

Tesis de Posgrado

El nucleolo : Componentes bioquímicos. Estudio citológico y bioquímico en algunos vegetales (*Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Nitella clavata*, *Vaucheria* sp., *Acetabularia* sp.) y animales (*Drosophila virilis*, *Smittia* sp., *Bufo arenarum*, *Gallus gallus*, *Cavia porcellus*)

Tandler, Carlos Juan

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tandler, Carlos Juan. (1963). El nucleolo : Componentes bioquímicos. Estudio citológico y bioquímico en algunos vegetales (*Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Nitella clavata*, *Vaucheria* sp., *Acetabularia* sp.) y animales (*Drosophila virilis*, *Smittia* sp., *Bufo arenarum*, *Gallus gallus*, *Cavia porcellus*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1207_Tandler.pdf

Cita tipo Chicago:

Tandler, Carlos Juan. "El nucleolo : Componentes bioquímicos. Estudio citológico y bioquímico en algunos vegetales (*Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Nitella clavata*, *Vaucheria* sp., *Acetabularia* sp.) y animales (*Drosophila virilis*, *Smittia* sp., *Bufo arenarum*, *Gallus gallus*, *Cavia porcellus*)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1207_Tandler.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El nucleolo.

Componentes bioquímicos. Estudio citológico y bioquímico en algunos vegetales (Allium cepa, Vicia faba, Zoa nays, Vaucheria sp., Elitella clavata, Acetabularia sp.) y animales (Drosophila virilis, Smittia sp., Bufo arenarum, Gallus gallus, Cavia porcellus).

Carlos Juan Tandler

Resumen de Tesis presentada presentada
para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas, Orientación Zoología.

Año 1963

Una revisión bibliográfica acerca del nucleolo revela que pese a los numerosos trabajos citológicos y bioquímicos del que fuera objeto, su función precisa dentro de la célula es desconocida. En esta tesis se han descrito hallazgos que representan un nuevo aporte a la bioquímica y fisiología del nucleolo, y comprenden:

(A) La presencia universal de una sustancia de alto peso molecular localizada específicamente en los nucleolos de las células vegetales y animales, aun no identificada químicamente y caracterizada por reducir fuertemente las sales de plata y emulsiones fotográficas. No está presente en los cromosomas y área nuclear cuando desaparece el nucleolo durante la división celular. En metafase parece localizarse en el citoplasma.

(B) Origen del nucleolo: utilizando la técnica anterior se demostró que durante la ana-telofase la sustancia nucleolar se origina en contacto con todos los cromosomas, la que por fusión progresiva da lugar a la formación de pequeños cuerpos "prenucleolares". Estos a su vez se organizan finalmente en el nucleolo definitivo. El papel del organizador nucleolar consiste en la colección del material nucleolar disperso en el núcleo. También el microscopio electrónico está suministrando evidencia de la existencia de los cuerpos prenucleolares en diversos materiales biológicos.

(C) La existencia de un pool de sustancias de bajo peso molecular -en su mayor parte o en su totalidad constituido por iones ortofosfato - y demostrado por una nueva técnica citoquímica. No está presente en los cromosomas y área nuclear durante la mitosis. La localización obtenida corresponde a una distribución real de estos iones en el nucleolo y no a un artificio de la técnica. La evidencia sugiere también algún tipo de combinación física, estructural, con el denso material nucleolar. Al juzgar por las imágenes dadas por el microscopio electrónico del tejido fijado en acetato de plomo, la distribución de los iones ortofosfato en el nucleolo es completamente homogénea. Este pool de ortofosfato sería el precursor del ácido ribonucleico (RNA) nucleolar.

(D) Se demostró por medio de la autoradiografía de alta resolución que el fosfato radioactivo ($P^{32}O_4$) no es un buen precursor del RNA nucleolar en células en división mitótica, en contraposición a lo observado con células en crecimiento continuo (glándulas salivares de Dípteros). Siendo el nucleolo uno de los lugares más activos en el metabolismo del RNA, evidenciado por numerosos trabajos usando ribonucleósidos radioactivos, la

en la explicación del fenómeno observado: ~~radicación~~ ~~la~~ ~~existencia~~ del pool de ortofosfato nucleolar. En efecto, este pool es relativamente impermeable al P^{32} . Si este pool es usado en el nucleolo para la síntesis y de radación del RNA nucleolar, este RNA tendrá una baja actividad específica relativa como RNA- P^{32} , que es lo que realmente ocurre. Este hallazgo incide en las hipótesis formuladas por algunos investigadores acerca de la probable función del RNA nucleolar e indica que es imposible una contribución masiva del RNA cromosomal al nucleolo, así como también que el nucleolo suministre todo el RNA ribosomal al citoplasma.

(E) Se logró demostrar en los nucleolos de glándulas salivares de Dípteros la presencia de la enzima RNA-metilasa. En este trabajo se describe el empleo de la metionina marcada en el grupo metilo ($-C^{14}H_3$) como precursora de un RNA, empleando la técnica autoradiográfica al nivel intracelular. La transferencia del grupo metilo de la metionina al RNA nucleolar no es afectada por la puomicina, antibiótico que inhibe la incorporación de la metionina en las proteínas. La radioactividad aparece en las bases metiladas del RNA nucleolar tal como indica la separación cromatográfica del hidrolizado alcalino de las glándulas salivares. La metilación observada representa muy probablemente un aspecto de la síntesis de transfer-RNA ya que esta especie de RNA es la única que posee bases metiladas.

(F) Las glándulas salivares del género Smittia (Diptera) constituyen un material excelente para el análisis de la relación entre el organizador nucleolar y el RNA nucleolar por la disposición espacial de ambas estructuras. Se observa que el RNA nucleolar no proviene en especial del organizador. La función del organizador reside en la colección del material nucleolar, lo que está de acuerdo con el modo de formación del nucleolo (vease punto B).

C. C. C. C.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El Moleclo. Componentes bioquímicos.
 Estudio citológico y bioquímico en
 algunos vegetales (Allium cepa, Vicia
fabo, Lea MAYA, Mitella clavata, Vaucheria
sp., Acetabularia sp.) y animales (Dre-
panhila virilis, Mittia sp., Dufa
arcuata, Gallus gallus, Cavia porcellus).

Carlos Juan Tamler

Tesis presentada para optar al Título de
 Doctor en Ciencias Biológicas, Orientación
 Zoología.

Año 1963

TESIS 1207

AGRADECIMIENTO

Parte de esta Tesis fué realizada en el Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Alvalle (Argentina) siendo becario de la Universidad de Buenos Aires. Los capítulos D, E y F fueron efectuados durante la tenencia de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en el Institute of Animal Genetics (Gran Bretaña) y en colaboración con los Drs. J.L. Sirlin, J. Jacob y J.F. Curmins. Agradezco igualmente a los Drs. J.M. De Carlo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Buenos Aires), J. Paul, Biochemical Institute (Glasgow), U. Leening, Botanical Department (Edimburgo), H.G. Schweiger y G. Jans, Max Planck Institute (Wilhelmshaven, Alemania) por las valiosas críticas y discusiones hechas al manuscrito durante mi estadía en esos Institutos.

I. Introducción

II. Biología del nucleolo (revisión bibliográfica)

(a) Estructuras celulares relacionadas con el nucleolo. Dificultades para una definición del nucleolo.

(b) Bioquímica del nucleolo.

III. Nuevas aperturas a la bioquímica del nucleolo:

(A) Demostración de la existencia de una sustancia de localización específicamente nucleolar. La técnica de reducción de sales de plata ("argentañin") y sus variantes.

(B) La sustancia "argentañin" y el ciclo nucleolar durante la mitosis. Relación del nucleolo con el organizador nucleolar.

(C) Demostración de la existencia de un "pool" de ortofosfato en el nucleolo. La técnica de fijación en acetato de plomo. Especificidad citoquímica. Comportamiento del pool durante la mitosis.

(D) Metabolismo del ácido ribonucleico (RNA) en el nucleolo. Comportamiento peculiar del fosfato radiactivo ($P^{32}O_4$) en diversos tipos de células. El pool de ortofosfato nucleolar, precursora del RNA nucleolar.

(E) Demostración de la enzima RNA-metilasa en el nucleolo y la presencia de "transfer-RNA". Empleo de la metionina radiactiva en el grupo metilo ($-C^{14}H_3$).

(F) Relación entre el RNA del nucleolo y el organizador nucleolar.

IV. Bibliografía.

V. Resumen.

I. INTRODUCCION

El nucleolo, descrito por vez primera en 1781 por Fontana y designado con distintos nombres (véase Montgomery, 1898) es un organelo intranuclear cuya función continúa siendo un enigma. Para el citólogo, la diversidad de cuerpos intranucleares en ciertos materiales biológicos hace difícil su homología con los elementos nucleolares. Para el bioquímico constituye una dificultad —sine imposibilidad en muchos casos— la aislación en masa de nucleoles completamente libres de otro material nuclear. Por esto la aproximación al problema ha sido inicialmente, y en su mayor parte aun hoy día, con métodos citoquímicos.

Varias monografías han sido dedicadas al nucleolo, debiéndose citar: Montgomery (1898), Ladford (1922), Daxson (1933), Gates (1942), Vogt y Vogt (1947), Steckinger (1953), Vincent (1955), Stieh (1956), Hertl (1957), Fleq (1959), Swift (1959) y Sirlin (1962). Debe mencionarse aquí el libro de Brachet, *Biochemical Cytology* (1957) en el que el nucleolo y su relación con las síntesis celulares aparece tratado en varias oportunidades y con los conocimientos que se tenían hasta esa fecha.

Es de lamentar que en un tratado más reciente, "The Cell" (1961), editado por Brachet y Mirsky, el nucleolo no haya sido encarado con la deferencia a que es acreedor todo componente mayor de la célula.

Es el propósito de esta tesis, más que una revisión exhaustiva de toda la bibliografía (lo que por otra parte ha sido hecho en las monografías arriba citadas), la descripción de nuevos hallazgos en su composición química, metabolismo y origen celular, encuadrándolos dentro de un esquema que sugiera una posible función fisiológica del nucleolo. La mayoría de estos hallazgos han sido posibles gracias a la introducción de nuevas técnicas en la citología bioquímica, que creemos constituye el principal aporte a esta tesis y para las investigaciones futuras en distintos problemas biológicos.

II. BIOLOGIA DEL NUCLEOLO

(a) Estructuras celulares relacionadas con el nucleolo. Dificultades para UNA DEFINICION DEL NUCLEOLO. Como se ha dicho más arriba es imposible definir biológica e bioquímicamente al nucleolo. En los casos en que no se presenta ninguna disyuntiva, el criterio puramente morfológico es suficiente: uno o más cuerpos densos, generalmente esféricos, que se hallan dentro del núcleo celular. También la elevada densidad del nucleolo es un criterio adecuado para su identificación con el microscopio electrónico. Su gran densidad se debe a proteínas. Con el microscopio óptico se observan diferenciaciones intranucleolares de difícil interpretación y variables según el estado fisiológico de la célula: "vacuolas" de poca densidad, inclusiones muy densas ("nucleolini") y filamentos ("nucleolenomata"). La ultraestructura

del nucleolo ha sido revisada por Bernhart (1958) y Porter (1960). Consiste esencialmente de una matrix densa y de gránulos de 15 m μ de diámetro, los que pueden estar constituidos por subunidades. Gránulos similares se hallan en el nucleoplasma, cromosomas y citoplasma, correspondiendo muy probablemente a ribosomas o agregados de ribosomas. Se ha sugerido que los gránulos son, por lo tanto, ribonucleoproteínas y la matrix, proteína (Swift, 1959). En Protozoos (Cohen, 1957) y plantas (Lafontaine, 1958; Sun, 1961) se hallan gránulos muy densos, pensándose que la distribución observada podría ser un artefacto de difusión.

En cortes ultrafinos de diversos materiales fijados tanto con tetróxido de osmio como con permanganato de potasio, no se observó la existencia de una membrana nucleolar, lo que descartaría definitivamente la evidencia presentada con el microscopio óptico, al menos en los casos en que el mismo material ha sido examinado con ambos microscopios. Una excepción notable ha sido descrita por David (1960).

El número de los nucleolos varía de uno a varios centenares en algunos eucitos. El número intrínseco está determinado por los organizadores nucleolares (véase más adelante) y es constante para cada especie (Heits, 1931; Gates, 1942). De acuerdo a esto, su número es mayor en núcleos poliploides, por ejemplo, en los Ciliados. Esta regla no es estricta pues el número es frecuentemente reducido por fusión y disolución, e aumentado por superproducción (eucitos) y "budding", que da origen a pequeños nucleolos originados por "brotación" del nucleolo principal.

Frecuentemente las estructuras nucleolares no son homogéneas, tanto en su morfología como en las propiedades químicas y de coloración (Enead, 1956; Raven, 1961).

En Dípteros, los cromosomas politénicos presentan a menudo formaciones que poseen algunas de las características del nucleolo, y son los llamados "bulbs", "puffs" y "Balbiani rings" (véase para su descripción Beerman, 1959). Algunas estructuras semejan nucleolos verdaderos y han sido llamadas "Sondernucleolen"; por ejemplo en Chironomus tentans se observa frecuentemente, al lado de los dos nucleolos ubicados en los cromosomas 2 y 3, un Sondernucleolen en el cromosoma 4 (Beerman, 1960). Ambos tipos de nucleolos difieren en estructura, y fisiología y no se fusionan entre sí. También en cromosomas politénicos se observó una expresión fisiológica, variable de individuo a individuo (Beerman, 1959) y consistente en la emisión de "gotas" refringentes, y a las que se ha denominado "Nebenmucleolen" (Bauer, 1935). En verdad, sus propiedades químicas (ribonucleoproteína, Feulgen negativo) lo asemejan al nucleolo verdadero. Puede ser inducido experimentalmente, en forma reversible, por un cambio de temperatura (Beerman, 1960).

Osano et al. (1956, 1957) observaron una diferencia interesante en la formación del nucleolo en el espermatozote de la rata y del ratón. En este último los cromosomas sexuales (X,Y) forman el nucleolo. Por el contrario en la rata este papel corresponde a unos pocos autosomas, mientras que los cromosomas

sexuales de hallar incluidos totalmente en una "vesícula". Tanto esta curiosa formación como el nucleolo comparten ciertas propiedades: composición química (ribonucleoproteína, Feulgen negativo) y desaparición durante la meiosis.

Finalmente debemos aquí indicar lo que se conoce con el nombre de "organizador nucleolar" y "cromatina asociada al nucleolo". El primero es un locus cromosómico -que es el mismo para todas las células de un organismo- en el cual está ubicado el nucleolo. Su función es la de organizar e concentrar el material nucleolar en una estructura final, el nucleolo principal.

El cromosoma que contiene al organizador se designa con el nombre de cromosoma nucleolar. Frecuentemente el organizador se localiza subterminal, como una constricción secundaria que termina en un trabante (Heits, 1931; McClintock, 1934).

La "cromatina asociada al nucleolo" es un término introducido por la escuela de Caspersen (1950) y refleja, como su nombre indica, la relativa topografía de la cromatina que está asociada (o unida) al nucleolo. Como tal, incluye al organizador nucleolar y, generalmente, heterocromatina. Junto con el nucleolo forma el llamado "aparato nucleolar".

Durante la evolución de la organización celular el nucleolo aparece simultáneamente con la membrana nuclear y los cromosomas diferenciados. En bacterias no existe nucleolo ni membrana nuclear y las fibras de DNA yacen libres en la cavidad nuclear. Ya en los Protistas aparecen claramente estas estructuras y el DNA se halla combinado con proteínas y RNA en cromosomas diferenciados.

(b) Bioquímica del nucleolo.

La obtención de nucleolos aislados en cantidad suficiente y exentos de contaminación de otras estructuras nucleares es evidentemente difícil. Debe mencionarse aquí los trabajos de Vincent (1952 - 1960) en oocitos de control de mar, Litt et al. (1952), Monty et al. (1956) y Merin et al. (1957) en hígado de mamíferos, Peert (1961) en pancreas, Stern et al. (1959), Johnston et al. (1959) y Mirnstiel et al. (1962) en raicillas de arveja. En general coinciden en señalar la presencia de RNA y proteína. La presencia del RNA fue señalada independientemente por Caspersen (1950) con métodos citofotométricos y por Brachet (1950) por procedimientos citoquímicos. La concentración de RNA varía según el material biológico y es usualmente un 5% de la proteína nucleolar. Excepcionalmente llega al 15% e es muy diluido (algunos oocitos). Tomando un caso concreto, en los nucleolos aislados de raicillas de arveja (Herbert et al. 1959) que tienen un 6 a 10% de RNA (1/4 de la proteína nucleolar) se estimó que el RNA del nucleolo representa un 20% del RNA de todo el núcleo y el 1.6% del RNA de toda la célula. Como dato comparativo, el RNA del núcleo comprende un 8% del RNA total de la célula y la proteína nuclear el 14% de la proteína celular.

El nucleolo es Paulgen negativo, es decir, no contiene ácido desoxirribonucleico (DNA). Este resultado fue confirmado por autoradiografía con un precursor específico del DNA, la timidina tritiada; el nucleolo nunca mostraba radioactividad, aun cuando el tiempo de incubación con el isótopo comprendía varias mitosis, es decir, varias duplicaciones de DNA (Taylor, 1957). Una interesante excepción la constituyen aquellos casos en los que las fibras cromosómicas del organizador nucleolar penetran profundamente en el nucleolo mismo (Maulard, 1956; Pelling, 1962).

Experimentos con autoradiografía mostraron que el turnover del RNA nucleolar ocurre continuamente en todas las células, excepto cuando los cromosomas están condensados en profase (Taylor, 1960), pero que en ciertos casos puede continuar aun durante la condensación cromosómica (Woods, 1959). En todos los casos estudiados hay un intenso metabolismo —síntesis y degradación— del RNA en el nucleolo. Por el contrario esto no ocurre con la proteína nucleolar, lo que sugiere que una función primordial del nucleolo radicaría en algún aspecto del metabolismo celular del RNA.

La incorporación de precursores radiactivos del RNA puede ocurrir inicialmente en el nucleolo, es decir, antes que el RNA del resto de la célula (Stich et al. 1953; Taylor et al., 1955, 1959; Mc Master et al., 1958, 1960; Pelling, 1959; Sirlin, 1960). Otros estudios señalaron que el nucleolo se marca simultáneamente e después del RNA cromosómico (cromatina): Taylor (1953, 1960), Goldstein et al. (1959), Harris (1959), Sirlin et al. (1959), Woods (1959), Fitzgerald et al. (1959), Amann et al. (1960), Weinendogen et al. (1960), Perry (1960). Los precursores radiactivos consistieron en los cuatro ribonucleósidos (guanósina, adenosina, citidina, uridina) e bases (guanina, adenina, citosina, uracilo) marcados con C^{14} & H^3 . Escaso número de trabajos ha dedicado atención al fosfato radiactivo (P^{32}); sobre este último precursor volveremos en detalle más adelante (III/D).

La actividad específica del RNA nucleolar es mayor que la del RNA citoplásmico. Los experimentos con autoradiografía precisaron la localización intranuclear. La interpretación de ambos tipos de experimentos tienden hacia la elucidación de un problema cuya solución definitiva no ha sido aun posible: de si el RNA nucleolar (y dentro del nucleolo si el cromosómico o el nucleolar) es el precursor del RNA citoplásmico. Por un lado en los experimentos citoquímicos es imposible distinguir que especie de RNA es la más activa (ribosomal, transfer o messenger). Además existe siempre la posibilidad de que un polinucleótido de bajo peso molecular se pierda en las preparaciones citológicas (véase por ejemplo Woods, 1959; Pollister et al., 1949).

Los experimentos con fragmentos celulares (nucleoles y anucleoles), especialmente en Amoeba y en el alga verde gigante Acetabularia indican que el nucleolo ejerce un control sobre la cantidad de RNA sintetizado en el citoplasma, mientras que la síntesis proteica prosigue algún tiempo después de la extirpación del nucleolo. Pero no señalan específicamente cual es la centri-

bución y en que forma se realiza.

Por otra parte, los espectaculares avances en el conocimiento de la estructura molecular y síntesis enzimática de los ácidos nucleicos, así como la elucidación del mecanismo de la síntesis de proteínas (vease por ejemplo Watson, 1963) hacen obligatorio el encuadramiento del tema dentro de los conocimientos adquiridos por los bioquímicos. El nucleolo se muestra más accesible al estudio del RNA. Las hipótesis sobre la función de esta estructura celular tienden a hacer énfasis en este aspecto particular (por ejemplo Parry, 1962; Sirlin, 1962).

McMaster-Kaye (1960) obtiene datos que interpreta como una síntesis y degradación del RNA nuclear más que una transferencia de las moléculas de RNA nuclear hacia el citoplasma. También sugiere precursores distintos para el RNA nuclear y cromosomal. Estas interpretaciones no son compartidas por otros autores, pero es evidente que existe una síntesis y degradación *in situ*, pues el metabolismo del RNA en los nucleolos de glándulas salivares en regresión continúa siendo intenso aún cuando evidentemente no hay síntesis neta de RNA (cf. Sirlin, 1962).

Las proteínas constituyen el componente más voluminoso de los nucleolos. La concentración alcanza a 430 mg/cm^3 en microesporocitos de Zea mays (Fallister et al., 1947) y 500 mg/cm^3 en hígado de mamíferos (Stenram, 1957, 1958). Este último valor corresponde a un contenido de materia seca del 40% aproximadamente (calculado como proteína con el microscopio de interferencia, Stenram, 1957). Valores aun más altos han sido hallados: 70% en neuronas (cf. Stenram, 1957), 85% en nucleolos aislados de oocitos de Asterias (Vincent et al., 1954). Estudios autoradiográficos con aminoácidos radiactivos indicaron al citoplasma como el lugar de síntesis proteica más activa (Zalekar, 1960). Más exactamente, el citoplasma muestra una mayor independencia de síntesis, y es difícil precisar el papel de las proteínas nucleares (y nucleolares) en el conjunto de reacciones celulares. Estudios físicoquímicos modernos señalan los componentes necesarios para la síntesis proteica (cf. Watson, 1963): ribosomas (ribonucleoproteínas estructurales), transfer-RNA (también llamado soluble-RNA), mensajero RNA y por supuesto las enzimas correspondientes. Todos estos componentes están presentes en el citoplasma. Ribosomas -estructuras con las características de los ribosomas se han hallado también dentro del núcleo, en el nucleolo, nucleoplasma y aun en los cromosomas (politénicos). Estudios autoradiográficos y el análisis bioquímico en núcleos aislados por centrifugación diferencial indican que el núcleo celular es capaz de sintetizar proteínas, independientemente del citoplasma (Allfrey, 1960; Zalekar, 1960). Por el contrario las tres especies de RNA parecen hallarse bajo el control inmediato del núcleo (Allfrey et al. 1962).

También nucleolos aislados de raicillas de arveja son capaces de efectuar síntesis proteica en forma independiente (Birnstiel et al., 1963). Estudios

autoradiográficas con aminoácidos radiactivos mostraron un rápido marca-
 miento de la proteína nuclear en tejidos en crecimiento rápido, tales
 como hígado en regeneración (Logan et al., 1957), meristema de raicillas
 (De, 1961) y oocitos (Ploq, 1955). Pero por otra parte, en células diferen-
 ciadas (hígado, testículo y tejido nervioso) las autoradiografías dieron
 resultado negativo para el nucleolo (Carneiro et al., 1959; Oehlert et al.,
 1960). También Sirlin et al. (1959) y Waddington et al. (1959) observaron
 en células embrionarias de axolote y mioblastos de anfibios un marca-
 miento de la proteína nuclear, mientras que en células similares en estados em-
 brionarios más avanzados no mostraban radiactividad en los nucleolos.
 No pueden sacarse conclusiones definitivas de estos resultados ya que, por
 ejemplo las células diferenciadas de los acinos pancreáticos y de la zona
 vacuolizada de raicillas muestran un marca-
 miento de la proteína nuclear (Begerich et al., 1961; De, 1961).

Finalmente, y en forma menos general, la presencia de otros componentes bioquí-
 micos han sido señalados: diversas proteínas separables por electroforesis
 u otros métodos a partir de nucleolos aislados de páncreas (Foert, 1961) y
 oocitos de Asterias (Vincent, 1958) y nucleos aislados de tino (Zbaraky et
 al., 1959); fosfatasa alcalina (Chévremont et al., 1953), succinato dehidroge-
 nasa (De et al., 1962), DPN sintetasa y ribonucleasa activa y latente
 (Baltus, 1954, 1960); fosfolípidos (La Cour et al., 1958) y elementos minerales
 (Vincent, 1955; Fujii, 1955). En oocitos se ha señalado una diversidad de
 otros compuestos, posiblemente característicos de las diversas especies
 (cf. Raven, 1961). Leuchtenberger et al. (1958) describen la presencia de
 glucógeno en nucleolos de hígado bajo ciertas condiciones experimentales;
 en las células hepáticas normales el glucógeno es siempre un componente
 del citoplasma.

Estérin et al. (1958) encontraron en neuronas una correlación entre el volu-
 men nuclear y el RNA total de la célula (lo que incluye principalmente
 la sustancia de Nissl en el citoplasma); no hallan proporcionalidad entre el
 volumen nuclear y RNA nuclear e entre el RNA nuclear y el RNA cito-
 plásmico. Vogt-Kano (1961) en Chironomus y Wers (1962) en el alga Agardhi-
 laria hallan que la relación entre el contenido en RNA y proteínas del
 nucleolo se mantiene constante bajo condiciones experimentales que llevan a
 una disminución de tamaño e incluso hasta la degeneración total del
 nucleolo.

Steinman (1957, 1958) analizó en detalle el fenómeno del aumento de volumen
 del nucleolo de las células hepáticas con resultado de una dieta pobre en
 proteínas. Este efecto parece ser específico del hígado pues, por ejemplo,
 no lo presentan las células de la médula espinal ni las del páncreas embrino.
 La concentración de la masa seca nuclear es la misma en ambos casos -dieta
 rica e pobre en proteínas- es decir que el aumento de tamaño no es debido a

un mayor contenido en agua solamente. En forma similar la concentración del RNA (14% de la masa seca nucleolar) es también la misma en ambos casos y corresponde a un 5% de la masa nucleolar total, lo que significa un aumento del contenido absoluto de RNA en los nucleolos grandes. Vincent (1954) halla en eucitos de Asterias que con el aumento de tamaño del nucleolo el peso seco decrece a un 40%, pero observa la presencia de numerosas vacuolas que ocupan un 50% del nucleolo y contienen sólo 5% del peso seco. Si no se consideran las vacuolas, el contenido en peso seco no decrece al aumentar de tamaño el nucleolo, de acuerdo a lo observado en el hígado por Stenram. La extrusión de material nucleolar hacia el citoplasma ha sido descrita innumerables veces en la literatura para células secretoras, tumorales y eucitos (Brachet, 1957; Haven, 1961; King et al., 1958; Gonzales Ramires et al., 1959). Otras tantas veces ha sido puesta en duda; pero es innegable en casos muy evidentes, por ejemplo, Oka (1940), King et al. (1958).

Altman (1952) y Stöcker (1962) describen que la inyección de pilocarpina, estimulante de la secreción pancreática, provoca la extrusión del nucleolo. Esto se realiza por una asociación de la membrana nuclear con la cromatina asociada al nucleolo, la que forma un pasaje para la emisión del nucleolo al citoplasma. Simultáneamente se realiza la extrusión de los gránulos de zimógeno, después de lo cual un nuevo nucleolo se forma en el lugar del expulsado. Erdan et al. (1962, 1963) señalan un fenómeno de extrusión nucleolar que se produce naturalmente en los tejidos de plantas del género Citrus.

La composición química y tamaño del nucleolo principal se hallan bajo directo control cromosomal. Lin (1955) demostró en microesporocitos de Zea mays una relación lineal entre el contenido en RNA del nucleolo y el número de organizadores nucleolares adicionales presentes en los cromosomas B⁶ supernumerarios. También observó que tanto en microesporocitos triploides para el cromosoma nucleolar como en una planta triploide el contenido en RNA y proteínas era la misma, y con un valor 1.5 mayor que en los normales diploides. Es interesante que, en cambio, la relación RNA/proteína siempre se mantenía constante, lo que señalaría un comportamiento general de la masa nucleolar, de acuerdo a lo observado por Vogt-Köhne (1961) en Chironomus y por Wers (1962) en Acartabularia. Longwell et al. (1960) observaron en microesporocitos de plantas de trigo tetraploides para los cromosomas nucleolares un aumento del 50% del volumen y masa seca nucleolar así como de masa seca y RNA citoplásmicos. Plantas tetraploides para los cromosomas no nucleolares no difieren apreciablemente de los normales diploides, lo que sugiere que, cuantitativamente, el nucleolo y citoplasma (tamaño, peso seco, contenido en RNA y proteína) se hallarían bajo control de los cromosomas nucleolares.

Debe sin embargo aclararse que esto no significa que solamente el cromosoma nucleolar —o su organizador— son los responsables de la síntesis de materia

nucleolar (RNA, proteínas). En aquellos casos en que no existe organizador nucleolar, talos como las glándulas salivares de leishmanias (Jacob et al., 1963), una mutación de Chironomus (Boermann, 1960) y Xenopus (Elsdale et al., 1958; Wallace, 1962) y microesporocitos de Zea mays tratados con rayos X (McClintock, 1934), aparecen una serie de corpúsculos intranucleares de distinto tamaño y con las características del nucleolo. La ausencia del organizador nucleolar impide la organización del material nucleolar en un nucleolo principal, pero no la síntesis de material nucleolar. Das (1962) estudió la formación de nucleolos en raicillas de haba y cebolla irradiadas con rayos X y con el fin de inducir fragmentación de los cromosomas; todos los micronucleos que se originaron, independientemente del tamaño, contienen material nucleolar.

Un caso citado por McClintock (1934) revela que la mera presencia del organizador nucleolar no es suficiente para una organización ordenada del nucleolo: ella encuentra un tipo de células madres de pólen en maiz que, a pesar de poseer dos cromosomas nucleolares muestra la presencia de numerosas "nucleolos" asociados con los otros cromosomas del complemento. Sugiere que bajo ciertas condiciones y con ciertas deficiencias genéticas, el organizador nucleolar no puede funcionar eficazmente, aun cuando la formación de material nucleolar tiene lugar dentro de estos núcleos.

Birnstiel et al. (1963) encuentran en los nucleolos aislados de raicillas de arveja, que los ribosomas nucleolares son idénticos con los ribosomas del citoplasma. Este resultado no es sorprendente por cuanto las proteínas ribosomales provenientes de fuentes tan distintas como reticulocitos, semilla de arvejas y hígado, mostraron una gran similitud (Tse, 1962).

Favard (1961) ha publicado un extenso trabajo sobre la evolución de las ultraestructuras celulares durante la espermiogénesis de Ascaris megalocephala Schrank, que merece una mención especial. Es sabido que en estos Nematodos el citoplasma contiene una abundante cantidad de inclusiones constituidas por "gránulos" de una proteína ácida, la ascaridina, muy rica en aminoácidos dicarboxílicos. Esta proteína peculiar posee las propiedades de ser completamente soluble en agua destilada a 60°C, alcohol absoluto con 1% de ácido fosfotúngstico e en soluciones alcalinas tales como el hidróxido de plomo. Estas características no son modificadas por la fijación en alcohol, Carnoy, formal e OsO_4 . Favard ha podido así demostrar en forma muy convincente y por primera vez al nivel del microscopio electrónico, gránulos de secreción citoplásmicos en el nucleolo. Este constituye una fuerte evidencia en el sentido de que el nucleolo puede llegar a sintetizar exactamente la misma proteína que el citoplasma. Favard halla que esto ocurriría en forma independiente; sólo aparecen los gránulos de ascaridina en el nucleolo cuando el citoplasma se halla ya saturado de ascaridina. El destino ulterior de la ascaridina nucleolar es la fragmentación y desaparición —junte con el nucleolo mismo— al final de la diacinesis.

III. RESPUESTA A OBTENIDA EN LA BIOQUÍMICA DEL NUCLEOLO.

La revisión bibliográfica anterior nos señala los siguientes problemas: (a) proteínas nucleolar, (b) RNA nucleolar, (c) relación del nucleolo con el organizador nucleolar, (d) ciclo nucleolar durante la mitosis y (e) ultraestructura. En torno a estos puntos surgen las siguientes preguntas: (A) ¿existe una sustancia de localización específicamente nucleolar, o concentrada especialmente en los nucleolos?, (B) ¿cual es el origen del material nucleolar durante la mitosis y meiosis?, (C) ¿contiene el nucleolo un "pool" de sustancias de bajo peso molecular que le es propio?, (D) ¿el RNA nucleolar se comporta de la misma manera en todos los tipos de células y con todos los precursores?, (E) ¿existen los tres tipos de RNA en el nucleolo? es posible una caracterización citoquímica de estos RNAs?, (F) ¿cual es la relación entre el RNA nucleolar y el RNA del organizador nucleolar? Describiremos a continuación los métodos y hallazgos que nos han permitido contestar a estas preguntas fundamentales.

4. Demostración de la existencia de una sustancia de localización específicamente nucleolar. La técnica de reducción de sales de plata (argentafin) y sus variantes.

Material y método: fijación en alcohol 96%, Carnoy (alcohol absoluto: ácido acético glacial; 3:1) o 10% formol. Cortes por congelación (15 a 30 μ) y "squashes" efectuados según (a) Foulgen, hidrólisis en 1N HCl y coloración con leucofucsina básica, (b) Schneider (1945), 5% ácido tricloroacético 30 minutos a 95°C, (c) Tandler (1959), 2% NaOH, 12 a 24 horas a 37°C después de un tratamiento con formol o (d) pectinasa, 5% (Pectinase 100-D, Rehm y Haas Co.), 3 horas a 25°C. Materiales de raíces de Allium cepa, Vicia faba, Zea mays, y Pisum sativum; glándulas salivares de Drosophila virilis y Smittia sp.; hígado, médula espinal, riñón, intestino delgado y ovario de Cavia porcellina, Gallus gallus y Bufo arenarum.

Métodos: la preparación del nitrato de plata amoniacal ha sido descrita por varios autores (cf. Lison, 1953). Sin embargo la coloración de los nucleolos no ha sido señalada. Esto se debe a que los nucleolos pierden su poder reductor en los cortes usuales obtenidos por inclusión en parafina (en forma muy variable según el tiempo y material usado). Un segundo punto que conviene aclarar es la naturaleza química de la reacción, a la que suele llamarse "argentafin" y que es muy diferente de las coloraciones por impregnación argéntica (Lison, 1953).

Solución de nitrato de plata amoniacal: a una solución de 10 a 15% de AgNO_3 se agrega, gota a gota y agitando, amoníaco concentrado (25%). En forma primera un precipitado que luego se redissuelve. El punto crítico de la técnica es que no debe haber nada de amoníaco libre. Para este fin, una vez que el

reactivo ha quedado límpido se agregan unas pocas gotas de la solución de AgNO_3 hasta reaparición del precipitado. Se agita y deja unos minutos para estar seguro que no se redissuelve; el reactivo no debe estar a menisaje. Una ligera modificación consiste en mezclar partes iguales de 20% AgNO_3 y de una solución saturada de carbonato de litio. Se producirá un precipitado compuesto por carbonato de plata. El agregado de menisaje se hace en forma análoga al reactivo anterior.

Modo de empleo: el material fijado se lava en la forma usual, y finalmente con agua destilada. Se sumergen en el reactivo y se dejan en un recipiente herméticamente cerrado y en completa oscuridad a 45°C - 60°C por espacio de varias horas. Cada hora se examina la marcha de la reducción montando en agua destilada o glicerina (como la observación requiere lógicamente la presencia de luz, estos cortes se descartan). El tiempo de reducción fluctúa entre 4 y 24 horas. También se puede trabajar en condiciones más drásticas: 15 a 45 minutos a 90°C . Se lava con agua destilada fría, varias veces, y finalmente con ácido acético al 4% y agua destilada, todos estos pasos protegiendo lo más posible el material de la luz. Se observa en una gota de glicerina, o se deshidrata en alcohol y se monta en Daparal.

Emulsión fotográfica: hemos hallado este procedimiento durante un intento de utilizar la técnica de Gernberg (1951) para fabricar una emulsión sensible a las radiaciones. En la técnica original se colocaba una capa protectora entre el tejido y la emulsión fotográfica. Hemos observado que al emitir esta capa protectora, y permitiendo así un contacto íntimo de las células con los cristales de bromuro de plata, los nucleolos reducen fuertemente la emulsión después de efectuado el proceso de revelación fotográfica. La técnica, algo compleja, es la siguiente:

- 1) Se sumergen los cortes (adhesivos a los portasobjetos con un poco de gelatina) y squashes en la solución dada por Gernberg, conteniendo celodión (15cm^3), bromuro de cadmio (3grs.) y bromuro de amonio (0.6grs.) disueltos en 50cm^3 de alcohol absoluto (5 minutos).
- 2) Se deja drenar unos 30 segundos el exceso de esta solución, apoyando la parte inferior del porta sobre un papel absorbente. A continuación se sumergen y trabajan con luz roja, en una solución fría ($1-4^\circ\text{C}$) de nitrato de plata al 10%. Aquí permanecerán en la heladera y completa oscuridad por 3 a 10 días.
- 3) Se revela, ya sea como en el método original de Gernberg, con sulfato ferroso al 4%, o con Kodak D-11 ó D-19b. En el último caso se lava repetidas veces con agua destilada para eliminar el exceso de AgNO_3 . Finalmente se fija en una solución de "hype" al 30%, se lava con agua corriente, deshidrata en alcohol y se monta en Daparal.

Das (1962) publicó una técnica similar para ser utilizada con la emulsión comercial de Kodak, Autoradiographic stripping film AR-10.

Resultados:

Las soluciones de plata amoniacal, así como las emulsiones

fotográficas son reducidas por el nucleolo más rápida y fuertemente que el resto de las estructuras celulares (figs. 1 y 2). Con un mayor tiempo de tratamiento el citoplasma y cromosomas adquieren un color que varía del amarillo al marrón, mientras que los nucleolos se muestran negros. Por supuesto la fijación en fermal, por ser este reductor, hace aumentar la coloración de fondo. Pero el hecho de que el nucleolo reduce fuertemente las sales de plata, aun cuando se haya usado un fijador "inerte" como el alcohol, muestra que el alto poder reductor se debe realmente a la sustancia nuclear per se.

Surge ahora la pregunta de si el elevado poder reductor del nucleolo se debe a una sustancia nuclear especial o si es resultado de una mayor concentración de proteínas en el nucleolo. Debemos señalar que la reducción de sales de plata no constituye una reacción químicamente específica, de manera que todas las sustancias reductoras dan reacción positiva. Las proteínas también reducen las sales de plata, tal como demuestran unos pocos experimentos en tubos de ensayo e frotis de proteínas efectuados sobre un portaobjetos. Esto explica la coloración de fondo de toda la célula, pero no justifica la intensa reacción dada por el nucleolo. Los ácidos nucleicos no son los responsables químicos ya que estos pueden ser eliminados (squashes según el procedimiento de Schneider, o el RNA por hidrólisis alcalina) sin que se afecte la propiedad de los nucleolos de reducir fuertemente las sales de plata. Dos líneas de evidencia justifican la presunción de que la reacción demuestra la presencia de una sustancia de localización específicamente nuclear (o concentrada en los nucleolos): (a) la reacción es mucho más intensa aun cuando la concentración en proteínas y masa seca es mayor en otras estructuras y (b) el efecto de algunos bloqueadores químicos sobre la reacción argentafina.

Una tercera evidencia señala, por otra parte que la reacción nuclear no es un artefacto de difusión: los cromosomas no se colorean, y de igual modo no hay ninguna reacción intensa en el área nuclear cuando el nucleolo está ausente durante la metafase. Previamente la reducción del nitrato de plata amoniacal por agregado de una sustancia reductora (por ejemplo, una gota de fermal o glicerina) la plata reducida impregna los cromosomas, y la coloración final muestra colorados en negro tanto los nucleolos como los cromosomas, mientras que todo el núcleo muestra una mayor coloración de fondo. La fijación en fermal provoca fenómenos semejantes al el fermal no es eliminado totalmente. Si existiera un mecanismo de difusión artificial en la reacción argentafina no se explicaría la coloración selectiva del nucleolo simultáneamente con la ausencia de este efecto en los cromosomas.

La primera evidencia señalada anteriormente (a) parece confirmarse al observar la intensa reacción nuclear en comparación a estructuras ricas en nucleoproteínas tales como los cromosomas y la sustancia tigroide de las neuronas. Lengwell et al. (1960) dan datos cuantitativos de la distribución de materia

celular durante la meiosis en microesporocitos de Zea mays, Triticum aestivum, Tradescantia paludosa y esporocitos de Malanopsis differentialis fijados en Carnoy. En todos los casos los cromosomas son las estructuras mas densas y las que muestran una mayor concentración de proteínas. Si la reacción argentafín fuera suficiente debido a proteínas cabe esperar una fuerte reducción en los cromosomas. Esto no ocurre, y aun en estos casos el nucleolo es la estructura que muestra el poder reductor mas elevado. De manera que es aceptable la hipótesis de que el nucleolo posee sustancia(s) fuertemente reductor(es) y de alto peso molecular (pues no son disueltas por fijación y lavado) que le son propios. Estas sustancias están fuertemente unidas a la proteína molecular y no ha sido posible disolverla sin desintegrar al nucleolo mismo. No hemos podido identificarla químicamente, pero es muy probable que el nucleolo posea grupos reductorales diferentes al resto de la célula. De ser así sería posible obtener una reacción diferencial del nucleolo frente a las sales de plata y usando bloqueadores químicos. La Tabla I resume un ensayo de este tipo. Se observa que el bromo suprime la reacción argentafín del nucleolo sin afectar apreciablemente la coloración de fondo de la célula, mientras que el acetato mercurico hace exactamente lo contrario: la reacción del nucleolo es intensa mientras que suprime la coloración de fondo. Así pues esta evidencia señala hacia la existencia de grupos químicos característicos en el nucleolo. Parece ser, a juzgar por el efecto de los bloqueadores, que enlaces estilénicos (C=C) y grupos capaces de acilarse pero distintos del grupo amino o sulfhidrilo, son los responsables de la intensa reducción de la sustancia molecular. Se sabe que generalmente el nucleolo es Schiff y ácido periódico-Schiff (PAS) negativo. La primera reacción indica como muy poco probable la presencia de grupos aldehidos como responsables de la reacción argentafín. La reacción PAS indica la ausencia de carbohidratos con grupos 1-2 glicol libres. Sin embargo la presencia de carbohidratos, aun y en particular aldeos con el carbono (C1) uno libre, podría ser una posibilidad. Nosotros hemos observado (Tandler, 1962) que el grupo carbonilo de los aldeos es capaz de dar la reacción fenilhidracina-formosán (Pearce, 1961); por ejemplo la fenilhidracina cristalina de la manosa da inmediatamente un formosán color violeta con la sal de diazonio Fast Blue 2B (Garr) en piridina. Pero los nucleolos no muestran ninguna coloración con este test, lo que de por sí no significa una ausencia de estos grupos debido a que el test no es de aplicación general. (Pearce, 1961). Por supuesto, otros grupos químicos reductores son también posibles (di- o polifenoles, aminofenoles, etc.). La sustancia "argentafín" del nucleolo es resistente a la extracción con solventes orgánicos (piridina, alcohol y benceno a ebullición) y no corresponde al "nucleolodroma" de Estable y Setole (1954) porque no puede ser visto en los cromosomas mitóticos.

B. La sustancia "argentafin" y el ciclo nucleolar durante la mitosis.

Relación del nucleolo con el organizador nucleolar.

La localización de una sustancia específica del nucleolo permite el estudio de la misma en relación con el ciclo nucleolar durante la mitosis. Hemos observado que la técnica de la emulsión fotográfica suministra imágenes más precisas, posiblemente por el uso de reactivos menos drásticos que las soluciones de plata amoniacal. En el problema del origen del nucleolo en la telofase existen dos posibilidades: (1) la anunciada por Heits (1931a) en que el nucleolo comienza a formarse en el organizador nucleolar y crece en este locus. Un corolario —aunque no obligado— de esta tesis es que únicamente el organizador nucleolar sintetiza el material del nucleolo. (2) la anunciada por diversos autores antiguos y modernos (véase Cates, 1942; Matsura, 1938; Vincent, 1953; Jain, 1957) en la que el organizador nucleolar colecta el material nucleolar que se forma (o aparece) inicialmente en diversos lugares dentro del núcleo y que sólo más tarde se fusionan en el organizador.

La evidencia morfológica encontrada por nosotros, junto con la certeza de que se trata realmente de material nucleolar dada la especificidad de la técnica empleada, demuestra que la posibilidad (2) es la correcta. Cabe destacar aquí que el mismo Heits observó en el mismo año (1931b) un caso que le obligó a rectificar su hipótesis previa: un micronúcleo derivado de un cromosoma "lagging" que con certeza no era el cromosoma nucleolar, y que sin embargo fué capaz de formar un nucleolo.

En "equinios" de meristemas de raicillas hemos observado durante la anafase-telofase temprana una delgada capa de material nucleolar ubicada entre todos los cromosomas (es decir, siguiendo la configuración de los mismos). En estados algo más avanzados de la telofase aparecen numerosas "corpúsculas" de material nucleolar que denominamos cuerpos prenucleolares (Fig. 1) los que por fusión de unos con otros van originando cuerpos prenucleolares más grandes (Fig. 2) los que finalmente se unen en uno o dos nucleolos en la interfase. Los cuerpos prenucleolares dan la reacción argentafin, lo que constituye una demostración de que el material prenucleolar es idéntico al nucleolar, y de que el primero es el precursor morfológico del segundo.

En profase se observa a menudo un proceso similar, como si la desaparición del nucleolo implicara una desmembración estructural. En metafase no se observa ninguna coloración argentafin en (o sobre) los cromosomas y área nuclear, mientras que el citoplasma parece colorarse algo más.

Estas observaciones demuestran (1) el origen del nucleolo en los cuerpos prenucleolares, (2) la función del organizador nucleolar consistente en la colección de estos cuerpos prenucleolares y (3) de que el material nucleolar no forma parte integrante del cromosoma metafásico. Por el contrario, lo observado en profase y metafase sugiere que el nucleolo se desintegra y pasa al

citoplasma.

Respecto a cómo puede ir más allá de este último problema: ¿qué pasa con el material molecular durante la metafase? Recientemente Das et al. (1959) y Das (1962) señalaron que el material molecular aparece en el citoplasma durante la metafase (véase Nagia, 1961). Sin embargo esta última conclusión es algo aventurada por cuanto la reacción argentafín carece de especificidad química. Afortunadamente las notables investigaciones de Swanson Beck (1962) han probado que es correcta la presunción. Este autor observó que en ciertas enfermedades humanas la tolerancia inmunológica se quiebra y los pacientes producen auto-anticuerpos que reaccionan con constituyentes de sus propias células. Usando la técnica de coloración con anticuerpos fluorescentes observó tres tipos de auto-anticuerpos que reaccionan con otros tantos componentes intranucleares. Los antígenos con los que estos anticuerpos reaccionan son: (a) una deoxiribonucleoproteína presente en la cromatina; (b) una proteína soluble presente en el nucleoplasma y (c) un constituyente no identificado de los nucleolos. Este autor ha seguido la distribución de estos antígenos por coloración de los respectivos anticuerpos fluorescentes en células HeLa durante los estadios de la mitosis. Sus resultados también confirman que el material (antígeno) molecular se desintegra durante la profase y reaparece en la telofase en los cuerpos prenucleolares. Pero el resultado más interesante es que solamente en metafase aparece el citoplasma coloreado. Es decir: (1) el antígeno molecular, presente sólo en los nucleolos durante la interfase, aparece durante la metafase en el citoplasma y (2) confirma de que los cromosomas metafásicos no contienen la sustancia molecular. Todos estos resultados nos muestran el verdadero aspecto del ciclo molecular. Los resultados de Swanson Beck no pueden ser puestos en duda debido a la gran especificidad bioquímica del método empleado. Es interesante que también el antígeno del nucleoplasma aparece en el citoplasma durante la metafase. El movimiento de estas proteínas del núcleo al citoplasma y viceversa muestran una cierta analogía con el comportamiento de las proteínas nucleares transplantadas experimentalmente a una célula receptora. Usando un núcleo marcado en la proteína, Goldstein (1958) en Amphib y Krengel et al. (1963) en glándulas salivares de Dípteros observaron que después de algún tiempo ambos núcleos eran radiactivos. Como en ningún momento ha aparecido radiactividad en el citoplasma -lo que ocurriría si la proteína nuclear marcada se hidrolizara en aminoácidos- se sugiere que ha habido un verdadero transporte, es decir, que los núcleos aparecen como centros de atracción para las proteínas nucleares. Otro resultado fundamental ha sido obtenido por Das (1962) utilizando la característica del material molecular de reducir las sales de plata; todos los cromosomas e fragmentos de cromosomas son capaces de producir material molecular. Irradiando con rayos X maripositas de raicillas de haba para inducir fragmentación cromosómica observó que todos los micronúcleos al formarse poseían la sustancia argentafín, independientemente del tamaño.

Varios autores anteriores habían señalado que, sin embargo, muchos microendocitos no poseían nucleolos; nos parece que esto se debe a diferencias de técnica, y el resultado positivo de nos se debe a una mayor sensibilidad y especificidad citológica del método empleado.

Nos ha seguido también la evolución ulterior de los microendocitos: muchos de ellos pierden la capacidad de formar sustancias nucleolar. Cualquiera que sea la función de la sustancia argentafin nos ha señalado que sólo aquellas microendocitos que la poseen son capaces de sintetizar RNA y DNA.

Destacaremos también que el origen del nucleolo durante la telofase por el proceso de la cohesión de cuerpos pre-nucleolares ha sido confirmado con el microscopio electrónico en diversos materiales biológicos: meristema de raicillas de Vicia faba (LaFontaine et al., 1963), plasmodesma de Physarum polycephalum (Cutler et al., 1961), neuroblasto de langosta (Stevens, 1961), meiosis en plantas (Repp-Hassenkamp, 1960) y espermatozoides de Ascaris megalocephala (Favard, 1961).

En las glándulas salivares del chironómido Smittia sp. el nucleolo rodea al organizador nucleolar completamente (Birlin, 1962). La fuerte reducción de la emulsión fotográfica dada por el nucleolo por μg no es compartida por el organizador, lo que indica que la sustancia argentafin está concentrada en el nucleolo. El fragmento cromosómico constituido por el organizador nucleolar no difiere apreciablemente de los cromosomas en cuanto a su poder reduccional, señalando que, de estar presente la sustancia argentafin, lo está en concentraciones mucho más bajas que en el nucleolo.

Por último diremos que existe evidencia de que los cuerpos pre-nucleolares también contienen RNA (Fleinfeld et al., 1959) y de que el RNA nucleolar podría seguir el mismo ciclo que la sustancia nucleolar, esto es, de que se desplaza hacia el citoplasma en el período profase-metáfase (Taylor, 1960) y vuelve hacia el núcleo en anafase-telofase. Es también posible que exista una reutilización del material nucleolar (proteína y RNA) del ciclo anterior (Harris, 1961; Martin, 1961).

C. Demostración de la existencia de un "pool" de ortofosfato en el nucleolo. La técnica de fijación con acetato de plomo. Especificidad citológica. Comportamiento del pool durante la mitosis.

La base de esta técnica es la observación empírica de que la fijación en una solución acuosa de acetato de plomo provoca la precipitación de una sustancia de bajo peso molecular en el nucleolo. Se demostrará que este componente nucleolar es debido en su mayor parte —o en su totalidad— a iones ortofosfato y que no es un artefacto de la técnica. Se discute la significación de este hallazgo y su comportamiento durante la mitosis.

Materiales: raicillas de Allium cepa, Vicia faba, Linum catharticum, Desmodium y otras plantas; el alga verde Vaucheria sp.; células intermedias del alga Nitzschia

clavata; hojas de Brassica elaracea; embriones de Vicia faba y Gallus gallus; células madres de polen de Los mayas; hígado, glándula suprarrenal, médula espinal y ovario de Bute swainsoni, Cavia porcellina y Gallus gallus; glándulas salivares de Protophila virilis.

Técnicas: consiste en fijar en una solución de acetato neutro de plomo al 10% en agua bidestilada. También hemos empleado el "picrate-acetate de plomo", fijador compuesto por un volumen de ácido picrico (saturado en agua destilada) y dos volúmenes de acetato de plomo al 10 ~~o~~ 15%. En este caso ambas sustancias reaccionan y el fijador está finalmente compuesto por picrato de plomo (saturado), ácido acético y acetato de plomo. El tiempo de fijación es generalmente entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente o en frío (1 - 4°C). Se lava el exceso de plomo con agua destilada (varias veces), se deshidrata en alcohol y se incluye en parafina con los métodos usuales. Los cortes desparafinados se sumergen en una solución saturada de ácido sulfhídrico (H_2S) en agua destilada, 15 a 30 minutos, se lava con agua destilada, se deshidrata y se monta en Sapprol e bálsamo de Canadá. Los nucleolos aparecen colorados en negro debido al sulfuro de plomo (PbS). Si se quiere observar el precipitado nuclear (incoloro), sin recurrir a su coloración con H_2S , pueden observarse los cortes con el microscopio de contraste de fase. Los nucleolos se muestran muy refringentes.

Simultáneamente se realizan controles de la siguiente manera: (a) se fijan los tejidos en ácido tricloroacético al 5% (1 - 4°C) por 15 minutos y se lava con agua destilada fría. A continuación se prosigue con una post-fijación en acetato de plomo en la forma arriba indicada. (b) Los cortes del material fijados en acetato de plomo se tratan con la solución fría de ácido tricloroacético. Estos controles demuestran que el precipitado nuclear está formado por la sal de plomo de un componente ácido-soluble. La sal de plomo misma es también ácido-soluble.

Resultados:

Especificidad citológica: sólo los nucleolos dan una intensa reacción positiva dentro del núcleo (Figs. 3 - 16). Los cromosomas no dan la reacción (Fig. 8) lo que señala que este componente ácido soluble del nucleolo, al igual que la sustancia argentafín ácido-insoluble, no participan en la formación de los cromosomas en forma directa. En ciertos casos (meristema de raicillas de cebolla) una reacción positiva es dada por algunos elementos figurados del citoplasma. En este caso se debe principalmente a sales insolubles, ya que, al contrario del nucleolo, aparecen aun después de la fijación en alcohol.

Especificidad citoquímica: cuál es la sustancia que precipita en los nucleolos? Para resolver este problema estudiaremos: (1) el efecto de fijadores (pre-fijación) y (2) las propiedades in situ de la sal de plomo depositada en los nucleolos. Por combinación de los datos obtenidos de (1) y (2) se analizará (3) la separación cromatográfica de las sustancias precipitables por

acetato de plomo.

(1) El efecto de los fijadores el precipitado nucleolar de la sal de plomo no se forma si previamente los tejidos son sumergidos en alcohol 96%, Carnoy, ácido acético (2 a 45%), ácido ascético 5% en etanol 50%, acetona, ácido tricloroacético al 5% o ácido perclórico al 4%, 15 a 60 minutos (1-4°C), y lavado posterior con agua destilada fría. Este indicio, que muy posiblemente el componente nucleolar precipitable por Pb es de bajo peso molecular.

(2) El precipitado nucleolar (observación con contraste de fase e coloración con H_2S) es completamente insoluble en solventes orgánicos a ebullición (etanol, benceno, tolueno, cloroformo, xilol o piridina). Esto descarta a los ácidos grasos (jabones de plomo). También es completamente insoluble en las siguientes soluciones: 1 a 5% de acetato de plomo en ácido acético glacial o al 45%; idem. en acetato de amonio al 20%. Este segundo reactivo descarta al sulfato de plomo, mientras que el primero descarta al carbonato, glicerofosfato, tartrato y malato de plomo. Las sales de plomo de los fosfatos inorgánicos son insolubles en ácido acético. Los meta- y polifosfatos pueden descartarse ya que, su presencia no ha sido hallada en cantidades apreciables en los vertebrados. La inclusión de iones Pb^{++} en el ácido acético y en el acetato de amonio es necesaria porque estos dos últimos se hallan siempre en gran exceso respecto al precipitado de los nucleolos, y en rigor, ninguna sustancia es completamente insoluble.

(3) Si bien es cierto que después de fijar en ácido tricloroacético en frío los nucleolos pierden el componente nucleolar precipitable con Pb, queda por demostrar que este componente es realmente extraído de las células, esteros, que no existe la posibilidad de que la sustancia nucleolar quede retenida en forma difusa dentro del tejido. Para este fin es necesario obtener una mayor sensibilidad de los reactivos, y hemos observado que los iones Pb^{++} pueden ser completamente eliminados de raicillas enteras (es decir, no se coloran en absoluto con H_2S). También el precipitado obtenido por fijación en acetato de plomo es extraído en forma total con ácido tricloroacético. La Tabla II demuestra este punto. Es evidente que los iones Pb^{++} pueden quedar retenidos por proteínas y otras sustancias ácido-insolubles y colorarse con H_2S . Este fenómeno es completamente eliminado con el ácido acético cosa que no ocurre con el componente ácido-soluble del nucleolo. Su total extractabilidad por el ácido acético tricloroacético frío, indica que seguramente se trata de una sustancia de bajo peso molecular y que se halla en los extractos de tejidos obtenidos con este ácido, es decir, en la fracción ácido-soluble. Habiendo demostrado esto, procedemos a su identificación por separación cromatográfica. El siguiente método se ha empleado:

Extracción del tejido fresco con ácido tricloroacético frío (1-4°C) por 30 minutos, eliminación del tricloroacético con éter etílico y cromatografía ascendente en papel Whatman N° 1. Este papel fue lavado previamente con

ácido acético al 10% y agua bidestilada para eliminar impurezas. El solvente usado consistió en una mezcla de acetona:ácido acético:agua destilada (50:15:35) descrita por Burrows et al. (1952) y Winteringham et al. (1955). Hemos observado que este solvente, originariamente usado para la cromatografía de compuestos fosforilados da también buenas separaciones de aminoácidos y sustancias fenólicas. Los "spots" se localizaron por medio de los reactivos según Smith (1958). Para las sustancias precipitables con Pb hemos procedido de la siguiente manera: los cromatogramas son pulverizados (sprayed) e pasados rápidamente a través de una solución de acetato de plomo al 5%, dejándoles luego colgar en un lugar seco durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavan ahora los papeles en una cubeta con agua bidestilada, tres veces 5 a 10 minutos cada vez (esto es necesario para eliminar totalmente el exceso de Pb). Después de la evaporación del agua los papeles son colgados en una atmósfera de H_2S ; las sustancias precipitables con Pb aparecen como manchas marrones. El ortofosfato de plomo puede ser mostrado en este mismo papel con el reactivo melibídico de Burrows et al. (1952); la mancha de Pb es transformada después de algunos minutos en una mancha azul de fosfomolibdato. Las precipitaciones de Pb insolubles en ácido acético se localizan sumergiendo los cromatogramas ya tratados con acetato de plomo en una cubeta conteniendo 5% de acetato de plomo en ácido acético glacial (30 -60 minutos) y procediendo luego a lavar con agua y colorar con H_2S .

Los spots que absorben luz ultravioleta fueron localizados según el método del "blueprint" de Gordon (1958). El análisis cuantitativo de ortofosfato y fosfato ácido-soluble total (en presencia de iones Pb^{++}) fue realizado mediante el método de King (1932).

Los resultados se presentan a continuación. Se utilizaron principalmente raicillas por cuanto el análisis indicó que el ortofosfato representaba 60 -65% de la fracción ácido-soluble total (extractos obtenidos con ácido tricloroacético al 5% o perclórico al 4%). Valores tan elevados para ortofosfato han sido descritos por otros autores (Arney, 1939; T'ee et al., 1959).

La Fig. 22 muestra las sustancias ácido-solubles en extractos de raicillas de maíz. En la Tabla III se señalan las reacciones dadas por estas sustancias. Se observa que sólo los spots N° 5 (ortofosfato), 9 y 10 (compuestos flavonoides) están presentes en cantidades suficientes para dar un precipitado con acetato de plomo. De estos, sólo el ortofosfato de plomo forma una sal de plomo insoluble en ácido acético. Este resultado, junto con las propiedades del precipitado molecular estudiadas in situ, señalan a los iones ortofosfato como componentes ácido-solubles de los nucleoles y responsables de la reacción citoquímica del acetato de plomo. Los fosfatos orgánicos están presentes en cantidades muy pequeñas que para ser visualizadas en el cromatograma por medios químicos (véase también Brooks et al., 1959).

En el hígado se observa además del precipitado molecular, una gran cantidad

de precipitado granular extracelular y especialmente alrededor de las venas centrales. Si efectuamos en cambio una perfusión con solución fisiológica notamos que este último precipitado está ausente mientras que no se afecta al de los nucleolos. Se concluye de este experimento sencillo que la fracción precipitada por Pb dentro de los nucleolos corresponde — en parte — de la fracción del ortofosfato intracelular.

El precipitado nucleolar en diversos tipos de células: hifas de Allium cepa incubadas 8 horas in vivo con ribonucleasa cristalina (Sigma) a una concentración de 5 mg/ml en agua destilada, pierden la basofilia nucleolar (Brachet, 1957), tal como se observa por coloración con azul de toluidina (fijación en Carnoy). Sin embargo estos nucleolos aun contienen ortofosfato a juzgar por su precipitación con el método de fijación en acetato de plomo; este estaría de acuerdo con el hecho de que la ribonucleasa no afecta el contenido en fosfato inorgánico (Brachet, 1956). Tampoco un tratamiento con ácido ribonucleico de levadura (que induce la formación de nucleolos voluminosos, Kodani, 1948), Fig. 10 o con calchicina, afectan apreciablemente al contenido en fosfato inorgánico de los nucleolos.

En los evocitos de Raphanus el ortofosfato se halla localizada en la porción basófila, es decir la que contiene RNA, mientras que la parte acidófila no da ninguna reacción con el acetato de plomo (Figs. 14, 15).

Los embriones de pello y de haba dan también reacción positiva en sus nucleolos. Es interesante destacar que aun en las semillas de haba no germinadas (deshidratadas y fisiológicamente muy poco activas) existe un pool de ortofosfato en los nucleolos.

En la célula gigante intermedial del alga Nitzschia glauca el precipitado obtenido por fijación en acetato de plomo aparece únicamente en los nucleolos (Fig. 6). Mas de 100 nucleolos pueden ser vistos en una célula, cada uno conteniendo unos 20 a 50 nucleolos. Estos nucleolos se dividen amitóticamente (Fritsch, 1935). La frecuente observación de nucleolos comprendidos en este proceso muestran todos sus nucleolos con el precipitado de fosfato de plomo. Si cortamos una célula intermedial en dos o tres trozos el contenido de la vacuola central se diluye en el agua del medio, pero el protoplasma permanece adherido a la membrana celular. La fijación con acetato de plomo de estos fragmentos muestra los mismos resultados que en la célula entera. Como la integridad de la membrana celular ha sido destruida, esta no puede ser responsable de la retención de la fracción de fosfato inorgánico precipitada en los nucleolos.

Finalmente, resulta de interés observar la aparición del precipitado nucleolar al microscopio electrónico. De hecho, resulta posible la localización de los iones ortofosfato en la forma de su sal de plomo debido a que este metal pesado es opaco a los rayos del microscopio. En colaboración con el Dr. J. Jacob hemos realizado cortes ultrafinos de hifas de Allium cepa fijadas en 10%

de acetato de plomo, y de acuerdo con la técnica usual. La inclusión en metacrilato destruyó estas células, de modo que fue necesario una post-fijación en (a) 5% acetato de plomo en 10% formal o (b) idem en 2% OsO_4 . Como "controleres" se usó la fijación en formal y OsO_4 y entiendo por completo el acetato de plomo. Los resultados señalaron que el fosfato de plomo precipita en una forma muy homogénea dentro de la masa nucleolar y no hay evidencia de precipitados gruesos (Figs. ¹¹ y ¹²). Las vacuolas dentro del nucleolo aparecen libres de Pb. Si asumimos que las imágenes observadas con el electrónico reflejan fielmente la distribución in vivo de los iones ortofosfato dentro del nucleolo, entonces estos están también distribuidos en forma homogénea. Las estructuras observadas en el nucleolo (ribosomas, etc.) están como embebidas en los iones difusos en la densa sustancia nucleolar. El mayor contraste obtenido con el OsO_4 que con el formal se debe a una adicional coloración de proteínas.

En estos cortes hemos observado un fenómeno curioso: los nucleolos aparecen casi siempre fuera del núcleo con lo que al principio dudáramos en su identificación citológica. Observando al microscopio óptico cortes de 0.5μ de espesor notamos el mismo hecho. La explicación reside en que la densidad de estos nucleolos es muy elevada (por el precipitado de fosfato de plomo) con respecto al resto del núcleo, lo que les hace saltar hacia afuera al cortar la cuchilla. Fenómenos semejantes se conocen en la literatura cuando aparecen cristales inorgánicos u orgánicos de mayor densidad que el protoplasma. (Harcor, 1959).

Demuestra que la reacción citoquímica del acetato de plomo no es un artefacto de difusión; es evidente que el acetato de plomo es capaz de precipitar los iones fosfato dentro de las células; es también evidente que la habilidad de precipitar estos iones dentro del núcleo es característica del nucleolo. Sin embargo podría pensarse en duda de si el denso precipitado observado en los nucleolos del material fijado reproduce la distribución in vivo del ortofosfato o bien es un artefacto de difusión de la técnica empleada. Para demostrar que la primera aseveración es la correcta describiremos primeramente unos experimentos sencillos:

Determinaciones químicas cuantitativas indican que el tiempo necesario para obtener una precipitación completa del ortofosfato de las raicillas de cebolla es de 3 horas con una solución 0.25 M de acetato de plomo (AcPb) y de 2 horas con una solución de 2% de ácido ascórtico en AcPb (fijador ascórtico- AcPb). La observación directa bajo el microscopio de las raicillas sumergidas en el fijador mostraron que las primeras precipitaciones nucleolares aparecen aproximadamente a los 10 minutos y en las células situadas cerca del área cortada e en la periferia de la raíz.

Si se interrumpe la fijación transfiriendo las raicillas a un gran volumen de agua destilada, el resultado es la formación de precipitado granular de

fosfato de plomo intranuclear, y sin localización precisa; es evidente que estos gránulos representan artificios de difusión (Fig. 23). Estos tipos de núcleos son mas frecuentes si se interrumpe la fijación a la hora, mientras que despues de 2 3 3 horas el precipitado está generalmente limitado a los nucleolos.

La extracción completa del fosfato de las raicillas con ácido acético al 2% requiere aproximadamente una hora. Fijando con acético-AcPb en diferentes tiempos podemos observar que es lo que pasa con los iones fosfato que están difundidos fuera de las células. Los resultados mostraron otra vez el tipo de núcleos de la Fig. 23. Como era de esperar el número de núcleos con localización nucleolar exclusiva era mayor cuanto menor era el pretratamiento con ácido acético al 2%, y despues de una hora ya no se forma ningún precipitado dentro del tejido.

Raicillas de cebolla pueden ser pretratadas (3 horas) con varios reactivos disueltos en agua destilada y en una amplia gama de concentraciones sin alterar mayormente el contenido en ortofosfato de los nucleolos. Se incluye aqui: urea, fluoruro de sodio, ácido acético, cianuro de potasio y ferricianuro de potasio. Estas sustancias tambien pueden ser agregadas al fijador (AcPb) sin afectar los resultados. Debe incluirse aqui ácido picrico (-picrate de plomo mas ácido acético) y ácido nítrico (AcPb, ácido acético y nitrito de sodio, 1 -4°C). Pero por otra parte un pretratamiento con solventes orgánicos (fase acuosa) como ser n-butanal, cloroforme e éter etílico, así como tambien OsO_4 al 1%, extraen grandes cantidades de fosfato inorgánico y la reacción de precipitación nucleolar no se produce. Es interesante que con OsO_4 la difusión del ortofosfato pueda ser tan rápida que el acetato de plomo sea incapaz de precipitarlo al nivel intracelular; fijando en AcPb conteniendo 1% OsO_4 una nube de fosfato de plomo se forma inmediatamente en el frasco del fijador.

Interpretación y Conclusiones: (1) La localización del ortofosfato con el acetato de plomo no es un artificio de técnica pues: (a) resulta evidente que el Pb es capaz de precipitar fosfato inorgánico dentro de todo el núcleo (Fig. 23). No hay razón entonces de por que lo ha de hacer sólo en el nucleolo. (b) En el fijador acético-AcPb ambos componentes deben alcanzar el nucleolo al mismo tiempo, pues si el ácido acético lo hace primero (iones H^+ mas pequeños que Pb^{++}) extraería ortofosfato del nucleolo y sería de esperar entonces un tipo de precipitado de la Fig. (este es, como en el pretratamiento con 2% ácido acético). Este simple experimento hace muy improbable que ocurra una difusión artificial del ortofosfato celular hacia los nucleolos durante la fijación en Pb: el ortofosfato que ha difundido al núcleo (porción extranucleolar, Fig. 23) no difunde dentro del nucleolo al completarse la fijación. La conclusión natural es que el origen del ortofosfato extranucleolar de la Fig. 23 es el nucleolo mismo. Esta interpretación está refer-

sada por el hecho, ya mencionado, de que no se produce ninguna precipitación de Pb en el área nuclear en aquellos estadios de la mitosis y meiosis en los que el nucleolo se halla ausente.

(2) El ortofosfato nucleolar representa una forma "combinada" de estos iones, señalándose que la unión es de tipo física y no química. Esta posibilidad surge si se considera que el AcPb no causa la difusión del ortofosfato, mientras que si lo hace mezclade con sustancias que no afectan su precipitación en el tubo de ensayo. Siendo los solventes orgánicos muy efectivos en provocar la difusión parecería que los lípidos intervienen en mantener la unión física de los iones ortofosfato dentro del nucleolo. Esta idea surge independientemente si se considera el éxito de una técnica aparentemente imposible (precipitación de un ión fácilmente difusible con estre mayor y lento, véase por ejemplo discusión en Lison, 1953), y la ausencia de una verdadera membrana nucleolar. Desconocemos la forma exacta en que se produce la retención del ortofosfato en el nucleolo in vivo. Debemos tal vez aceptar que esta unión es distinta en los diversos tejidos y células; en los casos aquí descritos parece ser bastante resistente al Pb, lo que permite su localización. En los casos que el nucleolo no reacciona positivamente es de suponer que el Pb provoca una rápida difusión de los iones ortofosfato y no aparece entonces ninguna precipitación intracelular.

Una reacción negativa no debe interpretarse en citología como prueba de ausencia de la sustancia en cuestión. El grado de dispersión (concentración) puede afectar marcadamente su visualización. Esto significa, en el presente caso, que si la concentración de iones ortofosfato es mucho mayor en el nucleolo que en el citoplasma, la localización citológica será hallada en el nucleolo solamente, aun cuando esta fracción sea cuantitativamente pequeña comparada con el ortofosfato total de la célula entera.

D. Metabolismo del RNA en el nucleolo. Comportamiento peculiar del fosfato radioactivo (P^{32}O_4) en diversos tipos de células. El pool de ortofosfato nucleolar precursora del RNA nucleolar.

Estudios autoradiográficos efectuados con P^{32} -ortofosfato y ribonucleósidos radioactivos en glándulas salivares de Dípteros (Taylor et al., 1955; Mc Master-Kaye, 1960), ovocitos de Anfibios (Ploq, 1955) y Asterias (Vincent et al., 1960) y en el alga verde Acetabularia (Blumling et al., 1956; Olaszewska et al., 1961) revelaron que ambos precursores son rápidamente incorporados en el RNA nucleolar. Sin embargo Pálo et al. (1950) observaron en fibroblastos de pollo que el nucleolo no incorporaba P^{32} . Este contraste en la utilización de ambos precursores en estas células fué aparentemente desapercibido por autores posteriores. Se demostrará que en ciertos tipos

de células el RNA molecular es menos accesible al fosfato que a los ribonucleósidos.

Material y métodos: Meristemas de raicillas de Allium cepa, Zea mays, Vicia faba y Pisum sativum; así explantes de embriones de pollo, los que al final del cultivo en medio radiactivo alcanzaron los estadios desde línea primitiva a procesos cefálicos. Las raicillas fueron sumergidas en agua a 22-25°C y los explantes cultivados en albuman a 37.5°C (How, 1955), conteniendo uno de los siguientes isótopos: $P^{32}O_4$ (Radiochemical Centre, 0.15 a 0.85 mC/mg P total, en solución salina isotónica pH 7), 15 - 30 μ C/ml; (H^3)-guanocina (Radiochemical Centre, 4.65 y 400 mC/mM) e (H^3)-citidina (Schwarz BioResearch, 10/mM), 10 - 30 μ C/ml. La fijación se efectuó en Carnoy frío (ácido acético: etanol; 1:3), y se obtuvieron cortes parafinados en la forma usual (2 - 4 μ de espesor). Las autoradiografías se realizaron con la emulsión Kodak AR.10 "stripping film" en la forma usual (Pearce, 1961). Después del revelado y fijado, las células fueron coloreadas a través de la emulsión con pironina-verde de metilo. La resolución obtenida con P^{32} es lógicamente menor que con H^3 . Los nucleolos de los tejidos empleados tienen un tamaño de 4 a 6 μ estando por consiguiente dentro de la máxima resolución obtenible con P^{32} que es de 2 a 3 μ (Lamerten et al., 1954; Pale, 1958).

Para hidrolizar el RNA se utilizó la ribonucleasa (Light, 5X cristalina, 0.5 mg/ml en agua destilada pH 6.0 - 6.5), una hora a 37°C, seguida por 5% ácido tricloroacético (4°C), 5 minutos y agua destilada. Los controles se trataron de la misma manera pero omitiendo la enzima.

Resultados:

(a) Distribución de (H^3) ribonucleósidos en el RNA celular: La distribución de radiactividad es la misma para citidina y guanocina en los meristemas de raicillas y de acuerdo a lo descrito por Weede (1959). La incorporación es principalmente en el RNA y que la radiactividad se elimina totalmente con la ribonucleasa. La incorporación en el RNA molecular es a las 1.5 horas de incubación mucho mayor en el nucleolo cuando utilizamos la guanocina de alta actividad específica (Fig. 17). A las 6 horas el RNA del citoplasma se halla fuertemente marcado, y un porcentaje de nucleos interfásicos señala la aparición de (H^3)-DNA en la cromatina.

Con la guanocina de baja actividad específica la mayor incorporación en los nucleolos aparece a las 4 horas de incubación y luego aumenta proporcionalmente en toda la célula.

La aplicación del método de Yu y Zamochnik (1960) a los cortes histológicos no elimina apreciablemente al isótopo, lo que indica que muy probablemente los nucleósidos no se han incorporado al RNA en forma terminal únicamente. La incorporación de ribonucleósidos (H^3) en embriones de pollo muestra una semejante distribución en sus RNA al de raicillas, y ha sido estudiada en detalle por Pather et al. (1961).

Distribución de $P^{32}O_4$ en el RNA celular. Raicillas de cebolla cultivadas por

espacio de 1.5 a 24 horas acumulan progresivamente P^{32} en la cromatina y citoplasma pero no en los nucleolos. Después de 48 horas la ausencia de autoradiografía -o la presencia de unos pocos granos de plata- es aun el hecho mas notable (Fig. 18).

Estas débiles autoradiografías sobre el nucleolo no pueden ser atribuidas con precisión al nucleolo per se, pues pueden provenir de la cromatina que lo rodea (por el fenómeno del "cross fire").

La misma distribución de P^{32} fué observada en raicillas de las otras plantas (24 horas) y en embriones de pollo (12-18 horas). La Tabla IV muestra el resultado de un análisis cuantitativo obtenido por conteo de los granos de plata (descontando los granos que aparecen en el "background", fuera de los tejidos). A las 6 horas de incubación la mayor parte del P^{32} en los nucleos interfásicos está presente en un producto ácido-insoluble y lábil a la ribonucleasa, este es, en RNA- P^{32} . A las 12 horas, el conteo de los granos en secciones adyacentes de tejido tratadas con la enzima mostraron el siguiente porcentaje (%) de cuentas que han sido removidas y atribuibles a RNA- P^{32} : nucleolo 100% (las cuentas no son significativas, Tabla IV), cromatina 47 ± 28 y citoplasma 107 ± 18 . Estos datos señalan que mientras el nucleolo no se marca significativamente, el RNA- P^{32} citoplásmico aumenta continuamente en radioactividad y en todo momento sobrepasa al isótopo en el RNA nuclear (numero de granos por unidad de area). Como la concentración de RNA es igual o algo mayor en el nucleolo que en el citoplasma (Woodward et al., 1961), esto significa que la actividad específica del RNA- P^{32} citoplásmico es significativamente mucho mayor que la del nucleolo. Los datos de la Tabla IV da las siguientes relaciones de cuentas totales del RNA- P^{32} por sección (citoplasma: nucleolo): 130:1, 90:1 y 100:1 a las 12, 24 y 48 horas de incubación respectivamente. Estas proporciones serian aun mayores si fueran basadas en el volumen de las estructuras celulares y por otra parte son valores mínimos ya que las cuentas del nucleolo no son significativas.

Usando estos datos y los valores publicados para la concentración de RNA (Woodward et al., 1961) se calculó que los RNA del citoplasma y cromatina alcanzan la misma actividad específica relativa a las 12 horas de incubación, lo que está de acuerdo a lo observado por Tse et al. (1959). La fracción de P^{32} resistente a la ribonucleasa, mostrada sólo por un porcentaje de nucleos interfásicos a las 6 horas y aumentando continuamente a las 12-48 horas, es atribuible a RNA- P^{32} . El aumento y variación de las cuentas a las 24 y 48 horas (Tabla IV) representa un aumento considerable de este RNA a través de las mitosis (el tiempo medio de generación es 24 horas, Mc.Made et al., 1956).

No se observaron cambios cualitativos en las autoradiografías por extracción de las secciones con 5% ácido tricloroacético frío o con éter, etanol (1:3) e ebullición. Para evitar el agotamiento de P^{32} , el medio de incubación (50 -

100 ml) fué reencapsulado, cada 12 horas (15 -30 μ C/ml); los resultados no difirieron de los ya descritos.

Para eliminar la posibilidad de un efecto de radiación debido al P^{32} las raicillas fueron incubadas 24 horas en $P^{32}O_4$ y luego en $P^{32}O_4$ conteniendo (H^3)-guanosina por 1.5 y 6 horas adicionales. Los cortes fueron conservados en la heladera durante 3 meses: este hecho que la radiactividad del P^{32} decae a un 1.5% de la radiactividad original mientras que no afecta apreciablemente al H^3 . La Fig. 17 muestra que la distribución de la guanosina es idéntica que si se ofrece sin el tratamiento previo con P^{32} . De aquí resulta que los nucleos no se hallan dañados y que la falta de autoradiografía molecular con P^{32} no se debe a una inactivación en su metabolismo. Por otra parte los tejidos han crecido (largo de la raicilla) y diferenciado (embrión de pollo) en P^{32} .

Distribución de $P^{32}O_4$ en el ortofosfato celular: El comportamiento sorprendente del RNA molecular utilizando como precursor al P^{32} y en aparente contradicción a los precursores orgánicos sugiere, como primera explicación, la presencia de un pool de fosfatos en el nucleolo. Hemos ya señalado en el capítulo (D) la existencia de un pool de ortofosfato molecular, demostrado por fijación en acetato de plomo. De aquí que esta técnica se preste para la verificación experimental de esta hipótesis. El período de incubación con $P^{32}O_4$ es el mismo que en los experimentos anteriores, pero usando ahora la fijación en 10% acetato de plomo (1 -4°C). Una serie de cortes fueron tratados con ácido tricloroacético al 5% (1 -4°C), 15 minutos, que elimina los fosfatos ácido-solubles. La otra serie de cortes fueron sólo lavados con agua destilada. La diferencia entre ambas autoradiografías revela la radiactividad debida a fosfatos ácido-solubles (y precipitables con Pb). Como en estas raicillas el 60 -65% del fosfato total ácido-soluble es debida al ortofosfato (vease el capítulo D), la radiactividad observada la atribuimos principalmente a esta fracción.

Es de hacer notar que existe una fuente de error en nuestro procedimiento: la coprecipitación de $P^{32}O_4$ durante la fijación en acetato de plomo. De aquí que un resultado positivo debe interpretarse con cautela. Sin embargo los resultados señalan que, a pesar de este riesgo, los nucleos son generalmente las estructuras menos radiactivas de las células fijadas en Pb. Este fijador retiene en forma efímera grandes cantidades de P^{32} , tal como se observa en las autoradiografías y comparando con aquellas en las que se realizó la extracción con ácido tricloroacético. Debido a la elevada concentración de ortofosfato en el nucleolo estos datos señalan que este fosfato inorgánico tiene una baja actividad específica. Este comportamiento, junto con la evidencia citológica presentada anteriormente (en capítulo D) de que los iones ortofosfato se hallan "combinados" físicamente dentro del

nucleolo, indicarían que el pool nucleolar es relativamente impermeable al fosfato extramoleolar. Resulta evidente entonces la baja actividad específica del $P^{32}O_4$ y RNA- P^{32} nucleolares; este comportamiento similar en ambas fracciones fosforadas señala que el ortofosfato nucleolar se comporta como si fuera el precursor fosforado del RNA nucleolar (y viceversa).

Interpretación y conclusiones: debemos hacer notar claramente que, como en todos los experimentos de autoradiografía, los datos cuantitativos son relativos. La ausencia de granes de plata en los autoradiogramas de nucleolos no indica la ausencia total del P^{32} . La corta exposición empleada hizo necesario un sacrificio de la parte cuantitativa absoluta en favor de la resolución citológica. Pero lo que sí es evidente es el hallazgo de que el RNA citoplásmico se marca antes que el nucleolo, y en forma apreciable, lo que está en manifiesto contraste con el comportamiento de otros precursores (ribonucleósidos, purinas y pirimidinas).

En las células estudiadas por nosotros, la incorporación nucleolar de P^{32} es la más baja de todas las estructuras celulares y el citoplasma incorpora antes que el nucleolo. La incorporación de ribonucleósidos (H^3 & C^{14}) en el nucleolo es rápida (y su retención pobre, Woods 1959 y otros antes ya citados en IIb), es la más elevada de todas las estructuras celulares y ocurre antes que la incorporación citoplásmica.

Este tipo diferencial de marcaje no ocurre en otros tipos de células. En glándulas salivares de Dípteros (Taylor, 1955; McMaster-Faye, 1960), en oocitos de estrella de mar (Fieg, 1955; Vincent, 1960) y en el alga Acetabularia (Helmreich et al., 1956) los nucleolos incorporan rápidamente P^{32} , al igual que otros precursores. Se muestra parecer que una diferencia significativa es la de que estas células -y sus nucleolos- crecen continuamente durante interfase. En las células estudiadas por nosotros el crecimiento del nucleolo está principalmente limitado al período telofase - interfase temprana, y consiste en la organización por fusión progresiva del material pronucleolar (véase parte B de esta tesis). Como indicáramos anteriormente, existen evidencias concretas de que la sustancia nucleolar aparece en el citoplasma durante la metafase y se reutiliza en los nucleolos de las células hijas (Harris, 1961; Swanson Beck, 1962). Lo mismo parece ser válido para el RNA (Martin, 1961), y bien podría ser para el ortofosfato nucleolar (mas posiblemente para su presunto precursor fosforado macromoleolar). Por supuesto, toda la sustancia nucleolar incluyendo el RNA, deberá reemplazarse totalmente después de varias divisiones celulares; en el presente experimento sólo se han seguido como máximo dos (48 horas).

Los ribonucleósidos- (H^3) deben ser fosforilados (a nucleósido di- y trifosfatos) para entrar en la molécula del RNA; de otro modo sería imposible la síntesis de RNA- H^3 . Siendo el fosfato nucleolar -tanto en el RNA como en el ortofosfato- relativamente inaccesible al P^{32} se sugiere que es este ortofosfato nucleolar el que es utilizado para fosforilar los ribonucleósidos externos. En otras palabras, en el turnover (síntesis y degradación) del RNA el

el nucleolo utiliza preferentemente los ribonucleótidos efrecidos (tal vez el pool de nucleótidos nucleolares es pequeño, permeable y se satura rápidamente) y el ortofosfato propio (al pool es grande y relativamente impermeable).

Es de interés mencionar que también las células arriba mencionadas que incorporan rápidamente P^{32} en el RNA nucleolar tienen al pool de fosfatos fácilmente solubles en el nucleolo. El porqué de las diferencias anotadas en el marcaje del RNA- P^{32} en distintas células es difícil de contestar; de todas maneras deberíamos conocer la cantidad de cada especie de RNA en estos nucleolos (ribosomal, transfer y messenger)

, cosa que por ahora es desconocida. Es posible que estos tres RNA (y cada uno de ellos es un heterogéneo) muestren una cinética de marcaje diferente. El comportamiento del RNA- P^{32} en las células aquí estudiadas incide en algunas hipótesis publicadas por diversos autores en cuanto a la función del nucleolo: (1) Sugiere que no existe una masiva contribución del RNA cromosomal al nucleolo (Woods, 1959; Rho et al., 1961), ya que la alta actividad específica del primario (como RNA- P^{32}) no se la halla en el RNA nucleolar. Obviamente no descarta una pequeña -pero importante- contribución del RNA cromosomal (Sirlin et al., 1962). (2) Se ha propuesto, de acuerdo a la composición (Edström et al., 1961) y otros parámetros moleculares (Perry, 1962) que el nucleolo suministra RNA ribosomal al citoplasma. Sin embargo, en las células ^{aquí} estudiadas un suministro total de este tipo de RNA es improbable: la actividad específica (y cuenta total) del RNA- P^{32} en el citoplasma es siempre mucho mayor que en el nucleolo. Debemos hacer notar que la identificación citoquímica del RNA con la ribonucleasa no constituye un criterio bioquímico riguroso. Sin embargo aun cuando una gran parte del P^{32} citoplásmico no está presente en RNA, sino en algún otro compuesto transformado en fácilmente soluble por la enzima, las presentes conclusiones son aun válidas. La radioactividad observada en el citoplasma puede ser tomada como representativa del RNA- P^{32} ribosomal ya que este representa la mayor parte del RNA citoplásmico (T'ao et al., 1959). De modo que, a menos que la síntesis de RNA del citoplasma sea completamente independiente del nucleolo, parece depender mas del RNA cromosomal que del nucleolar.

En cambio nucleolos aislados de raicillas de arveja contienen 56% de transfer RNA y 44% de RNA ribosomal (Birnstiel et al., 1963). Es decir, que difieren apreciablemente del contenido en transfer RNA del citoplasma (10-20%).

Es probable que el RNA- P^{32} de alta actividad específica observado en epicotiledos de arveja por T'ao et al. (1959) corresponda especialmente al cromosomal, y en mucho menor grado al RNA nucleolar.

7. Demostración de la enzima RNA-metilasa en el nucleolo y la presencia de transfer RNA. Empleo de la metionina marcada en el grupo metilo ($-C^{14}H_3$).

Entre los RNA del nucleolo se han descrito: transfer RNA (Vincent et al., 1960; Birnstiel et al., 1963), RNA ribosomal (Mastrin et al., 1961; Birnstiel et al., 1963) y un RNA con las características del messenger (Sirlin et al., 1962; "fracción molecular" de Shibata et al., 1962).

El transfer RNA contiene, a diferencia de los otros RNA, componentes menores entre los cuales figuran las bases metiladas (Dunn, 1959). Fleissner et al. (1962) hallaron en Escherichia coli que el transfer RNA se metila al nivel de polinucleótido, utilizando la metionina como dador del grupo metilo. Estos autores usaron la metionina marcada en el carbono del grupo metilo ($-C^{14}H_3$) y purificaron la enzima correspondiente, a la que designaron con el nombre de RNA-metilasa. Biswas et al. (1961) observaron también que el metilo de la metionina es el precursor de los grupos metilo del transfer RNA en células de tumor ascítico. Estos hallazgos nos han llevado a emplear la metionina $-C^{14}H_3$ en combinación con la autoradiografía de alta resolución.

Material y métodos: se utilizaron glándulas salivares de Spittia sp. y de Drosophila virilis, incubadas in vitro con el isótopo en el medio de cultivo 199 (Glaxo Laboratories Ltd.) y a 29-30°C.

La incubación es interrumpida agregando un volumen aproximadamente igual de ácido tricloroacético al 10%. Las glándulas son fijadas inmediatamente en una solución de este ácido al 5% (20 minutos). Se realizan "squashes" en ácido acético al 45%. Todas las soluciones contenían 1,37% de acetato de lantano y estaban a 1-4°C (Sirlin et al., 1961).

Los siguientes radioisótopos han sido empleados, todos comprados en Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra: (H^3)-uridina 62 mCi/m mol; L (metil- C^{14})-metionina 18.3 mCi/m mol y L (S^{35})-metionina 20 mCi/m mol. Todos fueron empleados en una concentración de 50 μ Ci/ml y por 30 minutos. El antibiótico purmicina (Stylenycin) fue un obsequio de las laboratorios Lederle; se utilizó en una concentración de 250 μ g/ml.

Los siguientes procedimientos citoquímicos fueron empleados: ribonucleasa (Light & Co., Ltd., cristalizada 5 veces) en una concentración de 0.2 mg/ml en buffer barbiturato de sodio-acetato de sodio (sin NaCl), pH 7, 15 minutos a 37°C. Las preparaciones hidrolizadas por la enzima fueron tratadas luego 5 minutos con ácido tricloroacético al 5%, a 1-4°C y finalmente lavadas con agua destilada.

Para eliminar la metionina unida como tal al transfer RNA se sumergieron las preparaciones, 30 minutos a 37°C, en una solución 0.005 N de NaOH o 1.3 N de hidroxilamina en metanol. Este último reactivo se preparó disolviendo clorhidrato de hidroxilamina en metanol, ajustando a pH 7.7 con NaOH concentrado, y dejando reposar la solución en la heladera para que precipite al se usa el sobrenadante. Después de estos tratamientos se pasan las preparaciones

a metanol absoluto (dos lavados, 5 minutos cada vez), luego a la solución de ácido tricloroacético al 5% (1-4°C), 5 minutos y finalmente a agua destilada. Estos procedimientos son idénticos a los empleados en la bioquímica excepto que se han adaptado a la citología reemplazando al solvente acuoso con el metanol a fin de mantener intactas las estructuras celulares. El Dr. J.O. Bishop determinó gentilmente a nuestro pedido que el metanol-NaOH liberaba 92% de la radioactividad de una muestra de (C^{14})-leucina-transfer RNA de levadura (2230 cuentas/minuto) en 30 minutos a 37°C.

Las preparaciones fueron coloradas con pironina-verde metilo y las tratadas con ribonucleasa examinadas con el microscopio de contraste de fase.

Cromatografía: Las glándulas radiactivas fueron subergidas en ácido tricloroacético al 1% (1-4°C), centrifugadas (repetiéndose una vez mas este proceso) y conservadas a -15°C. El centrifugado, constituido por las glándulas radiactivas fué sometido a la hidrólisis alcalina con solución 1 M de piperidina, 40 horas a 60°C (Crestfield et al., 1957). Se realizaron cromatogramas ascendentes con papel Whatman N° 1 usando el método de Littlefield et al. (1958), con isopropanol: agua destilada (70:30 v/v) y vapores de amoníaco. Las sustancias de referencia fueron los 2,3'-ribonucleótidos de timina y 6-metil-aminopurina preparados de transfer RNA de levadura y gentilmente obsequiados por el Dr. D.B. Dunn (Cambridge). El cromatograma (que se corrió poniendo en el punto de origen el hidrolizado de las glándulas y las sustancias de referencia) se observó a la luz ultravioleta filtrada (pico de emisión a 257 m μ) para localizar los ribonucleótidos metilados de referencia, que estaban situados a 16.8 -18.2 centímetros del origen. El cromatograma fué cortado en 16 franjas de 2.5 cms cada una, numeradas y puestas en recipientes con un líquido "phosphor" (NE 213, Nuclear Enterprises Ltd., Inglaterra) y medidas las radioactividades con un detector tipo "liquid scintillation" (Type 6012 A; Isotope Development Ltd., Reading, Berks). Se midieron los impulsos durante 100 y 400 segundos, sustrayendo la emisión de fondo.

Resultados: Los nucleolos de las glándulas salivares incorporan fuertemente los ribonucleótidos marcados. La Fig. 21 representa al nucleolo y cromosomas de *Smittia* marcados en el RNA con (H^3)-uridina.

La distribución de la radioactividad para (metil- C^{14})-metionina está ilustrada en la Fig. 19. Aparece principalmente en proteínas y es intensa tanto en el citoplasma como en el nucleolo. Si la incubación se efectúa en presencia de la pamicina, antibiótico que inhibe la síntesis proteica (Yarmolinsky et al., 1959), observamos que en contraposición al citoplasma la radioactividad del nucleolo permanece inalterada (Fig. 20).

Esta radioactividad es ahora completamente eliminada por la ribonucleasa, lo que indica que muy probablemente está en el RNA.

La pamicina no interfiere con la combinación del aminoácido al transfer RNA (Yarmolinsky et al., 1959). La radioactividad de los nucleos no se debe a la metionil-transfer RNA ya que no es eliminada en absoluto por tratamiento con álcali o hidroxilamina (versee métodos).

Queda por demostrar que la radioactividad se halla realmente en las bases metiladas del RNA. Para esto fin se hizo una incubación en masa de 55 pares de glándulas con (metil- C^{14})-metionina, 100μ g/ml y pamicina (300μ g/ml), durante 30 minutos. Las glándulas se sometieron al proceso de hidrólisis y cromatografía indicado en métodos. El resultado está indicado en la Fig. 24.

La mayor radioactividad corresponde al Rf obtenido con los 2,3'-ribonucleótidos de timina y 6-metil-aminopurina. Una radioactividad menor la da la zona en la que se hallan presentes los 2,3'-fosfatos de metilcitidina, metilguanina y metiladenina junto con los 2,3'-fosfatos de citidina, uridina y adenina. La región cerca del origen corresponde al 2,3'-fosfato de guanina y no muestra radioactividad apreciable. El pico de actividad observado cerca del frente del solvente corresponde posiblemente a la metionina misma. Estos resultados confirman que el grupo metilo de la metionina ha sido transferido como tal al RNA.

Como correlario se deduce que la enzima RNA-metilasa está presente en el nucleolo, ya que es esta la única estructura radiactiva en ciertos tiempos de incubación.

Es de señalar que, como era de esperarse, con la metionina marcada solamente en el átomo de azufre (S^{35}) no aparece radioactividad en el RNA nucleolar. Se concluye que el grupo metilo de la metionina es transferido, por medio de la RNA-metilasa del nucleolo, al RNA presente en el mismo nucleolo. Esta metilación representa un aspecto de la síntesis del transfer-RNA ya que es sólo esta especie de RNA la que posee bases metiladas.

F. Relación entre el organizador nucleolar y el RNA nucleolar.

Ya nos hemos referido al problema de la relación del nucleolo con el organizador nucleolar en el capítulo (B) al estudiar el origen del nucleolo.

Las glándulas salivares del género *Eristalis* (Diptera) representan un material muy favorable para el estudio de esta relación por la disposición espacial de ambas estructuras (Sirlin, 1962). Estudios autoradiográficos con precursores tritizados del RNA (H^3 -ribonucleósidos) indicaron que el RNA- H^3 aparece inicialmente en el centro de estos nucleolos y alrededor del organizador nucleolar pero no aparece dentro del organizador (Fig. 21); posteriormente todo el nucleolo contiene RNA- H^3 (Sirlin, 1962). La conclusión lógica es que el RNA nucleolar es sintetizado en el nucleolo mismo y no en el organizador.

El organizador incorpora ribonucleósidos aproximadamente en la misma proporción que las otras regiones cromosómicas y ab initio el nucleolo se marca

mas fuertemente.

La proflavina (1.4×10^{-5} M) en oscuridad, inhibe totalmente la síntesis de RNA nucleolar (incorporación de H^3 -uridina ó H^3 -guanocina, $40 \mu\text{g/ml}$) y sólo parcialmente la del RNA cromosomal. El organizador muestra el mismo fenómeno de inhibición parcial que los cromosomas y no una drástica supresión como el nucleolo. De aquí sigue que la inhibición nucleolar no está obligatoriamente explicada por la parcial inhibición del organizador en particular.

La actinomicina D inhibe la síntesis del RNA nucleolar en la misma manera que la proflavina (Sirlin et al., 1962). Galástein et al. (1961) y Journey et al. (1961) señalaron que la actinomicina afecta también la estructura del nucleolo y provoca su fragmentación. Perry (1962) sugirió que la inhibición del RNA nucleolar por la actinomicina podría ser debida a la competencia particular del DNA del organizador. Sin embargo esta explicación no resulta satisfactoria por cuanto la proflavina produce una inhibición similar del RNA nucleolar aunque, contrariamente a la actinomicina, la proflavina no actúa sobre las secuencias de guanina del DNA para afectar la síntesis del RNA dependiente de DNA (Goldberg et al., 1962).

Existen, por otra parte, indicaciones puramente morfológicas que indican que la síntesis del RNA ocurre en el nucleolo mismo y que es dissociable de la síntesis en el organizador. Por ejemplo, esto resulta evidente en los nucleolos libres que no están adheridos al organizador (ovocitos de Anfibios) e en los que no existe organizador nucleolar (glándulas salivares de Solifugas, Jacob et al., 1963).

Durante la mitosis el nucleolo (y RNA nucleolar, Kleinfeld et al., 1958) no reaparece únicamente en contacto con el organizador como cabría esperar si sólo el organizador sintetizara la sustancia (y RNA) nucleolar. Por el contrario el organizador reúne, por fusión, la sustancia nucleolar (cuerpos prenucleolares) dispersa en el nucleolo telofásico (véase capítulo B).

Estos hechos, junto con la evidencia obtenida en Spizella sp sugieren que el organizador tiene exclusivamente un papel de colector -de organizador- del RNA y de la sustancia nucleolar, pero no de su síntesis exclusiva.

Una conclusión opuesta ha sido señalada en Chironomus tentans por Pelling (1962). Pero en este material el nucleolo está penetrado por las fibras de DNA del organizador, tal como lo indican las coloraciones e la autoradiografía con H^3 -timidina (Pelling, 1962). Nos parece difícil poder juzgar en estos nucleolos si el RNA sintetizado corresponde a la sustancia nucleolar per se e a las fibras cromosómicas del organizador. Por el contrario, en Spizella sp el DNA del organizador no penetra en el nucleolo (coloración y autoradiografía con H^3 -timidina). Este hecho permite tener la certeza de que el RNA sintetizado corresponde al nucleolo per se y no al organizador nucleolar.

- Alfrey, V.C. 1960 Amino acid activation and transfer to ribonucleic acids in the cell nucleus. en: *The Cell Nucleus*, Butterworths, London, 170-175.
- Alfrey, V.C. y Mirsky, A.E. 1962 Evidence for the complete RNA dependence of RNA synthesis in isolated thymus nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 48: 1590-1596.
- Altman, H.W. 1952 Über den Funktionsformwechsel des Kernes in exokrinen Gewebe des Pankreas. *Zeits. Krebsforsch.*, 58: 632-645.
- Amato, M. y Leblond, C.P. 1960 Comparison of the specific activity curves of ribonucleic acid in chromatin, nucleolus and cytoplasm. *Exp. Cell Research*, 20: 250-253.
- Arney, E.E. 1939 Phosphate fractions in barley seedlings. *Biochem. Jour.*, 33: 1078-1086.
- Baltus, F. 1954 Observations sur le rôle biochimique du nucléole. *Biochim. Biophys. Acta*, 15: 263-267.
- Baltus, F. 1961 *Arch. Int. Physiol.*, 68: 671.
- Bather, R. y Purdie-Pepper, K. 1961 Nucleic acid synthesis and transfer in normal, second generation chick embryo fibroblasts. *Canadian Jour. Biochem. Physiol.*, 39: 1625-1633.
- Bauer, H. 1935 Der Aufbau der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von Chironomus Thummi Kiefer. *Zeit. Zellforsch.*, 23: 280-313
- Beerman, W. 1959 Chromosomal differentiation in insects. en: *Developmental Cytology* (Dorothy Rudnick Ed.) Ronald Press Co., New York, 83-103.
- Bernhard, W. 1958 Ultrastructural aspects of nucleocytoplasmic relationship. *Exp. Cell Research, Suppl.* 6: 17-50.
- Birnatiel, M.L. y Hyde, B.B. 1963 Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *Jour. Cell Biol.*, en prensa.
- Birnatiel, M.L. y Chipchase, M.I.H. 1963 The chemical and physical fractionation of nucleoli. *Federation Proc.*, April 20th.
- Biawas, B.B., Edmonds, M. y Abrams, R. 1961 *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 6: 146.
- Bogoroch, R. y Siegal, R.V. 1961 Some metabolic properties of the nucleolus as demonstrated by recent radioisotope experiments. *Acta Anat.*, 45: 265-287.
- Bopp-Hassentkamp, G. 1960 Weitere Elektronmikroskopische Untersuchungen an pflanzlichen Zellkern während der meiosis. *Zeit. Zellforsch.*, 52: 238-247.
- Brachet, J. 1957 *Biochemical Cytology*, Academic Press, New York.
- Brachet, J. 1950 *Chemical Embryology*, Interscience, New York.
- Brachet, J. 1956 *Les Facteurs de la Croissance Cellulaire. Exposé actualisé de biologie cellulaire*, Masson et Cie., Paris
- Brachet, J y Mirsky, A.E. (Editores) *The Cell* (vol. III) 1961 Academic Press, N. York
- Brooks, L.A., Lawrence, J.C. y Rickets, C.R. 1959 The phosphate esters of mammalian skin maintained on glucose and various deoxyglucoses.

- Biochem. Jour. 73: 566-572.
- Barrows, S., Gryllo, E.L.M. y Harrison, J.S. 1952 Paper chromatography of phosphoric esters. Nature(London), 170: 800-801.
- Carneiro, J. y Leblond, C.P. 1959 Continuous protein synthesis in nuclei shown by radiocautography with H^3 -labelled aminoacids. Science, 129: 391-392.-
- Casperasen, T.O. 1950 Cell growth and cell function. W.W. Norton Co., New York.
- Chèvremont, M. y Firket, H. 1953 Alkaline phosphatase of the nucleus. Intern. Review of Cytol. 2: 261-288.
- Cohen, A. 1957 Electron microscopic observations of Amoeba pruvoti in growth and inanition. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 3: 859-866.
- Crestfield, A.M. y Allen, F.W. 1957 Terminal groups of ribonucleic acids from yeast. Federation Proc., 16: 168-169.
- Das, N.I. 1962 Demonstration of a non-RNA nucleolar fraction by silver staining. Exp. Cell Research, 26: 428-431.
- Das, N.I. y Alfert, M. 1959 Anat. Record, 134: 548-549.
- David, H. 1960 Über einen Nucleolus mit Membran. Zeit. Zellforsch., 53: 50-54.
- De, B.H. 1961 Autoradiographic studies of nucleoprotein metabolism during the division cycle. The Nucleus, 4: 1-24.
- De, P. y Chatterjee 1962 Evidence of nucleolar succinic dehydrogenase activity. Exp. Cell Research, 27: 172-173.
- Dorman, H. 1933 Origin and behaviour of the nucleoli in plants. Jour. Arnold Arboretum Harvard Univ., 14: 282-323.
- Dunn, C.B. 1959 Additional components in ribonucleic acid of rat-liver fractions. Biochim. Biophys. Acta, 34: 286-287.
- Edstrom, J.E. y Michner, D.E. 1958 Relation between nucleolar volume and cell body content of ribonucleic acid in supra-optic neurons. Nature(London), 181: 619-620.
- Edstrom, J.E., Grupp, H. y Leber, M.A. 1961 The intracellular distribution and heterogeneity of ribonucleic acids in starfish oocytes. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 11: 549-557.
- Edwards, T.R., Fischberg, M. y Smith, S. 1958 A mutation that reduces nucleolar number in Xenopus laevis. Exp. Cell Research, 14: 642-643.
- Estable, C. y Setale, J. 1954 The behaviour of the nucleolus during mitosis. en Fine Structure of Cells. P. Noordhoff Ltd., Groningen, Holanda. 170-179.
- Favard, P. 1961 Evolution des ultrastructures cellulaires au cours de la spermatogenese de l'Ascaris (Ascaris megalocephala = Parascaris equorum, (Goerke) Annales des Sciences Naturelles (Zoologie et Biologie Animales) 12^e Serie Tome 3: 55-140. Masson et Cie., Paris
- Feinendegen, L.W., Bond, V.P., Shroove, W.C. y Painter, R.B. 1960 RNA and DNA metabolism in human tissue culture cells studied with tritiated cytidine. Exp. Cell Research, 19: 443-459.
- Floq, A. 1955 Etude autoradiographique du métabolisme des protéines et des

- ácidos nucleicos en el curso de la carcinógenesis en los Batracios. *Exp. Cell Research*, 9: 286-298.
- Picq, A. 1959 La physiologie du nucléole. en *Problèmes d'ultrastructure et de fonctions nucléaires*. (Ed. J.A. Thomas), Masson, Paris. 35-63.
- Fitzgerald, P.J. y Vinijohankul, V. 1959 Nucleic acid metabolism of pancreatic cells as revealed by cytidine- H^3 or thymidine- H^3 . *Lab. Invest.*, 8: 319-330.
- Fleissner, E. y Berek, E. 1962 A new enzyme of RNA synthesis: RNA methylase. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 48: 1199-1203.
- Fontana, F. 1781 *Traité sur le venin de la vipère*. Florence.
- Fritsch, F.E. 1935 *The structure and reproduction of the algae*. Vol. 1. Cambridge University Press.
- Fujii, T. 1954 Presence of zinc in nucleoli and its possible role in mitosis. *Nature (London)*, 174: 1108-1109.
- Gates, H.R. 1942 Nucleoli and related nuclear structures. *Botan. Rev.*, 8: 337-409.
- Geizer, R.L. 1958 Subcultures of adult mammalian brain cortex in vitro. *Exp. Cell Research*, 14: 541-566.
- Goldberg, I.H., Rabinowitz, H. y Reich, S. 1962 Basis of actinomycin action. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 48: 2094-2101.
- Goldstein, L. 1958 Localization of nucleus-specific protein as shown by transplantation in ameba proteus. *Exp. Cell Research*, 15: 635-637.
- Goldstein, L.K., Pfenst, E. y D'Arrigo, J.D. 1961 A fluorescence microscope study of HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D. *Anat. Record*, 139: 231-233.
- Goldstein, L. y Miceu, J. 1959 Nuclear-cytoplasmic relationship in human cells in tissue culture. III. Autoradiographic studies of interrelation of nuclear and cytoplasmic ribonucleic acids. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 301-303.
- Goldstein, L. y Miceu, J. 1959 On the primary site of nuclear RNA synthesis. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 1-5.
- Gomberg, H.J. 1951 A new high-resolution system for autoradiography. *Nucleonics*, 9: 28-43.
- Gonzales Ramirez, J. y Zamiga, M y Ramos, B.A. 1959 Molecular physiology. I. Passage of two different molecular components towards the cytoplasm in living cells. *Boletín del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos (México)*, 17: 51-57.
- Gordon, H.T. 1958 Detection of ultraviolet absorbing spots on paper chromatograms by blueprint paper. *Science*, 128: 414-415.
- Guttes, E., Guttes, S. y Rasch, H.P. 1961 Morphological observations on growth and differentiation of Physarum polycephalum grown in pure culture. *Developmental Biol.*, 3: 588-614.
- Hammerling, J. y Stich, H. 1956 *Einbau und Abbau von $32P$ im Nucleolus (nebst Bemerkung über intra- und extranukleare Proteinsynthese)*. *Zeit. Naturforsch.* 11b: 158-161.

- Harris, H. 1959 Turnover of nuclear and cytoplasmic ribonucleic acid in two types of animal cell, with some further observations on the nucleolus. *Biochem. Jour.*, 73: 362-369.
- Harris, H. 1961 Formation of the nucleolus in animal cells. *Nature (London)*, 190: 1077-1078.
- Heits, E. 1931a Die Ursache der gestimmten Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlichen Nucleolen. *Planta*, 12: 775-844.
- Heits, E. 1931b Nucleolen und Chromosomen in der Gattung Vicia. *Planta*, 15: 495-505.
- Hertl, H. 1957 Zum Nucleolus-Problem, *Zeit. Zellforsch.*, 46: 18-51.
- Jacob, J. y Sirlin, J.L. 1963 *Jour. Cell Biol.*, en prensa.
- Jain, H.K. 1957 Effect of high temperature on meiosis in Lolium: nucleolar inactivation. *Heredity*, 2: 23-26.
- Johnston, F.B., Betterfield, G. y Stern, H. 1959 The isolation of nucleoli from ungerminated pea embryos. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 53-56.
- Journey, L.S. y Goldstein, M.N. 1961 Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D. *Cancer Research*, 21: 929-932.
- King, F.J. 1932 The calorimetric determination of phosphorus. *Biochem. Jour.*, 26: 292-297.
- King, R.C. y Devine, R.L. 1958 Oogenesis in adult Drosophila melanogaster. The submicroscopic morphology of the ovary. *Growth*, 22: 299-326.
- Kleinfeld, R.C. y Haam, E. 1959 Effect of thiocotamide on rat liver regeneration II. Nuclear RNA in mitosis. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 393-396.
- Kodani, M. 1948 Sodium ribose nucleate and mitosis. *Jour. Hered.*, 39: 327-335.
- Kordan, R.A. y Margraten, I. 1962 Nucleo-cytoplasmic relationship in proliferating citrus fruit tissue in vitro. *Life Sciences*, 8: 381-386.
- Kordan, R.A. y Margraten, I. 1963 Transfer of nucleolar material to the cytoplasm of citrus cell. *Exp. Cell Research*, 30: 98-105.
- Kroeger, H., Sirlin, J.L. y Jacob, J. 1963 *Exp. Cell Research*, en prensa.
- La Cour, L.F. y Chayen, J. 1958 A cyclic staining behaviour of the chromosomes during mitosis and meiosis. *Exp. Cell Research*, 14: 462-468.
- La Cour, L.F., Chayen, J. y Gahan, P.S. 1958 Evidence for lipid material in chromosomes. *Exp. Cell Research*, 14: 469-485.
- La Fontaine, J.G. 1958 Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of Vicia faba and Allium cepa. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 777-784.
- La Fontaine y Cheuinard, L.A. 1963 A correlated light and electron microscope study of the nucleolar material during mitosis in Vicia faba. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 17: 167-201.
- Lamerton, L.F. y Harris, S.H. 1954 Resolution and sensitivity in autoradiography. *Jour. Photogr. Sci.*, 2: 135-144.

- Lettré, R. 1955 Fine Structure of Cells, p.141. Noordhoff, Groningen, Holanda.
- Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R. y Uyski, T. 1958 Cytological and cytochemical changes in livers of white mice following intraperitoneal injections of MHC preparations from breast cancers of agouti C3H mice. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash., 44: 700-705.
- Lillie, R.D. 1954 Histopathological Technique and Practical Histochemistry, Blakiston, New York.
- Lin, M. 1955 Chromosomal control of nucleolar composition in maize. Chromosoma, 7: 340-370.
- Lison, L. 1953 Histochemie et Cytochemie Animales. Gauthier-Villars, Paris.
- Litt, J.W., Monty, F.J. y Deanes, A.C. 1952 Isolation and properties of rat liver cell nucleoli. Cancer Research, 12: 279-282.
- Littlefield, J.W. y Dunn, D.E. 1953 The occurrence and distribution of thymine and three methylated-adenine bases in ribonucleic acids from several sources. Biochem. Jour., 70: 642-651.
- Loran, R., Fieq, A. y Errera, M. 1959 The uptake of 8-C¹⁴ adenine and 2-C¹⁴ phenylalanine by rat liver nuclei in vitro. Biochim. Biophys. Acta, 31: 402-408
- Lengwell, A. y Meta, M. 1960 The distribution of cellular material during mitosis. Endeavour, 29: 100-107.
- Lengwell, A.O. y Svihla, G. 1960 Specific chromosomal control of the nucleolus and of the cytoplasm in wheat. Exp. Cell Research, 20: 294-312.
- Leifert, R.J. 1922 The morphology and physiology of the nucleolus. Jour. Roy. Microsc. Societ., 113-150.
- Martin, P.G. 1961 Evidence of the continuity of nucleolar material in mitosis. Nature (London), 190: 1078-1079.
- Matsuzura, H. 1938 Chromosome studies on Trillium kantschaticum Fall. VI. On the nucleolus-chromosome relationship. Cytologia, 9: 55-77.
- Mc Clintock, R. 1934 The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. Zeit. Zellforsch., 21: 294-328.
- Mc Master-Kaye, R. 1960 The metabolic characteristics of nucleolar, chromosomal and cytoplasmic ribonucleic acid in Drosophila salivary glands. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 8: 365-378.
- Mc Master-Kaye, R. y Taylor, J.H. 1958 Evidence for two metabolically distinct types of ribonucleic acid in chromatin and nucleoli. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 5-11.
- Mc Made, R., Friedkin, M. y Atchison, A.A. 1956 Radiation effects of thymidine-2-C¹⁴. Exp. Cell Research, 11: 249-264.
- Marcus, M. 1959 An electron microscopy of Amoeba proteus. Proc. Roy. Soc., 150B: 216-233.
- Montgomery, T.H. 1898 Comparative cytological studies, with special regard to the morphology of the nucleolus. Jour. Roy. Microscop. Soc., 15: 265-582.
- Monty, F.J., Litt, M., Kay, E.H.M. y Deanes, A.C. 1956 Isolation and properties of liver cell nucleoli. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 127-145.

- Merin, G. L., Zajdala, F. y Cesterouse, J. 1957 Metabolic heterogeneity of mouse liver desoxyribonucleic acid. *Exp. Cell Research*, 13: 204-207.
- Malsard, J. 1956 Présence d'inclusions Foulgen-positives dans les nucléoles larvaires de quelques Dipteres. *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 67: 485-498.
- New, D. L. T. 1955 A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Jour. Embryol. Exp. Morphol.*, 3: 326-331.
- Oehlert, W., Schmitze, B. y Haarer, W. 1960 Autoradiographische Untersuchungen sur Frage des Eiweissynthese innerhalb des Kerns und des Cytoplasmas der Zelle. *Beitr. zur pathol. Anat. und Allgem. Pathol.*, 122: 289-318.
- Ohno, S., Kaplan, W. D. y Kinoshita, R. 1956 Concentration of RNA on the heteropycnotic XI bivalent of the rat. *Exp. Cell Research*, 11: 520-526.
- Ohno, S., Kaplan, W. D. y Kinoshita, R. 1957 Heterochromatic regions and nucleolar organizers in chromosomes of the mouse *Mus musculus*. *Exp. Cell Research*, 13: 358-364.
- Okun, T. B. 1940 Extrusion of a nucleolus in toto, found in the ovarian oocytes of *Heletharia gonauria*. *Cytologia*, 10: 545-550.
- Olaszewski, H., de Witry, P. y Brachet, J. 1961 Influence d'irradiations UV localisées sur l'incorporation de l'uridine-³H et de la DL-méthionine-³⁵S dans l'algue *Acetabularia mediterranea*. *Exp. Cell Research*, 24: 58-63.
- Pearce, A. G. F. 1961 *Histochemistry. Theoretical and applied.* Churchill Ltd., London.
- Pale, E. R. 1958 Autoradiography as a cytochemical method, with special reference to C¹⁴ and S³⁵. en *General Cytochemical Methods I* (ed. J. Danielli) 279-316.
- Pale, E. R. y Spear, F. G. 1959 Autoradiography of avian fibroblasts in tissue culture made with P³². *Brit. Jour. Radiol.*, 23: 287-289.
- Pelling, C. 1962 Application of tritiated compounds to the ridge *Chironomus* and some aspects of the metabolism of salivary gland chromosomes. en *Tritium in the Physical and Biological Sciences*, Vol. II: 327-334.
- Perry, R. P. 1960 On the nucleolar and nuclear dependence of cytoplasmic RNA synthesis in HeLa cells. *Exp. Cell Research*, 20: 216-220.
- Perry, R. P. 1962 The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 48: 2169-2180.
- Pollister, A. W. y Leschtenberger, C. 1949 Nucleotide content of the nucleolus. *Nature (London)*, 163: 360-361.
- Pollister, A. W. y Rio, H. 1947 Nucleoprotein determination in cytological preparations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12: 147-157.
- Peert, G. 1961 Electrophoretic comparison of nuclear and nucleolar proteins. I. Beef pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, 46: 373-380. II. Rat pancreas *Biochim. Biophys. Acta*, 51: 236-240.
- Porter, K. A. 1960 4th. Int. Congr. Electron Microscopy, vol 2: 186. Springer, Berlin
- Raven, Ch. P. 1961 *Oogenesis. The storage of developmental information.* Pergamon Press, London.
- Rhe, J. H. y Lerner, J. 1961 The site of RNA synthesis in the isolated nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 47: 1611-1619.
- Schneider, W. C. 1945 Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction :

- estimations of deoxyribose and ribose nucleic acids. *Jour. Biol. Chem.*, 161: 293-303.
- Sibatani, A., Fleet, L.R., Allfrey, V.G. y Mirsky, N.E. 1962 Isolation of a nuclear RNA fraction resembling DNA in its base composition. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 48: 471-476.
- Sirlin, J.L. 1962 The Nucleolus. *Progress in Biophysics and Biophys. Chem.*, 12: 27-66 y 319-326.
- Sirlin, J.L. y Fladale, T.R. 1959 Rates of labelling of RNA and proteins in cell components of the amphibian myoblasts. *Exp. Cell Research*, 18: 268-281.
- Sirlin, J.L., Jacob, J. y Katz, K. 1962 The relation of messenger to molecular RNA. *Exp. Cell Research*, 27: 355-359.
- Sirlin, J.L., Katz, K.I. y Jones, K.F. 1961 Synthesis of ribonucleic acid in the nucleolus. *Biochim. Biophys. Acta*, 48: 421-423.
- Smith, I. 1958 *Chromatographic Technique, Clinical and Biochemical Application.* William Heinemann, Medical Books Ltd., London and Pitman Press, Bath.
- Stenram, U. 1957 Interferometric dry matter determinations on liver nucleoli of protein-fed, protein-deprived, and thyroid-fed rats. *Exp. Cell Research*, 12: 626-632.
- Stenram, U. 1958 Interferometric determinations of the ribose nucleic acid concentration in liver nucleoli of protein-fed and protein-deprived rats. *Exp. Cell Research*, 15: 174-183.
- Stern, H., Johnston, F.B. y Fetterfield, G. 1959 Some chemical properties of isolated pea nucleoli. *Jour. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 57-60.
- Stich, H. 1956 Bau und Funktion des Nucleolus. *Experientia*, 12: 7-14.
- Stich, H. y Hammerling, J. 1953 Einbau von ^{32}P in die Nucleolarnucleinsäure des Zellkernes von *Acetabularia mediterranea*. *Zeit. Naturforsch.*, 8b: 329-333.
- Stevens, B.J. 1961 Fine structure of nucleolar formation during mitosis. Abstracts Int. Annual Meeting Amer. Soc. Cell Biol., p. 206.
- Stöcker, T. 1962 Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonucleinsäure- und Eiweißsynthese im Nucleolus. *Zeitschrift für Zellforschung*, 57: 145-171.
- Steinkinger, L. 1953 Der Kernkörperchen. *Protoplasma*, 42: 365-413.
- Snead, B. 1956 Behaviour of the nucleoli in *Phaedonassa gemelli*. *Exp. Cell Research*, 10: 78-87.
- Sun, C.M. 1961 The occurrence of dense granules of unknown function in the nucleoli of certain plant cells. *Exp. Cell Research*, 25: 214-215.
- Swanson Beck, J. The behaviour of certain nuclear antigens in mitosis. 1962. *Exp. Cell Research*, 28: 406-418.
- Swift, H. 1959 Studies on nucleolar function. *Symposium on Molecular Biology* (ed., R.W. Zirkle), 266-303. University of Chicago Press.
- Tandler, C.J. 1951 Empleo del método de plomo como reactivo citoquímico. *Ciencia e Investigación*, 9: 427-428.

- Tandler, C.J. 1959 an alkali-formaldehyde squash technic for plant cytology and cytochemistry. *Stain Technol.*, 34: 234-236.
- Tandler, C.J. 1962 Bound inclusions in Acetabularia. *Planta*, 59: 91-107.
- Taylor, J.H. 1957 The time and mode of chromosome duplication. *Amer. Naturalist*, 91: 209-221.
- Taylor, J.H. 1960 Nucleic acid synthesis in relation to the cell division cycle. *Ann. New York Acad. Sci.*, 90: 409-421.
- Taylor, J.H., McMaster-hay, R.D. y Galyna, M.F. 1955 Autoradiographic study of P^{32} incorporation into ribonucleic acid at the intracellular level. *Exp. Cell Research*, 9: 460-473.
- Taylor, J.H. y Woods, P.S. 1959 *In situ* studies of polynucleotide synthesis in nucleolus and chromosomes. in *Subcellular Particles*. (T. Hayashi, ed.) The Ronald Press Co., New York. 172-185.
- T'se, P.O.P. 1962 The ribosome-ribonucleoprotein particles. *Ann. Review Plant Physiol.*, 13: 45-80.
- T'se, P.O.P. y Lato, C.E. 1959 Synthesis of ribonucleic acid in plants. *Exp. Cell Research*, 17: 227-245.
- Vincent, W.S. 1952 The isolation and chemical properties of the nucleoli of starfish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash.*, 38: 139-145.
- Vincent, W.S. 1955 Structure and chemistry of nucleoli. *Intern. Review of Cytol.*, 4: 269-298.
- Vincent, W.S. 1957 Some studies on differentiation and development of the oocyte. in *Beginnings of Embryonic Development* (Ed. A. Tyler y R.C. Berstel y C.B. Metz) 1-22 *Amer. Assoc. Adv. Sci., Wash.* 1-22.
- Vincent, W.S., Bensen, B. y Bensen, A. 1958 Synthesis of ribonucleic acid by nucleoli. *Biol. Bull.*, 115: 342-343.
- Vincent, W.S. y Huxley, A.H. 1954 The dry matter content of starfish oocyte nucleoli. *Biol. Bull.*, 107: 290-291.
- Vincent, W.S. y Baltus, T. 1960 A function for the nucleolus. *Biol. Bull.*, 119: 299-300.
- Vogt-Kühne, L. 1961 Quantitative cytochemische Untersuchungen an Nucleolus aus Speicheldrüsenkernen von Chironomus thummi. *Chromosoma*, 12: 382-397.
- Vogt, C. y Vogt, O. 1947 Lebensgeschichte, Funktion und Tätigkeitsregulierung des Nucleolus. *Erztl. Forsch. (Wien)*, 1: 8-14, 43-50.
- Waddington, C.H. y Sirlin, J.L. 1959 The changing pattern of amino acid incorporation in developing mesoderm cells. *Exp. Cell Research*, 17: 582-585.
- Wallace, H. H. 1962 Cytological and biochemical studies of amoebulate Xenopus larvae. *Ann. Jour. Microscop. Sci.*, 103: 25-35.
- Watson, J.D. 1963 Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science*, 140: 17-25.
- Wers, G. 1962 Zur Frage der Elimination von Ribonucleinsäure und Protein aus dem Zellkern von Acetabularia mediterranea. *Planta*, 57: 636-655.

- Winteringham, F.P.W., Bridges, P.W. y Hellyer, G.C. 1955 Phosphorylated compounds in the muscle of Musca domestica L. Biochem. Jour., 56: 1321.
- Woods, P.L. 1959 RNA in nuclear-cytoplasmic interaction. Brookhaven Symp. in Biol., 12: 153-174.
- Woodward, J., Rasch, T. y Swift, H. 1961 Nucleic acid and protein metabolism during the mitotic cycle in Vicia faba. Jour. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 445-462.
- Yamelincky, M.B. y de la Haba, G.L. 1959 Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., Wash, 45: 1721.
- Yu, Ch. T. y Zamsonick, P.C. 1960 A hydrolytic procedure for ribonucleosides and its possible application to the sequential degradation of RNA. Biochim. Biophys. Acta, 45: 148-154.
- Zalakar, M. 1960 Sites of protein and ribonucleic acid synthesis in the cell. Exp. Cell Research, 19: 559-576.
- Zbarky, I.B. y Georgiev, G.P. 1959 Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei. Biochim. Biophys. Acta, 13: 301-302.

TABLA I

Efecto de bloqueadores químicos sobre la reacción argentafina.

Tiempo de reducción (horas)	Nucleolo			Nucleo y citoplasma		
	4	6	24	4	6	24
-	+ a ++	++		-	±	+
anhidrido acético	-	+ a ++	++	-	-	+
ácido nítrico		++			±	+
iodacetato		± a +	++		-	±
acetato mercurico		-	++		-	-
bromo		-	± a +		±	+
iodo		-	++		- a ±	+

El material consistió en cortes por congelación de raicillas de Allium cepa y hígado de Gavia peregrina fijados en 96% etanol o Carnoy. El reactivo usado fue el nitrato de plata amoniacal a 45 -60°C y en absoluta oscuridad. Las intensidades de reducción están indicadas por la siguiente clave: (-) nada (blanco) o amarillento; (±) amarillo a marrón claro; (+) marrón y (++) negro. Los agentes bloqueantes fueron usados en la forma indicada por Lillie (1954).

TAHIA II

Reactividad del Pb^{++} con fracciones ácida-solubles y ácida insolubles en raíces de cebolla y maíz después de varios tratamientos.

Fijación	Post-tratamiento	Precipitado en los nucleoles	PbS coloración de la raíz
acetato de plomo		+	+
acetato de plomo	Pb en ácido acético	+	+
Ácido trichloroacético (1-4°C)	acetato de plomo	-	+
Ácido trichloroacético (1-4°C)	acetato de Pb, luego Pb en ácido acético	-	-
acetato de plomo	Ácido trichloroacético (1-4°C), luego acetato de Pb, luego Pb en ácido acético	-	-
Nitrógeno líquido	acetato de Pb, luego Pb en ácido acético	- (algunos ϕ) figuras de difusión	+

(+) e (-) indican si el precipitado de plomo está presente o ausente de los nucleoles, y en el caso de la coloración con H_2S (PbS), si las raicillas se vuelven negras o quedan completamente incoloras.

TABLA III

Reacciones de color aplicadas al cromatograma de sustancias sólido-solubles de ratonillas de maíz.

Los spots están numerados de acuerdo a la Fig. 22.

Spot N°	Pb ac.	Pb ac. - ácido acético	Uranilo ac.	Molibdato	Mn	FeCl ₃	Acido sulfúrico diluido	Gibbs	α - nitroso - β - naphthol	I ₂	AgNO ₃ amoniacal	2,4° - dinitro - fenil hidracina	Ninhidrina	2,6° - diaceto - fenil indol fenol	Leucina
10	+				+	violeta	rojo - naranja	azul	rojo	+	naranja	+	púrpura (aceolero)		
9	+				+	violeta	rojo - naranja	azul - lila	azul - lila	+	naranja	+	púrpura (aceolero)		
8															
7,7°					+	amarillo	rosa	amarillo - lila	rojo	+		+	amarillo - lila	azul	2211
6											negro				
5	+	+	+	+									azul		
4													azul	púrpura	
3													azul	púrpura	
2,2°													amarillo - lila	púrpura	
1													azul	rojo - púrpura	

TABLE IV

P^{32} total ácido -insoluble en raicillas de Allia cepa. (a,b)

Período de cultivo (horas)	Nucleolo ^(c)	Cromatina	Citoplasma
12	0.8 ± 1.2	5.5 ± 2.6	2.1 ± 0.5
24	2.3 ± 2.7	6.6 ± 2.4	3.4 ± 0.6
48	4.6 ± 4.4	16.1 ± 3.9	8.4 ± 2.6

(a) Para las 12 horas de incubación, $P^{32}O_4$ fué ofrecido en una concentración de $20 \mu C/ml$ (26.3 nC/ml al principio del cultivo); para las 24 y 48 horas fué $15 \mu C/ml$ (4.65 nC/ml).

(b) Cuentas totales de granos \pm S.E. por área circular de 100 ^2 en autoradiografías de componentes celulares de 8-9 secciones de células. Tiempo de exposición, un día.

(c) Las cuentas para el nucleolo no son significativas, y están probablemente aumentadas por el "cross-fire", especialmente a las 48 horas de cultivo.

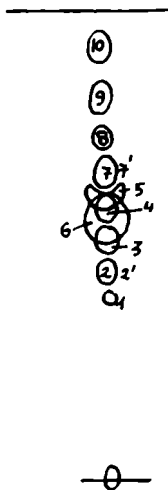


Fig. 22. Esquema representando las sustancias ácido-solubles en raicillas de Zea MAYS (extractos con 5% ácido tricloroacético e 5% ácido acético en 50% etanol, 1 - 4°C). Whatman N° 1, ascendente 24 horas; solvente: acetona-ácido acético - H₂O (50:15:35 v/v). Véase Tabla III para la localización de las manchas. Sólo la N° 5 (ortofosfato), 9 y 10 (compuestos flavonoides) están presentes en cantidades suficientes como para precipitar con acetato de plomo. De estas sólo el ortofosfato (N° 5) da un precipitado insoluble en ácido acético glacial.



Fig. 23. El tipo de precipitado intranuclear observado después de interrumpir la fijación en acetato de plomo por inmersión en agua destilada, o por un pretratamiento con 2% de ácido acético. El ortofosfato precipita en distintos loci sin localización precisa (algunas veces en contacto con los nucleolos como resultado de la difusión provocada experimentalmente (véase su interpretación en el texto)).

fijado en 5% acetato de plomo, post-fijado en formal-b e incluido en metacrilato. La distribución del ortofosfato de plomo dentro de la densa masa nuclear es completamente homogénea. La actual posición de las vacuolas es probablemente un artefacto de la fijación. La cuchilla ha desplazado al nucleolo fuera del núcleo y contra la membrana de celulosa (X 15000).

Fig. 12. La misma observación que en la Fig. 11 pero post-fijado en OsO_4 . Se observan dos nucleolos muy densos y también desplazados fuera del núcleo (X 10000).

Fig. 13. Glándulas salivares de Hydrophila viridis fijadas en picro-acetato de plomo y coloradas con H_2S .

Fig. 14. Secciones de dos ovocitos de Dafnoprocarum fijados en 5% acetato de plomo y colorados con H_2S . Sólo la parte basófila de los nucleolos muestra la localización del ortofosfato.

Fig. 15. Otro corte de un ovocito. Todas las nucleolas de la vesícula germinal dan reacción positiva. (H_2S). La franja oscura en la izquierda de la foto es melanina.

Fig. 16. Músculo espinal de Cavia porcellus fijada en picro-acetato de plomo y colorada con H_2S . Cortes por inclusión en parafina. El precipitado aparece en los nucleolos de la neurona y de la glía.

Fig. 17. Autoradiografía del meristema de raicillas de Allium cepa cultivado en P^{32}O_4 durante 24 horas, y luego en P^{32}O_4 mas R^3 -guanosina por 1.5 horas adicionales. Estos cortes fueron conservados en frío (-5°C) durante 3 meses para permitir que decaiga la actividad debida al P^{32} . La autoradiografía es debida al RNA- R^3 . Se observa un fuerte marcaje de los nucleolos. Tiempo de exposición 6 días.

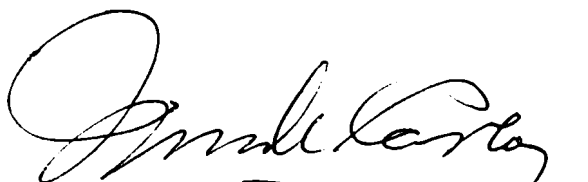
Fig. 18. Autoradiografía del meristema de raicilla de Allium cepa cultivado 48 horas en P^{32}O_4 . En contraste al activo metabolismo del RNA nuclear observado con ribonucleósidos - R^3 de la Fig. anterior, no se observa a radioactividad apreciable sobre los nucleolos.

Fig. 19. Autoradiografía de una célula de la glándula salivar de Spittia sp. fijada 30 minutos después de la incubación con (metil- C^{14})-metionina. Se observa intensa incorporación en toda la célula, debida especialmente a proteínas. Obsérvese la fuerte radioactividad del nucleolo.

Fig. 20. Lo mismo que la Fig. anterior, pero la incubación fué efectuada en presencia de la penicilina. La incorporación en proteínas ha sido inhibida casi completamente. Obsérvese que el nucleolo —en contraposición al citoplasma— no es afectado por el antibiótico. La radioactividad está en el RNA nuclear.

Fig. 21. Un nucleolo de glándula salivar de *Spizella* sp. marcado en su RNA con uridina- 3 y separado del organizador nuclear. Se observa una gran cantidad de granos de plata directamente sobre el nucleolo, en contraste con el organizador que, en este caso particular, no mostraba radioactividad. Los cromosomas se hallan también marcados en el RNA.

Las Figs. 19 -21 representan squashes efectuados según el procedimiento descrito en el texto.


Dr. Jorge M. De Carlo



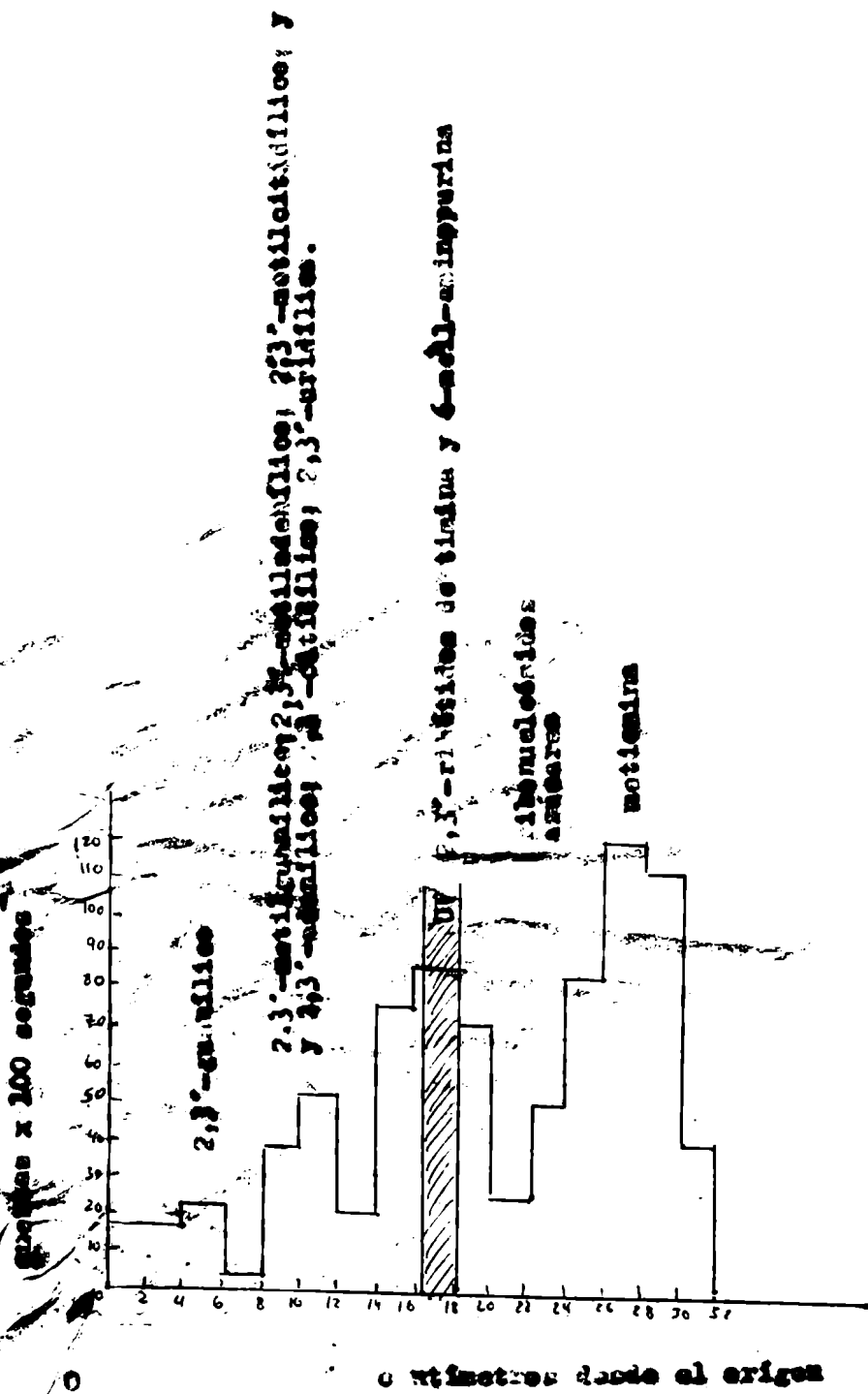


Fig. 24. Cromatograma del hidrolisado alcalino (piperidina 1M, 40 horas a 60°C) de las glándulas salivares de *Smittia* sp. incubadas con (metil- C^{14})-motilemina en presencia de purocinina y fijadas en 1% de ácido tricloroacético (1-4°C) Whatman N° 1, ascendente, 12 horas; solvente: isopropanol: H_2O (70:30 v/v)-vapore de NH_3 . Las cuentas indicadas en la ordenada representan la radioactividad del cromatograma a distintas distancias (cmts., en la abscisa) del origen. Se observa que un pico de radioactividad coincide con las sustancias de referencia 2,3'-ribonucleótidos de timina y 6-metil-aminopurina corridas junto con el hidrolisado, y localizadas por su absorción en luz ultravioleta (UV). La posición de las otras sustancias del hidrolisado están también indicadas (véase el texto).

Fig. 1. Squashes del meristema de raicilla de Allium cepa. Fijación en Carnoy y procedimiento NaOH-formol. Los nucleolos han reducido la emulsión fotográfica. Observarse los nucleolos telefísicos en los que se observan los cuerpos prenucleolares.

Fig. 2. Squashes del meristema de raicillas de Vicia faba. Fijación en Carnoy y calentamiento en ácido tricloroacético al 5% para extraer los ácidos nucleicos. Los nucleolos continúan reduciendo fuertemente la emulsión fotográfica. Se observa un núcleo telefísico con pequeños cuerpos prenucleolares, algunos de los cuales son mayores y se hallan en el proceso de fusionarse unas con otras.

Fig. 3. Yancharia sp. fijado en 96% etanol y luego tratado con 5% acetato de plomo. Nótese la ausencia del precipitado de fosfato de plomo (coloración con H_2S). Esta Fig. representa un control de la Fig. 4.

Fig. 4. Yancharia sp. fijado en 5% acetato de plomo. El precipitado de fosfato de plomo se observa en los núcleos del alga (coloración con H_2S).

Fig. 5. Anteras de Zea mays fijadas en 10% acetato de plomo en 1% ácido acético y coloradas con H_2S . Cortes por inclusión en parafina. Los nucleolos de las células madres de polen dan intensa reacción positiva.

Fig. 6. Varías núcleos de la célula intermedial del alga Nitzschia clavata mostrando la localización molecular del ortofosfato. Fijación en 5% acetato de plomo, seguida por tratamiento con 5% acetato de plomo en ácido acético glacial, lavado en agua destilada y coloración con H_2S .

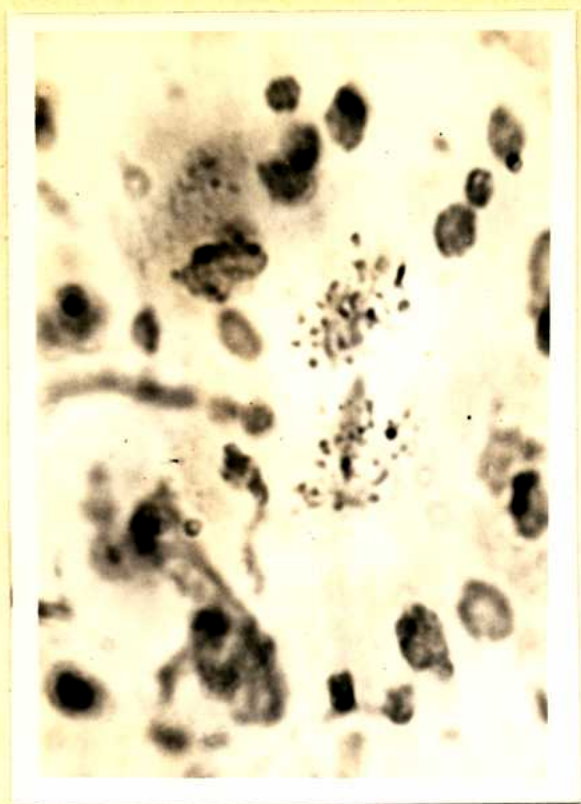
Fig. 7. Meristema de raicilla de Allium cepa fijado en 10% acetato de plomo en 1% de ácido acético. Inclusión en parafina. Sin coloración y fotografiado con contraste de fase. El ortofosfato de plomo se ha depositado masivamente en los nucleolos.

Fig. 8. Mismo procedimiento que en la Fig. 7 pero colorado con H_2S . Se observa una célula en metafase con sus cromosomas y con reacción negativa.

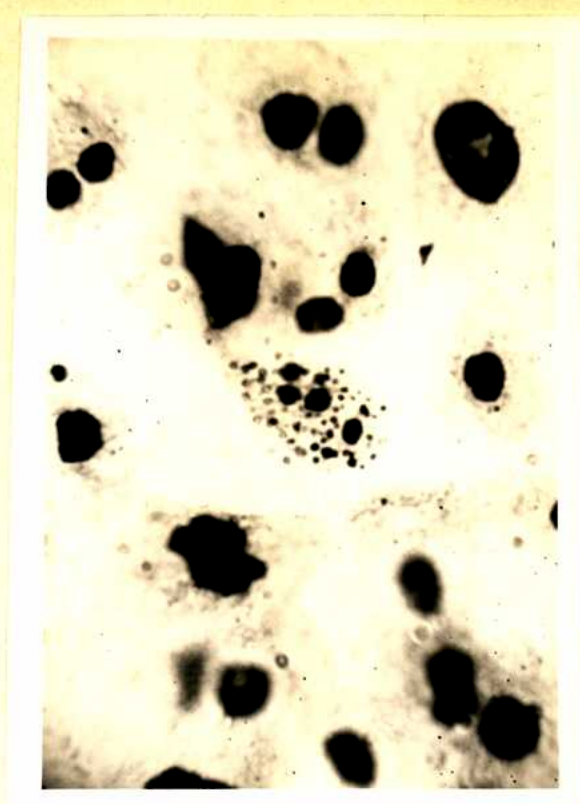
Fig. 9. Células del meristema de Zea mays fijadas en picro-acetato de plomo. El precipitado molecular ha sido colorado con H_2S .

Fig. 10. Células del meristema de raicilla de Allium sativum sometidas a un tratamiento previo con ribonucleato de sodio. Los nucleolos de tamaño gigante reaccionan de la misma manera que los normales, mas pequeños. Fijación: 10% acetato de plomo en 2% ácido acético. Coloración con H_2S .

Fig. 11. Corte ultrafino de un nucleolo del meristema de raíz de Allium cepa.



1



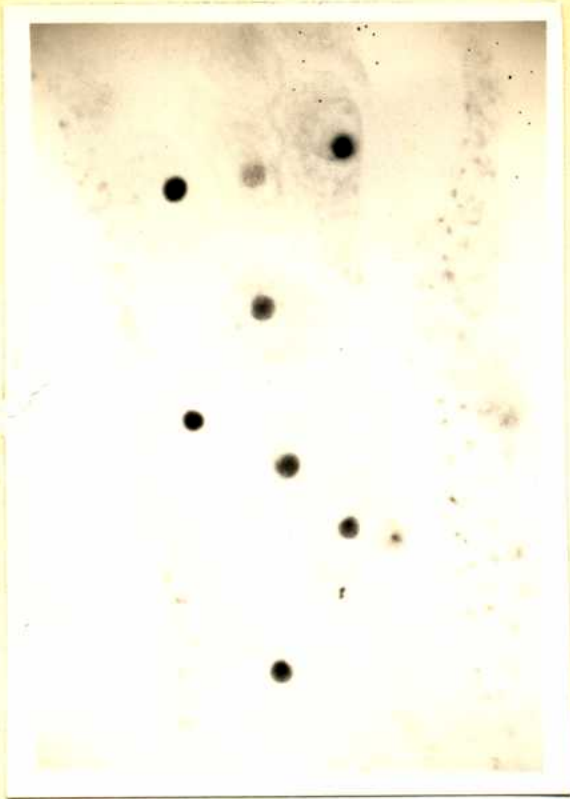
2



3



4



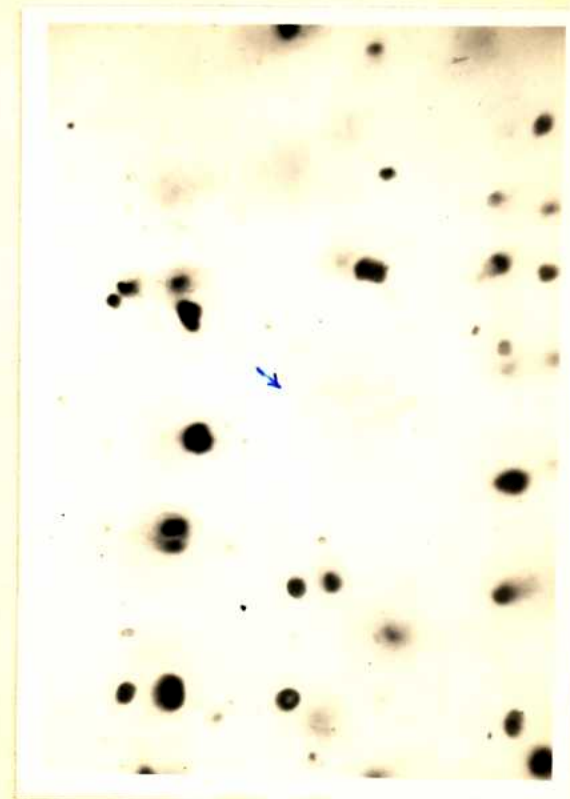
5



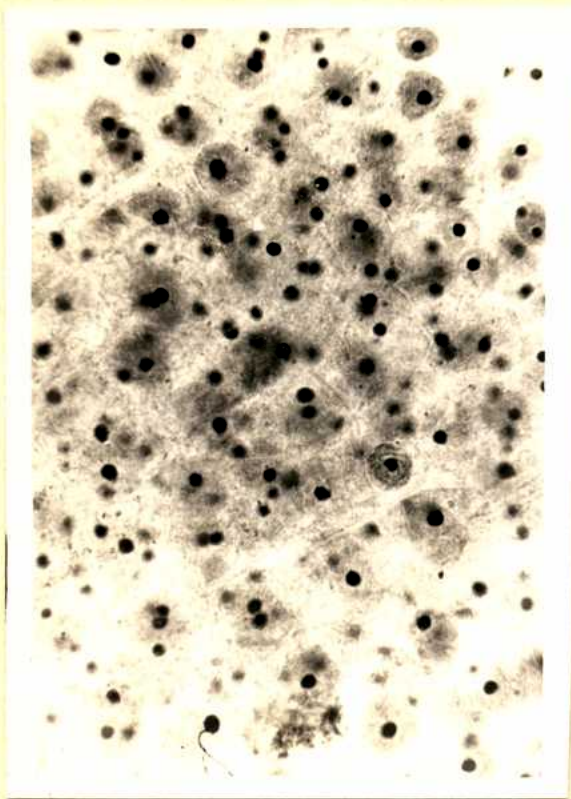
6



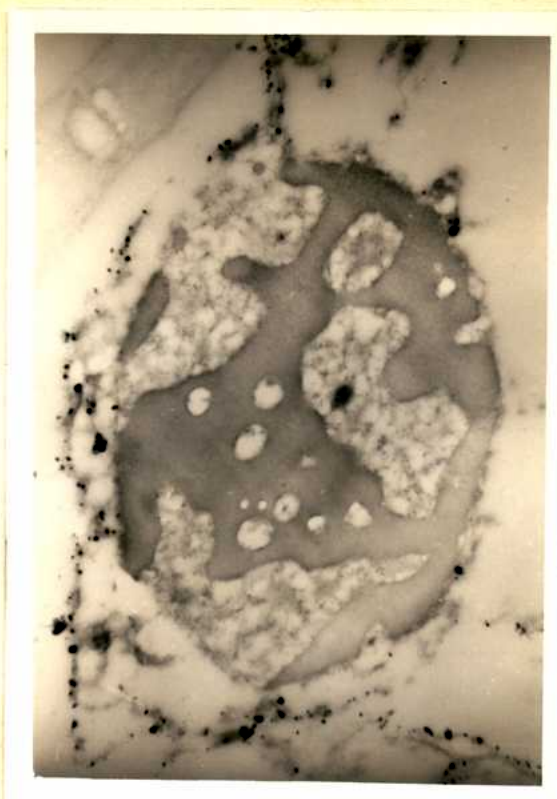
7



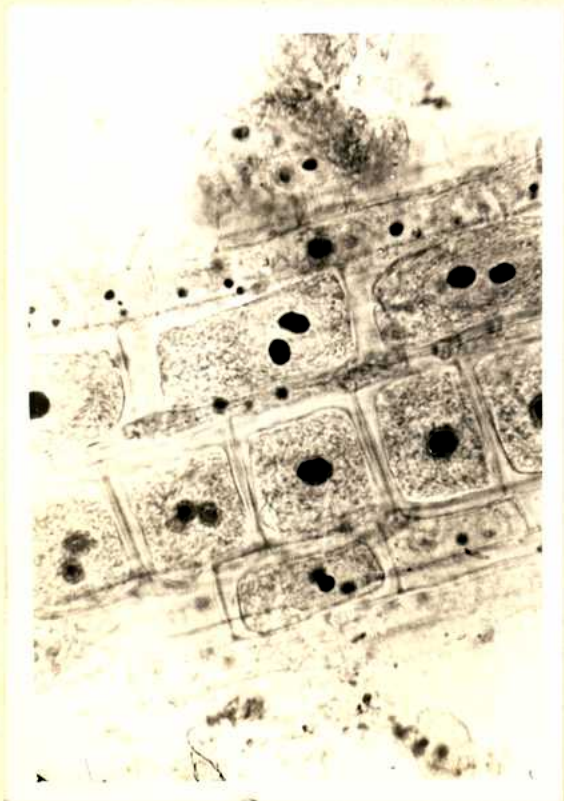
8



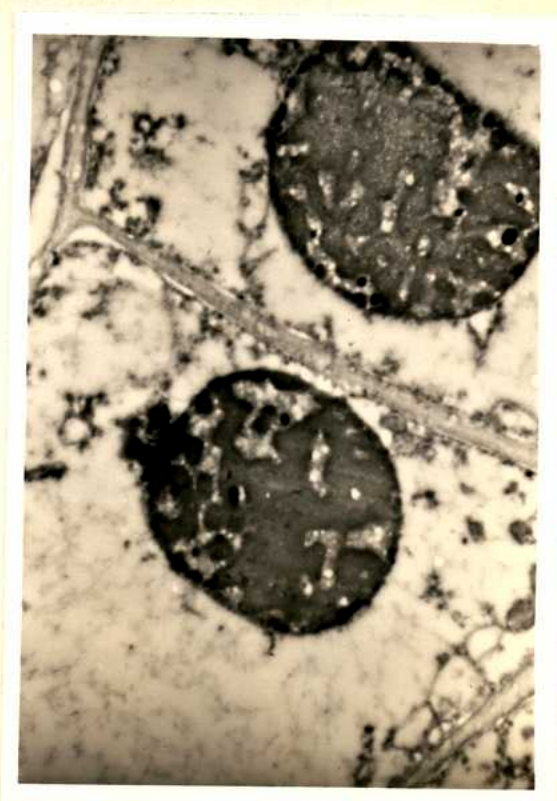
9



11



10



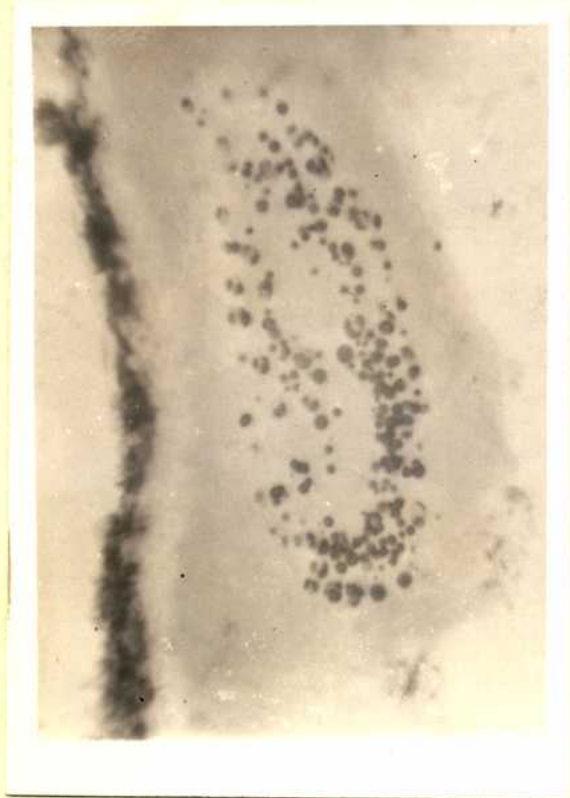
12



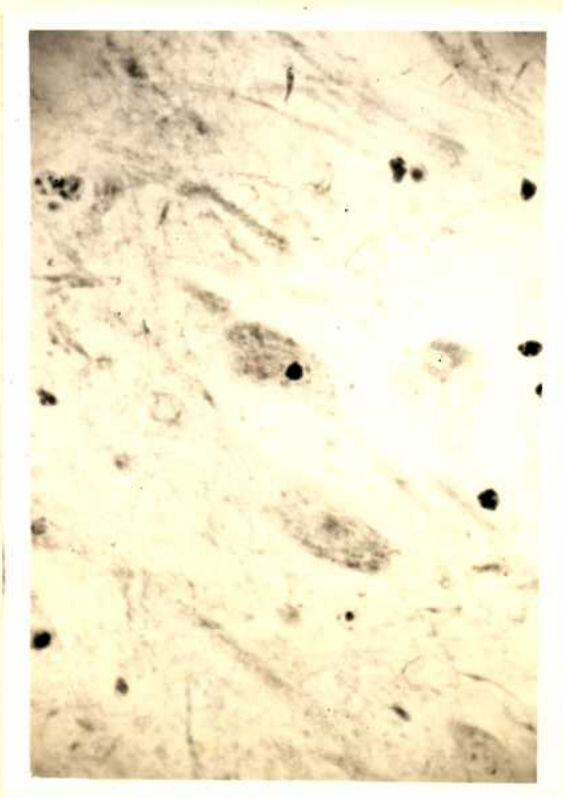
13



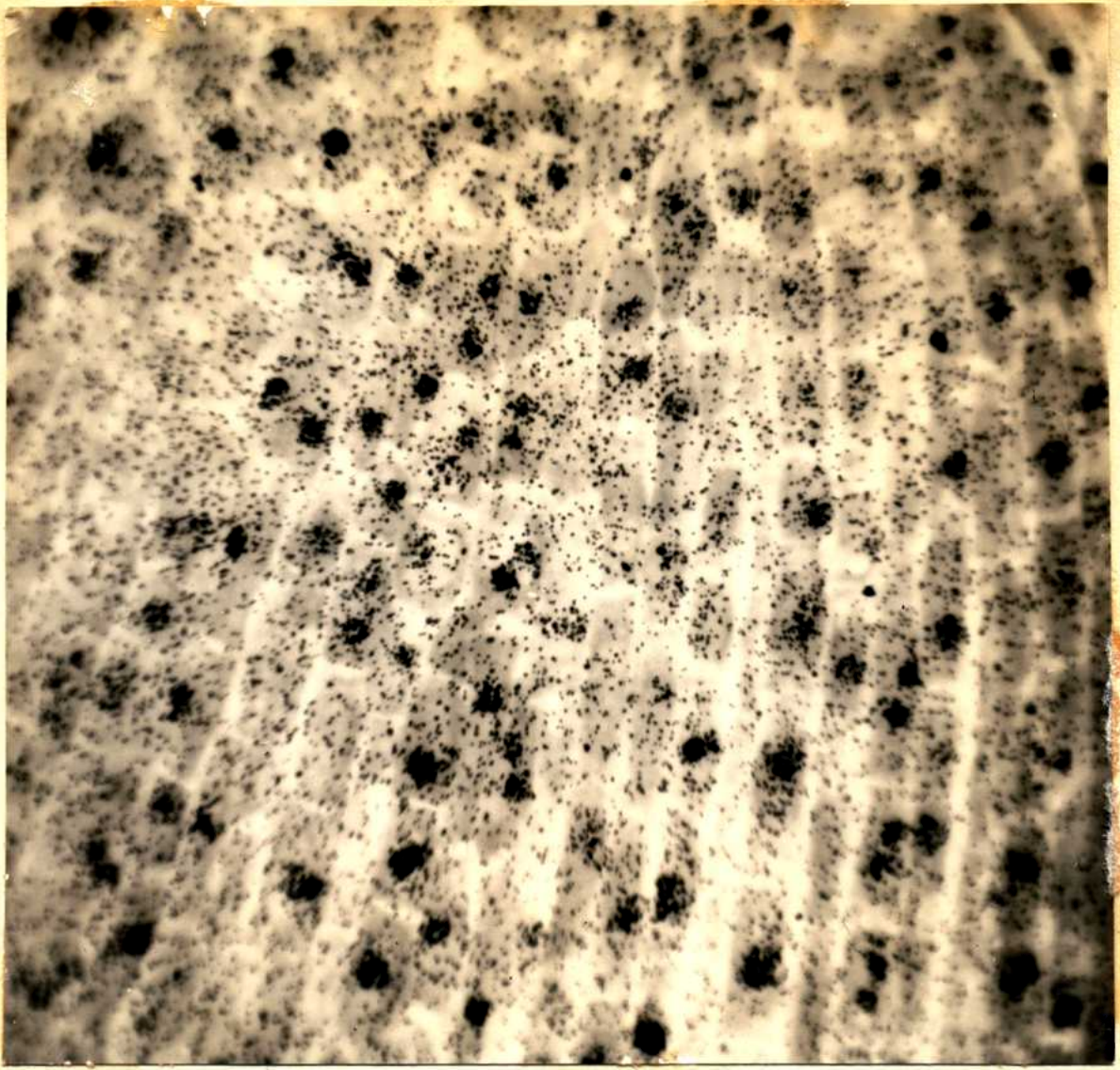
14



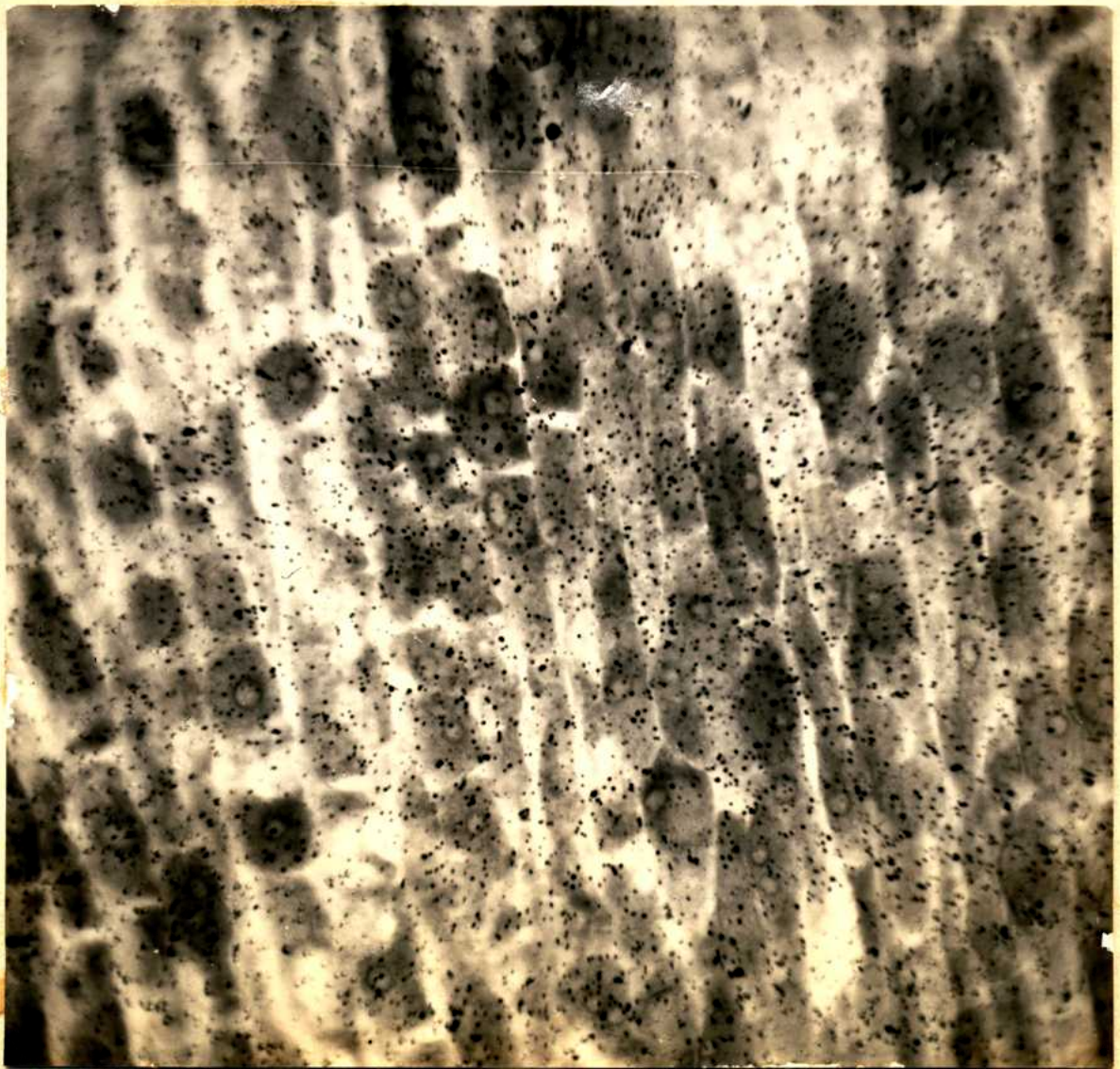
15



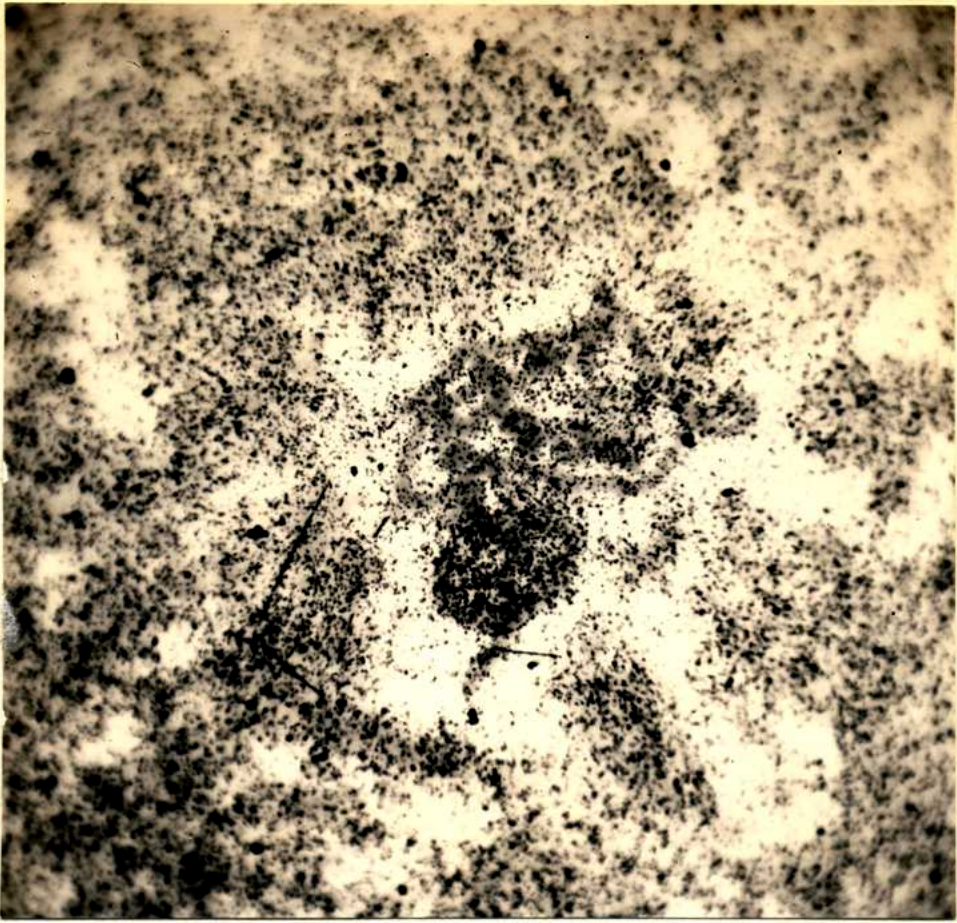
16



17



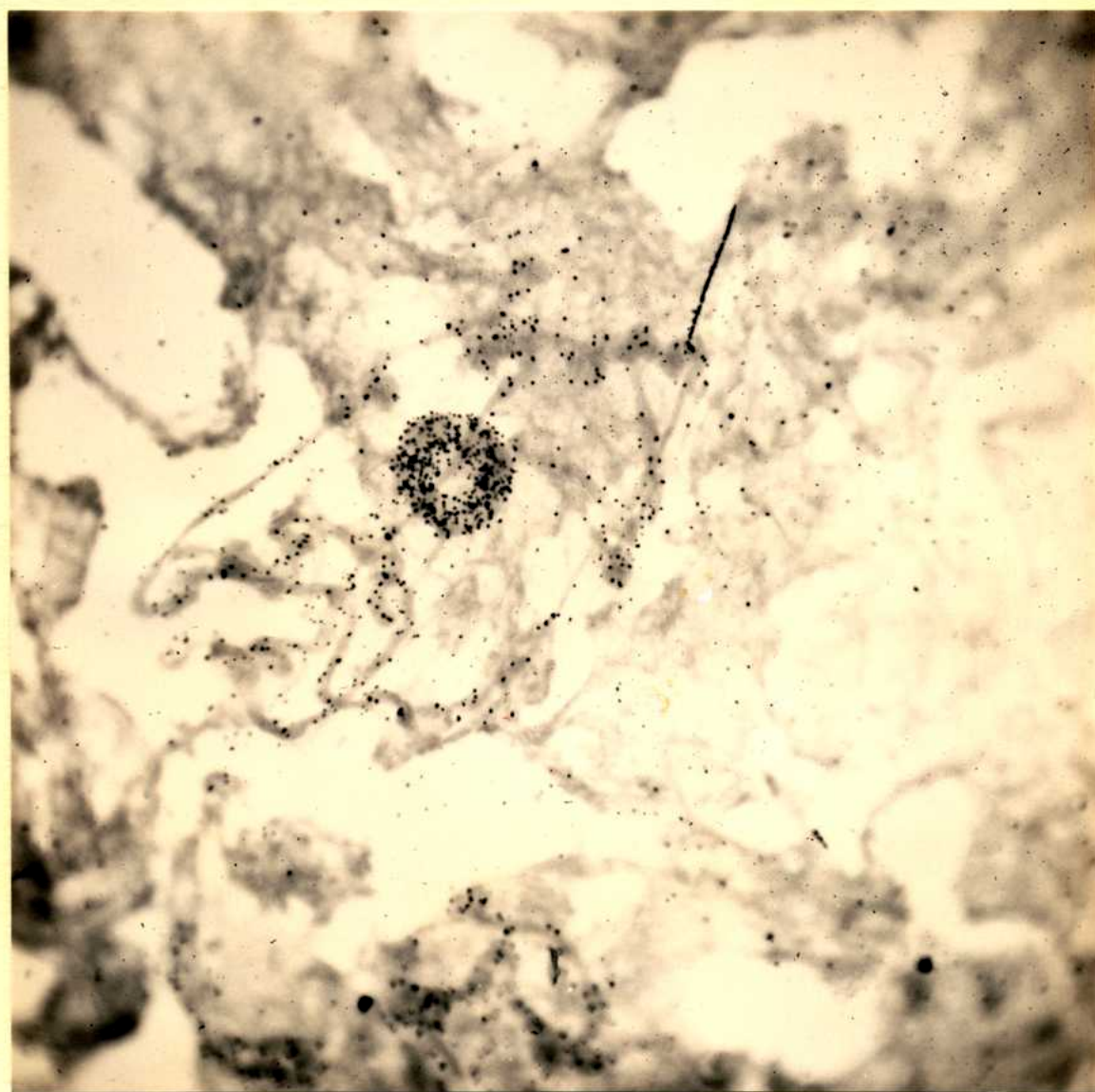
18



19



20



21