

INSTITUTO DE ESPAÑA

**ANALES**  
de la  
**REAL ACADEMIA**  
**NACIONAL**  
**DE**  
**FARMACIA**



**2001**

**VOLUMEN LXVII**

**Núm. 1**

**Publicación trimestral**

**Domicilio de la Academia**

**FARMACIA, 11**

**28004 MADRID**



---

## Revisión

---

### **Reiniciación de la transcripción en el ciclo celular: Nucleogénesis\***

GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN

*Académico Correspondiente*

#### RESUMEN

La transición de telofase al periodo G<sub>1</sub> interfásico incluye el proceso de nucleogénesis o reorganización nucleolar en la que específicas regiones (NOR) de determinados cromosomas en cada cariotipo se encuentran involucradas en la formación de los nuevos nucleolos.

Los estudios realizados en células que efectúan esta transición muestran que tanto la síntesis de proteínas como la de RNA, que son inexistentes en las etapas medias de la mitosis, aumentan su intensidad al final de la telofase, precisamente durante el periodo de reorganización nucleolar, justamente cuando son observados los llamados cuerpos prenucleolares en la superficie de los cromosomas.

Para abordar de qué manera podrían influir la biosíntesis de proteínas y del RNA en la nucleogénesis se partió de varios hechos: a) El marcado citocinesis por inhibición mediante cafeína; b) el conocimiento de que la nucleogénesis abarca a un 7,4% de la duración del ciclo celular y se sitúa entre telofase y G<sub>1</sub> temprano; c) la aplicación de inhibidores de síntesis de proteínas o de RNA antes, durante y posteriormente al marcado binucleado y su análisis sobre la reorganización celular.

Experimentalmente se demostró que los cuerpos prenucleolares no eran productos inmediatos de la actividad transcripcional de los cromosomas post-metafásicos, apareciendo independientemente de una simultánea síntesis de proteínas. La correlación cronológica perfecta entre la desaparición de los cuerpos prenucleolares y la nucleogénesis completa, así como su adelantamiento mediante inhibición de síntesis de proteínas o su bloqueo por inhibición de la síntesis de RNA, mostraron concluyentemente qué factores se encontraban en el proceso de nucleogénesis.

---

\* Discurso de ingreso como Académico Correspondiente, leído el 2 de diciembre de 1999

La existencia del NOR no siempre asegura la reorganización de un nucleolo. Puede existir dominancia de unos NORs sobre otros, tanto inter- como intra-específicos, formándose un número de nucleolos inferior al número de NORs, debiéndose a proteínas de unión al DNA condicionadas por el nivel de metilación de sus citosinas. Esta dominancia en la nucleogénesis es detallada en sus diferentes fases.

**Palabras clave:** Transcripción celular.- Nucleogénesis

## SUMMARY

### **Reinitiation of the Transcription in the celular cycle. Nucleogenesis**

The transition from a telophase to the G1 of a new cell cycle includes the nucleogenesis process or nucleolar reorganization. In it, specific chromosomal regions of the karyotype, the nucleolar organizer regions (NORs) are involved in the development of the new nucleoli responsible for the synthesis of ribosomal RNAs in the cell.

Synthesis of both RNA and proteins are cancelled or very low in the central stages of mitosis. They re-start or increase again by telophase completion, when many small prenucleolar bodies appear on the surface of chromosomes.

To assess how the reinitiation of RNA and protein synthesis at the beginning of the new cycle affect the nucleogenesis process, three premises were used: a) synchronous telophases become binucleate cells in early G1 if blocking their cytokinesis by caffeine; b) the whole nucleogenesis takes place in a time window that represent only 7.4% of the whole cell cycle duration, RNA or protein synthesis at different times of the nucleogenesis process. They were used for the kinematic study of the process.

It was shown, for the first time, that the prenucleolar bodies were not product of nay concurrent RNA synthesis taking place after metaphase. Moreover, their appearance was also independent from the reinitiation of the mature nucleoli were growing, the advancement in the completion of the nucleogenesis when the simultaneous protein synthesis was prevented, and their inhibition when the re-start of rDNA synthesis was prevented, allowed to design a model integrating the different factors involved in nucleolar formation.

Lastly, it is a long standing fact that the presence of a NOR does not always ensure the development of a nucleolus on it. Thus, a NOR could result active (dominant) in developing a nucleolus *versus* other interspecific, independent from the normal fusion of nucleoli formed in different NORs. Nucleolar dominance or amphiplastia can be achieved by selective hypomethylation of cytosines in certain NORs. The factors involved in such process has been determined.

**Key words:** Celular transcription.- Nucleogenesis.

Hace exactamente un siglo (1898) Montgomery publicaba en el *Journal of Morphology* una revisión de 327 páginas sobre el nucleolo. Este trabajo posee unas 700 referencias obtenidas desde 1781, en que Fontana describió por primera vez esta formación del núcleo celular, en un tratado sobre el veneno de la víbora. Se puede señalar que esta revisión marca una frontera entre una época eminentemente descriptivo-morfológica y la posterior y actual que viene a desarrollar un periodo preferentemente analítico, ya de la estructura nucleolar, ya de su fisiología, actividad y comportamiento en la célula.

No cabe duda que el avance alcanzado en la presente centuria en la Biología ha abarcado a todos los componentes celulares, desde el citoplasma y sus orgánulos (mitocondrias, plastidios, lisosomas, centrosomas, aparato mitótico, etc.) hasta el núcleo celular con los cromosomas, lográndose un conocimiento profundo de la composición y función de todos ellos. Sobre el nucleolo no podría ser menos.

La palabra nucleolo viene a ser un diminutivo de un diminutivo. Núcleo proviene del latín *nux* y significa nuececilla. Pues bien, nucleolo sería como la pequeña nuececilla del núcleo celular (Valentin, 1839) (1).

El núcleo celular y los nucleolos se encuentran íntimamente asociados. El hecho que los cromosomas no se observen al microscopio óptico desde el paso de telofase a interfase del ciclo celular, y paralelamente se vayan viendo los nucleolos y, por otra parte, el que los nucleolos vayan desapareciendo en el transcurso de la interfase-profase, mientras los cromosomas se hacen microscópicamente visibles, llevó a la consideración de la existencia de una marcada asociación de unos con otros, que permitió incluso formular como causa y origen de unos u otros, ya a los cromosomas ya a los nucleolos.

A finales del siglo XIX (1879) se describe extensamente la división del núcleo celular. Se introduce un nuevo método para el estudio de la multiplicación celular. En este año tres científicos publicaron las observaciones que habían realizado al microscopio bajo condiciones en que se podía seguir a las células en el curso de su división. Strasburger (2) utiliza los pelos estaminales de *Tradescantia* como material de observación, mientras que Flemming (3), por una parte, y Schleicher, por otra, emplean células de embriones de anfibios, especialmente salamandra. Flemming (3) y Schleicher (4) publican en el mismo

fascículo de la misma revista (*Archiv für mikroskopische Anatomie*) las diferentes etapas por las que transcurre el núcleo celular durante su división. Al conjunto del proceso Flemming lo denominó *mitosis* (del griego *mitos*, filamentos) y Schleicher lo llamó *Kariocinese* (del griego *karyo*, núcleo, y *cinese*, movimiento). Lo llamativo fue y es para el observador los cambios morfológicos observados al microscopio que tenían lugar en el núcleo durante la división de la célula. Lo otro, el “espacio” que transcurre entre dos divisiones celulares y en el que destaca el núcleo fue llamado por Flemming “*Ruhekern*” (núcleo en reposo). Es justamente cuando el núcleo alcanza el máximo de actividad metabólica. En 1965, el Instituto Rockefeller de Nueva York publicó en su revista *Journal of Cell Biology* la traducción del artículo de Flemming titulado *Beiträge zur Kenntnis der Zelle und Ihre Lebens Erscheinungen* publicado en la revista alemana *Archiv für mikroskopische Anatomie* de 1880. Estas investigaciones confirmaban los distintos estadios del proceso de división del núcleo, que ocurrían de manera secuencial, dando una visión fundamental de la mitosis aún en sus menores detalles y mostrando que se trataba de un proceso común tanto para las células vegetales como animales.

Por entonces se consideraba como diferencia básica de los componentes celulares su distinta capacidad de tinción con diversos colorantes. Así, el propio Flemming vio que el núcleo celular y los cromosomas se teñían con colorantes básicos y por ello dio el nombre de cromatina a la sustancia nuclear coloreable.

Hacia ya unos años que Miescher (1871) (5) había aislado una sustancia proveniente de los núcleos de células del pus obtenido de los heridos de la guerra franco-prusiana a la cual denominó nucleína. La nucleína mostró ser un componente permanente del núcleo celular. Llegó a esta conclusión después de analizar otros tipos celulares, como el esperma que obtenía de los salmones que remontaban el Rin, a su paso por Basilea, su ciudad natal, a la que había regresado en 1872. El demostró que la nucleína, en el caso del esperma, se encontraba combinada con una sustancia nitrogenada altamente básica, a la que llamó protamina. Zacharias (1881) (6) aplica el sistema de extracción de Miescher a diferentes tipos celulares, tanto animales como vegetales, de cuyos núcleos siempre es capaz de extraer la nucleína. Estos trabajos de

Zacharias fueron conocidos por Flemming (7), el cual en su libro *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (1882) define la cromatina como la sustancia que constituye el entramado del núcleo y la considera idéntica a la nucleína. Actualmente, conocemos a compuestos importantes de dicha sustancia con el nombre de ácidos nucleicos.

El progreso en el estudio de la química de los ácidos nucleicos fue muy rápido desde el momento en que Altmann (8) ideó un método para prepararlos aislados de proteínas (1889). En pocos años se encontró que poseían tres componentes: ácido fosfórico, dos tipos de bases orgánicas, purinas y pirimidinas, y un carbohidrato. Las fuentes de las que se extrajeron los ácidos nucleicos fueron las levaduras, por una parte, y las células del timo por otra. Los ácidos nucleicos de cada uno de los orígenes poseían ciertas diferencias y ello llevó a una prematura generalización que distinguía al ácido nucleico de las plantas (ácido zimonucleico) del de las células animales (ácido timonucleico). Sin embargo, esta dicotomía se mostró falsa: todos los núcleos poseen ácido desoxirribonucleico (DNA, antes conocido como ácido timonucleico) mientras que el llamado ácido zimonucleico correspondía al ácido ribonucleico (RNA), principalmente citoplásmico, que se aislaba tan abundantemente de los hongos. Feulgen (9), en 1914, demostró además que el inestable carbohidrato del DNA no era una hexosa sino una pentosa que, por hidrólisis, liberaba un aldehído. Este se podía detectar mediante un agente que reaccionaba con este tipo de sustancia: el colorante fucsina decolorado con ácido sulfuroso. Diez años más tarde, Feulgen y Rossenbeck (10) (1924) fueron gratamente sorprendidos al aplicar el colorante al germen de trigo y observar la tinción específica del núcleo de sus células. Esta técnica sigue empleándose en la actualidad tanto en microscopía óptica como en microspectrofotometría, para valorar el contenido de DNA de un núcleo concreto.

Fue Heitz (1931) (11) quien, aplicando la técnica de tinción de Feulgen a células de los meristemos de *Vicia faba* L., siguiendo la tradición de los citólogos clásicos, demostró la correlación de las posiciones de los nucleolos en el núcleo con la de ciertos cromosomas específicos. Heitz estableció que los nucleolos se originaban en lugares concretos de cromosomas determinados que microscópicamente se presentaban como constricciones secundarias en las que el DNA

compacto, característico de los cromosomas metafásicos no parecía estar presente. El llamó a estas regiones zonas SAT (*sine acido thymonucleinico*). Las regiones SAT venían a delimitar, por su situación en el cromosoma, una zona relativamente pequeña del mismo, existente en uno de sus extremos a la que se denominó “satélite” del cromosoma. En otras palabras, los cromosomas “satelizados” poseían una región (SAT) en la que en los estadios tempranos de la interfase se organizaban los nucleolos, próxima al pequeño segmento terminal del cromosoma o satélite. Heitz, en 1929 (12), estudió los cromocentros en las células de las plantas, a los que llamó “regiones heterocromáticas”, demostrando igualmente que se hallaban relacionadas con regiones específicas de determinados cromosomas.

McClintock (1934) (13), que estudiaba en la década de los años 30 la citogenética del maíz, analizó de qué manera se recomponían los cromosomas después de ser tratados con rayos X. En el momento crucial de su trabajo observa que el nucleolo se encuentra siempre organizado en una región específica del cromosoma 6. Esta zona a la que denominó NOR (*nucleolar organizing region*) era heterocromática y, si mediante rayos X era fracturada, los posteriores reagrupamientos de sus porciones seguían poseyendo capacidad de reorganizar nucleolos, de acuerdo a sus respectivas longitudes. Esto último evidencia que el NOR está compuesto por regiones repetidas y la separación experimental de ellas permite dilucidar que están formadas por múltiples genes nucleolares.

Mc Clintock (1934) que relaciona sus hallazgos con los de Heitz señala que la región SAT de Heitz era el lugar residual en donde se forma el nucleolo y a su vez indica, en relación a los experimentos de Navashin (14) (1932), que el tamaño de la constricción podía estar relacionado tanto con el volumen nucleolar como con la contracción cromosómica.

Estudios de Caspersson (15) sobre el nucleolo lo relacionaron con la síntesis de proteínas (1940). Por otra parte, el papel del nucleolo en la síntesis del RNA ribosomal fue concluyentemente demostrado por Brown y Gurdon (1966) (16) en mutantes de *Xenopus laevis*. La hibridación de DNA-RNA ha mostrado la multiplicidad de genes que codifican el RNA ribosomal (Ingle y Sinclair, 1972) (17), otra manera de señalar lo ya indicado por McClintock e, igualmente, que estos genes se encontraban en el NOR (Birnstiel et al., 1966) (18) y finalmente se estableció

inequívocamente que el lugar cromosómico (NOR) posee los genes que codifican los RNA 18S, 5,8S y 28S que se encuentran en los ribosomas (Birnstiel et al., 1971) (19).

Simultáneamente a estos hallazgos, la inhibición específica de síntesis de macromoléculas ha servido para dilucidar la estructura y función nucleolar. De esta manera, Reynolds et al. (1964) (20) y Schoebl (1964) (21) observaron en los nucleolos de los hepatocitos una redistribución de sus componentes estructurales al ser tratados con actinomicina. Bernhard et al. (1965) (22) denominaron a este fenómeno “segregación nucleolar”, la cual es originada por una serie de inhibidores (Stockert et al., 1970) (23) y se la considera como una característica propia del nucleolo inactivo en transcripción. En 1970, Giménez-Martín y Stockert (24) demuestran que la segregación nucleolar era también un fenómeno natural, similar al inducido por drogas y caracterizado por la separación de las regiones fibrilar y granular del nucleolo, encontrándose aquélla siempre alrededor de la *pars chromosomica* (NOR). Si la revisión escrita por Montgomery (25) en 1898 marca un límite al conocimiento sobre el nucleolo hasta entonces, las comunicaciones en el Simposio Internacional sobre el Nucleolo, realizado en Montevideo en 1966, muestran todos los conocimientos existentes sobre el nucleolo hasta ese momento. Posteriormente los libros editados por Busch y Smetana (1970) (26), Jordan y Cullis (1982) (27), Hadjiolov (1985) (28), así como las revisiones de Hay (1968) (29), Bernhard y Granboulan (1968) (30), Lafontaine y Lord (1968) (31), Lafontaine (1974) (32), Giménez-Martín et al. (1977) (33), Goessens (1984) (34), Benavente y Scheer (1990) (35) señalan los conocimientos que se han ido alcanzando hasta esta década.

### **El ciclo celular**

Para llegar a conocer qué es lo que sucede en el nucleolo durante la proliferación celular es preciso delimitar la trayectoria de las investigaciones llevadas a cabo sobre el ciclo. El ciclo celular es el espacio existente entre dos divisiones celulares sucesivas. De hecho, es la programación de la vida de una célula desde que se forma hasta que ella origina sus dos descendientes, con todas las características morfológicas y fisiológicas de la misma. En otro orden de cosas es el sistema que tiene la

célula de formar nuevas unidades fundamentales del organismo vivo, sustituir a las fenecidas y mantener permanentemente la capacidad orgánica de cada ser. En otras palabras, el aforismo *omnis cellula e cellula* de Virchow.

Ya se sabía desde finales del pasado siglo el proceso que ocurre en la célula al dividirse. Es decir, las fases que se suceden durante el espacio en que un núcleo se dividía en dos ya tenían nombre, así como el conjunto del proceso: mitosis o cariocinesis. Pero ¿qué sucedía en los núcleos formados entre el final de una mitosis hasta el comienzo de su propia división? Flemming, como ya indicábamos lo llamó *Ruhekern*, núcleo en reposo, actualmente denominado interfase celular. Fueron Howard y Pelc (1951, 1953) (36, 37) empleando  $^{32}\text{P}$  los que demostraron que su incorporación al núcleo celular no se realizaba durante todo el periodo interfásico, sino en un espacio específico del mismo entre un periodo postmitótico y otro premitótico en los que el núcleo no captaba el isótopo. Estos autores denominaron al periodo de incorporación del isótopo al núcleo celular con la sigla S, de síntesis, y a los otros dos con G<sub>1</sub> al postmitótico y G<sub>2</sub> al premitótico. Para algún autor este hallazgo en el que la interfase se divide en G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> más la división nuclear (mitosis) marca el nacimiento de los estudios sobre el ciclo celular proliferativo.

Ya teníamos el ciclo celular con relación al núcleo pero faltaba conocer cómo se dividía el citoplasma a través del proceso de citocinesis. Los hallazgos tardaron 13 años más, hasta que fue publicado en 1963 por Whaley y Mollenhauer (38) y Frey-Wyssling et al. (1964) (39) expusieron cómo sucedía el proceso citocinético en células vegetales y cuatro años después Risueño et al. (1968) (40) detallaron las distintas fases del mismo, López Saez et al. 1966 (41).

El primer problema planteado estribó en el hallazgo de métodos para averiguar cuál era la duración del ciclo y sus diferentes etapas. Sería prolijo el detallar los distintos intentos de elaborar metodologías con esa finalidad. Nos centraremos en puntos básicos de ellas: la sincronía natural, la sincronización artificial, etc.

En los tejidos de reposición, como pueden ser ante todo los epitelios en los organismos animales y las regiones meristemáticas en las plantas, las células se encuentran en plena proliferación, no presentando otra alternativa que la de duplicar su contenido y la de dividirse;

duplicación del conjunto de la masa celular y duplicación del número de células constituyen el eje fundamental, en estos casos, de la actividad celular, dando lugar a un ciclo que sigue la pauta duplicación → reparto → duplicación → reparto →... y la célula puede salir de esta situación especialmente hacia la diferenciación.

El ciclo mitótico posee dos amplios periodos: la interfase y la división. Lógicamente un sistema excelente para el estudio cuantitativo del ciclo es aquel que emplease un material caracterizado por el hecho de que sus células se encontrasen en completa sincronía. En este sentido se emplearon, en un principio, las primeras divisiones celulares de los embriones, observando que los núcleos de las mórulas y blástulas iniciaban y finalizaban sus divisiones sincrónicamente. No en todos los embriones el número de ciclos en que las células se desarrollaban sincrónicas era el mismo. Así, en los anfibios, solían ser de unos 15 ciclos; en el embrión del *Anfioxus* la sincronía es de 3 ciclos; en *Paracentrotus lividus*, 6 ciclos, etc. Este tipo de ciclos de división posee una característica especial, la secuencia duplicación → reparto viene modificada con respecto a los ciclos celulares más generalizados en razón al hecho que el material incluido “en duplicación” se halla previamente sintetizado ya en la etapa del cigoto. Por ello, los periodos G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se encuentran extremadamente restringidos, cuando no inexistentes.

Sin embargo, como material idóneo y característica de los llamados sincrónicos naturales, se encuentra el mixomiceto *Physarum polycephalum* cuyo soma consiste en un microplasmodio que contiene de 2 a 100 núcleos diploides que pueden confluir con otros microplasmodios y constituir un macroplasmodio conteniendo millones de núcleos. Sachsenmaier (1964, 1966) (42, 43) y otros autores han utilizado este material para averiguar la duración tanto del ciclo nuclear como de los diferentes periodos del mismo.

La carencia, en sentido amplio, de material sincrónico natural ha obligado a los científicos a procurárselo mediante diferentes tratamientos experimentales. Así, la sincronía de los ciclos se consigue en *Euglena gracilis* mediante cultivo sometido a periodos de iluminación de 14 horas, seguidos de 10 horas de oscuridad; al comenzar la oscuridad se inician las mitosis y en la siguiente fase de iluminación se realiza todo el proceso de biosíntesis, alcanzando el doble de su masa de una manera lineal para

realizar su nueva división en el siguiente periodo de oscuridad (Cook, 1966) (44).

Un sistema similar permite la sincronización en otros tipos como *Chlorella vulgaris*, lo cual facilita tanto la medida de la duración del ciclo, de sus fases y de los estudios bioquímicos que se llevan a término en el periodo S (Lafeber y Steenbergen, 1967) (45).

Scherbaum y Zeuthen (1954) (46) establecieron una metodología similar a los tratamientos luz/oscuridad, pero siguiendo un esquema diferente. Estos autores emplearon una cualidad especial del ciliado *Tetrahymena pyriformis*: su gran sensibilidad a los cambios de temperatura, conocida desde 1928. De esta manera, Scherbaum y Zeuthen, cultivando los ciliados durante 30 minutos a 33,5° C y 30 minutos a 29,5° C durante periodos de ocho horas consiguieron una excelente sincronización de los cuatro ciclos posteriores al cese del tratamiento.

En los años 60 se realizaron experimentos con la intención, igualmente, de sincronizar las células en ciclo. A este respecto, sólo citaré dos efectos puntuales. A diferencia de las metodologías anteriores que pueden consignarse como de efectos generales sobre el ciclo, aquellos otros que se refieren a la acción de drogas pueden considerarse como de acción puntual. Vamos a resumir la actividad de dos drogas, una que actúa en la frontera entre el G<sub>1</sub> y S y la otra en la zona entre el S y el G<sub>2</sub>. La primera es la hidroxiaurea (Navarrete et al., 1979) (47) y la segunda, el 5-aminouracilo (Prensky y Smith, 1965; Wagenaar, 1966) (48, 49). El sistema empleado de sincronización es el mismo: las células del tejido proliferativo desarrollan su ciclo hasta el punto del mismo en que actúa la droga y allí se van concentrando a medida que lo van alcanzando. Las células, por tanto, encuentran bloqueada su progresión a través del ciclo y se van acumulando en cualquiera de dichas regiones. Si el tiempo de tratamiento por la droga es el de la duración de un ciclo, el número de células en proliferación detenidas puede llegar a alcanzar al 70-80% de la población celular proliferativa. Si en ese momento se libera de la droga al tejido, las células al cabo de un tiempo de recuperación reinician simultáneamente el ciclo que había sido bloqueado.

En 1959 y gran parte de la década de los 60, se aportaron nuevos métodos que podemos señalar como característicos de un sistema de

marcado celular. El primero tomó como base el hecho que sólo las células que se encontraban en el periodo S del ciclo y se les aportaba timidina tritiada eran capaces de incorporar el nucleósido marcado y de esta manera, mediante autorradiografía, poder detectar el isótopo y ser seguidas hasta que entraban en la primera mitosis después del marcado y alcanzaban, posteriormente, la segunda mitosis. La duración del ciclo se medía por la distancia entre los máximos de dos mitosis sucesivas marcadas (Quastler y Sherman, 1959) (50). Otro tipo de marcado, a principio de los años 60, fue elaborado por Van't Hoff y Sparrow (1963) (51), Vant' Of. (1965) (52) y Van't Of. y Ying (1964) (53) consistente en un tratamiento con colchicina de los meristemas de *Pisum sativum*, logrando con ello dos efectos: Detenimiento de las células que cursan el ciclo en metafase y, con ello, una parcial sincronización de las mismas y conversión de esa población de diploide a tetraploide, alcanzando así un marcado por su ploidía.

Veamos ahora el método ideado por el grupo del Instituto de Biología Celular del CSIC de Madrid:

1º En 1965, Giménez-Martín et al. (54) Publicaron en el *Journal of Cell Biology* un trabajo titulado “*One new method of labelling cells*” y con él se abrió un futuro que se ha extendido hasta la actualidad, consistente en el bloqueo específico del proceso citocinético sin alterar la velocidad del ciclo, originando células binucleadas; el carácter binucleado es la condición de marcado de estas células.

2º El marcado binucleado tiene estas características: a) se conoce en qué instante del ciclo se realiza este marcado; b) se distingue el carácter binucleado del mononucleado del resto de la población celular; c) la población meristemática se demostró constante y a su vez proporcionalmente constantes sus índices mitóticos y de fases; d) el flujo celular ...0...% de células que pasan por cada punto del ciclo por unidad de tiempo es constante e inversamente proporcional a la longitud del ciclo.

Una vez obtenido el marcado fue aplicado al estudio de la duración del ciclo. A diferencia del tratamiento con colchicina, las células que transcurren por la zona del ciclo en que actúa la cafeína prosiguen el mismo de tal manera que el único efecto de la cafeína es el inhibir la citocinesis pero sin alterar el desarrollo del ciclo cromosómico. El número

de células que quedan marcadas como binucleadas es proporcional a la velocidad del ciclo y éste es un parámetro que nos puede dar la duración del mismo. Llamando flujo celular ( $\Phi$ ) a la cantidad de células % que pasan por cada punto del ciclo en una unidad de tiempo, lo podemos relacionar con la duración del mismo (T):

$$\Phi = 100/T$$

Es decir, el flujo celular es tanto mayor cuanto menor es la duración del ciclo. Siguiendo esta fórmula, De la Torre et al. (1971) (55) elaboraron otro método para averiguar la duración del ciclo celular mediante tratamiento de la población meristemática con timidina tritiada durante 10 min, y, transcurrida una hora, valorar la frecuencia de células marcadas en la población durante otro diez minutos analizando otra muestra. La diferencia en células marcadas entre esta segunda muestra y la primera corresponde a la frecuencia celular que inició replicación durante la hora transcurrida. Las células que inicialmente se marcaron por hallarse en el período de replicación y continúan todavía en él una hora después son marcadas por una segunda vez; aquéllas que se marcaron la primera vez pero pasaron a G<sub>2</sub> durante la hora transcurrida sólo tendrán la marca del primer tratamiento con timidina tritiada; y las que iniciaron su replicación son las marcadas una única vez por el segundo tratamiento. Es decir, la diferencia entre la frecuencia de marcado en % es el flujo celular.

Sin embargo, la primera aplicación del método del marcado de binucleadas se realizó para estudiar cual era el tiempo que una población celular binucleada necesitaba para entrar en división por primera y segunda vez, considerando este tiempo como el de la duración del ciclo (Giménez-Martín et al., 1965) (54). Posteriormente se analizaron las diferencias ente longitudes de los ciclos a diferentes temperaturas, comprobándose la permanencia de los índices mitóticos y de fases en cada una de ellas, aunque las duraciones de los ciclos variaban al modificar la temperatura, obteniéndose la valiosa conclusión que la proporcionalidad de las duraciones de cada una de las fases era constante sea cual fuere la duración del ciclo (López-Sáez et al., 1966) (56). Cinco años después se analizó la proporcionalidad entre G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> interfásicos a diferentes temperaturas, comprobándose igualmente su mantenimiento (González-Fernández et al., 1971) (57), hecho ya desmotrado en *Tetrahymena pyriformis* (Mackenzie et al., 1966) (58).

### Ciclo celular y ciclo nucleolar

El estudio de los meristemas creciendo bajo condiciones de equilibrio dinámico llega a establecer el número relativo de células en cada uno de los compartimientos del ciclo. A través de estos datos es posible conocer la duración absoluta de sus diferentes fases. Como ya hemos dicho, la aparición y desaparición del nucleolo en diversos estadios del ciclo celular sugiere la existencia de un ciclo nucleolar. El análisis de los meristemas mediante impregnación argéntica permite detectar cuatro tipos diferentes de células con relación al nucleolo (Giménez-Martín et al., 1971) (59): a) Aquellas células meristemáticas que presentan nucleolos maduros y que corresponden al 84,1% del total; b) aquéllas con nucleolo en proceso de reorganización (nucleologénesis) que representan el 7,4%; c) aquéllas cuyo nucleolo se encuentra en desorganización, con el 4,7% y d) finalmente, aquéllas en las que no se observa ninguna formación nucleolar visible, con el 3,8% del total de las células meristemáticas.

Una observación cuantitativa de las relaciones entre las fases de los ciclos cromosómico y nucleolar ha hecho posible determinar que la desorganización nucleolar ocupa sólo una porción de la profase y que la nucleologénesis tiene lugar durante la telofase y la interfase temprana.

TABLA 1  
*Frecuencia o duración relativa de las diferentes fases de los ciclos cromosómico y nucleolar*

Ciclo cromosómico	%	Ciclo nucleolar	%
Profase	6,1	Desorganización	4,7
Metafase	1,7		
Anafase	1,2	No visible	3,8
Telofase	3,9	Nucleologénesis	7,4
Interfase	87,1	Nucleolo organizado	84,1

Las fases de los ciclos nucleolar y cromosómico ocupan segmentos del ciclo que son proporcionales a las frecuencias señaladas en la tabla.

### **Variaciones en el ciclo nucleolar**

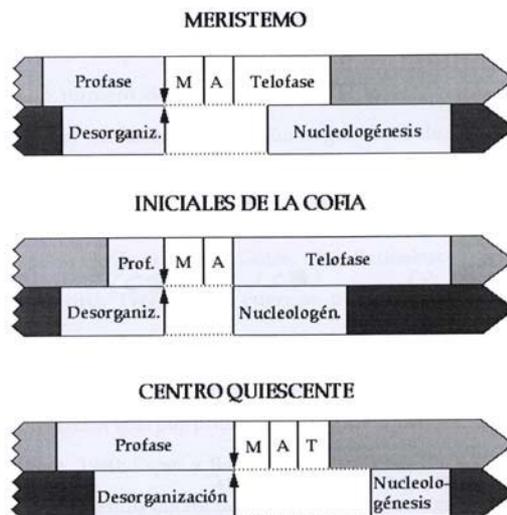
La duración de las fases de los ciclos celular y nucleolar difieren en cuatro regiones del meristemo de *Zea mays* L. Así, en las células iniciales de la cofia se presenta un ciclo de 8,2 horas, mientras en el centro quiescente posee una longitud de 81,2 horas. Dos regiones de la estela, representando la porción más abundante del meristemo, tienen ciclos de 16,4 horas (De la Torre y Clowes, 1972) (60).

Es posible relacionar las fases de los ciclos cromosómicos y nucleolar en el meristemo teniendo en cuenta que el final de la desorganización nucleolar coincide precisamente con la rotura de la envoltura nuclear y el fin de la profase. Tanto en las regiones de la estela del maíz, como en los meristemos de *Allium cepa* L. la nucleologénesis ocupa la última porción de la telofase y parte del temprano G<sub>1</sub>. Ésto coincide igualmente con observaciones en *Vicia* (De la Torre et al., 1975) (61).

Sin embargo, la nucleologénesis en el centro quiescente se realiza en el G<sub>1</sub>, algún tiempo después de finalizada la telofase, mientras en las células iniciales de la cofia se lleva a cabo durante la telofase temprana. Estas observaciones demuestran que el ciclo nucleolar no se relaciona estrictamente con las diferentes fases del ciclo cromosómico.

El avance de la nucleologénesis a la telofase temprana en las células iniciales de la cofia, es interesante en sí mismo porque estas células carecen de G<sub>1</sub> y la replicación se inicia durante la última parte de la telofase (Clowes, 1968) (62).

**Figura 1.-** El diagrama muestra el acople de las distintas fases de los ciclos cromosómico y nucleolar en tres zonas diferentes de la raíz de *Zea mays* L. formadas por células proliferando con cinéticas bien distintas. Así, mientras el ciclo celular dura un promedio de 16 horas en las regiones propiamente meristemáticas del parénquima del ápice, lo es de sólo unas 12 horas en la zona de iniciales de la cofia y alcanza las 280 horas en el centro quiescente. Obsérvese que la nucleogénesis ocurre entre telofase e interfase en el meristemo, mientras que se anticipa a la temprana telofase en las iniciales de la cofia y, en las células del centro quiescente, sucede ya en la interfase temprana. (Giménez Martín et al., 1977) (63)



### Nucleogénesis

La nucleogénesis implica la reorganización de los nucleolos en las células originadas tras una mitosis. Viene caracterizada por la aparición de los llamados cuerpos prenucleolares, masas preferentemente fibrilares, entre 0,1 y 0,2  $\mu\text{m}$  que van apareciendo bordeando la cromatina cromosómica. A medida que progresa la telofase los cuerpos prenucleolares van disminuyendo en número, aumentando en volumen por fusión y paralelamente van creciendo los nuevos nucleolos.

La aparición de los cuerpos prenucleolares durante la telofase de la mitosis ha sido objeto de un amplio número de investigaciones. Muchos autores han reportado la existencia en las células telofásicas de distintos organismos de unos materiales que se teñían diferencialmente del resto de los cromosomas, los cuales fueron considerados precursores del nucleolo y por eso denominados “cuerpos prenucleolares” (Doutreligne, 1933; Mc Clintock, 1934; De Zeeuw, 1936; Gates, 1942; Tandler, 1959; Lafontaine y Lord, 1966) (63, 64, 66, 67, 68). Los cuerpos prenucleolares fueron igualmente observados bajo el microscopio electrónico (Lafontaine, 1958; Lafontaine y Chouinard, 1963; Stevens, 1965) (69, 70, 71) y, por otra parte, fue conocido que aquellas células que carecen de NORs solamente presentan cuerpos prenucleolares (McClintock, 1934; Beerman, 1960; Fischberg and Wallace, 1960; Esper y Barr, 1964) (72, 73, 74). Das (1962, 1963) (75, 76) y Das y Alfert (1963) (77) estudiaron células conteniendo micronúcleos derivados de fragmentos obtenidos por la acción de rayos X y observaron que en telofase tanto los cromosomas como los fragmentos daban reacción positiva a la impregnación argéntica, aunque durante la interfase siguiente al tratamiento, algunos pocos fragmentos podían organizar nucleolo.

En 1985, el grupo del Prof. Harris Bush (Robert Ochs, Michael Lischwe, Eva Shen y Robert E. Carroll) publican en *Chromosoma* un trabajo titulado *Nucleologensis: composition and fate of prenuclear bodies*, en el que establecen para las células animales las características de proceso nucleológico, el cual se muestra similar en todos los aspectos a los descritos con anterioridad en células vegetales, igualmente que en estas células puede bloquearse la nucleogénesis mediante acción de drogas inhibitoras de la RNA polimerasa I.

Por otra parte, la aparición de los cuerpos prenucleolares es aparentemente normal aunque la reorganización nucleolar se encuentra inhibida. Estos cuerpos prenucleolares no son el producto de transcripción simultánea con su aparición en telofase y no muestran incorporación de precursores radioactivos de RNA (Morcillo y de la Torre, 1980) (78). Si esto es así ¿de dónde provienen los cuerpos prenucleolares? Cuando las células desarrollan la mitosis a partir de la profase-metafase el conjunto de las células muestran un marcado silencio génico. Contrariamente a lo que se sostenía a nivel de profase hay tanto biosíntesis de proteínas como

transcripción nucleolar que cesan al comienzo de la rotura de la envoltura nuclear para volver a reiniciarse en la telofase temprana (García-Herdugo et al., 1974; Morcillo et al., 1976; Giménez-Martín et al., 1977) (79, 80, 81).

Otra cuestión relacionada con los cuerpos prenucleolares durante la nucleogénesis es la existencia de un flujo de estas formaciones desde las regiones más lejanas de los núcleos a aquellas cercanas a los NORs. Este gradiente de densidad de los cuerpos prenucleolares se muestra más evidente en los núcleos poliploides, alargados, inducidos por colchicina (Stockert et al., 1977). El NOR es el lugar donde confluyen los cuerpos prenucleolares y es el sitio donde se efectúa más tempranamente la transcripción en el ciclo celular (Morcillo et al., 1976) (80).

Es curioso el hecho que la segregación nucleolar caracterizada por la separación topográfica de las *pars granular* y *fibrilar* y que de un modo natural se observa en paquitene de los meiocitos de insectos y que corresponde a un estadio carente de transcripción, lo cual fue postulado se debía a un colapsamiento de la *pars chromosomica* y, consecuentemente, la *pars fibrilar* que rodea siempre al NOR se concentra alrededor de éste, mientras la *pars granular* se sitúa en la periferia, volvía a observarse de una manera similar en los cuerpos prenucleolares que carecen de rDNA, tanto en células telofásicas vegetales (Giménez-Abián et al., 1985) (81) y animales (Ochs et al., 1985) (82); por tanto la segregación no era consecuencia del rDNA sino motivada por otro origen aún no conocido.

En la década de los 70 y primeros años 80 se establecieron las bases del proceso de nucleogénesis. En la reorganización nucleolar confluían básicamente dos tipos de formaciones: los NORs y los cuerpos prenucleolares y un factor fisiológico: la reiniciación de la transcripción después de un periodo de silencio génico. a) los NORs son regiones de los cromosomas y como su nombre indica, capacitadas para organizar los nucleolos y por tanto poseen el componente genético (rDNA) implicado en la biosíntesis de la maquinaria para transcribir diversos componentes del rRNA, que a su vez se encuentran relacionadas con el procesamiento ribosómico; b) los cuerpos prenucleolares se mostraron como formaciones cuyo contenido provenía de componentes del nucleolo de la interfase anterior que en su desorganización emigraban a las superficies cromosómicas y era transportados por los propios cromosomas y que, en

la telofase, emergían de la superficie de los mismos y paulatinamente emigraban por el nucleoplasma a los NORs donde se unían para reorganizar el nuevo nucleolo. Durante los años 80 y actualmente parte de los estudios han seguido la pauta de analizar los componentes estructurales y moleculares del nucleolo, así como la manera en que ellos desarrollan su actividad biológica y especialmente la biosíntesis del RNA ribosomal.

Por otra parte, otros estudios se han encaminado a conocer qué es lo que sucede con los componentes nucleolares en el espacio que media entre el final de la profase, en que desaparece como entidad visible el nucleolo, y la telofase, hasta entrado el periodo G<sub>1</sub> temprano, en que los nucleolos se encuentran plenamente reorganizados (Goessens et al, 1987; Scheer et al., 1993; Hernández-Verdún et al., 1988) (83, 84, 85). En general se sabe que existen proteínas nucleolares que permanecen como remanentes asociadas al NOR (Robert-Fortel et al., 1993; Roussel et al., 1993, Scheer y Weissenbergen, 1994) (86, 87) ; otras que se solubilizan en el citoplasma (Schmidt-Zachmann et al., 1984) (88) y finalmente otras proteínas que se dispersan por la periferia de todos los cromosomas sirviendo éstos de vehículo de transporte a través de la anafase hacia los núcleos del final de una mitosis (Gautier et al., 1994) (89) .

En telofase podemos consignar, con relación al nucleolo, dos entidades presentes: el NOR que contiene los genes repetitivos de rDNA junto con la RNA polimerasa I (Scheer y Rose, 1984) (90) y moléculas de topoisomerasa I (Guldner et al., 1986) (91) y los cuerpos prenucleolares conteniendo proteínas nucleolares (Gas et al., 1985; Giménez-García et al., 1989; Schmidt-Zachmann et al., 1987) (92, 94, 88). La asociación de estas dos entidades separadas ocurre sólo si la actividad transcripcional de los genes rDNA se ha iniciado (Stockert et al., 1970; Giménez-Martín et al., 1972, 1974; De la Torre y Giménez-Martín, 1982; Benavente et al., 1987) (95, 96, 97). A través de la localización topológica de varios antígenos en los cuerpos prenucleolares, se han identificado por inmunocitoquímica componentes nucleolares de pequeño RNA (snoRNAs), asociados a ellos, en particular el U3 snoRNA que juega un papel en el procesamiento del pre-rRNA (revisión de Warner, 1990; Hertwig et al., 1990) (93). Azum-Gélade et al., (1994) (98) mediante hibridación *in situ* e inmunocitoquímica han demostrado claramente que

tanto U3 snoRNA está en los cuerpos prenucleolares y sugieren pudiera participar en la reorganización nucleolar en asociación con diferentes proteínas como la nucleolina y la fibrilarina.

El NOR es el lugar donde confluyen los cuerpos prenucleolares y es el sitio donde se efectúa más tempranamente la transcripción en el ciclo celular (Morcillo et al., 1976) (80).

Por tanto, está plenamente establecido que la reorganización nucleolar en telofase comienza con la aparición de los cuerpos prenucleolares que se van paulatinamente agregando a los NORs hasta originar el nucleolo maduro (De la Torre y Giménez-Martín, 1982).

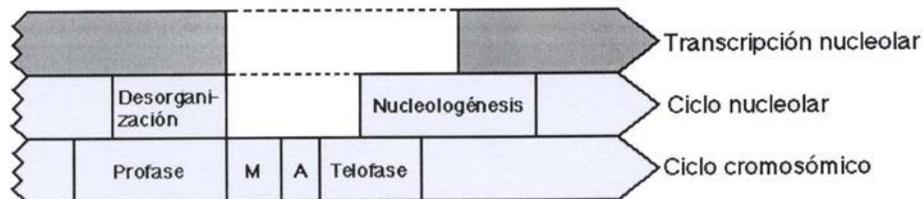


Figura 2.- Acople del ciclo de transcripción nucleolar a los ciclos cromosómico y nucleolar. La transcripción nucleolar se reinicia de nuevo mediada la nucleogénesis.

El análisis de los cuerpos prenucleolares muestra que poseen fibrilarina y otros tipos de proteínas nucleolares tales como la NO38-B23 y nucleolina, pero carecen de la RNA polimerasa I y de la topoisomerasa I, así como de rDNA. Para demostrar que el ensamblaje de los cuerpos prenucleolares en el NOR requería la transcripción del rDNA, Benavente et al (1987) (97) inyectaron anticuerpos contra la RNA polimerasa I y observaron la inhibición del proceso de nucleogénesis. Estas observaciones confirman que para la coalescencia de los cuerpos prenucleolares en el NOR y, por tanto, de realizarse la reorganización del nucleolo, se precisa la iniciación de la transcripción del rRNA (Morcillo et al., 1976). Con anterioridad, Stockert et al. (1970) y Giménez-Martín et al. (1972, 1974) (95, 96) empleando inhibidores de transcripción de la RNA polimerasa I como la cordicepina ya habían señalado la inhibición de la nucleogénesis mediante este tipo de droga.

### **Medida directa de la nucleogénesis**

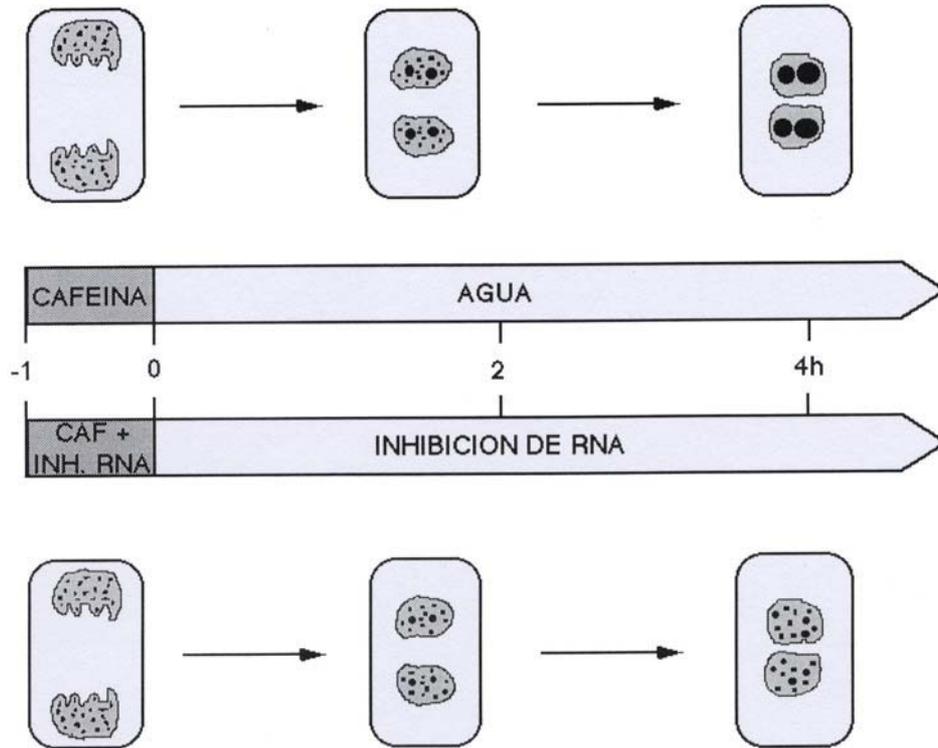
Habiéndose determinado con exactitud el momento en que es inhibido el proceso citocinético por cafeína y la amplitud del impacto de la droga sobre el ciclo, se tiene la zona de marcado de las células binucleadas por la acción de la cafeína. Se demostró que si la droga se aplica antes o después de esa región de bloqueo de la citocinesis no se produce su inhibición. Esta acción de la cafeína corresponde a un 1% de la duración del ciclo y se halla en la telofase tardía.

Tomando como referencia esa región podemos observar en qué momento antes, en o después de la acción de la cafeína aparecen los llamados cuerpos prenucleolares. Cuando una población meristemática es tratada con cafeína las células que transcurren por la región en que ésta actúa, repetimos, se convierten en células binucleadas. Si en tiempos anteriores a la acción de la cafeína se realiza la impregnación argéntica, se puede observar en las células binucleadas la existencia o no de cuerpos prenucleolares. Si estas células son seguidas en tiempos sucesivos se puede averiguar la tardanza de ellas en que sus núcleos posean nucleolos maduros. El tiempo que se tarda desde la aparición de los cuerpos prenucleolares hasta la observación de los nucleolos organizados, es el tiempo de duración del proceso de nucleogénesis.

El conocimiento de la duración de la nucleogénesis y de la zona en la que ésta ocurre en el ciclo celular fue el primer paso para poder efectuar su análisis.

Figura 3.- Diseño experimental usado para medir directamente la velocidad de nucleogénesis tanto en condiciones control (mitad superior) como en condiciones en las que se ha inhibido la síntesis de RNA (mitad inferior de la figura). La cafeína marca como binucleadas a las células que se encuentran realizando la citocinesis durante el tratamiento. La célula se encuentra en nucleogénesis mientras existan cuerpos prenucleolares en el núcleo. Sólo la binucleada esquematizada en la parte superior derecha de la figura representa una binucleada con los nucleolos ya maduros, plenamente organizados. La comparación de ambos esquemas señala que la nucleogénesis sólo se culmina cuando no se inhibe la reiniciación de síntesis de RNA.

Esquema experimental de utilización del marcado con cafeína de células sincrónicas y su seguimiento hasta la temprana interfase: a) células binucleadas sólo con cuerpos prenucleolares; b) con cuerpos prenucleolares y nucleolos incipientes; y c) con nucleolos maduros. La cinética de aparición de células con nucleolos ya maduros y sin cuerpos prenucleolares sirve de medida directa de la velocidad de nucleogénesis en condiciones control y viene señalada en horas en la barra inferior. Giménez Martín et al., 1977



El empleo ya de inhibidores de síntesis de RNA, ya de proteínas, mostró la necesidad del requerimiento de la primera, pero no de la segunda. Este estudio puso en evidencia que los cuerpos prenucleolares se formaban independientemente de la transcripción en los núcleos telofásicos. Esto es consistente con su aparición en ausencia de rDNA (Hay y Gurdon, 1967) (99). La dificultad en distinguir entre cuerpos prenucleolares fusionados y verdaderos nucleolos en células poseyendo un alto y variable número de NORs explica por qué algunos tipos celulares no son apropiados para estudiar y analizar en ellos la nucleogénesis. Esto es motivado porque los cuerpos prenucleolares pueden ensamblarse o coalescer entre ellos mismos, a pesar de ser inhibida la nucleogénesis (Morcillo y de la Torre, 1980) (100). Este ensamblaje de cuerpos prenucleolares entre sí, en ausencia de síntesis de RNA, puede explicar las observaciones realizadas en algunas células

animales (Phillips, 1972) (101) y vegetales (Semeshin et al., 1975) (102). Por otra parte, el desarrollo de la nucleogénesis durante la inhibición simultánea de síntesis de proteínas señala que las proteínas sintetizadas tempranamente en la telofase son las empleadas en el ensamblaje del nuevo nucleolo. Mientras la síntesis de RNA muestra que sólo aquella que se realiza en los estadios tempranos de la nucleogénesis, es necesaria para la reorganización del nucleolo y su inhibición posterior, desde una hora después del tratamiento de cafeína, no afecta a la reorganización y a la velocidad de nucleogénesis. Los requerimientos tempranos de síntesis de RNA son indicativos que la nucleogénesis es mayormente un proceso de ensamblaje en donde el nuevo RNA transcrito sirve como iniciador de la misma y que finaliza con el ensamblaje completo de los cuerpos prenucleolares.

Chouinard (1975) (103) describe que la gradual descondensación de la cromatina del NOR es el dato morfológico y funcional asociado con la nucleogénesis. Esta descondensación del NOR puede estar relacionada con la iniciación de la transcripción.

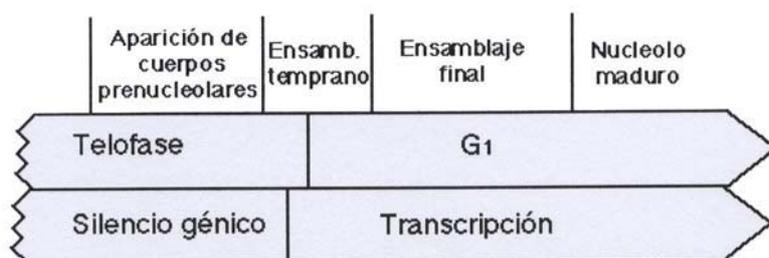
### **Modelo de nucleogénesis**

A la luz de todos estos resultados se pudo proponer un modelo de nucleogénesis (Morcillo y de la Torre, 1979 a; De la Torre y Giménez-Martín, 1982) en el que la aparición de los cuerpos prenucleolares, con cierto ensamblaje en los estadios iniciales, no depende de una reiniciación de la síntesis de rRNA. Existe algún ensamblaje de cuerpos prenucleolares al NOR no transcriptor por aparente relajación de su estructura. Sin embargo, el ensamblaje total de los cuerpos prenucleolares al NOR y con ello el desarrollo completo del nucleolo depende de una síntesis *de novo* de rRNA en el NOR. El modelo incluye el hecho que el nuevo nucleolo contiene moléculas de RNA que fueron sintetizadas en la interfase precedente y otras sintetizadas durante la telofase, en el momento de la reorganización nucleolar, como Lepoint y Goessens (1978) (104) demostraron mediante autorradiografía de alta resolución, en células tumorales de Erlich.

En relación al adelanto de la nucleogénesis ocasionada por la acción inhibidora de síntesis de proteínas (Giménez-Martín et al., 1974)

(96) se llevaron a término una serie de experimentos que demostraron que la sensibilidad de la nucleogénesis estaba localizada inmediatamente antes y durante la acción de la cafeína para originar células binucleadas. Este espacio es más temprano que el periodo sensible a la acción de los inhibidores de RNA. Una valoración del ciclo de descondensación de la cromatina muestra que los inhibidores de síntesis de proteínas aceleran esta descondensación (Morcillo y de la Torre, 1979 b) (105), probablemente anticipando la aparición de los cuerpos prenucleolares en los cromosomas, como Geuskens y Legros (1969) (106) sugieren sobre la accesibilidad de las RNA polimerasas funcionales.

Figura 4.- Modelo del desarrollo de la nucleogénesis. Los cuerpos prenucleolares aparecen después del primer tercio de la telofase, antes de la reiniciación de la transcripción e incluso puede observarse algún tipo de fusión espontánea entre ellos. El ensamblaje final de todos ellos en los NORs sólo se efectúa cuando se ha reiniciado la transcripción nucleolar. El ensamblaje de los cuerpos prenucleolares se realiza a través de los dos tercios finales de la telofase y una parte del G<sub>1</sub> temprano.



Todos estos hechos nos llevan a discernir sobre los controles que aparecen durante la regulación del ciclo nucleolar y han mostrado incontrovertiblemente que el proceso de ensamblaje para organizar el nuevo nucleolo depende de una síntesis de RNA *de novo*. La situación es tal que abre la posibilidad que el proceso morfogénico de la nucleogénesis pueda ser una prueba de la acción génica en la iniciación del conjunto del nuevo ciclo celular. La velocidad de la nucleogénesis se ha introducido como un ensayo fácil para estudiar la reactivación de los genes rDNA en la tardía mitosis (De la Torre et al., 1975) (107). Las células vegetales son un material idóneo para el estudio del nucleolo, dado el gran número de genes rDNA que posee su genoma, sus amplios

volúmenes nucleolares, el enclaustramiento de los genes rDNA en un lugar específico de un cromosoma determinado, etc. Por estas razones muchos de los hallazgos sobre el nucleolo se han descrito primeramente en células vegetales y los hallazgos sobre la nucleologénesis en células animales ha confirmado ampliamente los anteriores.

### **Funciones de regulación relacionadas con la progresión del ciclo celular**

Muchas funciones cruciales sobre el ciclo celular se encuentran reguladas por controles positivos y negativos. Cuando un proceso es regulado positivamente por una molécula, la falta de ella detiene en ese momento la progresión del ciclo. Por otra parte, cuando falla un control negativo, las células pueden avanzar en el ciclo, pero muy frecuentemente con un efecto letal para ellas, ya que de hecho no se encuentran preparadas para su progresión. Los genes relacionados con una regulación positiva del ciclo se les denomina **cdc** (*cell division cycle*), mientras que los que se encuentran relacionados con controles negativos para el avance del ciclo se les llama **chk** (*checkpoint*) (Hartwell y Weinert, 1989) (108) o genes de control de retroalimentación o *feedback* (Murray y Kirschner, 1989) (109). La nucleologénesis entre el límite de un ciclo y el siguiente se encuentra igualmente controlada positiva y negativamente.

Recientemente, la proteína nucleolar p130 que se encuentra en el componente fibrilar denso y se la considera como el disparador de la quinasa p34<sup>cdc2</sup>, en mitosis, se encuentra igualmente relacionada con la nucleologénesis (Pay et al., 1995) (110). Por otra parte, la nucleolina (la proteína argirófila más abundante, llamada también C23) y la p105 (ambas también concentradas en el componente fibrilar denso) y la numatrina (también llamada B23, ribocarina, NO38 y nucleofosmina), que se halla concentrada en el componente granular son sustratos de la quinasa p34<sup>cdc2</sup> (Peter et al., 1990) (111). Sin embargo, hay muchas más funciones relacionadas con el ciclo celular y algunas de ellas están unidas a genes de control negativo no relacionados con la quinasa p34<sup>cdc2</sup>.

### **Interrupción de la transcripción del NOR durante la mitosis**

La transcripción en las regiones NOR, tanto como otras muchas secuencias del DNA del genoma, no tiene lugar durante la metafase, la anafase y parte de la telofase, merced a controles negativos obvios. Estos controles son fisiológicos y se disparan espontáneamente en cada ciclo. La interrupción de la transcripción durante la mitosis se considera se debe al bloqueo de la elongación del RNA pre-ribosomal naciente (Weissenberger y Scheer, 1995) (112). Sin embargo, el mecanismo puede envolver un control de la iniciación de la síntesis de rDNA que responde al nivel de metilación (Mergudich et al., 1992) (113).

Proteínas relacionadas con la condensación cromosómica son los candidatos involucrados en la inducción del silencio génico en mitosis. Estas proteínas son de vida corta y se sintetizan en la misma mitosis (Morcillo y de la Torre, 1979) (100). Como se ha demostrado, la inhibición de la síntesis de proteínas, mediante anisomicina y cicloheximida, hace que la nucleologénesis se anticipe con relación a la citocinesis en aquellas células que fueron marcadas como binucleadas mediante un tratamiento corto con 5 mM cafeína (Giménez-Martín et al., 1974) (96).

Algunas de las proteínas sintetizadas en telofase que dificultan la reiniciación de la transcripción temprana del rDNA pueden ser proteínas que se unen al DNA, de tal manera que los núcleos de las células vegetales que poseen DNA hipometilado anticipan la nucleologénesis en relación a los núcleos con DNA nativo no sustituido. El DNA hipometilado impide la unión de proteínas de regulación negativa (Boyes y Bird, 1991; Ashapkin et al., 1995) (115, 116) y causa la expresión de genes del centeno que se encuentran bloqueados en el híbrido interespecífico de triticales (Neves et al., 1995) (117).

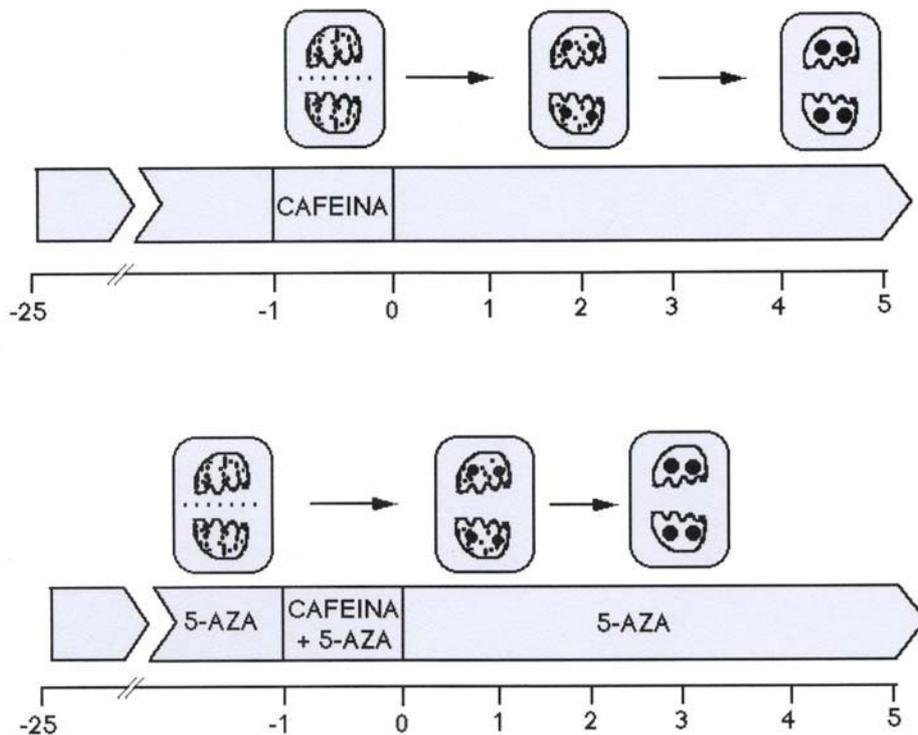
### **Dominancia nucleolar experimental**

En 1986 se iniciaron estudios (Cabello et al., 1986) (118) para delimitar la influencia de la incorporación de la 5-azacitidina sobre el proceso de nucleologénesis. Para ello se emplearon células sincrónicas marcadas como binucleadas por inhibición de la citocinesis mediante

cafeína 5 mM y el objeto era el conocer si la hipometilación influía o no sobre el desarrollo del proceso.

La inducción e hipometilación confirma la correlación negativa entre la transcripción y la metilación del rDNA, como fue demostrado en el trabajo primero por Jones y Taylor (1980), empleando 5-azacitidina. Esta sustancia es un análogo de la citidina y tiene un átomo de N<sub>2</sub> en posición 5, mostrándose como un falso sustrato de la DNA metiltransferasa, conduciendo con ello a la hipometilación del DNA (Parrow et al., 1989).

Figura 5.- Protocolo experimental utilizado para medir el efecto de la hipometilación en la velocidad de nucleogénesis, en relación a la velocidad en condiciones control. Las células recibieron 5-azacitidina durante un tiempo correspondiente a un 70% de la duración total del ciclo y el marcado con cafeína tuvo lugar también en presencia de 5-azacitidina. Los resultados indicaban un acortamiento del tiempo necesario para observar a la población que había terminado su proceso de nucleogénesis.



Cuando el análisis de la nucleogénesis se llevó a cabo se encontró que este proceso se hallaba adelantado dentro de la mitosis y siempre se realizaba a mayor velocidad en las células con DNA hipometilado que en las que poseían DNA nativo. Si en esta población la duración de la nucleogénesis era de 3 h 56 min, la hipometilada la efectuaba en 1h 40 min, siendo ésta 1.6 veces más rápida que la no tratada.

Como la nucleogénesis solamente se completa después de que la transcripción post-mitótica se ha reanudado, los datos arriba señalados sugieren que el tratamiento con 5-azacitidina puede intervenir en la velocidad de progresión de las células postmitóticas.

La nucleogénesis anticipada de un NOR es el primer paso que induce la represión permanente de otros NORs, de tal manera, que el NOR bloqueado se encuentra incapaz de iniciar la transcripción y con ella la nucleogénesis como se demuestra en células que poseen cromosomas asimétricos hipometilados (De la Torre et al., 1991) (119). Estos resultados sitúan inequívocamente en telofase el estadio en que es establecida la dominancia o recesividad del NOR y no inmediatamente después de su replicación (Matzke y Matzke, 1993) (120). El hecho que la dominancia nucleolar se establezca durante la telofase, para toda la vida de las células resultantes, presenta implicaciones importantes. En este estadio mitótico se reorganiza la matriz nuclear y con ello es el momento en que se ancla uno o los dos NORs en la misma, dando lugar al sitio donde se establece la maquinaria de la transcripción permanente de los NORs (Cook, 1989; García-Blanco et al., 1995) (121, 122). No se puede desechar el que los dominios generalmente extranucleolares que codifican para el RNA ribosomal 5S puedan servir también, si se mantienen descondensados en telofase, como parece ocurrir en células humanas (Kaplan y O'Connor, 1995) (123).

En este caso, la dominancia nucleolar no se ha establecido entre dos genomas de diferentes especies sino en un mismo genoma y por ello no se puede atribuir a que los diferentes promotores no sean reconocidos por la otra especie, al considerarles que podrían ser especie-específicos, ni aparentemente a un desequilibrio entre potenciadores de los promotores de los NORs sino exclusivamente al grado de hipometilación. Este último mecanismo de dominancia presenta unas características: el DNA metilado

se encuentra rodeado de proteínas nucleares que secundariamente dificultan la actuación de los factores de transcripción (Boyes y Bird, 1991). La hipometilación del DNA se consigue fácilmente por la incorporación de 5-azacitidina, lo cual tiene lugar durante el periodo S del ciclo. El resultado de los NORs de células humanas que han sido tratados con 5-azacitidina aumentan de forma importante su actividad transcripcional (Ferraro y Lavia, 1985) (124).

La valoración citológica de la dominancia de un NOR sobre otro puede originarse por: i) detectar en el NOR del cromosoma metafásico restos de proteínas tales como la nucleolina y otras que interactúan físicamente sólo con aquellos NORs que han sido activos en la interfase anterior (Hubble, 1985) (125), ii) por la eficacia que un NOR juega durante el proceso de nucleologénesis que tiene lugar entre la telofase y G<sub>1</sub> del ciclo celular (De la Torre et al. 1975; Cabello et al., 1986); iii) por el tamaño final del nucleolo (Martini y Flavell, 1985) (126).

La dominancia de un NOR sobre otro y su observación en interfase puede ser total o parcial. Será total cuando se observa un determinado nucleolo maduro en un NOR mientras el alelo carece de él; será parcial cuando frente al nucleolo normal el de su alelo presenta un tamaño reducido. Sin embargo, en este último caso, el tamaño reducido se puede deber no a un equilibrio fisiológico entre dominancia y recesividad sino a un desequilibrio estructural motivado por diferencia de tamaño en los respectivos NORs (Stockert et al., 1969; Giménez-Martín et al., 1977).

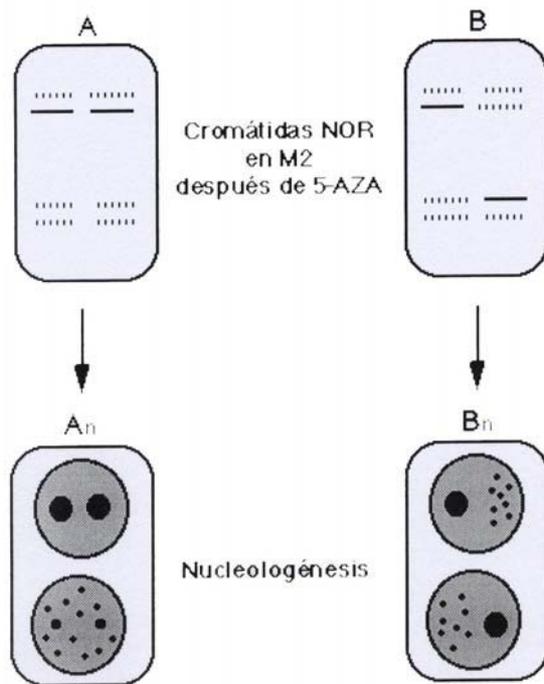
El método empleado para obtener cromosomas aza-sustituidos asimétricamente consistió en tratar durante un periodo S a las células con 5-azacitidina y cada cromátida estará monocatenariamente aza-sustituida. Esperando a la división siguiente de estas células que han transitado por el siguiente periodo S sin tratamiento de 5-azacitidina, de las dos cromátidas de cada cromosoma, una sola poseerá una cadena aza-sustituida y la otra cadena estará formada por DNA nativo, mientras su cromátida hermana tendrá ambas cadenas nativas. Si al llegar a telofase estas células son tratadas con 5 mM cafeína se inhibe la citocinesis y se obtienen los dos núcleos resultantes de dicho protocolo en el mismo citoplasma. Es decir, de las ocho cromátidas que poseen las células binucleadas, dos se encuentran asimétricamente aza-sustituidas. La emigración al azar en la anafase de las cromátidas puede originar que

ambas monosustituidas vayan a un polo, con lo que las otras dos irán al otro o, alternativamente, que una vaya a un polo y la otra al otro. Los resultados observados fueron los siguientes: cuando ocurre la co-emigración de los aza-NORs se puede observar un nuevo tipo de nucleogénesis asimétrica (An): Los aza-NORs del núcleo superior pueden desarrollar nucleogénesis completa, mientras los NORs nativos (núcleo inferior) no son funcionales o llevan retraso en su nucleogénesis con lo que no se ha finalizado la agregación de los cuerpos prenucleolares. En el caso en que la emigración de los aza-NORs a los polos anafásicos distintos se puede observar otro tipo (Bn) de asimetría, caracterizada por desarrollarse inversamente nucleolo en uno de los núcleos mientras en el opuesto sólo hay cuerpos prenucleolares o nucleolos incipientes (De la Torre et al., 1991) (119). Esto viene a ser demostrativo que a pesar de encontrarse los NORs en el mismo núcleo desarrollan su nucleogénesis de acuerdo a su estado fisiológico.

Estos experimentos apoyan la hipótesis que el NOR hipometilado es la causa y no la consecuencia del incremento del nivel de transcripción que sucede en los NORs aza-citidina.

En cada caso, la separación precoz de proteínas reguladoras negativas de secuencias relevantes hipometiladas de los espaciadores génicos del rDNA proporcionará a esos genes la capacidad de anclarse a

Figura 6.- Esquema en el que se muestra la distribución alternativa de los 2 NORs por núcleo en relación a la incorporación de 5-azacitidina en el periodo S del ciclo celular anterior a aquél cuya mitosis se está estudiando en las células binucleadas. En la primera situación (A) los dos cromosomas que poseen DNA nativo y los dos cromosomas con 5-azacitidina en una de las cadenas emigran a núcleos distintos. En la situación B, cada núcleo recibe un NOR con DNA nativo y otro con aza-DNA. De la Torre et al., 1991.



la matriz nuclear para formar los complejos de transcripción, para iniciarla y atraer el material disperso del nucleolo premitótico. Ello permitirá la formación de un nuevo nucleolo que permanecerá como centro de transcripción del rDNA y de la maduración del rRNA 45S por la totalidad de la vida celular. La determinación de un NOR para mantenerse a sí mismo dominante sobre otro puede incluso ser transmitida de ciclo en ciclo, ya que algunos de los componentes del complejo de transcripción, como la subunidad más grande de la RNA polimerasa I y el factor de transcripción (*upstream binding factor*) permanecen asociados a los NOR durante mitosis, al menos en células animales (Zatsepina et al., 1993 (127); Roussel y Hernández-Verdún, 1994; Weisenberger y Scheer, 1995).

De esta forma se detectó que hay factores de transcripción en cantidad limitante en el núcleo que forman complejos estables con el NOR e incluso pueden permanecer unidos al promotor a lo largo de sucesivas rondas de iniciación de la RNA polimerasa. Su unión al NOR determinará su dominancia sobre aquellos que van retrasados en la

separación de las proteínas reguladoras negativas que impiden la iniciación de la transcripción.

### **Dominancia interespecífica del NOR**

Los fenómenos epigenéticos son consecuencia de inactivación selectiva de transcripción que no resulta de cambios en la secuencia de DNA (Bestor et al., 1994; Holliday, 1994; Paszkowski y Mittelsen, 1998) (128, 129), 130). El primer ejemplo reconocido es el de la dominancia nucleolar. Navashin (1934), cruzando dos especies de *Crepis*, cada una con un par de cromosomas nucleolares observó que en las células del híbrido tan sólo se organizaba un nucleolo, relacionado con uno de los cromosomas de uno de los progenitores. Importante fue el hecho que el nucleolo reprimido podía, tras un retrocruzamiento, volver a manifestarse en el cromosoma correspondiente, en ausencia del otro cromosoma nucleolar de la otra especie, demostrando que el cromosoma organizador del nucleolo no había sido alterado o había perdido su capacidad de organizar nucleolo. Décadas más tarde está plenamente demostrado que las regiones organizadoras nucleolares son lugares donde centenares o miles de genes rDNA se encuentran linealmente ubicados, poseyendo miles de pares de bases de DNA (Wallace y Birnstiel, 1966; Pardee et al., 1970, Phillips et al., 1971) (131, 132, 133). La RNA polimerasa I transcribe estos genes y produce los primeros transcritos que son procesados en forma de 18S, 5.8S y 28S RNA, que forman los ejes de ambas subunidades del ribosoma (Reeder, 1992; Paule, 1994; Moss y Stefanovsky, 1995) (134, 135). Los nucleolos se organizan en los lugares del rDNA donde se sintetiza el rRNA. Por ello, Honjo y Reeder (1973) (136) interpretan al híbrido de Navashin como la manifestación citológica de incapacidad en la producción de rRNA de un juego de genes rDNA. En este sentido, Chen y Pikaard (1997) (137) definen la dominancia nucleolar como un fenómeno epigenético caracterizado por la formación de un nucleolo alrededor del rDNA de solamente un progenitor en un híbrido interespecífico o aloploiploide.

La dominancia nucleolar ocurre en híbridos interespecíficos y en aloploiploides de numerosos géneros (ver revisiones de Reeder, 1985; Pikaard y Chen, 1997) (138, 139). En los estadios tempranos del

desarrollo del híbrido *Xenopus laevis* x *Xenopus borealis* sólo se detecta el nucleolo de *X. laevis* mostrando, por tanto, dominancia su rDNA sobre el de *X. borealis* (Honjo y Reeder, 1973; Cassidy y Blackair, 1974) (136, 140, 141). Dedder y Roan (1984) (141) sugieren por sus resultados que los genes rDNA de *X. laevis* son transcripcionalmente dominantes a causa de un incremento del número de potenciadores en la región anterior al promotor del rDNA, en relación a *X. borealis* (Boseley et al, 1979; Busby y Reeder, 1983; Moss, 1983; Labhart y Reeder, 1984) (142, 143, 144, 145). El desequilibrio de los potenciadores fue propuesto como uno de los factores limitantes de la transcripción, haciendo incapaces de transcribir a promotores recesivos.

Otra de las hipótesis expuestas para explicar la dominancia nucleolar parte de la observación que los promotores de los genes ribosomales y los sistemas de transcripción de la RNA polimerasa I evolucionaron rápidamente (Reeder, 1974; Dover y Flavell, 1984; Gerbi, 1985; Flavell, 1986) (141, 146, 147, 148). Consecuentemente un promotor de las secuencias de rDNA de una especie puede no ser reconocido en otra especie a causa de la incompatibilidad de los factores de transcripción. La incapacidad de expresarse de un factor de transcripción especie-específico puede causar el fallo en la expresión de un juego de genes ribosomales. Esto podría explicar posiblemente la dominancia nucleolar en células híbridas hombre-ratón (Elicieri y Green, 1969; Miller et al., 1976; Onishi et al., 1984) (149, 150, 151).

La metilación es importante a causa de que actúa en la inactivación preferencial de genes cuando se encuentran presentes dos genomas diferentes, como son el caso de los alotetraploides y de los organismos transgénicos (Cedar, 1988; Flavell et al., 1988; Peterson y Sapienza, 1993) (152, 153, 154).

En los vegetales existen innumerables casos en que se ha demostrado esta dominancia de unos genes sobre otros como una inactivación de un grupo de ellos por la presencia de otros alelos. El caso señalado y ya expuesto que obtuvo Navashin fue sólo el comienzo lejano del hallazgo de un fenómeno cada vez más frecuentemente observado y que poco a poco empieza a ser explicado (Reeder, 1985) (141). Así en diversas combinaciones entre los genomas de trigo y centeno se observó la práctica inactivación total de los organizadores nucleolares del centeno

(Lacadena et al., 1983; Cermeño et al., 1984; Vieira et al., 1990) (155, 156). Esta inactivación se encuentra asociada a un alto nivel de metilación de la citidina dentro de las secuencias intergénicas del rDNA del centeno (Sardana, 1992; Neves et al., 1993).

En la F<sub>1</sub> del cruzamiento entre trigo x centeno y en los triticales, la incorporación de 5-azacitidina durante la germinación de la semilla reactiva los NORs del centeno (Viera et al., 1990; Neves et al., 1995) (157), causando modificaciones en los niveles de metilación del rDNA que son heredables en las siguientes generaciones (Heslop-Harrison, 1990). En resumen, como ha sido descrito por varios autores (Viera et al., 1990; Neves et al., 1995; Amado et al., 1997) la expresión de los NORs del genoma del centeno es dependiente de un estado de hipometilación cuyos efectos, por la acción de la 5-azacitidina, son heredados en la siguiente generación con una alta actividad de los NORs del centeno en contraste con la progenie control en la que no se detecta actividad en dichos NORs.

### **Represión natural intraespecífica de los NORs**

La represión del NOR es un mecanismo que opera durante todo el ciclo en las células meristemáticas de *Allium cepa* L. Era conocido que existen en la célula diploide como máximo cuatro nucleolos por núcleo, correlacionados con cuatro cromosomas con NOR (Sato, 1981; Cortés y Escalza, 1986; Richroh et al., 1992) (163, 164, 165). Seleccionando bulbos, en años distintos, en cuyas células radicales sólo aparecieran hasta un máximo de dos nucleolos, sorprendentemente se encontró, mediante fluorescencia después de hibridación *in situ* con rDNA procedente de trigo, en las células en las que la transcripción había sido interrumpida por acción de la 3'desoxiadenosina (Penman et al., 1970) (166), cinco NORs de tamaños diferentes. Dichos NORs estaban situados en dos pares de cromosomas de los 16 de la dotación diploide de *Allium cepa* L. (Panzer et al., 1996) (167). El par de cromosomas satelizados (par 6) presentaba los NORs más grandes, mientras que el otro par cromosómico que presentaba los NORs menores correspondía al par 8. El quinto NOR se observa en el telómero de uno de los dos cromosomas del par 6, pero no en el otro, en el que, caso de haberlo, su número menor de copias de

genes ribosomales lo podían hacer indetectable en nuestras condiciones de análisis. De hecho, en *Allium cepa* existen dos familias de genes ribosomales en relación a los espaciadores intergénicos (Maggini y Carmona, 1981) (169), lo cual puede relacionarse con esta inducción de dominancia natural.

Un testimonio para detectar la depleción intranuclear de algunos reguladores positivos que pudieran estar implicados en la dominancia del NOR en *Allium cepa* L consistió en la aplicación de una droga multipolarizante (carbetamida) durante la mitosis, de tal manera que se obtenían células multipolares (Giménez-Martín et al., 1992) (170) y con ello una distribución desequilibrada de las cromátidas hacia 3 ó 4 polos. Si estas anafases y telofases multipolares se trataban con cafeína se obtenían células multinucleadas con núcleos con diversas ploidía dentro de un citoplasma común. Las células así obtenidas eran tetraploides, es decir  $4n$ , como suma de las ploidías de todos los núcleos.

Estas células tetraploides, de acuerdo a lo indicado anteriormente, tendrían 10 NORs distribuidos en ocho cromosomas NOR. Fue interesante el hecho que estas células poseyeran más de cuatro nucleolos distribuidos en diferentes núcleos. Con ello, se demostraba que no era permanente la inactivación de aquellos NORs que se hallaban reprimidos en el ciclo celular diploide, de tal manera que ellos transcribían y formaban nucleolo después de aislarse, por medio de sus envolturas nucleares, de otros NORs existentes en otros núcleos dentro del mismo citoplasma.

En resumen, se encontraron tres puntos sobre la organización y regulación de los genes ribosomales de *Allium cepa*: a) como ya se ha indicado, se hallaron cinco NORs que se encontraban distribuidos en cuatro cromosomas del genoma diploide, con un claro polimorfismo entre los homólogos; b) sólo dos de los cinco rDNA (NORs) eran transcripcionalmente activos en telofase; y c) los NORs inactivos pueden ser reactivados por su separación de aquellos NORs dominantes, como ocurre en los diferentes núcleos de las células multinucleadas tetraploides.

Así como todos los núcleos que tienen capacidad para iniciar la replicación (por poseer las secuencias de DNA adecuados para responder al estímulo para replicar), la inician sincrónicamente dentro de un mismo citoplasma, aquellos que carecen de las secuencias para aceptar el

estímulo son incapaces de replicar. Este hecho de iniciar sincrónicamente su replicación permite inferir la existencia de un estímulo que se transmite vía citoplasma y que opera sobre todos ellos (Giménez-Martín et al., 1992; Panzera et al., 1996), pero sólo se ven afectados aquellos que al menos poseen un cromosoma con las secuencias de DNA que aceptan el estímulo.

El que los nucleolos se reorganicen en aquellos núcleos que poseen cromosomas con NORs manifiesta la capacidad de algunos de sus NORs para organizarlos. Sin embargo, parte de estos NORs podrán ser activos o no si se encuentran en un mismo núcleo conforme la presencia o no de otros NORs dominantes. En todos los casos, en los núcleos de una célula multinucleada el organizar nucleolos depende de su dotación cromosómica, independientemente del citoplasma común en que se encuentran.

El hecho de que la formación de un nucleolo sea indicador directo de la reactivación de la transcripción en el NOR y la simplicidad del ensayo de la medida de la tasa de nucleologénesis hace que esta prueba sea muy útil para discernir los factores implicados en el establecimiento de la dominancia génica en la célula. La regulación del rDNA que es transcrito por la RNA polimerasa I no tiene porqué ser esencialmente diferente de la regulación de otros genes repetitivos y no repetitivos que son transcritos por las RNA polimerasas III y II, respectivamente.

### **Conclusiones**

1. La nucleologénesis, o formación de un nucleolo en un NOR o reorganización nucleolar, depende de la transcripción del rDNA en la tardía mitosis, lo cual fue detallado primeramente en células meristemáticas de *Allium cepa* L. y comprobado posteriormente por diferentes autores y distintas metodologías en otros tipos celulares vegetales y animales.
2. El impedir cualquier transcripción prematura del rDNA en la telofase, al menos de células vegetales, es debido a la existencia de proteínas lábiles sintetizadas en la misma telofase, ya que el bloqueo de su síntesis adelanta la nucleologénesis en relación al ciclo cromosómico.

3. Los cuerpos prenucleolares son formaciones cuyo contenido proviene del nucleolo premitótico y son transportados por los cromosomas a través de anafase-telofase en donde vuelven a aparecer en la superficie de los mismos, salen al nucleoplasma y van coalesciendo en el NOR, constituyendo el origen del nuevo nucleolo. Este ensamblaje está promovido por la transcripción del rDNA. La ausencia del NOR, así como la acción de drogas anti-RNA polimerasa I inhiben la nucleogénesis pero no alteran la aparición de los cuerpos prenucleolares. Algunas de estas proteínas lábiles pueden ser proteínas de unión al DNA, ya que la hipometilación experimental del DNA también adelanta la nucleogénesis.
4. En células de *Allium cepa* L., hay dominancia nucleolar intraespecífica, ya que sólo se forman dos nucleolos por núcleo en las células meristemáticas de ciertas raíces, en los que la hibridación *in situ* demuestra la existencia de, al menos, cinco NORs de tamaños diferentes. Por lo tanto, tres de los cinco NORs no son activados tras la mitosis.
5. La distribución de los cromosomas portadores de NOR en diferentes núcleos (tras la utilización de un agente multipolarizante en anafase) permite la reactivación de algunos de los NORs reprimidos, que hasta entonces eran incapaces de organizar nucleolo. Para ello es preciso que tales NORs se encuentren en núcleo independiente, aunque estén en el mismo citoplasma, de aquel o aquellos en los que se hallan los NORs normalmente activos.
6. La dominancia nucleolar se adquiere en cuatro fases: a) la primera es la separación de algunas proteínas reguladoras negativas de algunos NORs en telofase; b) el paso siguiente es la unión de proteínas que actúan como reguladores positivos de la transcripción de aquellos NORs previamente liberados de sus reguladores negativos; c) el paso tercero es la iniciación de la transcripción en esos NORs y d) el cuarto y último paso es la nucleogénesis que tiene lugar en esos NORs activados. Una vez el nucleolo se forma alrededor de un dominio conteniendo rDNA,

este NOR permanecerá dominante sobre los otros por toda la vida celular.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) VALENTÍN, G. (1839). Repertorium Teil. 4
- (2) STRASBURGER, E. (1879) Neue Beobachtungen über Zellbildung und Zelltheilung. *Bat. Ztg.* Nos. 17, 18.
- (3) FLEMMING, W. (1879) Beiträge zur kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen *Arch. Mikrosk. Anatom.* 16: 302-436.
- (4) SCHLEICHER, N. (1879) Die Knorpel-Zelltheilung. *Arch. Mikr. Anat.* 16: 248-301.
- (5) MIESCHER, F. (1871) Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hopper-Seyler's Chemisch. Untersuch.* 4: 441-460.
- (6) ZACHARIAS, E. (1885) Über der Nucleolen. *Bot. Ztg.* 43: 257-278.
- (7) FLEMMING, W. (1882) Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. Vogel, Leipzig.
- (8) ALTMANN, R. (1889). Über Nucleinsäuren, *Arch. Anat. Physiol. Abt. Physiol.* Pp. 524-536.
- (9) FEULGEN, R. (1914). *Z. PHYSIOL. CHEMIE* 92: 154.198.
- (10) FEULGEN, R., ROSSENBECK, H. (1924) Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Physiol. Chem.* 135: 203-244.
- (11) HEITZ, E. (1931). Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Gröse pflanzlicher Nucleolen. *Planta* 12: 775-844.
- (12) HEITZ, E. (1929) Heterochromatin, chromozentren. *Chromosomen. Ber. Deutsch. Bot. Gaz.* 47: 272-284.
- (13) MCCLINTOCK, B. (1934) The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. Mikrok, Anat.* 21: 294.438.
- (14) NAVASHIN, M. (1934). Chromosomal alterations caused by hybridization and their bearing upon certain genreal genetic problems. *Cytologia* 5: 169-203.
- (15) CASPERSSON, R.O.; SCHULTZ, J. (1940) Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm and the function of the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 26: 507-515.
- (16) BROWN, D.D., GURDON, J.B. (1964) Absense of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51: 139-146.
- (17) INGLE, J.; SINCLAIR, J. (1972) Ribosomal RNA genes and plant development. *Nature* 235, 30-32.

- (18) BIRNSTIEL, M.L., WALLACE, J., SIRLIN, J.L., FISCHBERG, M. (1966) Localization of ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of *Xenopus laevis*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 23: 431-448.
- (19) BIRNSTIEL, M.L. CHIPCHASE, M., SPIERS, J. (1971) The ribosomal RNA cistrons. *Progress Nucleic Acid Mol. Biol.* 11: 351-389.
- (20) REYNOLDS, R.C., MONTGOMERY, O.B., HUGHES, B. (1966) Nucleolar "caps" produced by actinomycin D. *Cancer Res.* 24: 1269-1278.
- (21) SCHOEFL, G.Z. (1964) The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. *J. Ultrast. Res.* 27: 224-243.
- (22) BERNHARD, W., FRAYSINET, C., LAFARGE, C., LEBRETON, E. (1965) Lésions nucléolaires précoces provoquées par laflatoxine dans les cellules hépatiques du rat. *Comt. Rend. Acad. Sci. Paris* 261: 1785-1788.
- (23) STOCKERT, J.C., FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E., GIMÉNEZ-MARTÍN, G., LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1970b) Nucleolar Organization of argyrophilic nucleolar material throughout the division cycle of meristematic cells. *Protoplasma* 69: 265-278.
- (24) GIMÉNEZ-MARÍN, G.; STOCKERT, J.C. (1970) Nucleolar structure during the meiotic prophase in *Allium cepa* anthers. *Z. Zellforsch.* 107: 551-563.
- (25) MONTGOMERY, T.H. (1898) Comparative cytological studies with special regard to the nucleolus. *J. Morphol.* 15: 265-592.
- (26) BUSCH, H. SMETANA, J. (1970) The nucleolus. Academic Press, New York,
- (27) JORDAN, E.G.; CULLIS, C.A. (1982) The nucleolus. Cambridge Univ. Press. Society for Exp. Biol. Seminar Series 15.
- (28) HADJIOLOV, A.A. (1985) The nucleolus and ribosome biogenesis. Vol. 12 Cell Biology Monographs. Springer Verlag. Viena.
- (29) HAY, E.D. (1968) en: The Nucleus. A.J. Dalton, F. Haguenau (eds.) Academic Press, New York,
- (30) BERNHARD, W.; GRANBOULAN, N. (1968). Electron microscopy of the nucleolus in vertebrate cells. En: A.J. Dalton, F. Haguenau (eds.) Ultrastructure in biological systems: The nucleus. Academic Press, New York. Pp. 81-148.
- (31) LAFONTAINE, J.G.; LORD, F.A. (1969) Organization of nuclear structures in mitosis cells. En: A. Lima-de-Faria (ed.) handbook of Molecular Cytology. North-Holland, Amsterdam.
- (32) LAFONTAINE, J.G. (1974) Ultrastructural organization of plant cell nuclei. En: H. Busch (ed.) The cell nucleus. Vol. 1. Academic Press, New York. Pp. 149-173.
- (33) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DE LA TORRE, G.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1977) Cell division in higher plants. En: T.L. Rost and E.M. Gifford (eds.) Mechanisms and control of cell division. Dowden, Hutchinson, Ross. Stroudsburg, Pennsylvania. Pp. 261-307.
- (34) GOESSENS, G. (1984) Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 87: 107-138.

- (35) BENAVENTE, R.; SCHEER, U. (1990) Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssays* 12: 14-21.
- (36) HOWARD, A.; PELC, S.R. (1951) Nuclear incorporation of  $^{32}\text{P}$  as demonstrated by autosynthesis between euchromatin and heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 2: 178-187.
- (37) HOWARD, A.; PELC, S.R. (1953) Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity suppl.* 6: 261-273.
- (38) WHALEY, W.G.; MOLLENHAUER, H.H. (1963) the golgi apparatus and cell plate formation. A postulate. *J. Cell Biol.* 17: 216-221.
- (39) FREY-WYSSLING, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; MÜHLETHALER, L. (1964) Formation and development of the cell plate. *J. Ultrast. Res.* 10: 422-432.
- (40) RISUEÑO, M.C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1968) Experimental analysis of plant cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 49: 136-147.
- (41) LÓPEZ SÁEZ, J.F.; RISUEÑO, M.C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. (1966) Inhibition of cytokinesis in plant cells *J. Ultrast. Res.* 14: 85-92.
- (42) SACHSENMAIER, W. (1964) Zur DNS-und RNS-Synthese im Teilungscyclus synchroner Plasmodien von *Physarum polycephalum*. *Biochem. Z.* 340: 541-547.
- (43) SACHSENMAIER, W. (1966) Analyses des Zellcyclus durch Einfrefe in die Makronolekül-Biosynthese. En: P. Sitte (ed.) Probleme der biologischen Reduplikation. Springer Verlag, Berlín-Heidelberg. Pp 139-160.
- (44) COOK, J.R. (1966) Studies on chloroplast replication in synchronized Euglena. En cell synchrony. I.L. Cameron, G.M. Padilla (eds). Academic Press. London-New York. Pp 153-168.
- (45) LAFEVER, A.; STEENBARGER, C. (1967) Simple device for obtaining synchronous cultures mof algae. *Nature* 213: 527-528.
- (46) SCHERBAUM, O.H.; ZEUTHEN, E. (1957) Induction of synchronous cell divisions in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.* 6: 221-227.
- (47) NAVARRETE, M.H.; PÉREZ. VILLAMIL, B.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1979) Analysis of the interphase accumulation induced by hydroxyurea on proliferating plant cells. *Exp. Cell Res.* 124: 151-157.
- (48) PRENSKY, W.; SMITH, H.H. (1965) The mechanism of 5-aminouracil-induced synchrony of cell división in *Vicia faba* root meristems. *J. Cell biol.* 24: 401-414.
- (49) WAGENAAR, E.B. (1966) Heigh mitotic synchronization induced by 5-aminouracil in root cells of *Allium cepa* L. *Exp. Cell Res.* 43: 184-190.
- (50) QUASTLER, H.; SHERMAN, F.J.(1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* 17: 420-438.
- (51) VANT'T HOF, J.; SPARROW, A.H. (1963) A relationship between DNA content, nuclear volume and minimun mitotic cycle time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49: 897-902.

- (52) VAN'T HOF, J. (1965) Relationship between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. *Exp. Cell Res.* 39: 48-58.
- (53) VAN'T HOF, J.; YING, W.K. (1964) Relationship between the duration of the mitotic cycle, the rate of cell production and the rate of growth of *Pisum* roots at different temperatures. *Cytologia* 29: 399-406.
- (54) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1965) a new method of labelling cells. *J. Cell Biol.* 26: 305-309.
- (55) DE LA TORRE, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. (1971) Cell Flow and its Application to the Estimate of Cell Cycle Parameters in Meristems. *Biol. Zbl.* 90: 707-710.
- (56) LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (1966) Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature. *Z. Zellforsch.* 75: 591-600.
- (57) GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DíEZ, J.L.; DE LA TORRE, C.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1971) Interphase development and beginning of mitosis in the different nuclei of polynucleate homokaryotic cells. *Chromosoma* 36: 100-112.
- (58) MACKENZIE, T.B.; STONE, G.E.; PRESCOTT, D.M. (1966) The duration of G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub> at different temperatures in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 31: 633-635.
- (59) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; DE LA TORRE, C. (1971) The nucleolar cycle in meristematic cells. *Cytobiologie* 4: 330-338.
- (60) DE LA TORRE, C.; CLOWES, F.A.L. (1972) Timing of nucleolar activity in meristems. *J. Cell Sci.* 11: 713-721.
- (61) DE LA TORRE, C.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. (1975) *Nature*. Vol. 256, 5517: 503-505.
- (62) CLOWES, F.A.L.; (1968) The DNA content of the cells quiescent centre and root cap of *Zea mays*. *New Phytol.* 67: 631-639.
- (63) DOUTRELIGNE, J. (1933) Chromosomes et nucleolus dans le noyaux du type euchromocentrique. *Cellule* 42: 31-60.
- (64) DE ZEEUW, J. (1936) Recherches sur les noyaux euchromocentriques et leur division (*Lupinus luteus* et *L. hirsutus*). *Cellule* 44: 389-413.
- (65) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DE LA TORRE, C.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; ESPONDA, P. (1977) Plant nucleolus structure and physiology (a review). *Cytobiologie* 14: 421-462.
- (66) GATES, R.R. (1942) Nucleoli and related nuclear structures. *Bot. Res.* 8: 337-409.
- (67) TANDLER, C.J. (1959) The silver-reducing property of the nucleolus and the formation of prenucleolar material during mitosis. *Exp. Cell Res.* 17: 560-564.
- (68) LAFONTAINE, J.G.; LORD, F.A. (1966) Structure and mode of formation of the nucleolus in plant cells. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 23: 67-75.

- (69) LAFONTAINE, J.G. (1958) Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of *Vicia faba* and *Allium cepa* *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 777-784.
- (70) LAFONTAINE, J.G.; CHOUINARD, L.A. (1963) A correlated light and electron microscope study of the nucleolar material during mitosis in *vicia faba* *J. Cell Biol.* 17: 167-209.
- (71) STEVENS, B.J. (1965) The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cells. *J. Cell Biol.* 24: 349-369.
- (72) BEERMANN, W. (1960) Der Nukleolus als lebenswichtiger Bestandteil des Zellkernes. *Chromosoma* 11: 263-296.
- (73) FISCHBER, M.; WALLACE, H. (1960) A mutation which reduces nucleolar number in *Xenopus laevis* en: Cell nucleus. J.S. Mitchel, ed. Butterworth, London. Pp 30-34.
- (74) ESPER, H.; BARR, J. (1964) A study of developmental cytology of a mutation affecting nucleoli in *Xenopus* embryos. *Develop. Biol.* 10: 105-121.
- (75) DAS, N.K. (1962) Synthetic capacitors of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material *J. Cell Biol.* 15: 121-130.
- (76) DAS, N.K. (1963) Chromosomal and nucleolar RNA synthesis in root tips during mitosis *Science* 140: 1231-1233.
- (77) DAS, N.K.; ALFERT, M. (1963) Silver staining of a nucleolar fraction, its origin and fate during the mitotic cycle. *Ann. Histochem.* 8: 109-114.
- (78) MORCILLO, G.; DE LA TORRE, C. (1980) the effect of RNA synthesis inhibitors on prenucleolar bodies. *Experientia* 36: 836-837.
- (79) GARCÍA-HERDUGO, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; HIDALGO, J.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1974) Effects of the protein synthesis inhibition during plant mitosis. *Exp. Cell Res.* 89: 336-342.
- (80) MORCILLO, G.; DE LA TORRE, C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. (1976) Nucleolar transcription during plant mitosis. *In situ* assay for RNA polymerase activity. *Exp. Cell Res.* 102: 311-316.
- (81) GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; RUFAS, J.S.; DE LA TORRE, C. (1985). The plant nucleolar cycle under hypoxia. *Protoplasma* 126: 47-53.
- (82) OCHS, R.L.; LISHCWE, M.A.; SHEN, E.; CARROL, R.E.; BUSCH, H. (1985) Nucleologenesis composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 92: 330-336.
- (83) GOESSENS, G.; THIRY, M.; LEPOINT, A. (1974) The nucleolus-organizing regions (NOR's): recent data and hypotheses. *Biol. Cell.* 35: 211-220.
- (84) SCHEER, U.; THIRY, M.; GOESSENS, G. (1993) Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3: 236-241.
- (85) HERNÁNDEZ-VERDÚN, D.; ROUSSEL, P.; GAUTIER, T. (1998) Nucleolar proteins during mitosis. *Chromosomes today* 11: 70-90.
- (86) ROUSEEL, P.; HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. (1994) Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp. Cell Res.* 214: 465-472.

- (87) SCHEER, U.; WEISSENBERGER, D. (1994) The nucleolus. *Curr. Op. Cell Biol.* 6: 354-356.
- (88) SCHMIDT-ZACHMANN, M.S., HÜGH, B.; SCHEER, M.; FRANKE, W.W. (1984) Identification and localization of a novel nucleolar protein of high molecular weight by monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.* 153: 327-346.
- (89) GAUTIER, T.; FOMPROIX, N.; MASSON, C.; AZUM-GÉLADE, M.C.; GAS, N.; HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. (1994) Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA. *Biol. Cell* 82: 81-93.
- (90) SCHEER, U.; ROSE, R. (1984) Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes, by light and electronic microscopy immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 81: 1431-1435.
- (91) GULDNER, H.H.; SZOTECKI, H.P.; VOSBERG, H.J.; LAKOMEK, E.; PENNER, E.; BAUTZ, F.A. (1986) Scl 70 auto-antibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA-topoisomerase I. *Chromosoma* 94: 132-138.
- (92) GAS, N.; ESCANDE, M.L.; STEVENS, B.J. (1985) Immunolocalization of the 100 kDa nucleolar protein during the mitotic cycle in CHO cells. *Biol. Cell* 53: 99-110.
- (93) WARNER, J.R. (1990) The nucleolus and ribosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 521-527.
- (94) JIMÉNEZ-GARCÍA, L.F.; ROTHBLUM, L.I.; BUSCH, H.; OCHS, R.L. (1989) Nucleologenesis: use of non-isotopic in situ hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol. Cell* 65: 238-246.
- (95) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DE LA TORRE, C.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (1972) Effect of cordyzepein on the nucleolar cycle. *Caryologia* 25: 43-58.
- (96) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DE LA TORRE, C.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (1974) Experimental analysis of nucleolar reorganization. *J. Cell Biol.* 60: 502-507.
- (97) BENAVENTE, R.; ROSE, K.M.; REIMER, R.; HÜGLE-DÖRR, B.; SCHEER, U. (1987) Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. *J. Cell Biol.* 105: 1484-1491.
- (98) AZUM-GÉLADE, M.C.; NOAILLAC-DEPEYRE, J.; CAIZERGUES-FERRER, M.; GAS, N. (1994) Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic nucleolar remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. *H. Cell Sci.* 107: 463-475.
- (99) HAY, E.D.; GURDON, J.B. (1967) Fine structure of the nucleolus in normal and mutant *Xenopus* embryos. *J. Cell Sci.* 2: 151-159.
- (100) MORCILLO, G.; DE LA TORRE, C. (1979 a) Mapping nucleologenesis in relation to transcription. *Biol. Cell* 36: 1-6.

- (101) PHILLIPS, R.L.; KLEESE, R.A.; WANG, S.S. (1971) The nucleolus organizer region of maize (*Zea mays* L): Chromosome site of DNA complementary to ribosomal RNA. *Chromosoma* 36: 79-88.
- (102) SEMESHIN, V.F.; SHERUDILO, A.J.; BELYAEVA, E.S. (1978) Nucleoli formation under inhibited RNA synthesis. *Exp. Cell Res.* 93: 458-467.
- (103) CHOUINARD, L.A. (1975) An electron-microscope study of the intranucleolar chromatin during nucleologenesis in root meristematic cells of *Allium cepa* J. *Cell Sci.* 19: 85-102.
- (104) LEPOINT, A.; GOESSENS, G. (1978) Nucleologenesis in *Ehrlich* tumour cells. *Exp. Cell Res.* 117: 89-94.
- (105) MORCILLO, G.; DE LA TORRE, C. (1979 b). Control of mitotic chromosome condensation and of the time of nucleolar formation in meristems by short life proteins. *Protoplasma* 99: 221-228.
- (106) GEUSKENS, M.; LEGRO, F. (1969) Apparition précoce de nucléoles anormaux au cours de la segmentation, dans les embryons de pleurudèle traités par la cycloheximide. *Chem. Biol. Interactions* 1: 185-198.
- (107) DE LA TORRE, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. (1975) Rate of nucleologenesis as a measure of gene activity. *Nature* 256: 503-505.
- (108) HARTWELL, L.H.; WINERT, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- (109) MURRAY, A.; KIRSCHNER, M.W. (1989) Dominions and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-621.
- (110) PAI, C.Y.; CHEN, H.K.; CHEU, H.L.; YEH, N.H. (1965) Cell cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleologenesis. *J. Cell Sci.* 108:1911-1920.
- (111) PETER, M.; NAKAGAWA, J.; DORÉE, M.; LABBÉ, J.C.; NIGG, E.A. (1990) Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2kinase. *Cell* 60: 791-801.
- (112) WEISENBERGER, D.; SCHEER, U. (1995) A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* 129: 561-575.
- (113) MERGUDICH, D.; LEYTON, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; SANS, J.; DE LA TORRE, C. (1992) Determination of the replication time of nucleolar organizer DNA after 5-azacytidine treatment for restricted parts of the S period. *Protoplasma* 167: 43-48.
- (114) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; DE LA TORRE, G.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (1974) Experimental analysis of nucleolar reorganization. *J. Cell Biol.* 60: 502-507.
- (115) BOYES, J.; BIRD, A. (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methylCpG protein. *Cell* 64: 1123-1134.
- (116) ASHAPKIN, V.V.; ANTONIV, T.T.; VANYUSHIN, B.F. (1995) Methylation-dependent binding of wheat nuclear proteins to the promoter region of ribosomal RNA genes. *Gene* 157: 273-277.

- (117) NEVES, N.; HESLOP-HARRISON, J.S.; VIEGAS, W. (1995) rRNA gene activity and control of expression mediated by methylation and imprinting during embryo development in wheat x rye hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 91: 529-533.
- (118) CABELLO, P.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LEYTON, C.; SANS, J.; DE LA TORRE, C. (1986) Stimulated nucleologenesis in meristematic cells with hypomethylated DNA. *Biol. Cell* 58: 91-94.
- (119) DE LA TORRE, C.; GIMÉNEZ-ALBIÁN, J.F.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. (1991) Dominance of a NOR (nucleolar organizer region) over its allele and over its sister NOR after asymmetric 5-azacytidine substitution in plant chromosomes. *J. Cell Sci* 100: 667-674.
- (120) MATZKE, M.; MATZKE, A.J.M. (1993) Genomic imprinting in plants: parental effect and trans-inactivation phenomena. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 53-76.
- (121) COOK, P.R. (1989) The nucleoskeleton and the topology of transcription. *Eur. J. Biochem.* 185: 487-501.
- (122) GARCÍA-BLANCO, M.; MILLER, D.D.; SHEETZ, M.P. (1995) Nuclear spreads: I. Visualization of bipartite ribosomal RNA domains. *J. Cell Biol.* 128: 15-27.
- (123) KAPLAN, F.S.; O'CONNOR, J.P. (1995) Topographic changes in a heterochromatic chromosome block in humans (15p) during formation of the nucleolus. *Chrom. Res.* 3: 309-314.
- (124) FERRARO, M.; LAVIA, P. (1985) Differential gene activity visualized on sister chromatids after replication in the presence of 5-azacytidine. *Chromosoma* 91: 307-312.
- (125) HUBBEL, H.R. (1985) Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Techn.* 60: 285-294.
- (126) MARTINI, G.; FLAVELL, R.B. (1985) The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three developmental stages. *Heredity* 54: 11-120.
- (127) ZATSEPINA, O.V.; VOIT, R.; GRUMMT, I.; SPRING, H.; SEMENOW, M.V.; TRENDELENBURG, M.F. (1993) The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma* 102: 599-611.
- (128) BESTOR, T.H.; CHANDLER, V.L.; FEINBERG, A.P. (1994) Epigenetic effects in eukaryotic gene expression. *Dev. Genet.* 15: 458-462.
- (129) HOLLIDAY, R. (1994) Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15: 453-457.
- (130) PASZKOWSKI, I.; MITTELSEN-SCHNEID, O. (1998) Plant genes. The genetics of epigenetics. *Current Biol.* 6: 200-208.
- (131) WALLACE, J.; BIRNSTIEL, M.L. (1966) Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochem. Biophys. Acta.* 114: 296-310.
- (132) PARDUE, M.L.; GERBI, S.A.; ECKHARDT, R.A.; GALL, J.C. (1970) Cytological localization of DNA complement of ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma* 29: 268-290.

- (133) REEDER, R.H. (1992) Regulation of transcription by RNA polymerase I. En: Transcriptional regulation. S.L. McKnight, K.R.; Yamamoto (eds.) Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, New York. Pp 315-347.
- (134) PAULE, M.R. (1994) Transcription of ribosomal RNA by eukaryotic RNA polymerase I. En Transcription: Mechanisms and regulation. Ed. R.C. Conaway, J.W. Conaway. Raven Press, New York. Pp 83-106.
- (135) MOSS, T.; STEFANOVSKY, V.Y. (1995) Promotion and regulation of ribosomal transcription in eucaryotes by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic. Acids Res. Mol. Biol.* 50: 25-66.
- (136) HONJO, T.; REEDER, R.H. (1973) Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*. *J. Mol. Biol.* 80:217-228.
- (137) CHEN, Z.J.; PIKAARD, C.S. (1997 a) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Gen. Dev.* 11: 2124-2136.
- (138) REEDER, R.H. (1985) Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants (a review). *J. Cell Biol.* 101: 2013-2016.
- (139) PIKAARD, C.S.; CHEN, Z.J. (1997) Nucleolar dominance. En: RNA polymerase I: Transcription of eucaryotic ribosomal RNA. M.R. Paule (ed.) R.G. Landes. Austin, Texas.
- (140) CASSIDY, D.M.; BLACKLER, A.W. (1974) Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Dev. Biol.* 41: 84-96.
- (141) REEDER, R.H. (1985) Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants (a review). *J. Cell Biol.* 101: 2013-2016.
- (142) BOSELEY, T.; MOSS, T.; MACHLER, M.; PORTMANN, R.; BIRNSTIEL, M. (1979) Sequence organization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of *X. laevis*. *Cell* 17: 10-31.
- (143) BUSBY, S.J.; REEDER, R.H. (1983) Spacer sequences regulate transcription of ribosomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell* 34: 989-996.
- (144) MOSS, T. (1983) A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. *Nature* 302: 223-228.
- (145) LABHART, P.; REEDER, R.H. (1984) Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell* 37: 285-289.
- (146) DOVER, G.A.; FLAVELL, R.B. (1984) Molecular co-evolution: rDNA divergence and the maintenance of function. *Cell* 38: 622-623.
- (147) GERBI, S.A. (1971) Localization and characterization of the ribosomal RNA cistrons in *Sciara coprophila*. *J. Mol. Biol.* 58: 499-511.
- (148) FLAVELL, R.B. (1986) The structure and control of expression of ribosomal RNA genes. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 3: 252-274.
- (149) ELICIERI, G.L.; GREEN, H. (1969) Ribosomal RNA synthesis in human-mouse hybrid cells. *J. Mol. Biol.* 41: 253-260.
- (150) MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHU, R.; CROCE, C.M. (1976) Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer

- activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Prod. Natl. Acad. Sci.* 73: 4531-4535.
- (151) ONISHI, T.; BERGLUND, C.; REEDER, R.H. (1984) On the mechanism of nucleolar dominance in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 484-487.
- (152) CEDAR, H.; (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53: 3-4.
- (153) FLAVELL, R.B.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F. (1988) Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. *J. Mol. Biol.* 204: 523-534.
- (154) PETERSON, K.; SAPIENZA, C. (1993) Imprinting the genome: imprinted genes, imprinting genes and hypothesis for their interaction. *Ann. Re. Genet.* 27:7-31.
- (155) LACADENA, J.R.; CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L. (1984 a) Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty in triticales by silver staining procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67: 207-213.
- (156) CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R. (1984) Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver staining procedure. *Chromosoma* 89: 330-376.
- (157) VIEIRA, R.; QUERIOZ, A.; MOARIS, L., BARAO, A.; MELLO-SAMPAYO, T., VIEGAS, W. (1990 a) Genetic control of the nucleolus organizer region expression in the presence of wheat genome. *Genome* 33: 713-718.
- (158) JONES, P.A.; TAYLOR, S.M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20: 85-93.
- (159) PARROW, V.C.; ALESTÖM, P.; GAUTVIK, K.M. (1989) 5-azacytidine-induced alteration in the GH12C1 cells, effects on cellular morphology, chromosome structure, DNA and protein synthesis. *J. Cell Sci.* 93: 533-543.
- (160) VIEIRA, R.; QUEIROZ, A.; MORAIS, L.; BARAO, A.; MELLO-SAMPAYO, T.; VIEGAS, W. (1990 b). 1R chromosome nucleolus organizer region activation by 5-azacytidine in wheat x rye hybrids. *Genome* 33: 707-712.
- (161) HESLOP-HARRISON, J.S. (1990) Gene expression and parental dominance in hybrid plant. *Develop. (Suppl.)* 21-28.
- (162) AMADO, L.; ABRANCHES, R.; NEVES, N.; VIEGAS, W. (1997) Development-dependent inheritance of 5-azacytidine-induced epimutations in triticales: analysis of rDNA expression patterns. *Chrom. Res.* 5: 445-450.
- (163) SATO, S. (1981) Cytological studies on the satellited chromosomes of *Allium cepa*. *Caryologia* 34: 431-440.
- (164) CORTÉS, F.; ESCALZA, P. (1986) Analysis of different banding patterns and late replicating regions in chromosomes of *Allium cepa*, *A. sativum* and *nigrum*. *Genetica* 71: 39-46.
- (165) RICOCH, A.; PEFFLEY, E.B.; BAKER, R.J. (1992) Chromosomal location of rDNA in *Allium*: *in situ* Hybridization using biotin- and fluorescein-labelled probes. *Theor. Appl. Genet.* 83: 413-418.

- (166) PENMAN, S.; FAN, H.; PERLMAN, S.; ROSBASH, M.; WEINBERG, R.; ZYLBER, E. (1970) Distinct RNA synthesis systems of the HeLa cell. *Cold Spring Harbor Symp.on Quantt. Biol.* 35: 561-575.
- (167) PANZERA, F.; GIMÉNEZ-ALBIÁN, M.I.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; CUADRADO, A.; SHAW, P.J.; BEVEN, A.; CÁNOVAS, J.L.; DE LA TORRE, C. (1996) Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* L. chromosomes. *Chromosoma* 10: 12-19.
- (168) PANZERA, F.; GIMÉNEZ-ALBIÁN, M.I.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; CUADRADO, A.; CÁNOVAS, J.L.; DE LA TORRE, C. (1977) Competence for nuclear replication and the NOR-chromosomes of *Allium cepa*. *Eur. J. Cell Biol.* 72: 9-12.
- (169) MAGGINI, F.; CARMONA, M.J. (1981). Sequence heterogeneity of the ribosomal DNA in *Allium cepa* (*Liliaceae*). *Protoplasma* 108: 163-171.
- (170) GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; PANZERA, F. CÁNOVAS, J.L.; DE LA TORRE, C.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. (1992) A limited number of chromosomes makes a nucleus competent to respond to inducers of replication and mitosis in a plant. *Eur. J. Cell Biol.* 58: 163-171.

Anal. Real Acad. Farm. 2001, 67:

---

## Doctrina

---

### Medicinal Chemistry in the Development of Societies.

#### Biodiversity and Natural Products.

A. MONGE<sup>A</sup>, M. CHORGHADÉ<sup>B</sup>, P.W. ERHARDT<sup>C</sup>, C.R. GANEL-LIN<sup>D</sup>, N. KOGA<sup>E</sup>, P. LINDBERG<sup>F</sup>, T. J. PERUN<sup>G</sup>, J.G. TOPLISS<sup>H</sup>, B.K. TRIVEDI<sup>I</sup>, C.G. WERMUTH<sup>J</sup>.

*A Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada. Universidad de Navarra. Apdo. 177. 31080 Pamplona, España*

*B Chorghade Enterprises. 14 Carlson Circle, Natick, MA 01760-4205. U.S.A.*

*C Ctr. for Drug Design & Development. Univ. Toledo. College of Pharmacy. 2801 W. Bancroft Street. Toledo. OH, 43606-3390. U.S.*

*D University College London. Department of Chemistry. Christopher Ingold Laboratories. 20, Gordon Street. London. WC1H 0AJ. UK.*

*E Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo, 103-8234, Japan*

*F Astra Hässle AB. S-431 83.Mölndal. Sweden.*

*G Route 4. Box 24. Hempstead. TX, 77445. U.S.A.*

*H Department of Medicinal Chemistry. University of Michigan. College of Pharmacy. 428, Church Street. Ann Arbor. MI, 48109-1065. U.S.A.*

*I Parke-Davis Pharmaceutical Research. 2800 Plymouth Road. Ann Arbor. MI 48105. U.S.A.*

*J Université Louis Pasteur Strasbourg. Faculté de Pharmacie. 74, Route du Rhin. BP 24. F-67401. Illkirch Cedex. France.*

## SUMMARY

This document has been prepared by the IUPAC Medicinal Chemistry section and is backed by a large number of scientists, many of whom have had direct involvement and whose names appear at the end of the article.

This work discusses the role that the discovery of new medicinal agents has in the development of societies as well as in the conservation of biodiversity in terms of the work carried out on natural products.

Also included are several recommendations for countries which are presently in search of their own scientific and technological development in medicinal agents.

The IUPAC Medicinal Chemistry section would appreciate the collaboration of the scientific societies in every country to aid in the diffusion of this document.

**Keywords:** Medicinal Chemistry.- Biodiversity.- Development of Societies.

## RESUMEN

### **La Química médica en el desarrollo de las Sociedades. Biodiversidad y Productos naturales**

Se presenta un documento de opinión elaborado por la sección de Medicinal Chemistry de IUPAC, que cuenta además con el acuerdo de un buen número de científicos, algunos de los cuales figuran al final del trabajo.

Se plantea el papel que puede tener el descubrimiento de medicamentos en el desarrollo de las sociedades y mantenimiento de la biodiversidad en base a los trabajos en productos naturales.

Se plantean recomendaciones de aplicación en los países que están en la búsqueda de su desarrollo científico y tecnológico en el medicamento.

Es intención de la sección de Medicinal Chemistry de IUPAC su difusión internacional, por lo que agradecen la colaboración de las sociedades científicas de los diferentes países.

**Palabras Clave:** Medicinal Chemistry.- Biodiversidad.- Desarrollo de los pueblos.

Modern times have seen globalization of all human endeavors accompanied by a seamless, *sans frontiers*, diffusion of culture, ideas and science across traditional boundaries of territories, cultures and societies. However, all societies are not at the same level of development and a significant challenge still lies in respecting and harnessing our differences to insure peace, justice and liberty for all.

For example, within the context of the life sciences a man-made medicinal agent should receive special, international attention. Any compound that can help restore lost health or prevent a disease should be made available to all countries, regardless of the continental location or the degree of societal development. The only limits that should exist are those which are organizational, linked to preparation, distribution, etc.

Presently there are countries which are the discoverers of medicinal agents and there are countries which are simply consumers. Likewise, there are countries whose legislation pertaining to intellectual property rights are quite sophisticated while there are others who do not have this type of legislation at all. Some countries are in search of development with an overabundance of natural resources and biodiversity while others have the potential for scientific and technological exploitation but lack such resources. In this wide panorama, the field of chemistry can play an important role since medicinal agents are chemical products which, in many cases, are often modified if not entirely prepared by chemical reactions. Likewise, biodiversity is attributable to chemical constituents of plants with an array of complex structures, many of which have not yet succumbed to total, practical syntheses by man. To lose biodiversity is to lose information of great potential value.

This article intends to refine and further promote ideas proposed during earlier projects of the IUPAC Medicinal Chemistry section (1-3). Specifically, the authors seek to enhance the transfer of science and technology associated with drug discovery and development between developed and developing societies in the most mutually beneficial scenarios possible.

### **Inverting The Model**

Irrespective of administrative or political considerations, companies and centers having high levels of development need to be brought together with those which lack it by means of joint projects within the broad field of chemistry and, especially, within the distinct area of biologically active compounds. Various modes of interaction can be proposed: the most often used is one wherein samples of materials from developing countries with biodiversity are extracted and transported for study in developed societies. We make a case for an *inversion of this traditional model*, namely that of offering technology to the countries with biodiversity so that they themselves may carry out the necessary developmental work. Chemical research conducted in the country where samples originate would enhance the country's scientific development. Competitive capacity, research methodology and the infrastructure could be the focus of negotiation and agreement. The contributions to chemical research on bioactive molecules that biodiversity-rich, developing countries may be able to then return can be ascertained on the basis of:

➤ Strengths:

- Biological material, both of animal and vegetable origin, with demonstrated or potential activity.
- Traditional knowledge concerning biological activities, linked to plants or animals.

➤ Weaknesses:

- Infrastructure deficiencies which cause difficulties for conducting scientific research.

Importantly, the salient features of such programs should provide for: conservation of biodiversity; equitable intellectual property rights/duties; and, development of scientific resources/facilities/infrastructure.

## Medicinal Chemistry and Biodiversity

Realizing that biodiversity can be lost by man-made cataclysms such as the construction of large public works or by natural catastrophes such as fires, volcanoes etc., *Medicinal Chemistry can function as a great ally* by emphasizing the eco-balance between life and its surroundings, plants and micro-fauna and other relationships. *Medicinal Chemistry also recognizes the symbiotic interaction between native communities and cultures as a foundation and wellspring for potential discoveries.* These interrelationships must be nurtured and their key elements preserved. Researchers studying natural medicinal agents subscribe to this rationale. Their analysis, evaluation and effective utilization of available resources can greatly assist toward maintaining the elements of biodiversity while promoting scientific advances. Alternatively, in developing countries whose economies are based on the exploitation of agricultural and livestock resources principally geared to the production of cash crops and immediate products, there is great pressure on their natural space. Consequently, there is also great pressure toward the potential elimination of their natural flora. Thus, the relationships between biodiversity, opportunity and the structuring of various alliances become especially important relative to the immediate financial needs of a developing country. In this light, however, *biodiversity and Medicinal Chemistry must find a way to collaborate and optimize opportunities based on new alliances and technology transfer that is not based-upon pure economics. Enormous benefits can accrue in the fields of education, scientific research, and innovation when an approach, other than immediate financial gain is taken.*

Some examples can be illustrative. The “uña de gato,” *Uncaria tomentosa*, DC, is a liana which has long been used by native communities of South America. However, the people from the countries where the plant grows became wary of exporting extracts for Medicinal Chemistry research because they thought they might not receive commensurate benefits. Ultimately the plant became offered on the net, in any quantity anywhere in the world by a few financially opportunistic companies. The result is that the opportunity toward incorporating technology and technological development for the countries that originally possessed the plant

has been lost. Alternatively, the domestication of plants, such as the *Catharanthus roseus* G. Don of great interest in the production of anti-cancer alkaloids like vincristine, represents a form of conservation of biodiversity, of training in agricultural techniques of economic interest, and of the creation of a local chemical industry.

### **Medicinal Chemistry and Ownership of Natural Resources**

Recognizing the sovereign rights that each country has over its resources (4), the aim of this report is to prompt compromises between developed countries and developing countries in the area of ownership. New circumstances (5) have emerged that suggest *reform of the traditional system of patents essential for commercialization and diffusion of science*. Presently, when a native community produces a unique cloth, it can be copied by the whole world because it is not legally protected. Alternatively, when an entity in a developed country copies and registers modifications based on the designs of a native community, absolutely no one, not even the original artists, can legally copy them (6). It could be argued that the native community has the sole responsibility to register its work in order to obtain legal protection. However, such countries are typically unable to do this because of a lack of knowledge regarding these types of procedures or due to a scarcity of the means to achieve such ends. The same situation can happen with a galenic preparation of a plant that has biological activity when initially used by a traditional culture.

Establishing ownership may not be simple. It is imperative to begin by defining the discoverer (7). In the discovery of medicinal agents, by traditional ways of Medicinal Chemistry, this can correspond to an individual researcher or to an entire research team. In plants with therapeutic applications originating from native communities, the question is much more complicated. Here we are speaking more of a “chain” of inventors. This can result in problems when it comes to the selection of the beneficiaries and the distribution of the benefits obtained. A matter of equal importance is the fact that certain cultures hold nature to be sacred and look askance at any attempts at its legal protection as a prelude to commercialization.

Whether the traditional use of a plant for a given pathology constitutes public property and prior art is a vexing question. *The protection of knowledge, within the context of plants with biological activity, cannot be easily accomplished via patents and it becomes necessary to search for further avenues. From the standpoint of equity, answers may be able to be found during the transfer of knowledge.* Consider that the number of plants which are presently used in their original form in therapeutics is quite limited. In practice it is the process of bio-directed fractionation of plant extracts that eventually permits us to find compounds which then typically also undergo further structural modification to ultimately provide preferred molecules that are more active and less toxic. Consequently, in this type of scenario a patent covering the initial plant material may not be adequate. The solution to this scenario of “*plant-development*” can lead to an impasse precisely for the countries in search of development, thereby possibly losing by default the possibilities for the use of their biodiversity.

Economic compensation for historical knowledge should not be lost during the overall development process because the living materials may have needed protection and conservation, sometimes throughout centuries, in order to ultimately afford the current validation of their use. This effort might be compensated for through a contract, establishing royalties that could be obtained when commercialization takes place. In line with our previous discussion, the contract might also specify in advance of commercialization and as part of a collaborative development venture, the training of persons and the acquisition of equipment and technologies as well as the more typical payment for samples. For example, compensation could be provided to the persons that provide the plant, make the extracts, and carry out biological assays, in such a way that each one can maintain his or her own interest and ultimate stake in commercialization. The country obtains benefits directly through taxation corresponding to the activities, and more importantly, through the scientific and technological upgrading of its society. The possibility of regional subsidiary or local companies playing a more important role in the transference of research and technology in such collaborative scenarios should also be seriously considered.

In countries with emerging economies, biodiversity and related activities constitute “green gold.” For this reason, at times, the governments assume quick, financially-driven policies that can sometimes be contrary to eco-relationships. Thus, both parties must be prepared to adopt longer-range planning considerations into their decision-making processes. *Equity and equal opportunity must be given to protect the discoveries made by any society.* This principle of equity can ameliorate any misunderstanding arising out of the actions of medicinal chemists in developed countries in their relationship with their counterparts in developing countries.

### Summarial Points

- Medicinal Chemistry research on extracts from plants and other living organisms that leads to the discovery of therapeutic agents, can also be an important factor toward maintaining biodiversity.
- Relationships between societies which possess important biodiversity and developed societies which possess advanced technological processes should be based on the principles of equity. They should operate by means of collaborative contracts which acknowledge progression of scientific research in such a way that the immediate financial aspects are not considered to be of primary interest but rather only a legitimate, longer-term consequence of such partnering (8,9).
- Since all of humanity benefits from the discovery of new drugs, all societies should collaborate in the preservation and evaluation of the areas of great diversity from which such structures might emerge. This could be carried out through investments made by pharmaceutical companies to help preserve this type of land (e.g. of great biodiversity, of fragile environment, or where promising species *prosper*) and through the promotion of localized searches done in collaborative settings that can allow for both immediate development of identified actives and sustained cultivation of undefined biodiversity.

### Additional Recommendations

- Strengthen international relationships on these types of research projects, particularly including countries at different levels of development.
- Utilize university-company relationships within less-developed countries.
- Strengthen international relationships between scientists and the authorities responsible for research in various countries.

### REFERENCES:

- (1) P.R. Andrews., R. Borris., E Dagne., M. Gupta., L.A Mistcher., A. Monge., N.J. de Souza and J.G. Topliss. (1977) Preservation and utilization of Natural Biodiversity in context of search for economically valuable medicinal biota., *Chemistry International.*, 19 (3), 77 (Summary of Technical Report).
- (2) P.R. Andrews., R. Borris., E. Dagne., M.P. Gupta., L.A. Mistcher., A.Monge., N.J. De Souza and J.G. Topliss. (1997) General features of contracts for natural products collaborations. *Chemistry International.*, 19(3), 77. (Summary of Technical Report).
- (3) Monge., R. Ganellin., J. Ide., N. Koga., L. Mitscher., C. Muller., T.J. Perun., J.G. Topliss and C.G. Wermuth. (1999). Research and Training in Medicinal Chemistry in South and Central American and Sub-saharian Africa., *Chemistry International.*, 21 (3) 65-69
- (4) The Phuket Declaration., *Chem. Int.*, 20 (5) 139 (1998).
- (5) S. Borman (1999).African AIDS tragedy: Patent rights versus human rights. *C&EN.*, 49
- (6) P. Quéan¿De quién fue la idea?.(1999). *Fuentes (UNESCO).*, (117), 4-5.  
R. Pidgeon (1999).Patenting-pitfalls and prizes. *Chemistry in Britain.*, 25-28.
- (7) D.E. Nettleton., Jr. (1995).Bioprospecting, Compensation and Biopreservation., *DN&P.*, 250-256
- (8) C.M. Rodríguez (1996)Legal Issues: Contracts, Intellectual property rights and other property rights. In: Biodiversity, Biotechnology and Sustainable Development., p.p. 183-190 in *Health and Agriculture: Emerging Connections.*, OPS. Washington.

**Acknowledgments:**

The following persons have collaborated in this work. (May 2, 2000)

.- **Alcudia González, Felipe.** Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, SPAIN (Red Iberoamericana de Investigación, Diseño y Desarrollo de Medicamentos [ RIIDDMED] - CYTED)

.- **Aldana, Ignacio.** Dpto. Química Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. C/ Irunlarrea, s/n. 31008 Pamplona. SPAIN

.- **Benaim, Marisela.** Laboratorios GIEMPI. C/ Bolivar. Urb. La Trinidad - Edif. Klinos .Apdo. Postal 87085. Caracas 1081. VENEZUELA (RIIDDMED - CYTED).

.- **Cerecetto, Hugo.** Facultad de Química y Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. URUGUAY. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Compagnone, Reinaldo S.** Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 47102. Caracas. VENEZUELA. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Chiriboga P, Ximena.** Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias químicas. Departamento de Fitoquímica y Productos Naturales. Salazar Gómez No N32 – 01 y Martínez .Mera. Quito. ECUADOR. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Farré, Antonio J.** Lab. Dr. Esteve. M.D.D.Montserrat 221. 08041 Barcelona. SPAIN. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Fernández Braña, Miguel.** Universidad San Pablo Ceu. Facultad de Ciencias Experimentales. Urb. Montepríncipe. Ctra. Boadilla del Monte, 5,300. 28668 Madrid. SPAIN. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Ferrándiz García, Francisco.** Vocal Asesor de Rel. Internacionales. OCYT. C/ José Abascal, 4. 28003 Madrid. SPAIN

- .- **Ferro, Esteban.** Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Asunción. Fac. de Ciencias Químicas. Dirección de Investigación. Departamento de Fitoquímica. Campus Universitario. San Lorenzo. PARAGUAY.
- .- **Fischer, Janos.** Richter Co., Ltd. P.O. Box 27. H- 1475 Budapest, 10. HUNGARY
- .- **Gattuso, Martha.** Universidad Nacional de Rosario. Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Biología Vegetal. Suipacha, 531. 2000 Rosario, ARGENTINA
- .- **Gattuso, Susana.** Universidad Nacional de Rosario. Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Biología Vegetal. Suipacha, 531. 2000 Rosario, ARGENTINA
- .- **Guccione Salvatore.** University of Catania (Italy), Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, viale A. Doria 6, Ed. 12 Città Universitaria, I-95125 Catania. ITALY
- .- **Huenchuñir Gómez, Patricio.** Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. San Carlos de Apoquindo 2200. 6782468. Las Condes. Santiago. CHILE. (RIIDDMED - CYTED).
- .- **Kobayashi, Toshi.** PhRMA-Japan. SB Building. 6 Sanbancho. Chiyodaku. Tokyo. 102-0075. JAPAN
- .- **Martín, Yolanda.** Dpto. Química. Universidad Europea de Madrid. Villaviciosa de Odón. 28670 Madrid. SPAIN. (RIIDDMED - CYTED).
- .- **Ochoa de Ocariz, Carmen.** Instituto de Química Médica. Juan de la Cierva, 3. 28006-Madrid. SPAIN. (RIIDDMED - CYTED).
- .- **Sener, Bilge.** Director. Department of Pharmacognosy. Faculty of Pharmacy. Gazi University. P.K. 143. 06572 Mattope. Ankara. TURKEY.
- .- **Vega Noverola, Salvador.** Instituto de Química Médica. Juan de la Cierva, 3. 28006-Madrid. SPAIN. (RIIDDMED - CYTED).

.- **Zacchino, Susana.** Universidad Nacional de Rosario. Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Farmacognosia. Suipacha, 531. 2000 Rosario, ARGENTINA. (RIIDDMED - CYTED).

————— *Artículos Originales* —————

**Determinación de la permitividad y conductividad eléctricas a la frecuencia de microondas de varios tejidos de rata tratadas con cadmio\***

O. GARCÍA-ARRIBAS<sup>1</sup>, M. PÉREZ-CALVO<sup>1</sup>, S. MUÑOZ<sup>2</sup>, J.M. ESCRIBANO<sup>3</sup>, J.M. MIRANDA<sup>2</sup>, M. SANCHO<sup>2</sup>, J.L. SEBASTIÁN<sup>2</sup>, L.P. RODRIGUEZ<sup>4</sup>, J.A. GARRIDO<sup>1</sup>, B. RIBAS<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Toxicología, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, 28220-Majadahonda, Madrid.*

<sup>2</sup> *Departamento de Física Aplicada III, Facultad de Físicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid.*

<sup>3</sup> *Instituto de Cardiología, Comunidad de Madrid, 28040-Madrid.*

<sup>4</sup> *Departamento de Medicina Física y Rehabilitación, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.*

**RESUMEN**

Los campos electromagnéticos ambientales cada vez más presentes en el entorno, pueden afectar a los propios seres humanos y, según su intensidad (magnetoterapia), activar o modular procesos fisiológicos o inducir a posibles patologías. En este trabajo se pretende determinar las características fisicoquímicas (los parámetros permitividad ( $\epsilon$ ) y conductividad eléctrica ( $\sigma$ )) de varios tejidos de rata, mediante la aplicación de microondas de radiofrecuencia, ante variaciones en la concentración de cadmio (Cd) y comprobar si se pueden utilizar como indicadores

---

\* Este trabajo fue presentado en el Congreso Internacional de la URSI (International Union of Radio Science), Agosto 1999, Toronto, Canada, y fue galardonado con un "Young Scientist Award".

\*\* Autor a dirigir la correspondencia

del efecto específico de la presencia de cadmio, evaluar su efecto por la contaminación del entorno y cuantificar su acúmulo. Por consiguiente, se pretende aportar nuevos datos sobre los efectos de la toxicidad del cadmio en diversos órganos sistémicos y comprobar si existe sinergismo entre el efecto tóxico del cadmio (contaminante ambiental) y el de los campos electromagnéticos. Se utilizan dos grupos de ratas macho Wistar, uno control y otro tratado con Cd ( $\text{CdCl}_2$ ), con doce dosis (una por día) por vía intraperitoneal desde 0,1 a 1 mg Cd/Kg rata/día. Se extrae la sangre bajo anestesia con éter por punción cardíaca hasta su muerte, y se diseccionan los órganos. Se analizan diversos parámetros sanguíneos, y se congelan los órganos siguientes: hígado, riñones, pulmones, corteza cerebral, testículos, páncreas y músculo, en los que se determina la permitividad y conductividad. Se determinan los coeficientes de reflexión y transmisión de estas muestras a la frecuencia industrial de 2,45 GHz. Esta frecuencia está comprendida dentro del rango de las frecuencias de microondas. Los coeficientes de reflexión y transmisión se miden mediante un analizador de redes, se usa un estimulador HFSS de HP que determina la permitividad de un tejido que produjera los mismos valores de los coeficientes de reflexión y transmisión medidos experimentalmente. Los resultados muestran que en el caso del riñón e hígado los valores de  $\epsilon$  (permitividad) y  $\sigma$  (conductividad) son menores que en el control, lo que se puede explicar porque ambos órganos son los principales tejidos diana de la toxicidad del cadmio. Este elemento provoca disfunción en los túbulos proximales del riñón, y en el caso del hígado, el cadmio también se acumula en este órgano provocando daño hepático, un descenso de la integridad estructural de los hepatocitos y liberación de las transaminasas en el suero. Del análisis de sangre se observa que el cadmio provoca un estado anémico, de forma que se produce una disminución de los valores de hematocrito y hemoglobina con respecto a los controles.

**Palabras Clave:** Cadmio.—Toxicidad.—Permitividad.—Conductividad.—Microondas.—Radiofrecuencia.—Campos magnéticos.

### SUMMARY

#### Determination of permittivity and conductivity in several rat tissues treated with cadmium.

In this work we pretend to determine two physical parameters permittivity ( $\epsilon$ ) and conductivity ( $\sigma$ ) in several rat tissue, control and treated with cadmium (Cd), applying electromagnetic fields of radiofrequency and to check if these parameters can be used as indicators of cadmium toxicity and presence in the environment in certain organs. There are used two groups of male Wistar rats, a control group and the one treated with cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), with twelve single intraperitoneal increasing doses from 0,1 to 1 mg Cd/Kg rat/day. After blood extraction under ether anesthesia the animals died and several biochemical and haematological parameters are analyzed. The dissected organs are: brain cortex, testes, kidney, liver, pancreas, lungs and muscle, which are submitted to determine the  $\epsilon$  and  $\sigma$ , mea-

asuring the reflection and transmission, complex coefficients of these biological samples at the industrial frequency of 2.45 GHz. This frequency is included in the range of microwave frequencies. The reflection and transmission coefficients are measured with a network analyzer. We use a HP HFSS simulator that determines the permittivity of a tissue that would produce the same values for reflection and transmission coefficients obtained experimentally. Results show that in liver and kidney there is a decrease in the  $\epsilon$  and  $\sigma$  compared to the controls. The changes in the kidney can be explained because the renal cortex is the major target tissue for cadmium toxicity, provoking proximal tubular dysfunction. In liver, cadmium also accumulates inducing hepatic damage, with an increase of both transaminases in serum and the decrease of the structural integrity of hepatocytes. Blood analysis show that cadmium induces an anaemic state, with a decrease in hemoglobin and hematocrite values in comparison to the controls.

**Keywords:** Cadmium.—Toxicity.—Permittivity.—Conductivity.—Radiofrequency.—Microwave.—Electromagnetic fields.

## INTRODUCCIÓN

Un ser vivo está compuesto por una compleja estructura de tejidos biológicos con propiedades eléctricas diferentes (permitividad dieléctrica  $\epsilon$  y conductividad  $\sigma$ ). Tanto los tejidos como las células están expuestos a metales pesados y tóxicos químicos que los pueden afectar hasta el punto de que sus propiedades eléctricas pueden verse alteradas y los tejidos biológicos implicados no pueden realizar su función adecuadamente. También estas propiedades son en gran parte responsables de la interacción de los campos electromagnéticos con moléculas y estructuras biológicas supramoleculares. Así un valor elevado para la permitividad implica un considerable efecto protector para el campo eléctrico, aunque la conductividad origina la circulación de corrientes inducidas en tejidos. Además es posible que los efectos de metales pesados puedan combinarse con los de los campos electromagnéticos medioambientales, produciendo efectos adversos en la salud.

Se han realizado estudios en los que se ha comprobado que la exposición a campos magnéticos estáticos (SMF) y campos magnéticos de muy baja frecuencia (ELF-MF) influyen en la actividad bioeléctrica neuronal, en los que está implicado el calcio citosólico (1 a 3). También se han estudiado las propiedades dieléctricas de teji-

dos biológicos aplicando campos electromagnéticos (4,5). Es conocido, que las microondas de la gama de frecuencia mencionada penetran en los tejidos expuestos y producen calor, debido a la absorción de energía por las células. La profundidad de la penetración depende de la frecuencia del campo, y es mayor para las bajas frecuencias. El calor inducido es neutralizado por los procesos de regulación homeostática de los seres vivos.

Por todo ello, se trata en este trabajo de aportar algunos datos sobre las características fisicoquímicas de los tejidos, permitividad y conductividad, mediante la aplicación de microondas de radiofrecuencia, ante variaciones en la concentración de cadmio. En el organismo humano existen situaciones patológicas, en las que también varían las concentraciones de diversos metales, Fe, Cd, Hg, Pb, como es conocido en Toxicología y Medicina del Trabajo. Se trata de experimentos fundamentales, para conocer la variación de propiedades de los tejidos ante las ondas de radiofrecuencia, en presencia de agentes naturales, químicos ambientales, y siguiendo los consejos del Parlamento Europeo (6).

Este trabajo tiene dos objetivos. El primero es la determinación de la variación de las propiedades eléctricas de órganos tratados con cadmio. Para este propósito, se mide la permitividad dieléctrica compleja de muestras de tejido de rata, a la frecuencia industrial de 2,45 GHz. También se relacionan las variaciones observadas en la  $\epsilon$  y  $\sigma$  con los parámetros bioquímicos y enzimáticos encontrados en el análisis de sangre. El segundo objetivo de este trabajo es mostrar una técnica sencilla y útil para la evaluación de la toxicidad de distintas sustancias químicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales de experimentación

Se emplean ratas macho de raza Wistar con pesos comprendidos entre 170 y 200 g mantenidas en jaulas metabólicas, y alimentadas con pienso estándar y agua "ad libitum". Se utilizan dos grupos de 5 ratas, uno de ellos control y otro tratado con cadmio. Los grupos de animales se mantienen en las mismas condiciones.

Un grupo de ratas se trata con Cd en la forma química de  $\text{CdCl}_2$  (Merck). Se prepara una disolución estéril de  $\text{CdCl}_2$  1 mg/ml, que se inyecta por vía intraperitoneal con una dosis creciente de 0,1 a 1 mg Cd/kg rata/día, durante 12 días.

### **Determinación de parámetros permitividad y conductividad**

#### *Disección de tejidos*

Los animales son sacrificados por extracción total de sangre mediante punción cardíaca, bajo los efectos de la anestesia con éter. Una vez sacrificados se diseccionan los tejidos y se extraen los órganos, concretamente pulmones, hígado, riñones, testículos, páncreas, corteza cerebral y tejido muscular de la zona femoral. De todos los órganos se hacen cortes de aproximadamente 2 mm de espesor y se guardan en placas petri a 0°C hasta la determinación de los parámetros físicos permitividad y conductividad.

#### *Calibración y puesta a punto del sistema experimental de medida*

El sistema experimental para radiación y caracterización de muestras que se ha montado consta de un analizador de redes (VNA) HP 8720 que permite medidas en el margen de frecuencia 50 MHz-21 GHz y dos transiciones guía/coax de muy baja razón de onda estacionaria. Para la calibración del sistema en guía de ondas a la frecuencia de trabajo de 2,45 GHz se construye una sección guía tipo WR 430 útil para trabajar en el rango de 1,7-2,6 GHz, de 34 cm de longitud total, pudiéndose variar su longitud mediante un cortocircuito variable con objeto de fijar los planos de referencia adecuados.

#### *Célula de medida*

Para la radiación y caracterización de muestras biológicas se diseña una célula de medida formada por: a) una sección de guía WR 430 de aluminio altamente pulido de 5,4 cm de longitud y b) un

portamuestras constituido por dos bloques de metacrilato pulido con una cavidad rectangular de dimensiones: largo 54 mm, ancho 11 mm y alto 2 mm. Dentro de esta cavidad rectangular es donde se va a introducir la muestra biológica. Para la calibración del sistema de medida la muestra cortada de tejido biológico se reemplaza por una pieza de metacrilato de las mismas dimensiones.

La caracterización experimental se realiza midiendo los coeficientes complejos de reflexión  $s_{11}$  y transmisión  $s_{21}$  de las muestras biológicas a la frecuencia industrial de 2,45 GHz. Para ello los cortes de la muestra biológica se colocan en la cavidad rectangular del portamuestras rellenando todo el espacio, sin que quede ningún hueco y todo ello en la sección de guía WR 340. Los coeficientes complejos de transmisión y reflexión de la muestra biológica en el rango de radiofrecuencias se miden usando un analizador de redes (VNA) de tipo HP 8720.

#### *Medida de la permitividad y conductividad*

La misma estructura (tejido dentro de la guía de ondas) fue analizada usando el simulador HP HFSS. El simulador hace posible determinar el valor de la permitividad dieléctrica y conductividad de un tejido que produciría los mismos valores para los coeficientes de reflexión y transmisión que habían sido determinados experimentalmente.

#### *Análisis de Sangre*

La sangre extraída de cada animal se recoge en dos tubos de plástico uno de ellos con EDTA (Vacutainer), para realizar recuentos celulares, al que se añade un volumen de 2 ml de sangre, y otro que contiene 2 ml de Gel PST<sup>TM</sup> y heparina-litio, al que se añaden 4 ml de sangre. Este tubo se centrifuga a 2500 rpm durante 7 min, y en el sobrenadante sérico, se analizan los parámetros bioquímicos y las enzimas. Las muestras de sangre obtenidas de los animales control y de los tratados con cadmio, se someten a los siguientes análisis:

- a) Hematológicos: glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

b) Bioquímicos: glucosa, urea, proteínas totales, albúmina en sangre, bilirrubina total, magnesio, calcio sérico y fósforo.

c) Enzimáticos: transaminasas: GOT, GPT, Gamma-GT, LDH, CPK.

## RESULTADOS

La tabla 1 muestra los valores experimentales de la permitividad y conductividad (S/m) para los tejidos de rata control y los tratados con cadmio.

Los valores vienen expresados con su media y  $\pm$  DS.

TABLA 1  
*Valores experimentales de permitividad y conductividad.*

TEJIDO	CONTROL		CADMIO	
	$\epsilon$	$\sigma$	$\epsilon$	$\sigma$
RIÑÓN	49,84 $\pm$ 1,09	1,77 $\pm$ 0,21	44,17 $\pm$ 0,98*	1,08 $\pm$ 0,10*
HÍGADO	42,6 $\pm$ 0,96	1,52 $\pm$ 0,08	42,50 $\pm$ 0,8**	1,35 $\pm$ 0,18**
PULMÓN	47,36 $\pm$ 0,69	1,64 $\pm$ 0,09	40,75 $\pm$ 1,33**	1,19 $\pm$ 0,09*
MÚSCULO	49,5 $\pm$ 0,64	1,77 $\pm$ 0,05	45,67 $\pm$ 1,37*	1,10 $\pm$ 0,09*
PÁNCREAS	41,7 $\pm$ 0,78	1,58 $\pm$ 0,09	51,99 $\pm$ 1,04*	1,20 $\pm$ 0,13*
TESTÍCULOS	51,0 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,05	54,5 $\pm$ 0,5	1,35 $\pm$ 0,15*

\*Diferencias muy significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,001$ )

\*\*Diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ )

### Parámetros sanguíneos

En la Tabla 2 se representan los parámetros sanguíneos de ratas tratadas con cadmio y control.

TABLA 2

*Parámetros hematológicos, bioquímicos y enzimáticos.  
(Los valores medios son expresados con la desviación estándar ( $\pm$ DS)).*

PARÁMETROS	CONTROL	CADMIO
<b>Hematología</b>		
Hemoglobina (g/dL)	12,75 $\pm$ 0,35	9,97 $\pm$ 1,50
Hematocrito (%)	37,30 $\pm$ 0,8	31,8 $\pm$ 6,10
Plaquetas ( $10^3$ /mm <sup>3</sup> )	896 $\pm$ 48,9	1214 $\pm$ 41
Eritrocitos ( $10^6$ /mm <sup>3</sup> )	7,05 $\pm$ 0,49	5,7 $\pm$ 1
<b>Bioquímica</b>		
Proteínas totales (g/100mL)	6,3 $\pm$ 0,2	5,96 $\pm$ 0,61
Albumina (mg/100mL )	3,7 $\pm$ 0,12	2,35 $\pm$ 0,2
Urea (mg/100mL)	33 $\pm$ 2	39 $\pm$ 15,26
Ac. Úrico (mg/100mL)	2,4 $\pm$ 0,1	1,35 $\pm$ 0,25
Bilirrubina total (mg/100mL)	0,25 $\pm$ 0,05	0,575 $\pm$ 0,54
Glucosa (g/100mL)	166 $\pm$ 13	109 $\pm$ 3,5
Hierro sérico ( $\mu$ g/100mL)	259 $\pm$ 37	100,5 $\pm$ 28,84
Calcio sérico (mg/100mL)	11,7 $\pm$ 0,9	10,17 $\pm$ 1,17
Fósforo (mg/100mL)	7,5 $\pm$ 1,3	7,55 $\pm$ 0,25
Magnesio (mg/100mL)	2,2 $\pm$ 0,33	2,65 $\pm$ 0,47
<b>Enzimas</b>		
GOT (U/L)	93,5 $\pm$ 12,5	275,2 $\pm$ 17,3
GPT (U/L)	81 $\pm$ 12,9	47,75 $\pm$ 17
Gamma-GT (U/L)	0	2 $\pm$ 1,22
LDH (U/L)	252,5 $\pm$ 30,5	1004 $\pm$ 55,7
CPK (U/L)	277,5 $\pm$ 59,5	651,5 $\pm$ 58,4

## DISCUSIÓN

En los experimentos que se presentan en este trabajo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas tanto para la permitividad como para la conductividad, entre los hígados tratados con cadmio y los controles. Estos resultados se corresponden con los parámetros sanguíneos, en los que se observa un aumento de la GOT y LDH que indica daño hepático por los efectos del cadmio. En el hígado el cadmio provoca fibrosis intralobulares, cirrosis y descenso de la integridad estructural de los hepatocitos. Además este

metal induce la síntesis de metalotioneína en hígado considerada como de defensa, por la asociación de cadmio y prevención de sus efectos tóxicos (7).

En los pulmones, la permitividad en las muestras de rata tratadas con cadmio ha mostrado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. En cuanto a la conductividad, medida en la frecuencia de microonadas, se observa una disminución respecto a los controles. Los cambios significativos en la permitividad y conductividad tisular, pueden ser indicativos de la toxicidad de los metales pesados en los pulmones. Estudios previos con ratas expuestas a cadmio han mostrado que la toxicidad principal se diagnosticó en el sistema respiratorio, caracterizado por inflamación, necrosis y fibrosis pulmonar (8,9). El resultado del análisis de sangre muestra que las ratas tratadas con cadmio tienen unos niveles de hematocrito y hemoglobina por debajo de los valores normales debido a que el tratamiento con cadmio induce a anemia y afecta significativamente a la médula ósea, metabolismo de los eritrocitos y ciertas proteínas plasmáticas.

En el riñón también se han observado diferencias significativas en la permitividad y conductividad entre el grupo control y el grupo tratado con cadmio. El hecho de que el riñón, aparte del hígado, sea un órgano diana para la toxicidad y acumulación de numerosos metales, podría explicar los cambios observados en la permitividad compleja. En concreto, la corteza renal es el principal tejido que sufre lesión, nefrotoxicidad y acumula cadmio (10).

Las medidas de la permitividad en el páncreas de ratas tratadas con cadmio, mostraron diferencias muy significativas al ser comparadas con los controles.

Se sabe que este metal a grandes dosis puede provocar una disfunción pancreática, que afecta principalmente a los islotes de Langerhans que, en condiciones normales, elaboran la síntesis de insulina e inducen a su secreción, necesarias para la regulación del metabolismo de los carbohidratos. Además el páncreas se vuelve más suave, esponjoso y de un color que varía entre el marrón y marrón-rojizo. El cadmio y los demás metales pesados producen un aumento de la secreción de insulina provocando unos niveles muy bajos de azúcar en sangre.

En el músculo, se observa que el cadmio tiene una fuerte influencia en ambas, permitividad y conductividad. El calcio es muy importante en los procesos implicados en la contracción muscular, y en muchas ocasiones el cadmio puede sustituir al calcio y puede bloquear la función específica de sus proteínas, lo que conlleva a un mal funcionamiento del sistema muscular con el consiguiente bloqueo metabólico con daño y posterior lesión muscular. Además se observa un nivel elevado en sangre de la enzima creatinfosfoquinasa, indicadora de daño muscular, una de las fuentes de energía muscular, responsable de la síntesis de APT a partir de ADP.

En los testículos se produce un aumento de la permitividad y conductividad; el cadmio afecta a estos órganos ya que provoca edema intersticial en las células, hemorragia, reducción en la producción de andrógenos por las células de Leydig, necrosis de las células de Sertoli, inhibición de la espermatogénesis y atrofia testicular.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Fondo de Investigaciones Sanitarias, la ayuda N° 98/0050-02; y a la Comunidad Autónoma de Madrid la ayuda N° 08.8/0002/97, que han permitido la realización de este trabajo.

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) REPACHOLI, M.H. (1998): Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromag.* 19, 1-19.
- (2) AZANZA, M.J., DEL MORAL, A. (1994): Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog. Neurobiol.* 44, 517-601.
- (3) AZANZA, M.J., DEL MORAL, A. (1996): Isolated neuron amplitude spike decrease under static magnetic fields. *J. Magn. Magn. Mat.* 157-158, 593-594.
- (4) GABRIEL, C., GABRIEL, S., CORTHOUT, E. (1996): The dielectric properties of biological tissues: I. Literature Survey. *Phys. Med. Biol.* 41, 2231-2249.
- (5) GABRIEL, S., LAU, R. W., GABRIEL, C. (1996): The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. *Phys. Med. Biol.* 41, 2271-2293.
- (6) Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° C 205/440, Documento N° A3-0238/94, del 5 Mayo de 1994.

- (7) SÁNCHEZ REUS, M.I., INIESTA, M.P. and RIBAS, B. (1991): Metallothionein 1 a molecular marker in cadmium nephrotoxicity. *Toxicol. Environ. Chem.* 30, 63-67.
- (8) LATIN, WO L.M., IKEDIABI, C.O., SINGH, N.P., SPONHOLTZ, G., FASANYA, C. and RILEY L. (1997): Comparative studies of in vivo genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain, kidney and liver cells. *Cell. Mol. Biol. Noisy. Le. Grand.* 43, 203-21
- (9) CALABRESE, E.J., KENYON, E.M. (1991): Lewis Publishers. Chelsea, M.I.
- (10) WAALKES, M.P., COOGAN, T.P., BARTER, R.A. (1993): Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 175-201.



## **Determinación de las constantes de la reacción de hidrólisis de Ceftriaxona por cromatografía de líquidos**

A.L.DOADRIO, A. MAYORGA, P. MADRIGAL Y R. ORENGA  
*Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid*  
*Teléfono 913941789. Fax 913941786*  
*e-mail: antoniov@eucmax.sim.ucm.es*

### **RESUMEN**

Hemos realizado la determinación de las constantes de la reacción de hidrólisis de la Ceftriaxona por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 7 y a temperaturas de 30 a 60°C. Asimismo a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos y del estudio de los espectros de U.V. de las fracciones cromatográficas eluidas, es posible deducir el mecanismo de reacción que tiene lugar en nuestras condiciones de ensayo.

**Palabras clave:** Ceftriaxona.—Hidrólisis.—HPLC.

### **SUMMARY**

#### **Determination of ceftriaxone hydrolysis constants reaction by high pressure liquid chromatography**

In this paper, we have carried out the determination of ceftriaxone constants reaction by liquid chromatography at a pH range of 2-7 and temperatures of 30-60°C. From the study of chromatographic profiles and U.V. spectra of the eluted fractions, it is possible to propose the reaction mechanism consider in the assay conditions.

**Key words:** Ceftriaxone.—Hydrolysis.—HPLC.

## INTRODUCCIÓN

Las reacciones de hidrólisis de cefalosporinas y penicilinas son muy similares (1,2). La cinética de la reacción de hidrólisis de penicilinas ha sido determinada por métodos potenciométricos y espectrofotométricos (3), pero estos resultaron ser poco selectivos.

En otros trabajos publicados por nosotros (4), realizamos la determinación de las constantes de hidrólisis por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), puesto que es un método mucho más selectivo que los anteriores, y tiene la ventaja de que se puede separar al antibiótico de sus productos de hidrólisis, ya que por la alta capacidad de separación de la técnica, es posible la elución de los solutos en picos cromatográficos diferentes, con lo cual se simplifica el estudio del mecanismo de reacción al poder identificar los productos que se van formando.

En nuestro estudio, hemos efectuado la determinación de las constantes de reacción de hidrólisis de la Ceftriaxona por cromatografía de líquidos, en un intervalo de pH de 2 a 7 y sometiéndola a temperaturas de 30 a 60°C. A medida que aumenta la temperatura y la hidrólisis es más pronunciada, se pueden detectar en cada momento los niveles correspondientes a la Ceftriaxona residual y a sus productos de hidrólisis.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. Aparatos

El equipo de cromatografía de líquidos está configurado con dos bombas Waters M-6000-A, detector de longitud de onda variable Kontron Uvikon 730 LC, detector de Diodos LDC SM 5000, e inyector automático Kontron 460 unidos mediante una interfase RS232C y software SM 5000 v. 1.05. El inyector automático, las bombas y el detector Kontron Uvikon 730, fueron controlados mediante el software D450v. 2,0 de Kontron.

En la hidrólisis selectiva de nuestras muestras se ha empleado un baño de agua termostaticada Selecta modelo 140-B.

En el ajuste de pH de las muestras y tampones se ha empleado un pH-metro Methrom-Herisau E-520.

## 2. Condiciones cromatográficas

Fase móvil: tampón  $K H_2PO_4$  a pH = 2,5 y metanol (70:30)  
Flujo: 1mL/min  
Longitud de onda: 254 nm  
Inyección: 10 $\mu$ L muestra.

## 3. Columna

Se ha utilizado una columna analítica Spherisorb ODS-18 de 10 mm (25x0,46 cm) suministrada por Merck, con un número de platos teóricos por metro >80000.

## 4. Reactivos.

El metanol utilizado en la fase móvil fue de calidad HPLC suministrado por Scharlau.

Se ha empleado un patrón de Ceftriaxona sódica comercial, de una riqueza del 99,14 %, valorada por el método yodométrico de la USP, a una concentración de 0,5 mg/mL. Asimismo, se ha utilizado 7-ADCA patrón suministrado por los laboratorios SKF, para intentar identificar uno de los productos de hidrólisis de la Ceftriaxona, a una concentración de 1 mg/mL.

Tanto la fase móvil como las muestras se filtran a través de filtros Millipore de 0,22  $\mu$ . Los disolventes de la fase móvil se desgasifican empleando una corriente de Helio.

## 5. Preparación de los tampones

Se han utilizado tampones a valores de pH = 2, 3, 4, 5, 6 y 7, preparados según el método de Sørensen (5).

## 6. Temperaturas de trabajo

Las muestras se han sometido sucesivamente a las temperaturas de ensayo de 30, 40, 50 y 60° C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma obtenido en el ensayo de la Ceftriaxona, a tiempo inicial, pH = 4 y T = 30°C, se muestra en la figura 1, donde se manifiestan dos picos cromatográficos; el pico I, que tiene un tiempo de retención de 1,84 min. y el pico II, de mayor estabilidad, de tiempo de retención de 2,10 min., con el cual realizamos el tratamiento cuantitativo.

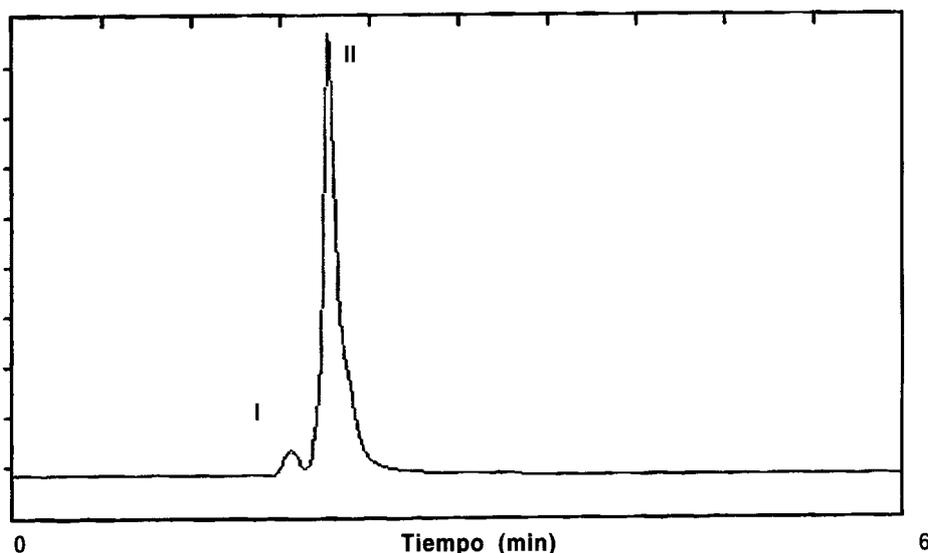


Figura 1: Cromatograma de la Ceftriaxona a tiempo inicial. T = 30°C y pH = 4. I. tr = 1,84 min. II. tr = 2,10 min.

Tanto el pico cromatográfico I como el II, manifiestan un espectro de absorción U.V. con máximos a 275, 139 y 203 nm, tal como se manifiesta en la figura 2.

En los demás valores de pH y temperaturas ensayadas, a tiempo inicial, se dan perfiles cromatográficos idénticos.

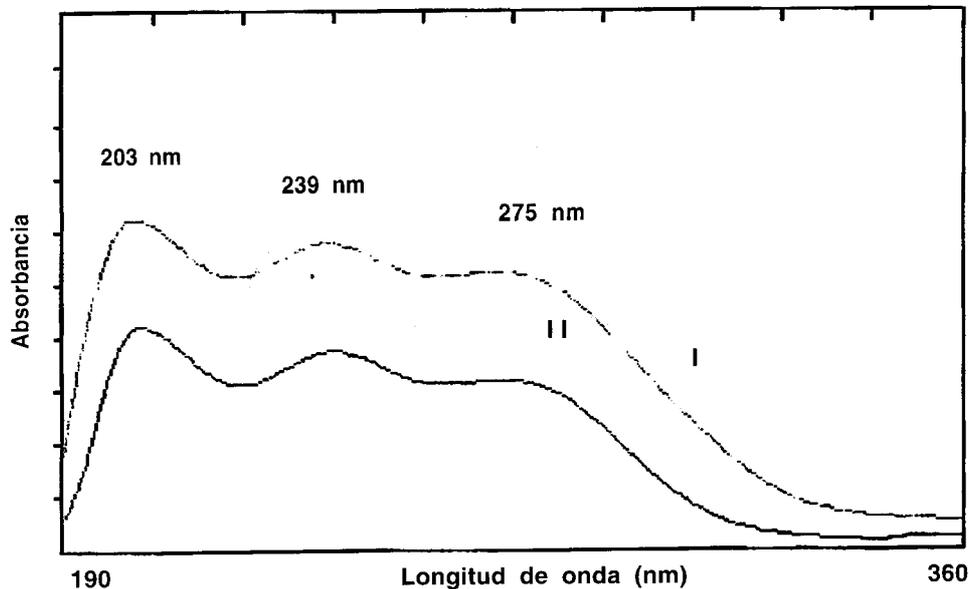


Figura 2. Espectros U.V. de los picos I y II de Ceftriaxona en las condiciones de ensayo por inyección en el cromatógrafo.

A partir de dos horas de degradación, en las mismas condiciones cromatográficas, pH = 4 y T = 30°C, se observa en el cromatograma, la aparición de otro pico cromatográfico, el pico III, de tiempo de retención de 2,26 min., tal como se muestra en la figura 3. El espectro U.V. de este último pico (pico III), presenta tres máximos a 279, 239 y 191 nm. Como se puede observar en la figura 4, los máximos de absorción se manifiestan a longitudes de onda prácticamente idénticas a las del pico del isómero mayoritario de la Ceftriaxona (pico II), pero el aspecto del espectro de absorción no es el mismo, disminuyendo la absorción del máximo 279-280 nm y aumentando el de 190-200 nm. El pico cromatográfico III, no se manifiesta a tiempo inicial y va aumentando conforme transcurre el tiempo de hidrólisis de la Ceftriaxona, por lo que debe tratarse de un producto de degradación, que previsiblemente sea el 7-ADCA, ya que el espectro de absorción y la retención cromatográfica del patrón de 7-ADCA es coincidente con éste pico III.

En los distintos valores de pH y temperatura en los que fue ensayada la degradación de la Ceftriaxona, los cromatogramas obtenidos presentan el mismo perfil que el descrito anteriormente.

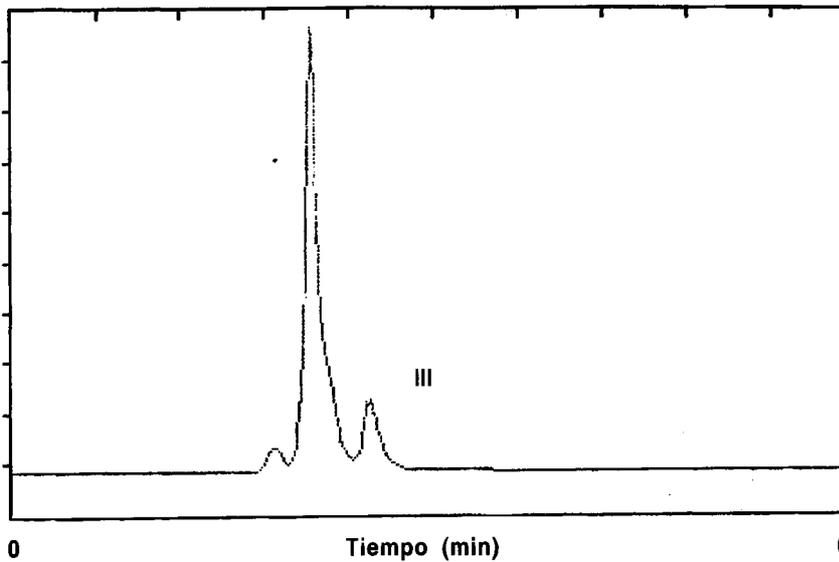


Figura 3. Cromatograma de la Ceftriaxona degradada. T = 30°C y pH = 4, I. tr = 1,86 min. II. tr = 2,10 min. III. tr = 2,26 min.

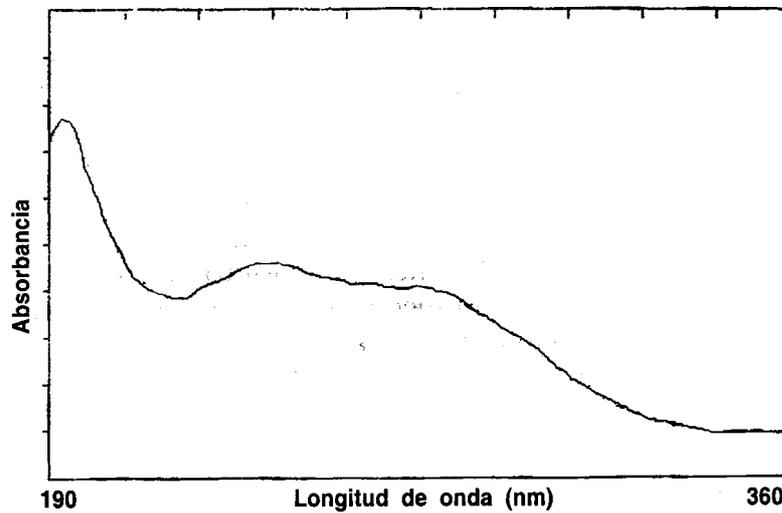


Figura 4. Espectro U.V del pico III. tr = 2,26 min. T = 30°C y pH = 4.

Puesto que en todos los cromatogramas obtenidos se ha registrado la presencia de los mismos productos de hidrólisis podemos deducir que el mecanismo de reacción, en nuestras condiciones de ensayo, es el mismo en todo el intervalo de pH en el que hemos operado y, que debe corresponder a una ruta hidrolítica ácida, tal como se muestra en la figura 5, en la que se reflejan los productos recogidos en el ensayo cromatográfico.

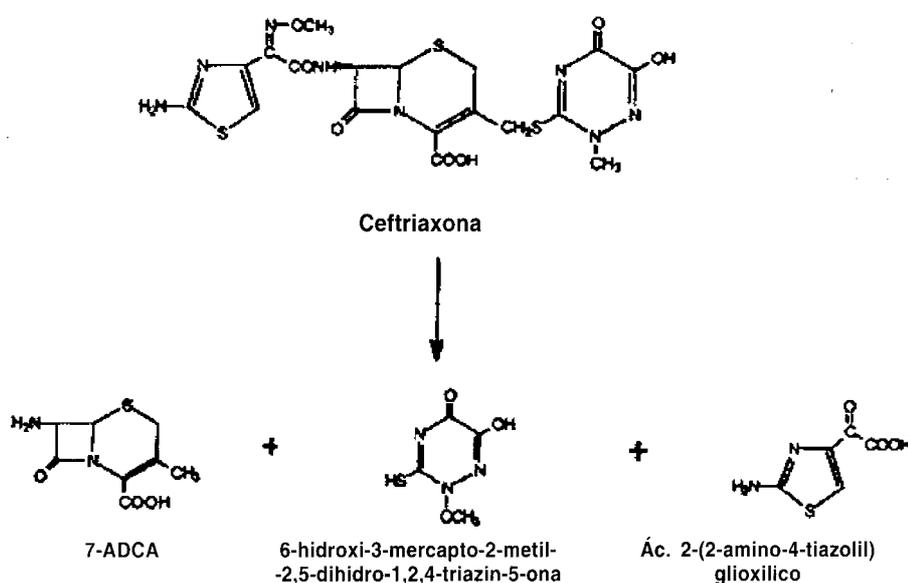


Figura 5. Ruta propuesta de hidrólisis de la Ceftriaxona.

La hidrólisis de la Ceftriaxona sigue, fundamentalmente, una cinética de orden uno, en estas condiciones, como se deduce de los correspondientes de correlación de las rectas de regresión lineal. Los coeficientes de regresión lineal y los correspondientes valores de las constantes de reacción de orden uno (Kobs), se dan en la Tabla I.

TABLA I  
 Coeficientes de regresión lineal y constantes observadas

pH	T°C	R	Kobs
2	30	-0,985	0,584
	40	-0,979	0,617
	50	-0,921	0,796
	60	-0,980	1,189
3	30	-0,997	0,463
	40	-0,994	0,496
	50	-0,963	0,591
	60	-0,926	0,760
4	30	-0,998	0,162
	40	-0,986	0,195
	50	-0,977	0,427
	60	-0,922	0,554
5	30	-0,983	0,140
	40	-0,985	0,173
	50	-0,971	0,445
	60	-0,914	0,573
6	30	-0,987	0,202
	40	-0,963	0,235
	50	-0,951	0,524
	60	-0,904	0,651
7	30	-0,949	0,108
	40	-0,921	0,141
	50	-0,972	0,362
	60	-0,959	0,490

Representando el log. Kobs frente a los valores de pH, obtenemos un perfil característico de una reacción de hidrólisis (figura 6), donde se pueden observar dos puntos de inflexión. Según se deduce de la gráfica de la figura 6, la degradación es máxima en los valores de pH más ácidos (2-3), con un punto de inflexión a pH = 4, donde la degradación de la Ceftriaxona es inferior, hasta un pH = 6 donde aumenta. Una vez superado este último valor de pH = 6, la Ceftriaxona va disminuyendo su degradación conforme nos acercamos al valor de pH = 7.

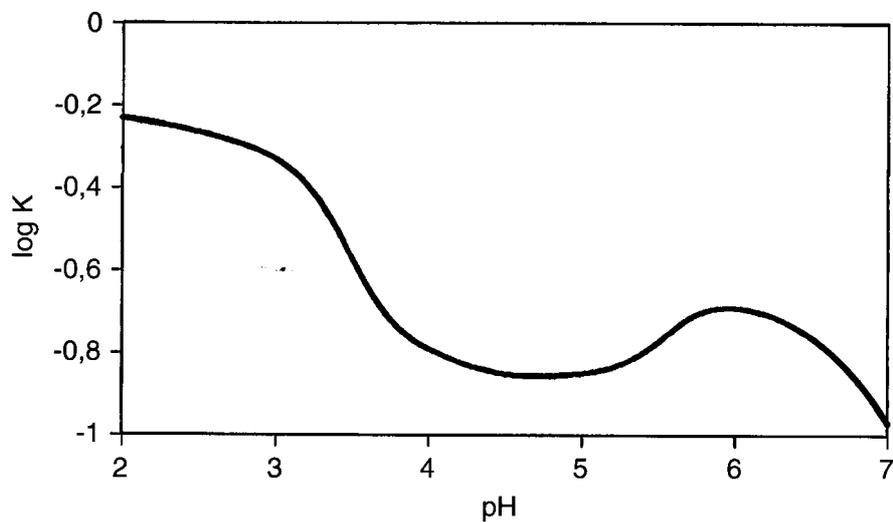


Figura 6. Representación del log. Kobs. Frente al pH a T = 30°C.

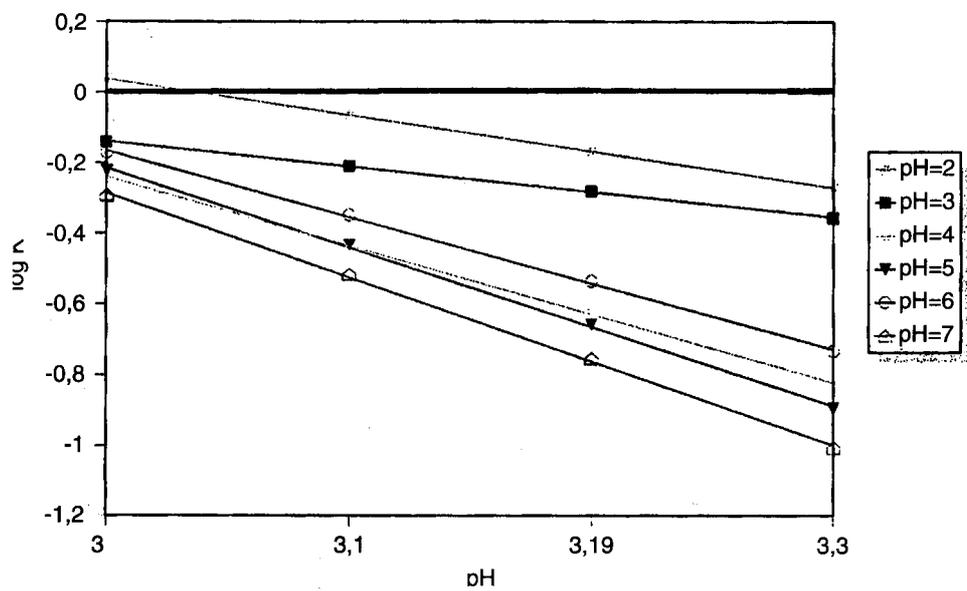


Figura 7. Representación de Arrhenius.

Las correspondientes rectas de regresión lineal obtenidas por la aplicación de la ecuación de Arrhenius, representando los logaritmos de las constantes de velocidad de primer orden frente a  $1/T$ , se muestran en la figura 7, en los distintos valores de pH, mientras que las Energías de Activación, obtenidas según la ecuación:

$$E_a = 2,303 \cdot R \cdot a$$

se dan en la Tabla II. En esta tabla se observan altos valores de la Energía de Activación de Arrhenius, siguiendo un orden de pH:

$$\text{pH} = 3 < 2 < 6 < 4 < 5 < 7$$

que resulta prácticamente inverso al de la velocidad de reacción de hidrólisis  $2 > 3 > 6 > 4 > 5 > 7$ .

Tabla II

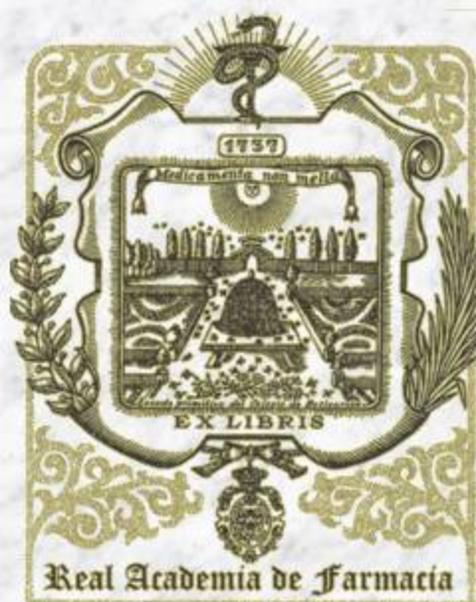
*Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (Kcal/mol)*

PH	Ea
2	55,01
3	53,58
4	59,24
5	60,62
6	58,90
7	61,25

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) KUCHINSKAS, E. J, LEVY, G. N. (1977): *J. Pharm. Sci.* 61: 727-9.
- (2) VAN KRIMPEN, P. C, VAN BENNEKOM, W. P. (1987): *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition.* 9: 1-23.
- (3) HOU, J. P, POOLE, J. W. (1969): *J. Pharm. Sci.* 58, 4: 447-454.
- (4) MERCK. Tabla de tampones.
- (5) DOADRO, A. L, IRIBARREN, M. (1990): *Anal. Real. Acad. Farm.* 56: 9-19.





MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA

[www.ranf.com](http://www.ranf.com)