replication, and the other that assures synchronic entrance in prometaphase. With the use of 5³bromodeoxyuridine (BrUdR) followed by UV ($\lambda=313$ nm) radiation, the controls that regulate nuclear synchronization in central nuclei are blocked resulting in lateral nuclei present in different phases of mitosis. Those central nuclei, that are incapable of responding to the synchronizer mechanisms appear to have their functional capacity lost in order to complete their cycle.

Key words: *Allium cepa*; cell cycle division; checkpoints; 5³bromodeoxyuridine.

Introducción

La capacidad que presentan las células para reproducirse puede ser considerada como la propiedad más interesante que poseen. Como dice Jacob, "el sueño de toda célula es ser dos células" y el "omnis célula e célula" de Virchow se cumple siempre. La pérdida de la capacidad reproductora de una célula la acerca a su propia muerte.

Los meristemas radiculares de *Allium cepa*, L., presentan dos sistemas de células con diferente finalidad: el típicamente proliferativo que suministra nuevas células para el crecimiento de la raíz y el originario y mantenedor de la coifa con la aportación de nuevas células sustitutivas de las eliminadas. Si la proliferación celular puede estimarse como un proceso imprescindible para el desarrollo de cualquier organismo no es extraño que cualquier variación patológica de dicho proceso pueda inducir alteraciones que lleven al trastorno general del organismo.

Los tejidos con células en proliferación se encuentran desarrollando el llamado ciclo de división celular (CDC) que es el proceso por el que una célula origina 2 idénticas a sí misma e idénticas entre sí.

Ahora bien, todo lo que sucede durante el CDC sucede de una manera ordenada mediante mecanismos que aseguran que un

evento tardío es dependiente de la terminación de otro anterior a él. En eucariontes, por ejemplo, la mitosis depende de la terminación de la replicación del genoma; los mecanismos de control responsables de esta dependencia son una serie de proteínas reguladoras o *checkpoints* que retardan la entrada a puntos específicos del ciclo celular hasta que se completen determinados acontecimientos cruciales, por ejemplo, replicación del DNA y/o reparación del mismo (1-5). El estudio de estos controles existentes en el proceso de multiplicación de las células es uno de los temas más apasionantes de la Biología Celular actual.

Muchos de estos efectos reguladores se llevan a cabo a través de la activación o desactivación reversible de las quinasas dependientes de ciclina, las CDKs (5,6), otra clase de proteínas de acción positiva que al activarse mantienen esta interdependencia S-mitosis.

En células de mamíferos, a los genes de los *checkpoints* se les conoce como genes "supresores de tumores". Cuando estos genes son disfuncionales las células entran a las fases siguientes del ciclo antes de que ellas estén listas para tal transición (7).

En este trabajo se utilizaron poblaciones plurinucleadas de *Allium cepa*, L., formadas después de un doble tratamiento con cafeína 5 mM que bloquea 2 citocinesis consecuti-

vas; en estos sistemas todos los núcleos que comparten el mismo citoplasma inician el periodo replicativo (S) sincrónicamente pero se van asincronizando en el transcurso del mismo, siendo los núcleos laterales (en las células con 3 ó 4 núcleos) los que presentan una replicación más rápida debido, seguramente, a la presencia de un ambiente citoplasmático mayor.

Reportamos en este trabajo, la presencia de 2 *checkpoints* en estos sistemas mediante el bloqueo de la replicación de los núcleos más lentos cuando ya los más rápidos habían alcanzado G2: uno que impide la entrada de los núcleos rápidos a profase hasta que los lentos hayan completado su periodo S y el segundo que impide la entrada a prometafase hasta que todos los núcleos terminen su profase. La utilización de 5´bromodeoxiuridina seguida de radiación UV permitió esta identificación.

Materiales y Métodos

Materiales: El material empleado fueron los meristemas radiculares de *Allium cepa*, L., brotados y crecidos a temperatura constante de 25°C ± 0,5, en oscuridad y colocados en recipientes de vidrio de 90 mL de capacidad, con agua filtrada y renovada cada 24 horas. La aireación se realizó por burbujeo de aire saturado de agua a razón de 15-20 mL/seg. Bajo estas condiciones de crecimiento, las raíces alcanzaron un desarrollo de 2 cm a las 48 h después de colocados los bulbos en agua y un equilibrio dinámico en el que los parámetros del ciclo permanecieron constantes.

Métodos. Cuando las raíces alcanzaron 2 mL de longitud fueron colocadas en las diferentes soluciones preparadas con agua destilada, sin alterar las otras condiciones ambientales.

Tratamiento con cafeína. Las raíces fueron tratadas con cafeína a una concentración de 5 mM para inhibir la citocinesis, ya que la cafeína impide la fusión de las pe-

queñas vesículas de Golgi (8). 15 horas más tarde, tiempo que corresponde a un ciclo completo a 25°C, las raíces recibieron un segundo tratamiento con cafeína durante 1 h con el fin de obtener poblaciones meristemáticas plurinucleadas.

Tratamiento con 5´bromodeoxiuridina (BrUdR): Este análogo compite con la timina durante la replicación del DNA sustituyéndola y obteniéndose, junto a la cromátida normal, la cromátida bromada, detectables una y otra con tinción de Giemsa (9) y susceptible de sufrir en determinadas condiciones, fotólisis por efecto de la luz UV (10). Se utilizó esta droga a una concentración de 10⁻⁴ M y el tratamiento se efectuó durante 3 h abarcando la etapa de replicación tardía de los núcleos lentos, siendo posteriormente irradiadas las raíces con una lámpara Westinghouse de 40 W 313 nm de λ . Antes de la radiación los bulbos fueron colocados en agua destilada y burbujeados durante 15 min con nitrógeno, con el fin de eliminar el oxígeno.

Tratamiento con timidina trititada (H³TdR): Con el fin de conocer la duración del periodo replicativo (S) en estas poblaciones plurinucleadas, las raíces fueron incubadas con H³TdR (Amersham) a una concentración de 370 KBq/mL y con una actividad específica de 925 GBq/mmol, durante 15 min en diferentes tiempos. Para detectar la incorporación del isótopo radiactivo, los portaobjetos con los meristemas fijados y extendidos en una monocapa fueron cubiertos con emulsión autoradiográfica NTB-2 de Kodak, diluida 1:1 (v/v). El revelado se hizo con revelador D-19 de Kodak y fijadas con fijador ultrarápido, también de Kodak.

Procedimientos citológicos. Para los análisis citológicos las raíces fueron fijadas en etanol-ácido acético glacial, 3:1 y teñidas posteriormente con orceína acético-clorhídrica. Se aisló la región meristemática de cada raíz y se realizaron las preparaciones microscópicas para su observación.

Resultados

El análisis del periodo G2 ha venido a señalar la existencia de puntos de control para la regulación del ciclo proliferativo, tanto en células vegetales (11,12) como animales (13,14). Por otra parte, el estado en que se encuentra el genoma en G2, no es meramente premitótico y en tránsito hacia su división; el hecho de encontrarse en G2 marca una situación fisiológicamente real para el núcleo; cuando el plasmodio *Physarum policephalum*, por ejemplo, cuyos núcleos se encuentran en G2 se fusionan con un plasmodio cuyos núcleos se encuentran en periodos tempranos del ciclo, los núcleos G2 se detienen hasta que los primeros hayan alcanzado la misma etapa de desarrollo iniciando sincrónicamente sus profases (15).

Al bloquear 2 citocinesis consecutivas se obtuvieron células plurinucleadas 8n con 2 núcleos (50%), con 3 núcleos (35%) o con 4 núcleos (15%) dependiendo de la reunión de

grupos de cromosomas 2n para formar un núcleo 4n durante telofase, Figura 1. En estas poblaciones, los núcleos localizados en los extremos de las células trinucleadas y tetranucleadas terminaron su replicación antes que los núcleos centrales; de esta forma, se obtuvieron células heterofásicas interfase-profase (I-P), Figura 2a; sin embargo, todos los núcleos iniciaron sincrónicamente la profase tardía, Figura 2b, para entrar así a metafase, Figura 2c.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de confirmar resultados previos (5) que demuestran que la profase no se inicia en los núcleos rápidos hasta que los lentos hayan completado el periodo S, (barra superior de la Figura 3). Para confirmar esto se dieron tratamientos cortos de 10 min de duración con H³TdR, desde la hora 6 hasta la 12 después del segundo tratamiento con cafeína; se evaluó la frecuencia de células con núcleos marcados con el precursor radiactivo y con núcleos sin marcar en profase; ninguna de las 600 células plurinucleadas ana-

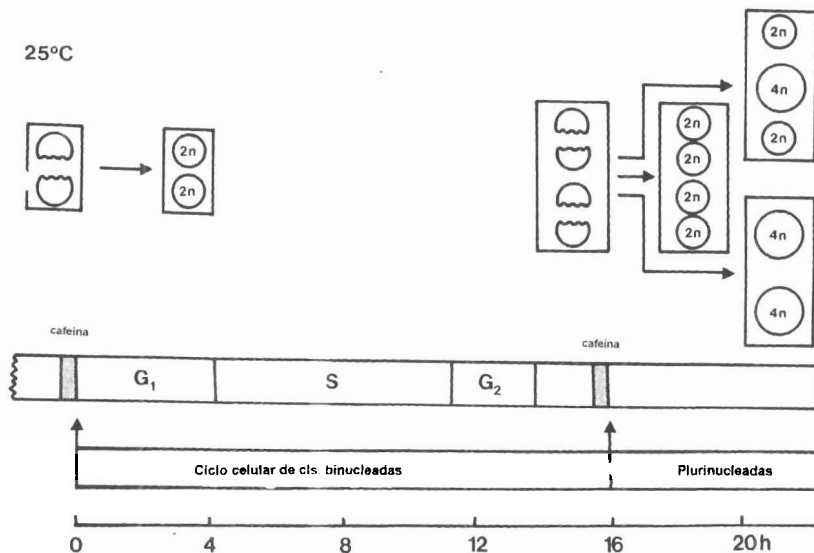


Figura 1. Diseño experimental para la producción de células plurinucleadas en meristemos radiculares de *Allium cepa*, L., crecidos a 25°C ± 0.5. Dos tratamientos con cafeína 5 mM espaciados durante un ciclo completo producen la inhibición de 2 citocinesis consecutivas. Después del segundo tratamiento con la cafeína se obtuvieron células 8n y dependiendo de la fusión de sus núcleos aparecieron células con 4(15%), 3(35%) ó 2 núcleos(50%).

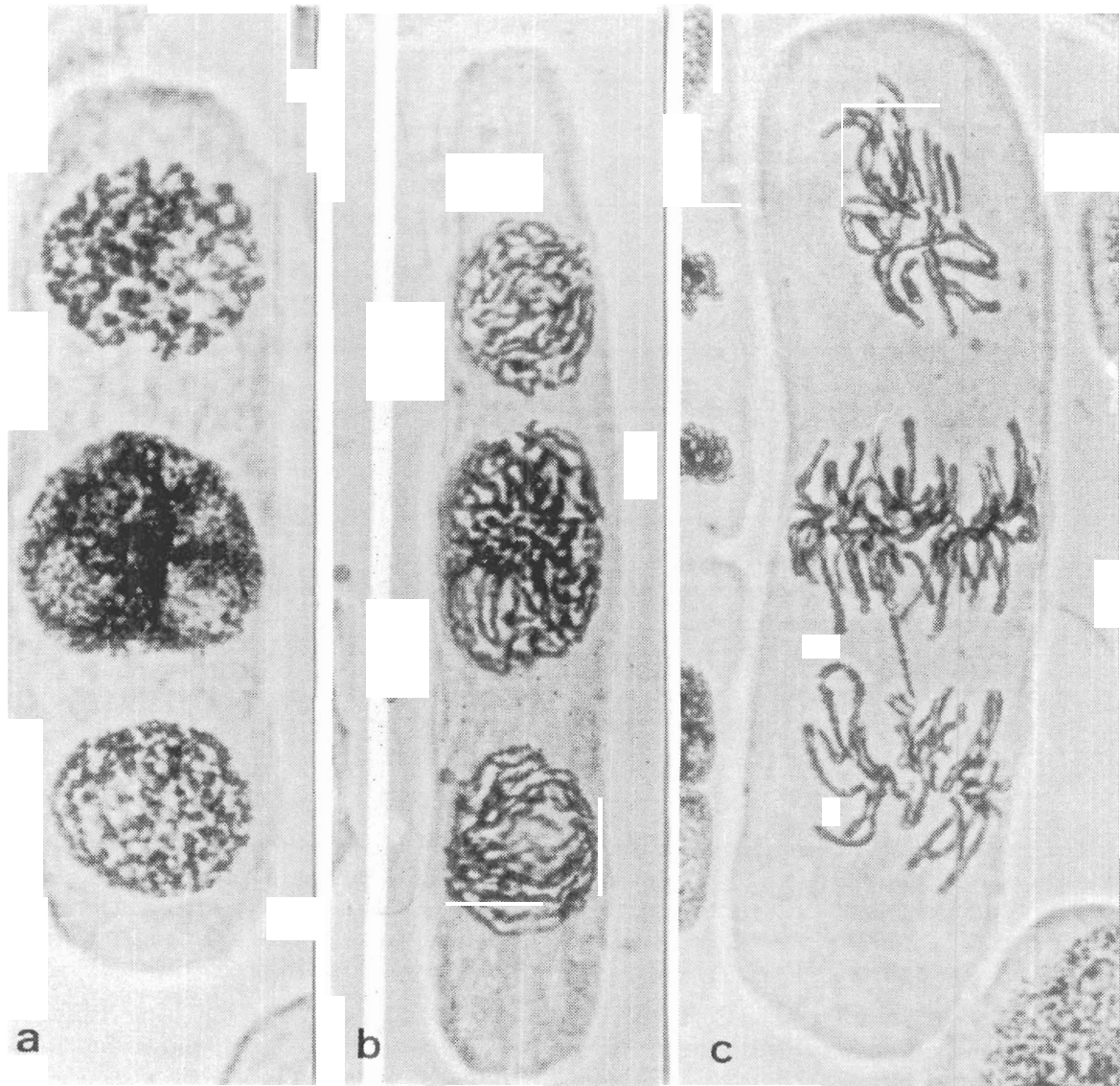


Figura 2. Desarrollo normal de la mitosis de las células plurinucleada A. Célula trinucleada(2n-4n-2n) cuyo núcleo central está en interfase mientras que los núcleos periféricos se encuentran en profase temprana. B. Célula trinucleada(2n-4n-2n) en profase C. Célula trinucleada(2n-4n-2n) en metafase. La entrada a metafase se realiza siempre en estricta sincronía en células control.

lizadas presentaban esta situación lo que demuestra que la profase no se inicia en los núcleos laterales hasta que los centrales hayan terminado de replicar; esto confirma la existencia de un *checkpoint* G2 que controla la entrada en profase.

Aprovechando la oportunidad que presenta el desarrollo asincrónico del periodo S en los sistemas plurinucleados, se planteó un experimento para determinar la posible influencia de la transcripción de segmentos de replicación tardía sobre la mitosis (16). Se

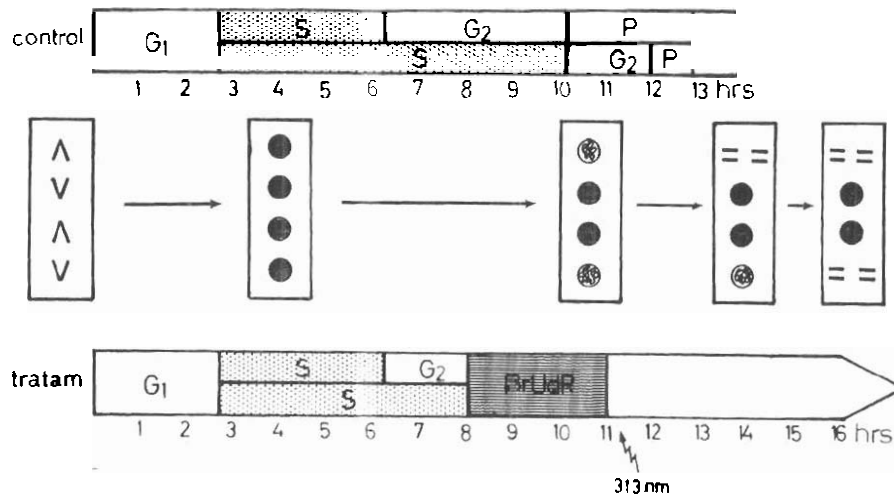


Figura 3. La barra superior representa los parámetros del ciclo en los núcleos de las células plurinucleadas. Los núcleos de los extremos muestran una replicación corta (3.20 h) y un periodo G2 y profase largos mientras que los núcleos centrales presentan un periodo S largo (7.48 h) y periodo G2 y profase más cortos que los núcleos periféricos. La barra inferior representa el tiempo de tratamiento con el BrUdR y la radiación con UV de $\lambda=313$ nm. Por último, los gráficos centrales representan el desarrollo de las células tetranucleadas después del segundo tratamiento con la cafeína cuando los núcleos centrales fueron bromosustituídos en la última parte de su periodo S. En este caso, los núcleos de los extremos, más rápidos en replicar son capaces de iniciar metafase mientras que los centrales permanecen en interfase o en profase.

sabe que el BrUdR es un análogo de la timina que en determinadas condiciones de tratamiento puede sustituirla durante la replicación del DNA; este DNA bromado resulta sensible a las radiaciones UV (17, 18).

Al iniciar un tratamiento con BrUdR a la hora 8 después del segundo tratamiento con cafeína y durante 3 horas, Figura 3, parte de los núcleos rápidos ya habían iniciado su periodo G2 mientras que los más lentos efectuaban, o estaban a punto de efectuar, la replicación tardía; por lo tanto, sólo estos últimos sufrieron la bromosustitución. En estas condiciones se irradiaron las células durante 20 min con luz UV de $\lambda=313$ nm, previa eliminación del oxígeno con nitrógeno durante 15 min, viéndose afectados aquellos núcleos cuyo DNA poseen BrUdR. Como se observa en esta figura, se hace presente una subpoblación formada por polimito-

sis heterofásicas diferente a las I-P observadas en los controles, lo que indica que los 2 *checkpoints* que controlan la entrada a profase y la entrada sincrónica a metafase fueron debilitándose en el tiempo.

La Figura 4 expresa la distribución de frecuencias de células plurinucleadas en mitosis, sea esta en I-P, con polimitosis sincrónicas o con polimitosis heterofásicas, presentándose valores para las 3 subpoblaciones. Después de un pequeño retardo, se pueden observar en los núcleos rápidos, otras fases distintas a las observadas en ausencia de la bromosustitución (prometafases y metafases), Figura 5 a y b, pequeño retardo que corresponde al tiempo en el que el *checkpoint* G2 responsable de la sincronización premetafásica, era operativo; sin embargo, los núcleos retardados pueden sufrir una prematura condensación de la cromatina observándoseles en una fase parecida a

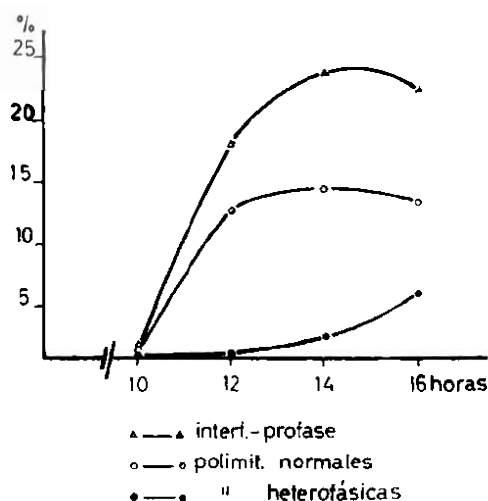


Figura 4. Frecuencia de los diversos tipos de células en mitosis en la población total de plurinucleadas tratadas con BrUdR durante 3 h, seguidas de radiación UV.

prometáfase debido a la desaparición de la membrana nuclear pero sin llegar a otras fases de la mitosis, Figura 5 c.

Al contrario de lo que sucede en sistemas tratados con 5-aminouracilo en los que pueden formarse un aparente huso funcional (5), los sistemas tratados con BrUdR actúan de tal forma que ni siquiera poseen la capacidad de responder al inductor de mitosis aunque esté producido por los núcleos rápidos, por lo que los lentos quedan inhabilitados generalmente, para pasar a otras fases de la mitosis.

Discusión

La formación de nuevas células a partir de otras precedentes es esencial para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos; esto supone una serie de sucesos que se llevan a cabo en 2 ciclos: uno de crecimiento en masa que es continuo desde que la célula nace hasta que se divide y otro discontinuo que corresponde a la síntesis y reparto del DNA; los 2 transcurren en paralelo, aunque

en ciertos momentos tienen que interactuar y regularse mutuamente.

La existencia de puntos de control durante G2 ha sido detectada de diversas maneras: bloqueo de las células en el G2 cuando sus condiciones de desarrollo son precarias, como falta de hidratos de carbono(19); bloqueo del ciclo en G2 por inhibición de síntesis de proteínas (20); inhibición selectiva de la terminación de la replicación del DNA mediante tratamiento continuo con 5-aminouracilo (5), etc.

Los mecanismos de control negativo o *checkpoints*, bloquean la entrada de los núcleos a mitosis cuando el DNA está incompletamente replicado o está dañado(21); por otra parte, el avance de las células a través del ciclo celular se basa en la activación o desactivación de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), análogas de la p34cdc2 (4). Rao y Johnson (22) estudiaron el predominio del citoplasma sobre el núcleo en estos mecanismos de control: al fusionar una célula en S con otra en mitosis se produce condensación prematura de la cromatina en los núcleos en proceso de replicación.

En este trabajo, aunque la bromosustitución del DNA seguida de radiación por luz UV de $\lambda=313$ nm en condiciones de anoxia no impide la terminación de la replicación, 2 hechos fueron aparentes: 1. Cuando fueron bromosustituidas las secuencias del DNA replicadas tardíamente en los núcleos lentos, solamente en los núcleos rápidos eran operativas las señales positivas que inducen mitosis; entonces, solamente estos núcleos entraron a mitosis aunque más tarde que los núcleos de las células plurinucleadas control, Figuras 4 y 5 a y b; 2. Por otra parte, el bloqueo temporal impuesto por el *checkpoint*-G2 y que fue funcional cuando solamente fueron bromosustituidas e irradiadas las secuencias replicadas tardíamente en los núcleos lentos, determinó en los núcleos rápidos en replicar un largo G2; entonces, los núcleos lentos con el DNA incompletamente replicado fue-

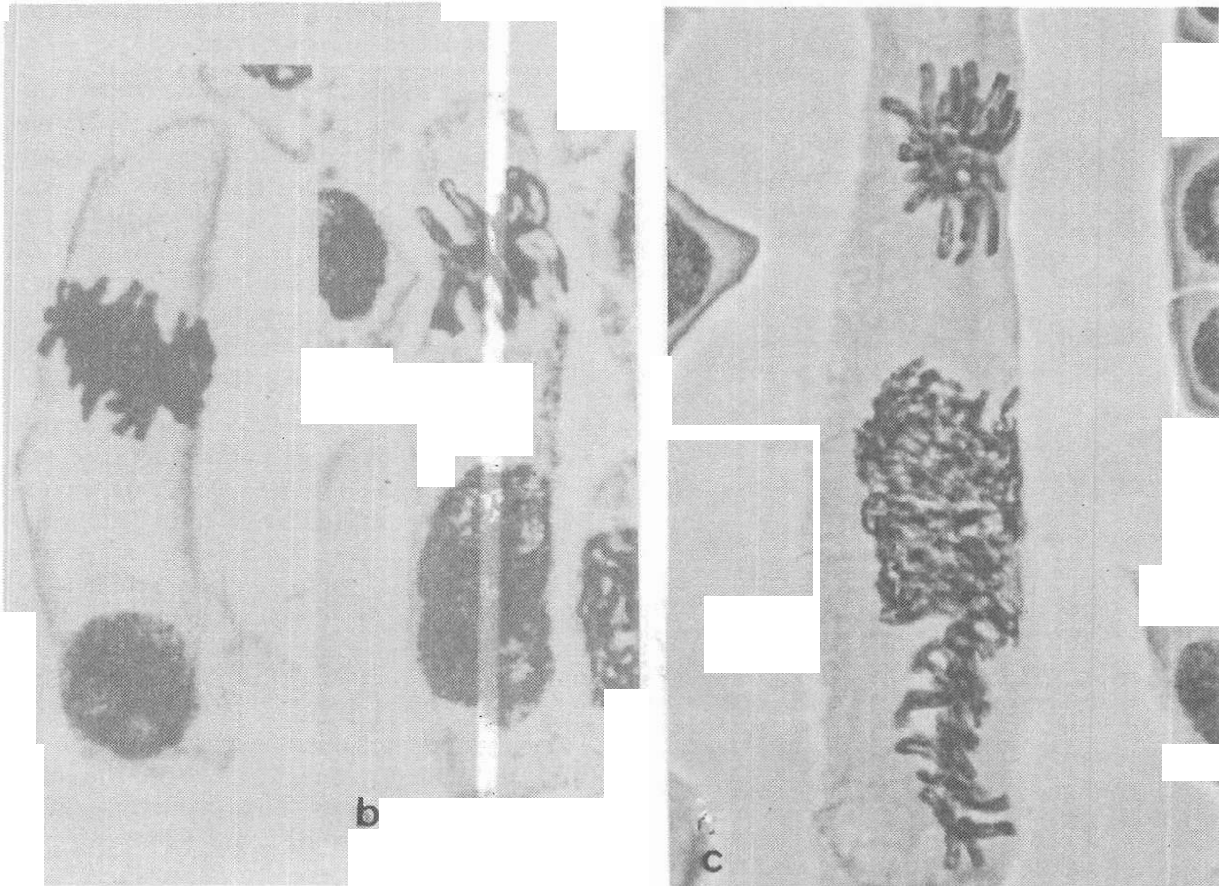


Figura 5. Asincronía inducida en mitosis de las células plurinucleadas después de bromosustitución e irradiación: A y B. Células binucleadas $4n-4n$, con un núcleo en profase y el otro en metafase. Célula trinucleada $2n-4n-2n$, con el núcleo central en prometafase anormal y los periféricos en metafase.

ron inducidos a entrar a mitosis después de 4 horas de eficiente bloqueo sufriendo prematura condensación cromosómica y observándoseles en un estado de prometafase con su membrana nuclear aparentemente rota.

Es decir, que la acción de la radiación sobre el DNA bromado provocaría alteraciones en la cromatina que modificarían la funcionalidad del DNA implicado en la transcripción de los controles en G2 y profase y por este motivo los núcleos desarrollan el resto de la interfase y mitosis en completa independencia, Figura 5 c y d; otras veces, los núcleos lentos cuya replicación tardía ha sido bloqueada no poseen la capacidad de

aceptar al inductor de mitosis aunque esté producido por los núcleos rápidos por lo que los lentos quedan frecuentemente inhabilitados para entrar a mitosis, Figura 5 a y b.

Mediante este trabajo se ponen de manifiesto la presencia de 2 *checkpoints* que son activos antes de prometafase: uno que bloquea la entrada en profase de los núcleos rápidos hasta que se haya completado en los núcleos lentos su proceso replicativo y otro que impide la entrada en metafase hasta que todos los núcleos terminen profase.

A pesar de los avances logrados durante la última década en lo relativo a la replica-

ción celular, deben hacerse nuevos estudios; sin embargo, en todos los casos estudiados referentes al paso G2-P y P-M la existencia de inductores y de una predisposición para su aceptación pueden condicionar las opciones positivas o negativas a pasar al periodo siguiente. Todo esto pone de manifiesto la gran importancia y complejidad de las interacciones núcleo-citoplasmáticas en el ciclo eucariótico.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico(CONDES) de La Universidad del Zulia por los aportes financieros al desarrollo de este Trabajo; así mismo, Joseph Jay Ewald por la colaboración y asesoramiento prestados.

Conclusiones

1. Los núcleos de las células plurinucleadas inician replicación y metafase con una estricta sincronía.
2. Los núcleos periféricos siempre finalizan la replicación de su genoma antes que los centrales.
3. Si en los núcleos centrales la última porción del genoma es bromosustituida e irradiada, los mecanismos de sincronización se alteran: los núcleos más rápidos en replicar son capaces de llegar a metafase mientras que los más lentos permanecen en interfase, pudiendo llegar en algunos casos, a prometafase.
4. Los núcleos que llegan a metafase son capaces de completar la mitosis
5. Los mecanismos de sincronización en metafase parecen depender de la existencia de un regulador negativo en G2, lo mismo que el inicio de profase en los núcleos laterales depende de la terminación del periodo S en los más lentos en replicar.

Referencias Bibliográficas

1. HARTWELL L.H., WEINERT T.A. *Science* 246: 629-634, 1989.
2. LI J.J., DESHAIES R.J. *Cell* 74: 223-226, 1993.
3. NURSE P. *Cell* 79: 547-550, 1994.
4. LYDALL D., WEINERT T.A. *Science* 270: 1488-1491, 1995.
5. DEL CAMPO A., GIMÉNEZ-MARTÍN G., LÓPEZ-SÁEZ J.F., DE LA TORRE C. *Eur J Cell Biol* 74: 289-293, 1997.
6. WALWORTH N., DAVEY S., *Nature* 363: 368-371, 1993.
7. KISER G.L., WEINERT T.A. *Mol Biol Cell* 7: 203-208, 1996.
8. LÓPEZ-SÁEZ J.F., RISUEÑO M.C., GIMÉNEZ-MARTÍN G. *J Ultrastruc Res* 14: 85-92, 1966.
9. DEL CAMPO A., COLETTO R. *Ciencia* 6(1): 7-21, 1998.
10. SUGIYAMA T., GOTO K., KANO Y. *Nature* 259: 59-60, 1976.
11. SANS J., LEYTON G., GIMÉNEZ-ABIAN, M.I., GIMÉNEZ-ABIAN J.F., ALLER P., DE LA TORRE C. *Cell Prolif* 30(2): 61-69, 1997.
12. GIMÉNEZ-ABIAN M.I., DE LA TORRE C., CANOVAS J.L., GIMÉNEZ-MARTÍN G. *Eur J Cell Biol* 47: 404-407, 1988.
13. KAUFMANN W.K. *Cancer Metastasis rev* 14(1): 31-41, 1995.
14. BERNHARD E.J., MAITY A., MUSCHEL R.J., McKENNA W.G. *Radiat Res* 140(3): 393-400, 1994.
15. SACHSENMAIER W., REMY U., PLATTNER-SCHOBEL R. *Exptl Cell Res* 73: 41-48, 1972.
16. DEL CAMPO A. *Ciencia* 1(2): 73-82, 1993.
17. JONES T.C., DOVE W.I. *J Mol Biol* 64: 409-416, 1972.
18. COOK G.P., CHEN T., KOPPISCH A.T., GREENBERG M.M. *Chem Biol* 6(7): 451-459, 1999.

19. VAN'T HOFF J. **Exptl Cell Res** 61: 173-182, 1970.
20. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ A., GIMÉNEZ-MARTÍN G., FERNÁNDEZ-GÓMEZ M.E., DE LA TORRE C. **Exptl Cell Res** 88:163-170, 1974.
21. MURRAY A.W. **Nature** 359: 599-604, 1992.
22. RAO P.N., JOHNSON R.T. **Nature** 255:159-164, 1971.