

Efecto del antibiótico novobiocina (NVB) sobre la síntesis de RNA y proteínas durante el ciclo proliferativo en meristemas radicales de *Allium cepa*, L

Antonio Del Campo G.* y Jorge Guíñez

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia
Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Venezuela

Recibido: 30-05-96 Aceptado: 02-11-96

Resumen

La novobiocina (NVB) a 0,5 mg/ml bloqueó el ciclo proliferativo en células meristemáticas radicales de *Allium cepa*. La determinación citofotométrica en poblaciones celulares que crecieron asincrónicamente, así como la cinética del ciclo en células binucleadas indicaron que el bloqueo tiene lugar al comienzo del período G1 y en el paso S/G2; el tránsito a través del período replicativo (S) no se vio afectado por los tratamientos con el antibiótico. Por otra parte, el bloqueo inducido por la NVB fue reversible en todos los casos estudiados y cuyos tratamientos se extendieron por distintos períodos de tiempo. Los resultados demuestran que las tasas de incorporación de uridina tritiada y leucina tritiada como presursos de ARN y de proteínas respectivamente, decreció como consecuencia del tratamiento con la droga, lo que puede deberse a un bloqueo de la primera actividad transcriptor de la célula y a la inhibición de proteínas relacionadas con los procesos reguladores del ciclo de división celular.

Palabras claves: *Allium cepa*; cafeína; ciclo celular; novobiocina.

Effect of novobiocin (NVB) antibiotic on the RNA and proteins synthesis during cell cycle in root meristems from onion (*Allium cepa*, L)

Abstract

The antibiotic drug Novobiocin (NVB) at 0.5 mg/ml concentrations blocked cell proliferation in root meristems of *Allium cepa*. The citophotometric determination in cell populations that showed asincronic growth, as well as the kinetic of the cycle in binucleate cells, indicated that the blocking takes place at the beginning of the G1 period and on border S/G2. The replicative period (S) was not affected by the treatments with antibiotic. On the other hand, the cell cycle blockage induced by the NVB was reversible in all cases over different periods of time. The results demonstrate also, that the rates of incorporation of ³H-uridine and ³H-leucine as precursors of DNA and proteins respectively, were reduced as a result of the drug. This may due to a blockage in the first transcriptor activity of the cell and to the inhibition of proteins related to the regulatory processes of the cell division cycle.

Key words: *Allium cepa*; caffeine; cell cycle; novobiocin.

* Autor para la correspondencia.

Introducción

La novobiocina, antibiótico producido por *Streptomyces niveus* y *Streptomyces spheroides* acapara la atención de algunos investigadores que han seleccionado este antibiótico como material de trabajo, dado su comportamiento en células animales cultivadas.

La NVB es un inhibidor de las girasas bacterianas, topoisomerasas del tipo II, que rompen la doble cadena de ADN simplificando el superenrollamiento de la molécula (1-3); este antibiótico inhibe también algunas de las enzimas de organismos eucarióticos, como las topoisomerasas I y II (4-6). Además, se ha demostrado que la NVB inhibe los procesos de replicación del genoma (3,7,8) y de reparación del ADN en células de mamíferos (9,10), afectando también la condensación de la cromatina (11).

Los estudios citogenéticos sobre los efectos de la NVB han sido muy escasos (12-14) sobre todo los relacionados con su acción sobre el período G1 del ciclo de división celular; una de las dificultades para investigar el efecto de la NVB sobre el G1 ha sido la ausencia de un sistema experimental apropiado; sin embargo, se ha demostrado que el ara C (1-B-D-arabinofuranosilcitosina) convierte ciertos tipos de daño al ADN en aberraciones cromosómicas al inhibir la replicación previa al proceso de reparación en el período G1 (15).

Recientemente, Lee *et al.* (16), estudiando los efectos de la NVB en células sincronizadas de 4 líneas tumorales encontraron que a una concentración 0,3 mM, el antibiótico presenta toxicidad solamente en el paso G1/S; en otras fases del ciclo proliferativo las células no eran afectadas, siendo bloqueadas de nuevo en el paso G1/S del ciclo siguiente. Hasta se le utiliza como agente precipitante en el fraccionamiento de proteínas con carga similar y parecido peso molecular (17).

Los efectos de este antibiótico apenas se han reportado en vegetales. Nicoloff *et al.* (18) detectaron en *Vicia faba* diferentes respuestas ante las aberraciones cromosómicas provocadas por la hidrácida maleica, según se suministre antes o después del choque térmico.

Más recientemente, Del Campo y Romero (19) estudiaron los efectos de la cafeína y de la NVB durante el proceso de reparación del ADN dañado por el 5-aminouracilo y su incidencia en el tránsito celular durante los períodos G2 y profase llegando a la conclusión de que la NVB, por un efecto "rebote", bloquearía la potenciación del daño producido por la cafeína al inhibir la síntesis de proteínas.

Un objetivo del presente trabajo fue extender el conocimiento que se tiene actualmente sobre el efecto de la NVB, a la proliferación celular en tejidos vegetales; se han utilizado meristemos radicales de *Allium cepa* ya que presentan ventajas para el estudio de los mecanismos de control durante el ciclo proliferativo *in vivo*. Por otra parte, se pretendía estudiar si la NVB bloquea preferentemente el comienzo del período G1 y el paso S/G2, lo que podría deberse a un bloqueo de la síntesis de ARN y de proteínas relacionadas con estos procesos.

Materiales y Métodos

El material utilizado fueron meristemos radicales de *Allium cepa* crecidos en agua destilada, en oscuridad y a temperaturas de $15^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ó $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, según los casos. El medio de cultivo fue removido cada 24 horas y aireado mediante burbujeo a razón de 15-20 ml de aire/min.

Las condiciones de cultivo descritas anteriormente se mantuvieron durante los diversos tratamientos con NVB, cafeína, leucina tritiada (H^3LeudR) y uridina tritiada (H^3UrdR).

Tratamientos con cafeína

Con el fin de obtener poblaciones binucleadas ($2n-2n$) se dieron tratamientos con la droga a una concentración de 5 mM. Las células que durante el tratamiento con la trimetilxantina cursan su telofase tardía quedan marcadas como binucleadas iniciando su ciclo de una manera sincrónica pudiendo, por lo tanto, hacer un seguimiento de la población a través del tiempo.

Tratamiento con novobiocina

El antibiótico novobiocina, se utilizó a concentraciones finales de 0,2 y 0,5 mg/mL y se suministraron a las poblaciones meristemáticas en tiempos diferentes del ciclo: 1. tratamientos continuos cuando se trató de poner a punto la concentración óptima de la droga y para el estudio de su acción mediante el uso de precursores radioactivos (H^3 UrdR y H^3 LeudR); 2. tratamientos de barrido para el estudio de sus efectos durante los periodos G1, S y G2 y 3. tratamientos desde 6 h de incubación hasta 20 h para el estudio de la reversibilidad del bloqueo producido por la droga.

Técnicas citológicas

Tinción de los meristemos: Para determinar el índice mitótico, las raíces separadas del bulbo y fijadas en etanol acético-clorhídrico (3:1 v/v), fueron coloreadas con orceína aceto-clorhídrica, de acuerdo a la técnica de Tjio y Levan (20). Para el análisis microdensitométrico, las raíces fueron hidrolizadas con HCl 5N a 20°C durante 1 hora y teñidas posteriormente con el reactivo de Schiff durante 30 min (21). Posteriormente, las raíces fueron lavadas durante 30 min en una solución sulfurosa antes de hacer las preparaciones para su observación al microscopio.

Microdensitometría: La frecuencia en la distribución de las células meristemáticas, de acuerdo a su contenido de ADN, se obtuvo midiendo individualmente los núcleos interfásicos, teñidos con Feulgen, en un microdensitómetro M-85 (Vickers Ins-

truments, York, UK) que da, en unidades arbitrarias, la densidad integrada de ADN/núcleo tomando como referencia la densidad de un núcleo telofásico y utilizando una longitud de onda de 550 nm. Las lecturas se hicieron con objetivo de inmersión.

Los contenidos relativos de ADN fueron determinados en meristemos control (no tratados con el antibiótico) y en meristemos tratados con NVB durante 7 y 14 h y a una concentración de 0,5 mg/mL. Los valores corresponden a una baja absorción (2C) y a una absorción más alta (4C) de las células diploides meristemáticas (21).

Autorradiografía: Las raíces separadas del bulbo después de tratamientos continuos y secuenciales cada 2 h con la NVB, recibieron pulsos de 30 min con timidina tritiada (H^3 TdR), 0,9 MBq.mL⁻¹ y una actividad específica de 0,9 TBq.mL⁻¹. Terminado el pulso con el precursor, las raíces fueron fijadas y teñidas. La autorradiografía se hizo con emulsión Kodak y revelado con revelador Kodak y fijador Valca.

Medición de la incorporación de H^3 UrdR y H^3 LeudR: Con el fin de marcar al RNA y a las proteínas, las raíces unidas al bulbo fueron sumergidas, unas en una solución de H^3 -uridina a una concentración de 1,8 MBq.mL⁻¹ y con una actividad específica de 1,6 TBq.mL⁻¹ y otros meristemos fueron tratados con H^3 -leucina a una concentración de 1,8 MBq.mL⁻¹ y con una actividad específica de 2,2 TBq.mL⁻¹. Después de estos tratamientos, las raíces fueron separadas del bulbo y lavadas con agua destilada a 0°C para detener la incorporación del precursor radioactivo. Separados los meristemos de 50 raíces fueron lavados 3 veces con 2 mL de TCA frío al 5% con el fin de extraer la radioactividad ácido-soluble (no incorporada). Esta radioactividad fue estimada en alícuotas de TCA (20 µL) en filtros de fibra de vidrio GF/A (Whatman). Para medir la radioactividad incorporada por el ARN y proteínas, los meristemos fue-

ron homogeneizados en una solución fría de TCA al 5%; los homogeneizados fueron filtrados posteriormente a través de papel filtro GF/C (Whatman) y lavados también con TCA frío al 5% de concentración. En todos los casos los filtros fueron secados, midiendo posteriormente la radioactividad en una solución de centelleo (PPO-POPOP en tolueno) (22).

En virtud de que la NVB podría modificar la entrada de los precursores radioactivos se ajustaron los valores de incorporación; esto se hizo calculando la rata corregida de incorporación que está dada por la razón entre la cantidad de radioactividad incorporada y la cantidad intracelular total (soluble+incorporada). Este procedimiento utilizado en meristemos vegetales (22) y en células animales (23,24) representa un estimado más puntual de síntesis macromolecular que la obtenida cuando solamente se toman en cuenta los valores crudos de incorporación.

Resultados

Los meristemos radicales de *Allium cepa* fueron tratados con concentraciones crecientes de NVB determinándose el índice mitótico (IM) a diferentes tiempos de incubación. Como se observa en la Tabla 1, el IM fue notoriamente reducido a 1 mg/mL ya que bloquea prácticamente el crecimen-

to con relación a los controles, mientras que a 0,2 mg/mL y sobre todo a 0,1 mg/mL el porcentaje de células en mitosis se acerca a los valores de los meristemos que crecen en condiciones de equilibrio dinámico, por lo que se tomó la concentración de 0,5 mg/mL como la concentración óptima para todos los experimentos de este trabajo que, aunque deprime el ciclo proliferativo, mantiene constante el IM cuya tasa promedio es de $6,4 \pm 0,4$ (SD).

Como un primer intento para determinar si la NVB actúa preferencialmente en estadios específicos del ciclo de división celular (CDC), se midió la distribución porcentual de las células meristemáticas de acuerdo a su contenido de ADN. Como se observa en la Figura 1, los meristemos tratados con la NVB asumen una distribución que se hace bifásica a las 14 horas de tratamiento con una disminución en el número de células entre 2C y 4C (S). Esto indicaría un bloqueo preferencial en los periodos G1 y G2.

Efecto de la NVB sobre el período prerreplicativo (G1)

La Figura 2 muestra el diseño experimental para estudiar el posible bloqueo por la NVB durante este período del CDC. La duración de las fases del ciclo de las células binucleadas que crecen a 15°C práctica-

Tabla 1
Índice mitótico en poblaciones de *Allium cepa* crecidas a 15°C ± 0,5 según tiempo y concentración de NVB

Concentración (mg/ML) de NVB	Índice Mitótico (%)					Promedio
	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	
1	5,6 ± 0,7	3,2 ± 0,2	-	2,4 ± 0,3	-	1,24 ± 0,3
0,5	7,6 ± 0,4	7,0 ± 0,3	6,4 ± 0,2	6,1 ± 0,6	5,3 ± 0,5	6,4 ± 0,4
0,2	10,5 ± 0,7	9,7 ± 1,2	12,4 ± 1,5	10,0 ± 0,5	9,1 ± 0,4	10,4 ± 0,8
0,1	11,8 ± 0,8	11,3 ± 1,1	11,2 ± 0,5	10,9 ± 0,9	10,7 ± 0,8	11,2 ± 0,8
Controles	12,1 ± 0,7	11,7 ± 1,3	12,0 ± 2,0	11,3 ± 2,7	11,6 ± 1,6	11,5 ± 1,6

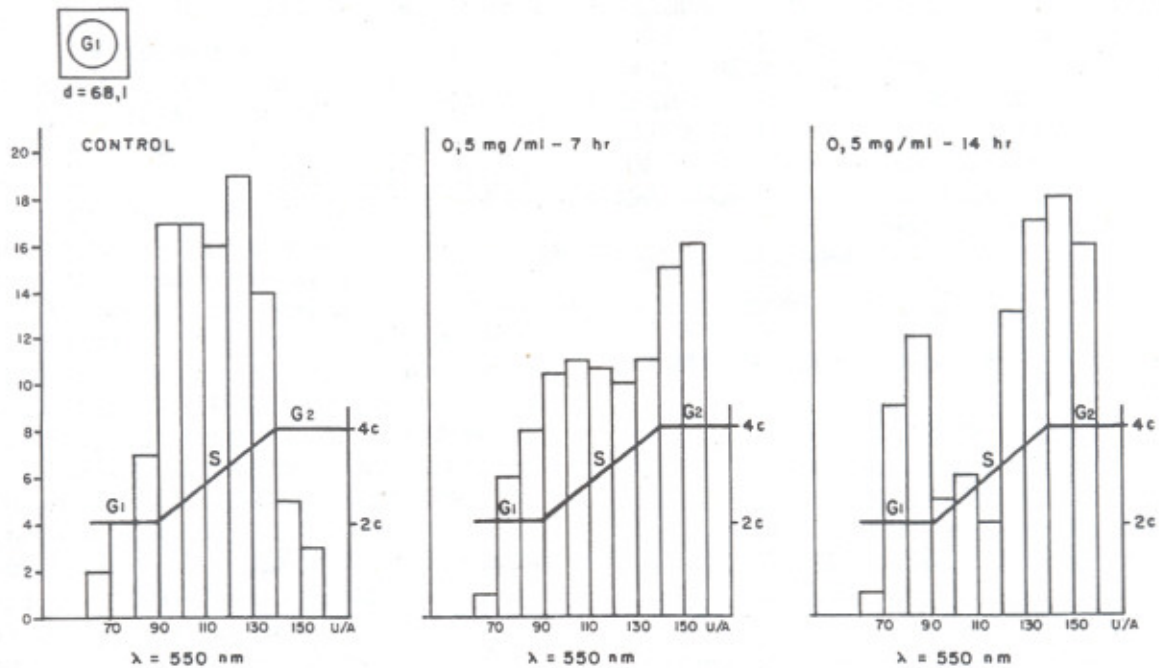


Figura 1. Distribución de la población celular, tratada con NVB durante 7 y 14 h, según su contenido de ADN y con relación a los controles, en unidades arbitrarias (u/a). La densidad de un núcleo en G1 = 68,1 u/a.

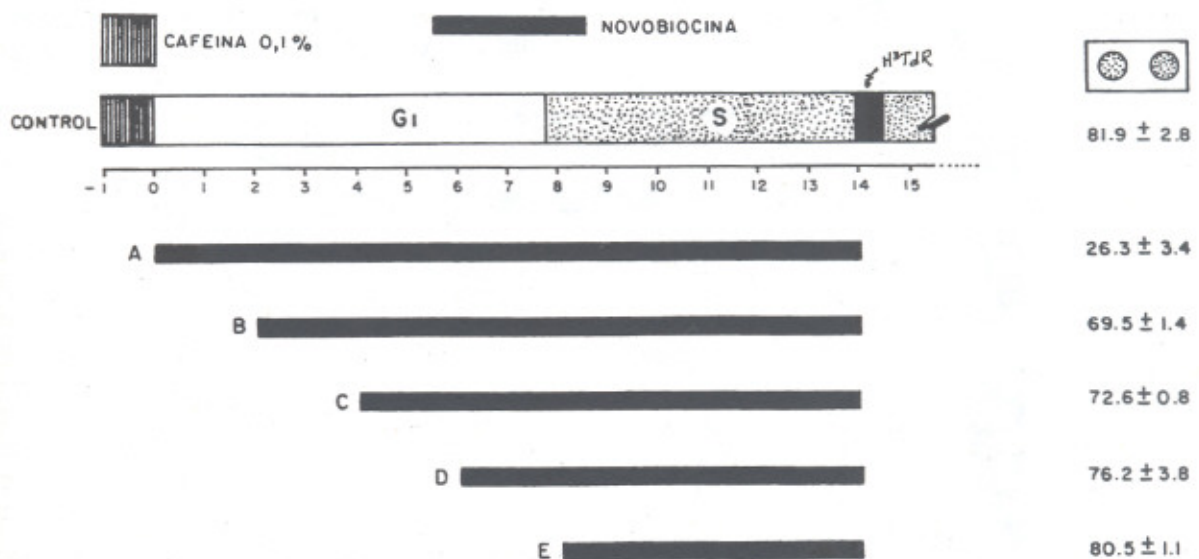


Figura 2. Diseño experimental para el estudio de la acción de la NVB 0.5 mg/mL durante G1. Los meristemos fueron pulseados con H³TdR 0,9 MBq/mL, durante 30 min a partir de la h 14. Se indica el % de núcleos marcados para cada tratamiento con el antibiótico.

mente es la misma que la de las células monucleadas que crecen a esa misma temperatura (G1 = 7 h, 48'; S = 13 h, 36'; G2 = 4 h, 48' y mitosis = 3 h, 36'). Los meristemas radicales fueron incubados con NVB 0,5 mg/mL y pulseados con H^3TdR durante 30 min a partir de la hora 14 después del tratamiento con la cafeína cuando supuestamente el 100% de los núcleos desarrollaban su período de síntesis de ADN; el índice de marcación por el H^3 , en la población de células binucleadas, se determinó por autorradiografía.

Cuando la NVB se suministró a partir de la hora 0, es decir, terminado el tratamiento con la cafeína, el índice de células marcadas fue del $26,3\% \pm 3,4$, mientras que los tratamientos suministrados a partir de la hora 2 dieron valores porcentuales aproximados a los controles ($81,9\% \pm 2,8$). Puesto que la NVB no tiene un efecto puntual sino que se va diluyendo este en el tiempo, se podrían interpretar los porcentajes de los tratamientos B, C y D no como un efecto de la droga en esos puntos del G1 sino como un proceso de recuperación.

Estos resultados sugieren que la NVB bloquea el CDC al comienzo del período prerreplicativo (G1).

Período de síntesis del ADN (S)

En la Figura 3 se muestra el diseño experimental utilizado para analizar el posible efecto de la NVB sobre el desarrollo del período de replicación del ADN. 12 horas después del tratamiento con la cafeína, es decir, 4,2 horas después del comienzo del período S, se suministró a las células binucleadas un tratamiento continuo con el antibiótico hasta la hora 20; se espera que al comienzo del tratamiento todas las células binucleadas estén en S evitando la posibilidad de un bloqueo G1 o G1/S. Los contenidos de ADN se midieron con un microdensitómetro, previa coloración con Feulgen. Como se indica en la Figura 3, el incremento en el contenido de ADN (densidad nuclear), desde la hora 12 hasta la 20, no se diferencia considerablemente de los controles. Entonces, a excepción de un posible bloqueo durante la replicación tardía, la NVB no parece que afecte al normal desarrollo del período replicativo en estos sistemas vegetales.

Acción de la NVB sobre el desarrollo del período postreplicativo (G2)

La Figura 4 muestra el experimento realizado para determinar la acción de la

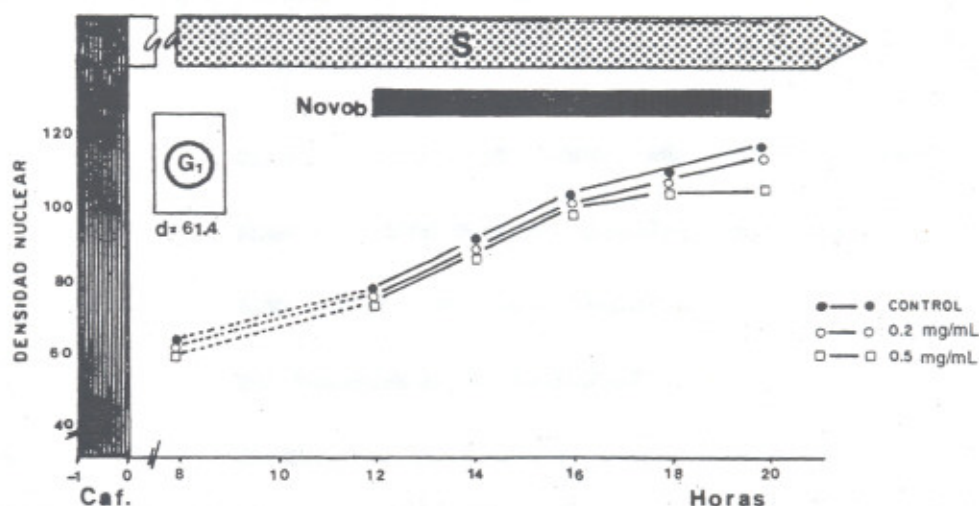


Figura 3. Diseño experimental para el estudio de la acción de la NVB durante el período S. Se indica el contenido de ADN de un núcleo en G1 = 61,4 u/a.

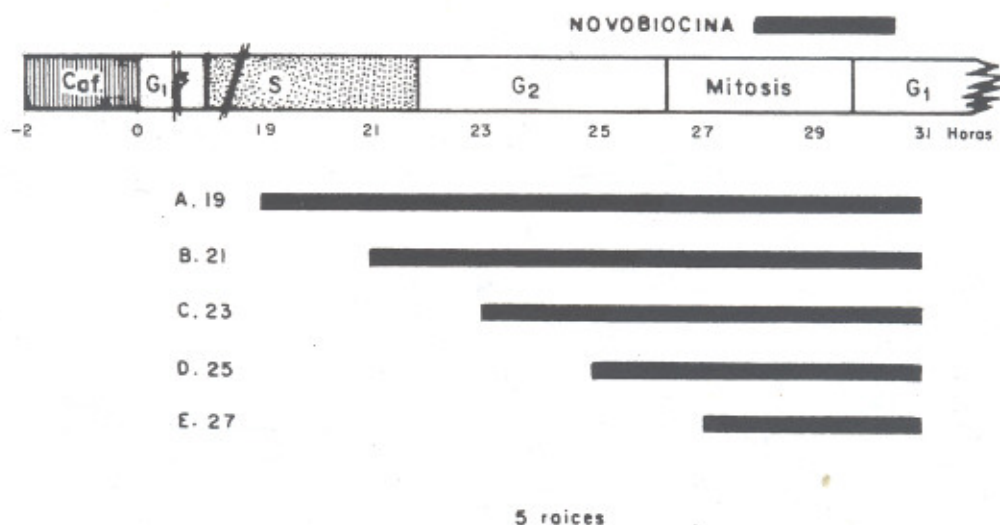


Figura 4. Diseño experimental para el estudio de la acción de la NVB durante el período S tardío y G₂ temprano.

NVB sobre esta parte del ciclo, con los resultados obtenidos.

Cuando la NVB se suministró 19 horas después del tratamiento con la cafeína, coincidiendo con la replicación tardía para la mayor parte de las células, se bloqueó la entrada a mitosis hasta porcentajes inferiores al 10% (A-19); a medida que los tratamientos se dieron en horas posteriores (B-21; C-23; D-25 y E-27) estos porcentajes se fueron aproximando a los controles, Figura 5.

Estos resultados indicarían que la NVB efectúa el bloqueo en un punto del ciclo situado al final del período S y/o en el paso S/G₂. De todas las formas, dado que a medida que transcurre el ciclo se va acentuando la asincronía de la población binucleada se hace difícil puntualizar el momento exacto de la acción del antibiótico; por esta razón, consideramos que es durante el paso S/G₂ cuando actúa la droga.

No se efectuaron experimentos para analizar los posibles efectos de la NVB sobre la mitosis; sin embargo, cuando se analizaron las diferentes fases se observó un retraso en alcanzar los valores porcentuales de

los controles lo que indicaría una acción tóxica de la droga.

Reversibilidad del bloqueo producido por la NVB

Las células meristemáticas fueron tratadas con el antibiótico por período crecientes de tiempo; posteriormente, se realizaron los análisis en ausencia de la droga hasta 48 horas después de finalizados los tratamientos. En todos los casos, y así se expresa en la Tabla 2, se llegó a los índices mitóticos normales lo que indicaría que el efecto bloqueante de la NVB es reversible.

RNA y síntesis de proteínas

Como otros procesos metabólicos de la célula, el CDC depende de la expresión génica y la NVB parece que lo afecta. Por otra parte, en contraste a la metodología utilizada para los estudios citológicos que pueden realizarse en poblaciones sincronizadas (binucleadas o plurinucleadas), los análisis de transcripción tienen que efectuarse con las poblaciones meristemáticas mononucleadas debido a la falta de procedimientos de sincronización para trabajos de tipo bioquímico. Además, se quería saber si el bloqueo

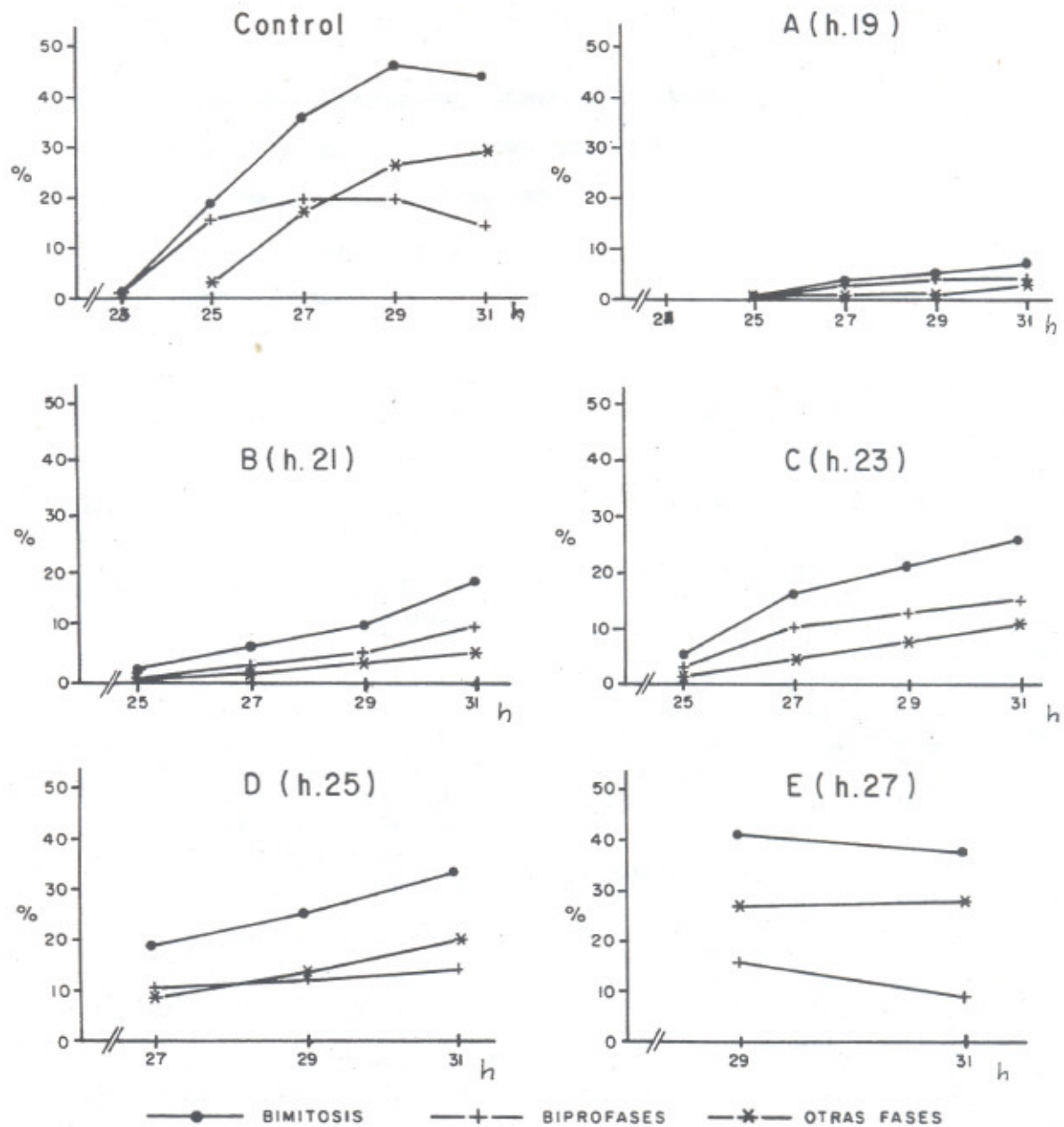


Figura 5. Análisis del período postreplicativo en células tratadas con NVB a una concentración de 0,5 mg/mL. Aparece un bloqueo en el paso S/G₂; a medida que se avanza en el tiempo los valores se aproximan a los de los controles.

Tabla 2

Reversibilidad del CDC bloqueado por la NVB, 0,5 mg/mL. Los tratamientos con el antibiótico se realizaron durante 6, 12, 18, 24 y 30 horas. Se indican los valores porcentuales del IM correspondientes a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas de recuperación. Se evaluó un promedio de 2500 células/tratamiento

Tratamiento (horas)	Índice Mitótico (%)					Controles
	Recuperación (horas)					
	0	12	24	36	48	
6	0,5 ± 0,1	6,1 ± 0,4	10,2 ± 1,1	11,6 ± 1,3	11,6 ± 2,1	
12	0,6 ± 0,07	5,8 ± 0,7	9,6 ± 1,0	10,5 ± 1,5	11,8 ± 1,7	0,5 ± 0,1
18	0,4 ± 0,06	3,8 ± 0,1	8,6 ± 1,2	12,9 ± 2,4	11,9 ± 1,9	
24	0,3 ± 0,04	5,7 ± 0,5	9,2 ± 0,8	11,4 ± 0,9	11,6 ± 1,9	
30	0,4 ± 0,09	2,6 ± 0,1	5,5 ± 0,6	10,7 ± 1,1	11,5 ± 2,0	

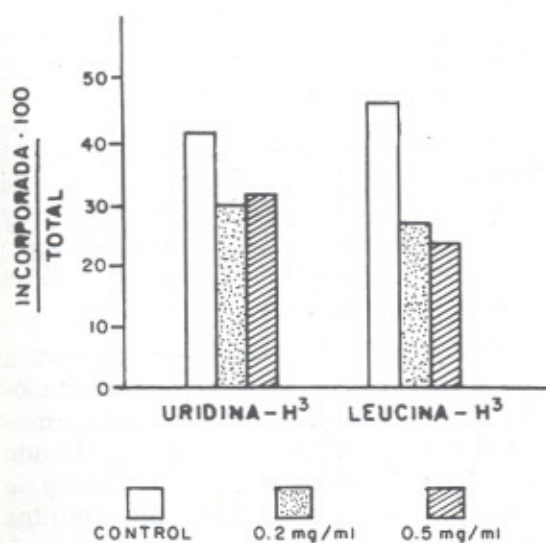


Figura 6. Efecto de la NVB sobre la incorporación de uridina- H^3 y leucina- H^3 . Los meristemos fueron tratados durante 6 horas con el antibiótico y marcados posteriormente durante 1 h con el precursor radioactivo en presencia del antibiótico. Los controles fueron marcados durante el mismo tiempo en ausencia de la NVB. En cada caso se determinó la radioactividad incorporada y la total (incorporada+soluble).

en algunos puntos del ciclo celular en los meristemos tratados con la NVB, podrían ser consecuencia de algún efecto colateral de este compuesto sobre la síntesis de ARN o proteínas; esta posibilidad fue verificada mediante análisis de incorporación de H^3 -uridina y H^3 -leucina tanto en los controles como en los meristemos tratados con el antibiótico. La Figura 6 muestra que la incorporación de estos precursores al ARN y a las proteínas disminuyó con relación a los controles debido al tratamiento con la NVB; la cantidad total de radioactividad intracelular también disminuyó por acción de la droga.

Como primer paso en este estudio, se analizó la acción de dos concentraciones diferentes de la NVB (0,2 y 0,5 mg/mL) sobre la incorporación de los precursores radioactivos. Los resultados expresados en la Figura 6 demuestran que los valores "crudos" de incorporación variaron poco en el caso del ARN con relación a los controles, siendo más acentuada esta variación en el caso de las proteínas y más a concentraciones del antibiótico de 0,5 mg/mL, Figura 7.

Ahora bien, como la caída de los valores de incorporación podrían reflejar una disminución en la entrada a la célula de los precursores por acción de la NVB, fue necesario aplicar acciones correctivas para esas

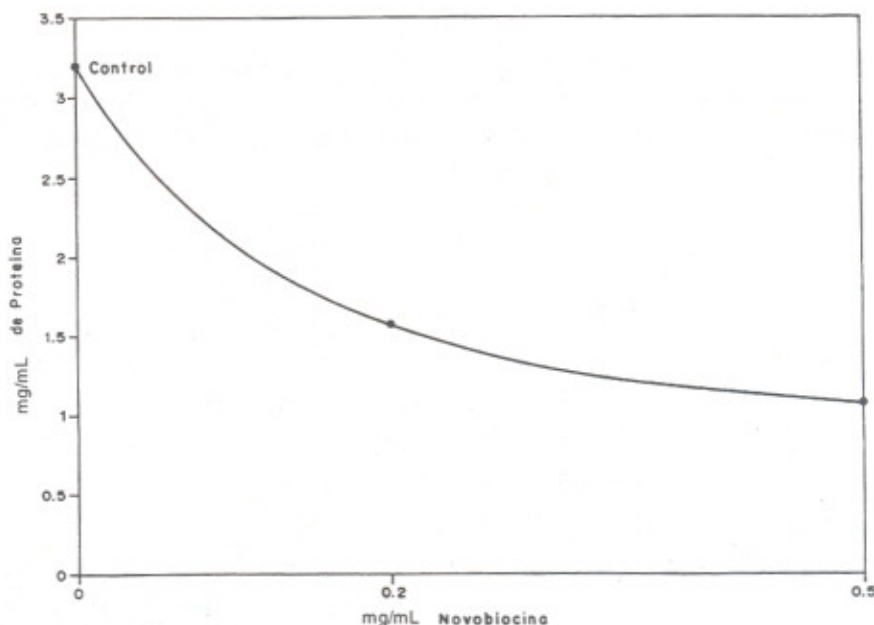


Figura 7. Relación novobiocina/concentración de proteínas.

medidas de incorporación; cuando se efectuó esto, se pudo comprobar que había una clara diferencia entre los meristemos control y los tratados con relación a la incorporación de H^3 -leucina y que esta diferencia era menos acentuada en el caso de la H^3 -uridina. Teniendo en cuenta las limitaciones del método, parece ser que la NVB no afecta grandemente a los procesos de transcripción y sí a los de translación o síntesis de proteínas.

Discusión

Mientras que los efectos de la NVB han sido ampliamente estudiados en animales, bacterias y virus (1-5,7-11) se ha puesto menos atención a sus efectos sobre células vegetales (6,18,19). Por esta razón nos ha parecido interesante obtener alguna información sobre el efecto de la NVB sobre la actividad celular de meristemos radicales de *Allium cepa*. Se ha seleccionado este material por sus excelentes propiedades para el estudio del CDC (27).

Estudios realizados en *Vicia faba* (18) mostraron diferentes respuestas del anti-

biótico ante las aberraciones cromosómicas provocadas por la hidrácida maleica y de acuerdo a las condiciones experimentales y más recientemente, Del Campo y Romero (19) observaron que la NVB interviene en los procesos de reparación del ADN.

En el presente estudio analizamos, a nivel citológico, la acción *in vivo* del antibiótico sobre la proliferación de los meristemos radicales de *Allium cepa* comprobando que la NVB, aplicada a concentraciones de 0,5 mg/mL, afecta al ciclo celular en puntos concretos de su desarrollo: G1 temprano y en el paso S/G2. Además, los datos obtenidos sugieren que este efecto está determinado por un bloqueo en la síntesis de proteínas, más que en la inhibición de los procesos de transcripción.

Los resultados pueden ser resumidos así: 1. la NVB bloquea el ciclo en momentos específicos del desarrollo celular; 2. el bloqueo es reversible aún después de largos periodos de tratamiento con el antibiótico; 3. este efecto es puntual en el sentido de que no depende de efectos colaterales de la NVB sobre la síntesis de proteínas o de ácidos

nucleicos y 4. la NVB afecta más a los procesos de translación.

Al contrario de lo que sucede en células sincronizadas de 4 líneas tumorales en las que el antibiótico presenta toxicidad solamente en el paso G1/S, en *Allium cepa* su acción es particularmente bloqueante al comienzo del período G1 y en el paso S/G2.

Como sucede en la mayor parte de las células animales y bacterias, el valor potencial de la NVB en el estudio de su acción sobre células vegetales radica en la reversibilidad de sus efectos, Tabla 2.

El problema de los mecanismos bioquímicos responsables del bloqueo en algunos puntos del CDC en células tratadas con el antibiótico, ya fueron estudiados de alguna forma por otros autores (1, 10, 12, 13, 16, 19, 31, 32) pero sin llegar a conclusiones concretas; aunque este problema escapa del alcance de este estudio, se llegó a la conclusión de que la NVB afecta al ciclo celular, en meristemas radicales de *Allium cepa*, de manera similar a como lo hacen otros inhibidores de síntesis proteica; de hecho se ha reportado que la anisomicina y la cicloheximida actúan durante el período G1 de las células meristemáticas de *Allium cepa* (28) y también durante el G2 temprano (29,30).

Estos resultados llevaron a estudiar la posible acción de la NVB sobre la síntesis de macromoléculas en células vegetales, aunque conscientes de que la metodología utilizada en este trabajo, principalmente la incorporación de precursores radioactivos de ARN y proteínas corregidos para paliar el posible efecto del antibiótico sobre al paso a través de la membrana celular, no da necesariamente una medida exacta de los niveles de transcripción y translación. Sin embargo, se puede afirmar que el bloqueo en el temprano G1 y durante el paso S/G2 es consecuencia de una inhibición de al menos una de estas actividades, sobre todo del proceso de síntesis de proteínas. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados obtenidos en sistemas animales en los

que la NVB actúa, de alguna forma, induciendo bloqueo del desarrollo celular, independientemente del proceso de transcripción.

Ahora bien, debido a que la NVB es un inhibidor de la actividad de las ADN-topoisomerasas I y II, una explicación probable a la acción sobre el proceso de transcripción podría ser el que la droga impide los cambios estructurales en la organización de la cromatina, requeridos para recuperar la capacidad proliferativa y en consecuencia, la activación de ciertos genes. Esta hipótesis que está bajo investigación podría aceptarse desde los trabajos de Han *et al.* (31) que demuestran que la NVB impide la expresión de genes inducibles por el calor. Sin embargo, los resultados obtenidos y relativos a la transcripción llevan a afirmar que la NVB es una droga débil, dentro de las que actúan en diferentes momentos de la transcripción. En resumen, este antibiótico inhibe la transcripción al bloquear las topoisomerasas requeridas para la activación y desactivación génica (32).

Al comparar estos resultados con los reportados en investigaciones previas, podemos concluir: 1. que hay genes que no son expresados cuando las células son bloqueadas en G1 o en S/G2 por agentes químicos como la NVB; 2. este antibiótico bloquea procesos de translación que tienen que ver con la actividad transcriptor de esos genes y 3. por tratarse de un bloqueo al comienzo del período G1, probablemente se relacione con la primera actividad transcriptor de la célula y, por lo tanto, de ARN-ribosomales (33,34). Con relación al bloqueo en el paso S/G2, se trataría de la "proteína-G2" que condiciona la entrada en mitosis (28).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Joseph J. Ewald por la ayuda prestada; a Darío Espina M., técnico dibujante, por los gráficos realizados y a los

Laboratorios de Hematología y Neuroquímica del Instituto de Investigaciones Clínicas de LUZ.

Referencias Bibliográficas

1. GELLERT M., O'DEA M.H., ITO T., TOMIZAWA J. *Proc Nat Acad Sci USA* 73: 4474-4478, 1976.
2. GELLERT M. *Annu Rev Biochem* 50: 879-910, 1981.
3. CONTRERAS A., MAZWELL A. *Mol Microbiol* 6 (12): 1617-1624, 1992.
4. EDENBERG H.J. *Nature* 286: 529-531, 1980.
5. HSIEH T., BRUTLANG D. *Cell* 21: 115-125, 1980.
6. NAKAYAMA K., SUGINO A. *Biochem Biophys Res Commun* 96: 306-312, 1980.
7. PARSOT C., MATALANOS J.J. *J Bacteriology* 174(16): 5211-5218, 1992.
8. EDER J.P., WEELER, C.A., TEICHER B.A., SCHNIPPER L.E. *Cancer Res* 51(2): 510-513, 1991.
9. MATTERN M.R., SCUDIERO A. *Biochem Biophys Acta* 653: 248-258, 1981.
10. CLARKSON J.M., MITCHELL D.L. *Biochem Biophys Acta* 740: 355-361, 1983.
11. AJIRO K., NISHIMOTO T. *J Biol Chem* 260: 15379-15381, 1985.
12. ISHII Y., BENDER M.A. *Mutation Res* 79: 12-32, 1980.
13. TAKAHASHI K., KANETO, K., NISHIYAMA, C., NAKANO K. *Mutation Res* 144: 265-270, 1985.
14. TAKAHASHI K., KANEKO K., NISHI Y., INUI N. *Mutation Res* 174: 279-284, 1986.
15. KUNIKAZU K. *Mutation Res* 208: 109-113, 1988.
16. LEE F.Y., FLANNERY D.J., SIEMANN D.W. *Cancer Res* 52(13): 3515-3520, 1992.
17. SRINIVAS R., SRINIVAS K., SURIANARAYANA T. *Biochem Int* 27(2): 221-229, 1992.
18. NICOLOFF H., RIEGER R., MICHAELIS A. *Mutat Res* 208: 173-178, 1988.
19. DEL CAMPO A., ROMERO J. *Ciencia* 2(1): 7-16, 1994.
20. TJIO J.H., LEVAN A. *Annu Estc Exptl Aula Dei* 2: 21-64, 1951.
21. NAVARRETE M.H., CAMPOS E.S., MARTIN-HURTADO S. *Morfología Normal y Patológica* 712: 239-247, 1983.
22. ALLER P., GONZALEZ-FERNANDEZ A., CORONADO C., DE LA TORRE C. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 111(4): 283-292, 1983.
23. TAMM I., HAND R., CALIGURY L.A. *J Cell Biol* 69: 229-240, 1983.
24. ALLER P. *Cell differnt* 11: 203-209, 1982.
25. LOWRY O.H., ROSEBROUGH J., FARR A.L., RANDALL A.L. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
26. DE LA TORRE C., NAVARRETE M.H. *Exptl Cell Res* 88: 171-174, 1974.
27. GIMENEZ-MARTIN G., DE LA TORRE C., LOPEZ-SAEZ J.F. *Mechanisms and control of Cell Division*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc Stoudsburg, pp. 261-307, 1977.
28. GARCIA-HERDUGO G., GONZALEZ-FERNANDEZ A., LOPEZ-SAEZ J.F. *Exptl Cell Res* 104: 1-6, 1976.
29. GIMENEZ-MARTIN G., DE LA TORRE C., DEL CAMPO A., GONZALEZ-FERNANDEZ A. *Bio Cell* 46: 161-174, 1982.
30. GONZALEZ-FERNANDEZ A., SANS J., ALLER P., DE LA TORRE C. *Cell Biol Int Rep* 9: 237-243, 1985.
31. HAN S., UDVARDY A., SCHDEL P. *J Mol Biol* 183: 13-29, 1985.
32. WEBB M.L., MAGUIRE K.A., SAMSON T.J. *Nucleic Acids Research* 15(20): 8547-8560, 1987.
33. WEBB M.L., SAMSON T.J. *J Biol Chem* 263(10): 4745-4748, 1988.
34. DE LA TORRE C., GIMENEZ-MARTIN G., SELMAN A.M., GONZALEZ-FERNANDEZ A. *European J Cell Biol* 41: 19-24, 1986.