

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

EVIDENCIAS SOBRE CONTROL GENETICO DEL CICLO CELULAR EN
CELULAS MERISTEMATICAS DE CEBOLLA (ALLIUM CEPA L.)
POR BROMOSUSTITUCION E IRRADIACION

JORGE EDUARDO SANS PUROJA

- 1985 -

EVIDENCIAS SOBRE CONTROL GENETICO DEL CICLO CELULAR EN
CELULAS MERISTEMATICAS DE CEBOLLA (ALLIUM CEPA L.)
POR BROMOSUSTITUCION E IRRADIACION

Tesis

entregada a la

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Grado de

Magister en Ciencias Biológicas

con Mención en Biología Celular

por

JORGE EDUARDO SANS PUROJA

Patrocinantes de Tesis: Prof. Dr. Norbel Galanti Garrone
Prof. Dra. Consuelo De la Torre y
García-Quintana

- 1985 -

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JORGE EDUARDO SANS PUROJA

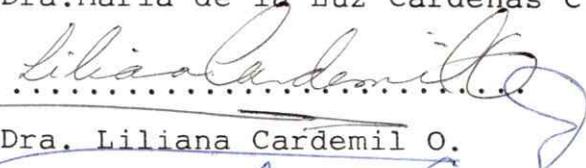
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular

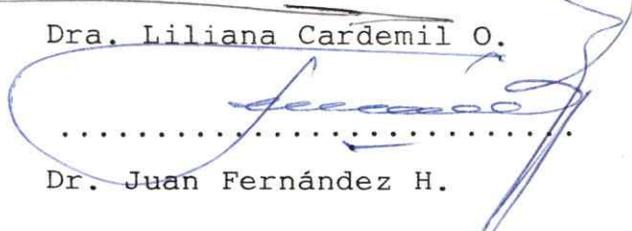
Patrocinante de Tesis


.....
Dr. Norbel Galanti G.

Comisión Informante de Tesis


.....
Dra. María de la Luz Cárdenas C.


.....
Dra. Lilitiana Cardemil O.


.....
Dr. Juan Fernández H.

"Omnis cellula e cellula"

Virchow, 1855

A MI MADRE, RODRIGO, DIEGO Y
DARINKA

A G R A D E C I M I E N T O S

Al culminar este trabajo quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente lo hicieron posible.

A la Dra. Consuelo de la Torre, maestra y amiga, a quien siempre he tenido como ejemplo por su calidad humana y de gran científico.

Al Prof. Dr. Norbel Galanti, mi amigo, con quien me inicié, ya hace 12 años, en este caminar por este fascinante mundo de la regulación de la proliferación celular.

A los Profesores Raúl Fernández y Remigio López, por la lectura crítica de esta tesis.

A mi sobrina Verónica, a las Sras. Iris Rojo y Natacha Salgado por transcribir pacientemente mis manuscriptos preliminares.

A la Srta. Julia Palma por su esmerada transcripción mecanográfica del manuscrito final.

Al Sr. Héctor Muñoz por su valioza ayuda en la parte fotográfica; a los Sres. Juan Fernández y Roberto Ortiz por la mantención del material de laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio Cecilia Leyton, Julieta González y Myriam Santos por su constante apoyo y amistad.

A todos mis amigos del Instituto de Biología Celular, C.S.I.C. de Madrid, Gonzalo Giménez-Martín, Aurora González-Fernández, Jorge López-Sáez, María Luisa Moreno, Patricio Aller y Margarita Carrascosa, por la gran acogida y apoyo que me han brindado en todas las oportunidades que he estado junto a ellos.

A mi Madre y a mis hijos Rodrigo y Diego por su paciencia y extrema comprensión al soportar mis ausencias y malos momentos.

Por último a Darinka, quien no sólo me ha brindado su amor, sino que además, su comprensión y apoyo incondicional, lo que ha estimulado en mí ese deseo de seguir adelante.

I N D I C E

	PAG.
INDICE DE MATERIAS	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	18
1. Material	18
2. Tratamientos	18
2.1. Bromosustitución	20
2.2. Tratamiento con cafeína	21
2.3. Irradiación con luz de 300-400 nm	21
3. Procedimientos citológicos	24
3.1. Tinción con orceína acética	24
3.2. Tinción con reacción de Feulgen	26

CONTINUACION INDICE DE MATERIAS

	PAG.
3.3. Control citológico de la bromosustitución.	28
3.4. Estudio microdensitométrico	31
4. Medición del crecimiento radicular	32
RESULTADOS	34
1. Control citológico de la bromosustitución	34
2. Efecto de la bromosustitución e irradiación sobre el crecimiento radicular.	38
3. Efecto de la bromosustitución e irradiación sobre la actividad mitótica del meristema.	46
4. Efecto de la bromosustitución e irradiación sobre la interfase.	53
5. Detección del momento en G_2 en que se expresa la función responsable del inicio de la mitosis.	62
6. Efecto de la bromosustitución sobre la síntesis de proteínas responsables del inicio de la mitosis.	71

CONTINUACION INDICE DE MATERIAS

	PAG.
7. Detección de un punto de control en profase responsable de la transición profase - metafase.	77
8. Detección en el período replicativo de la fracción del DNA responsable de la progresión de las células a través del período S.	87

DISCUSION

BIBLIOGRAFIA

L I S T A D E T A B L A S

PAG.

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Contenido de DNA en núcleos de células meristemáticas en telofase y en profase, teñidos por la reacción de Feulgen fluorescente. | 56 |
| 2 | Criterio arbitrario utilizado para identificar células en G_1 , S y G_2 , mediante la determinación microfluorométrica del contenido de DNA nuclear. | 57 |

L I S T A D E F I G U R A S

	PAG.
1. A) Cultivo de bulbos para la obtención de raíces.	
B) Vista general de una gradilla de cultivo.	19
2. Irradiación de los bulbos con luz de 300-400 nm.	22
3. Cromosomas de células meristemáticas, teñidos con la técnica del FPG.	37
4. Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 12 horas.	42
5. Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 24 horas.	43

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
6. Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 36 horas.	44
7. Gráfico resumen del efecto de la irradiación sobre el crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído, durante 12, 24 y 36 horas.	45
8. Células meristemáticas en distintas etapas de la mitosis, en aplastados de raíces teñidas con orceína acética.	47
9. Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 12 horas.	49

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
10. Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituido e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 24 horas.	50
11. Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituido e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 36 horas.	51
12. Frecuencia de células meristemáticas en cuatro períodos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), en raíces no tratadas (control) y en raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas (BrdUrd).	60

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

- | | PAG. |
|---|------|
| 13. Frecuencia de células meristemáticas en cuatro períodos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), en raíces no tratadas (control), raíces no tratadas e irradiadas (control \swarrow), y en raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas e irradiadas (BrdUrd \swarrow). | 61 |
| 14. Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de una población de células binucleadas con DNA, unifilarmente bromosustituído. | 65 |
| 15. Células meristemáticas binucleadas en distintas etapas de la mitosis, teñidas con orceína acética. | 68 |

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
16. Efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído.	70
17. Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la bromosustitución sobre el momento en que hay síntesis de proteínas responsables del punto de transición en G_2 .	72
18. Efecto de la anisomicina sobre la progresión de células binucleadas a través del período G_2 .	74
19. Efecto de la anisomicina sobre la progresión de células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído a través del período G_2 .	76

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
20. Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído.	79
21. Efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído.	81
22. Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células meristemáticas mononucleadas en crecimiento asincrónico y con DNA unifilarmente bromosustituído.	83

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
23. Efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células mononucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído.	85
24. Esquema experimental diseñado para analizar el efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis, de una población de células binucleadas unifilarmente bromosustituídas en distintos segmentos de su DNA.	89
25. Efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de células binucleadas, unifilarmente bromosustituídas en distintos segmentos de su DNA.	91

L I S T A D E A B R E V I A T U R A S

- G_1 : Período post-mitótico y pre-replicativo del ciclo celular.
- S : Período en que se replica el DNA nuclear.
- G_2 : Período post-replicativo y pre-mitótico del ciclo celular.
- G_0 : Estado no proliferativo en que las células han salido del ciclo en G_1 .
- G_{02} : Estado no proliferativo en que las células han salido del ciclo en G_2 .
- M : Mitosis
- BrdUrd : 5-bromo-2-desoxiuridina
- A : Adenina
- T : Timina
- C : Citosina
- G : Guanina

CONTINUACION LISTA DE ABREVIATURAS

FPG	:	"Fluorescence Plus Giemsa"
^3H	:	Tritio
Tc	:	Tiempo de ciclo
ts	:	Temperatura sensible
dCTP	:	Desoxicitidina trifosfato
u.a.	:	Unidades arbitrarias
D.S.	:	Desviación estandar

R E S U M E N

En la presente tesis se analiza la posible relación existente entre eventos específicos del ciclo celular y la expresión de sectores particulares del genoma en células meristemáticas de raíces de bulbos de Allium cepa L.

Con este fin se analizó el efecto mutagénico de la luz ultravioleta de longitud de onda larga (300-400 nm), sobre genomas con DNA bromosustituído. La premisa de este análisis es que la irradiación, al ser mutagénica, altera la expresión de todos aquellos segmentos del DNA bromosustituídos que deban transcribirse después de efectuada la irradiación. Este hecho ocasiona un bloqueo de las células en todas aquellas etapas del ciclo celular cuya evolución probablemente depende de la expresión de dichos segmentos del DNA.

En una primera etapa, se efectuaron experimentos cuya finalidad fue detectar eventos asociados con crecimiento radicular que fuesen susceptibles de ser bloqueados por la irradiación y establecer su posible vinculación con etapas específicas del ciclo celular. De esta manera se com

probó, que la irradiación inhibe el crecimiento radicular en forma proporcional a la frecuencia de células meristemáticas con DNA unifilarmente bromosustituído, en cualquiera de sus dos cadenas. Estudios citológicos efectuados en aplastados de la región meristemática mostraron una disminución significativa de la frecuencia de células en mitosis. Este hecho indicaría que la inhibición del crecimiento radicular se debe, al menos en parte, a una disminución en la actividad proliferativa a nivel meristemático.

Mediante un análisis microdensitométrico del contenido de DNA de las células en interfase, se observó que la disminución de la frecuencia de mitosis se debe a acumulación de células en G_1 y en G_2 . Este resultado pone en evidencia la existencia de al menos dos puntos de control genético del ciclo celular de las células meristemáticas de la raíz de cebolla, uno en G_1 y el otro en G_2 .

En una segunda etapa, la tesis se centró en el análisis más detallado del punto de control existente en G_2 . Con este fin, se utilizó una población sincrónica de células meristemáticas seleccionadas y marcadas como células binucleadas, mediante un tratamiento con cafeína. Irradiaciones efectuadas en distintos momentos del G_2 , sobre células binucleadas con genoma unifilarmente bromosustituído,

permitieron detectar aproximadamente en la mitad de G_2 , la expresión de una función génica que es indispensable para que las células puedan iniciar la mitosis.

A través de un estudio secuencial realizado en células binucleadas, que presentan sólo segmentos de su DNA unifilarmente bromosustituído, fue posible vincular esta función del G_2 con un sector del DNA que replica aproximadamente en la mitad del período S.

Por otra parte, se comprobó que la irradiación de células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído en cualquiera de sus hebras, efectuada durante la profase, bloquea el tránsito profase-metafase. Además, estas células pierden las características nucleares de células en profase tomando el aspecto de células en interfase. Este hecho sugiere que el paso de profase a metafase estaría regulado por una función génica que se expresa durante la profase, la que además controlaría la mantención del estado profásico del núcleo.

Se concluye que en el ciclo proliferativo de las células meristemáticas de la raíz de Allium cepa L., existirían al menos tres puntos controlados genéticamente,

uno en G_1 , otro en G_2 y un tercero en profase. El control genético ejercido en G_2 estaría codificado por un segmento del DNA que replica aproximadamente en la mitad del período S.

A B S T R A C T

The aim of the present Thesis is the study of the relationship between cell cycle specific events and particular genomic regions in root meristematic cells of Allium cepa L. bulbs.

The selected methodological approach was the mutagenic effect of long wave ultraviolet light (300-400 nm) upon genomes containing bromosubstituted DNA. The basis of this method is the radiation-induced modification in the expression of all the bromosubstituted DNA regions, which should be transcribed after the irradiation. Thus, cell cycle dependent events may be blocked in those stages requiring the right expression of the involved DNA regions.

At the first stage, experiments were developed in order to detect root-growth associated events which may be blocked by irradiation and to establish their eventual relation to cell cycle specific stages. Accordingly, irradiation inhibits root growth in proportion to the frequency of meristematic cells containing DNA bromosubstituted in any of the two strands. Cytological studies on the meris-

tem region showed that the frequency of mitotic cells was significantly decreased. This result suggests that inhibition of root growth is at least partially due to a decrease in the proliferative activity of the meristematic region.

DNA quantification by microdensitometry showed that the decrease in the frequency of mitotic cells is caused by accumulation of cells in G_1 and G_2 . These results reveal the existence of at least two genetically controlled steps in the cell cycle of meristematic cells, one in G_1 and the other in G_2 .

With these results, the emphasis of the Thesis was focused on the analysis of the control point located at G_2 . For this purpose, a synchronous population of meristematic cells, with any of the two DNA strands bromosubstituted and tagged as binucleated after caffeine treatment, was used. These cells were differentially irradiated along G_2 , allowing the detection of DNA controlled functions necessary for the onset of mitosis. These functions are expressed at mid- G_2 and were related to a region of DNA replicating around, mid-S.

On the other hand, when binucleated cells containing DNA bromosubstituted in any of the two strands

were irradiated during prophase, the prophase-metaphase transition was blocked. Furthermore, the appearance of their nuclei became interphasic again. This fact suggests that the prophase-metaphase transition would be controlled by a genetic function expressed during prophase, which would be also responsible of keeping the nucleus at prophase.

In conclusion, results presented in this Thesis suggest that during the proliferative cycle of root meristematic cells of Allium cepa L. there would exist at least three genetically controlled steps located in G_1 , G_2 and prophase, respectively. The genetic control expressed in G_2 is coded for by a genomic region replicating around mid-S.

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

Se denomina ciclo celular al tiempo que transcurre desde el nacimiento de una célula hasta su división en dos células hijas. Dos son los eventos más trascendentales en este ciclo: la replicación del material hereditario y la división celular o mitosis. Ambos eventos están temporalmente desfasados (Mitchinson, 1971; Prescott, 1976; Baserga, 1976, 1985).

La duplicación del material hereditario es una condición necesaria para que las dos células que se originan por mitosis, reciban una copia fiel e íntegra de la información genética de la célula antecesora. Durante la mitosis, se lleva a cabo el reparto equitativo del material genético en dos nuevos núcleos y la distribución, no necesariamente equitativa, de los constituyentes citoplasmáticos. Esta última culmina con la división citoplasmática o citocinesis.

La replicación del DNA nuclear se lleva a cabo en un período discreto de la interfase (período S) (Howard y Pelc, 1953). En la mayoría de las células eucarióti-

cas, la síntesis de DNA nuclear va precedida por un intervalo comprendido entre el término de la mitosis y el inicio de S, (G_1), y seguido de otro intervalo, que transcurre desde el término de la replicación del DNA hasta el inicio de la mitosis (G_2). De esta manera, el ciclo celular queda subdividido temporalmente en cuatro etapas (G_1 , S, G_2 y M), durante las cuales deben ocurrir todos los eventos que en último término hacen posible la división celular (Mitchinson, 1971; Baserga, 1976, 1985; Prescott, 1976; Pardee y col., 1978).

Las células en activa proliferación pueden entrar, temporal o definitivamente, a un estado de reposo divisional abandonando el ciclo proliferativo en G_1 y/o en G_2 (Lajtha, 1963; Brunori y Ancora, 1968; Bryan, 1969; Epifanova y Terskikh, 1969; Ley y Tobey, 1970; Peterson y Gelfant, 1970; Gelfant y Smith, 1972; Evans y Van't Hof, 1974; Pardee, 1974; Epifanova, 1977; Baserga, 1978; Evans y col., 1979; Sans y De la Torre, 1979; Sans y col., 1980; Yanishevsky y Stein, 1981). Estos antecedentes muestran claramente la existencia de por lo menos dos puntos de control de la proliferación celular, uno en G_1 y otro en G_2 (Van't Hof y Kovacs, 1972).

El estudio del ciclo celular en las últimas dos décadas, ha estado orientado fundamentalmente a dilucidar los mecanismos que controlan la proliferación celular (Mitchinson, 1971; Baserga, 1976, 1985; Prescott, 1976; Giménez-Martín y col., 1977; Pardee y col., 1978; Houchhauser y col., 1981; Yanishevsky y Stein, 1981; Lloyd y col., 1982). En la actualidad está claro que la actividad proliferativa de una población celular está regulada por señales del medio que afectan en último término a los genes o a los productos de los genes que controlan la división celular, mediante los cuales las células responden a estas señales. Desde esta perspectiva el análisis del ciclo celular se ha traducido por una parte, en la identificación de los factores que estimulan o inhiben la proliferación celular y por otra, en el estudio de las respuestas celulares a estos factores, con especial énfasis en la identificación de los genes y sus productos que regulan la división celular (Baserga y col., 1982; Baserga, 1985).

El análisis genético del ciclo celular realizado tanto en células eucarióticas inferiores, que tienen la propiedad de desarrollarse en forma haploide (Howell, 1974; Harwell, 1978; Lloyd y col., 1982) como en mutantes termosensibles de células eucarióticas (Sheinin, 1980), demuestra

que la progresión de las células a través del ciclo proliferativo depende de un número determinado de genes que se expresan en forma simultánea o consecutiva, en las distintas etapas del ciclo celular.

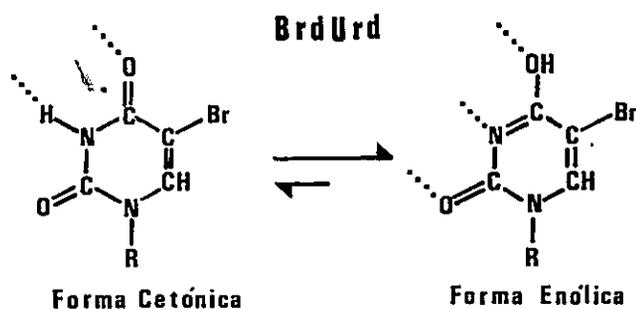
La identificación de genes que regulan el ciclo celular ha sido particularmente difícil en el caso de las células eucarióticas superiores, debido a su condición de diploide. A fin de soslayar este problema, se han desarrollado diversas estrategias y metodologías experimentales. Una de ellas es la fusión interespecífica de células somáticas en cultivo, que permite por exclusión la adscripción de determinadas funciones a cromosomas. Otra, es el uso de mutantes termosensibles del ciclo (ts) (Basílico, 1977; Levin, 1978) que dejan de proliferar al ser trasladadas a una temperatura no permisiva. En algunos casos, el uso de las mutantes ts se ha combinado con el procedimiento de hibridación interespecífica de células somáticas, intentando por complementación la localización de algunas funciones particulares del ciclo en determinados cromosomas de estas células (Croce y Koprowsky, 1974; Ruddler y Creagan, 1975; Ming y col., 1976; Baserga y col., 1977). Por otra parte, las nuevas técnicas de biología molecular (DNA recombinante, clonación, transfección o microinyección de fragmentos de genes,

etc., Watson y col., 1983) han hecho posible, por ejemplo, la identificación dentro del gen temprano del virus SV-40, las secuencias nucleotídicas responsables de la inducción de la replicación del DNA y de la activación de los cístrones ribosomales de la célula hospedadora (Floros y col., 1981; Baserga y col., 1982; Galanti y col., 1982). En la actualidad se ha profundizado esta área lográndose elaborar genotecas de genes cuya expresión juega un rol fundamental en la progresión de las células eucarióticas superiores a través del ciclo celular (Hirschhorn y col., 1984).

Todas estas metodologías y estrategias experimentales han sido de gran utilidad en el estudio genético del ciclo celular en células eucarióticas superiores mantenidas en cultivo. Sin embargo, ellas no son aplicables con este mismo fin a células somáticas dentro de un tejido en el que se conservan todas las interacciones naturales de una población celular. En este caso, un camino para el análisis genético del ciclo celular es introducir modificaciones en el DNA, que lleven a la aparición de productos génicos defectuosos. Estos pueden traducirse en alteraciones funcionales específicas identificables desde un punto de vista funcional o morfológico.

Se ha visto que la sustitución de la timidina por 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdUrd) durante la replicación del DNA, induce una serie de cambios celulares. Así, inhibe la diferenciación celular (Bischoff y Holtzer, 1970; Goz, 1978; Merrill y col. 1980), en algunos casos disminuye y en otros aumenta la actividad de algunas enzimas (Goz, 1978; Colleta y col., 1979; Sander y Hadwiger, 1979; O'Brien, 1980), e induce la expresión de oncogenes (Goz, 1978), entre otros efectos. Estos cambios han sido atribuidos a un efecto mutagénico del BrdUrd. Este, se debería a la existencia de apareamientos anómalos de este nucleósido con la guanina. Se postula que el bromo electrofílico en posición 5', favorece la forma aniónica o enólica tautomérica de la base halogenada* (configuración poco frecuente para la timina). En estas condiciones, el análogo puede formar tres puentes de hidrógeno y tiende a aparearse preferentemente con la guanina (Lawley y Brookes, 1962; Goz, 1978).

*



Hopkins y Goodman (1980), han propuesto que el BrdUrd puede producir dos tipos de cambios de pares de bases en el DNA. Uno en la que un par A-T es sustituido por un par G-C a causa de un error en la replicación, y otro, en la que un par G-C es cambiado a un par A-T, como producto de un error en la incorporación.

En el primer caso, BrdUrd se incorpora al DNA en reemplazo de la timidina durante el período replicativo. Al replicarse este DNA bromosustituido, el análogo incorporado tiende preferentemente a aparearse con la guanina. En un segundo ciclo de replicación, esta guanina se aparea normalmente con la citosina. De esta manera se produciría la transición de un par A-T a G-C después de dos ciclos replicativos.

En el segundo caso el BrdUrd presente en el "pool" interno se aparearía en forma anómala con la guanina durante la incorporación, probablemente como consecuencia de una caída en el "pool" interno de desoxicitidina trifosfato (dCTP) (Hopkins y Goodman, 1980). En el ciclo replicativo siguiente, el BrdUrd incorporado en su forma similar a timidina, puede aparearse con adenina. En este caso, durante la replicación siguiente la adenina puede aparearse normalmente

con timina, dando como resultado una transición de un par G-C a A-T. En todo caso, esta transición parece ser menos frecuente que la anterior. Al respecto, Laskin y Goodman (1985) han demostrado claramente en un sistema de replicación *in vitro*, que usa como molde el DNA del bacteriófago M13 (M13 mp-8 ó 9), que el BrdUrd incorporado al DNA se aparee en una alta frecuencia con la guanina. Este apareamiento es 4-10 veces superior a apareamientos entre timina-guanina.

Por otra parte, Skopek y Hutchinson (1982) han demostrado en fago lambda, que el BrdUrd induce preferentemente una transición de pares A-T a G-C, la que es dependiente de la secuencia nucleotídica del sector del genoma involucrado, existiendo la gradiente $5' \text{A-C-G-C} 3' > \text{A-C (A, C o T)} > \text{A (A, G o T)}$.

La existencia de apareamientos anómalos durante la replicación del DNA, sugiere que este mismo fenómeno puede ocurrir durante la transcripción de la información genética.

Hill y col. (1974) han demostrado en células 3T6, que el reemplazo de aproximadamente el 20% de la timidina por BrdUrd en el DNA, provoca una mayor incorporación

de guanosina y una menor incorporación de adenosina al RNA. Esto es más evidente cuando se usa como molde cromatina en vez de DNA aislado.

Este resultado sugiere que la incorporación de BrdUrd al DNA, por cualquiera de los mecanismos discutidos, puede expresarse en una alteración en el proceso de transcripción. Este hecho llevaría invariablemente a la aparición de proteínas modificadas en su secuencia de aminoácidos, lo que puede implicar una pérdida de su actividad biológica. Apoyan un tanto esta sugerencia estudios recientes realizados con técnicas de biología molecular (genética inversa o mutagénesis dirigida, ver Watson y col., 1983), que han demostrado que el cambio de un nucleósido de un codón, que implique el cambio de un solo aminoácido, puede producir una baja considerable en la actividad biológica de la proteína (Weinmaster y col., 1984; Mishina y col., 1985).

Por otra parte, se ha sugerido que la incorporación de BrdUrd al DNA puede inhibir la transcripción del genoma. Preisler y col., 1973, han demostrado en células de ratón con eritroleucemia de Friend, que el BrdUrd bloquea la síntesis de globina, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de RNA mensajero para esta molécula. Lykkesfeldt

y Andersen, (1977), han demostrado en Tetrahymena pyriformis que el BrdUrd inhibe preferencialmente la síntesis de RNA nucleolares 17 y 25S. Estos resultados están sugiriendo que el BrdUrd puede inhibir la expresión génica.

La inhibición de la expresión de un gen, puede llevarse a cabo al menos por dos mecanismos. La incorporación del BrdUrd en el DNA puede inducir un mayor grado de condensación de la cromatina que lleva a una menor capacidad transscriptiva. Al respecto, Augenlicht y col. (1974), han demostrado que la incorporación de BrdUrd al DNA produce alteraciones en las propiedades físicoquímicas de la cromatina, tales como cambios en el patrón de dicroísmo circular y una mayor resistencia a la desnaturalación térmica. Lapeyre y Bekhor (1974) confirman estos resultados en un estudio más detallado. Los autores atribuyen estos cambios a un incremento en la interacción de proteínas cromosomales con el DNA bromosustituído. Ling y col. (1976), confirman en parte esta apreciación, demostrando que las histonas se unen más intensamente al DNA bromosustituído.

Un incremento en la interacción de las proteínas cromosomales al DNA puede ser importante cuando se trata de genes regulados por proteínas represoras. Una mayor

interacción del represor con el promotor impediría la unión de la RNA polimerasa al DNA, bloqueando su transcripción (Lin y Riggs, 1974). También puede ocurrir que la presencia de BrdUrd en un promotor puede alterar su reconocimiento por la RNA polimerasa. Se sabe, que prácticamente todos los genes eucarióticos presentan a nivel del promotor una región rica en AT (caja TATA), localizada 25 a 30 bases antes del sitio de iniciación de la lectura del gen, y otra región (caja CAT) ubicada 70-80 nucleótidos antes del codón de iniciación. Ambas zonas presentan en su secuencia un número apreciable de timidinas, susceptibles de ser reemplazadas por BrdUrd durante la replicación.

Por otra parte, se ha visto que la bromosustitución transforma al DNA en una molécula altamente fotolábil a diversos tipos de radiaciones (Djordjevic y Saybalski, 1960; Saybalski, 1964; Eisenstark, 1971; Hutchinson, 1973). Así, se ha comprobado que la bromosustitución incrementa con siderablemente la cantidad de fracturas cromosómicas inducidas por distintos tipos de radiaciones (Hutchinson, 1973; Ja cob, 1979 y 1982) y que el DNA bromosustituído es cien veces más sensible a la luz ultravioleta que el DNA nativo (Regan y col., 1971). En particular, es muy sensible a la luz ultravioleta de longitudes de onda larga (300-400 nm), radia-

ciones que no afectan al DNA nativo (Eisenstark, 1971).

También se ha observado que la exposición a la luz blanca de células cuyo DNA ha sido unifilarmente bromosustituído*, incrementa significativamente la frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas (Kato, 1977; Schwartzman y col., 1979).

Por otra parte, se ha sugerido que la irradiación de un DNA bromosustituído con luz de 300-400 nm inhibiría la transcripción sin alterar su capacidad replicativa (Scaife, 1970; Jones y Doves, 1972; Lin y Riggs, 1974). Sin embargo, resultados obtenidos en células meristemáticas de Allium cepa L. han demostrado que la bromosustitución unifilar sola, o bien la bromosustitución unifilar seguida de irradiación con luz de 300-400 nm, incrementa significativamente la incorporación de ribonucleósidos pirimídicos (uridina y citidina) manteniéndose relativamente inalterada la incorporación de los nucleósidos purínicos (adenosina y guanosina) (Sans y col., 1982). Estos resultados sugieren que en este sistema la bromosustitución y la irradiación no inhiben la transcripción, pero que podrían alterarla como producto de un aumento en la incidencia de apareamientos anómalos.

* En este tesis se denomina genoma unifilarmente bromosustituído al que se encuentra en células que fueron incubadas con BrdUrd durante un ciclo replicativo.



Estos antecedentes han llevado a sugerir que la irradiación con luz de 300-400 nm de un genoma bromosustituído altera la expresión génica (Eisenberg y Pardee 1969; Scalfe, 1970; Jones y Dove, 1972; Chang y Baserga, 1977), al parecer por un efecto mutagénico (Szybalski, 1964; Carlson, 1969; Chu y col., 1972; Davison y Kaufman, 1972; Goz, 1978; Nakamura y Okada, 1979; Skopek y Hutchinson, 1982).

Por otra parte, la propiedad de alterar la expresión de un genoma bromosustituído por mutagénesis inducida por irradiación con luz de una determinada longitud de onda, ha sido utilizada por diversos autores como método para la localización dentro del período replicativo de segmentos del genoma responsable de diferentes funciones celulares (Kajiwara y Mueller, 1964; Balazs y Schuldkrout, 1971; Gimmeler y Schweizes, 1972; Stambrook, 1974; Suzuki y Okada, 1975; Lough y Bischoff, 1976; Chang y Baserga, 1977; D'Andrea y col., 1983).

Un material biológico adecuado para aplicar estas estrategias metodológicas en el estudio genético del ciclo celular en un tejido es el meristema radicular de los vegetales superiores. Al respecto, los bulbos de

Allium cepa L. presentan incluídos, alrededor de la corona, una serie de blastemos radiculares cuyo meristema está en dormancia (Sans y De la Torre, 1979). La embibición de los bulbos en agua induce la proliferación celular en estos meristemas alcanzando un equilibrio proliferativo aproximadamente a las 48 horas, a 15°C (Sans y col., 1980). Estos meristemas constituyen un material biológico de fácil manejo, en el que el bulbo proporciona los nutrientes para su crecimiento. El medio de cultivo puede ser tan simple como agua potable convenientemente aireada. No se requiere condiciones estériles para su cultivo. Además, por ser la raíz el órgano de absorción de la planta, su meristema tiene una alta permeabilidad que facilita la entrada y salida de metabolitos y drogas. Más aún, los meristemas radiculares están formados por células carentes de cloroplastos y sus rutas metabólicas son semejantes a las de otras células eucarióticas.

En condiciones controladas de cultivo, la población de células meristemáticas proliferan en equilibrio dinámico, de manera que los parámetros del ciclo celular se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Por último, de cada bulbo surgen de 30 a 40 raíces, todas genéticamente iguales.

Todas estas características han hecho de este material un sistema adecuado para el estudio de la proliferación celular, en especial de la regulación de los procesos que controlan esta actividad celular (Giménez-Martín y col., 1977, 1981, 1982).

Se ha comprobado en este sistema celular que la exposición de células meristemáticas con DNA unifilarmente bromosustituído a luz blanca, incrementa significativamente la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas (Schvartzman y col., 1979). Este hecho sugiere que la bromosustitución fotolabiliza el genoma de las células meristemáticas.

Por otra parte, se ha observado que la bromosustitución unifilar del DNA de las células meristemáticas por sí sola, o bien la irradiación con luz de 300-400 nm de longitud de onda de células con DNA nativo, no altera la progresión de una población de células que avanza sincrónicamente por el ciclo celular. Sin embargo, la irradiación después de la bromosustitución unifilar del DNA impide que las células lleguen a mitosis (González-Fernández y de la Torre, 1979).

Con estos trabajos surgió la posibilidad de identificar segmentos del genoma de células meristemáticas de Allium cepa L. cuya expresión regule el tránsito de las células por puntos definidos del ciclo proliferativo, empleando (como agente mutagénico) la irradiación con luz de 300-400 nm, y como blanco, células del meristema radicular con genoma unifilarmente bromosustituído.

La presente tesis tiene como objetivo general realizar un estudio genético del ciclo celular en células meristemáticas de raíces adventicias de bulbos de Allium cepa L., mediante la utilización del efecto mutagénico de la luz de 300-400 nm de longitud de onda, sobre genomas bromosustituídos.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- a) Identificar eventos propios del ciclo celular dependientes de la expresión del genoma.
- b) Identificar dentro del período S del ciclo proliferativo el momento en que replican los sectores del DNA involucrado en dichos eventos.

M A T E R I A L Y M E T O D O S1. MATERIAL

Se utilizó meristemas radiculares de bulbos de cebollas Allium cepa L. variedad perla.

Las raíces se obtuvieron sumergiendo la base del bulbo en agua potable filtrada, contenida en tubos de vidrio de 80 ml. de capacidad. El agua era cambiada cada 24 horas y sometida a un continuo burbujeo mediante una bomba de acuario a razón de 10-20 ml de aire por minuto. Los cultivos fueron hechos en un incubador termoregulado (Precision Gr1. Corp. USA), mantenido a una temperatura constante de $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y en total oscuridad (Fig. 1A).

2. TRATAMIENTOS

Los tratamientos fueron realizados en raíces unidas a los bulbos y se iniciaron cuando éstas alcanzaron una longitud de 15-20 mm. En estas condiciones se considera que la raíz presenta un crecimiento en equilibrio dinámico (Sans y col., 1980). Durante las incubaciones se mantuvo las condiciones de cultivo descritas en 1. Una vez finalizado cada tratamiento, las raíces se lavaron

Fig. 1: A) Cultivo de bulbos para la obtención de raíces.

A la izquierda se muestra un bulbo cultivado por 72 hrs., en el que se puede observar alrededor de 30 raíces de 4-5 cm de longitud; a la derecha se muestra un bulbo al momento de iniciarse la imbibición en agua.

B) Vista general de una gradilla de cultivo.

Se muestra un cultivo de bulbos con raíces bromosustituídos. Tanto los receptáculos que contienen el agua, como los bulbos en cultivo son cubiertos con papel aluminio, a fin de evitar la irradiación accidental de las raíces con luz ambiental.

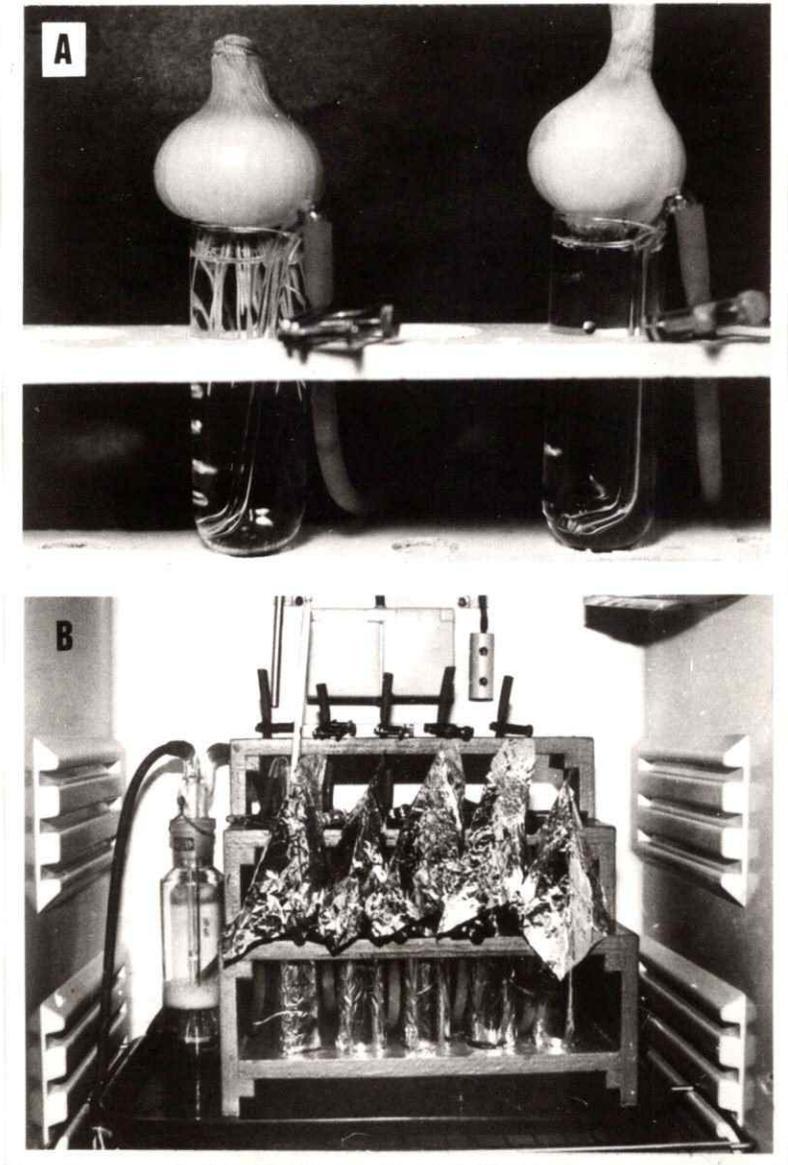


Fig. 1

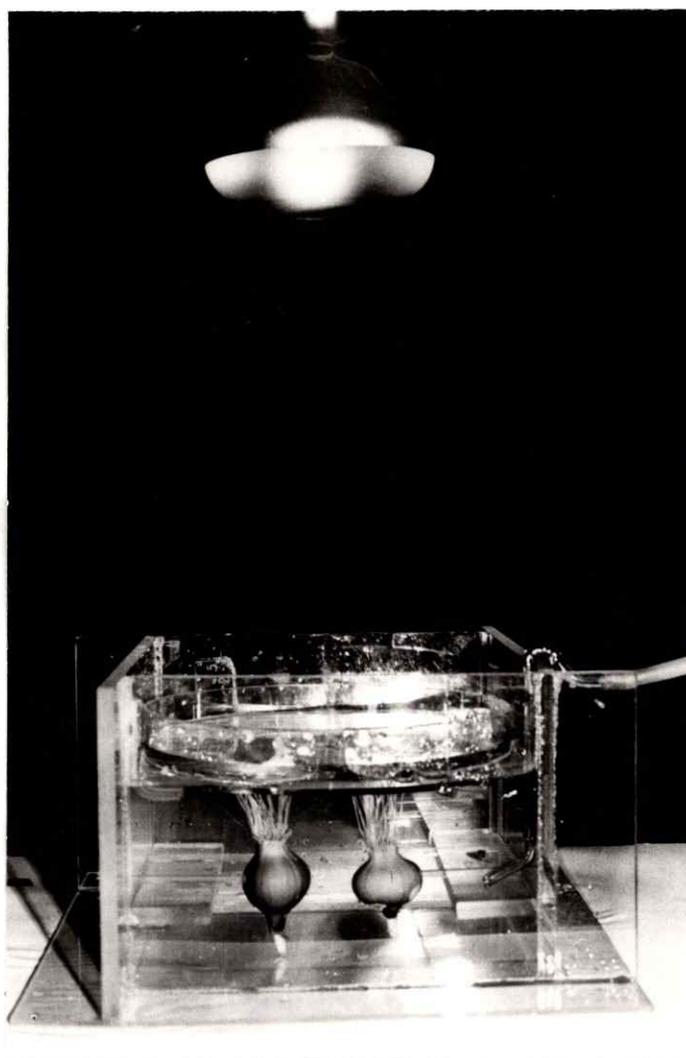


Fig. 2: Irradiación de los bulbos con luz de 300-400 nm.

La fuente de luz se ubica a 30 cm. por sobre los ápices radiculares. Los bulbos sumergidos en agua son dispuestos con las raíces hacia arriba. Sobre las raíces se coloca una cápsula de Petri con una solución de timidina $10^{-3}M$, a modo de filtro ultravioleta.

2.2. Tratamiento con cafeína

Con el objeto de seleccionar una población de células meristemáticas naturalmente sincrónica, las raíces unidas a los bulbos se incubaron en cafeína 5 mM (Merck) por espacio de una hora.

Con este tratamiento, todas aquellas células que se encuentran en telofase quedan marcadas como células binucleadas, fácilmente distinguibles del resto de las células meristemáticas (Giménez-Martín y col., 1965).

2.3. Irradiación con luz de 300-400 nm

La irradiación de las raíces se efectuó de la forma estandarizada previamente por González-Fernández y de la Torre, 1979, con algunas modificaciones.

Los bulbos se colocaron en una cubeta de acrílico convenientemente diseñada para que las raíces queden orientadas hacia arriba y sumergidas en agua (Fig. 2). El agua previamente hervida y mantenida a 15°C, fue sometida a un burbujeo con nitrógeno, a razón de 100 ml. por min. durante una hora, con el propósito de eliminar el oxígeno disuelto en

con agua potable filtrada y el cultivo se continuó en las condiciones iniciales, o bien fueron sometidas a un nuevo tratamiento, si el caso lo requería. Todas las soluciones de incubación fueron preparadas en agua potable filtrada y mantenida a 15°C.

2.1. Bromosustitución

Raíces unidas a los bulbos, se incubaron en 80 ml. de solución de bromosustitución que contiene 5-bromo-2-desoxiuridina 10^{-4} M; uridina 5×10^{-6} M y fluorodesoxiuridina 10^{-7} M (Sigma, U.S.A.) (Kihlman y Kromber, 1975; Schvartzman y col., 1977). Las raíces se mantuvieron en esta solución por diferentes intervalos de tiempo, dependiendo del experimento.

La bromosustitución incrementa la fotolabilidad del DNA (Eisenstark, 1971). A fin de evitar la exposición de las raíces a la luz, los bulbos y los receptáculos de cultivo se cubrieron con papel aluminio, durante todo el experimento (Fig. 1B).

ella (Eisenstark, 1971). Inmediatamente por encima de las raíces se dispuso a modo de filtro ultravioleta una cápsula Petri de 25 cm. de diámetro conteniendo una solución de timidina $10^{-3}M$, en volumen suficiente para dar un espesor de 1,5 cm. (Eisenstark, 1971).

La fuente de luz (lámpara Ultravitalux Osram, 300 W, con un máximo de emisión en longitudes de onda entre 300-400 nm), se ubicó a 30 cm. sobre el ápice de las raíces. La irradiación se aplicó durante 20 min. La temperatura del agua en que se sumergían los bulbos para efectuar la irradiación variaba escasamente al final de este tratamiento ($1,5 \pm 0,5^{\circ}C$ sobre la temperatura inicial $15^{\circ}C$).

En estas condiciones de irradiación se absorben todas las longitudes de onda menores de 300 nm, que pueden dañar per se al DNA nativo (Eisenstark, 1971). Se ha estimado que a las raíces incidiría una energía de aproximadamente 6 Joules cm^2 (medido con un fotómetro Black-Ray Long wave Ultraviolet Meter J-221, UVP Inter. Inc., U.S.A.).

La irradiación efectuada de esta manera no altera los parámetros del ciclo celular tales como, duración del ciclo y tiempo de inicio de la mitosis, de una población de células meristemáticas con DNA nativo. Sin embargo, bloquea la entrada de las células en mitosis cuando su DNA ha sido previamente bromos sustituido (ver Resultados).

3. PROCEDIMIENTOS CITOLOGICOS

3.1. Tinción con orceína acética

Las raíces se fijaron en solución de Carnoy I (etanol absoluto-ácido acético glacial, 3:1 v/v), durante 24 hrs. a 4°C. Posteriormente se tiñeron con orceína-acética clorhídrica, procediendo de la siguiente manera:

1. Tres a cuatro raíces se colocaron en un vidrio reloj y se cubrieron con 3 ml. de orceína acética clorhídrica (Tjio y Levan, 1950)*.

* Orceína acética clorhídrica. Mediante una manta termoregurable se calentaron a ebullición 55 ml. de ácido acético (Merck) en un balón de cuello esmerilado unido a un condensador de destilación. Luego se agregó lentamente 2 gr. de orceína (Gurr) y se hirvió 10 minutos adicionales. Una vez fría la solución, se filtró por papel Whatman N° 4. Finalmente se agregó una parte de ácido clorhídrico (Merck) 1 N por cada 9 partes de esta solución.

2. Se calentaron suavemente con un mechero de alcohol hasta la aparición de vapores y se dejó enfriar. Se repitió esta operación por tres veces.
3. Luego se transfirió cada raíz a un portaobjeto y se aisló de ella la zona meristemática (2^o mm. desde el ápice radicular) con un bisturí. Se agregó una gota de colorante, se cubrió con un cubreobjeto y se golpeó suavemente sobre éste varias veces con la punta de un lápiz grafito para obtener la disgregación celular.
4. El preparado se cubrió con un trozo de papel filtro y se presionó fuertemente el cubreobjeto con el dedo pulgar, para lograr la formación de una monocapa de células.
5. Finalmente, los bordes de los cubreobjetos fueron sellados con esmalte de uñas. Los preparados así montados se guardaron en una cámara húmeda a 4°C hasta su observación.

3.2. Tinción con reacción de Feulgen

Las raíces fueron teñidas mediante la reacción de Feulgen convencional (Feulgen y Rossenbeck, 1924) o bien con la reacción de Feulgen fluorescente (Prenna y col., 1974), procediendo de la siguiente manera:

1. Las raíces fijadas se lavaron durante 5 minutos en 5 ml. de agua destilada a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó tres veces.
2. Luego se incubaron durante 60 minutos en ácido clorhídrico 5 N, a una temperatura constante de 20°C.
3. En seguida, se lavaron durante 5 minutos en 5 ml. de agua destilada enfriada a 0°C. Esta etapa se repitió tres veces.

4. A continuación, se tiñeron con reactivo de Schiff convencional* o Fluorescente**, durante 45 minutos a temperatura ambiente.
5. Las raíces fueron lavadas durante 10 minutos con agua sulfurosa recién preparada (5 ml. de metabisulfito de sodio 0.4 M, 5 ml. de ácido clorhídrico 1 N y 90 ml. de agua destilada). Esta etapa se repitió tres veces.
6. Se hicieron aplastados de la zona meristemática, según se indicó en 3.1.

* Reactivo de Schiff convencional (De Tomasi, 1936). Se disolvió 1 gr. de fucsina básica (Gurr) en 200 ml. de agua destilada a ebullición. Se enfrió a 50°C y se filtró con un papel Whatman N° 4. Luego se agregó 20 ml. de ácido clorhídrico 1 N y 1 gr. de metabisulfito de sodio. Se agitó esta solución por 2 hrs. a temperatura ambiente. Por último se agregó 1 gr. de carbón activo, se agitó durante 10 min. y se filtró con papel Whatman N° 4.

** Reactivo de Schiff para fluorescencia (Itikawa y Ogura, 1954). Se preparó una solución acuosa de pararosanilina (Gurr) al 0.01% la que se hizo burbujear directamente anhídrido sulfuroso (SO₂), hasta que la solución alcanzó un pH 1.7. En esta condición se logra una decoloración total del fluorocromo. El reactivo de Schiff así preparado se diluyó 1:5 con agua destilada, en el momento de usar.

7. Los preparados se colocaron en un congelador a -70°C durante 1 hora y luego se removieron rápidamente los cubreobjetos con una hoja de afeitar. Los preparados fueron deshidratados en una batería de alcoholes de concentraciones crecientes hasta llegar al xilol.
8. Finalmente se hizo el montaje de los preparados con Fluormount (Gurr) y éstos se guardaron a 4°C en total oscuridad.

3.3. Control citológico de la bromosustitución

La bromosustitución del genoma fue controlada por una técnica de coloración diferencial llamada FPG (Fluorescence plus Giemsa), que permite diferenciar cromátidas con DNA unifilarmente bromosustituído de aquellas con DNA bifilarmente bromosustituído (Wolff y Perry, 1974).

Para esto se requiere que las células hayan tenido por lo menos dos ciclos replicativos en presencia de BrdUrd. Por esta razón se procedió de la siguiente manera:

Las raíces unidas a los bulbos se incubaron en la solución de bromosustitución, durante 70 hrs., esto es aproximadamente dos ciclos celulares a 15°C, la solución se cambió cada 24 horas. Posteriormente las raíces se trataron con colchicina 10^{-3} M (Merck), durante 4 hrs. y finalmente se fijaron en solución de Carnoy I, durante 12 hrs. a 4°C.

Las raíces fueron sometidas a continuación al método de tinción diferencial de cromátidas hermanas (González-Gil y Navarrete, 1982), que se detalla a continuación:

1. Las raíces fijadas se lavaron 3 veces en tampón citrato 10^{-2} M a pH 4.2 durante 10 min. cada vez.
2. Luego se incubaron en pectinasa 5% (Sigma, USA) en tampón citrato, durante 50 min. a 37°C.
3. Las raíces fueron transferidas a una solución de ácido acético glacial 45% y de ellas se prepararon aplastados de la región meristemática, en la forma indicada en 3.1, usando portaobjetos previamente gelatinizados.

4. Se removieron los cubreobjetos de la manera indicada en 3.1.
5. Los preparados se hidrataron en agua destilada, durante 10 min. lavados por una vez en solución salina de citrato (S.S.C.) (Cloruro de sodio 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M durante algunos minutos).
6. Luego se tiñeron con solución de Hoeschst 33258* durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Los preparados se lavaron brevemente en una solución 0.5 X S.S.C. y una vez montados con cubreobjetos fueron irradiados con la misma lámpara indicada en 2.4. ubicada a 5 cm. del preparado. La irradiación se realizó a temperatura ambiente, durante 1 hora.
8. Se quitaron los cubreobjetos y los preparados se incubaron en una solución 0.5 X S.S.C., durante 1 hora a 55°C.

* Solución de Hoechst 33253. 1 mg. de Hoechst se disolvió en 1 ml. de etanol absoluto; 0.2 ml. de esta solución se diluyeron con una solución 0.5 X S.S.C., hasta completar 100 ml.

9. Posteriormente, se incubaron en solución de ácido clorhídrico 5 N a 20°C durante 15 min. y se lavaron 2 veces, durante 5 min. cada vez con agua destilada.
10. Finalmente los preparados se tiñeron durante 10 min. a temperatura ambiente con solución de Giemsa (Merck) 3% v/v, en tampón fosfato 0.017 M, pH 6.8. El exceso de colorante se dejó escurrir y después se dejó secar al aire, durante una hora, se cubrieron con resina sintética (Sandeural, Gurr).

3.4. Estudio microdensitométrico

La cuantificación del contenido de DNA por núcleo se realizó en preparados previamente teñidos por la reacción de Feulgen convencional o fluorescente, utilizando dos tipos de microdensitómetros. Para el caso de preparados teñidos por la reacción de Feulgen convencional, se usó un microdensitómetro de barrido M-85 (Vickers Ltda. U.K.). Las mediciones se hicieron usando un objetivo de 100x, con un haz de lectura de 0.4 um de diámetro, iluminación

Køller con un diámetro de campo visual no mayor de 30 μm y luz de 550 nm, seleccionada por un filtro monocromador.

Para el caso de preparaciones teñidas por la reacción de Feulgen fluorescente, se usó un microfluorómetro M-01 (Zeiss) provisto de un sistema de epiluminación con una fuente de luz U.V. HBO-100 y la siguiente combinación de filtros: Filtro de excitación BP 546/10, prisma cromático FT 580 y filtro de barrera LP 590.

Las mediciones se hicieron con un objetivo 40x, usando un campo de iluminación no mayor de 100 μm de diámetro y un diafragma de medida entre 20 y 30 μm de diámetro.

4. MEDICION DEL CRECIMIENTO RADICULAR

A fin de estudiar el efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento radicular, se procedió de la siguiente manera:

Bulbos cultivados de la forma descrita en 1., se podan dejando sólo 10 a 15 raíces de tamaño similar, dispuestas de manera que sean fácilmente individualizables. Se midió la longitud de las raíces con una reglilla milimetrada, cada 24 horas, durante 5 días consecutivos.

R E S U L T A D O S

1. CONTROL CITOLOGICO DE LA BROMOSUSTITUCION

Numerosas evidencias experimentales demuestran que BrdUrd ejerce su efecto mutagénico o de alterar la expresión génica, al incorporarse al DNA en reemplazo de la timidina durante el período replicativo (Goz 1978).

Por este motivo, en todo estudio cuya metodología de análisis utilice este análogo, es necesario demostrar que BrdUrd se ha incorporado efectivamente al genoma de las células.

Existen diversos procedimientos mediante los cuales se puede efectuar este control. Uno de ellos es la determinación de cambios en el coeficiente de sedimentación del DNA, en un gradiente de cloruro de cesio (Haut y Taylor, 1967). Otro método de detección se basa en la aparición de cambios en las propiedades tintoriales de la cromatina frente a determinados fluorocromos. Estos cambios están íntimamente relacionados con el grado de bromosustitución del DNA (Latt, 1973; Schwartzendruber 1977;

Darzynkiewicz y col., 1978).

En esta tesis se ha utilizado un método citológico de coloración diferencial de cromátidas hermanas, FPG ("Fluorescence Plus Giemsa", Wolff y Perry 1974). Con este método de tinción, es posible diferenciar en un mismo cromosoma cromátidas con DNA nativo, de aquellas con DNA con una o dos cadenas bromosustituídas (Schvartzman y Goyanes, 1980). Este tipo de coloración diferencial de las cromátidas sólo se pueden obtener después de dos ciclos replicativos del DNA en presencia de BrdUrd (Wolff y Perry, 1974). De esta manera es indispensable para hacer este control, que el tratamiento con el análogo tenga una duración equivalente a dos ciclos celulares.

Empleando un tiempo de tratamiento con BrdUrd de 70 horas, período que abarca poco más de dos ciclos celulares de las células meristemáticas de la raíz de Allium cepa L., cultivadas a 15°C (Tc = 30 hrs., López-Sáez y col., 1966; González-Fernández y col., 1971), se comprobó que el 60-70% de las placas metafásicas presentan cromosomas cuyas cromátidas muestran segmentos intensamente teñidos (DNA unifilarmente bromosustituído), intercalado con segmentos débilmente teñidos (DNA bifilar-

mente bromosustituído) (Fig. 3A).

La distribución de estos segmentos, en ambas cromátidas (cromosomas arlequinados) es el producto de la existencia de intercambio de segmentos entre cromátidas hermanas (Kato, 1977).

Cromosomas obtenidos de células no tratadas con BrdUrd y teñidos con la técnica del FPG, presentan cromátidas intensamente teñidas en forma homogénea (Fig. 3B).

La aparición de cromosomas arlequinados después de dos rondas de replicación sucesivas del DNA en presencia de BrdUrd, sugiere que:

- a) La dosis de BrdUrd utilizada es suficiente para producir una adecuada bromosustitución del DNA.
- b) Tratamientos de menor duración también producen bromosustitución del genoma. De otra manera los cromosomas presentarían una coloración homogénea en ambas cromátidas.

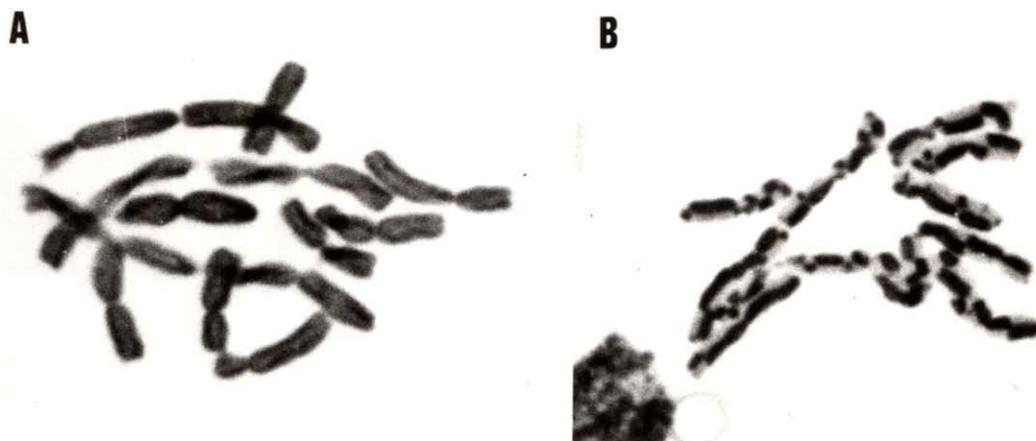


Fig. 3: Cromosomas de células meristemáticas teñidos con la técnica del FPG.

- A) Cromosomas obtenidos de raíces controles no bromosustituídas que presentan ambas cromátidas teñidas con igual intensidad (1250 X).
- B) Cromosomas obtenidos de raíces que han tenido dos ciclos replicativos en presencia de BrdUrd. Estos cromosomas presentan cromátidas con zonas intensamente teñidas alternadas con zonas más claras, cuya disposición es recíproca en ambas cromátidas, producto de la existencia de intercambio entre cromátidas hermanas. Este hecho da a los cromosomas un aspecto de arlequín (1250 X).

2. EFFECTO DE LA BROMOSUSTITUCION E IRRADIACION SOBRE EL CRECIMIENTO RADICULAR

El crecimiento de la raíz es compuesto y depende de la integración de dos procesos parcialmente independientes, que ocurren en la región meristemática y en la zona de diferenciación (López-Sáez y col., 1975).

El meristema está constituido por una población de células que proliferan asincrónicamente. Su número se mantiene constante en el tiempo debido a que después de cada ciclo de división, aproximadamente la mitad de las células que se forman, pasan a ser parte de la zona de diferenciación. Las células que entran a este compartimento dejan de proliferar; y crecen fundamentalmente en longitud, incrementando su tamaño de 10 a 15 veces (López-Sáez y col., 1975).

Bajo condiciones controladas de cultivo, las raíces alcanzan una velocidad de crecimiento regular y constante en el tiempo. Esto se logra sólo cuando los dos parámetros del crecimiento radicular, proliferación y elongación, se hacen constantes en el tiempo. En este caso la raíz está creciendo en equilibrio dinámico (López-Sáez y col., 1975). Cualquier factor que afecte a uno o

ambos parámetros del crecimiento, invariablemente incidirá en la velocidad de crecimiento radicular.

En esta etapa de la tesis, se estudió el efecto de una concentración fija de BrdUrd, en tratamientos de distintas duraciones (12, 24 y 36 horas) sobre el crecimiento radicular.

La duración del tratamiento con BrdUrd está en relación directa con la frecuencia de células cuyo DNA ha sido unifilarmente bromosustituído en forma completa. Así, se podrá obtener bromosustitución unifilar de todo el genoma de una célula sólo cuando el tiempo de incubación de la raíz en BrdUrd tenga una duración igual o mayor al tiempo total del período replicativo (período S). La cantidad de células que han tenido un período replicativo completo en presencia de BrdUrd se puede estimar conociendo la duración del período S, y el flujo celular (porcentaje de células que pasan por un punto del ciclo por unidad de tiempo).

En las condiciones de cultivo empleadas en esta tesis la duración del ciclo celular es de 30 horas (López-Sáez y col., 1966), el flujo celular es de 3-4% de células por hora (De la Torre y col., 1971) y la duración

del período S es de aproximadamente 12 horas (González-Fernández y col., 1971). De esta manera la incubación de las raíces durante 12 horas con el análogo producirá aproximadamente un 3.6% de células meristemáticas con todo su DNA unifilarmente bromosustituído. Tratamientos por 24 y 36 horas producirían una frecuencia de alrededor de 47 y 90% de células, respectivamente, con este tipo de DNA.

Bulbos cultivados durante 48 horas en condiciones normales y posteriormente incubados en solución de bromosustitución por 12, 24 ó 36 horas fueron irradiados junto a bulbos controles no bromados. Se midió la longitud de las raíces inmediatamente después de efectuada la irradiación y cada 24 horas durante seis días consecutivos.

Las figuras 4, 5, 6 y 7 resumen los resultados de estos experimentos. Se observa que la sola irradiación de las raíces no tiene ningún efecto sobre el crecimiento radicular. Por el contrario, la bromosustitución unifilar inhibe parcialmente el crecimiento radicular, con una intensidad que depende de la duración del tratamiento con BrdUrd. Así, a las 144 horas de finalizado el tratamiento por 24 y 36 horas en BrdUrd, las raí-

ces alcanzan la mitad de la longitud de las no tratadas (Figs. 4 y 5).

La irradiación después de la bromosustitución, incrementa este efecto, siendo nuevamente más relevante la inhibición del crecimiento en raíces tratadas por 36 horas con BrdUrd (Figs. 5, 6 y 7).

Estos resultados muestran que la bromosustitución del genoma de las células meristemáticas afecta el crecimiento longitudinal de la raíz, efecto que es aún más evidente después de la irradiación de las raíces bromosustituídas. Teniendo en cuenta que en el crecimiento radicular participan dos componentes, proliferación celular en la zona meristemática y elongación celular en la zona de diferenciación, los resultados obtenidos no permiten precisar el o los componentes afectados. Sin embargo, es esperable que el efecto principal ocurra sobre la proliferación de células meristemáticas, debido a que el análogo se incorpora al DNA durante el período S del ciclo celular, y secundariamente en la zona de diferenciación, cuando algunas células meristemáticas que han cumplido su último ciclo pasan a este compartimento radicular.

Fig. 4: Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 12 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 12 horas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 12 horas e irradiadas △—△.

El crecimiento de la raíz se expresa como el incremento porcentual en longitud, en relación al tamaño inicial de la raíz (25-30 mm de longitud). Cada punto representa el promedio de 20 raíces en tres experimentos distintos. La desviación estandar fue menos del 10% del promedio en cada punto. La abscisa indica el tiempo transcurrido después de efectuados los respectivos tratamientos.

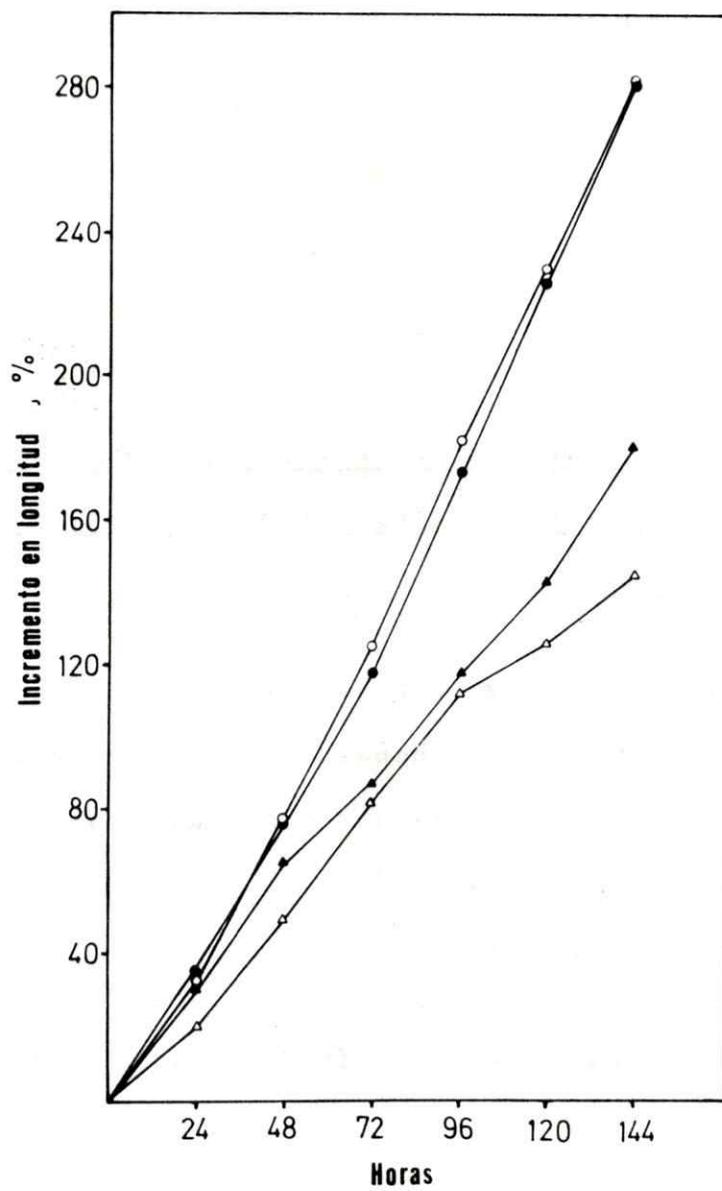


Fig. 4

Fig. 5: Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosus-
tituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, duran-
te 24 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irra-
diadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromo-
sustitución, durante 24 horas ▲—▲; raíces incuba-
das en solución de bromosustitución, durante 24
horas e irradiadas △—△.

Otros detalles se indican en leyenda de la figura 4.

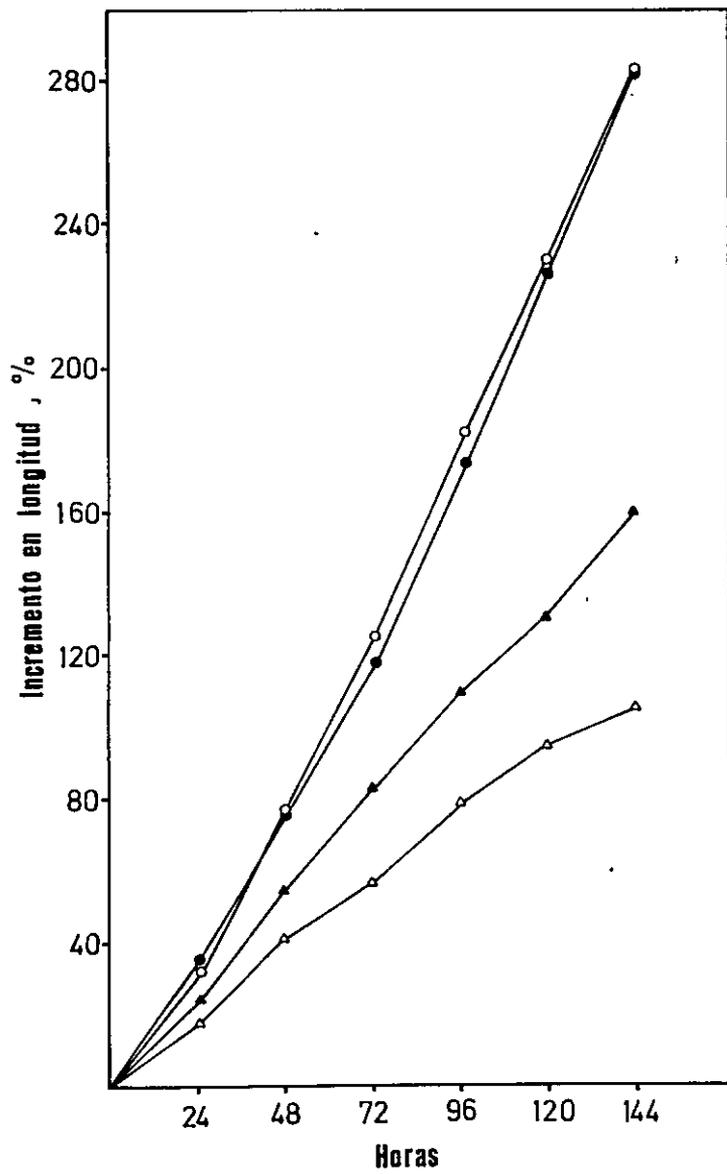


Fig. 5

Fig. 6: Crecimiento radicular en raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 36 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas e irradiadas △—△.

Otros detalles se indican en la leyenda de la figura 4.

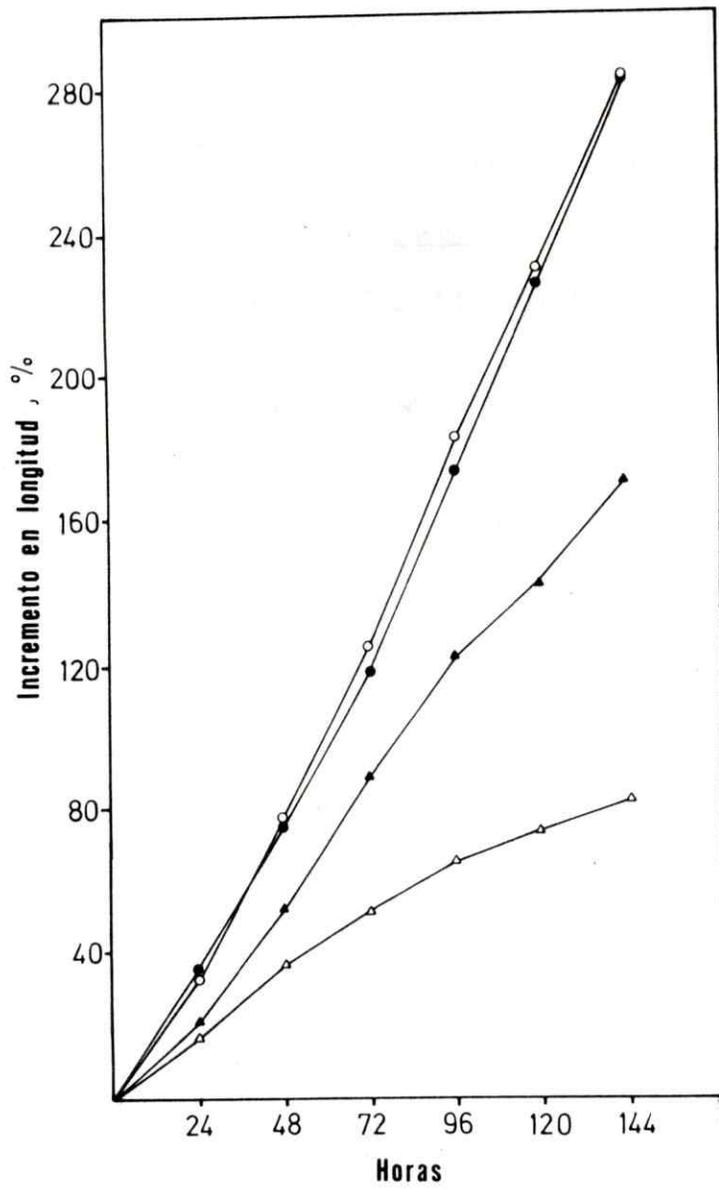


Fig. 6

Fig. 7: Gráfico resumen del efecto de la irradiación sobre el crecimiento radicular en raíces con genoma bromo-sustituído, durante 12, 24 y 36 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 12 horas e irradiadas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 24 horas e irradiadas △—△; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas e irradiadas □—□,

Otros detalles se indican en la leyenda de la figura 4.

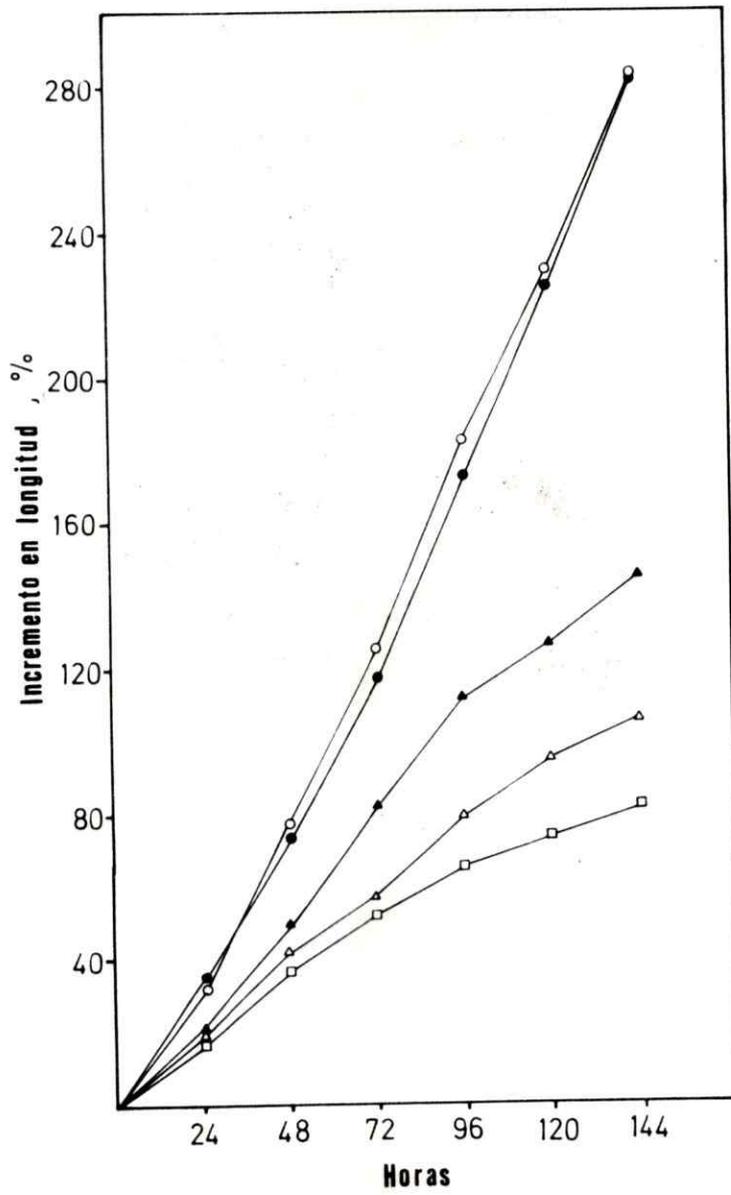


Fig. 7

3. EFFECTO DE LA BROMOSUSTITUCION E IRRADIACION SOBRE LA ACTIVIDAD MITOTICA DEL MERISTEMA

Una alteración de la actividad proliferativa del meristema producida por bromosustitución del DNA e irradiación, debería reflejarse en una caída de la actividad mitótica en la zona meristemática.

Para probar esta hipótesis, bulbos cultivados por 48 horas en condiciones normales e incubados a continuación en solución de bromosustitución por 12, 24 y 36 horas fueron irradiados junto a bulbos controles no bromados. A distintos intervalos después de efectuada la irradiación, algunas raíces fueron fijadas y teñidas con orceína acética. Se cuantificó la frecuencia de células en mitosis considerando a todas aquellas que presentaron características típicas de profase a telofase terminal (Fig. 8).

Las figuras 9, 10 y 11 resumen los resultados de estos experimentos. Se observa que la irradiación o la bromosustitución de las raíces por 12 ó 24 horas aplicados independientemente, no inhiben significativamente la frecuencia de células en mitosis (Fig. 9 y 10). Sin

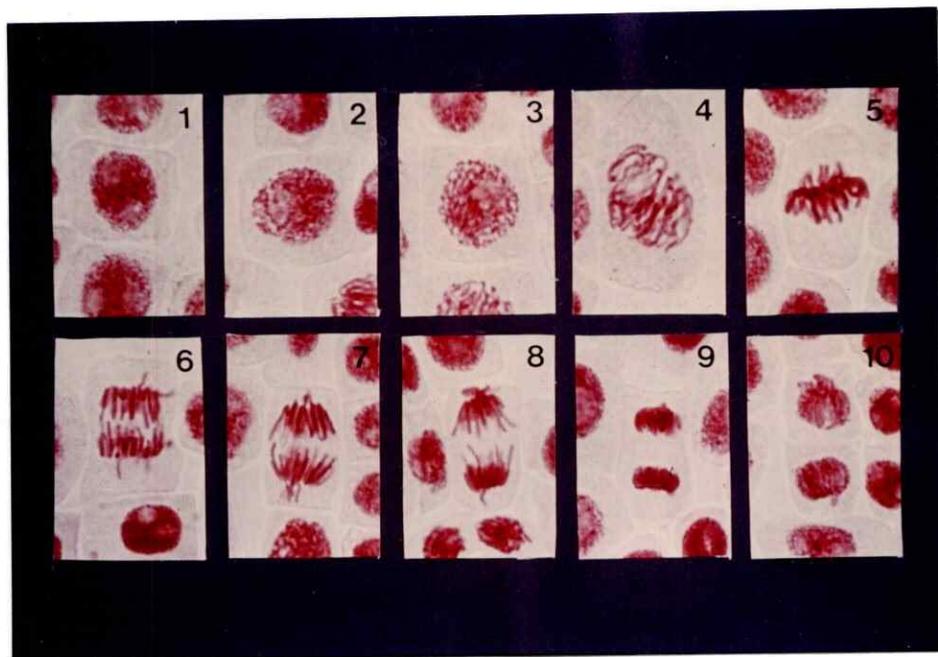


Fig. 8: Células meristemáticas en distintas etapas de la mitosis, en aplastados de raíces teñidas con orceína acética.

Células en interfase (1); profase (2 y 3); prometafase (4); metafase (5); anafase (6, 7 y 8); telofase (9); citocinesis (10). (620 X).

embargo, se observa una ligera caída en el número de células en esta etapa del ciclo en raíces que se han mantenido en solución de bromosustitución por 36 horas (Fig. 11). En esta condición, como se indicó anteriormente, el 90% de las células de la zona meristemática ha pasado por un período replicativo completo en presencia de BrdUrd.

La irradiación de raíces bromosustituídas por 12 horas produce un descenso de la frecuencia de células en mitosis a un mínimo claramente significativo hacia las 8 horas, recuperándose la actividad mitótica inicial hacia las 24 horas (Fig. 9). Este mismo resultado se obtuvo en otro experimento en que se midió la frecuencia de células en mitosis cada 6 horas hasta la hora 48 de finalizados los tratamientos (no mostrado).

De manera similar, la irradiación de raíces bromosustituídas por 24 ó 36 horas, disminuye la frecuencia de células en mitosis, que también llega a un mínimo hacia las 8 horas. Sin embargo, en estos casos la inhibición es más drástica y no se observa recuperación significativa de la actividad mitótica aún a las 48 horas (Figs. 10 y 11).

Fig. 9: Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 12 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 12 horas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 12 horas e irradiadas △—△.

La frecuencia de mitosis se midió observando 2.000 células por raíz y analizando 3 raíces por punto. La desviación estandar de cada punto fue menos del 10% del promedio. La abscisa indica el tiempo después de efectuada la irradiación.

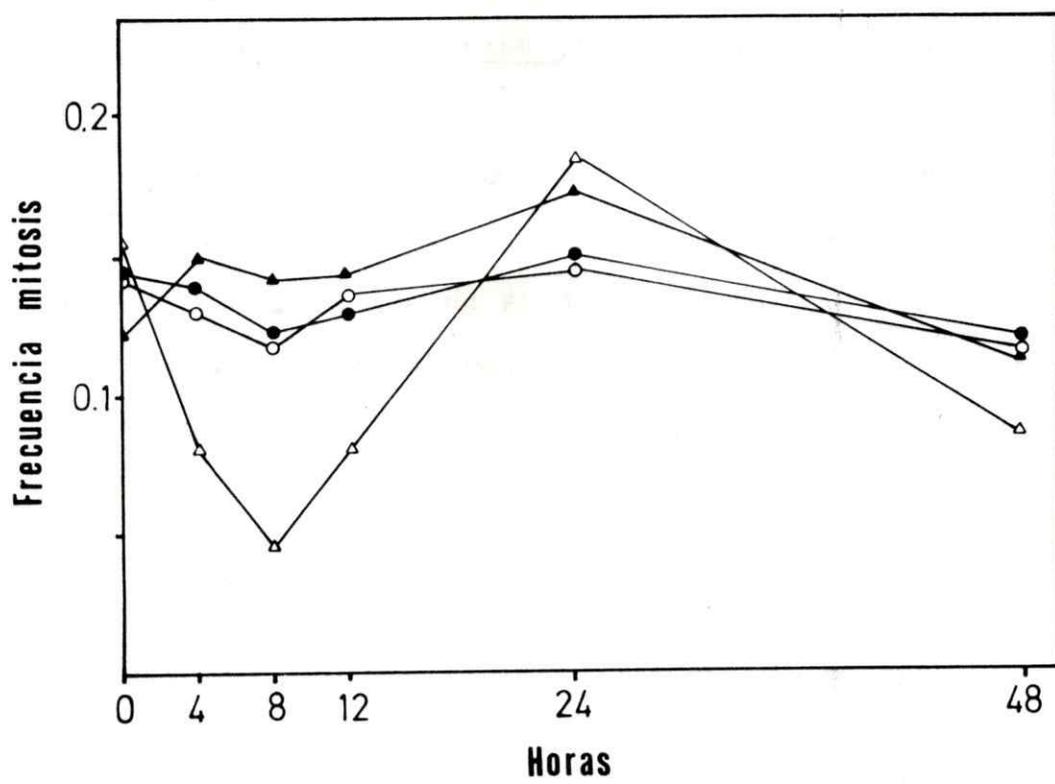


Fig. 9

Fig. 10: Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 24 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 24 horas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 24 horas e irradiadas △—△.

Otros detalles se indican en la leyenda de la figura 9.

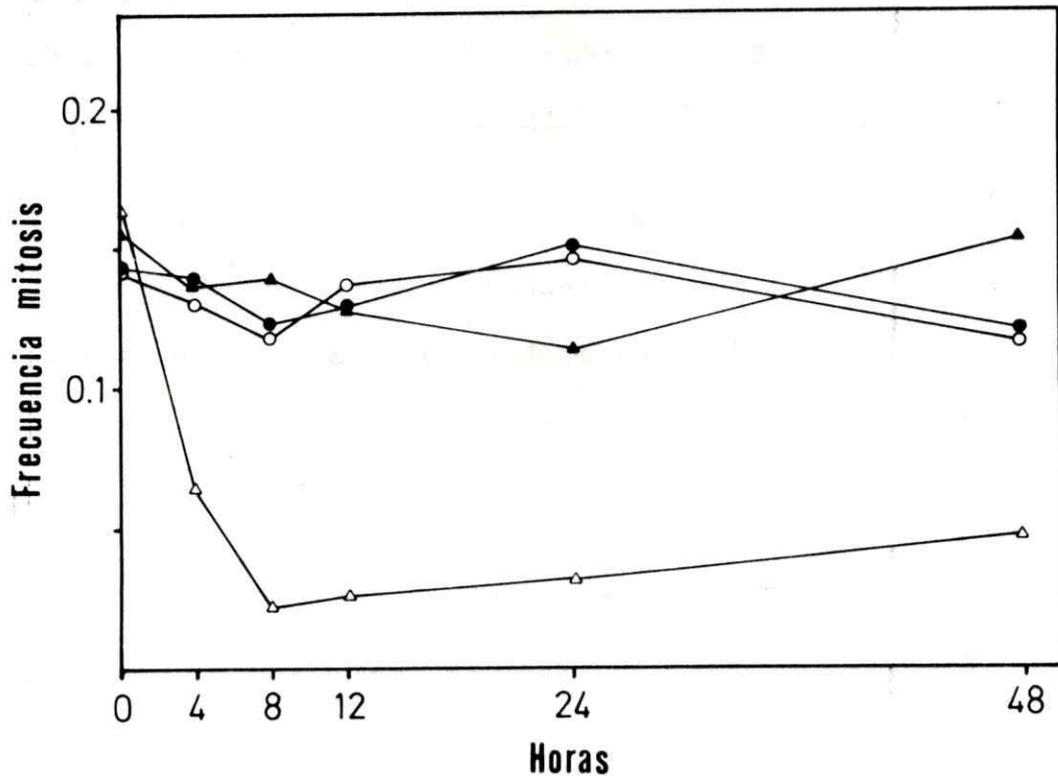


Fig. 10

Fig. 11: Frecuencia de mitosis en la zona meristemática de raíces con genoma bromosustituído e irradiado. Tratamiento con BrdUrd, durante 36 horas.

Raíces no tratadas ●—●; raíces no tratadas e irradiadas ○—○; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas ▲—▲; raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas e irradiadas △—△.

Otros detalles se indican en la leyenda de la figura 9.

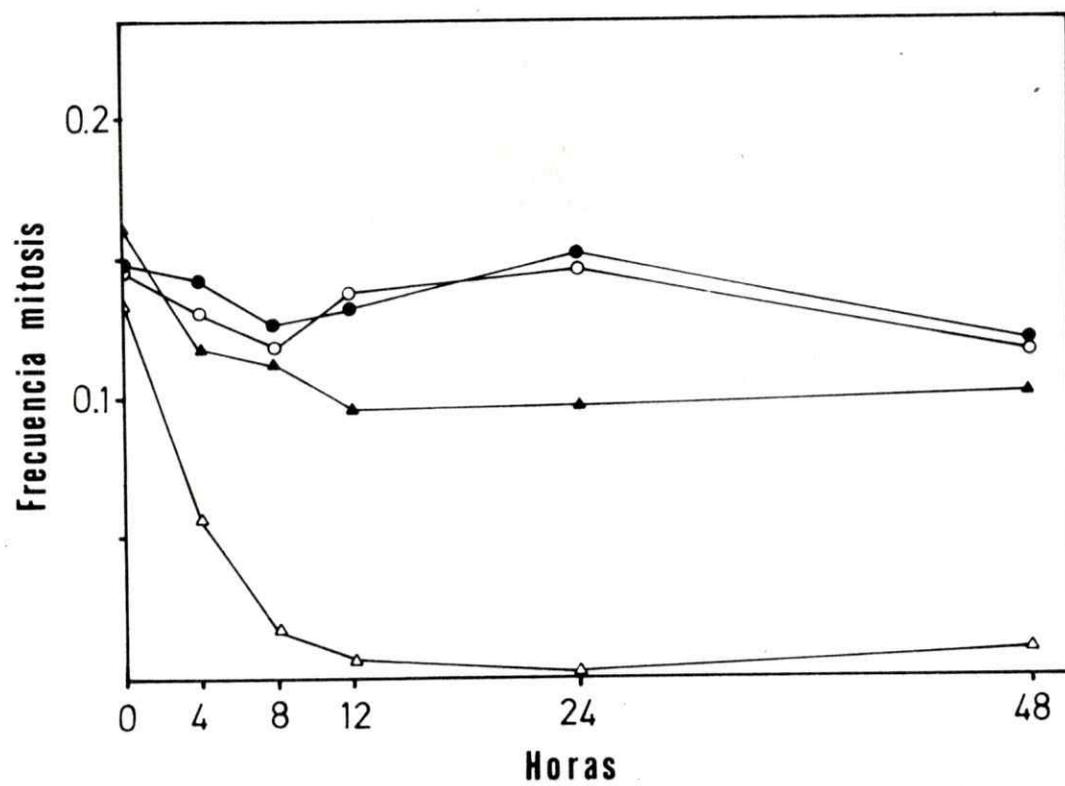


Fig. 11

Estos resultados indican que la inhibición del crecimiento longitudinal de las raíces observada después de bromosustitución e irradiación, se debe, al menos en parte, a una fuerte caída en la actividad proliferativa de la zona meristemática. A su vez, la disminución de la frecuencia de células en mitosis podría ser el resultado de un bloqueo del tránsito de las células, en algún punto de la interfase.

4. EFFECTO DE LA BROMOSUSTITUCION E IRRADIACION SOBRE LA INTERFASE

Como vimos en el punto anterior, la irradiación de células con DNA bromosustituído produce una caída en la frecuencia de células en mitosis, ocasionada probablemente por un bloqueo de las células en algún punto de la interfase.

Con el objeto de identificar la etapa o etapas de la interfase en que ocurre este bloqueo, se estudió la frecuencia de células en G_1 , S y G_2 , después de bromosustitución sola o seguida de irradiación.

En un primer intento, empleamos para este análisis el método de Mak (1965). Este método permite conocer la frecuencia de células en las distintas etapas de la interfase, midiendo en una misma preparación el índice de marcación por autorradiografía y el contenido de DNA por microdensitometría de los núcleos teñidos por la reacción de Feulgen. Sin embargo, con este método no se obtuvo buenos resultados, debido a que el tratamiento de las raíces con BrdUrd dificulta la incorporación de timidina 3H y de otros desoxinucleótidos 3H (resultados no mostrados). En vista de esta dificultad, se optó por deter-

minar la frecuencia de células en G_1 , S y G_2 , utilizando exclusivamente el análisis microdensitométrico en preparados teñidos por la reacción de Feulgen. De este modo, a través de la medición del contenido de DNA nuclear por célula, es posible discriminar entre las células en interfase, aquellas que tienen un contenido de DNA $2C$ (G_1) de aquellas con un contenido $4C$ (G_2). Las células que tienen un contenido de DNA intermedio al valor $2C$ y $4C$ representan a las células que están en período replicativo.

De esta manera, grupos de bulbos cultivados por 48 horas e incubados en solución de bromosustitución, por 36 horas, fueron irradiados junto a bulbos controles, no bromosustituídos. En distintos momentos después de efectuada la irradiación (0, 12, 24 y 48 horas), se fijaron algunas raíces y se tiñeron con la reacción de Feulgen fluorescente.

A fin de conocer el contenido de DNA en células en los períodos pre y post replicativo ($2C$ y $4C$ respectivamente), se midió el contenido de DNA (expresado en unidades arbitrarias) en aproximadamente 100 núcleos de células en telofase y en una cantidad similar de núcleos de células en profase. En la Tabla 1 se resumen los re-

sultados de esta medición. Las células en telofase (2C) tienen un contenido de DNA correspondiente a 23.9 ± 4.1 u.a., y las células en profase (4C), 53.8 ± 6.2 u.a. Obtenidos estos valores, se elaboró un criterio de clasificación de las células en las distintas etapas de la interfase, en relación a su contenido de DNA. Para ello se estableció el rango de valores correspondientes a células en G_1 , sumando y restando una desviación estandar al promedio encontrado en los núcleos en telofase. En forma similar, se estableció el rango de DNA para las células en G_2 . Los valores intermedios corresponden a células en período S. La Tabla 2, muestra los rangos de valores así obtenidos para las células en G_1 , S y G_2 .

Establecido este criterio, se determinó la frecuencia de células en cada una de las etapas de la interfase, en meristemas controles, controles irradiados, bromosustituídos durante 36 horas, y bromosustituídos e irradiados.

T A B L A 1
CONTENIDO DE DNA EN NUCLEOS DE CELULAS MERISTEMATICAS
EN TELOFASE Y EN PROFASE, TENIDOS POR LA
REACCION DE FEULGEN FLUORESCENTE

NUCLEOS	N	CONTENIDO DNA u.a. (\pm D.S.)
Telofásicos (2C)	117	23.9 \pm 4.1
Profásicos (4C)	121	53.8 \pm 6.2

N = Número de núcleos medidos

u.a. = Unidades arbitrarias

D.S. = Desviación estandar

T A B L A 2

CRITERIO ARBITRARIO UTILIZADO PARA DIFERENCIAR CELULAS
 EN G_1 , G_2 Y EN S, MEDIANTE LA DETERMINACION
 MICROFLUOROMETRICA DEL CONTENIDO
 DE DNA NUCLEAR

FASES DEL CICLO	CONTENIDO DNA u.a.
G_1	19.8 - 28.0
S	28.1 - 47.5
G_2	47.6 - 59.8

El rango de valores correspondientes a las células en G_1 se obtuvo restando y sumando la desviación estandar al promedio 2C de la Tabla 1. El rango G_2 se obtuvo sumando y restando la desviación estandar al promedio 4C. Los valores intermedios corresponden a células en período S.

La figura 12 resume los resultados obtenidos en células bromosustituídas durante 36 horas, en las que se incluye además la frecuencia de células en mitosis. Se observa que la frecuencia de células en G_1 no cambia en ninguno de los intervalos analizados. Sin embargo, la frecuencia de células en S está inicialmente disminuída en relación a los controles (BrdUrd 0 horas) y luego aumenta, sobrepasando el valor control (BrdUrd 12 horas), disminuyendo posteriormente a valores próximos al control (BrdUrd 24 y 48 horas). La frecuencia de células en mitosis cae ligeramente a partir de la hora 12, mientras que la frecuencia de células en G_2 aumenta a partir de la hora 24.

Estos resultados sugieren que la bromosustitución del DNA puede inducir una ligera caída en la frecuencia de células en mitosis, posiblemente producto de un bloqueo de células en G_2 .

Por el contrario, la irradiación de raíces bromosustituídas durante 36 horas produce cambios muy significativos en las distintas etapas del ciclo proliferativo (Fig. 13). Se puede observar una caída en la frecuencia de células en mitosis en forma progresiva desde la hora 0 hasta la hora 12, para prácticamente desaparecer en inter

valos posteriores. La disminución de células en mitosis se acompaña de una caída en la frecuencia de células en período S (15% en relación al control). Estos dos hechos, se asocian con un incremento concomitante y significativo ($P < 0.01$) en la frecuencia de células en G_1 y G_2 . Tanto la acumulación en G_1 y G_2 , como la disminución de células en S y M sugieren que la irradiación de las raíces bromosustituídas produce un bloqueo parcial de las células en los períodos prereplicativos y premitóticos. Además, sugieren que en estas dos etapas se estarían produciendo eventos dependientes de la expresión del genoma, indispensables para que las células puedan por una parte, iniciar la replicación del DNA, y por otra, la mitosis. Sin embargo, con estos resultados no se puede precisar él, o los momentos específicos dentro de G_1 y G_2 , en que dichas funciones se expresan.

El resto de esta tesis, se centró fundamentalmente en analizar con más detalle el momento en que probablemente se expresan funciones génicas que controlan el inicio y prosecución de la mitosis.

Fig. 12: Frecuencia de células meristemáticas en cuatro períodos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), en raíces no tratadas (control) y en raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas.

La frecuencia de células en los cuatro períodos del ciclo celular se cuantificó a las 0, 12, 24 y 48 horas, después de finalizada la bromosustitución.

Las barras representan las frecuencias de células en los distintos compartimentos del ciclo.

Los números sobre las barras representan el promedio de las frecuencias y su desviación estandar, correspondientes a G_1 , S y G_2 .

Los valores en paréntesis indican la significancia estadística de algunos cambios de frecuencia en relación al control (test de t)

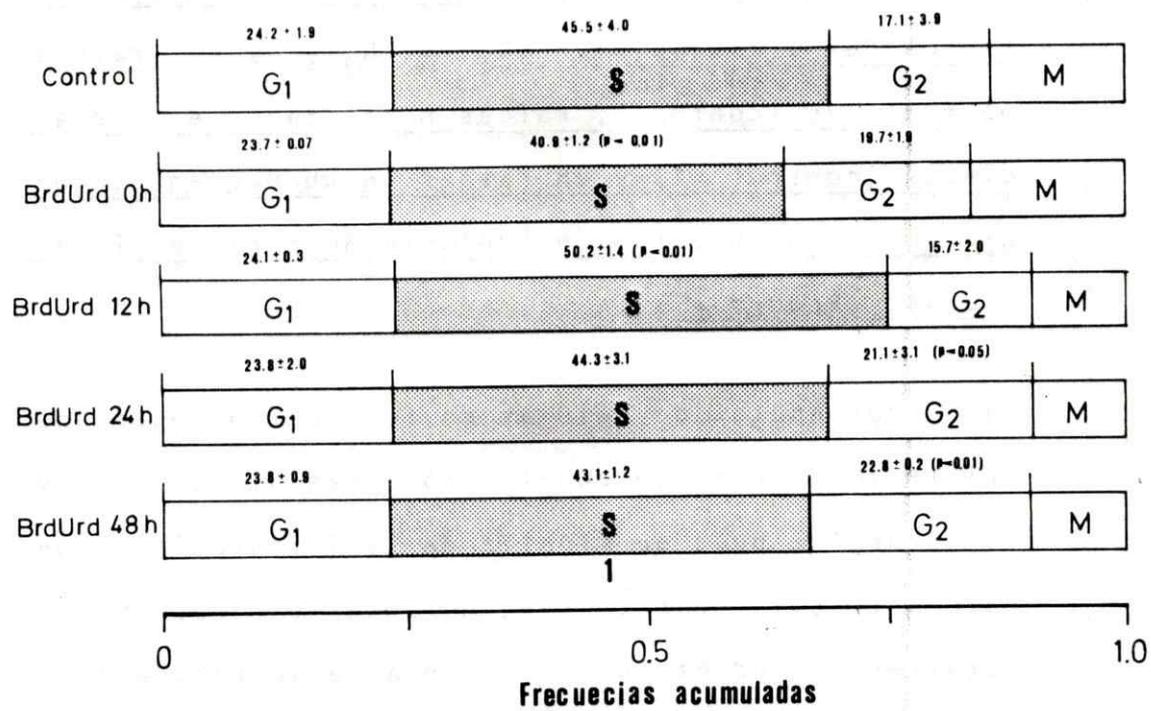


Fig. 12

Fig. 13: Frecuencia de células meristemáticas en cuatro períodos del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M) en raíces no tratadas (control), raíces no tratadas e irradiadas (control ↙) y en raíces incubadas en solución de bromosustitución, durante 36 horas e irradiadas, (BrdUrd ↙).

Las frecuencias de células en los cuatro períodos del ciclo celular se cuantificó a las 0, 12, 24 y 48 horas, después de finalizada la irradiación de raíces tratadas con BrdUrd, durante 36 horas. Otros detalles se indican en la leyenda de la figura 12.

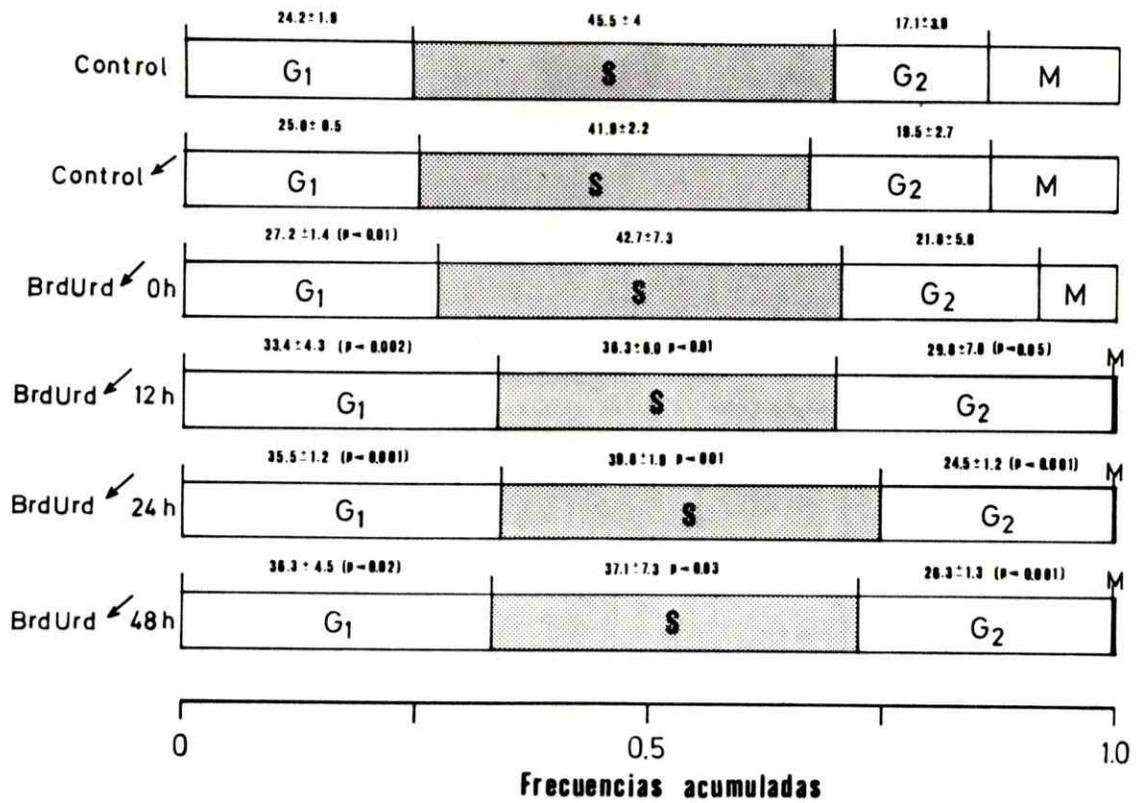


Fig. 13

5. DETECCION DEL MOMENTO EN G₂ EN QUE SE EXPRESA LA FUNCION RESPONSABLE DEL INICIO DE LA MITOSIS

El objetivo de esta etapa fue precisar el momento, dentro de G₂, en que se expresa la función que permite la progresión de las células por este período y su entrada en mitosis.

El análisis de esta etapa del ciclo en particular es interesante porque existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que la progresión de las células a través del período G₂ depende del proceso de transcripción y traducción de la información genética (González-Fernández y col., 1970; Giménez-Martín y col., 1971; Yanishevky y Stein, 1981; Hochhauser y col., 1981). Así, se ha demostrado que durante el primer tercio de G₂ existe un momento en que ~~hay~~ síntesis de proteínas indispensables para que las células puedan iniciar la mitosis (González-Fernández y col., 1974).

Por otra parte, se ha demostrado que la duración del período G₂ depende de la presencia de factores, probablemente proteicos, que actúan como control positivo (inductor) y negativo (represor). Ambos tipos de facto-

res son sintetizados por la propia célula (De la Torre y Giménez-Martín, 1977).

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en células vegetales asincrónicas, anteriormente presentados, sugieren la existencia en G_2 de un punto de control o de transición regulado genéticamente. Sin embargo, estos resultados no dan cuenta sobre el momento de G_2 en que se expresa esta función.

Considerando que la irradiación con luz de 300-400 nm, de un genoma unifilarmente bromosustituído, altera la expresión de todos aquellos genes que deben ser transcritos después de la irradiación, sería posible detectar, con bastante aproximación, el momento en que se expresa una función génica que regula una etapa particular del ciclo. Esto se puede lograr utilizando una serie experimental en que la variable es el momento en que se efectúa la irradiación, evaluándose el efecto de éstas sobre la capacidad de las células para alcanzar una fase particular del ciclo, como sería en el presente estudio la mitosis.

En este caso, la irradiación afectará la entrada en mitosis en todos aquellos casos en que ella sea

efectuada antes del momento en que se expresa el sector del genoma involucrado en el inicio de esta etapa del ciclo. El punto de transición corresponderá a la irradiación efectuada en un intervalo límite que no afecte la entrada en mitosis. Teniendo en cuenta este razonamiento, se desarrolló el esquema experimental que se resume en la figura 14.

Bulbos cultivados por 48 horas se incubaron en una solución de cafeína 5 mM durante una hora. Con este tratamiento, se selecciona una población de células meristemáticas naturalmente sincrónicas, las que quedan marcadas como células binucleadas. Debido a que la cafeína inhibe la formación del fragmoplasto o tabique intercelular, quedan como células binucleadas aquellas células que durante el tratamiento transcurren por telofase (alrededor de 3.5% del total de la población meristemática).

Dentro de la población de células binucleadas se distinguen dos subpoblaciones, una que corresponde al 20% del total de células binucleadas y que presenta un ciclo celular más corto (rápidas, con una interfase de 23 horas a 15°C) y otra, que corresponde al 60% de la población binucleada y cuya interfase tiene una duración promedio de 26 horas. (González-Fernández y De la Torre 1979).

Fig. 14: Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de una población de células binucleadas con DNA, unifilarmente bromosustituído.

Las barras representan la duración relativa de las distintas etapas del ciclo (G_1 , S, G_2 y M) en las células binucleadas más rápidas (barra superior) y en el promedio de la población binucleada (barra inferior). Ambas poblaciones corresponden al 20 y 60% del total de células binucleadas respectivamente.

La escala de tiempo señala las horas transcurridas después de formada la población de células binucleadas, tras un tratamiento con una solución de cafeína 5 mM, durante 1 hora. En estos experimentos se considera tiempo 0 el momento en el que se suspende la incubación en cafeína.

La barra ~~con rayas~~ representa la duración del tratamiento con BrdUrd. Las flechas señalan los momentos en que se efectúan las distintas irradiaciones. Así, cada flecha corresponde a un experimento en particular, en el que sólo se ha cambiado el momento en que se ha efectuado la irradiación.

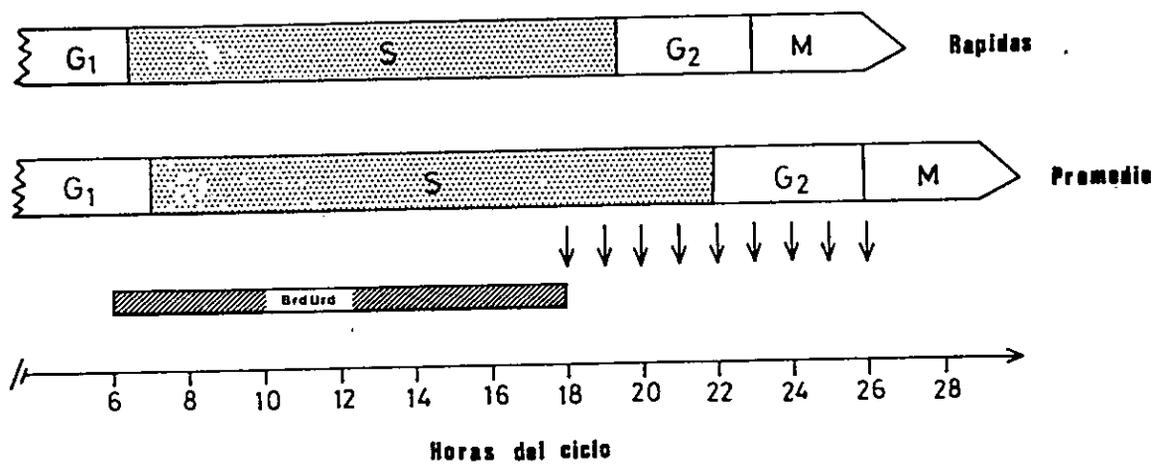


Fig. 14

Ambas subpoblaciones constituyen nuestro material de estudio.

Seis horas después de finalizado el tratamiento con cafeína (inicio de S), algunos bulbos fueron incubados en solución de bromosustitución, durante 12 horas. Con este tratamiento se cubre casi todo el período S de las células binucleadas más rápidas y aproximadamente el 75% del período S en el promedio de las células binucleadas. De esta manera queda sin bromosustituirse el DNA que replica en el último quinto de S, que en este material corresponde a las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Fussel, 1972, 1975; Schvartzman y Diez, 1977). Otros bulbos se mantuvieron en agua por igual tiempo (controles).

Posteriormente, algunos bulbos controles y otros tratados con BrdUrd fueron irradiados en distintos intervalos después de suspendido el tratamiento con BrdUrd (Fig. 14). Para nuestros fines, se consideró hora 0 el momento en que se suspendió el tratamiento con cafeína.

En cada uno de estos experimentos, se analizó la frecuencia de células en mitosis (células binucleadas

en mitosis, Fig. 15). Para este efecto, se fijaron tres o cuatro raíces por bulbo, cada dos horas, entre las horas 23 y 33. Las raíces fueron teñidas con orceína acética.

La figura 16 resume los resultados de este experimento. Se observa que, la irradiación o la bromosustitución efectuadas independientemente, no alteran significativamente la curva de entrada en mitosis de las células binucleadas. Sin embargo, cuando la irradiación se efectuó en células bromosustituídas entre las horas 18 y 21, lo que corresponde al primer tercio de G_2 , se bloquea totalmente la entrada de las células binucleadas en mitosis. Irradiaciones efectuadas en intervalos posteriores (hora 22 en adelante) provocan un bloqueo parcial en la entrada de células binucleadas en mitosis. No obstante, las ondas de mitosis son cuantitativamente diferentes, dependiendo del intervalo en que se llevó a cabo la irradiación. De esta manera, cuando las irradiaciones se realizaron entre las horas 22 y 23, sólo una pequeña fracción de células binucleadas fue capaz de iniciar la mitosis, (10 y 20% respectivamente). Probablemente, estas células corresponden a la fracción de células binucleadas más rápidas que habrían expresado la función necesaria para iniciar la mitosis antes de la hora 22. Por el contrario,

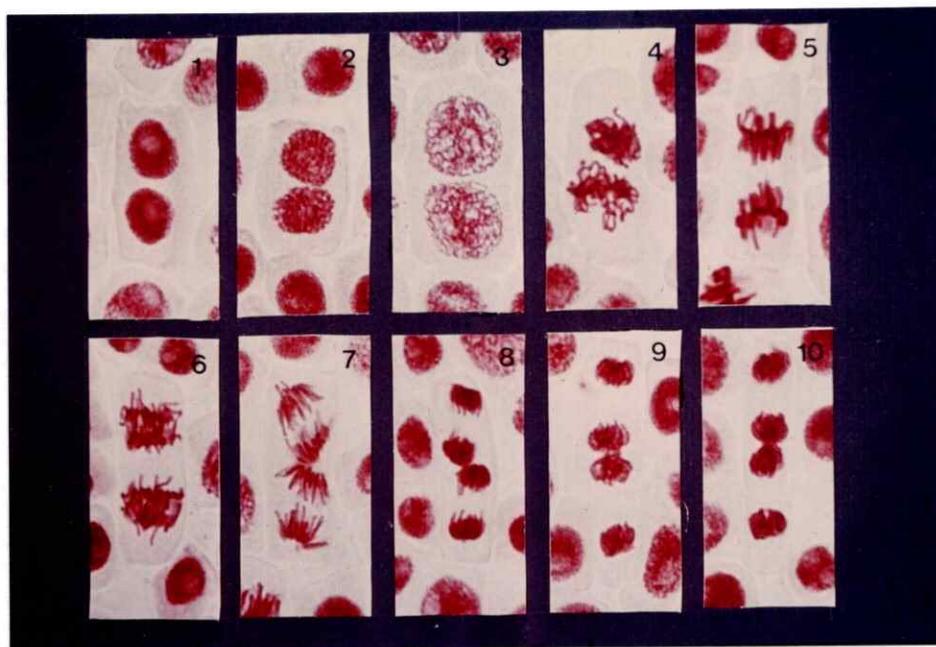


Fig. 15: Células meristemáticas binucleadas en distintas etapas de la mitosis, teñidas con orceína acética.

Las células binucleadas se obtienen por un tratamiento de las raíces con una solución de cafeína 5 mM, durante 1 hora. Estas células inician el ciclo celular en forma sincrónica entrando en mitosis 23 horas después de finalizado el tratamiento con cafeína, cuando son cultivadas a 15°C.

1: célula binucleada en interfase; 2 y 3: profase; 4: prometafase; 5: metafase; 6 y 7: anafase; 8 y 9: telofase; 10: citocinesis (450 X).

el promedio de la población de células binucleadas aún no había expresado esta función, quedando bloqueadas en G_2 por efecto de la irradiación.

Las irradiaciones efectuadas a partir de la hora 24 no modifican significativamente la onda de entrada de células binucleadas en mitosis. En este caso, llama la atención que la onda de mitosis está más circunscrita en el tiempo (ver recuadro Br-St 25 h, Fig. 16). Otra observación interesante es que la onda de mitosis está constituida fundamentalmente por células en profase, existiendo muy pocas células en otras etapas de la mitosis. Este hecho será analizado más adelante.

Estos resultados permiten localizar en la mitad del período G_2 una función de la que depende la progresión de las células a través de G_2 , tanto para la población binucleada más rápida (hora 22) como para el promedio de células binucleadas (hora 24). Sin embargo, este resultado no concuerda con un punto de transición puesto en evidencia en este mismo tipo celular por González-Fernández y col. (1974), mediante el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas. Estos autores han demostrado claramente que a la hora 19 del ciclo de las células

Fig. 16: Efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituído.

Los tres recuadros superiores muestran las frecuencias de células binucleadas en mitosis (bimitosis) en meristemas no tratados (control), en meristemas no tratados e irradiados a la hora 19 (control ↙ 18 horas) y en meristemas incubados en solución de bromosustitución, durante todo el período S (Br-St). Los recuadros restantes corresponden a experimentos efectuados en células binucleadas bromosustituídas e irradiadas a distintos intervalos de tiempo después del tratamiento con BrdUrd (Br-St ↙ h), de acuerdo al esquema experimental de la figura 14.

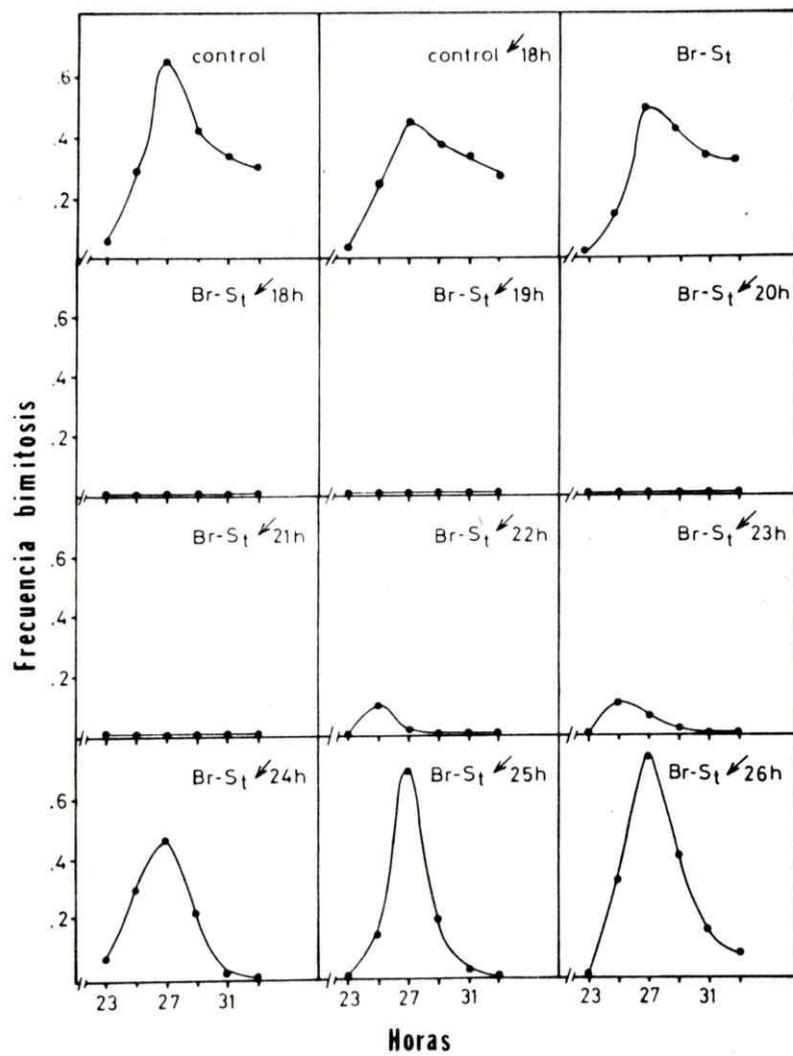


Fig. 16

binucleadas (final de S y comienzo de G_2) hay síntesis de proteína(s) necesaria(s) para que las células puedan iniciar la mitosis. Esta discrepancia temporal puede ser producto de la bromosustitución del genoma.

6. EFEECTO DE LA BROMOSUSTITUCION SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS RESPONSABLES DEL INICIO DE LA MITOSIS

Con el objeto de estudiar la discrepancia cronológica entre el momento en que se expresa el(los) gen(es) responsable(s) del inicio de la mitosis (ver Fig 16) con el punto de transición evidenciado con inhibidores de la síntesis de proteínas por González-Fernández y col., (1974), se desarrolló el esquema experimental que se resume en la figura 17.

Bulbos cultivados por 48 horas, fueron incubados en una solución de cafeína 5 mM, durante una hora. Seis horas después fueron incubados con solución de bromosustitución, durante 12 horas. Inmediatamente después, y a distintos intervalos (18, 20, 22, 24, 26 horas de formadas las células binucleadas), se iniciaron tratamientos continuos con una solución acuosa de anisomicina 4

Fig. 17: Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la bromosustitución sobre el momento en que hay síntesis de proteínas responsables del punto de transición en G₂.

Las barras representan la duración relativa de las distintas etapas del ciclo (G₁, S, G₂ y M) en las células binucleadas más rápidas (barra superior) y en el promedio de la población binucleada (barra inferior).

La escala de tiempo señala las horas transcurridas después de formadas las células binucleadas tras un tratamiento con una solución de cafeína 5 mM, durante 1 hora. En estos experimentos se considera tiempo 0 el momento en que se suspende la incubación en cafeína.

La barra de rayas representa la duración del tratamiento con BrdUrd. Las flechas horizontales representan distintos tratamientos continuos con una solución de anisomicina 4 uM.

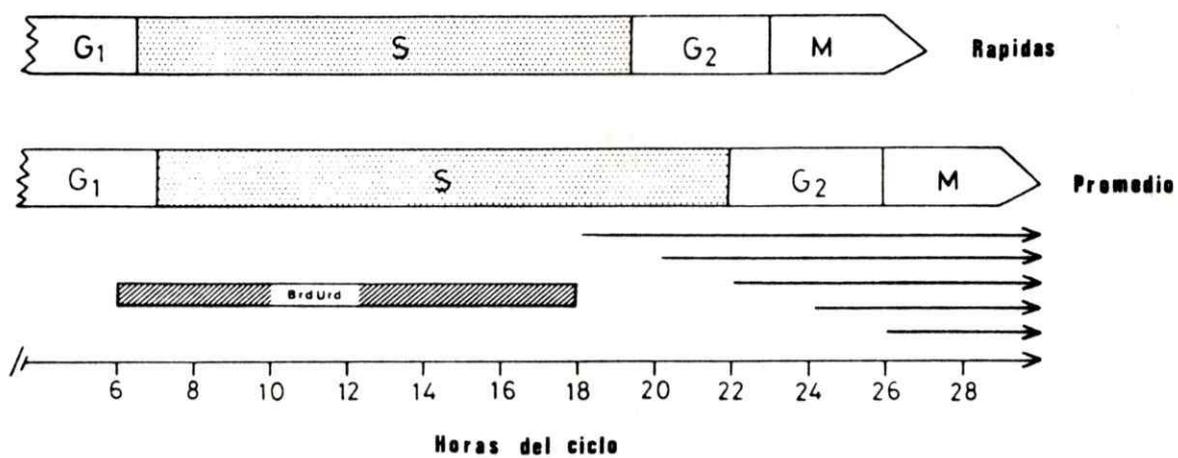


Fig. 17

uM. En cada uno de estos experimentos se estudió la frecuencia de células binucleadas en mitosis. Para este efecto cada 2 horas se fijaron 3-4 raíces por bulbo, entre las horas 23 y 33. Se consideró tiempo 0 el momento en el que se suspendió el tratamiento con cafeína. Se utilizó como control una población de células binucleadas no tratadas con BrdUrd e incubadas con anisomicina en los mismos tiempos indicados en la figura 17.

La figura 18 resume los resultados del tratamiento con anisomicina en células binucleadas control (no bromosustituídas). Se observa que la anisomicina bloquea totalmente el inicio de la mitosis sólo cuando el tratamiento se inicia a la hora 18 (final de S tanto en la población binucleada más rápida como para el promedio). Tratamientos realizados a partir de la hora 20 (después del primer cuarto de G_2 para la población de células binucleadas más rápidas) no alteran el inicio de la mitosis. Estos resultados permiten localizar un período de síntesis de proteínas entre la hora 18 y 19 después de formadas las células binucleadas (G_2 temprano para la población de células binucleadas más rápidas y S tardío para el promedio de la población binucleada). Estos datos concuerdan con los obtenidos en este mismo material por González-Fernández y col. (1974).

Fig. 18: Efecto de anisomicina sobre la progresión de células binucleadas a través del período G_2 .

El experimento se realizó de acuerdo al esquema de la figura 19, pero se omitió el tratamiento con BrdUrd.

Cada curva representa la frecuencia de células en mitosis (bimitosis), a distintos intervalos de tiempo después de formada la población binucleada.

El primer recuadro representa la curva de entrada en mitosis en células controles (no tratadas).

Los recuadros restantes corresponden a experimentos que difieren exclusivamente en el momento en que se inició un tratamiento continuo con anisomicina, según el esquema experimental de la figura 17. El tiempo de inicio del tratamiento con anisomicina se señala en la parte superior de cada recuadro.

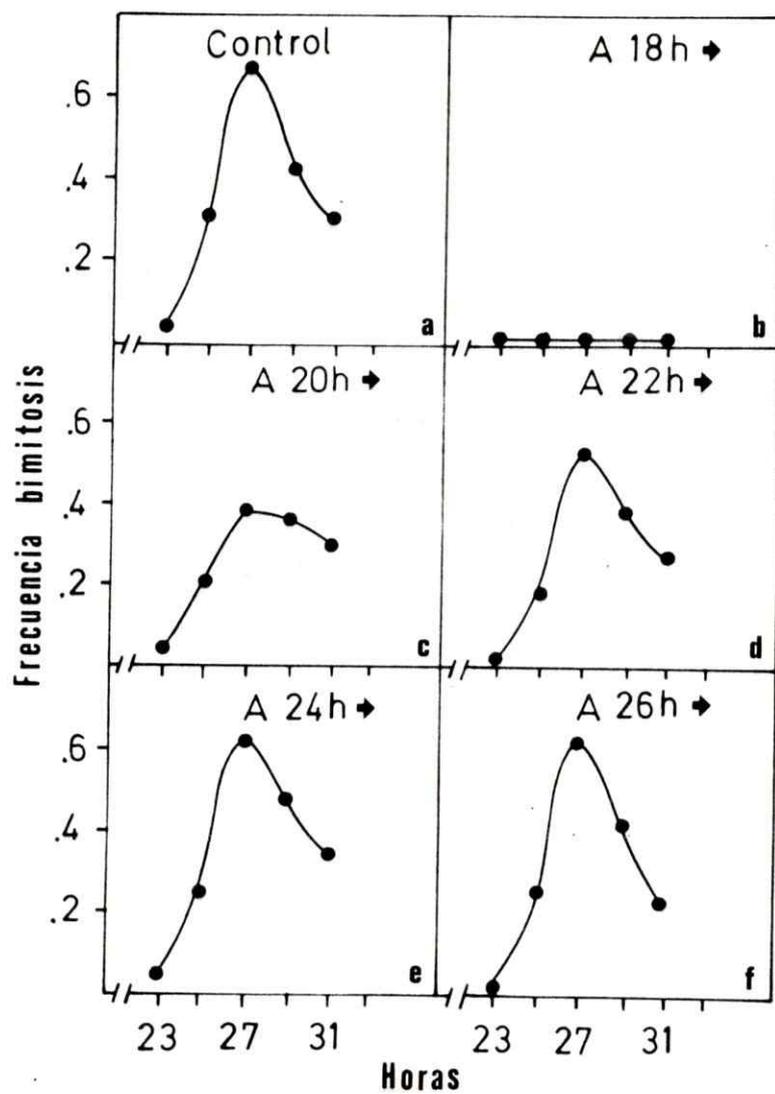


Fig. 18

La figura 19 resume los resultados de este mismo análisis en células binucleadas bromosustituídas. Se observa que tratamientos con anisomicina iniciados antes de la hora 24 de formadas las células binucleadas, bloquean el inicio de la mitosis.

Tratamientos iniciados en intervalos posteriores no impiden el inicio de la mitosis. Estos resultados permiten circunscribir el período de síntesis de proteínas necesarias para la progresión por G_2 entre las horas 18 y 24 del ciclo. Este intervalo es mayor al observado, en la población de células binucleadas no bromosustituídas y tratadas con anisomicina (Fig. 18).

Este hecho podría ser explicado por la formación de mensajeros anómalos antes que comiencen a funcionar los mecanismos de reparación del DNA. Una vez iniciada la síntesis de transcritos normales y en ausencia de anisomicina, se iniciaría la mitosis. Este razonamiento explicaría el mayor efecto de anisomicina en células bromosustituídas, el inicio de la mitosis en el tiempo esperado y la menor frecuencia de células en mitosis en la primera y después de ambos tratamientos (comparar Fig. 18c y Fig. 19c).

Fig. 19: Efecto de anisomicina sobre la progresión de células binucleadas con DNA unifilarmente bromosustituido a través del período G₂.

Cada curva representa la frecuencia de células en mitosis (bimitosis), a distintos tiempos después de formada la población de células binucleadas. El primer recuadro representa la curva de mitosis en células controles (no tratadas).

Los recuadros restantes corresponden a experimentos en células con DNA bromosustituido sometidas a un tratamiento continuo con anisomicina según el esquema experimental de la figura 17. El tiempo de inicio del tratamiento con anisomicina se señala en la parte superior de cada recuadro.

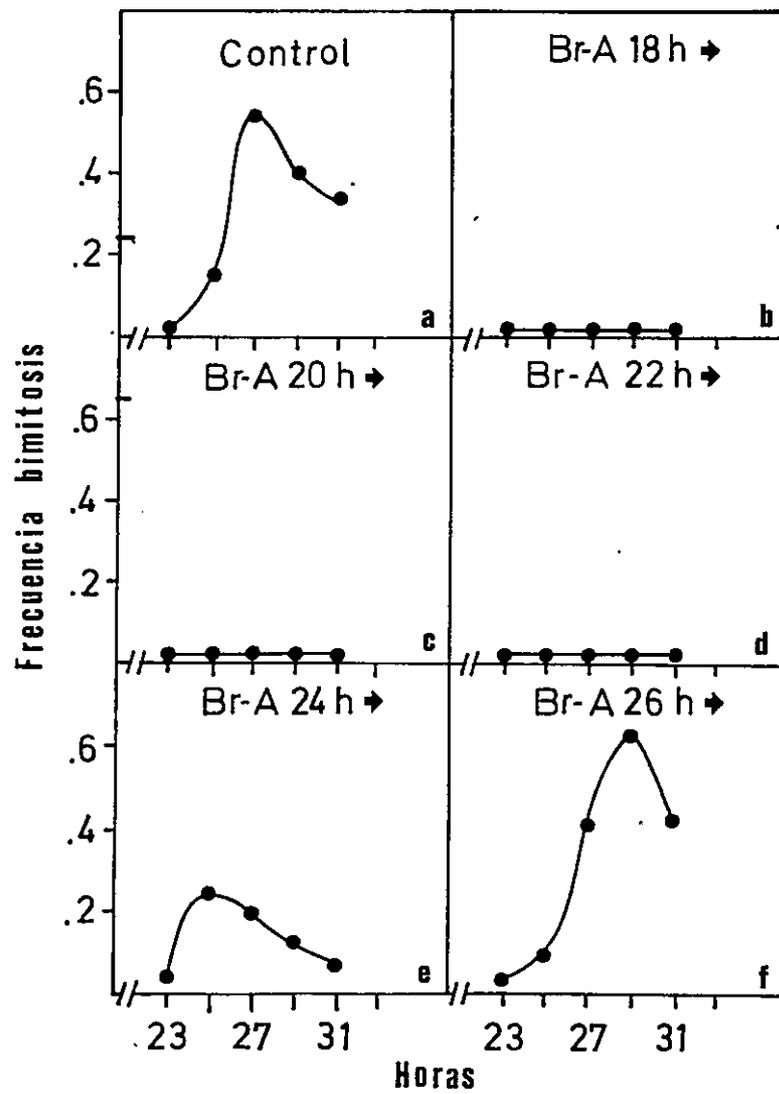


Fig. 19

Por otra parte, estos resultados sugieren que la progresión de células por G_2 sería dependiente de al menos dos sucesos independientes, uno a nivel de transcripción y otro de traducción.

7. DETECCION DE UN PUNTO DE CONTROL EN PROFASE RESPONSABLE DE LA TRANSICION PROFASE-METAFASE

Un hecho que llamó la atención en los experimentos referidos en 5., fue que en aquellos intervalos de tiempo en que la irradiación no bloqueaba el inicio de la mitosis en células binucleadas con DNA bromosustituído (ver Fig. 16, horas 25 y 26), las mitosis que se observaban correspondían casi exclusivamente a células en profase, tanto en la parte ascendente como en la descendente de la curva de mitosis. Un resultado esperable era que a una disminución de las células en profase siguiera un incremento de células en metafase. La no aparición de células en metafase podría estar sugiriendo que las células binucleadas en profase regresaran a interfase por efecto de la irradiación cuando ésta se efectuaba al comienzo de la profase (hora 24 y 25 del ciclo de estas células). Esta posibilidad ha sido sugerida por García-

Herdugo y col. (1974), mediante experimentos realizados en células meristemáticas, en los que se ha utilizado un inhibidor de la síntesis de proteínas administrado durante el inicio de la profase. Tanto los resultados de García-Herdugo como los presentados en esta tesis, sugerirían la existencia de otro punto de control del ciclo celular ubicado en profase. Para investigar esta posibilidad, se desarrolló el esquema experimental que se resume en la figura 20.

Bulbos cultivados por 48 horas fueron incubados en una solución de 5 mM de cafeína, durante una hora. Seis horas después algunos bulbos fueron incubados en solución de bromosustitución, durante 12 horas y otros se mantuvieron en agua por igual tiempo.

A la hora 24 de formadas las células binucleadas, tiempo que corresponde aproximadamente al primer tercio de la profase, se inició un tratamiento continuo con una solución de colchicina 10^{-3} M. Una hora después de iniciado este tratamiento (hora 25) algunos de estos bulbos se irradiaron y luego se continuó su incubación en colchicina por el resto del experimento. A fin de analizar la entrada en mitosis se fijaron tres a cuatro raíces cada

Fig. 20: Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células binucleadas con DNA uniformemente bromosustituído.

En el gráfico se representa la duración relativa de las distintas etapas del ciclo (G_1 , S, G_2 y M) en las células binucleadas más rápidas (barra superior) y en el promedio de la población binucleada (barra inferior). Ambas poblaciones corresponden al 20 y 60% del total de las células binucleadas respectivamente.

La escala de tiempo señala las horas transcurridas después de formada la población de células binucleadas, tras un tratamiento con una solución de cafeína 5 mM, durante 1 hora.

La barra con rayas representa el tratamiento con BrdUrd; la barra en negro representa el tratamiento con una solución de colchicina 10^{-3} M. La flecha vertical indica la hora en que se efectuó la irradiación.

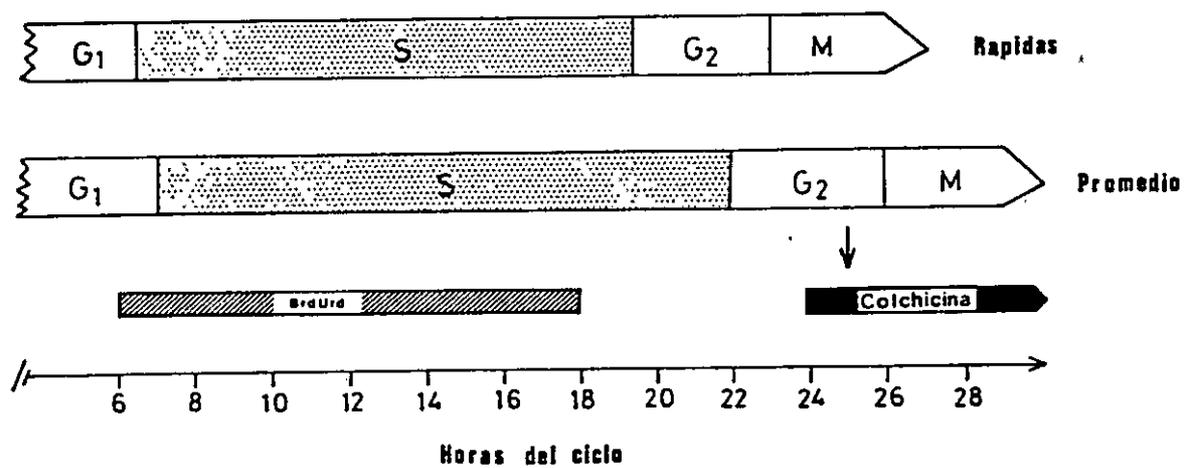


Fig. 20

2 horas, entre las horas 23 y 33 de formadas las células binucleadas. Se estudió independientemente la frecuencia de células en profase y en metafase. Los resultados de este experimento se resumen en la figura 21. Se observa en las tres situaciones controles (meristemas no tratados, no tratados e irradiados y sólo bromosustituídos Fig. 21 A, B y C respectivamente), que la frecuencia de células en profase disminuye a partir de la hora 29 de formadas las células binucleadas. Observándose además, después de la hora 25 que esta disminución de células en profase, se acompaña con un incremento correlativo en la frecuencia de células en metafase. Este hecho muestra claramente que las células en profase, como era de esperar, pasan después de un tiempo a metafase. El incremento progresivo en la frecuencia de células en metafase se debe al efecto acumulador de la colchicina.

Efectuando este mismo análisis en meristemas bromosustituídos e irradiados a la hora 25, aproximadamente después de transcurrido el primer tercio de la profase (Fig. 21, D), se observó que la frecuencia de células en profase disminuye en función del tiempo, sin observarse un incremento concomitante en la frecuencia de células en metafase. Además hay una clara caída en la frecuencia de células en mitosis. Estos resultados sugieren que la

Fig. 21: Efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células binucleadas con DNA uniformemente bromosustituído.

Frecuencias de células binucleadas en mitosis ($\blacktriangle\text{---}\blacktriangle$); profase ($\bullet\text{---}\bullet$); metafase (O---O), en meristemas no tratados (control), no tratados e irradiados (control \swarrow), tratados con BrdUrd (BrdUrd) y tratados con BrdUrd e irradiados (BrdUrd \swarrow).

Las horas indicadas en la abscisa corresponden al tiempo transcurrido desde la formación de las células binucleadas, tras un tratamiento con cafeína 5 mM, durante 1 hora.

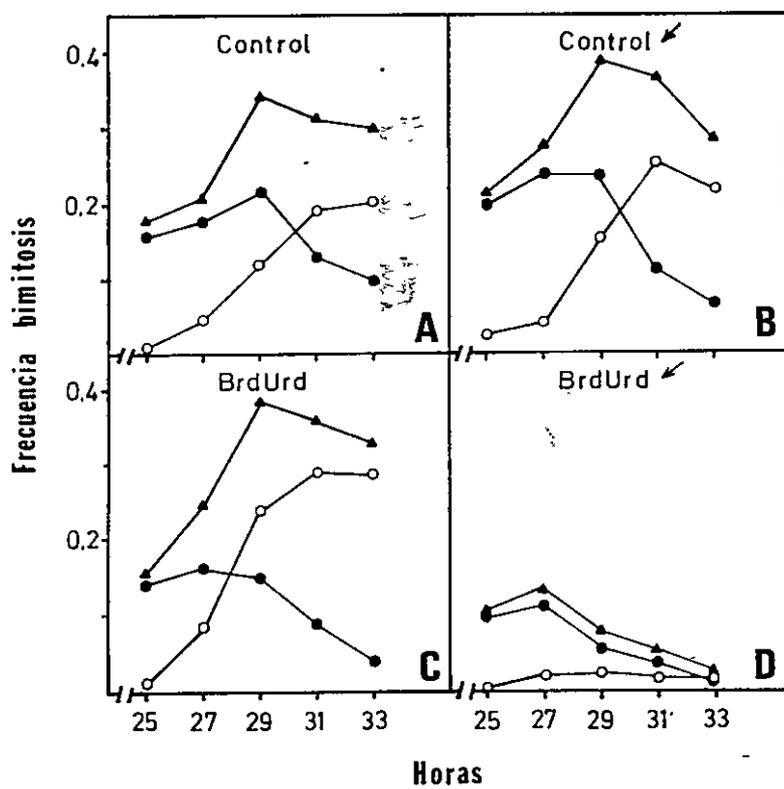


Fig. 21

irradiación de células con DNA bromosustituido bloquean el tránsito profase-metafase y afectaría la mantención del estado profásico.

A fin de ver si este mismo fenómeno se producía en una población de células meristemáticas asincrónicas se desarrolló el esquema experimental que se resume en la figura 22.

Bulbos cultivados por 48 horas, se incubaron en solución de bromosustitución, durante 24 horas, a fin de obtener una población de células con DNA unifilarmente bromosustituido. Bulbos controles fueron mantenidos en agua por igual período de tiempo. Seis horas después de finalizado el tratamiento con BrdUrd (tiempo suficiente para que lleguen al inicio de la mitosis las células que finalizaron el período replicativo en forma simultánea al término del tratamiento con BrdUrd) los bulbos fueron incubados por el resto del experimento en una solución de colchicina 10^{-3} M. Una hora después de iniciado este tratamiento, algunos bulbos controles y otros tratados con BrdUrd fueron irradiados en la forma habitual. A fin de estudiar la frecuencia de células en las distintas etapas de la mitosis, se fijaron tres a cuatro raíces por bulbo

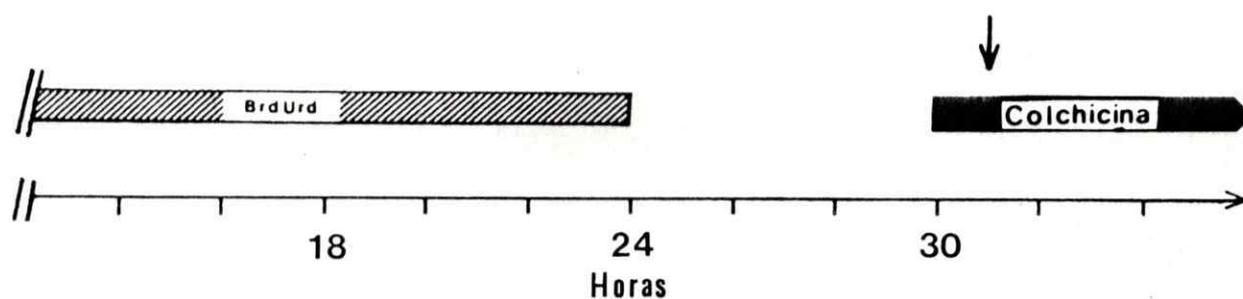


Fig. 22: Esquema experimental diseñado para estudiar el efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células meristemáticas mononucleadas en crecimiento asincrónico y con DNA unifilarmente bromosustituído.

La escala de tiempo señala las horas a partir del inicio del experimento. La barra de rayas representa la duración del tratamiento con BrdUrd y la barra en negro al tratamiento con una solución de colchicina 10^{-3} M. La flecha vertical señala el momento en que se efectuó la irradiación.

inmediatamente después de finalizada la irradiación y cada dos horas por un período total de 8 horas.

La figura 23 resume los resultados de este experimento. Se observa, en las tres situaciones controles (meristemas no tratados, no tratados e irradiados y sólo bromosustituídos, Fig. 23, A, B y C respectivamente) que la frecuencia de células en mitosis aumenta en relación al tiempo, manteniéndose constante la frecuencia de células en profase. En cambio la frecuencia de células en metafase, aumenta progresivamente en forma correlativa al incremento de células en mitosis. El incremento de la frecuencia de células en mitosis está dado fundamentalmente por la acumulación de células en metafase por acción de la colchicina. El hecho que la frecuencia de células en profase se mantenga constante en el tiempo indicaría que un número similar de células entran y salen de profase, y que las que finalizan esta etapa pasan a metafase.

Sin embargo, cuando se realizó este mismo análisis en la población de células meristemáticas que han sido bromosustituídas e irradiadas (Fig. 23 D), se observó que la frecuencia de células en mitosis disminuye en relación al tiempo. Esta caída está íntimamente relacio-

Fig. 23: Efecto de la irradiación sobre la progresión profase-metafase en células mononucleadas con DNA uniformemente bromosustituído.

Frecuencia de células en mitosis (\blacktriangle — \blacktriangle); frecuencia de células en profase (\bullet — \bullet), frecuencia de células en metafase (\circ — \circ); en meristemas no tratados (controles); no tratados e irradiados (control \swarrow); tratados con BrdUrd (BrdUrd) y tratados con BrdUrd e irradiados (BrdUrd \swarrow).

Las horas señaladas en la abscisa corresponden al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento con colchicina $10^{-3}M$.

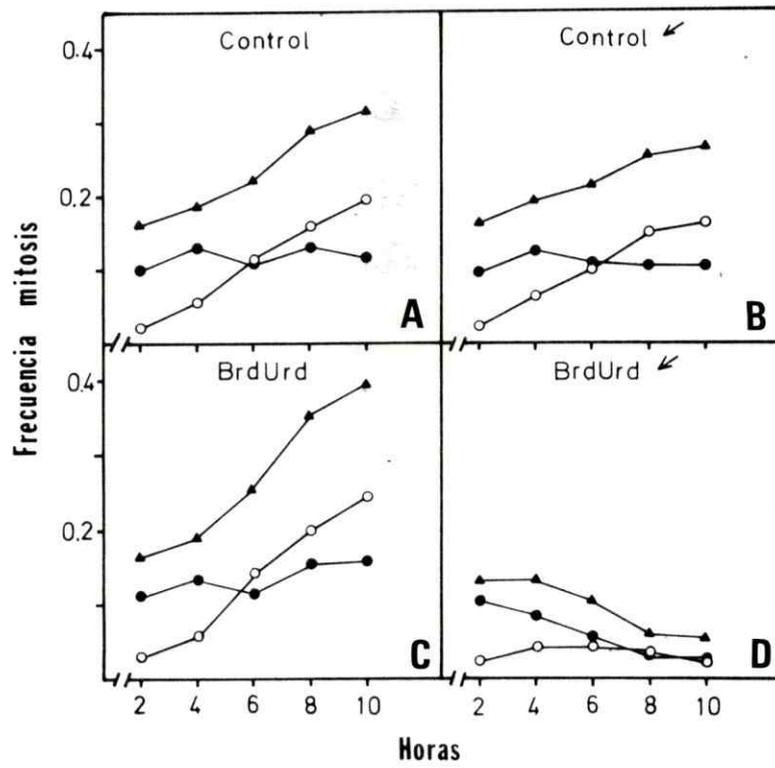


Fig. 23

nada con una disminución en la frecuencia de células en profase; curiosamente esta caída no va acompañada de un incremento correlativo en la frecuencia de células en metafase, siendo este resultado similar a lo observado en células meristemáticas sincrónicas (comparar Figs. 21 D y 23 D).

Los resultados obtenidos, tanto en células meristemáticas sincrónicas como en células asincrónicas, sugieren la existencia de un punto de transición en profase controlado genéticamente. Esta función génica, al parecer, estaría regulando por una parte el tránsito profase-metafase y por otra, la mantención del estado profásico. Sin embargo, con estos resultados no podemos decir que se trata de la expresión de una función génica que controla estos dos eventos o si son dos funciones que se están expresando en forma simultánea.

8. DETECCION EN EL PERIODO REPLICATIVO DE LA FRACCION DEL DNA RESPONSABLE DE LA PROGRESION DE LAS CELULAS A TRAVES DEL PERIODO G₂

Una vez caracterizado el punto de control o transición en G₂, interesó determinar el momento en que replica el sector del genoma implicado en dicha transición.

La replicación del DNA en los organismos eucarióticos es un proceso que ocurre por segmentos discretos llamados replicones (Cairns, 1966; Mueller y Kajiwara, 1966; Painter y Schaeffer, 1971). La replicación de estos segmentos tiene un orden temporal dentro del período S, que se mantiene inalterado en ciclos replicativos sucesivos (Mueller y Kajiwara, 1966; Brown y Will, 1969; Bostock y Prescott, 1971; Stanbrook, 1974; Tapiero y col., 1974; Adegoke y Taylor, 1977).

Considerando estos antecedentes sería factible obtener poblaciones celulares que presentan bromosustituido sólo una fracción de su genoma. Esto es posible mediante el tratamiento con BrdUrd de una población de células sincrónicas durante intervalos discretos del pe-

ríodo replicativo (Kajiwara y Mueller, 1964; Mueller y Kajiwara, 1966; Chang y Baserga, 1977; De la Torre y González-Fernández, 1979; O'Brien, 1980).

Mediante la irradiación con luz de 300-400 nm de longitud de onda de células con distintos segmentos de su DNA bromosustituído, es posible dañar diferencialmente distintos sectores del genoma. El análisis de la entrada a mitosis de las células sometidas a bromosustitución e irradiación permitiría así identificar dentro del período replicativo el momento en que duplica el sector del genoma responsable de la regulación del tránsito de las células por G_2 .

Teniendo en cuenta esta racional se desarrolló el esquema experimental de la figura 24.

Bulbos cultivados por 48 horas se incubaron en una solución de cafeína 5 mM por espacio de una hora. Seis horas después de formadas las células binucleadas, (inicio de S) grupos de bulbos fueron tratados con solución de bromosustitución por períodos secuenciales de dos horas de duración. El primer tratamiento se inició a la hora 6 y el último finalizó a la hora 22, después de for-

Fig. 24: Esquema experimental diseñado para analizar el efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de una población de células binucleadas unifilarmente bromosustituídas en distintos segmentos de su DNA.

En el gráfico se representa la duración relativa de las distintas etapas del ciclo (G_1 , S, G_2 y M) en las células binucleadas más rápidas (barra superior) y en el promedio de la población binucleada (barra inferior).

La escala de tiempo señala las horas transcurridas después de formadas las células binucleadas tras un tratamiento con cafeína 5 mM, durante 1 hora.

Las barras de rayas representan la extensión y cronología de los distintos tratamientos con BrdUrd. Las flechas verticales indican los tiempos en que se efectuaron las irradiaciones para cada experimento.

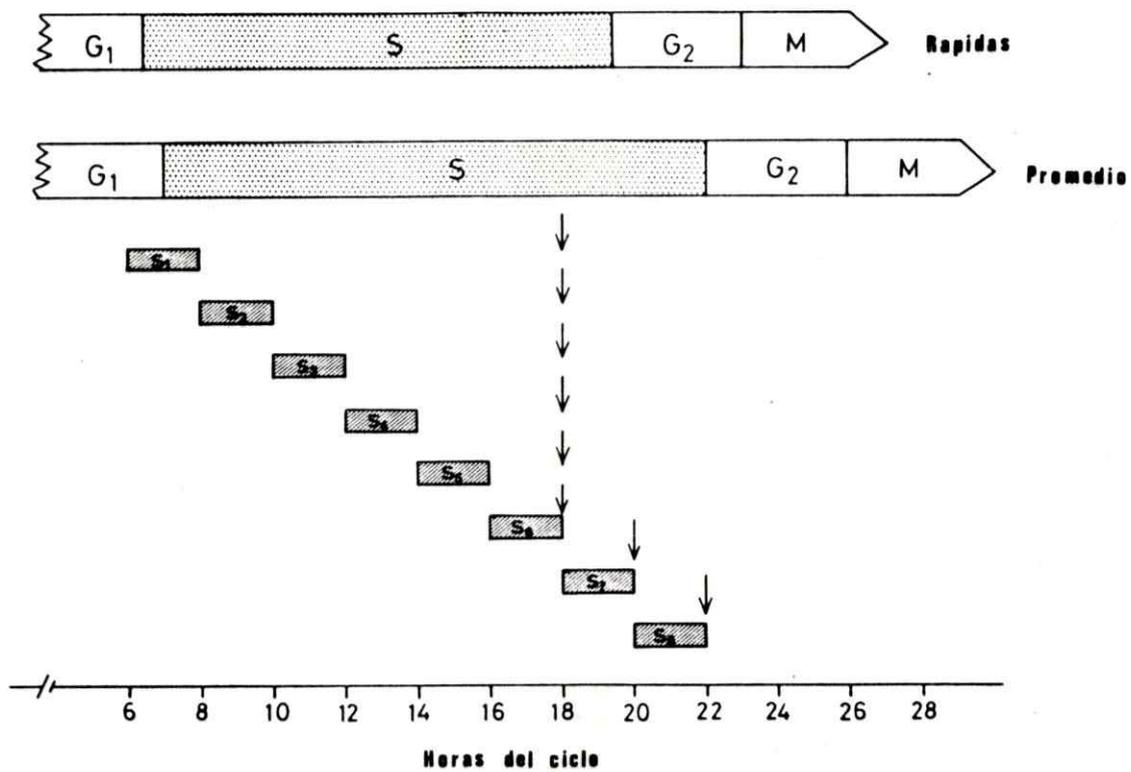


Fig. 24

madras las células binucleadas. De esta manera se obtienen 8 tipos de células binucleadas, que difieren únicamente en la porción de su genoma bromosustituido. Finalizado el tratamiento con BrdUrd se continuó el cultivo de los bulbos en agua hasta el momento de la irradiación. Los bulbos controles se mantienen en agua por un tiempo equivalente al tratamiento con BrdUrd. Los bulbos bromosustituídos entre las horas 6-8, 8-10, 10-12, 12-14, 14-16, 16-18 fueron irradiados durante 20 minutos a la hora 18, mientras que los bulbos bromosustituídos en los intervalos 18-20 y 20-22 fueron irradiados a las horas 20 y 22, respectivamente. Posteriormente, se fijaron y tiñeron con orceína acética 3 a 4 raíces por bulbo cada dos horas entre las horas 23 y 33 después de formadas las células binucleadas. Se determinó la frecuencia de células en mitosis en cada una de las condiciones experimentales. Los resultados de este experimento se resumen en la figura 25.

Se puede observar que la entrada en mitosis se bloquea cuando la irradiación se ha efectuado sobre células en que se ha bromosustituido los segmentos de S designados como S_4 y S_5 (bromosustituídos entre las 12-14

Fig. 25: Efecto de la irradiación sobre la entrada en mitosis de células binucleadas, que han sido unifilarmente bromosustituídas sólo en segmentos de su DNA.

El recuadro superior izquierdo muestra la frecuencia de células binucleadas en mitosis en una población control.

Los restantes recuadros corresponden a poblaciones binucleadas bromosustituídas en distintos momentos de la interfase: S_1 (6-8 hrs.); S_2 (8-10 hrs.); S_3 (10-12 hrs.); S_4 (12-14 hrs.); S_5 (14-16 hrs.); S_6 (16-18 hrs.); S_7 (18-20 hrs.); S_8 (20-22 hrs.). En la parte superior de cada recuadro se señala segmento de S bromosustituído y el tiempo en que se efectuó la irradiación.

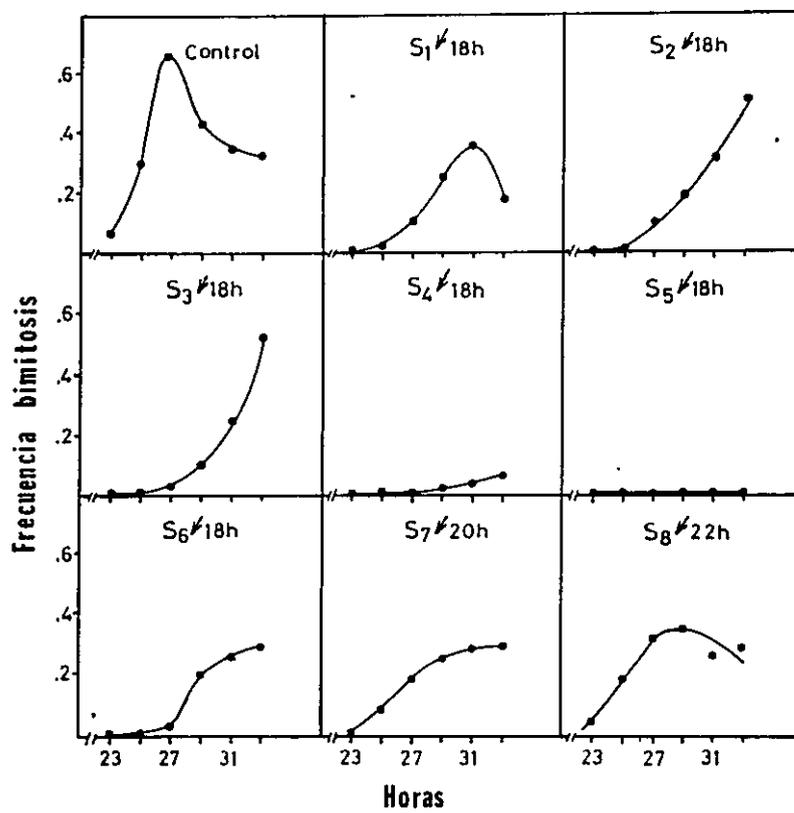


Fig. 25

y 14-16 horas respectivamente). El tratamiento con BrdUrd durante otros intervalos del período S modifica la frecuencia de células en mitosis pero no impide el inicio de esta etapa del ciclo celular.

Estos resultados muestran que el DNA que se duplica entre las horas 12 y 16 después de formadas las células binucleadas (período replicativo medio), corresponde a la zona del genoma relacionada con el punto de transición que permite la progresión de las células por G_2 . Es decir, en este intervalo replica(n) el(los) gen(es) involucrado(s) en la regulación del tránsito por el período G_2 e inicio de la mitosis.

D I S C U S I O N

Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido detectar eventos específicos del ciclo celular que dependen de la expresión de determinados sectores del DNA. Con este fin, se utilizó como metodología de análisis el efecto mutagénico de la luz de 300-400 nm sobre genomas con DNA bromosustituído.

El fundamento de este análisis se basa en la hipótesis que postula que la irradiación altera la expresión de todos aquellos genes cuyo DNA ha sido bromosustituído por aparición de RNA mensajeros con modificaciones en sus secuencias nucleotídicas. La traducción de estos mensajeros produciría proteínas cuya capacidad funcional estaría total o parcialmente alterada. La bromosustitución e irradiación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular ocasionaría un bloqueo de las células en aquellas etapas del ciclo en que el producto de estos genes sea requerido.

En una primera etapa de esta tesis se desarrollaron experimentos cuya finalidad fue estudiar el efecto de la bromosustitución e irradiación sobre el crecimiento radicular y establecer un posible vínculo con la actividad proliferativa a nivel meristemático. En una segunda etapa, el estudio se centró fundamentalmente en identificar eventos del ciclo celular dependientes de la expresión de genes que actuarían controlando la progresión de las células por el ciclo proliferativo, tanto en células meristemáticas sincrónicas como asincrónicas. Por último se efectuaron experimentos con el objetivo de identificar, dentro del período S del ciclo proliferativo, el momento en que replican los sectores del DNA cuya expresión se requiere para la división celular.

CRECIMIENTO RADICULAR

Los resultados obtenidos en el primer grupo de experimentos muestran que la bromosustitución del DNA de las células meristemáticas inhibe el crecimiento radicular en forma proporcional a la duración del tratamiento con el análogo. Este efecto es incrementado significativamente por irradiación de las raíces con luz de 300-400 nm. Es necesario tener en cuenta que en el crecimiento radicular partici-

pan dos componentes, proliferación celular en la zona meristemática y elongación celular en la zona de diferenciación. De esta manera la inhibición del crecimiento radicular puede deberse a un efecto directo del tratamiento sobre la actividad proliferativa a nivel meristemático, o bien a un trastorno en el proceso de elongación celular que ocurre en la zona de diferenciación de la raíz, o a una combinación de ambos efectos. De hecho, existen evidencias experimentales en células animales que sugieren que la incorporación del análogo al genoma provoca inhibición de la diferenciación (Bischoff y Holtzer, 1970; Goz, 1978; Colleta y col., 1979). Al respecto, debe considerarse que la BrdUrd se incorpora durante la replicación del DNA. Este proceso ocurre principalmente durante el período S del ciclo celular en las células meristemáticas. Sin embargo, las células que han iniciado el proceso de elongación pueden replicar su DNA sin posterior división celular. Por lo tanto, estas células también pueden incorporar BrdUrd. En consecuencia, la irradiación de las raíces tratadas con BrdUrd puede, por una parte, afectar la actividad proliferativa a nivel meristemático y por otra, ocasionar alteraciones en el proceso de diferenciación celular que se inicia en la zona de elongación de la raíz. En esta tesis se estudió el componente proliferativo del crecimiento radicular.

Los estudios citológicos de la región meristemática bromosustituída demostraron una caída significativa en la actividad mitótica, sugiriendo que la inhibición del crecimiento radicular podría deberse en parte a una disminución de la actividad proliferativa en el meristema.

La caída en la actividad mitótica ocasionada por la irradiación resultó ser proporcional a la duración del tratamiento con BrdUrd. Este hecho probablemente se relaciona con el número de células que presentan DNA nuclear totalmente bromosustituído en una de sus hebras. De esta manera, tratamientos que producen del orden de 47 y 90% de células con todo su DNA unifilarmente bromosustituído, inhibieron casi totalmente la actividad mitótica a nivel meristemático, sin observarse recuperación aún 48 horas después de efectuada la irradiación. Por el contrario, la caída de la frecuencia de células en mitosis, producida por la irradiación de raíces que fueron sometidas a un tratamiento corto con el BrdUrd (12 horas), es transitorio, pues la frecuencia de células en mitosis alcanza una cifra equivalente al de los controles después de 24 horas de terminada la irradiación. Esta recuperación podría deberse a una disminución del número de células meristemáticas con DNA bromosustituído como resultado del paso de estas células a la zona de diferen-

ciación. Concomitantemente, células no bromosustituídas, que han iniciado su actividad proliferativa después de la irradiación en el centro quiescente, pasarían al meristema (López-Sáez y col., 1975; Torrey y Felman, 1977).

Considerando que no se observan alteraciones morfológicas de las raíces, tanto a nivel macro como microscópico, la inhibición de la actividad mitótica producida por la irradiación de meristemas portadores de células con DNA bromosustituído, sería consecuencia de un bloqueo transitorio de las células en algún punto de la interfase.

El análisis de la frecuencia de células en las distintas etapas de la interfase, realizada después del tratamiento más largo con BrdUrd (36 horas), muestra claramente que la caída en la actividad mitótica producida por la irradiación sería fundamentalmente consecuencia de la acumulación de células en los períodos G_1 y G_2 de la interfase. La acumulación en G_1 y en G_2 estaría sugiriendo la existencia, al menos, de dos puntos de control en la interfase de las células meristemáticas.

Existen numerosas evidencias experimentales, tanto en plantas (Brunori y Ancora, 1968; Bryan, 1969; Van't Hof y Kovacs, 1973; Evans y Van't Hof, 1974; Rost, 1977; Evans y col., 1979; Sans y De la Torre, 1979; Sans y col.,

1980) como en células animales (Epifanova y Terskikh, 1969; Gelfant y Smith, 1972; Baserga, 1976, 1985; Prescott, 1976; Pardee y col., 1978; Hochhauser y col., 1981; Lloyd y col., 1982) que demuestran que la actividad proliferativa puede ser bloqueada por diversos agentes, en G_1 y/o en G_2 .

La existencia de dos etapas preferenciales del ciclo celular, en las que se puede detener la actividad proliferativa, ha dado origen a la hipótesis de los dos puntos principales de control del ciclo celular (uno en G_1 y otro en G_2), elaborada en plantas por Van't Hof y Kovacs (1973). Por su parte, Sans y De la Torre (1979) y Sans y col., (1980), han comprobado en blastemas radiculares de bulbos de Allium cepa L. en dormancia, que el 70% de las células que ocupan la zona meristemática se encuentran detenidas en G_1 (G_0) y el 30% restante en G_2 ($G_{0,2}$). Este hecho sugiere que estas células poseen al menos dos puntos de control de la actividad proliferativa, apoyando la hipótesis de Van't Hof y Kovacs.

CONTROL GENETICO EN G_1

Como se indicó anteriormente, la irradiación de células meristemáticas con DNA unifilarmente bromosusti-

tuído ocasiona una acumulación de células en G_1 . Este hecho sugiere que en esta etapa del ciclo se producen eventos susceptibles al tratamiento con BrdUrd e irradiación, que son necesarios para que las células puedan iniciar la replicación del DNA.

Curiosamente, esta acumulación de células en G_1 no se debe a un bloqueo total de las células en esta etapa del ciclo, puesto que se observan células en S. Este hecho puede deberse a que la irradiación no mutagenizaría todas las células bromosustituídas, de tal manera que aquellas células no alteradas podrían proseguir hacia S. También puede postularse que la mutación ocasionaría sólo una disminución en la actividad y/o en la síntesis de la(s) proteína(s) responsable(s) del punto de transición. En este caso, las células pueden quedar transitoriamente bloqueadas en G_1 hasta que se acumule la cantidad de proteína reguladora necesaria para disparar la replicación del DNA nuclear. Transcurrido un tiempo, estas células podrían iniciar la replicación de su genoma a una velocidad igual o mayor a la normal.

El período G_1 es una etapa importante del ciclo celular en la mayor parte de las células eucariontes, puesto que en ella ocurren sucesos que hacen posible el inicio y la total replicación del DNA. Así por ejemplo, se ha

comprobado que el inicio de la replicación del DNA es dependiente de la síntesis de RNA y proteínas durante G_1 , tanto en células animales (Prescott, 1976; Pardee y col., 1978; Hochhauser y col., 1981; Lloyd y col., 1982) como en células vegetales (Giménez-Martín y col., 1977, 1982). Más aún, experimentos de transplante de núcleos (Gurdon, 1963) y fusión de células de mamíferos (Rao y Johnson, 1970, 1974; Rao y Sunkara, 1978; Hochhauser y col., 1981) sugieren que el inicio del período S sería dependiente de un factor citoplasmático que se acumula a lo largo de G_1 .

Al respecto, estudios realizados en células meristemáticas plurinucleadas (tetranucleadas) de Allium cepa L. obtenidas por la inhibición de dos citocinesis sucesivas con cafeína, sugieren que la replicación del DNA depende de un factor citoplasmático. En efecto, la fase G_1 de estas células es similar o ligeramente más corto que la de células mononucleadas y la replicación del DNA se inicia sincrónicamente en todos los núcleos. Sin embargo, aquellos núcleos que están rodeados por una mayor cantidad de citoplasma (núcleos ubicados en los extremos de la célula) demoran considerablemente menos tiempo en replicar su DNA que los núcleos que están rodeados por menor cantidad de citoplasma (núcleos más centrales) [González-Fernández y col., 1971; Giménes-Mar

tín y De la Torre, 1977; Giménez-Martín y col., 1981]. Más aún, González-Fernández y col. (1974) han demostrado, en células meristemáticas binucleadas, que el inicio de la replicación depende de la síntesis de proteínas durante el período G_1 . Sin embargo, una vez iniciada la replicación puede continuar en ausencia de síntesis de proteínas (García-Herdugo y col., 1977; Moreno y col., 1982).

Por otra parte, se ha visto en este mismo sistema de células vegetales que la inhibición de la transcripción durante el período G_1 temprano produce un retraso en el inicio de la replicación del DNA nuclear, equivalente a la duración del tratamiento con el inhibidor (Selman 1981; Giménez-Martín y col., 1981). Estos autores han sugerido que en G_1 temprano se transcribirían uno o más RNA(s) mensajero(s) que se traduciría(n) en el G_1 tardío, gatillando el inicio de la replicación.

Evidencias directas de la existencia de proteínas reguladoras del ciclo proliferativo en el período G_1 se han publicado en los últimos años. Así, Rossow y col., (1979) postulan la existencia de una proteína (R) de vida media corta (2-3 horas), en células 3T3 y A-31, cuya síntesis durante el período G_1 es necesaria para la progresión de

las células hacia el período S. Recientemente, Popolo y Albergina, (1984) han encontrado en Saccharomices cerevisiae una proteína (PM 100.000) de vida media corta que se acumula durante G_1 y que alcanza un nivel crítico hacia el final de esta etapa, desencadenando la replicación del DNA nuclear.

Por otra parte, se ha aislado una gran variedad de mutantes que detienen su actividad proliferativa en G_1 (Sheinin, 1980). En muchos casos el análisis de complementación ha permitido determinar la existencia de un número discreto de pasos necesarios para la progresión de las células a través de G_1 (Howell, 1974; Hartwell, 1978; Liskay y Prescott, 1978; Hochhauser y col., 1981).

Existen numerosos tipos celulares que no presentan G_1 detectable, tanto en eucariontes unicelulares (Amoeba proteus y Physarum polycephalum) (Prescott, 1976; Hochhauser y col., 1981; Lloyd, 1982), como en células eucarióticas en los primeros estadios del desarrollo de animales superiores o en células en cultivo (Prescott, 1976). La desaparición del período G_1 , sin embargo, no presupone que las funciones que en él se realizan sean irrelevantes para la célula, sino que pueden estar desplazadas en el ciclo, de forma que se cumplan en otras etapas del ciclo proliferativo (Liskay, 1978).

Hace algunos años se aisló una línea celular mutante de Hamster Chino (Línea V79-8) que no presenta G_1 (G_1^-) Liskay, 1977. Rao y col. (1978), fusionaron esta mutante (G_1^-) con células HeLa en G_1 y encontraron que se inducía a la síntesis de DNA en el núcleo de las células HeLa. Este hecho demuestra claramente que las células V79-8 tienen un factor difusible que induce la síntesis de DNA y que no es especie específica. Este factor inductor de la replicación se halla presente incluso en células V79-8 en mitosis, sugiriendo que el gen que codifica esta proteína se expresa en forma constitutiva.

Liskay y Prescott (1978) han aislado cinco variantes de las células V79-8 que presentan G_1 (G_1^+). En estas mutantes se ha demostrado que el fenotipo G_1^- estaría determinado por al menos cuatro grupos de complementación. Es evidente entonces, que la transición G_1-S estaría controlada por la expresión de varias funciones génicas que en su conjunto harían posible el tránsito de las células de G_1 hacia S.

Los resultados presentados en esta tesis, y obtenidos en células asincrónicas de meristemas radiculares de cebolla, confirman la existencia de un mecanismo de regulación de la transición G_1-S , que depende de la presencia de

productos génicos específicos durante G_1 necesarios para el inicio de la replicación del DNA. Sin embargo, estos resultados no permiten precisar el número de eventos dependientes de la expresión de genes que controlan el inicio de S.

CONTROL GENETICO EN G_2

Por otra parte, los resultados obtenidos en células meristemáticas asincrónicas muestran que la bromosustitución produce además una ligera acumulación de células en G_2 , efecto que es incrementado significativamente por la irradiación. Estos resultados sugieren la existencia, en G_2 , de un suceso que depende de la expresión de uno o más genes necesarios para el inicio de la mitosis. Como se señaló anteriormente, la existencia de células en G_2 en meristemas de Allium cepa L. en dormancia también sugiere la existencia de un punto de control en G_2 .

La detención de la actividad proliferativa en G_2 no es un hecho exclusivo de células vegetales, ya que también ha sido detectado en células animales (Gelfant, 1966; Epifanova y Terskikh, 1969; Epifanova, 1977; Hochhauser, 1981).

Como ya se señaló, durante el período G_2 se llevan a cabo eventos que hacen posible el inicio de la mitosis. La transición G_2 -M es compleja, puesto que la mitosis lleva implícito cambios estructurales bastante dramáticos. Así, se observa un incremento en el grado de condensación de la cromatina, desaparición del nucléolo, desensamblaje del citoesqueleto interfásico, ruptura de la envoltura nuclear, formación del huso mitótico, etc. (Albert y col., 1983). También se ha demostrado, en diferentes tipos celulares, que el inicio de la mitosis requiere de la síntesis de RNA y proteínas (Hochhauser y col., 1981; Giménez-Martín y col., 1982).

González-Fernández y col. (1974) han demostrado, en células meristemáticas sincrónicas de Allium cepa L., que durante el período G_2 temprano hay síntesis de proteínas necesarias para el inicio de la mitosis. Este punto de control en G_2 ha sido estudiado también en células meristemáticas tetranucleadas (Giménez-Martín y De la Torre 1977; Giménez-Martín y col., 1982). Los resultados sugieren que el inicio de la mitosis estaría controlado por dos tipos de factores, uno que actuaría como inductor y otro como represor.

Rao y Johnson (1970, 1974) han demostrado, mediante experimentos en los que fusionaron células en período G_1 o en S con células en G_2 , que el núcleo G_2 "espera" a los núcleos más rezagados para entrar en mitosis. Los núcleos rezagados tienen un tránsito por G_2 un tanto más rápido de lo usual. Este efecto está en relación directa con el número de núcleos en G_2 presentes en la fusión. Este antecedente es una evidencia más en favor de la existencia de factores que controlan la entrada de células en mitosis. Otro hecho experimental que demuestra la existencia de estos factores de control del ciclo celular se desprende del hecho que, la fusión de células en S con células en G_2 no induce replicación del DNA en núcleos de las células en G_2 . Esta observación ha sido interpretada postulando la existencia, en el núcleo G_2 , de un factor no difusible unido a la cromatina que impide la iniciación de una nueva ronda de replicación en los replicones ya duplicados (Rao y Johnson, 1970).

Por el contrario, existen numerosas evidencias que demuestran que el estado mitótico también sería inducido por la aparición de un factor citoplasmático difusible. Así, Gurdon, 1968 ha demostrado la inducción de mitosis en núcleos interfásicos cuando son microinyectados en huevos de Xenopus laevis.

Por otra parte, la fusión de células en mitosis con células en otras etapas del ciclo celular promueve la condensación prematura de la cromatina y la ruptura de la envoltura nuclear de los núcleos de las células en interfase (Rao y Johnson, 1970). Rao y Johnson (1974), demostraron con este mismo tipo de experimentos que durante la fusión celular existe difusión de proteínas marcadas isotópicamente, desde el citoplasma de las células en mitosis hacia los núcleos de las células en interfase. Resulta claro, entonces, que las células en mitosis son portadoras de un factor citoplasmático que actuaría induciendo la condensación cromosómica.

Al-Bader y col. (1978) han encontrado en células HeLa, mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, la existencia de proteínas específicas de G_2 necesarias para la progresión de las células hacia la mitosis.

En los últimos años se ha profundizado el análisis de este factor citoplasmático. Así, en oocitos de anfibios se ha aislado un factor capaz de promover la meiosis de esta célula, que ha sido denominado MPF ("maturation promoting factor") (Masui y Markert, 1971). Este factor ha sido parcialmente purificado (Wu y Gerhart, 1980) y se ha en

contrado en una gran variedad de células en mitosis (Kishimoto y col., 1982).

En forma más directa se ha demostrado que la microinyección del factor promotor de maduración (MPF), a huevos de Xenopus laevis detenidos al final del período S, induce los eventos tempranos de la mitosis (Meake-Lye y col., 1983). Recientemente, se ha probado que MPF induce la condensación de la cromatina y la ruptura de la envoltura nuclear en un sistema libre de células. Este último evento se produciría a consecuencia de la despolimerización de la lámina nuclear, provocada por la fosforilación de las proteínas "lámina A y C". Sin embargo, MPF no sería el agente fosforilante de estas proteínas sino que desencadenaría una cascada de reacciones que culminan con la fosforilación de ellas (Meake-Lye y Kirschner, 1985).

Los resultados obtenidos en esta tesis, en células asincrónicas de meristemas radiculares, confirman la existencia de un control en G_2 . Resultados obtenidos en células meristemáticas sincrónicas muestran que el o los genes que controlan el inicio de la mitosis se expresan aproximadamente en la mitad del período G_2 . Este resultado permite postular que dicho momento correspondería a un punto de transición, que representaría el momento efectivo de la trans-

cripción del gen(es) responsable(s) de la inducción de la mitosis. Además, sugiere que la transición G_2 -M estaría regulada a nivel transcripcional.

Este punto de transición correspondería al momento de G_2 en el que ocurre síntesis de RNA necesaria para el inicio de la mitosis (González-Fernández, comunicación personal). Sin embargo, el punto de transición en G_2 , descrito en esta tesis, es posterior a la síntesis de una o más proteínas, evidenciada mediante el uso de inhibidores de síntesis de proteínas (González-Fernández y col, 1974). Esta discrepancia cronológica sería el producto de una prolongación del tiempo efectivo de síntesis de proteínas ocasionado por la incorporación del BrdUrd (ver Fig. 19). Resulta sorprendente, entonces, que un alargamiento del período de síntesis de proteínas no provoque retardo en el inicio de la mitosis. Esto podría sugerir que la síntesis de proteínas es un requisito, pero no un determinante, del inicio de la mitosis.

CONTROL GENETICO EN PROFASE

Otro hecho interesante observado en esta tesis es, que una vez transcurridos dos tercios del período G_2 , la irradiación no altera la entrada de las células meriste-

máticas binucleadas en mitosis. Sin embargo, el hecho que en presencia de colchicina no aumenta la frecuencia de células en metafase y disminuye la frecuencia de células en profase, se puede interpretar como el resultado del retorno de las células a la interfase.

Se ha postulado reiteradamente que las células que inician la mitosis están irrevocablemente destinadas a terminarla. Sin embargo, en la actualidad existe una serie de evidencias experimentales que sugieren que la transición profase-metafase sería otro punto de control en el ciclo celular. Así, se ha visto en células sincrónicas de meristemas radiculares de cebolla que la inhibición de la síntesis de proteínas, en el comienzo de la profase, impide el paso de las células a la metafase. Curiosamente, estas células no permanecen en esta etapa del ciclo sino que retornan a G_2 (García-Herdugo y col., 1974).

Del Campo (1980), estudió en cebolla el rol de la síntesis de proteínas sobre la sincronía en la entrada de los núcleos de células meristemáticas plurinucleadas a la metafase. La inhibición de la síntesis de proteínas en el inicio de la profase, alarga esta fase de la mitosis tanto en los núcleos más rápidos (ubicados en los extremos de las

células tetranucleadas) como en los núcleos más rezagados (ubicados en la zona más central de las células tetranucleadas). Sin embargo, tratamientos con el inhibidor durante la profase media y tardía, no alteran el inicio de la metafase. Este hecho sugiere que el inicio de la metafase es dependiente de la síntesis de proteínas que se producen durante la profase temprana.

Por otra parte, estudios realizados con inhibidores de la síntesis de RNA muestran que la administración del inhibidor durante la profase impide la ruptura de la envoltura nuclear, sugiriendo que este evento es dependiente de la síntesis de RNA. Las células meristemáticas tratadas con este tipo de inhibidor inician una endomitosis (la cromatina se condensa en el interior del núcleo) y la citocinesis ocurre con estrangulamiento del núcleo, que puede llevar a un reparto desigual del material nuclear (Giménez-Martín y col., 1981).

Tratamientos secuenciales con un inhibidor de la síntesis de RNA, durante la profase de células meristemáticas plurinucleadas, muestran que cuando el inhibidor es aplicado durante la mitad de la profase se produce un retraso significativo en el inicio de la metafase (Giménez-Martín y col., 1981).

García-Herdugo y col. (1974) determinaron, en células meristemáticas de Allium cepa L., la secuencia temporal de la síntesis de RNA y proteínas durante la profase. Sus resultados muestran, que la síntesis de proteínas necesarias para el inicio de la metafase ocurre mucho antes que la síntesis de RNA necesario para la ruptura de la envoltura nuclear. La función de este RNA es difícil de precisar con estos experimentos. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis muestran, indirectamente, que debe existir síntesis de RNA durante la profase para que las células puedan pasar a la metafase. Para explicar estos resultados, se puede postular que la síntesis de proteínas en profase está codificada por un segmento del DNA que se transcribe y traduce muy rápidamente; en este caso, prácticamente existiría una sobreposición temporal entre estos dos procesos. En conclusión, se puede decir que la transición profase-metafase depende de la expresión de uno o más genes durante la profase, haciendo posible de esta manera la continuación de la mitosis.

MOMENTO EN QUE REPLICA EL SEGMENTO DE DNA INVOLUCRADO EN LA TRANSICION G₂-M

Otro objetivo de esta tesis ha sido localizar

dentro del período S, el momento en que replica el sector del DNA comprometido con el inicio y tránsito de la mitosis.

Las células eucarióticas presentan un patrón de replicación del DNA cronológicamente fijo. Es decir, una porción definida del genoma se replica en el mismo momento en períodos replicativos sucesivos (Mueller y Kajiwara, 1966; Brown y Will, 1969; Bostock y Prescott, 1971; Stanbrook, 1974; Tapiero y col., 1974; Adegoke y Taylor, 1977). Por lo tanto, es posible bromosustituir segmentos discretos del genoma, en una población de células sincrónicas, modificando sólo el tiempo de administración del análogo en relación con el inicio del período S. Este hecho, junto con la posibilidad de alterar la expresión génica con la irradiación, permite identificar el momento del período S en el que replica el sector del DNA comprometido con una determinada función celular (Kajiwara y Mueller, 1964; Mueller y Kajiwara, 1966; Chang y Baserga, 1977; De la Torre y González-Fernández, 1979; O'Brien, 1980).

Siguiendo este mismo razonamiento, se ha comprobado en esta tesis que el segmento del genoma requerido para que las células meristemáticas puedan iniciar la mitosis, replicaría aproximadamente en la mitad del período S. Sin embargo, es preciso recalcar que con la metodología de

análisis usada no se está identificando el o los genes involucrados en esta función, sino que el período en el que replica aquella parte del genoma que incluye estos genes. Por supuesto, que durante este período replican también otros segmentos del genoma cuyos genes no estarían necesariamente comprometidos en el control de la transición G_2 -M.

Un hecho interesante de destacar es que la mayoría de los genes que codifican para proteínas específicas de ciertas líneas celulares replican en la primera mitad del período S. Así, por ejemplo, se ha visto que los genes responsables de las siguientes funciones replican en el período S temprano: genes responsables de la capacidad formadora de colonias de células HeLa (Kajiwara y Mueller, 1964), el gen necesario para la diferenciación miogénica en cultivo (Lough y Bischoff, 1976), los genes ribosomales (Stanbrook, 1974; D'Andrea y col., 1983), el gen Ala-32 en células L-5178 (Suzuki y Okada, 1975), el gen responsable de la mutación termosensible que bloquea a las células AF-8 en G_1 y los genes necesarios para su sobrevivencia en cultivo (Chang y Basergera, 1977), el gen que codifica la enzima tirosina amino transferasa (O'Brien, 1980), el gen que codifica la enzima carbamilfosfato sintetasa y otras (Goldman y col., 1984). Al respecto Goldman y col. (1984), han propuesto que no sólo

Los genes involucrados en la síntesis de proteínas específicas replican en la primera mitad del período S, sino que también otros genes que pueden experimentalmente ser inducida su transcripción. Los genes que pierden esta propiedad, por el contrario, pasan a replicar en el período S tardío. El DNA medianamente repetitivo puede replicar indistintamente en S temprano o tardío.

En este contexto, los resultados presentados en esta tesis indican que el o los genes involucrados en la transición G_2 -M, replican hacia la mitad del período S. Considerando que los genes involucrados son funcionales en Allium cepa L., es posible postular que este sector esté replicando hacia el final de la primera mitad del período S. Tanto la postulación de Goldman, como el resultado comentado, se ven apoyados por el hecho que en Allium cepa L. las regiones centroméricas y teloméricas replican en el período S tardío (Fussel, 1972, 1975; Schwartzman y Díez, 1977).

Otro hecho interesante que se desprende de los resultados es que la bromosustitución, de sólo una de las cadenas del DNA e irradiación posterior es suficiente para producir un bloqueo de eventos celulares necesarios para la progresión de las células por el ciclo celular. Al res-

pecto, si se considera que sólo una de las cadenas del DNA es la que se transcribe, entonces, por efecto de la irradiación, se debería alterar la transcripción de un gen sólo cuando éste tiene su DNA bromosustituído. Los resultados presentados en esta tesis utilizando células binucleadas sugieren, pero no prueban, que la irradiación altera ambas cadenas del DNA (la bromosustituída y la nativa). Este hecho ha sido llamado dominancia unifilar por Rutter y col., 1973. Se desconoce el mecanismo de esta alteración. En todo caso, el hecho concreto que se desprende de los resultados presentados es que la irradiación de un genoma unifilarmente bromosustituído, en cualquiera de sus dos cadenas, bloquea funciones celulares asociadas con el ciclo celular, como resultado, probablemente, de mutaciones que alteran la expresión génica (Szybalski, 1964; Carlson, 1969; Eisenberg y Pardee, 1969; Scaife, 1970; Chu y col., 1972; Davison y Kaufman 1972; Jones y Dove, 1972; Chang y Baserga, 1977; Goz, 1978; Nakamura y Okada, 1979; Stopek y Hutchinson, 1982).

De esta manera, la propiedad de alterar la expresión génica mediante el efecto mutagénico de la luz de 300-400 nm sobre un genoma unifilarmente bromosustituído, parece ser una estrategia experimental bastante adecuada para detectar el momento en que se transcriben genes involu-

crados en eventos específicos del ciclo celular, que requieran la transcripción y traducción inmediata del transcripto. Es decir, para detectar aquellos eventos celulares regulados a nivel transcripcional en que, tanto los transcriptos como las proteínas, son de vida media corta y aparecen en momentos precisos del ciclo celular desencadenando uno o más sucesos que conducirían a la división celular.

La estrategia experimental utilizada en esta tesis se podría considerar como una fenocopia mutacional que simularía la acción de inhibidores de transcripción. Sin embargo, tendría un efecto útil diferencial a nivel de poblaciones celulares, ya que preservaría la transcripción normal después de la irradiación en aquellas células cuyo DNA no está bromosustituído. Tampoco afectaría aquellos sectores de DNA no bromosustituídos, como ocurre cuando el tratamiento con el análogo cubre sólo una parte del período replicativo.

Los resultados expuestos en esta tesis demuestran que la irradiación de células con DNA unifilarmente bromosustituído bloquea la progresión de las células en etapas o momentos bien definidos del ciclo celular. Se ha planteado como probable causa de este bloqueo la alteración de la

expresión de genes ciclo-específicos; es decir, genes que se transcriben sólo en momentos muy definidos del ciclo celular y que actuarían controlando el tránsito de las células por él. Sin embargo, podría haber la posibilidad de que el bloqueo producido por la irradiación sea producto de un trastorno en la expresión de genes no ciclo-específicos; es decir, por genes que se expresan a lo largo de todo el ciclo celular.

Se ha postulado que la proliferación celular en los meristemas estaría controlada por hormonas que estimulan la proliferación (citocininas, auxinas y giberilinas) y por otras que la inhiben (ácido abscísico), ejerciendo su acción en etapas específicas del ciclo (Fosket, 1977; Brent-Loy, 1977). En muchos casos estas hormonas se sintetizan en tejidos distintos a los meristemas y por lo tanto existiendo un gradiente de concentración de ellas a lo largo del meristema (Barlow, 1976). Indudablemente, este hecho implica la existencia en las células meristemáticas de receptores para estas hormonas desde donde ellas regularían la expresión de genes que controlan la transición G_1 -S, G_2 -M y profase-metafase. De esta manera, se podría bloquear la proliferación celular por la irradiación de las células meristemáticas bromosustituídas, sólo si, tanto los receptores como los RNAs

mensajeros para estos receptores sean de vida media corta. Al menos en Allium cepa L. no se conoce la vida media de estos receptores.

Con los antecedentes y resultados expuestos en esta tesis se puede concluir que, la progresión de las células meristemáticas de Allium cepa L. por el ciclo proliferativo dependería de la expresión de genes en etapas definidas de este ciclo. Así, se ha presentado evidencias de la existencia de por lo menos tres eventos del ciclo celular en los que la expresión del genoma sería necesaria para que las células puedan, en último término, dividirse. Uno de estos eventos estaría ubicado en G_1 , y controlaría la transición G_1 -S. Otro evento ocurriría en G_2 , y controlaría la transición G_2 -M. Un tercer evento acontecería en la profase y controlaría la transición profase-metafase. El evento responsable de la transición G_2 -M, estaría codificado por un segmento del DNA que replica aproximadamente en la mitad del período S.

C O N C L U S I O N E S

1. La progresión de las células meristemáticas de la raíz de Allium cepa L., por el ciclo celular depende de la expresión de genes en etapas definidas del ciclo.
2. La transición G_1 -S estaría controlada por la expresión de uno o más genes en algún momento de G_1 .
3. La transición G_2 -M estaría controlada por la expresión de uno o más genes en la mitad de G_2 .
4. La transición profase-metafase estaría controlada por la expresión de uno o más genes, en el primer tercio de la profase.
5. El o los genes que controlan la transición G_2 -M, replicarían aproximadamente en la mitad del período S.

B I B L I O G R A F I A

- Adegoke, J.A. and Taylor, J.H. (1977). Sequence programming of DNA replication over the S phase of Chinese Hamster cells. *Exptl. Cell Res.* 104: 47 - 54.
- Al-Bader, A.A., Orengo, A. and Rao, P. (1978). G₂ phase-specific proteins of HeLa cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 6064 - 6068.
- Albert, B., Bray, D., Lewis, D., Raff, M., Robert, K. and Watson, J.D. (1983). *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc.
- Augenlicht, L., Nicolini, C. and Baserga, R. (1974). Circular dichroism and thermal denaturation studies of chromatin and DNA from BrdU-treated mouse fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59: 920 - 926.
- Balazs, I. and Schildkraut, C.L. (1972). DNA replication in synchronized. Cultured mammalian cell. II. Replication of ribosomal cistrons in thymidine-synchronized cells. *J. Mol. Biol.* 57: 153 - 158.

- Barlow, P. (1976). Towards an Understanding of the Behaviour of Root Meristems. *J. Theor. Biol.* 57, 433-451.
- Baserga, R. (1976). Multiplication and division in mammalian cells. Ed. por Marcel Dekeer, New York.
- Baserga, R., Mine, P.M., Tsuitsui, Y., Whelley, S., Chang, E., Rossini, M. and Huang, Ch. (1976-1977). Nuclear control of cell proliferation. *International Cell Biology* Ed. Blidkley, B.R. and Porter, K. Rockefeller University Press. pp. 409 - 493.
- Baserga, R. (1978). Resting cells and G₁ phase of the cell cycle. *J. Cell Physiol.* 95: 377 - 386.
- Baserga, R., Waechter, E., Soprano, J. and Galanti, N. (1982). Molecular biology of cell division. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 397: 110 - 120.
- Baserga, R. (1985). The biology of cell reproduction. Harvard University Press.

Basilico, C. (1977). Temperature-sensitive mutations in animal cells. *Adv. Cancer Res.* 24: 223 - 266.

Bischoff, R. and Hotlzer, H. (1970). Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis in 5-bromodeoxyuridine. *J. Cell Biol.* 44: 134 - 150.

Bostock, C.J. and Prescott, D.M. (1971). Shift in bouyant density of DNA during the synthetic period and its relation to euchromatin and heterocromatin in mammalian cell. *J. Mol. Biol.* 60: 151 - 162.

Braun, R. and Willi, H. (1969). Time sequence of DNA replication in Physarum. *Biochim. Biophys. Acta*, 174: 246-252.

Brent-Loy, J. (1977). Hormonal regulation of cell division in the primary elongating meristems of shoots. In: *Mechanisms and control of cell division*. T.L. Rost and E.M. Giffort, Ed. Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Stroudsburg, Pennsylvania.

- Brunori, A. and Ancora, G. (1968). The DNA content of nucleous in the embrions roots apices of dry seeds of Allium cepa and their radiations. *Cariologia*. 21: 261-269.
- Bryant, T. (1969). DNA synthesis and cell division in germinations onion II mitotic cycle and DNA content. *Cariologia*. 22: 135 - 148.
- Cairns, J. (1966). Autorradiography of HeLa cell DNA. *J. Mol. Biol.* 15: 372 - 373.
- Carlson, P.S. (1969). Production of auxotrophic mutants in ferms. *Genet. Res. Camb.* 14: 337 - 339.
- Colleta, G., Fragomele, F., Sandomenico, R.L. and Vecchio, G. (1979). Enhanced expression of viral polypeptides and messenger RNA in dimethyl sulfoxide and bromodeoxyuridine-treated friend erythroleukemic cells. *Exptl. Cell Res.* 119: 253 - 264.

- Croce, C. and Koprowsky, H. (1974). Somatic cell hybrids between mouse peritoneal macrophages and SV-40 transformed human cells. *J. Exp. Med.* 140: 1221 - 1229.
- Chang, E.L. and Baserga, R. (1977). Time of replication of gene responsible for a temperature-sensitive function in a cell cycle-specific ts mutant from a Hamster cell line. *J. Cell Physiol.* 92: 333 - 344.
- Chu, E.M., Sun, N.C. and Chang, C.C. (1972). Induction of auxotrophic mutations by treatment of chinese hamster cell with 5-bromodeoxyuridine and black light. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 3459 - 3463.
- D'Andrea, A.D., Tantravahi, U., Lalande, M., Perle, R. and Latt, S. (1983). High resolution analysis of the timing of replication of specific DNA sequence during S phase of mammalian cells. *Nucleic Acid. Res.* 11: 4753-4774.
- Darzynkiewics, Z., Andreeff, M., Traganos, T., Sharpless and Malamed, M.R. (1978). Discrimination of cycling and non cycling lymphocytes by BrdUrd suppressed acridine orange fluorescence in flow cytometric systems. *Exp. Cell Res.* 115: 31 - 35.

- Davison, R.L. and Kaufman, F.R. (1978). Bromodeoxyuridine mutagenesis in mammalian cells is stimulated by thymiding and suppressed by deoxycytidine. *Nature*. 276: 722 - 723.
- Del Campo, A. (1980). Relaciones núcleo-citoplasmáticas en células plurinucleadas homocarióticas. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- De la Torre, C., González-Fernández, A. y Giménez-Martín, G. (1971). Cell flow and its application to the estimate of the cell cycle parameter in meristems. *Biol. Zool.* 9: 707 - 710.
- De la Torre, C. and González-Fernández, A. (1979). Cell cycle mapping by irradiating cells with bromosubstituted DNA segments. *Photochem. Photobiol.* 29: 977 - 981.
- De Tomasi, J.A. (1936). Improving the technic of the Feulgen stain. *Stain Technology.* 11: 137.
- Djordjevic, B. and Szybalski, W. (1960). Genetics of human cell line III. Incorporation 5-bromo and 5 iododeoxyuridine its effect on radiation sensitivity. *J. Exp. Med.* 112: 509 - 531.

- Eisenberg, R.J. and Pardee, A.B. (1969). DNA replication during episome transfer as studied by bromodeoxyuridine photosensitization. *J. Mol. Biol.* 46: 355 - 358.
- Eisenstark, A. (1971). Mutagenic and lethal effects of visible and near ultraviolet light on bacterial cells. *Adv. in Genetics.* 16: 167 - 199.
- Epifanova, O.I. (1977). Mechanisms underlying the differential sensitivity of proliferating and resting cell to external factors. *Internat. Review of Cytol. Suppl.* 5: 303 - 325.
- Epifanova, O.I. and Terskikh, V.V. (1969). On the resting periods in the cell life cycle. *Cell Tissue Kinet.* 2: 75 - 93.
- Evans, L.S. and Van't Hof, J. (1974). Promotion of cell arrest in G_2 in root and smoot meristems in *pisum* by a factor from the cotyledons. *Exp. Cell Res.* 87: 259-264.
- Evans, L.S., Almeida, M.J., Lynn, D.G. and Nakanishi, K. (1979). Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in G_2 in complex tissue. *Science.* 203: 1122 - 1123.

Feulgen, R. and Rossenbeck, H. (1924). Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende mikroskopischen präparate. Z. Phys. Chem. 135: 203.

Floros, J., Jonak, G., Galanti, N. and Baserga, R. (1981). Induction of cell DNA replication of SV-40 DNA. Exptl. Cell Research. 132: 215 - 223.

Fosket, D.E. (1977). The regulation of the plant cell cycle by cytokinin. In: Mechanisms and control of cell division. T.L. Rost and E.M. Gifford, Ed. Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Stroudsburg, Pennsylvania.

Fussell, C.P. (1972). The interphase position of chromosomes in onion root tip nuclei. J. Cell Biol. 55: 79 A.

Fussell, C.P. (1975). The position of interphase chromosomes and late replicating DNA in centromere and telomere region of Allium cepa L. Chromosome (Berl.). 50: 201-210.

García-Herdugo, G., Fernández-Gómez, M.E., Hidalgo and López-Sáez, J.F. (1974). Effect of protein synthesis inhibition during plant mitosis. *Exp. Cell. Res.* 89: 336 - 342.

García-Herdugo, G., González-Fernández, A. and López-Sáez J. F. (1976). DNA replication in the presence of protein synthesis inhibitors in higher plant cells. *Exp. Cell Res.* 104: 1 - 6.

Galanti, N., Soprano, K., Jonak, G. and Baserga, R. (1982). Microinjection of cloned SV-40 DNA fragments in the study of cell proliferation. *Annals of New York, Acad. of Sci.*, 397: 238 - 248.

Gelfant, S. and Smith, J.G. (1972). How cycling cell an explanation. *Science.* 178: 357 - 367.

Giménez-Martín, G., González-Fernández, A. and López-Sáez, J. (1965). A new method of labelling cells. *J. Cell Biol.* 26: 305 - 309.

- Giménez-Martín, G., De la Torre, C. and López-Sáez J (1977).
Cell division in higher plant. In: Mechanisms and control of cell division. T.L. Rost and E.M. Gilfant, Ed. Dondon, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.
- Giménez-Martín, G., González-Fernández, A. and De la Torre, C. (1981). Regulation of the cell division in meristems. Boletim da Sociedade Broteriana. 53: 1283-1314.
- Giménez-Martín G., López-Sáez, J.F., González-Fernández, A., De la Torre, C. y Navarrete, M.H. (1982). La proliferación celular en meristemas. Regulación interfásica y modelos del ciclo. Anales de Edafología y Agrobiología. pp. 2015 - 2035.
- Giménez-Martín, G., Navarrete, M.H., De la Torre, C. y López-Sáez, J.F. (1982). Intensidad de replicación del ADN en el ciclo celular de meristemas. Estudios sobre Biología (Hom. al Prof. Bustinza). Ed. Univ. Complutense, Madrid. pp. 33 - 58.

- Gimmler, G.M. and Schweizer, E. (1972). rRNA replication in a synchronized culture of Saccharomyces cerevisiae. Biochen. Biophys. Res. Comm. 46: 143 - 149.
- Goldman, M.A., Holmquist, G.P., Gray, M.C., Caston, A.L. and Nag, A. (1984). Replication timing of genes and middle repetitive sequences. Science 224: 686 - 692.
- González-Fernández, A, Fernández-Gómez, M.E., Stockert, J.C. and López-Sáez, J.F. (1970). Effect produced by inhibitors of RNA synthesis on mitosis. Exp. Cell Res. 60: 320 - 326.
- González-Fernández, A., Giménez-Martín, G. and De la Torre, C. (1971). The duration of interphase period at different temperature on root tips cell. Cytobiol. 3 : 367-371.
- González-Fernández, A., Giménez-Martín, G., Fernández-Gómez, M.E. and De la Torre, C. (1974). Protein synthesis requirements at specific point in the interphase of meristematic cells. Exp. Cell Res. 8: 163 - 170.

González-Fernández, A. and De la Torre, C. (1979). Increasing photosensitivity by bromosubstituting the DNA of root meristems cells, as measured by G₂ timing. *Mutation Research*. 60: 51 - 59.

González-Gil, G. and Navarrete, M.H. (1982). On the mechanisms of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromatids. *Chromosoma (Berl.)*. 26: 375 - 382.

Goz, B. (1978). The effect of incorporation of 5-halogenated deoxyuridine into the DNA of eucariotic cells. *Pharmacological Review*. 29: 249 - 272.

Gurdon, J.B. and Wodland, H.R. (1968). The cytoplasmic control of nuclear activity in animal development. *Biol. Rev.* 43: 233 - 267.

Harwell, L.H. (1978). Cell division from a genetic perspective. *Cell Biol.* 77: 627 - 637.

Haut, W. and Taylor, J.H. (1967). Studies of bromouracil deoxyribose substitution in DNA of Bean roots (*Vicia Fab*a). *J. Mol. Biol.* 67: 389 - 401.

- Hill, R., Tsuboi, A. and Baserga, R. (1974). Effect of 5-bromodeoxyuridine on chromatin transcription in confluent fibroblast. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 71 : 455 - 459.
- Hirschhorn, R., Aller, P., Yuan, Z., Gibson, C.W. and Baserga, R. (1984). Cell cycle specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6004 - 6008.
- Hochhauser, S.J., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1981). Gene expression and cell cycle regulation. Inter. Review of Cytology. 71: 95 : 843.
- Hopkins, R.L. and Goodman, M.F. (1980). Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine and 2-aminopurine-induced. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 1801 - 1805.
- Howard, A. and Pelc, S.R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity (Suppl.). 6 : 261 - 274.

- Howell, S.H. (1974). Cell cycle control. G.M. Padilla, I. L. Cameron and A. Zimmermann, Eds., Acad. Press, N.Y., pp. 235 - 249.
- Hutchinson, F. (1973). The lesions produced by ultraviolet light in DNA containing 5-bromouracil. *Quart. Rev. Biophys.* 6: 201 - 246.
- Itikawa, O. and Ogura, V. (1954). Simplified manufacture and histochemical use of the schiff reagent. *Stain Technol.* 29: 9 - 11.
- Jacob, M. (1979). Differential radiosensitivity of uni- and Bi-filarly BrdUrd-substituted chromatid of Muntjac chromosomes. *Mutations Research.* 63: 211 - 213.
- Jacob, M. (1982). 5-bromodeoxyuridine substitution and differential radiosensitivity of Uni- and Bi-Filar chromatids. *Mut. Res.* 103: 173 - 176.
- Johnson, R.T. and Rao, P.N. (1970). Mammalian cell fusion : Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature.* 226: 717 - 722.

- Jones, C. and Dove, F. (1972). Protosensitization of transcription by bromodeoxyuridine substitution. *J. Mol. Biol.* 64: 409 - 416.
- Kajiwara, K. and Mueller, G.G. (1964). Molecular events in the reproduction of animal cells. III. Fractional synthesis of deoxyribonucleic acid with 5-bromodeoxyuridine and its effect on cloning efficiency. *Biochem. Biophys. Acta.* 91: 489 - 493.
- Kato, H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BrdR-labelling method. *Int. Rev. Cytol.* 49: 55 - 97.
- Kihlman, B.A. and Kronber, D. (1976). Sister chromatid exchanges in Vicia Faba L. demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma (Berl.)*. 51: 1.
- Kishimoto, T., Kuriyama, R., Kondo, H. and Kantani, H. (1982). Generality of the action of various maturation-promoting factors. *Exp. Cell Res.* 137: 121-126.

- Lajtha, L.G. (1963). On the concept of the cell cycle. *J. Cell Comp. Physiol.* 62: 143 - 145.
- Lasken, R.S. and Goodman, M.F. (1985). A fidelity assay using dideoxy DNA sequencing : A measurement of sequence dependence and frequency of forming 5-bromouracil-guanine base mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82: 1301 - 1305.
- Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*. 70: 3395-3399.
- Lawley, P.D. and Brookes, P. (1962). Ionization of DNA bases or base analogues as a possible explanation of mutagenesis with special reference to 5-bromodeoxyuridine. *J. Mol. Biol.* 4: 216 - 219.
- Lapeyre, J.N. and Bekhor, I. (1974). Effect of 5-bromo-2'-deoxyuridine and dimethylsulfoxide on properties and structure of chromatin. *J. Mol. Biol.* 89: 137 - 162.

- Levine, A.J. (1978). Approaches to mapping the temporal events in the cells cycle using conditional letal mutants. *Cell Physiol.* 95: 387 - 392.
- Ley, K.D. and Tobey, R.A. (1970). Regulation of initiation of DNA synthesis in chinese hamster cell II induction of DNA synthesis and cell division by isoleucine and glutamine in G₁ arrested cells in suspension culture. *J. Cell Biol.* 47: 453 - 454.
- Ling, S. and Riggs, A.D. (1974). Photochemical attachment of lac repressor to bromodeoxyuridine-substituted lac operator by ultraviolet radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 3: 947.
- Ling, S., Lin, D. and Riggs, A.D. (1976). Histones bind kor tightly to bromodeoxyuridine-substituted DNA than to normal DNA. *Nucleic Acids Res.* 3: 2183.
- Liskay, R.M. (1977). Absence of a measurable G₂ phase in two chinese Hamster cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 1622 - 1625.

- Liskay, R.M. and Prescott, D.M. (1978). Genetic analysis of the G₁ period : Isolation of mutants (or variants) with a G₁ period from a chinese hamster cell line lacking G₁. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 2873 - 2877.
- Liskay, M.R. (1978). Genetic analysis of a chinese hamster cell line lacking a G₁ phase. Exp. Cell Res. 114: 64 - 77.
- Lloyd, D., Poole, R.U. and Edwards, S.W. (1982). The cell duration cycle temporal organization and control of cellular growth and reproduction. Academic Press, London.
- López-Sáez, J., Giménez-Martín, G. and González-Fernández, A. (1966). Duration of cell division cycle and its dependence of temperature. Z. Zellforsch. 75: 591 - 600.
- López-Sáez, J.F., González-Fernández, A., De la Torre, C., Díez, J.L., Fernández-Gómez, E., Navarrete, M.H., García-Herdugo, G. and Giménez-Martín, G. (1975). A model for cell cycle and growth kinetics in roots. J. Theor. Biol. 53: 463 - 473.
- Lough, J. and Bischoff, R. (1976). Differential sensitivity to 5-bromodeoxyuridine during the S-phase of synchronized myogenic cells. Develop. Biol. 50: 457 - 475.

- Lykkesfeldt A.E. and Andersen, H.A. (1977). Preferential inhibition of rDNA transcription by 5-bromodeoxyuridine. *J. Cell Sci.* 25: 95 - 102.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 117: 129 - 146.
- Mak, S. (1965). Mammalian cell cycle analysis using microspectrometry combined with autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 39: 286 - 289.
- Merril, G.F., Witter, E.B. and Hauschka, S.D. (1980). Differentiation of thymidine kinase deficient mouse myoblast in the presence a 5' bromodeoxyuridine. *Exptl. Cell Res.* 129: 191 - 199.
- Miake-Lye, R., Newport J.W. and Kirschner, M.W. (1983). Maturation promoting factor induces nuclear envelope breakdown in cycloheximide-arrest embryos of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 97: 81 - 91.
- Miake-Lye, R. and Kirschner, W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell.* 41 : 167-175.

- Ming, P.M, Chang, H.L. and Baserga, R. (1976). Release by human chromosome 3 of the G₁ block in hybrids between t_S AF8 hamster and human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73: 2032 - 2055.
- Mishina, M., Tobimatsu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, M., Morimoto, Y., Mirose, T., Inayama, S., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. (1985). Location of functional regions of acetylcholine receptor L-subunit by site-directed mutagenesis. Nature. 313: 363 - 369.
- Mitchinson, J.M. (1971). The biology of the cell cycle. Ed. The University Press.
- Moreno, M.L., Leyton C., Sans, J. and De la Torre C. (1983). Plant chromatin replicated in the absence of protein synthesis. J. Exptl. Botany. 34: 1748 - 1755.
- Mueller, G.G. and Kajiwara, K. (1966). Early and late replicating DNA complex HeLa cell nuclei. Biochem. Biophys. Acta. 144: 108 - 115.
- Nakamura, N. and Okada, S. (1979). Cell cycle dependency of burd. Induced mutation for six genetic markers in cultured mammalian cells. Mutation Res. 60: 83-89.

- O'Brien, J.C. (1980). Tyrosine aminotransferase sensitivity to bromodeoxyuridine during restricted intervals of S phase in mepatoma cells. *J. Cell Biol.* 87: 629 - 632.
- Painter, R.R. and Schaeffer, A.W. (1971). Variation in the rate of DNA chain growth through the S phase in HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 58: 289 - 295.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1286 - 1290.
- Pardee, A.B., Dubrow, R., Hamlin, J. and Kletzien, R. (1978). Animal cell cycle. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 715 - 750.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature. (Lond.)*. 251: 156 - 158.
- Peterson, T. and Gelfant, S. (1970). Population cells in mouse kidney and duodenum and their behavior during the cell division cycle. *Exp. Cell Res.* 59: 32 - 36.
- Popolo, L. and Alberghina, L. (1984). Identification of a labile protein involved in the G₁-to-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 81: 120 - 124.

- Preisler, H.D., Housman, D., Scher, W. and Friend, C. (1973).
Effect of 5-bromo-2'-deoxyuridine on production of globin mRNA in dimethyl sulfoxide-stimulated friend leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 70: 2956-2959.
- Prenna, G., Leiva, S. and Mazzini, G. (1974). Quantitation of DNA by cytofluorometry of the conventional Feulgen reaction. Histochemical Journal. 6: 467 - 484.
- Prescott, D.K. (1976). Reproduction of Eucariotic cells. Ed. Academic Press, N.Y.
- Rao, P.N. and Johnson, R.T. (1970). Mammalian cell fusion : On the regulation of DNA synthesis and mitosis. Nature 225, 159 - 164.
- Rao, P.N. and Johnson, R.T. (1974). In control of proliferation in animal cells. Eds. Clarkson, B. and Baserga, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 785 - 800.
- Rao, P.N., Wilson, B.A. and Sunkara, P.S. (1978). Inducer of DNA synthesis present during mitosis of mammalian cells lacking G₁ and G₂ phases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5043 - 5047.
- Rao, P.N. and Sunkara, P.S. (1978). In cell cycle regulation. Eds. Cameron, I.L., Padilla, G.M. and Zimmerman, A.M. Acad. Press, N.Y. pp. 133 - 147.

- Regan, J.D., Setlon, R.B. and Ley, R.D. (1971). Normal and defective repair of damaged DNA in human cells. A sensitive assay utilizing the photolysis of 5-bromodeoxyuridine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 708 - 712.
- Rosow B.W., Riddle, V.G. and Pardee, A.B. (1979). Synthesis of a labile serum dependent protein in early G₁ control animal cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 76: 4446 - 4450.
- Rost, T.L. (1977). Responses of the plant cell cycle to stress. In: Mechanism and control of cell division. Ed. Rost, T.L. and Gifford, E.M. Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Strousburg, Pennsylvania. pp. 111 - 141.
- Ruddler, F.H. and Creagan, R.P. (1975). Parasexual approaches to the genetics of man. Ann. Rev. Genet. 9 : 407-497.
- Rutter, W.J., Pictet, R.L. and Morris, P.W. (1973). Toward molecular mechanisms of developmental processes. Ann. Rev. Biochem. 42: 601 - 646.
- Sander, Ch. and Hadwiger, L.A. (1979). L-Phenylalanine ammonia-lyase and pisatin induction by 5-bromodeoxyuridine in *Pisum sativum*. Biochem. Biophys. Acta. 563: 278-292.

- Sans, J. and De la Torre, C. (1979). G_0 and $G_{0,2}$ cells as identified by their chromatin pattern in dormant and proliferating meristems. *Europ. J. of Cell Biol.* 19 : 294 - 298.
- Sans, J. and Giménez-Martín, G. and De la Torre, C. (1980). Onset of cell proliferation in dormant roots of Allium cepa L. bulbs. Kinetic analysis. *Biologie Cellulaire.* 38: 95 - 104.
- Sans, J., Aller, P., González-Fernández, A., Leyton, C. y De la Torre, C. (1982). Efecto de la bromación del genoma y la irradiación con luz 313 nm sobre la biosíntesis de macromoléculas. XVIII Jornadas de Genética Ruso-Españolas, Granada, España.
- Scaife, J.F. (1976). Mitotic G_2 delay induced in synchronized human kidney cells by UV and K-irradiation and its relation to DNA strand breakages repair and transcription. *Cell Tissue Kinet.* 3: 229 - 242.
- Sheinin, R. (1980). Temporal-sensitive mutants in the study of cell cycle progression in mammalian cells. In: Nuclear cytoplasmic interactions in the cell cycle. Ed. G.L. Whitson. Acad. Press, N.Y.

- Schvartzman, J.B. and Diez, J.L. (1977). Late replicating DNA and the cell cycle of Allium cepa L. *Cytobiologie*. 14: 310 - 318.
- Schvartzman, B. and Cortés, F. (1977). Sister chromatid exchanges in Allium cepa L. *Chromosoma (Berl.)*. 62: 119-131.
- Schvarstzman, J.B., Postigo, R. and Gutiérrez, C. (1979). Analysis of visible light induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*. 74: 317 - 328.
- Schvartzman, J.B. and Goyanes, . (1980). A new method for the identification of Sce's per cell cycle ind BrdUrd substituted chromosomes. *Cell Biol. Int. Report*. 4 : 415 - 423.
- Selman, A.R. (1981). Ciclo celular : requisitos previos a la replicación. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.

Suzuki, N. and Okada, S. (1975). Localization of ala 32 gene replication in the cell cycle of cultures mammalian cells. *Mutation Res.* 30: 111 - 116.

Schwarzendruber, D.E. (1977). Microfluorometric analysis of cellular DNA following incorporation of bromodeoxyuridine. *J. Cell Physiol.* 9: 445 - 454.

Skopek, T.R. and Hutchinson, F. (1982). DNA base sequence changes induced by bromouracil mutagenesis of lambda phase. *J. Mol. Biol.* 159: 19 - 33.

Stambrook, P.J. (1974). The temporal replication of ribosomal genes in synchronized hamster cells. *J. Mol. Biol.* 32: 303 - 313.

Szybalski, W. (1964). Chemical reactivity of chromosomal DNA as related to mutagenicity : Study with human cell line. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 24: 151 - 159.

Tapiero, H., Shacol, P., Monier, M.P. and Herel, J. (1974). Replications DNA in synchronized chier fibroblast cells. *Exptl. Cell Res.* 89 : 39 - 46.

- Tjio, J.K. and Levan, A. (1950). The use of oxiquinoline in chromosome analysis. *Ann. Estac. Exptl. Aula Dei.* 2 : 21 - 64.
- Torrey, J.C. and Felman, L.J. (1977). The organization and function of the root apex. *American Scientist.* 65: 334-344.
- Van't Hof, J. and Kovacs, C.J. (1972). Mitotic cycle regulation in the meristem of cultured roots : The principal control point hypothesis. In: *The dynamics of meristem cell population.* Eds. Miller, M.W. and Keuhner C.C., Plenum Press, N.Y.
- Watson, J.D., Tooze, J. and Kurtz, D.T. (1983). *Recombinant DNA. A short course.* Ed. Scientific American Books, W. H. Freeman and Company, N.Y.
- Weinmaster, G., Zoller, M., Smith, M., Hinze, E. and Powson, T. (1984). Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus: Evidence that tyrosine phosphorylation of P130^{GAG-GPS}. Modulates its biological activity. *Cell* 37: 559 - 568.

- Wolff, S. and Perry, P. (1974). Differential Giemsa staining of sister chromatid and the study of sister chromatid exchanges without autorradiography. *Chromosoma*, (Berl.). 48: 341 - 353.
- Wu, M. and Gerhart, J.C. (1980). Partial purification and characterization of the maturation promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 79: 465-477.
- Yanischewsky, R.M. and Stein, G.H. (1981). Regulation of the cell cycle in eucariotic cells. *Int. Rev. Cytology.* 59: 223 - 259.