

## Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* (L) tratadas con inhibidores metabólicos

Letty Marcano\* y Antonio Del Campo

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia  
Maracaibo 4011, Venezuela

Recibido: 21-11-94 Aceptado: 07-03-95

### Resumen

Se estudiaron los cambios ultraestructurales que se producen en el nucléolo de células meristemáticas tratadas con inhibidores metabólicos. Las bulbos se cultivaron en agua filtrada a 25°C; el tratamiento con la droga se realizó utilizando concentraciones de 100 µg/ml de bromuro de etidio y 1 µg/ml de cicloheximida. En las células tratadas con cicloheximida se observó el fenómeno de segregación nucleolar en interfase. Con bromuro de etidio se evidenció una disminución en el número de nucleolos; dándose la presencia de estructuras conocidas como "gránulos intercromatínicos", "micropuffs" y "cuerpos fibrilares". Se concluye que la síntesis de RNA es necesaria para la reorganización final de los nucleolos induciendo su inhibición la aparición de cuerpos diferentes a los presentes en las células control. Por otro lado, la inhibición de síntesis de proteínas afecta los nucléolos interfásicos, posiblemente debido a su acción sobre los precursores ribosómicos.

**Palabras claves:** Bromuro de etidio; células meristemáticas; cicloheximida; nucléolo.

## Ultrastructural study of nucleoli in meristematic populations of onion *Allium cepa* treated with metabolic inhibitors

### Abstract

This paper reports the ultrastructural changes of the nucleoli produced in meristematic cells treated with metabolic inhibitors. In order to monitor these changes the bulbs were grown in filtered water at 25°C. The treatment with drugs was performed at the same experimental conditions, using 100 µg/ml of Ethidium Bromide and 1 µg/ml of Cycloheximide solutions. The cells worked with Cycloheximide produced nucleolar segregations during the interphasic stage. The treatment with Ethidium Bromide produce a decrease of the number of nucleoli and the presence of the structures known as "interchromatin granules", "micropuffs" and "fibrillar bodies". It is concluded here that the RNA synthesis is necessary for the final reorganization of the nucleoli causing its inhibition and the aparition of bodies diferent than those present in the control cells. By other hand, the inhibition of protein synthesis affects the interphase nucleoli, likely, due to its action over the ribosomic precursors.

**Key words:** cicloheximide; ethidium bromide; meristematic cells; nucleoli.

\* Autor para la correspondencia.

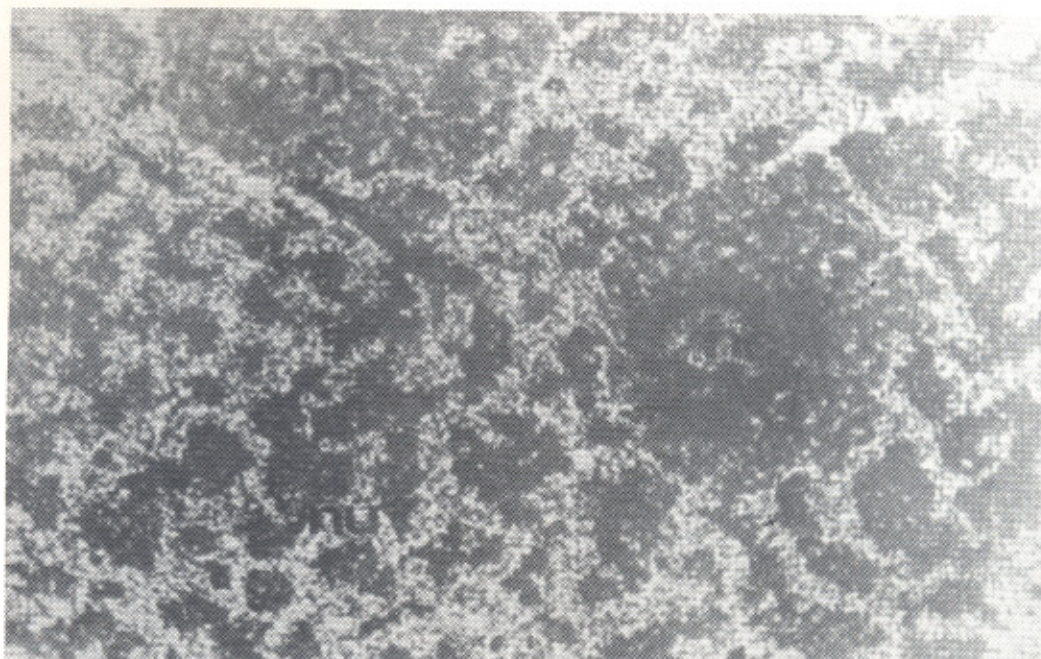


Figura 1. Micrografía de célula meristemática en interfase. Nucléolo (nc); núcleo (nu); 34000X.

En el caso de las células control, se realizó el mismo procedimiento, pero sin tratamiento con las drogas.

### Resultados

La estructura de los núcleos interfásicos en células meristemáticas de *Allium cepa*, muestra la presencia de dos nucléolos, los cuales pueden fundirse en uno sólo como una estructura bien delimitada (Figura 1). Estos organelos se presentan como cuerpos esféricos densos de 2 a 4  $\mu$ m de diámetro, con sus componentes nucleolares que pueden ser considerados constantes y generales en los nucléolos activos (4).

En la Figura 2 se muestra a gran aumento un nucléolo de una célula control en interfase donde claramente pueden ser distinguidos algunos de sus componentes: el componente granular (g); el fibrilar (f) y el cromosomal, conocido como la región del organizador nucleolar (NOR) que se observa como una porción de cromatina de baja densidad electrónica. En relación con el

componente fibrilar y con la NOR se observan los centros fibrilares (FC), en los cuales se asume que está presente la cromatina de la NOR que se encuentra en estado de inactividad, entremezclado con una gran proporción de proteínas (15,16).

Las alteraciones ultraestructurales de los nucléolos en las células interfásicas tratadas con cicloheximida (CH) se manifiestan por una especial redistribución de los componentes nucleolares conocida como segregación nucleolar (SN), caracterizada por una separación de los componentes granular y fibrilar del nucléolo (Figura 3).

En las células tratadas con bromuro de etidio (E.B.) se observó una evidente disminución de los nucléolos como estructura organizada en las células interfásicas (Figura 4); dándose la presencia de pequeños remanentes nucleolares de estructura fibrilar, en algunos casos asociado con lo que se conoce como "gránulos intercromatinicos" (ig), los cuales tienden a formar racimos, con una densidad electrónica mayor a la de los remanentes nucleolares (17).

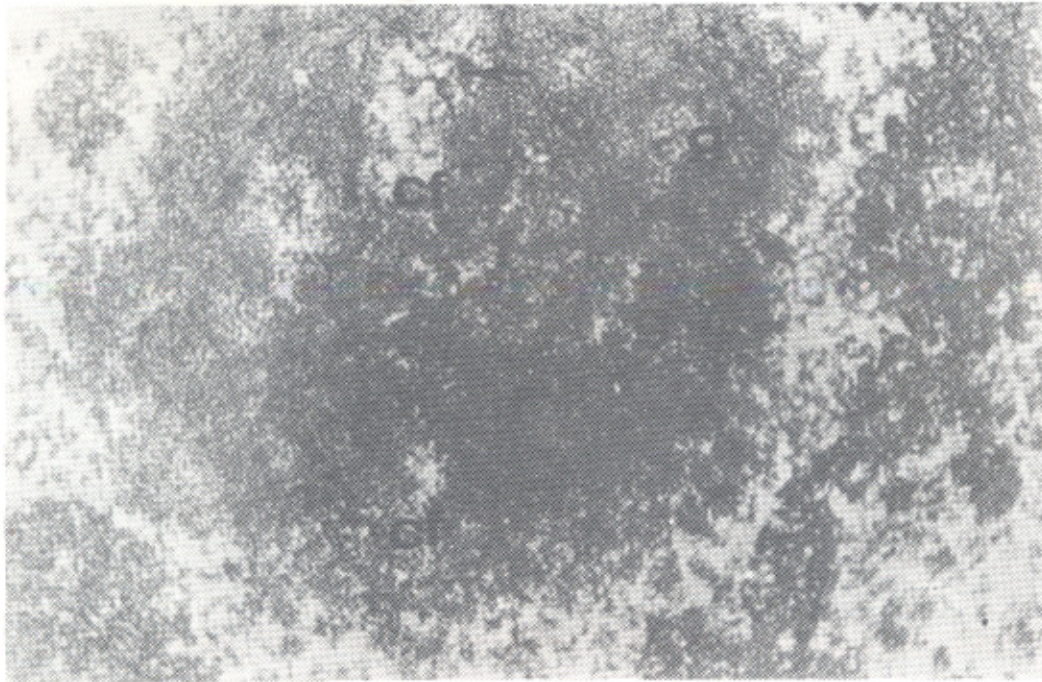


Figura 2. Nucléolo interfásico. Componente granular (g); fibrilar (f); centros fibrilares (cf); NOR (flecha); 60000X.

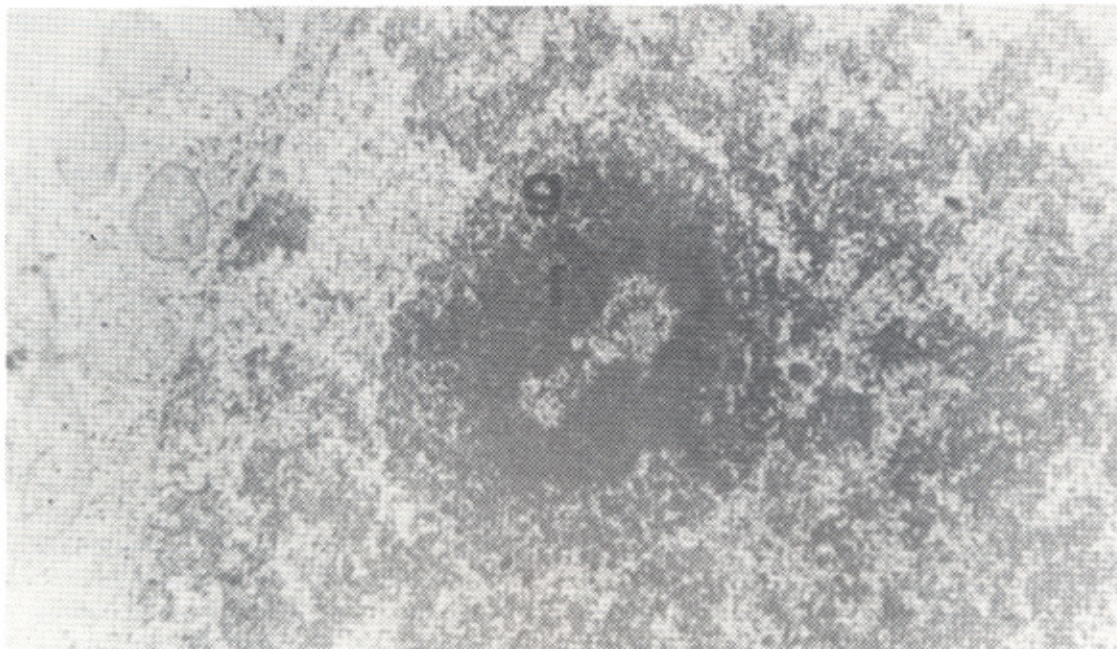


Figura 3. Segregación nucleolar inducida por CH en interfase. Componente fibrilar (f); componente granular (g); centro fibrilar (cf); 30000X.

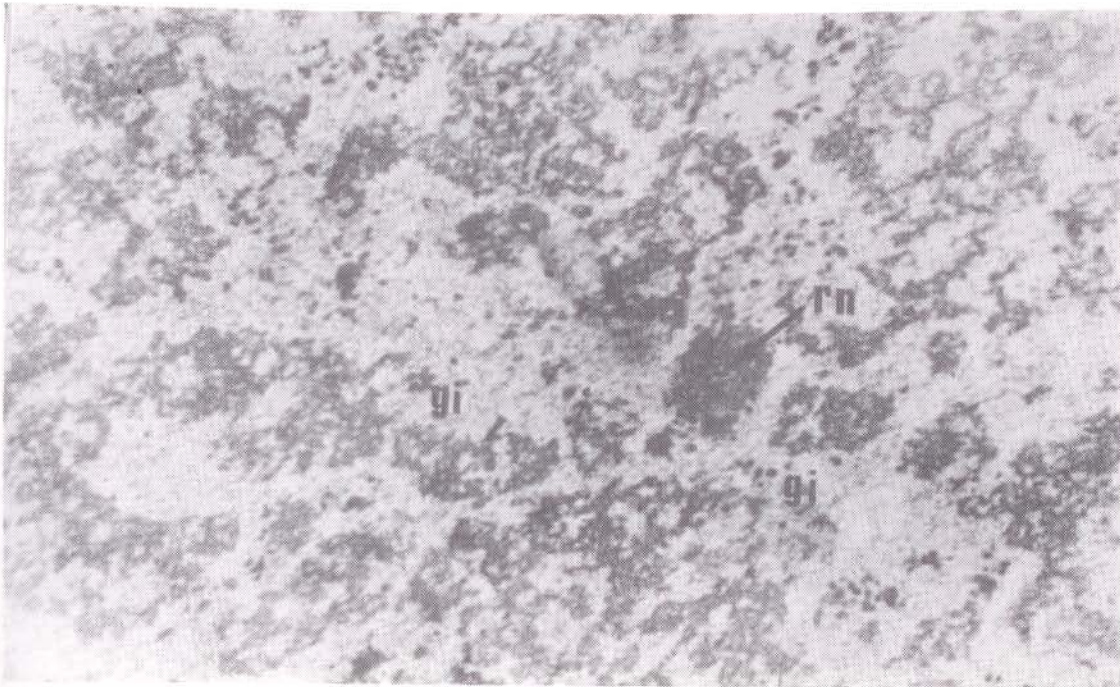


Figura 4. Núcleo de célula interfásica tratada con E.B. Nótese la ausencia del nucleolo y presencia de componentes como los remanentes nucleolares (rn) y gránulos intercromatínicos (gi); 34000X.

También se observa la presencia de dos componentes que no son frecuentes en las células meristemáticas de *Allium cepa*. Una de esas estructuras se conoce como "micropuff" (Figura 5), la cual puede encontrarse sola, inmersa en el nucleoplasma, o bien puede ser observada en estrecha relación con el otro componente conocido como "cuerpo fibrilar" (Figura 6), cuya estructura difiere de los micropuffs. Estos cuerpos fibrilares se observan de una forma elipsoidal, con un interior más o menos regular, presentando características citoquímicas diferentes a las de los cuerpos prenucleolares.

### Discusión

El análisis de los resultados de las células control coincide con lo reportado por otros autores en diversos materiales biológicos (2,3,18,19), quienes establecen la existencia de un ciclo nucleolar que se en-

cuentra en relación con el ciclo de división celular, aunque no existe un paralelismo entre los estadios del ciclo nuclear y el desarrollado por los nucléolos. En el caso de poblaciones meristemáticas de *Allium cepa*, fue posible evidenciar diferentes tipos de células, algunas de las cuales presentan nucléolos organizados, otros con nucléolos en organización y otros aparentemente sin ningún material nucleolar.

En la Figura 1 se observa dos nucléolos de aproximadamente 2 a 4  $\mu$ m de diámetro, con las características morfológicas propias de las células meristemáticas en interfase (4,20). La Figura 2 se muestra a mayor aumento los componentes nucleolares característicos de los nucléolos activos en las células control: los centros fibrilares (cf) son claramente visibles rodeados por una capa muy electrodensa correspondiente al componente fibrilar (f), constituido por fibras de 6-10 nm de diámetro; el componente granular (g) formado por gránulos de 15-20 nm de

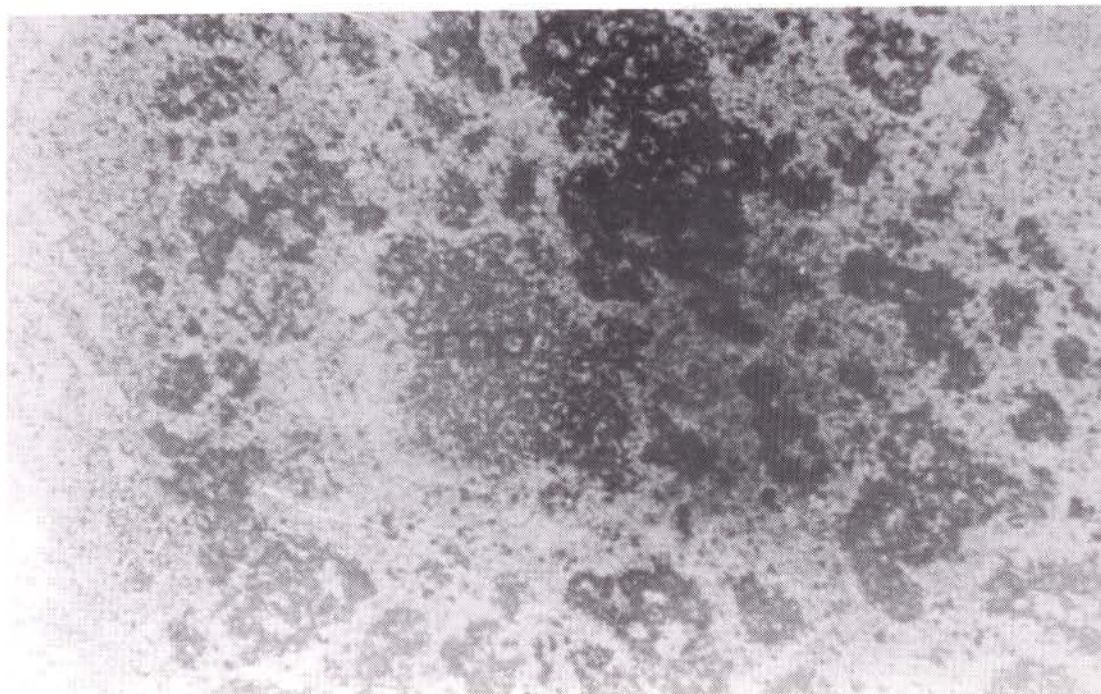


Figura 5. Micrografía de un núcleo interfásico de células tratadas con E.B. Micropuff (mp); cromatina (chr); 34000X.

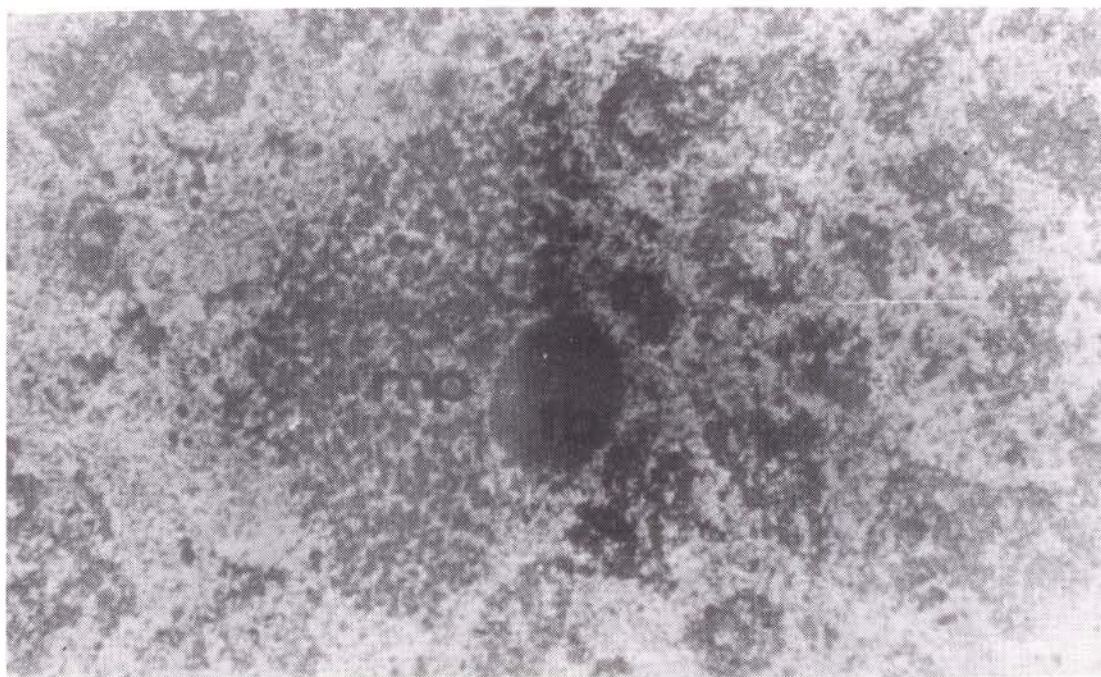


Figura 6. Núcleo interfásico tratado con E.B. Micropuff (m); cuerpo fibrilar (cf); 40000X.

diámetro y el componente cromosomal (NOR), siempre en relación con los cfs y el componente fibrilar.

Para dilucidar el papel que juegan las proteínas en los estadios del ciclo de división celular, se han llevado a cabo numerosos estudios usando inhibidores de síntesis de proteínas en una variedad de materiales (21,22); sin embargo, el efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas sobre el ciclo nucleolar en sí, ha sido menos explorado.

Los resultados muestran la segregación nucleolar que se produce en células de *Allium cepa* tratadas con cicloheximida (Figura 3). Como se puede observar, el componente fibrilar toma una topografía central en el nucléolo rodeado por el componente granular. Esta segregación nucleolar parece ser una respuesta fija de las células a varias alteraciones, ya que son muchos los trabajos en los que se han reportado, utilizando inhibidores de síntesis de RNA como la  $\alpha$ -amanitina (23), de síntesis de proteínas como la actinomicina-D(24), de la transcripción del DNAr como la D-galactosamina (17) y de agentes físicos como la hipoxia (25). Se ha reportado que la cicloheximida además de inhibir la síntesis de proteínas en los polisomas (26), actúa inhibiendo de una forma indirecta la síntesis del DNA, así como también alterando el transporte y maduración del RNA preribosomal 18S(7). Fernández Gómez y colaboradores (13), en un estudio realizado a células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas con cicloheximida, reportan un adelanto de la nucleogénesis, el cual puede ser debido a que al inhibirse la síntesis de proteínas se produce un exceso de RNA del cual depende la síntesis de proteínas y reorganización nucleolar posterior.

En las condiciones experimentales expuestas, no se observó ningún otro fenómeno diferente al de la segregación nucleolar, lo cual difiere con los resultados obtenidos por Bernhand y colaboradores (27), quienes describen además, que se da una ruptura

de la membrana nuclear. Otros autores (28,29), también reportan variaciones en los centros fibrilares en los que se observa la aparición de partículas densas agrupadas en forma de racimo en los nucléolos tratados con inhibidores metabólicos. En presencia de cicloheximida se produce la formación de un solo cf similar al observado después de un tratamiento con actinomicina-D (14,24). Del Campo (30), explica la segregación nucleolar en Lirio *Zephyrantes sp.* como una manifestación ultraestructural del efecto bloqueador de la cicloheximida sobre la síntesis de RNA dependiente del DNA. Esto se relaciona con los reportes de Govoni y colaboradores (31) quienes explican la segregación nucleolar producida por VM26 como una consecuencia de la inhibición de la síntesis de RNAr por efecto de la droga.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Mahneron (32), para que se produzca la segregación nucleolar es necesario un suministro continuo de proteínas sintetizadas durante la nueva distribución de los componentes nucleolares inducidos por aflatoxina B o lasioearpina, es decir, para que la segregación nucleolar tenga lugar, es necesaria la síntesis de proteínas. Suponiendo que esta hipótesis es correcta, podría ser que la segregación nucleolar inducida por cicloheximida se deba a que la síntesis de proteínas no es bloqueada totalmente, sino que sea debido a un bloqueo de la síntesis de RNA.

En cuanto a las células tratadas con E.B., si se define al nucléolo como un gen o una secuencia de genes idénticos localizados en regiones especiales de ciertos cromosomas, siendo uno de sus constituyentes la región del organizador nucleolar (NOR) que contiene los cistrones del RNA ribosomal (33), es de esperar que su morfología varíe cuando las células son tratadas con inhibidores de síntesis de RNA, como el bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante del DNA que selectivamente inhibe la transcripción de los cistrones ribosomales, así

como también la maduración del precursor del RNA 45S (34).

El tratamiento de las células con E.B. induce la aparición de alteraciones, como la presencia de remanentes nucleolares (rm) y gránulos inter cromatínicos (gi), en los núcleos interfásicos (Figura 4). Ambos componentes surgen ya que según los datos reportados por otros autores (1, 11), la coalescencia de los cuerpos prenucleolares para la formación de los nuevos nucléolos depende de la síntesis de RNA. Mikhaylova y Marcov (17), reportan la presencia de gránulos inter cromatínicos como un producto de la segregación nucleolar inducida por D-galactosamina en células hepáticas de ratón, asociándolas probablemente con modificaciones bioquímicas como consecuencia de las técnicas de tinción utilizadas.

Otro componente encontrado en los núcleos interfásicos de las células tratadas con E.B. es el conocido como "micropuff" (m) (Figura 5); el cual ha sido descrito como una estructura formada por una masa fibrilar de RNA inmersa en una matriz proteica (35).

También se observa la presencia de estructuras fibrilares compactas denominadas cuerpos fibrilares (fb), los cuales en algunos casos se encuentran en estrecha relación con los micropuffs (Figura 6), con características morfológicas, estructurales y citoquímicas diferentes a los cuerpos prenucleolares. Moreno Díaz de la Espina y Risueño (36) describen los fb como estructuras constituidas por proteínas, pudiendo presentar pequeñas cantidades de DNA.

Ambos componentes son poco frecuentes en meristemos de *Allium cepa*, siendo más comunes en células pertenecientes a otras zonas de la raíz; sin embargo, en células meristemáticas su aparición puede ser inducida por tratamiento con inhibidores de síntesis de RNA o de proteínas (35,36). Tanto los "m" como los "fb" sólo se hicieron presentes en células meristemáticas interfásicas tratadas con E.B., no sien-

do visibles en células mitóticas, lo cual coincide con los resultados reportados por Moreno Díaz de la Espina y Risueño (36); no obstante, Racher y colaboradores (19) reportan que ellos persisten durante el periodo de reorganización nucleolar, y Goessen y Lepoind (2) han observado que están presentes a lo largo del ciclo celular, aunque en ambos casos los estudios fueron llevados a cabo en cultivo de células provenientes de tejido animal. Ochs y cols (37), también reportan la presencia de estructuras similares a los cuerpos fibrilares en células de cáncer de mama.

La significación fisiológica de estos componentes está aún en controversia; sin embargo, debido a que estas estructuras no son visibles en las células control y sólo aparecen en gran número cuando la síntesis de RNA nucleolar o extranucleolar es bloqueada, es probable que correspondan a la expresión morfológica de una transcripción bloqueada, constituyendo quizás un sistema de eliminación de proteínas y probablemente de RNA y DNA del nucléolo.

### Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad del Zulia.

Se hace extensivo este agradecimiento a Nelly Montiel y a Ralph C. y Espinosa por su colaboración en la asistencia técnica.

### Referencias Bibliográficas

1. GIMENEZ-MARTIN G., DE LA TORRE C., LOPEZ-SAEZ, ESPONDA P.: Plants nucleolus: Structure and Physiology. *Cytobiologie* 14:421-462, 1977.
2. GOESSENG G., LEPOIND A.: The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehelich tumor cells

- cultivated in vitro. *Exptl Cell Res* 87:63-72, 1974.
3. HERNANDEZ V.: The nucleolus today. *J Cell Sci* 99 (3):465-472, 1991.
  4. SCHEERS S., WEISEMBERG D.: The nucleolus. *Current Cell Biol* 6(3):354-359, 1994.
  5. SOLLNERWEBB B., MOUGEY E.: News from the nucleolus: Ribosomal RNA gene expression. *Trends in Biochemical Sciences* 16(2):58-62, 1991.
  6. MORENO S., MEDINA J., RISUEÑO M.C.: Correlation of nucleolar activity and nucleolar vaculation in plant cells. *European J Cell Biol* 22:724-729, 1980.
  7. ALLER P., RUFFAS J.S.: Changes in the nucleolar structure and activity following short *in vivo* treatments with cicloheximide and emitime in polytene cells of *Chironomus thummi*. *Citobiology* 37:27-36, 1983.
  8. BROWN D.D., GURDON J.B.: Absence of Ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc Nat Acad Sci* 51:139-146, 1964.
  9. KLENOW H.: Inhibition of cordicepin and 2-deoxyglucose of the incorporation of P<sup>32</sup>-orthophosphate into the nucleic acids of Ehrlich ascites tumour cell in vitro. *Biochim Biophys Acta* 765:354-365, 1963.
  10. SHEMESHIN V.F., SHERUDILO A.I., BELYAGRA E.S.: Nucleoli formation under inhibited RNA synthesis. *Exptl Cell Res* 93:823-826, 1975.
  11. RISUEÑO M.C., FERNANDEZ-GOMEZ M.E., DE LA TORRE C., GIMENEZ-MARTIN G.: Effect of ethidium bromide on the fine structure of the nucleolus in plant cells. *J Ultrastruct Res* 39:163-172, 1972.
  12. GIMENEZ-MARTIN G., FERNANDEZ-GOMEZ M.E., GONZALEZ-FERNANDEZ A., DE LA TORRE C.: The nucleolar cycle in meristematic cells. *Cytobiologie* 4:330-338, 1978.
  13. FERNANDEZ-GOMEZ M.E., DE LA TORRE C., GIMENEZ-MARTINEZ G.: Accelerate nucleolar reorganization with shortened anaphase and telophase during cicloheximide inhibition of protein synthesis in root cells. *Cytobiologie* 5(2):117-124, 1972.
  14. REYNOLDS R.C., MONTGOMERY P.O., HUGHES B.: Nucleolar caps produced by actinomycin D. *Cancer Res* 24:1269-1278, 1964.
  15. MEDINA J., RISUEÑO M.C., MORENO DIAZ DE LA ESPINA S.: Reconstruction and morphometry of fibrillar centers in plant cells in relation to nucleolar activity. *Biol Cell* 48:31-38, 1983.
  16. RISUEÑO M.C., MEDINA F.J., MORENO DIAZ DE LA ESPINA S.: Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells. Ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J Cell Science* 58:313-329, 1982.
  17. MIKHAYLOVA V., MARCOV V.: Spherical Bodies and Fibrillar Centers in Hepatic cell nucleoli of rats treated with D-galactosamine. *Exptl Cell Res* 212:10-21, 1994.
  18. MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., RISUEÑO M.C., FERNANDEZ-GOMEZ M.E., TANDLER C.J.: Ultrastructural study of the nucleolar cycle in meristematic cells of *Allium cepa*. *J Microscopie Biol Cell* 25:265-278, 1976.
  19. RECHER C., WHITESCARVER J., BRIGGL M.: Cytochemical and radioautographic study of human tissue. Culture cell nucleoli. *J Cell Biol* 45:478-492, 1970.
  20. SATO S., YANO H.: The nucleonema changes its three-dimensional conformation during interphase in root-tip meristems of onion. *Protoplasma* 179(3):172-180, 1994.
  21. CUMMING J.E., BLOMQUIST J.C., RUSCH H.P.: Anaphase delay after inhibition of protein synthesis between late profase and prometafase. *Science* 154:1343-1344, 1966.
  22. KLILMAN B.A., ODMAR F.G.: Effects of adenine nucleosides on chromosomes cell division and nucleic acid synthesis in *Vicia faba*. *Heredytas* 56:71-82, 1979.



23. MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., RISUEÑO M.C.: Effect of -amanittine on the nucleolus of meristematic cells of *Allium cepa* in interphase and mitosis and structural analysis. *Citobiologie* 12(2):175-188, 1976.
24. SCHOELFF G.T.: The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. *J Ultrastruct Res* 10:224-243, 1964.
25. GIMENES-ABIAN M.I., RUFAS J.S., DE LA TORRE C.: The plant nucleolar cycle under hypoxia. *Protoplasma* 126:47-53, 1985.
26. GODCHAUX W.S., ADAMSON S.D., HERBERT E.: Effect of cicloheximide on polyribosome function in reticulocytes. *J Mol Biol* 27:57-72, 1967.
27. BERNHARD W., FRAYSINET C., LAFARGE C., LEBRETON E.: Lésions nucléolaires précoces propagées par L-aflotoxines dans les cellules hépatiques durat. *C R Acad Sc* 261:1785-1788, 1965.
28. THIRY M., SCHOONBROODT S., GIESSENS G.: Cytochemical distinction of various nucleolar components in insect cells. *Biol Cell* 72:133-140, 1991.
29. THIRY M., PLOTON D., MENAGER M., GOESSENS G.: Ultrastructural distribution of DNA within the nucleolus of various animal cell lines or tissues revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Cell Tissue Res* 271:33-45, 1993.
30. DEL CAMPO A.: Estudio de la biología del nucléolo. (Trabajo de Ascenso). pp 95. La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), 1987.
31. GOVONI M., FULVIA F., PESSION A., NOVELLO F.: Inhibition of Topoisomerase II activity and its effect on nucleolar structure and function. *Exptl Cell Res* 211:36-41, 1994.
32. MAHNEROM A.: Action of some drugs on liver nucleic and polysomes. *Advan Cytopharmacol* 1:131-141, 1934.
33. REEDER R.H.: Ribosomal RNA synthesis in the nucleolus. *Trends in Genetics* 6(12):390-395, 1990.
34. VAQUIRE V., BRACHET J.: Chromosomal abnormalities resulting from ethidium bromide treatment. *Nature* 222:193-195, 1969.
35. RISUEÑO M.C., MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., FERNANDEZ-GOMEZ M.E.: Structure et evolution des micropuffs chez *Allium cepa*. *J Microscopie Biol Cell* 23:72-76, 1975.
36. MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., RISUEÑO M.C.: Fibrillar bodies in *Allium cepa*: an ultrastructural study. *Biol Cell* 30(2):93-102, 1977.
37. OCHS R.L., STEIN T.W., TAIXI E.M.: Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J Cell Science* 107(2):463-476, 1994.