

00381
2ej 5



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO DE LA DISPOSICION DE LA CROMATINA EN NUCLEOS
INTERFASICOS DE HEPATOCITOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA LA
M. EN C. CLARA ESQUIVEL HUESCA

México, D. F. a de agosto de 1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- I Resumen
- II Introducción
 - a) La Biología Celular
 - b) El núcleo celular
 - c) La cromatina
 - d) La cromatina durante la interfase
 - e) Métodos utilizados para el estudio de la disposición de la cromatina.
- III Objetivo
- IV Materiales y métodos
 - a) Procedimientos para microscopía electrónica
 - b) Procedimientos para estudios cualitativos
 - b.1 Proyección de negativos para obtener los esquemas
 - b.2 Procedimiento para hacer modelos de la reconstrucción tridimensional de la cromatina.
 - b.3 Procedimiento para la comparación de los modelos
 - c) Procedimiento para el estudio semicuantitativo y cuantitativo.
 - c.1 Procedimiento para la individualización de bloques de cromatina.
 - c.2 Procedimiento para la obtención del volumen de los bloques de cromatina.
 - c.3 Procedimiento para la digitalización de la imagen y captura de datos.
 - c.4 Procedimiento para la transferencia de la información de una microcomputadora a otra con mayor capacidad de memoria
 - c.5 Procedimiento para calcular la masa y volumen de la cromatina, superficie total y posición de los centroides de la cromatina y de la superficie total.
- V Resultados
- VI Discusión
- VII Conclusiones
- VIII Bibliografía

I Resumen

Se han hecho varias investigaciones parciales o indirectas sobre la distribución de la cromatina en interfase las cuales sugieren en su gran mayoría, que en vegetales no está distribuida al azar. Actualmente se sabe que hay asociación de los cromosomas con el nucleolo y la envoltura nuclear, pero no se conoce la topología exacta de los cromosomas en células de mamífero en interfase. El propósito del presente estudio fue investigar si la distribución de la cromatina en núcleos interfásicos de mamífero se encuentra al azar o muestra un patrón de ordenamiento. Se utilizó una metodología desarrollada en nuestro laboratorio que consistió en hacer tinción en bloque en hígado de ratas adultas con ácido fosfotúngstico (PTA) después de la fijación y antes de la deshidratación; se incluyó en resina epóxica con el propósito de hacer compatible un método de contraste preferencial para cromatina con el corte seriado. Se analizaron las imágenes de micrografías electrónicas de cortes de 100 nm de espesor, por medio de métodos manuales y computarizados. Se hicieron modelos de reconstrucciones tridimensionales totales y parciales de la cromatina en 20 núcleos de hepatocitos de rata, en láminas de poliuretano de 3 mm de grosor a 30,000 X. En estos modelos se representó la disposición de los grumos de cromatina mayores de 138 nm y de los filamentos no menores de 34 nm. Los modelos mostraron que a la resolución de la microscopía electrónica la cromatina parece una red tridimensional de láminas y filamentos, pero se distinguen agrupaciones de elementos, muy notorias, principalmente en la parte central de los núcleos, alrededor tanto del nucleolo central como de los laterales y adosados a la envoltura nuclear. Hacia los casquetes, la cromatina se dispone como una capa continua de espesor irregular. Las reconstrucciones parciales de ocho cortes de la parte meridional, mostraron que solamente existen en esta zona 8 ó 9 cuerpos cromatinicos: diecisiete de veinte núcleos con ocho y los otros tres con nueve. Los acúmulos de la cromatina perinucleolar siempre se adosan a la cubierta nuclear, trece de veinte núcleos los presentaron diametralmente opuestos y los otros siete en forma angular de 50 a 125 grados. El acúmulo más conspicuo y fácil de comparar es el de la cromatina perinucleolar del nucleolo central que se extiende hasta ponerse en contacto con la envoltura nuclear; los grumos de la cromatina perinucleolar de los nucleolos laterales son más pequeños que el anterior. El lugar que ocupa la cromatina del nucleolo lateral fue el quinto en doce núcleos, el sexto en siete y en uno el cuarto. El volumen total de la cromatina compacta en esta zona se sitúa entre 10 y 12.5 micras cúbicas, el cual es cerca de la tercera parte del volumen estudiado. Los volúmenes de los acúmulos de cromatina compacta relacionada con los nucleolos varía entre 1 y 4 micras, lo que representa del 3 al 10 % del volumen del núcleo en esta zona. En siete de ocho núcleos estudiados en forma total, es muy notoria la similitud de los resultados. Los datos respecto a la masa y superficie de la cromatina, superficie total, posición de los centroides y de la superficie total mostraron una baja dispersión a excepción de un núcleo cuyos resultados respecto a masa, volumen y superficie, representan casi el doble debido a que quizá se trate de un núcleo tetraploide.

II Introducción

a) La Biología Celular

En la historia de la Biología Celular se pueden definir claramente dos periodos: el período clásico y el período moderno o actual. El período clásico está comprendido desde 1665 (año en que R. Hook publicó su libro "Micrografía") hasta el año 1932, en el que se inventa el primer microscopio electrónico; el período moderno nace con el invento de este aparato y se prolonga hasta nuestros días (Moreno y Shvartzman, 1978).

La historia de la Citología está íntimamente relacionada con la de otras ciencias que han aportado conocimientos que a su vez, han ayudado a conocer a un nivel más básico la organización de los seres vivos. También los avances técnicos han permitido ir descifrando poco a poco los más intrincados problemas biológicos, hasta permitir en nuestros días el tener una visión precisa de la gran complejidad de los organismos vivos y más en particular de la célula.

Con la introducción del microscopio se pudo dilucidar que a este nivel de observación todas las estructuras ordinarias de los seres vivos pueden ser reducidas a un denominador común, la célula (Asimov, 1985).

En 1665 el científico inglés Robert Hooke, al utilizar un microscopio compuesto construido por él mismo, descubrió que el corcho, procedente de la corteza de un árbol, estaba construido por compartimientos extraordinariamente pequeños similares a una esponja muy fina. A estos orificios los denominó «células», que comparó con pequeñas habitaciones tales como las celdas de un monasterio. A Hooke se le atribuye el haber dado a conocer la primera información importante obtenida por microscopía cuando publicó sus observaciones en su libro "Micrografía" en 1665; también señaló que algunas clases de células estaban llenas de «jugos» pero aún así, otorgó especial atención a la gruesa pared celular muy visible. Más tarde otros microscopistas hallaron células similares también llenas de líquido, pero ahora en tejidos vivos, sin embargo, aún cuando ya habían estudiado las células vivas, los primeros investigadores aparentemente no reconocieron su contenido protoplasmático y trabajos como "Anatomía de las Plantas", publicado en 1675 por el profesor italiano de medicina, Marcello Malpighi, trata enteramente de paredes celulares más que de contenidos celulares (Asimov, 1985; Avers, 1983; Cronquist, 1969; Moreno y Shvartzman, 1978).

El primer reconocimiento claro del contenido vivo de la célula puede haber sido hecho por el botánico italiano Bonaventuri Corti, quien en 1772 observó movimiento protoplásmico en las células del alga Chara. (Cronquist, 1969).

El líquido coloidal que llenaba ciertas células fue denominado protoplasma ("la primera forma") por el fisiólogo checo Jan Evangelista Purkinje en 1839, y el botánico alemán Hugo von Mohl extendió el término para designar el contenido de todas las células (Asimov, 1985; Cronquist, 1969). El anatomista alemán Max Johann Sigismund Schultze destacó la importancia del protoplasma como la "base física de la vida" y demostró la semejanza esencial del

protoplasma en todas las células, tanto vegetales como animales, tanto en los organismos simples como en los complejos (Asimov, 1985).

Hubo de pasar siglo y medio, para que gradualmente se hiciera más patente a los biólogos que todos los seres vivos estaban constituidos por células y que cada una de estas representaba una unidad independiente de vida. Algunas formas de vida -tal como ciertos microorganismos- estaban formados por una sola célula; los de mayores dimensiones eran el resultado de la cooperación de muchas células. Uno de los primeros en proponer tal punto de vista fue el fisiólogo francés René-Joachim-Henri Dutrochet; no obstante su comunicación publicada en 1824, pasó inadvertida y la teoría celular ganó importancia tan solo después de que Matthias Jacob Schleiden y Theodor Schwann de Alemania, la formularon independientemente, en 1838 y 1839 (Asimov, 1985; Avers, 1983; De Robertis y De Robertis, 1983).

La teoría celular es respecto a la Biología, como la teoría atómica respecto a la Química y a la Física. Su importancia en la dinámica de la vida fue establecida cuando, alrededor de 1860, el patólogo alemán Rudolf Virchow afirmó en una sucinta frase latina que <<todas las células proceden de células>>. Demostró que las células de los tejidos enfermos eran producidas por la división de células originalmente normales. (Asimov, 1985).

En aquel entonces ya resultaba evidente que todo organismo vivo, incluso los de mayores dimensiones empezaban su vida como una célula única. Uno de los primeros microscopistas, Johann Ham, ayudante de Leeuwenhoek, había descubierto en el semen pequeños cuerpos que más tarde fueron denominados "espermatozoides" (palabra derivada del griego que significa "semilla animal"). Mucho más tarde, en 1827, el fisiólogo alemán Karl Ernst von Baer identificó el óvulo, o célula huevo de los mamíferos. Los biólogos llegaron a la conclusión de que la unión de un óvulo y un espermatozoide daba como resultado un óvulo fecundado, a partir del cual eventualmente se desarrollaba un organismo completo mediante repetidas divisiones (Asimov, 1985).

En 1882, O. Hertwig publicó su monografía denominada "La célula y el tejido", en la que, basándose en las características de la célula, su estructura y función, trató de realizar una síntesis general de los fenómenos biológicos; de este modo surgió la Citología como una rama separada de la biología (De Robertis y De Robertis, 1983).

Es evidente que el conocimiento citológico ha avanzado por dos motivos principales. El primero es el aumento del poder de resolución de los instrumentos de análisis y en especial las técnicas de microscopía electrónica y de difracción de rayos X. El segundo consiste en la convergencia con otros campos de la investigación biológica, particularmente con la genética, fisiología y bioquímica (De Robertis y De Robertis, 1983).

b) El núcleo celular

Aún cuando ya se había establecido la teoría celular y se sabía que un organismo completo se desarrollaba a partir de múltiples divisiones celulares, la cuestión fundamental durante el siglo

XVIII fué: ¿Como se dividen las células?. La respuesta a esta cuestión se encontraba en un pequeño "glóbulo" de material relativamente denso que se observaba en el interior de la célula, cuya existencia fue dada a conocer por Robert Brown el descubridor del movimiento browniano en el año de 1831, quién lo denominó <<núcleo>>. (Asimov, 1985; Avers, 1983; Moreno, y Schwartzman, 1978).

Si un ser unicelular se dividía en dos partes y una de ellas contenía el núcleo intacto, esta parte con núcleo era capaz de crecer y dividirse, en tanto que la otra no lo hacía. Desafortunadamente los estudios del núcleo y del mecanismo de la división se mantuvieron estancados durante un largo periodo de tiempo, debido al hecho de que la mayoría de las células eran más o menos transparentes, de tal forma que no podían distinguirse sus subestructuras. Luego mejoró la situación, gracias al descubrimiento de algunos colorantes que podían teñir ciertas partes de la célula, respetando otras. Un colorante denominado "hematoxilina" (obtenido a partir del palo de Campeche) teñía de negro el núcleo celular y le permitía destacar claramente sobre el fondo de la célula (Asimov, 1985; Avers, 1983; De Robertis y De Robertis, 1983 y Moreno, y Schwartzman, 1978).

Después de que Guillermo Enrique Perkin y otros químicos comenzaron a producir colorantes sintéticos, los biólogos dispusieron de toda una serie de ellos para escoger (Asimov, 1985). Gracias a estos colorantes y a otros avances tecnológicos, se pudo conocer más acerca de la morfología y fisiología del núcleo, en base a sus características y a otras características de la célula, actualmente se sabe que existen dos fases fácilmente observables del ciclo celular, la de la mitosis y la de la interfase. La mayoría de las células se encuentran en interfase y la mitosis se puede considerar como un proceso relativamente ocasional en los organismos adultos (Karp, 1984).

Hasta el momento se han reconocido varios elementos estructurales que conforman el núcleo celular en interfase, estos son:

La envoltura nuclear.-Presenta dos membranas que circunscriben y separan a la zona nuclear de la citoplasmática; sin embargo, ambas zonas quedan interconectadas por la presencia de poros nucleares.

El nucleoplasma o jugo nuclear.-Representa la mayor parte del volumen nuclear. Abarca las áreas entre la cromatina condensada o heterocromatina, por lo tanto contiene a la eucromatina o cromatina laxa como algunos componentes ribonucleoproteicos. esta formado por agua y diversas moléculas solubles.

Cromatina condensada o heterocromatina.-Este componente se dispone, en su mayoría en la zona adyacente a la membrana nuclear y en la periferia del nucleolo.

Nucleolo.-Es la estructura ribonucleoproteica más compleja; puede ser único o múltiple. Generalmente es esférico y acidófilo.

Partículas ribonucleoproteicas.-Coimpreden a las fibras y gránulos pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados (De Robertis y De Robertis, 1983).

c) La cromatina

El descubrimiento de la cromatina se le puede atribuir a Miescher (1869) quien fue el primero en aislar el ácido desoxirribonucleico (ADN), pero fue hasta 1879, cuando el biólogo alemán Walther Fleming logró visualizarlo pues encontró, que con ciertos colorantes rojos podía teñir un material particular en el núcleo celular, material que se hallaba distribuido en éste en forma de pequeños gránulos, a los que denominó <<cromatina>>. Examinando este material, Fleming fue capaz de apreciar algunas de las modificaciones que experimentaba durante el proceso de la división celular (Asimov, 1985; De Robertis y De Robertis, 1983 y Moreno y Schwartzman, 1978) y en el año de 1882, Fleming publicó un importante libro en el cual describe este proceso con más detalle: al iniciarse la división celular, la cromatina se agrega para formar unos filamentos y la cubierta delgada que limita al núcleo parece disolverse, mientras, un objeto tenue situado por fuera de aquel se divide en dos llamándolo áster, debido a que los filamentos que se desprendían de él le conferían el aspecto de una estrella. Después de dividirse, las dos partes del áster se dirigían a puntos opuestos de la célula. Sus filamentos se unían al parecer a los de la cromatina, que entretanto se habían dispuesto en el centro de la célula, y el áster arrastraba a la mitad de los filamentos de cromatina hacia cada una de las mitades celulares. Como resultado, la célula se estrangulaba en su mitad y, finalmente se dividía en dos células. Se desarrollaba entonces un núcleo celular en cada una de las dos mitades, y el material cromatínico, que era rodeado por la membrana celular se fragmentaba de nuevo en pequeños gránulos (Asimov, 1985; Moreno y Schwartzman, 1978).

Fleming denominó al proceso de división celular <<mitosis>>, debido al importante papel desempeñado en él por los filamentos de cromatina. (Asimov, 1985; De Robertis y De Robertis, 1983; Moreno, y Schwartzman, 1978).

En 1882 Ernesto Strasburger describe la división celular en vegetales y la denomina <<cariocinesis>> y es el primero en emplear los términos "citoplasma" y "nucleoplasma" en su sentido actual (Asimov, 1985).

En 1888, el anatomista alemán Wilhem von Waldemeyer dio al filamento de cromatina el nombre de <<cromosoma>> (del griego "cuerpo coloreado"), y fue tan bien aceptado que ha persistido hasta nuestros días. No obstante, debe indicarse que los cromosomas, a pesar de su nombre, son incoloros en su estado natural, con lo que resulta sumamente difícil distinguirlos, sin embargo, a pesar de todo, fueron vistos ya en 1848 en células de flores por el botánico alemán Friedrich Benedict Hofmeister (Asimov, 1985; Avers, 1983; Cronquist, 1949; De Robertis y De Robertis, 1983 y Moreno y Schwartzman, 1978).

R. Feulgen y H. Rossenbeck en 1924 describieron un nuevo método para probar la presencia de ácido desoxirribonucleico, De esta forma se pudo ir conociendo cada vez mejor la composición química de la célula, de tal forma que con el término "cromatina" actualmente se designa al material Feulgen positivo que es posible observar durante la interfase (De Robertis, y De Robertis, 1983; Fawcett, 1981; Moreno, y Schwartzman, 1978).

En general se describe a la cromatina, en microscopía óptica como

formada por filamentos y gránulos asociados en un retículo desespiralizado o red de cromatina que se tiñe irregularmente y que se presenta así solamente durante el período de la interfase (Moreno, y Schwartzman, 1978).

En 1928, Heitz distinguió básicamente dos componentes bien definidos: la cromatina en forma condensada <<heterocromatina>>, descrita como la parte del cromosoma que se compacta después de la telofase, que se reconoce como cromocentro o nucléolo falso en el núcleo en interfase y la dispersa <<eucromatina>>, que corresponde a las partes del cromosoma que se decondensan y se hacen invisibles durante la telofase. (Tomás-Martín, 1976).

Estudios autorradiográficos a nivel de microscopía electrónica, muestran que las regiones de la cromatina dispersa o eucromatina son las zonas donde se lleva a cabo la transcripción activa (Kuroiwa y Tanaka, 1971b).

Los cromocentros junto con filamentos retorcidos de cromatina, representan partes de los cromosomas, y que permanecen condensadas durante la interfase. Esta heterocromatina frecuentemente se halla cerca de la envoltura nuclear y también adherida al nucléolo (Alberts, B. y col., 1986; De Robertis, E.D.P. y E.N.F. De Robertis, 1983; Wilson, G. B. y Morrison, J. H. 1976).

En 1966 Brown distinguió dentro de la heterocromatina dos formas distintas: la heterocromatina facultativa y la heterocromatina constitutiva. La facultativa es una zona compacta en uno de los miembros de un par cromosómico, que estar presente en los núcleos de algunas células y no en otras y la constitutiva corresponde a la que se localiza en la región de los centrómeros y los telómeros o que forma zonas definidas en ambos miembros del par cromosómico en todas las células de un individuo y en todos los individuos de la especie (De Robertis y De Robertis, 1983).

Durante la división celular, esa red de cromatina se espiraliza, alcanza su grado más alto de condensación y forma los cromosomas (Alberts, 1983; Moreno y Schwartzman, 1978; Sáez y Cardoso, 1978; Wolfe, 1981).

Los términos cromatina y cromosoma, si bien casi se refieren al mismo material, no son sinónimos. Cuando se habla de cromatina se describe al ADN desespiralizado o parcialmente desespiralizado durante la interfase, mientras que cuando se habla de cromosomas se describe al material cromatínico altamente condensado visible durante la mitosis (Moreno y Schwartzman, 1978).

Con microscopía electrónica y técnicas de contraste con sales de uranio y plomo, se observa que la cromatina compacta o heterocromatina es densa a los electrones, así como también la cromatina laxa o eucromatina, pero ésta no está definida en acúmulos de cromatina compacta. (Boutielle y col, 1974).

Los cortes finos al microscopio electrónico han contribuido poco al conocimiento de la organización de la cromatina dentro del núcleo interfásico, lo que contrasta con los resultados que se tienen mediante los procedimientos de extendidos del material nuclear que han sido investigados en combinación con estudios bioquímicos y ultraestructurales (Comings, 1972).

Los extendidos de cromatina muestran a esta formada por unidades repetitivas <<los nucleosomas>>. Los estudios que se han

hecho sobre los nucleosomas mostraron que en microscopio electrónico se presentan como esferas de 10 nm. en forma de cuentas de collar unidas entre sí por un filamento de ADN. Esta disposición se comprueba en casi todas las cromatinas observadas; sin embargo, no representa la verdadera estructura, sino un artificio como resultado de la pérdida de la histona H_1 . Con tratamientos en los que no se extrae la H_1 , la disposición en forma de collar de cuentas sobre un hilo no aparece, y las cuentas se tocan entre sí formando una fibra de 10 nm que representa el primer grado de organización de la cromatina (Cordunella, 1978; Fawcett, 1981; Felsenfeld, 1978; Hankcock y Boulikas, 1982; Hewish y Bourgoyne, 1973; Karp, 1984; McGhee y Felsenfeld, 1980; Tsanev y Petrov, 1976; Van Holde y col, 1974; Wolfe, 1981; Yakura y col, 1978).

Kornberg en 1974 reportó que cada nucleosoma contiene cerca de 200 pares de bases (pb), un octámero de histonas, constituido por cada una de las cuatro histonas (H_2A , H_2B , H_3 y H_4). Alrededor del octámero hay dos vueltas de ADN de 140 pb. La parte central del nucleosoma tiene la forma de un disco aplanado de 11 nm X 5.7 nm. La histona H_1 se adhiere al puente de ADN que une los nucleosomas. Esta histona interviene en el plegamiento de la fibra de 10 nm. Las cadenas de nucleosomas se pueden plegar para formar una fibra gruesa de 20 a 30 nm, en la cual hay seis nucleosomas por vuelta de hélice (De Robertis y De Robertis, 1983; Felsenfeld, 1978; McGhee y Felsenfeld, 1980).

Esta estructura se estabiliza por la interacción entre varias moléculas de H_1 . La fibra gruesa se observa en los cromosomas metafásicos y también en parte del núcleo interfásico, y probablemente representa una forma inactiva de la cromatina, es decir que no es capaz de transcribir (De Robertis y De Robertis, 1983; Fawcett, 1981; Karp, 1984; Stephen, 1981; Wilson y Morrison, 1976).

El empaquetamiento del ADN en el nucleosoma es de 5 a 7 veces, en la fibra gruesa de 40 veces y en el cromosoma metafásico de 5,000 a 10,000 veces (Cordunella, 1978; De Robertis y De Robertis, 1983).

Varios estudios físicos y bioquímicos realizados sobre cromatina aislada, han permitido determinar sus características y se ha demostrado que estas son las mismas que las de los cromosomas, y que consiste fundamentalmente en ADN, ARN, proteínas histónicas y no histónicas, fosfolípidos y cationes (Leninger, 1979; Morton-Bradbury, 1978; Pardon y Richards, 1979).

c) La cromatina durante la interfase

En la mayoría de los núcleos en interfase, la cromatina condensada se observa a lo largo de la pared interna de la cubierta nuclear, asociada a los nucleolos y en forma de grumos dispersos en el nucleoplasma (Brasch y Setterfield, 1974; Comings, D. E., 1968; Monneron y Bernhard, 1969), vista de esta forma, la individualidad de los cromosomas no es fácilmente identificable. La posibilidad de que los cromosomas estén arreglados en un patrón ordenado en el núcleo interfásico ha inquietado a muchos investigadores (Avivi y Feldman, 1980; Bak y col, 1979;

Bourgeois y col, 1985; Comings, D. E. 1968; Evans y Filion, 1982; Murray, y Davies, 1979; Hadlaczky y col, 1986).

La idea de que los cromosomas están ordenados durante la la interfase fue expresada en 1885 en un trabajo de Rabl y confirmada por Boveri en 1909 (citados por Bourgeois y col, 1985 y Hadlaczky y col, 1986). Aunque desde entonces se han acumulado evidencias que muestran que los cromosomas no están distribuidos al azar, pues la cromatina se encuentra asociada a la envoltura nuclear, a los nucleolos y a la matriz nuclear, no hay conclusiones definitivas que tiendan a mostrar como están arreglados (Avivi y Feldman, 1980; Comings, 1968; Evans y Filion, 1982; Murray y Davies, 1979).

Los trabajos que han abordado este problema no han obtenido resultados satisfactorios, o éstos han sido contradictorios y al parecer hasta el momento es imposible identificar a cada uno de los cromosomas en forma individual en el núcleo interfásico (Bourgeois y col, 1985). Sin embargo, otros estudios citológicos han mostrado que tanto en plantas como en animales, los cromosomas en interfase están siempre unidos a la membrana nuclear (Avivi y Feldman, 1980; Back y col, 1979; Bourgeois y col, 1985; Murray y Davies, 1979). Esta unión tiene lugar por medio de un andamiaje periférico asociado a la membrana interna de la cubierta nuclear y por segmentos cromosómicos específicos tales como centrómeros, telómeros y posiblemente otras regiones (Avivi y Feldman, 1980; Back y col, 1979; Moens y Church, 1977; Avivi y Feldman, 1980).

Respecto a los centrómeros, en núcleos de células vegetales se ha observado que se encuentran agrupados juntos y unidos en una área limitada de un sitio polar de la envoltura nuclear, mientras que los telómeros están unidos a la envoltura en el lado opuesto. Los telómeros están más espaciados y separados que los centrómeros (Avivi y Feldman, 1980; Bak y col, 1979).

Además de observarse este arreglo polarizado de los cromosomas denominado configuración Rabl, se ha visto que la cromatina ocupa una posición periférica en el núcleo, y deja un espacio interior para el nucleolo o los nucleolos (Avivi y Feldman, 1980).

La heterocromatina se ha observado en una posición más periférica que la eucromatina, lo que sugiere que la heterocromatina de cierto modo protege a la eucromatina más interna contra agentes mutágenos, clastógenos y virus (Avivi y Feldman, 1980).

Al parecer, los cromosomas nunca llegan a decondensarse a tal punto que pierdan su integridad tridimensional en distintos dominios durante la interfase (Stack y col, 1977), como en las células de las glándulas salivales de dípteros por ejemplo *Drosophila* con cromosomas politénicos.

Todas las observaciones que se describen en los párrafos anteriores, sugieren la existencia de un orden en la disposición de las estructuras nucleares, sin embargo la organización de la cromatina y el arreglo de los cromosomas no están bien definidos en la mayoría de las células animales. Existen muchas evidencias de la existencia de orden en el núcleo interfásico, pero en su mayoría son indirectas, porque se derivan de estudios que no incluyen a todo el juego completo de cromosomas. A continuación se mencionan algunos de los métodos indirectos que se han utilizado en el estudio de la

disposición de la cromatina durante la interfase.

e) Métodos utilizados para el estudio de la disposición de la cromatina.

Los citogenetistas en varios tipos de estudios han tratado de deducir la topología de la cromatina y/o los cromosomas en interfase, por medio de técnicas como las siguientes:

-Estudios en cortes de células.

Con esta metodología, aproximadamente de 1904 a 1935, los citólogos clásicos como Strasburger, Sykes, Overton, Stomps, Nemeč, Tahara, Muller, Gates, Lawrence y Watkins, estudiaron la distribución de los cromosomas homólogos notificando que tienden a asociarse unos con otros en metafases somáticas. (Avivi y Feldman, 1980).

-Técnicas en las que se practicó compresión (squash) con o sin pretratamientos para impedir la metafase.

De 1958 a 1977, investigadores como Hiraoka, Mitra, Kitany, Steinitz-Sears, Reitberger, Butterfass, Brown y Stack, Wagenaar, Ashley y Wagenaar, Chauhan, Werry y otros, por medio de este método, corroboraron la tendencia de los cromosomas homólogos a estar unidos unos con otros, e indicaron así la estrecha asociación de dos juegos de homólogos. Esta tendencia se encontró en un gran número de representantes de plantas superiores tanto de las familias de las monocotiledóneas como de las dicotiledóneas (Avivi y Feldman, 1980 y Stack y col, 1977).

-Técnicas de Bandeó C con Giemsa (NORs).

En la década pasada y cuando se inició esta, algunos investigadores como Stack y col, Gosh y Roy y Evans y Fillion, han demostrado una cierta orientación de los cromosomas en células vegetales (Evans y Fillion, 1982; Ghosh y Roy, 1977; Fussel, 1975; Stack y col, 1977).

-Por medio de medidas de la frecuencia de translocación específica entre los cromosomas.

El problema de la posición relativa de los cromosomas entre sí, fue investigado con este método en cultivos de linfocitos humanos de pacientes con anemia de Franconi o con síndrome de Bloom y en células normales tratadas con Treminon, y se obtuvieron evidencias de cierto orden (Hager y col, 1982; Vogel y Schroeder, 1974).

-Uso de irradiación con un microhaz de laser-ultravioleta.

Algunos investigadores como Zorn y colaboradores en 1979 estudiaron el grado de apareamiento que ocurre entre los cromosomas homólogos, con el propósito de ver si ocupan dominios estables dentro del núcleo y también si tanto los cromosomas homólogos como los no homólogos, guardan relaciones de vecindad estable a través del ciclo celular. Concluyeron que los cromosomas homólogos ocupan dominios estables, que hay relaciones de vecindad entre los cromosomas homólogos y también entre los no homólogos (Citados por Hager y col, 1982). Cremer y colaboradores en 1982, examinaron las interrelaciones de la posición de los cromosomas en la interfase y la metafase, y concluyeron que están relacionadas (Cremer y col, 1982).

-Estudios de computación con ayuda de microscopia de fluorescencia

Este tipo de estudios se han realizado desde 1984 por Gruenbaun y colaboradores, quienes han contribuido al conocimiento de un cierto orden en la distribución de los cromosomas en células vegetales (Hadlaczký y col, 1986).

-Hibridación in situ

Rappold, G. A. y sus colaboradores hicieron este tipo de estudios desde 1984 con fragmentos de ADN clonados (Hadlaczký, y col, 1984). También se ha utilizado el método de hibridación in situ no autorradiográfico. Este procedimiento implica una sonda de ARN unido a sulfidril-trinitrofenil-mercurio y a un anticuerpo marcado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) como sistema de detección, para determinar la posición de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) en el núcleo interfásico (Wachtler y col, 1986). También con este método de hibridación in situ con marcado de secuencias clonadas con tritio, se ha probado que secuencias específicas de ADN tienden a ocupar territorios específicos en cromosomas de eucariontes (Schertham y col, 1987). Como se puede ver, este método aplicado durante la interfase también ha demostrado cierto orden.

-Técnica de inmunofluorescencia.

Por medio de anticuerpos específicos para los centrómeros de cromosomas en células de mamíferos, Hadlaczký y col en 1986, mostraron evidencias directas de que los cromosomas no se localizan al azar durante la interfase (Hadlaczký y col, 1986).

-Técnica de reconstrucción tridimensional.

Murray y Davies (1979) utilizaron esta técnica para reconstruir los cuerpos cromatinicos en el núcleo interfásico de eritrocitos maduros del anfibio Triturus cristatus y determinaron el número de sitios de unión a la envoltura nuclear. Sus resultados sugieren que el número de cuerpos de cromatina es aproximadamente igual al número de cromosomas del juego diploide, pero comentan que los datos son insuficientes para demostrar si los cromosomas están dispuestos en un patrón ordenado en esta fase del ciclo celular.

Bourgeois y col en 1982, del grupo de Boutiellé, utilizaron también la técnica de reconstrucción tridimensional de células sincronizadas de la línea celular humana TG. Estudiaron varios tiempos desde interfase temprana a tardía, tomaron como referencia especial la región en la cual el nucleolo está unido a la envoltura nuclear. Los resultados mostraron que la estructura de la región de la cromatina que rodea al nucleolo es remarcablemente estable durante la interfase. También utilizaron esta técnica en fibroblastos de humano durante la interfase, como indicadores ultraestructurales usaron al nucleolo y el corpúsculo de Barr; determinaron que existen patrones de distribución similares al comparar sus coeficientes de proximidad y la distribución uniforme. (Bourgeois y col, 1985).

Todas estas técnicas, junto con los estudios bioquímicos, han dado importante información acerca de la asociación de los cromosomas con el nucleolo, la envoltura nuclear y los complejos de poro. Es casi evidente que existe un orden cromosómico durante la interfase pero también algunos investigadores al querer demostrar

el orden han obtenido resultados contradictorios, otros investigadores se han mostrado exépticos al dudar de ciertos resultados por no estar de acuerdo con el método empleado. Como se ve, hasta ahora no se han obtenido evidencias de orden que demuestren patrones acerca de la disposición de los cromosomas interfásicos debido a dificultades de tipo técnico y principalmente a la naturaleza intrínsecas del material biológico.

Las dificultades de tipo técnico estan relacionadas principalmete con el contraste de la cromatina para su estudio al microscópio electrónico, este se ha visto limitado por la carencia de un contraste preferencial o específico de fácil empleo. Algunos autores describen métodos de alta especificidad (Cogliati y Gautier, 1973; Moyne, 1974; Peters y Giese, 1971) que, sin embargo, dan un contraste muy bajo y además son poco accesibles en nuestro medio.

Un método sencillo es el que fue elaborado por Vázquez Nin y col (1973) en el cual se emplea glicolmetacrilato como resina de inclusión y ácido fosfotúngstico como agente preferencial de contraste. Sin embargo, es muy difícil obtener cortes seriados en este tipo de resina.

Respecto a las dificultades debidas al material biológico para el estudio de la disposición de la cromatina o los cromosomas durante la interfase, son principalmente que en esta fase del ciclo celular la cromatina se encuentra parcialmente decondensada, lo que impide observar si existe orden en su distribución cuando se observan cortes de núcleos interfásicos que muestran una estructura bidimensional, por lo que se requiere trabajar con modelos tridimensionales de la disposición de la cromatina reconstruidos a partir de cortes seriados.

III Objetivo

Objetivo General

El objetivo general de este estudio fue investigar la distribución de la cromatina en núcleos interfásicos de hepatocitos de rata, por medio de reconstrucciones tridimensionales a partir de cortes seriados para microscopía electrónica.

Objetivos específicos

- Obtener un contraste preferencial de la cromatina y al mismo tiempo lograr los cortes seriados.
- Una vez obtenidos los cortes seriados, hacer modelos físicos de la reconstrucción tridimensional de la cromatina de tal forma que se pueda observar su distribución en diferentes zonas con el propósito de compararlos, rotarlos y ver si existen zonas semejantes.
- En aquellos núcleos que tuvieran semejanza, estudiar las zonas equivalentes y determinar en estas: número, posición y volumen de bloques de cromatina.

IV Materiales y Métodos

a) Procedimientos para microscopía electrónica

Para obtener la tinción preferencial de la cromatina y al mismo tiempo lograr los cortes seriados, hubo necesidad de practicar tres procedimientos.

Se eligieron como material biológico hepatocitos de ratas. Se utilizaron seis ratas adultas (Rattus norvegicus) proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias, se anestesiaron con éter, se realizó una laparotomía con el propósito de obtener el hígado. Una vez obtenido el órgano mencionado, se cortó en pequeños trozos de 1 a 3 mm³, los que fueron inmediatamente fijados en glutaraldehído al 2.5 % diluido en amortiguador de fosfatos 0.2 molar pH 7.2. Después de la fijación fueron seguidos los tres procedimientos que a continuación se mencionan:

Procedimiento 1

Fijación

Después de hora y media de fijación, como se mencionó en el párrafo anterior, se lavaron los trocitos de tejido cinco o seis veces con amortiguador de fosfatos 0.2 M. a pH 7.2, se deshidrataron y embebieron con glicolmetacrilato (GMA) siguiendo la técnica de Leduc y Bernhard, como a continuación se detalla. (Leduc y Bernhard, 1967).

Deshidratación

La deshidratación se practicó en el mismo medio de inclusión (GMA) preparado a diferentes porcentajes para hacer una deshidratación gradual.

- En una solución de GMA al 70 % se hicieron dos cambios, uno a los 10 y otro a los 20 minutos.
- En GMA al 80 %, igualmente se practicaron dos cambios como los antes mencionados.
- En GMA al 97 % también dos cambios de la misma forma.
- En una solución 50:50 de GMA 97 % y solución de inclusión no polimerizada, se dejaron 20 minutos. Sin hacer cambios.
- En solución de inclusión no polimerizada, también 20 minutos.

Preinclusión

- Se colocaron los trocitos de tejido en un prepolímero de GMA durante 18 horas.

Inclusión

- Se pasaron los trocitos de tejido a cápsulas de gelatina con prepolímero nuevo, se etiquetaron, se taparon

procurando que llevaran la menor cantidad posible de aire y se colocaron en una cámara para polimerización con luz ultravioleta, durante 24 horas.

Microtomía

Se hicieron cortes ultrafinos de aproximadamente 100 nm de espesor en un ultramicrotomo MT 2 Sorvall. Los cortes fueron montados en portaespecímenes de cobre de un solo agujero (anillos

de Sjöstran) con película de soporte de Formvar. Para todos los procedimientos de microtomía, se siguieron las recomendaciones descritas por investigadores que han trabajado con cortes seriados para hacer reconstrucciones tridimensionales (Fahrenbach, 1984; Wettstein y Graver, 1973)

Contraste

Se realizó el contraste preferencial para cromatina de Vázquez Nin y Col. (1973) con ácido fosfotúngstico (PTA) al 3 % P/V en HCl 1 N, una alícuota de esta solución de PTA se ajustó a un pH de 2.3 con NaOH 1 N. Se efectuó el contraste de los cortes durante media hora a temperatura ambiente, después, se enjuagaron con agua bidestilada, se dejaron secar y finalmente se procedió a observarlos en un microscopio de alta resolución EM 10 ZEISS.

El GMA es una resina en la cual es difícil obtener series grandes de cortes, se intentaron varios procedimientos para tratar de lograrlas:

- Las pirámides truncadas hechas en los bloques para hacer los cortes ultrafinos, se cubrieron con varias sustancias, con el propósito de crear un perímetro adhesivo para facilitar la unión entre los cortes. Se utilizó resina epóxica, que es hidrofóbica, se dejó polimerizar sobre las pirámides durante 24 horas a 60° C.
- También se cubrieron con un acrílico comercial que polimerizó a temperatura ambiente casi en forma instantánea (Krazy Kola Loka, Group Cyanomex S. A. de México).
- Se intentó lo mismo con resina sintética de montaje de la utilizada para preparaciones fijas para microscopía óptica. Las pirámides así cubiertas se dejaron secar así a 60° C, 24 horas.
- Otras pirámides fueron cubiertas con Formvar y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- Finalmente se intentó lograr primero el contraste, se sumergieron los bloques de GMA en solución de PTA, unos a temperatura ambiente y otros a 60° C durante una hora; luego se cubrieron las pirámides con resina epóxica. (Diagrama de procedimientos, Procedimiento 1).

Procedimiento 2

Para este procedimiento, se utilizó el mismo fijador antes mencionado, pero se intentó hacer el contraste preferencial para cromatina con PTA, inmediatamente después de la fijación y antes de la deshidratación con alcoholes graduales para posterior inclusión del material en resina epóxica. A continuación se detalla este procedimiento:

Fijación

Se practicaron dos tiempos de fijación con el fijador ya mencionado, unos trocitos de hígado fueron fijados durante 15 minutos y otros durante una hora.

- Los que fueron fijados por 15 minutos, durante los 45 minutos siguientes se mantuvieron en una solución V/V del mismo fijador y agua oxigenada al 30 %, con el fin de facilitar la formación de enlaces entrecruzados entre fijador y las proteínas.

Después de estos tiempos de fijación, ambas muestras fueron lavadas cinco o seis veces con amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.2.

Contraste en el bloque de tejido

Cada una de las muestras fueron divididas en tres con el propósito de efectuar el contraste con PTA y se probaron los siguientes pH: 2, 2.3 y 2.7. El pH se ajustó con NaOH 1N.

Se practicaron dos tiempos de contraste: 30 y 60 minutos para cada una de las soluciones de contraste con PTA a los tres pH diferentes.

Deshidratación

La deshidratación se llevó a cabo en alcoholes graduales:

- En etanol 70, 80 y 96%, los trocitos de tejido se mantuvieron en cada uno durante 20 minutos.
- En etanol absoluto, se hicieron tres cambios de 15 minutos cada uno.

Paso intermedio entre la deshidratación y la inclusión.

- En óxido de propileno se hicieron tres cambios de 20 minutos cada uno.

Preinclusión

Se preparó una mezcla V/V de óxido de propileno y epón en la que se mantuvieron los trozos de tejido durante 18 horas a temperatura ambiente.

Inclusión

Se utilizaron tabletas para inclusión como molde, se introdujeron las muestras en el medio de inclusión, resina epóxica al 100 %. La polimerización del medio de inclusión se llevó a cabo en una estufa a 60° C durante 24 horas. ✓

Microtomía

Se hicieron cortes ultrafinos de los bloques a un grosor de 100 nm en un ultramicrotomo MT 2 Sorvall. Los cortes se montaron también en portaespecímenes de ranura (Anillos de Sjöstrand) sobre membranas de Formvar. Después se procedió a observarlos en el microscopio de alta resolución EM 10 ZEISS (Diagrama de procedimientos, Procedimiento 2).

Procedimiento 3

También se utilizó el mismo fijador que en los procedimientos anteriores, glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos a una molaridad de 0.2 y un pH de 7.2. En este procedimiento se intentó nuevamente hacer el contraste preferencial para la cromatina con PTA en el bloque del tejido, después de la fijación y de varios tratamientos de lavado. Posteriormente se deshidrató con alcoholes graduales para después embeber el material en resina epóxica, como se detalla enseguida.

Fijación

Como ya se mencionó, se utilizó el mismo fijador, pero en este procedimiento solamente se practicó un solo tiempo de fijación que fue de hora y media.

Lavado

Después de la fijación se enjuagó el material con el amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 y entonces se dividieron las muestras en tres lotes para hacer tres tipos de lavado como se señala:

Lavado A

Se hizo durante 30 minutos con una solución de HCl 0.2 M a la que se le ajustó el pH a 2.3 y 2.5 con NaOH 0.2 M. Esta solución se cambió cada 5 minutos hasta completar 30 minutos de lavado.

Lavado B

Este consistió en lavar con una solución isotónica de sacarosa también durante media hora e igualmente con cambios cada 5 minutos.

Lavado C

Se llevó a cabo con HCl 0.2 M, pero en este caso el pH fue ajustado con una solución de acetato de sodio 0.2 M y también se probaron los mismos pH que en el lavado A, 2.3 y 2.5.

Contraste en el bloque de tejido

Muestras procedentes del lavado A

Estas se pasaron a soluciones de PTA a las que se les ajustó el pH a 2.3 y 2.5 respectivamente con NaOH 0.2 M, por una hora.

Muestras procedentes del lavado B

Estas muestras se dividieron en cuatro lotes con el propósito de probar el contraste con PTA a los mismos pH, 2.3 y 2.5, pero unos especímenes se trataron con solución de PTA a la cual se le ajustó el pH con NaOH 0.2 M y otras con solución de PTA en la que se utilizó acetato de sodio 0.2 M para ajustar el pH. El tiempo de contraste también fue de una hora al igual que en el caso anterior.

Muestras procedentes del lavado C

Estas muestras se mantuvieron durante una hora también en solución de PTA a pH de 2.3 y 2.5, pero este se ajustó con acetato de sodio 0.2 M.

Deshidratación

La deshidratación se efectuó también en alcoholes graduales al igual que en el procedimiento 2.

Paso intermedio entre la deshidratación y la inclusión

Se utilizó como agente intermedio el óxido de propileno, se hicieron los tres cambios de 20 minutos cada uno.

Preinclusión

Se realizó al igual que en el procedimiento 2.

Inclusión

Se hizo en resina epóxica siguiendo los mismos pasos que se realizaron en el procedimiento 2.

Microtomía

Los cortes ultrafinos se hicieron en un ultramicrotomo MT 2 Sorvall. El grosor de los cortes fue de 100 nm, estos se montaron en anillos de Sjöstrand con película de Formvar para observarse en el microscopio electrónico de alta resolución EM 10 C. ZEISS (Diagrama de procedimientos. Procedimiento 3).

b) Procedimientos para estudios cualitativos.

Ya que se obtuvo el contraste preferencial de la cromatina, se hicieron cortes seriados de 100 nm de espesor con un ultramicrotomo Sorvall MT 5000. Se logró una serie de 185 cortes, de 20 en 20 fueron montados en portaespecímenes de ranura de 2 X 1 mm. Posteriormente, se procedió a observar los cortes en un microscopio de alta resolución provisto de un rotador del portaespecimen que permitió alinear siempre el lado basal de los cortes con uno de los ejes de la cámara. Se fotografiaron 10 núcleos en serie a una amplificación de 2,400 X, siempre en la misma posición.

b.1 Proyección de negativos para obtener los esquemas.

Los negativos de cada una de las micrografías electrónicas de los cortes seriados de los 20 núcleos fueron proyectados en una cámara lúcida para dibujo, a un factor de amplificación constante que fue de 8.1; para esquematizar los perímetros de todos los grupos de cromatina compacta mayores que 138 nm y de los filamentos no menores de 35 nm, en papel albanene.

b.2 Procedimiento para hacer modelos de la reconstrucción tridimensional de la cromatina.

Los esquemas obtenidos por medio del procedimiento descrito en el párrafo anterior, fueron reproducidos en láminas de poliuretano de 3 mm de grosor, el cual fue calculado tomando en cuenta el factor de amplificación, de tal forma que al construir los modelos la morfología verdadera de los núcleos no se alterara.

Para reproducir en las láminas de poliuretano los grupos de cromatina, se pegaron los esquemas hechos en el papel albanene sobre éstas y se recortaron con una navaja. Si algunos grupos de cromatina no eran contiguos a otros representados en el mismo corte del núcleo, se unían a uno o varios grupos cercanos por medio de puentes delgados del mismo poliuretano.

Después de haber representado todos los grupos de cromatina de un corte en las láminas de poliuretano, se pegaba una hoja de papel celofán sobre éstos y entonces, se podían retirar los puentes que sostenían a los grupos de cromatina que se encontraban aislados y también se retiraba el papel albanene. Sobre el otro lado de la misma hoja de celofán se podía pegar otro corte. De tal forma que quedaban pegados siempre de dos en dos cortes contiguos.

Después de este procedimiento se sobrepusieron cada uno de los juegos de dos en dos cortes seriados se alinearon según el formato fotográfico con el propósito de mantener el paralelismo del eje nuclear y de esta forma se lograron obtener modelos a un aumento final de 30,000 X, los cuales se podían abrir en cualquier zona y visualizar la disposición de la cromatina.

b.3 Procedimiento para la comparación de los modelos.

Una vez obtenidos los modelos, fueron estudiados en varias zonas con el propósito de distinguir agrupaciones de elementos de cromatina muy notorias que se presentaran en forma constante. También se pudieron rotar los núcleos, hasta hacer coincidir estas estructuras de cromatina que se presentaban en forma constante, tales como los acúmulos de la cromatina perinucleolar, tanto de los nucleolos centrales como la de los laterales.

Cuando se logró determinar la existencia de estos acúmulos de cromatina que tienen relevancia biológica y que se presentaban en forma constante, entonces se procedió a definir una zona de ocho cortes para el estudio parcial de los núcleos. En esta zona se encontraban incluidos los acúmulos de cromatina perinucleolar tanto del nucleolo central como al menos uno de los laterales.

c) Procedimiento para el estudio semicuantitativo y cuantitativo.

c.1 Procedimiento para la individualización de los bloques de cromatina.

Definidas las zonas de estudio como ya se describió, se hicieron esquemas también sobre papel albanene a un aumento final de 20 000 X en los que se individualizaron acúmulos grandes de cromatina contenidos en los ocho cortes correspondientes a estas zonas.

Se alineaban los esquemas conforme el formato fotográfico, sobreponiendo correctamente los ejes de los núcleos y se marcaba con un color un grumo grande de cromatina de cualquiera de los cortes, luego se seguían marcando con el mismo color los grumos de cromatina que presentaban continuidad tanto con los cortes que se encontraban hacia arriba como hacia abajo, siguiendo la serie. De esta forma se lograron individualizar acúmulos grandes de cromatina con diferentes colores para estudios cuantitativos posteriores. Estos acúmulos de cromatina, se numeraron en el sentido de las manecillas del reloj, comenzando a partir del bloque de cromatina adyacente a la del nucleolo central.

c.2 Procedimiento para la obtención del volumen de los bloques de cromatina.

Una vez individualizados los acúmulos grandes de cromatina en estos esquemas hechos a un aumento final de 20,000 X, se procedió a calcular los volúmenes de los grumos seleccionados en la zona de estudio, por medio de un programa para microcomputadora desarrollado por el Dr. Vázquez Nin del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Depto de Biol de la Fac de Ciencias.

Con este programa, se digitalizaban los perímetros de los grumos de cromatina por medio de un digitalizador (Tableta graficadora Apple) incorporado a una microcomputadora Franklin ACE 1200, además se incorporaba al programa con el dato del grosor del corte en micras y se calibraba en mm., el programa transformaba

esta medida en micras y finalmente se obtenían los volúmenes totales de los bloques de cromatina contenidos en los ocho cortes en micras cúbicas, para compararlos posteriormente, aplicándoles estadística descriptiva.

c.3 Procedimiento para la digitalización de la imagen y captura de datos.

Las imágenes de los esquemas obtenidos a un aumento final de 20,000 X según el procedimiento descrito en b.1, también se digitalizaron usando la tableta graficadora con un programa para digitalización de la imagen y captura de datos desarrollado por el Dr. César González del Lab. de Biofísica del Depto de Física de la Fac de Ciencias.

Este programa permitía digitalizar las imágenes de los perímetros tanto del núcleo, como de cada uno de los grumos de cromatina contenidos en cada uno de los cortes en una matriz de 128 X 128 puntos, además se podían almacenar datos tales como: identificación del núcleo, número total de cortes en los cuales estaba íntegramente contenido y el número de corte que se estaba digitalizando en ese momento. También este programa permitía reformar las imágenes digitalizadas en caso de equivocarse, de tal forma que la captura de los datos se almacenara lo más correctamente posible.

c.4 Procedimiento para la transferencia de información de una microcomputadora a otra con mayor capacidad de memoria.

Con el propósito de tener todos los datos juntos en un solo archivo del total de núcleos estudiados, hubo la necesidad de desarrollar un programa que permitiera transferir los datos de una microcomputadora de menor capacidad de memoria a otra de mayor capacidad para posteriormente hacer los estudios comparativos entre todos los núcleos en estudio. Este programa también fue desarrollado en el Laboratorio de Biofísica del Depto de Física de la Fac de Ciencias.

c.5 Procedimiento para calcular la masa y volumen de la cromatina, superficie total y posición de los centroides de la cromatina y de la superficie total.

El cálculo de estos parámetros también fue hecho por medio de un programa desarrollado en el laboratorio de Biofísica del Depto de física de la Fac de Ciencias. Este programa con las imágenes digitalizadas con el procedimiento descrito en c.3, calculó los volúmenes basándose también en los perímetros del núcleo y de los grumos de cromatina, conociendo el grosor del corte y la amplificación final de la imagen, se obtuvieron los volúmenes y la masa. Se calculó el centro gravitacional de cada uno de los núcleos y de esta forma se pudo conocer la posición de los centroides tanto de la cromatina como de la superficie. Una vez obtenidos estos datos se les aplicó estadística descriptiva para ver que tan semejantes son.

DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTOS

FIJACION
Glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos 0.2 M. a pH de 7.2

PROCEDIMIENTO 1

PROCEDIMIENTO 2

PROCEDIMIENTO 3

1:30 h.
LAVADO
5 ó 6 veces con amortiguador de fosfatos 0.2 M. a pH 7.2
DESHIDRATACION E INCLUSION EN GMA
GMA 70%
2 cambios: uno a los 10 min., otro a los 20 min.
GMA 80 y 9% I
Los mismos cambios y el mismo tiempo.
SOLUCION 50:50 de GMA 97% y SOLUCION DE INCLUSION NO POLIMERIZADA, 20 min.
SOLUCION DE INCLUSION NO POLIMERIZADA, 20 min.
PREINCLUSION
PREPOLIMERIZO 18 h.
INCLUSION
En prepólimero nuevo, en capsulas de gelatina.
POLIMERIZACION
En cámara con luz ultravioleta. 24 h.

15 min.
1 h.
45 min.
El mismo fijador + 3-0₂ 1/1 V/V
5 ó 6 veces, con
Con amortiguador de fosfatos 0.2 M. a pH de 7.2

1:30 h.
LAVADO
30 min.
LAVADO A
LAVADO B
LAVADO C
Con HCl 0.2 M. ajustando el pH con NaOH 0.2 M. a:
Con solución isotónica de sacarosa
Con HCl 0.2 M. ajustando el pH acetato de sodio 0.2 M. a:

TINCION EN BLOQUE
pH probados: 2.3 y 2.5
Con solución de PTA al 3 % P/V en HCl 1 N.
ajustando el pH con NaOH 1 N.
El pH se ajustó con NaOH 0.2 N.
El pH se ajustó con acetato de sodio 0.2 N.
pH 2, pH 2.3, pH 2.7
Tiempos probados:
10 min. 1 h. 2 h.
pH 2.3
pH 2.5
Tiempo probado: 1 h.

DESHIDRATACION
En etanol 70% 80% y 96%, 20 min. en c/u.
En etanol absoluto, tres cambios de 12 min. c/u.
Óxido de propileno, 3 cambios de 20 min. c/u.
PREINCLUSION
En óxido de propileno y epon 9/V, 18 h.
INCLUSION
En resina epóxica al 100%, a 60°C, 24 h.

V Resultados

a) De los procedimientos para microscopia electrónica.

Procedimiento 1

Se obtuvieron imágenes de alto contraste de la cromatina en los cortes del material incluido en glicolmetacrilato (GMA) y contrastado con ácido fosfotúngstico (PTA), pero los resultados obtenidos respecto a la microtomía, no fueron como se esperaban debido a que los cortes seriados en esta resina son muy difíciles de lograr, probablemente debido a que es una resina hidrofílica.

En aquellos procedimientos en los que se intentó hacer series grandes de cortes en GMA y al mismo tiempo lograr el contraste preferencial de la cromatina, se obtuvieron los siguientes resultados:

- En las pirámides que se cubrieron con epón, se obtuvieron cortes seriados, pero no el contraste de los cortes con el PTA.
- En las que se cubrieron con el acrílico comercial, se lograron obtener tiras de cortes, pero no se lo logró el contraste.
- Las pirámides con resina sintética de montaje fueron difíciles de cortar debido a que las cuchillas se mellaban fácilmente además de que el material no se contrastaba.
- Con Formvar, no se obtuvieron cortes seriados.
- Con el último procedimiento en el que se intentó lograr primero el contraste preferencial de la cromatina y después el corte seriado, sí se lograron obtener series de cortes, pero el contrastante no penetró en el tejido.

Procedimiento 2.

Respecto a la fijación, fue mala en aquellos bloques en los que se utilizó el fijador durante 15 min seguidos de una mezcla de el mismo fijador más peróxido de hidrógeno.

Se obtuvo buena fijación en los especímenes fijados durante una hora, pero respecto al contraste, se observó que no fue específico, porque aunque se contrastó la cromatina, todavía se observaban glucoproteínas y partículas ribonucleoproteicas.

Se determinó que el paso crítico en este procedimiento fue el cambio de pH, de 7.3 (el del amortiguador) a un pH muy ácido (el de las soluciones de contraste con PTA).

Procedimiento 3.

En este procedimiento en el que se probaron varias soluciones de lavado de manera de obtener un cambio gradual de pH de 7.3 a 2.3 o 2.5.

Los mejores resultados se obtuvieron en el material que fue sometido al lavado A y contrastado con una solución de PTA a pH 2.3 el cual se ajustó con una solución de NaOH 0.2 M. El contraste de la cromatina fue muy bueno pero no tan específico.

En el material que fue sometido al lavado B y contrastado con

una solución de PTA con el pH ajustado también a 2.3 presentaba un contraste de la cromatina no tan bueno como en el caso anterior, pero mucho más específico, los gránulos ribonucleoproteicos no se observaron, y el nucleolo tomó un tono gris muy claro. Al hacer la tinción de Bernhard que es preferencial para partículas ribonucleoproteicas, en un corte contiguo de una de las series, se demostró que las partículas ribonucleoproteicas estaban presentes pero no se unían al agente de contraste, comprobándose así la efectividad de nuestro método (Fig. 1, A y B). Fue en este material donde se resolvieron ambos problemas el del contraste preferencial de la cromatina y el de lograr la obtención de series largas de cortes (Ver Fig. 2).

No se obtuvieron buenos resultados respecto al contraste de la cromatina en el material que fue sometido al lavado C.

b) Del procedimiento para estudios cualitativos

El estudio cualitativo de los modelos mostró que la cromatina compacta se presenta como un estrato continuo que se encuentra en contacto con la envoltura nuclear, interrumpido por los poros nucleares y que a esta resolución, la cromatina parece una red tridimensional de acúmulos y filamentos (Ver Fig. 3). Sin embargo, al observar el modelo en forma parcial, se lograron distinguir agrupaciones de elementos de cromatina muy notorios que se presentan en forma constante, tales como: bloques irregulares de cromatina siempre adosados a la membrana nuclear, la cromatina perinucleolar del nucleolo central y la de los laterales también adosada a la membrana nuclear (Ver Fig. 4, A y B).

El estudio demostró que los hepatocitos de rata tienen de 2 a 4 nucleolos, no se encuentran en el análisis tridimensional células con un solo nucleolo.

c) Del procedimiento para el estudio semicuantitativo y cuantitativo.

c.1 Del Procedimiento para la individualización de bloques de cromatina.

Al individualizar los bloques de cromatina en la zona de estudio de ocho cortes de la parte meridional, se encontró que en estas zonas existen de 8 a 9 acúmulos de cromatina (Ver Fig. 5).

La cromatina perinucleolar del nucleolo central es más conspicua que la de los laterales que es más pequeña.

En trece de los núcleos estudiados, las cromatinas perinucleolares del nucleolo central y la de uno de los laterales se encontraron diametralmente opuestas (Figs. 5 y 6). Al sobreponer los esquemas donde se representaron estos acúmulos de cromatina y hacer girar los ejes longitudinales, se observó que coincidían, pues ocuparon un espacio bien definido (Fig. 6b). En siete núcleos se encontraron dispuestas en forma de ángulo de 50 a 125 grados (Fig. 5 c y d).

El lugar que ocupa la cromatina compacta que rodea al nucleolo

lateral en estos ocho cortes fue el quinto en doce núcleos, el sexto en siete y en uno el cuarto lugar (Ver Figs. 5).

c.2 Del procedimiento para la obtención del volumen de los bloques de cromatina.

Los resultados de los volúmenes totales calculados para cada uno de los acúmulos de cromatina contenidos en la zona de estudio de ocho núcleos estudiados con este procedimiento se muestran en la tabla I.

El volumen total de la cromatina compacta en estos ocho cortes se sitúa entre 10 y 12.5 micras cúbicas, el cual ocupa cerca de la tercera parte del volumen total estudiado.

Los volúmenes de los acúmulos de cromatina compacta relacionada con el nucleolo central o el nucleolo lateral varían entre 1 y 4 micras cúbicas, lo que representa del 3 al 10 % del volumen de la parte de núcleo estudiada.

El análisis de estos datos con estadística descriptiva muestra que la fracción de la cromatina que no forma parte de los nucleolos es muy semejante, se observa baja dispersión de los datos pues su desviación estándar es de solamente 0.038 y respecto a la fracción que sí forma parte de los nucleolos sucede lo mismo, la desviación estándar es solamente de 0.056 lo que muestra también su semejanza (Tabla I).

c.3 Del procedimiento para la digitalización de la imagen y captura de datos.

Los programas desarrollados para este propósito mostraron resultados satisfactorios, la digitalización de la imagen se hizo con relativa facilidad, fue posible reformarla y hacer la captura de los datos de la mejor manera, para que después se utilizaran para cálculos de masa, volumen, área, etc.

c.4 Del Procedimiento para la transferencia de información de una microcomputadora a otra con mayor capacidad de memoria.

Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios pues se lograron transferir todos los datos y almacenarlos en un solo archivo.

c.5 Del procedimiento para calcular la masa y el volumen de la cromatina; superficie total del núcleo y posición de los centroides de la cromatina y de la superficie total.

El procedimiento también fue satisfactorio, en la tabla No. II y las gráficas 1 y 2 se muestran los resultados de los ocho núcleos estudiados.

En siete de estos ocho núcleos es muy notoria la similitud de los resultados, los datos muestran una baja dispersión a excepción del núcleo "H" cuyos resultados respecto a la masa, el volumen y la superficie representa casi el doble de los obtenidos en los otros siete núcleos, debido a que quizá se trate de un núcleo tetraploide.

VI Discusión

El estudio sobre la posición y orientación de la cromatina durante la interfase, es de suma importancia debido a que representa a los cromosomas parcialmente decondensados. Algunos investigadores consideran que a pesar de esta decondensación, no llegan a perder su integridad física (Stack y col, 1977). Muchos investigadores se han interesado en tratar de esclarecer si existe disposición ordenada de los cromosomas en interfase y en células mitóticas de organismos superiores. La literatura sobre este tema es muy extensa y frecuentemente conflictiva (Spelling y Lüdtke, 1981; Bennet, 1982). Hay revisiones muy útiles que contienen numerosos ejemplos de varios arreglos cromosómicos particulares que difieren de disposiciones al azar (Comings, 1968; Avivi y Feldman, 1980).

Probablemente las discrepancias que existen para tratar de demostrar que realmente hay un orden en la disposición de los cromosomas durante la interfase, se deben a factores técnicos tales como el procedimiento de compresión (squash) que inevitablemente reduce las estructuras tridimensionales a bidimensionales. Si además de ser manipuladas de esta forma las células recibieron tratamiento previo con colchicina y se someten a extensos lavados, ambos tratamientos provocan una redistribución de los cromosomas que induce a mostrar la disposición de éstos al azar (Hadlaczy y col, 1986). Bennet al respecto ha expresado el temor de aceptar aquellas observaciones que se han hecho con estas técnicas, pues al tratar de reconstruir en estas condiciones una metafase, es como querer reconstruir un huevo que previamente se ha aplastado y que si además el material se ha pretratado con colchicina, entonces es similar a tratar de reconstruir un huevo revuelto (Bennett, 1982).

Aparte de estas técnicas que han dado resultados no muy aceptados por los investigadores que se han interesado en este tema, se han utilizado otras como las que se mencionan en la introducción de esta tesis, que juntas han dado importante información acerca de la asociación de los cromosomas con el nucleolo, la envoltura nuclear y los complejos de poro, pero sin embargo, no dan la suficiente información para conocer la topología real de los cromosomas de células de animales durante la interfase, ni muestran ningún patrón ordenado de la disposición de los cromosomas.

La técnica de reconstrucción tridimensional a partir de micrografías electrónicas de cortes seriados de núcleos en interfase, los cuales no han sido alterados con ningún tratamiento, como es el caso del presente trabajo, permite analizar directamente la disposición de la cromatina (topología de los cromosomas) en núcleos interfásicos intactos, sin distorsionarlos y los muestra en una forma más cercana a como se encuentran "in vivo". Esta técnica ha sido sugerida para abordar este problema (Hadlaczy y col, 1986) y también ha sido utilizada para el estudio de la disposición de los cromosomas en metafase y en eventos

premeióticos y meióticos. (Bennet, 1982, 1984a y 1984b; Hepslop-Harrison y Bennet, 1983a y 1983b; 1984).

El estudio de la disposición de la cromatina requería de cortes seriados y una tinción específica o preferencial adecuada. A pesar de que hay métodos de contraste específicos para la cromatina como los obtenidos por Gautier, Peters, Moyné Gautier el estudio de la cromatina en interfase ha sido difícil, debido principalmente al bajo contraste que se obtiene con estos procedimientos (Gautier y Schreyer, 1970; Peters y Giese, 1971; Moyné, 1972 y 1973; Cogliati y Gautier, 1973). En 1973 desarrollaron un método de tinción preferencial de la cromatina en estado compacto y extendido, basado en el uso de glicolmetacrilato como medio de inclusión y el ácido fosfotúngstico como agente contrastante (Vázquez Nin y col, 1973), sin embargo no fue posible obtener cortes seriados en esa resina, por lo que fue necesario hacer una modificación a esta técnica para obtener el mismo tipo de contraste y al mismo tiempo lograr los cortes seriados (Esquivel y col, 1987). Este procedimiento, nos permitió estudiar la disposición tridimensional de la cromatina en hepatocitos durante la interfase, sin provocar ninguna de las alteraciones mencionadas. Además el método de contraste es preferencial para la cromatina en estado compacto y extendido dentro del núcleo. El nucleolo y otras partículas ribonucleoproteicas no se tiñen. Las bases químicas de la reacción de la cromatina y los componentes de la solución del ácido fosfotúngstico (PTA) no son conocidas y el procedimiento es empírico. (Quintarelli y col, 1971 a y b).

Consideramos que nuestra metodología es perfectamente aplicable a este tipo de estudios ultraestructurales relacionados con la cromatina y que requieren seriación en los cortes, por que se pueden obtener series hasta de más de ciento cincuenta cortes con relativa facilidad. Además ofrece la ventaja de no limitarse al uso del glicolmetacrilato como medio de inclusión. Al incluir el material en resina epóxica, no se presenta dificultad en la polimerización y se consigue la dureza adecuada del bloque para el corte (Rovira y col, 1985) Por otra parte, este método presenta la gran ventaja de que permite la realización de contrastes posteriores, ya sea uranilo-plomo para obtener una clara relación de la cromatina con las demás estructuras nucleares, o el método de Bernhard (Bernhard, 1969) que posibilita estudiar en cortes sucesivos del mismo núcleo, las relaciones de la cromatina con las partículas ribonucleoproteicas (Esquivel y col, 1987).

Se eligieron para este estudio las células del hígado de animales normales con una dieta regular pues no sufren cambios importantes debido a que generalmente se encuentran en fase G₁.

El análisis microscópico de los núcleos de hepatocitos interfásicos, observados en cortes seriados con tinción preferencial para el ADN no reveló ningún patrón ordenado de la disposición de la cromatina, solamente mostró una capa casi continua a lo largo de la pared interna de la envoltura nuclear interrumpida por los poros nucleares, la cromatina asociada a los nucleolos y acúmulos aparentemente dispersos en el nucleoplasma. Estos resultados también apoyan las observaciones previamente realizadas por otros investigadores sobre el arreglo de la

cromatina durante la interfase (Moneron y Bernhard, 1969; Hancock, y Boulikas, 1982).

En el material para microscopía electrónica, preparado con procedimientos habituales, las imágenes de estructuras de entidades separadas, se pueden observar fusionadas por superponerse en el espesor del corte. A diferencia del microscopio óptico el electrónico posee una profundidad de campo muy grande, lo que no permite diferenciar diversos planos de enfoque en el espesor del corte y así distinguir las estructuras superpuestas en el espesor de los cortes que constituyen la capa continua periférica y las continuidades con los acúmulos de cromatina internos y perinucleolares, los que obligan a establecer criterios más o menos arbitrarios, como el de no considerar más que estructuras de un tamaño superior a un umbral fijado por el observador, que ayudan a reconocer los límites de los acúmulos. Las imágenes fusionadas de la cromatina en los núcleos interfásicos pueden representar entidades separadas equivalentes a los cromosomas mitóticos (Mazia, 1961) y los miembros homólogos de bivalentes mitóticos (Vázquez Nin, y Echeverría, 1976). En el presente estudio, pensamos que también sucede lo mismo; se fusionan las imágenes de grumos pequeños y filamentos de cromatina. Con el propósito de evitar el problema de la fusión de las imágenes, se han hecho investigaciones en materiales sometidos a tratamientos mecánicos y fisicoquímicos (Fusel, 1975; Stack y col, 1977). En nuestro material, no se aplican tratamientos de este tipo, pues al emplear los criterios mencionados se obtuvo una definición de los límites de los acúmulos de cromatina lejos de la envoltura nuclear. Murray y Davies (1979) visualizaron los límites de los cuerpos cromatinicos de los eritrocitos de Triturus cristatus sin tratamiento, aunque en una forma burda probablemente debido a la extremada compactación de la cromatina en estas células.

Al observar los modelos tridimensionales, a "grosso modo", la cromatina compacta y la extendida se visualiza como una maraña que ocupa la mayor parte del espacio nuclear y no hay evidencia aparente de individualidad cromosómica. No se visualizan dominios espaciales ocupados por cromosomas como los politénicos de los núcleos de las glándulas salivales de las larvas de Drosophila melanogaster (Hochstrasser y col, 1986). Probablemente esto se debió a que durante la interfase los cromosomas no politénicos son muy sutiles, menos evidentes y están más entremezclados que los politénicos. Los modelos tridimensionales de la disposición de la cromatina en los núcleos interfásicos de los hepatocitos, nos permitieron determinar que los cortes centrales de las series eran los más útiles para nuestro estudio; en estas células uno de los nucleolos se localiza lejos de la envoltura nuclear, pero la cromatina que lo rodea siempre está adosada a la envoltura ocupando una posición casi estable, lo cual concuerda con lo descrito en otros tejidos (Bourgeois y col, 1981; Vázquez Nin y col, 1983).

Son varios los estudios en los que se hace evidente la disposición ordenada de zonas especiales de los cromosomas interfásicos que pueden ser individualizadas tanto en plantas como en animales tales como: los centrómeros (Evans y Filion, 1982;

EST. TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fussell, 1975; Gosh y Roy, 1977; Moens y Church, 1977; Sperling y Lüdtke, 1981; Hadlaczky y col, 1986), telómeros (Appels y col, 1978; Fussell, 1975), regiones que contienen la región del organizador nucleolar (NOR) (Wachtler y col., 1986) y cromosomas sexuales compactos (Bourgeois y col. 1985). Nuestros resultados apoyan estos hallazgos pues mostraron que patrones repetitivos de la disposición de la cromatina pueden ser descubiertos en las células hepáticas utilizando a los nucleolos como referencias de posición, a pesar de que la estructura nuclear es dinámica y que suceden cambios importantes en la organización de la cromatina durante la interfase (Kuroiwa y Tanaka, 1971a y b; Lafontaine y Lord 1974; Stack y col, 1977). El movimiento nuclear podría ser una posible fuente de variación de la estructura nuclear. Si estos desplazamientos no destruyen los patrones generales de la organización nuclear podrían causar el cambio en la posición relativa del nucleolo y la cromatina asociada a éste y la cromatina no asociada (De Boni y Mintz, 1986). Lo expresado anteriormente podría ser una fuente importante de variación en el estudio de células fijadas al utilizar como referencia al nucleolo, como en el presente estudio. La ayuda del análisis computarizado, de imágenes digitalizadas para el estudio de la distribución tridimensional de la cromatina, da más información acerca de los patrones repetitivos en diferentes núcleos del mismo tipo si algunas rotaciones u otro tipo de desplazamiento ocultan el orden de la posición relativa de los acúmulos.

Al parecer el problema fundamental para determinar el orden cromosómico durante la interfase, es la capacidad para individualizar a cada uno de los cromosomas, lo cual requiere de una gran habilidad debido a que en esta fase del ciclo celular están parcialmente decondensados, no obstante Bennet al respecto dice que se podría identificar en forma inequívoca a algunos o a todos los cromosomas en células particulares durante la interfase, si se conocieran los volúmenes relativos de cada cromosoma. Este tipo de estudios son útiles en plantas, principalmente en cereales (Bennet, 1982). Los resultados de nuestra investigación apoyan esta idea pues los volúmenes parciales de los bloques de cromatina contenidos en la zona de estudio fueron muy semejantes.

VII Conclusiones

La técnica de tinción en bloque con ácido fosfotúngstico después de la fijación en glutaraldehído, con la posterior deshidratación en alcoholes graduales e inclusión en resina epóxica, es preferencial para contraste de la cromatina y permite la obtención de cortes seriados con relativa facilidad, para este tipo de estudios y para otros relacionados con la cromatina.

La cromatina en núcleos interfásicos de hepatocitos de rata no se encuentra distribuida al azar, presenta patrones repetitivos en los cortes de la parte meridional de los núcleos donde se localizan el nucleolo central y uno de los laterales.

Al usar los nucleolos como referencia se descubrió una disposición ordenada de la cromatina durante la interfase, pues este material nunca se encontró distribuido al azar.

Pie de Figuras:

Fig. 1. Cortes contiguos de una serie. En A, parte de un núcleo de un hepatocito contrastado con PTA pH 2.3 por una hora (X 21 825). La cromatina compacta (c) está teñida en oscuro, se pueden observar filamentos (f) que son continuos con los agragados compactos y también los espacios intercromatinianos (flechas). En B un corte adyacente del mismo núcleo contrastado con el método de Bernhard para ribonucleoproteínas después de 30 minutos de EDTA; la cromatina compacta (c) está blanqueada y las ribonucleoproteínas fuertemente contrastadas en oscuro. Gránulos intercromatinianos (icg). También se observa la cromatina perinucleolar (p) blanqueada.

Fig. 2. Seis cortes contiguos de una serie de 56, de un núcleo de hepatocito contrastado con PTA a pH 2.3 por 1 hora. La cromatina compacta está fuertemente contrastada en oscuro. El nucleolo es gris homogéneo. No se ven partículas ribonucleoproteicas (X 5,335).

Fig. 3. Modelo de la reconstrucción tridimensional de la cromatina de un núcleo de hepatocito. En A 1, El eje longitudinal está en el plano de la fotografía, el componente cromatínico se observa como un estrato continuo a la superficie. Las perforaciones de este estrato corresponden a los poros nucleares. En A 2, el eje longitudinal es perpendicular a la fotografía. (X3,400). En B, Modelo de otro núcleo de hepatocito abierto, se muestra en sus dos mitades la distribución de la cromatina compacta. (X36,000).

Fig. 4. Vista parcial del modelo de un núcleo de hepatocito. En A, dos cortes contiguos sobrepuestos muestran la continuidad (flechas) de la cromatina perinucleolar (pn) con la cromatina compacta (pl) adyacente a la envoltura nuclear. n-espacio nucleolar (X12,500). En B, cuatro cortes contiguos sobrepuestos. Los grumos de cromatina que aparentemente están aislados, muestran continuidad con los de los cortes adyacentes, forman bloques grandes que representan acúmulos bien definidos entre las cabezas de flecha. (X12,500).

Fig. 5. Diagramas de los acúmulos de cromatina encontrados en secciones de ocho cortes de la parte meridional de los núcleos y que contienen a los nucleolos central y lateral. cn- cromatina que rodea al nucleolo central, in cromatina que rodea al nucleolo lateral. 1 a 8 acúmulos de cromatina densa que no está relacionada a los nucleolos. a) y b) Núcleos con ocho acúmulos de cromatina, la del nucleolo lateral se encuentra en el quinto lugar está diametralmente opuesta a la del nucleolo central. c) Núcleo con nueve acúmulos de cromatina, el del nucleolo lateral se encuentra en el sexto lugar y está dispuesta en forma angular respecto a la del nucleolo central. d) Núcleo con ocho acúmulos de cromatina, el del nucleolo lateral también se encuentra dispuesto en forma angular y en el sexto lugar. (X5,400).

Fig. 6. Esquemas que muestran la cromatina relacionada con los nucleolos en seis núcleos diferentes. La cromatina del nucleolo central (en tono claro) y la del nucleolo lateral (en tono oscuro) se encuentran adosadas a la cubierta nuclear y están diametralmente opuestas, de a-f (X5,400). En la parte inferior, sobreposición de los acúmulos de cromatina relacionada con los nucleolos de los seis núcleos de arriba, el eje longitudinal de los núcleos muestra la rotación llevada a cabo para hacerlas coincidir, nótese que ocupan un espacio bien definido. (X11,000).



Fig. 1

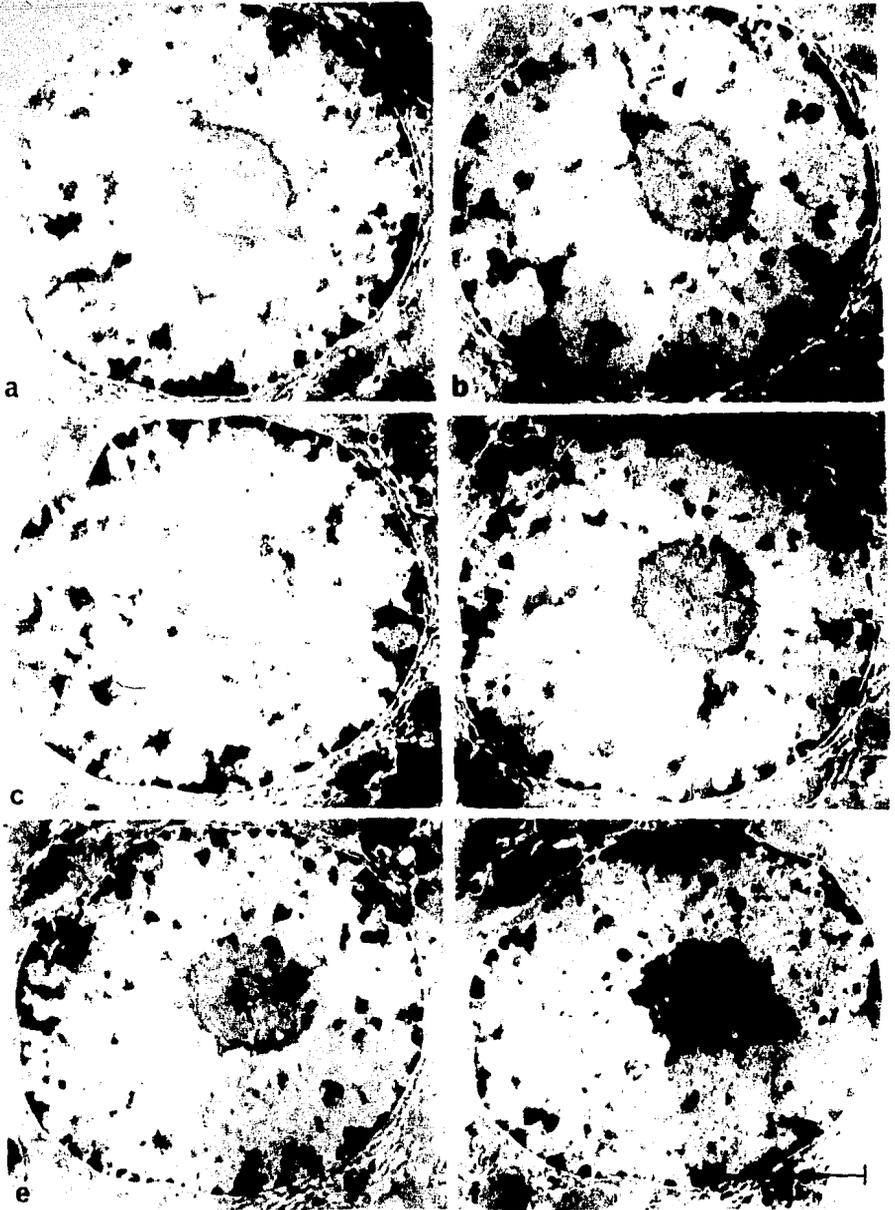


Fig. 2

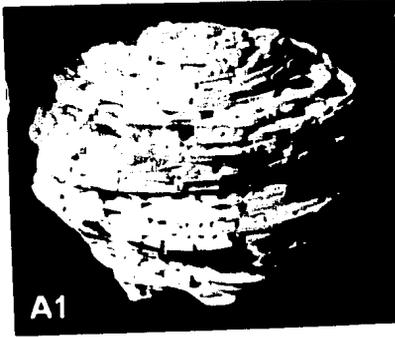


Fig. 3

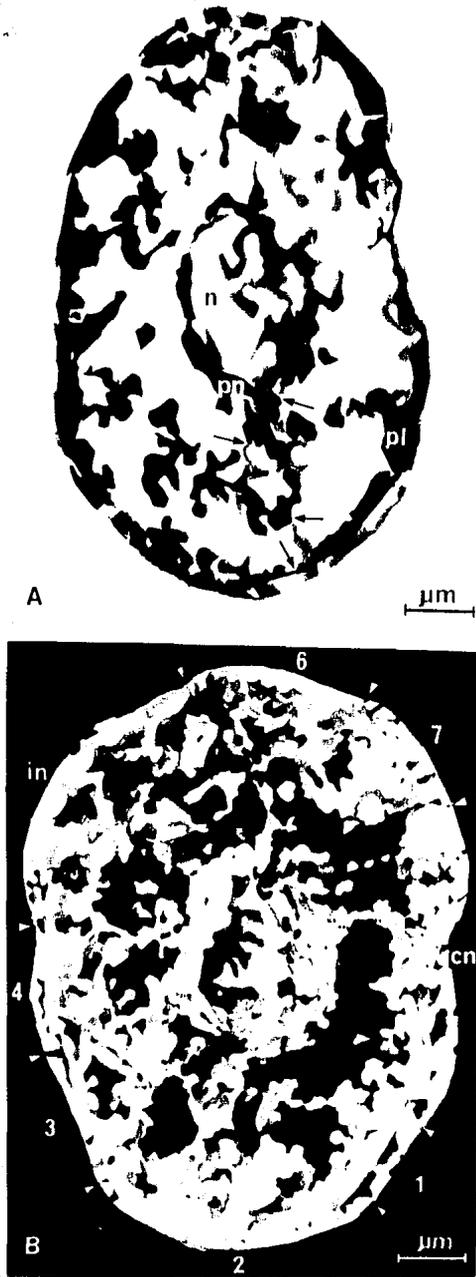


Fig. 4

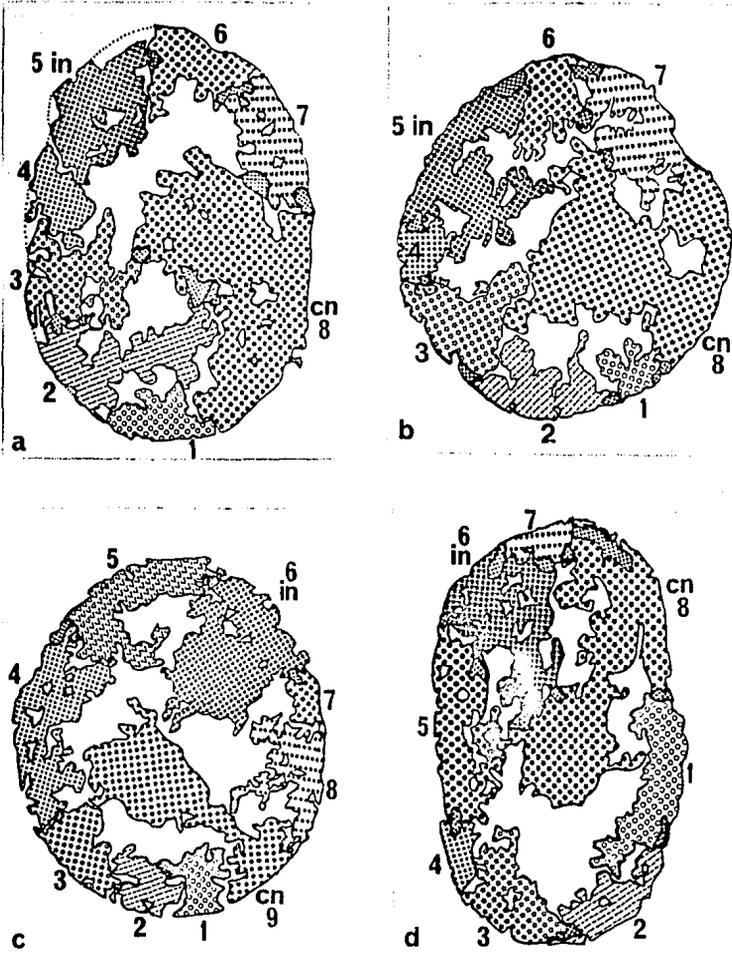


Fig. 5

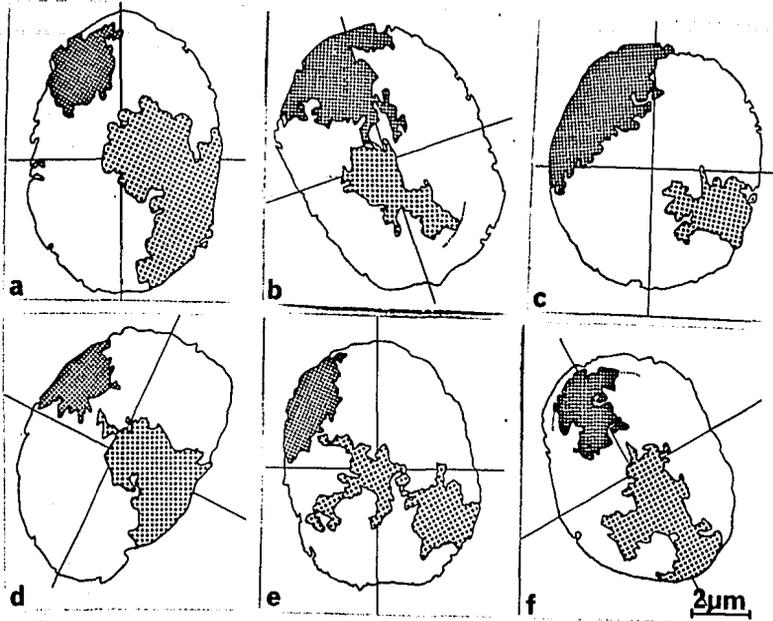


Fig. 6

TABLA I

VOLUMEN DE BLOQUES O ACUMULOS DE CROMATINA EN OCHO CORTES

NUCLEOS	Volumen total estudiado μm^3	Volumen de cromatina μm^3	Cromatina del nucleolo central		Cromatina del nucleolo lateral	
			μm^3	%	μm^3	%
A	39.9	12.5	1.7	13	3.2	8
B	36.5	11.7	2.5	21	1.3	11
C	40.0	10.5	3.9	37	1.4	13
D	39.6	14.7	1.7	9	2.7	18
E	35.2	10.8	2.2	21	1.0	10
F	38.4	10.7	2.1	20	1.0	10
G	33.7	10.1	2.9	28	1.5	15
H	30.3	11.1	3.2	28	1.2	11

% - Porcentaje del volumen total de la cromatina en la region estudiada.

Fracción de la cromatina que no forma parte de los nucleolos

$$\bar{X} = 0.315$$

$$\text{d. s.} = 0.038$$

Fracción de la cromatina que forma parte de los nucleolos

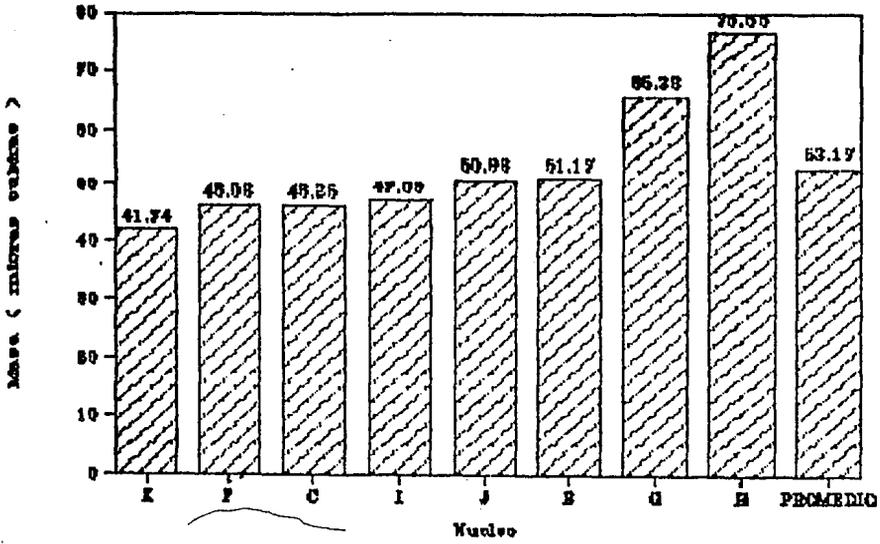
$$\bar{X} = 0.141$$

$$\text{d. s.} = 0.056$$

TABLA II PARAMETROS DE OCHO NUCLEOS RECONSTRUIDOS POR COMPUTACION

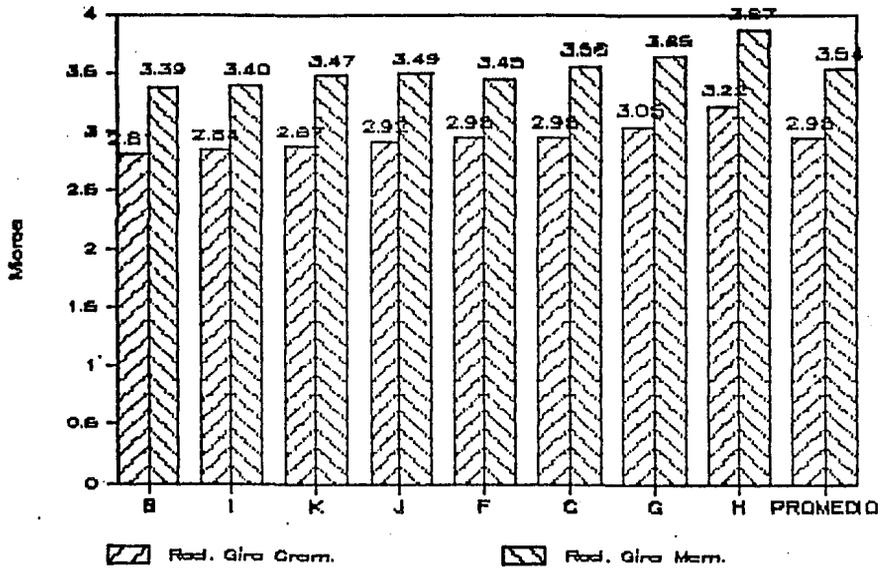
NUCLEOS	MASA μm^3	VOLUMEN μm^3	SUPERFICIE μm^2	POSICION DE LOS CENTROIDES					
				DE LA CROMATINA			DE LA SUPERFICIE		
B	51.17	136.85	103.32	5.06	4.78	2.99	5.11	4.78	2.89
C	46.25	147.71	97.62	5.22	5.04	2.70	5.23	5.03	2.64
F	46.08	170.42	115.77	5.07	5.29	3.12	5.08	5.28	3.05
G	65.38	189.72	134.42	5.02	5.08	3.67	5.02	5.10	3.63
H	76.66	239.51	152.88	5.23	5.09	4.04	5.22	5.02	3.89
I	47.08	138.22	102.43	5.05	5.19	2.62	5.06	5.20	2.71
J	50.98	154.90	105.72	5.10	4.70	2.74	5.12	4.75	2.78
K	41.74	142.10	96.87	4.99	5.18	2.51	4.96	5.22	2.50
\bar{X}	53.17	164.93	113.63	5.10	5.04	3.12	5.12	5.04	3.01
d. s.	7.02	18.0	12.24	0.08	0.19	0.50	0.07	0.18	0.46
D. s. / \bar{X}	0.13	0.10	0.10	0.01	0.04	0.16	0.01	0.04	0.15

M A S A



GRAFICA 1

Radios de Giro



GRAFICA 2

X Bibliografía

Alberts, B., Dennis, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, k. y Watson, J. D. 1984. Biología Molecular de la Célula. Omega S.A. Barcelona, pp 387-458.

Appels R., Driscoll, C. y Peacock W. J. 1978. Heterocromatin and highly repeated sequences in rye (Secale cereale). Chromosoma. 70:67-89.

Asimov, I. 1985. Introducción a la Ciencia. II. Ciencias Biológicas. 2a. ed., Ediciones Orbis, S. A., 837 p.

Avers, Ch. J. 1983. Biología Celular. Grupo Editorial Iberoamérica. México, 532p.

Avivi, A. y Feldman M. 1980. Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus. Hum. Genet. 55:281-295.

Bak, A. L., P. Bak y J. Zeuthen. 1979. Higher levels of organization in chromosomes. J. Theor. Biol. 76:205-217.

Bennett, M. D. 1982. Nucleotipic basis of spatial ordering of cromosomes in eukariotes and implications of the order for genoma evolution and fenotipic variation. In: Genome evolution, Douer, G. A., Flavell, R. B. (eds), Academic Press, New York, pp 239-261.

Bennett, M. D. 1984a. Nuclear Architecture and its manipulation. From: Genemanipulation in plant improvement. Ed. by Gustafson Plants. Publising Corporation, pp 469-502.

Bennett, M. D. 1984b. Premiotic events and meiotic chromosome pairing. Society for Experimental Biology, Great Britain, pp 87-121.

Bernhard, W. A. 1969. A new Staining Procedure for Electron Microscopical Citology. J. Ultrastruct. Res. 27:250-265.

Bourgeois, C. A., Hemon, D., Beaure D'Augères, C., Robineaux R. y Bouteille, M. 1981. Kinetics of nucleolus location within the nucleus by time-lapse microcinemotography. Biol. Cell 40:229-232.

Bourgeois, C. A., Hemon, D. y Boutielle, M. 1982. Changes in the nucleolus-envelope region during interphase in synchronized TG cells. J. Ultrastruc. Res. 81:257-267.

Bourgeois, C.A., Laquierre, F., Hemon, D., Hubert, J. y Boutielle, F. 1985. New data on the situ position of inactive X chromosome in the interfase nucleus. A. J. Genet. 69:122-129.

Boutielle, M., Laval, M. and Dupoy-Coin. In: The Cell Nucleus,

Busch, H. (Ed.), Vol. 1, chapt. 1, p. 3. Ac. Press, New York, 1974.

Brasch, K. y Setterfield, G. 1974. Structural organization of chromosomes in interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 83:175-185.

Cogliati, R. y Gautier, A. 1973. Mise en évidence de l'ADN et des Polysaccharides a l'aide d'un nouveau Réactif "de type Schiff". *C. R. Acad. Sc. Paris.* t. 276.

Comings, D. E. 1968. The Rationale for an ordered Arrangement of Chromatin in the Interphase Nucleus. *Amer. J. Genet.* 20:440-460.

Comings, D. E. 1972. The structure and funtion of chromatin. *Adv. Hum. Genet.* V.3, pp 237-431.

Cordonella, L. 1978. El Nucleosoma. *Investigación y Ciencia, Sci. Am.*, No. 22:44-53.

Cremer, T., Cremer, C., Schneider, T., Baumann, H., Hens, L. y Kirsch-Volders, M. 1982. Analysis of cromosome positions in the interphase nucleus of chinese hamster cells by Laser-UV-microirradiation experiments. *Hum. Genet.* 62:201-209.

Cronquist, A. 1969. Introducción a la Botánica. Continental, México. pp 26-38.

De Boni, U. y Mintz, A. H. 1986. Curvilinear, Three-dimensional motion of chromatin domains and nucleoli in neuronal interphase nuclei. *Science.* 234:863-866.

De Robertis, E. D. P. y E. M. F., De Robertis. 1983. Biología Celular y Molecular. El Ateneo. 10a. ed. México. pp 321-420.

Esquivel, C., Rovira P., Echeverría O. y Vázquez Nin, G. H. 1987. A simple staining method for chromatin compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy.* 21:103-110.

Evans, K. J. y Fillion, W. G. 1982. The distribution of chromatin in the interphase nucleus of Zebrina pendula. *Can. J. Gen Cytol.* 24:583-591.

Fahrenbach, W. H. 1984. Continuous serial thin sectioning for electron microscopy. *J. Electron Microscopy Tech.* 1:387-398.

Fawcett, D. W. 1981. The Cell. 2a. ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia, pp 204-225.

Felsenfeld, G. 1978. Chromatin. *Nature* 271:115-122.

Fussell, C. P. 1975. The position of interphase chromosomes and late replicating DNA in centromere and telomere regions for Allium cepa L. *Chromosoma.* 50:201-210.

Gautier, A. y Schreyer, M. 1970. << Feulgen Like >> electron stains for tissue sections. 7^e Cong. Inter. Microsp. Elect., Grenoble, Favard P., ed., pp 559-560.

Ghosh, S. y Roy, Ch. 1977. Orientation of interphase chromosomes as detected by Giemsa C-bands. *Chromosoma* 61:49-55.

Hadlaczky, Gy., Went, M. y Ringertz N. R., 1986. Direct evidence for the non random localization of mammalian chromosomes in the interphase nucleus. *Exp. Cell Res.* 167:1-15.

Hager, H. D., Schroeder-Kurth, T. y Vogel, F. 1982. Position of chromosomes in the human interphase nucleus. *Hum. Genet.* 61:342-356.

Hancock, R. y Boulikas, T. 1982. Functional organization in the nucleus. *Inter. Rev. of Cytol.* 79:165-214.

Heslop-Harrison, J. S. y Bennett, M. D. 1983a. Predictions and analysis of spatial order in haploid chromosome complements. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 218, 211-223.

Heslop-Harrison, J. S. y Bennett, M. D. 1983b. The spatial order of chromosomes in root-tip metaphases of *Aegilops umbellulata*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 218, pp 225-239.

Heslop-Harrison, J. S. and Bennett, M. D. 1984. Chromosome order-possible implications for development. *J. Embriol Exp. Morph.* 83 Supplement, 51-73.

Hewish, D. R. y Burgoyne, L. A. 1973. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regular spaced by a nuclear deoxyribonuclease *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52:504-510.

Hochtrasser, M., Mathog, D., Gruenbaum, Y., Saumweber H. y Sedat, J. 1986. Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* *J. Cell Biol.* 102:112-123.

Karp, G. 1984. Cell Biology. Mc. Graw-Hill Company. New York, pp 600-609.

Kuroiwa, T. y Tanaka, N. 1971a. Fine structures of interphase nuclei. I. The morphological classification of nucleus in interphase of *Crepis caplaris* . *Cytologia* 36:143-160.

Kuroiwa, T. y Tanaka, N. 1971b. Fine structures of interphase nuclei. IV. The behavior of late replicating chromatin during a late portion of the S period as revealed by electron microscopy radioautography. *J. Cell Biol.* 49:939-942.

Lafontaine, J. G. y Lord, A. 1974. An ultrastructure and radioautoradiographic study of the evolution of interphase nucleus in plant meristematic cells (*Alium porrum*). *J. Cell*

Sci. 14:263-287.

Leduc, E. H. y Bernhard, W. 1967. Recent modifications of the glycol-metacrilate embedding procedure. *J. Ultrastruc. Res.* 19:196-199.

Lehniger, A. L. 1979. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2a. ed. Omega. Barcelona, 1117 p.

Mazia, D., 1961. Mitosis and physiology of cell division. In: The Cell. Brachet, J. and Mirsky, A. E. eds. Academic Press, New York, vol. 3, 77-412.

McGhee, J. D. y Felsenfeld, G. 1980. Nucleosome structure. *Ann. Rev. Biochem.* 49:1115-1156.

Moens, P. B. y Church, K. 1977. Centromere size, positions and movements in the interphase nucleus. *Chromosoma* 61:41-48.

Monneron, A. y W. Bernhard, 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruc. Res.* 27:266-288.

Moreno, A. R. y Schvartman, B. 1978. Principios de Biología Celular. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 216p.

Morton-Bradbury, E. 1978. La cromatine. *La recherche* 9(91):644-653.

Moyne, G., 1972. Une méthode cytochimique de mise en évidence de l'ADN à l'usage de la microscopie électronique. *C. R. Acad. Sc., Paris*, D 274, 247-250.

Moyne, G. 1973. Feulgen-derived Techniques for Electron Microscopical Cytochemistry of DNA. *J. Ultrastr. Res.* 45:102-123.

Murray, A. B. y Davies, H. G. 1979. Three Dimensional Reconstruction of the Chromatin Bodies in the Nuclei of Mature Erythrocytes from the Newt Triturus cristatus: the number of the nuclear Envelope-Attachments sites. *J. Cel. Sci.* 35:59-66.

Pardon, J. F., and Richards, B. M. 1979. Physical studies on chromatin. In: Chromatin structure of The Cell Nucleus, Chromatin Part II, Part D., V. VII. Academic Press, Inc. New York, pp 371-411.

Peters, V. D. y Giese H., 1971. Elektronenmikroskopischer Nachweis von DNS. *Acta Histochem.*, 40, 119-125.

Quintarelli, G., R. Zito y Cifonelli, J. A. 1971a. On phosphotungstic acid staining. I. *J. Histochem. and Cytochem.* 19:641-647.

- Quintarelli, G., J. A. Cifonelli y Zito R. 1971b. On phosphotungstic acid staining. II. J. Histochem. and Cytochem. 19:648-653.
- Rovira, G. B. P., Esquivel, H. C. y Vázquez Nin, G. H. 1985. Un método de contraste preferencial de la cromatina para microscopía electrónica. Memorias III Simposio Ciencias en Sistemas Biológicos. Depto de Biol. Fac. de Ciencias U N A M. México. pp 137-144.
- Sáez, F. A. y Cardoso, H. 1978. Citogenética básica y Biología de los cromosomas. Monografía No. 20, Serie de Biología. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de Organización de Estados Americanos. Washington, D. C., pp 33-35.
- Schertham, H., Arnason, U. y A. Lima-de-Faria. 1987. The chromosome field theory tested in muntjac species by DNA cloning and hybridization. Hereditas 107:175-184.
- Sperling, K. y Lüdtke, E. K. 1981. Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian Muntjac. Chromosoma 83:541-553.
- Stack, S. M., Brown, D. B. y Dewey, W. C., 1977. Visualization of interphase chromosomes. J. Cell Sci. 26:281-299.
- Tomás-Martín, M. C. 1976. Citoquímica estructural de la cromatina sexual en núcleos interfásicos de células animales y vegetales. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias U.N.A.M., México.
- Tsanev, R. y P. Petrov. 1976. The substructure of chromatin and its variations as revealed by electron microscopy. J. Mic. Biol. Cell. 27:11-18.
- Van Holde, K. E., Sahasrabudde, C. G. y Shaw B. R. 1974. A Model for particulate structure in chromatin. Nucleic Acids Res. 1:1579.
- Vázquez Nin, G. H., Chávez, B. y Tomás Martín, C. 1973. A preferencial Staining Method for Chromatin in Electron Microscopy. J. de Microscopie 16:243-246.
- Vázquez Nin, G. H. y Echeverría, O. M. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. Acta. Anat. 96:218-231.
- Vázquez Nin, G. H., Ortega-Rangel, J. A., Echeverría, O. M., Parra, M. R. y Jiménez-García, L. F., 1983. Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. Biol. Cell. 48:17-24.
- Vogel, F. and Schroeder, T. M. 1974. The internal Order of the

interphase nucleus. Humangenetik. 25:265-297.

Wachtler, F., Hopman, A. H. N., Wiegant, J. y Schwarzacher, H. G. 1986. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in the interphase nuclei. Exp. Cell Res. 43:436-447.

Wettstein, R. y Graver, A. 1973. Film supporting frames for mounting section grids. J. Ultrastruct. Res. 43:436-447.

Wilson, G. B. y Morrison, J. H. 1976. Citologia. Continental, Uruguay, pp 123-346.

Wolfe, S. L. 1981. Biology of the Cell. 2a. ed. Wadsworth P. Co. Belmont California, pp 245-437.

Yakura, K., Fukuei, K. y Tanifuji, S. 1978. Chromatin subunit structure in different tissues of higher plants. Plant and Cell Physiol. 19:1381-1390.