

2eji 30

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO AUTORADIOGRAFICO DE LA
TRANSCRIPCION EN CELULAS EN MITOSIS

T E S I S

Que para obtener el grado de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

ALMA MIRIAM CARLOS GARCIA

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

I N D I C E

PARTE I	INTRODUCCION
	1.- Aspectos Generales de la Biología Celular y Molecular
	2.- El Núcleo y el Ciclo Celular
	A) Núcleo Interfásico
	B) Mitosis
	3.- Morfología de los Cromosomas
	A) Ultraestructura del Cinetocoro
	B) Acción del Cinetocoro durante la División Celular
	C) Transcripción del Acido Ribonucleico (ARN)
	4.- Autorradiografía
	5.- Objetivos
PARTE II	MATERIAL Y METODOS
	1.- Material Biológico
	A) Meristemo de Raíces de <i>Allium cepa</i>
	B) Cultivo de Linfocitos Humanos de Sangre Periférica
	2.- Autorradiogramas
PARTE III	RESULTADOS
	1.- Morfología
	2.- Análisis Cuantitativo
PARTE IV	DISCUSION
PARTE V	CONCLUSIONES
PARTE VI	BIBLIOGRAFIA

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

1.- Aspectos Generales de la Biología Celular y Molecular.

El proceso evolutivo ha producido una inmensa diversidad de formas de vida altamente organizadas (Simpson, 1967 y 1970) que sin embargo, al ser estudiadas a nivel celular y molecular presentan en conjunto, cierta unidad que las relaciona.

El estudio de la célula como unidad estructural y funcional de todos los organismos vivos vistos con el microscopio óptico, se amplió con el estudio de la organización ultraestructural y macromolecular de los constituyentes celulares, de las principales macromoléculas biológicas, proteínas y ácidos nucleicos, revelados por el microscopio electrónico. (De Robertis y De Robertis, 1981). De estas investigaciones se ha obtenido el conocimiento de la existencia de los fenómenos básicos de la herencia al haberse revelado el código genético y los procesos que intervienen en la transcripción de la información genética y finalmente su traducción en proteínas específicas.

Uno de los objetivos principales de la biología moderna es interpretar los fenómenos que se desarrollan en los organismos vivos en función de las estructuras y de las interrelaciones que se manifiestan entre los constituyentes macromoleculares de la célula. Es importante analizar con detalle los mecanismos que conducen a la integración de los circuitos reguladores de la célula, los procesos de la división celular, de la duplicación y transcripción de los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN), etc. (Jacob y otros, 1981).

Sabemos que existe una secuencia de acontecimientos bioquímicos, que todos los seres vivos utilizan el mismo código genético y el interés de las investigaciones de la biología molecular está enfocado en establecer los mecanismos que regulan la expresión genética. (De Robertis y De Robertis, 1982).

2.- El Núcleo y el Ciclo Celular.

Actualmente se acepta que la mayor división entre los organismos vivos es entre aquellos cuyas células carecen de núcleo (procariontes) y aquellos cuyas células poseen núcleo (eucariontes). (Schopf, 1978).

El descubrimiento del núcleo efectuado por Brown (1831) como componente fundamental y constante de la célula, junto con el establecimiento de la teoría celular postulada por Schleiden (1838) y Schwann (1839) fueron la consecuencia de muchas investigaciones iniciadas en el siglo XVII. Posteriormente Virchow (1855) amplió la teoría celular al expresar su principio de que cada célula se forma por división de otra célula, estableciendo la división celular como el fenómeno central en la reproducción de los organismos. Balbiani (1876) observó que antes de la división se formaban estructuras cilíndricas en el núcleo; estas estructuras después fueron denominadas cromosomas por Waldeyer (1890). (De Robertis y De Robertis, 1982).

Importante también fue la observación realizada por Hertwig (1875) de la fertilización y la fusión de los dos pronúcleos, uno que procede del óvulo y el otro del espermatozoide, que aumentó el conocimiento que establecía que los gametos se forman por división reduccional, lo que más adelante se denominó meiosis, con la cual se mantiene constante el número de cromosomas de una especie. (De Robertis y De Robertis, 1982).

Los estudios sobre las modificaciones que se producen en el núcleo permitieron que la investigación citológica culminara con el descubrimiento de la mitosis por Flemming (1880), Strasburger (1884) y Beneden en el mismo último año, mecanismo por medio del cual las células aseguran la continuidad entre una generación y otra. (Nultsch, 1966). En 1888, Waldeyer comprobó que el hecho fundamental en la mitosis es la formación de los filamentos nucleares o cromosomas. Así mismo en 1890, observó la exacta división entre los núcleos de las células hijas. (De Robertis y De Robertis, 1982).

Todos estos descubrimientos sirvieron para que otros investigadores postularan que el núcleo es un elemento necesario en las células y que interviene en sus procesos de multiplicación y herencia. (De Robertis y De Robertis, 1982).

Las primeras sustancias que se aislaron del núcleo celular fueron los ácidos nucleicos (ADN y ARN) por Miescher (1869) y Kossel (1891). (De Robertis y De Robertis, 1981). Años más tarde, en 1924, Feulgen y Rossenbeck descubren la reacción específica para el ADN con lo cual se inicia el estudio sobre su distribución en los más diversos tipos celulares. (Mirsky y Osawa, 1961). En 1942 Brachet establece la localización de los ácidos nucleicos en citoplasma y núcleo. (citado por Castañeda, 1973). Después de los trabajos de Watson y Crick (1953) sobre la estructura del ADN, de los de Jacob y Monod (1961) quienes encontraron que el ARN contiene información química, finalmente Nirenberg y Ochoa logran descifrar el código genético. (Castañeda, 1973).

La función esencial del núcleo es almacenar y proporcionar a la célula la información que se encuentra en la molécula de ADN, que constituye el depósito fundamental de información genética, la cual es copiada o transcrita en la molécula de ARN; en los elementos de estas cadenas de ADN y ARN, los llamados nucleótidos, existe una secuencia de aminoácidos. En este proceso interviene la traducción del ARN, produciéndose la síntesis de proteínas. (Lehninger, 1970).

Por lo tanto la reproducción del organismo se basa en el proceso de la reproducción de la célula; la célula como la unidad de vida, es la unidad de la reproducción. (Mazia, 1961). Esta se presenta como una serie de acontecimientos que comprenden fundamentalmente: (1) la replicación de los cromosomas (que incluye la replicación de los genes o factores de la herencia); (2) la separación de los juegos idénticos de cromosomas producidos por esa replicación y (3) la división de la célula en dos células, cada una de las cuales contiene uno de los juegos de cromosomas. (Mazia, 1975).

Según los resultados de la citología clásica, una célula puede originarse sólo mediante división de otra célula. Esta a su vez, depende de la previa división del núcleo. Los núcleos se dividen por mitosis produciéndose la separación en partes iguales de los cromosomas entre dos células hijas, manteniéndose así la continuidad del número cromosómico. Las células de todos los organismos vegetales y animales pasan por dos períodos, uno de interfase y otro de división. (Dyson, 1977). Este ciclo se repite en cada generación celular, pero el tiempo de duración varía considerablemente de un tipo celular a otro.

A este respecto se ha observado que el período mitótico en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* es de 2.4 hrs a una temperatura de 20°C y de 1.75 hrs a 25°C (López-Sáez y col., 1966). En otro estudio (González-Fernández y col., 1971) se mencionan períodos similares, de 2.2 hrs a 20°C y de 1.6 hrs a 25°C.

También se ha demostrado que la temperatura afecta la duración absoluta de cada uno de los diferentes estados morfológicos del ciclo celular (interfase y fases de la mitosis), pero que la relación proporcional entre la duración de cada uno de estos segmentos del ciclo y la duración total del mismo, permanece constante. (González-Fernández y col., 1971).

Algunos investigadores como Mazia, Mitchison y Van't-Hof (In Cell Cycle Controls, 1974) dividen el ciclo celular en cuatro intervalos sucesivos:

G₁ Tiempo que transcurre entre el final de la mitosis y el principio de la síntesis de ADN.

S Período de síntesis de ADN.

G₂ Intervalo entre la terminación de la síntesis de ADN y el comienzo de la mitosis.

M Actividad visible asociada con la mitosis.

La regulación de la duración del ciclo celular tiene lugar principalmente por su detención en un punto específico de G₁ y se dice entonces que la célula se encuentra en estado G₀; se considera que la célula es retirada del ciclo. Cuando las condiciones

cambian y se reanuda su crecimiento la célula vuelve a entrar en el período G₁. (Mazia, 1975).

En la actualidad la atención de los investigadores está dirigida al estudio del núcleo interfásico, así como a tratar de encontrar los mecanismos que operan a través del ciclo celular a un nivel molecular y ultraestructural.

A) Núcleo Interfásico.

En las células eucarióticas en interfase el núcleo se presenta como un compartimiento limitado por la envoltura nuclear. Su forma puede estar relacionada con la de la célula, pero generalmente es esférico. El tamaño del núcleo somático es específico, depende del contenido de ADN y de proteínas; su tamaño se relaciona con la actividad funcional que posee en la interfase. Su posición varía, pero en general es constante para cada tipo celular. Casi todas las células son mononucleadas pero existen también binucleadas y polinucleadas. (De Robertis y De Robertis, 1982).

En general pueden reconocerse las siguientes estructuras:

1) La envoltura nuclear, que presenta dos membranas con los poros nucleares intercalados.

2) El nucleoplasma o jugo nuclear, está formado por agua y diversas moléculas solubles; esta zona contiene también las regiones no condensadas de la cromatina (eucromatina), que son partes de los cromosomas en las que sus componentes macromoleculares tienen una disposición laxa.

3) Los cromocentros, que junto con filamentos retorcidos de la cromatina representan partes condensadas de los cromosomas. Estas porciones condensadas (heterocromatina) se encuentran frecuentemente cerca de la membrana nuclear y también adheridas al nucléolo.

4) El nucléolo, generalmente esférico y acidófilo, puede ser único o múltiple. Se caracteriza por su contenido de ARN y proteínas que intervienen en la producción de ribosomas. (Dyson, 1977).

Químicamente el núcleo se distingue de los demás organelos de la célula por su contenido de ADN localizado en los cromosomas. Bajo el aspecto funcional es el portador de los factores de la herencia y mediante éstos, el centro genético regulador de la célula. Como su función exige una transmisión completa e inalterada de su contenido en información genética de célula a célula, cuando se produce la división celular ésta se ve acompañada por una serie de cambios durante los cuales la membrana nuclear y el nucléolo desaparecen, la sustancia cromática se condensa haciendo su aparición los cromosomas como elementos individuales. (Nultsch, 1966).

B) Mitosis.

La división celular mitótica es característica de todas las células somáticas, aún cuando existen diferencias entre células ve getales y animales.

Como indica Mazia (1961) es difícil discutir el inicio de la mitosis ya que se desconocen la mayoría de los eventos que desencadenan el proceso. Brinkley y Stubblefield (1970) sugieren que la mitosis es simplemente la culminación física de la serie de eventos biosintéticos que ocurren en la interfase antecedente.

El proceso en sí mismo puede ser dividido en dos estados que incluyen el establecimiento del aparato mitótico y el transporte de los cromosomas a los polos de este aparato (Mazia, 1961) y comprenden una serie consecutiva de fenómenos que se pueden agrupar en las siguientes fases:

Interfase.- Período entre las divisiones; a) el núcleo aparece homogéneo; b) los cromosomas se encuentran dentro de la membrana nuclear como filamentos delgados y extendidos; se duplican individualmente; c) los centriolos se separan formando los polos de la mitosis.

Profase.- a) los cromosomas se condensan y se acortan apareciendo como cuerpos compactos; b) se observan las cromátidas unidas entre sí por el centro en una zona llamada centrómero; c) se establecen conexiones entre los centrómeros y los polos formándose

el huso.

Metafase.- a) se forma por completo el aparato mitótico al unirse los cromosomas a los microtúbulos del huso mediante sus cinetocoros; b) los cromosomas se orientan radialmente en el plano ecuatorial de la célula; c) desaparece la membrana nuclear y se desintegra el nucléolo.

Anafase.- a) los centrómeros se separan; b) los cromosomas se separan longitudinalmente; las cromátidas se agrupan en los polos opuestos de la célula; c) las cromátidas hermanas se separan.

Telofase.- a) los cromosomas se hacen cada vez menos condensados; b) se forman las membranas nucleares y los nucléolos de las células hijas; c) el centriolo produce un nuevo centriolo; d) el citoplasma empieza a dividirse mediante el proceso denominado citocinesis. Cuando se ha completado la división, ambas células resultantes del proceso de mitosis entrarán en interfase. (Smith, 1968; Mazia, 1969).

3.- Morfología de los Cromosomas.

Durante la división celular, la cromatina, compuesta por proteínas y ácidos nucleicos, se condensa en los cromosomas. En las células superiores los cromosomas son las estructuras que llevan la información genética, la cual se encuentra dentro de los genes. La condensación de los cromosomas facilita el movimiento y distribución equitativa de la información que llevan (Kornberg y Klug, 1981) y permite el estudio de su morfología, principalmente durante la metafase y la anafase, consideradas fases abiertas del ciclo celular.

En la interfase generalmente no son visibles porque se encuentran en un estado de intensa dispersión. En el núcleo interfásico el arreglo cromosomal tiene dos aspectos principales: (1) con respecto a la polaridad nuclear y a otros componentes nucleares y (2) con respecto de uno a otro. (Avivi y Feldman, 1980). Se ha sugerido que el sistema genético que determina el patrón específico del arreglo cromosomal en el núcleo, pudiera operar a través de los elementos microtubulares del sistema del huso: que el arreglo ordenado de los cromosomas en el núcleo interfásico es importante para la regulación de muchos aspectos del comportamiento cromosomal tales como el apareamiento meiótico, replicación y condensación, así como para la actividad genética. (Avivi y Feldman, 1980).

Sin embargo para un mejor entendimiento del arreglo cromosomal interfásico y su significado biológico, es necesaria más información sobre este fenómeno, su control genético y los mecanismos subcelulares involucrados. (Avivi y Feldman, 1980).

De acuerdo a su forma, que a su vez depende de la posición del centrómero, los cromosomas se pueden clasificar en cuatro grupos. Telocéntricos los que presentan el centrómero en uno de sus extremos; acrocéntricos aquellos que tienen un brazo muy corto; submetacéntricos los que tienen brazos de distinta longitud y los metacéntricos con los brazos iguales. (De Robertis y De Robertis, 1981).

Es posible distinguir varios elementos en cada cromosoma:

Cromátida.- Cada una de las dos estructuras simétricas de los cromosomas durante la metafase, con una sola molécula de ADN. Las cromátidas sólo están unidas entre sí a nivel del centrómero y se separan en la anafase. Por lo tanto, los cromosomas en la metafase tienen dos cromátidas y en la anafase sólo una.

Centrómero.- El centrómero se encuentra dentro de un segmento delgado del cromosoma denominado constricción primaria. Es el sitio de adherencia de las cromátidas hermanas y la región del cromosoma que se une al huso mitótico mediante los microtúbulos que se fijan en una zona en forma de disco llamada cinetocoro.

Telómero.- Término que se refiere a los extremos de los cromosomas que contienen las partes finales de la molécula de ADN que forma cada cromátida.

Organizador Nucleolar.- Regiones que se localizan en las constricciones secundarias que contienen los genes para los ARN ribosómicos e intervienen en la formación de los nucléolos, los cuales a su vez, son el lugar de ensamblaje de los ribosomas. Algunos cromosomas presentan otro elemento, el satélite, que es un cuerpo esférico separado del resto del cromosoma por una constricción secundaria. (De Robertis y De Robertis, 1982).

A) Ultraestructura del Cinetocoro.

A través de la mitosis se ha descubierto que el cinetocoro tiene una estructura precisa (Brinkley y Stubblefield, 1970) y que en la mayoría de los casos parece estar localizada en la constricción primaria de los cromosomas (Esponda, 1978). El cinetocoro se encuentra unido a la heterocromatina de la región del centrómero. Habitualmente se observan dos cinetocoros, uno en cada cromátida, pero en ocasiones existe un número mayor. (De Robertis y De Robertis, 1982)

Bajo la microscopía de luz pueden distinguirse dos tipos básicos de cinetocoros: (1) cinetocoros localizados, aquellos que están confinados a un sitio específico en el cromosoma (Rieder,

1979a) y (2) cinetocoros difusos, los que están distribuidos a lo largo de los brazos del cromosoma. (Brazelton, 1980 y 1981; Maeki, 1980 y 1981).

Los cinetocoros localizados se encuentran en la mayoría de los organismos metazoarios y los difusos en insectos hemípteros y en ciertos grupos de plantas como algunas algas. (Brinkley y Stubblefield, 1970).

Basándose en su ultraestructura los cinetocoros pueden dividirse en dos clases distintas: (a) los de forma de placa o copa, característico de plantas superiores y de algunos animales y (b) los de forma de disco trilaminar, típico de muchas células de mamíferos. Dependiendo del estado de división, ambas clases de cinetocoros pueden ser encontrados en la misma célula. (Rieder, 1979a, lo menciona en su Introducción).

El análisis ultraestructural ha mostrado que el cinetocoro se presenta en la mayoría de los casos en la forma de disco trilaminar, a la cual se unen los microtúbulos de las fibras del huso durante la división celular. (Esponda, 1978).

Está formado por tres capas: una capa externa de material denso, una capa de densidad menor y una capa interna en contacto con las fibras del huso. Desde la superficie convexa de la capa externa, además de los microtúbulos implantados en ella, emanan finos filamentos que forman una especie de "corona". (De Robertis y De Robertis, 1982).

En comparación con los numerosos estudios sobre el cinetocoro y su relación con el desarrollo de la división celular, los reportes acerca de la constitución y naturaleza química de esta estructura son escasos; sin embargo, se cree que están formados por un material distinto del de la cromatina y se ha sugerido que los cinetocoros pueden estar constituidos por proteínas básicas y ribonucleoproteínas (RNP) principalmente. (Esponda, 1978).

Los primeros intentos para detectar la presencia del ADN en el cinetocoro se hicieron basándose en análisis ultraestructurales y de microscopía de luz utilizando el procedimiento de la tinción

de Feulgen. Posteriormente bajo la microscopía de luz, por difusión y tinción con ácido fosfo tungstico (PTA), se mostró la posibilidad de que el cinetocoro estuviera constituido por un material distinto al ADN (Wolfe, 1972; Ross, 1973; citados por Esponda, 1978) a pesar de que las pruebas realizadas no constituyeran pruebas citoquímicas.

Con los avances en microscopía electrónica se desarrollaron nuevos procedimientos para el estudio de la citoquímica nuclear. La técnica de PTA alcohólico se utiliza para la tinción de proteínas básicas, el método de tinción preferencial de PTA para desoxirribonucleoproteínas (Vázquez-Nin y col., 1973) y la técnica de EDTA para tinción preferencial de RNP. Esta última técnica llamada método de Bernhard, es ampliamente utilizada en la actualidad en correlación con digestiones enzimáticas y con autorradiografía para la localización y estudio de partículas ribonucleoproteicas intranucleares.

Bajo la microscopía electrónica los métodos para el estudio del cinetocoro en cromosomas vegetales, han sido basados en el uso del método de EDTA. En células meristemáticas de *Allium cepa*, regiones similares a los cinetocoros aparecen teñidas positivamente en cromosomas metafásicos (Brazelton, 1974; citado por Esponda, 1978); en *Luzula*, en donde se encuentran cinetocoros no localizados, ha sido observada una tinción positiva (Brazelton, 1975; citado por Esponda, 1978). Se ha observado que los cinetocoros también pueden ser localizados en células vegetales durante la interfase y profase meióticas, mostrando una tinción positiva. (Esponda, 1978; cita a varios autores).

Recientemente Rieder (1979b) publicó un estudio de microscopía electrónica de alta resolución utilizando la técnica de Bernhard (uranilo-EDTA-plomo) en combinación con la enzima ribonucleasa, los resultados que obtuvo indican que el componente RNP del cinetocoro en forma de copa en animales, está asociado con los microtúbulos. En otro trabajo suyo (1979a), en el que estudió las células Ptk₁, encontró RNP en la capa interna del cinetocoro trila

minar de las células mencionadas. Con los resultados obtenidos, Rieder sugiere que estas ribonucleoproteínas son tal vez un componente universal de los microtúbulos, considerando que otros estudios describen RNP en el centriolo y en el material pericentriolar.

Autores como Brinkley y Stubblefield (1970) sostienen que el cinetocoro es un producto génico ya que después del marcado esta estructura se presenta como el producto de genes incorporados en el ADN del cinetocoro. Proponen además una teoría para explicar su funcionamiento: las asas del ADN en esta región producen interminables bandas de ARN alrededor de las cuales pueden agregarse proteínas de los microtúbulos. Apoyan su teoría con algunos datos experimentales.

B) Acción del Cinetocoro durante la División Celular.

El proceso de división celular depende grandemente de dos estructuras, el centriolo y el cinetocoro, que no obstante de ser componentes estructuralmente independientes, existe una interacción dinámica entre las dos estructuras que culmina con la formación y regulación del aparato mitótico y finalmente en la equidistribución del material genético dentro de las células hijas. (Went, 1966; Brinkley y Stubblefield, 1970).

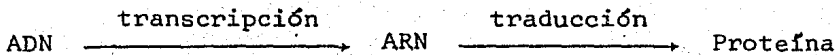
Se sabe desde hace tiempo que el cinetocoro es una estructura cromosómica involucrada en los movimientos de los cromosomas durante la división nuclear. (Moens y Church, 1977). Se ha indicado que los cinetocoros están implicados también en el enlace y ensamblaje de los microtúbulos (Brinkley y Stubblefield, 1970) y que se encuentran conectados uno a cada polo por medio de finos filamentos, los cuales guiarán a las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos. (Mazia, 1975).

En algunos casos, el cinetocoro parece dirigir la organización del huso, a pesar de que se desconoce la identidad que guía la organización y actividad del dinámico complejo estructural que representa el aparato mitótico. (Went, 1966).

C) Transcripción del Acido Ribonucleico (ARN).

Todos los organismos vivos contienen los ácidos nucleicos ADN y ARN, macromoléculas de suma importancia biológica. (De Robertis y De Robertis, 1981).

La información genética almacenada en la molécula de ADN se expresa en dos pasos. En el primer proceso, llamado de transcripción o síntesis de ARN, se copia la secuencia de nucleótidos de uno de los filamentos de ADN en un filamento complementario de ARN. En el segundo proceso, denominado de traducción o síntesis de proteínas, el programa genético del organismo es "leído" a partir del ARN, el cual es traducido en proteínas. Esta serie de fenómenos constituye lo que a menudo se denomina el Dogma Central de la Biología Molecular (Lehninger, 1970) y que puede resumirse de la siguiente manera:



Se considera que la información del ADN es transmitida a una molécula de ARN especial denominada ARN mensajero por medio de la enzima ARN polimerasa. (Conn y Stumpf, 1972). La transcripción de los organismos eucariontes ocurre en el núcleo, en donde la información genética es transcrita en diferentes moléculas de ARN (ARN mensajero, ribosómico y de transferencia) las cuales después de pasar al citoplasma, traducen la información facilitando la síntesis de proteínas específicas. (Clawson y Smuckler, 1982). Las características y el comportamiento de los organismos dependen, en último término, de la secuencia de aminoácidos de sus proteínas constituyentes. (Kornberg y Klug, 1981). De esta forma se resumen los procesos nucleares de la herencia y de la síntesis de proteínas en el citoplasma.

Mientras que la síntesis de ADN sólo ocurre en el período S, la del ARN ocupa toda la interfase y se detiene durante la mitosis. (De Robertis y De Robertis, 1982).

Las regiones activas de la cromatina en la transcripción

son las de la cromatina laxa o eucromatina (Ris, 1978), especialmente la zona pericromatiniana (Puvion y Moyne, 1978).

La heterocromatina está generalmente correlacionada con la inactividad transcripcional. (Zeng, 1982). Las zonas centroméricas o las regiones adyacentes al centrómero son heterocromáticas en la mayoría de las plantas y animales y probablemente representen la configuración de la cromatina transcripcionalmente inactiva. (De Robertis y De Robertis, 1982).

El proceso de regulación más importante se produce en la fase G_1 , durante la cual la célula debe iniciar un nuevo ciclo celular o detenerse en estado G_0 . Una vez que este punto G_1 ha sido superado, la célula completa un nuevo ciclo. Lamentablemente se sabe muy poco acerca de cómo se regula esta etapa fundamental de la proliferación celular. (De Robertis y De Robertis, 1982).

4.- Autorradiografía.

La citología moderna tiene un fuerte apoyo en el uso de sustancias marcadas con radioisótopos. La autorradiografía es un método mediante el cual, los constituyentes químicos en la célula pueden ser localizados fotográficamente, registrando la posición del material radioactivo introducido en las muestras biológicas. (Dawes, 1971).

Esta técnica es fácil de aplicar y permite un estudio dinámico de los sistemas celulares que en algunos casos, pueden ser cuantificados, por lo que en la actualidad la autorradiografía es considerada como un método eficiente cuando se utiliza en problemas morfogénéticos en biología vegetal. (Michaux-Ferrière, 1976).

Las variaciones a través del tiempo, del comportamiento de un vástago o raíz meristemática, pueden ser estimadas a través de las modificaciones que ocurren en el metabolismo del ADN, ARN y proteínas (Rejman y Buchowicz, 1971; Michaux-Ferrière, 1974; citados por Michaux-Ferrière, 1976). Para tal propósito, los especímenes son expuestos a compuestos radioactivos en ocasiones específicos, como la uridina, precursor del ARN, que da la información sobre la localización de la síntesis de ARN.

Los precursores usados son, en la mayoría de los casos, marcados con el tritio (H^3), emisor β de baja energía. Este elemento radioactivo es de larga duración (con una vida media de 12.26 años) y brinda excelentes resultados sobre la detección y niveles de localización y puede ser incorporado después de ser metabolizado con suficiente actividad específica para impresionar emulsiones nucleares en relativamente poco tiempo. (Michaux-Ferrière, 1976). Esta emisión tiene la propiedad de actuar sobre los cristales de bromuro de plata de la emulsión fotográfica. El tritio es el que se utiliza con más frecuencia sobre todo en autorradiografía ultraestructural, ya que la radiación que emite interactúa eficazmente con la emulsión, produciendo un alto rendimiento de granos con una localización muy cercana al lugar en donde se encuentra el isótopo. (De Robertis y De Robertis, 1981).

Después de la fijación, deshidratación e inclusión, los cortes son montados sobre portaobjetos (microscopía óptica) o bien rejillas de cobre (microscopía electrónica). El método comprende las siguientes etapas:

- 1) Colocación de la capa de la emulsión.
- 2) Exposición de la emulsión a la emisión radioactiva en la obscuridad y a baja temperatura.
- 3) Revelado y fijación fotográfica de la emulsión.
- 4) Coloración de las muestras para permitir la observación de las estructuras con el microscopio óptico o electrónico.

Según Mercer y Birbeck (1974), en esta técnica son importantes tres factores: el tamaño del grano de la emulsión, el grosor del corte y el revelador.

Las emulsiones, cuya propiedad característica es el tamaño pequeño de los granos de bromuro de plata que se necesitan para la alta resolución. Se recomiendan la emulsión Ilford K₅ para microscopía óptica e Ilford L₄ para autorradiografía electrónica, ya que son estables, dan resolución moderada y son fáciles de usar. Se deben mantener en el refrigerador y emplear antes de los seis meses de su fabricación.

En el espesor de los cortes influyen dos factores: la resolución y el tiempo de exposición. Cuanto más gruesos son, la resolución disminuye y el tiempo de exposición se hace más corto, de tal manera que debe planearse el espesor teniendo en cuenta la fineza de localización requerida y el tiempo disponible para la obtención de resultados.

El revelado es un paso que influye en la resolución, en la sensibilidad y en la radioactividad de fondo. La forma y tamaño de los granos de plata dependen del revelador; se obtienen granos pequeños y baja radioactividad de fondo empleando poco tiempo en el revelado. Para el revelador D₁₉ se recomienda 3 min a 20°C.

El tiempo de la exposición al material radioactivo en la autorradiografía, dependerá de la sensibilidad de la emulsión y de la intensidad de la radiación emitida.

5.- Objetivos.

La opinión de que las células en mitosis no sintetizan ningún ARN ha sido discutida ampliamente. Se afirma que la velocidad de síntesis de ARN declina rápidamente en la profase tardía y se detiene en metafase y anafase. Como sucede en otros casos, la cromatina condensada no puede transcribirse, posiblemente porque las enzimas de transcripción no pueden llegar hasta la molécula de ADN. (De Robertis y De Robertis, 1982).

Generalmente se ha aceptado que la transcripción del ARN nuclear está muy disminuida durante la división mitótica de células animales. Sin embargo, existen ciertas evidencias que revelan incorporación de uridina H^3 en algunas fases del ciclo celular, además, algunos resultados sugieren que los cinetocoros están incorporando activamente el isótopo.

Brinkley y Stubblefield (1970) indican que cuidadosas medidas de células metafásicas sincronizadas revelan incorporación de uridina H^3 en el ARN en cerca del 5% al 10% de los rangos de interfase. Trabajos posteriores en cromosomas mitóticos como el de Moyne y Garrido (1976) revelan la presencia de RNP pericromosomales demostrando también que gran parte de este ARN es transcrito al final de la fase G_2 ó bien al principio de la profase.

La autorradiografía ha revelado que parte de la radioactividad incorporada en el ARN permanece posiblemente en asociación con los cromosomas. (Moyne y Garrido, 1976; Fakan, Puvion y Spohr, 1976; Fakan y Nobis, 1978).

Otros estudios acerca del ciclo celular en células sincronizadas CHO, (Fakan y Nobis, 1978) sugieren que la transcripción del ARN ocurre (aunque a muy bajo nivel) en la periferia de cromosomas de células en metafase tardía y anafase temprana. Crick (1978) menciona que existe la posibilidad de que se requiera síntesis de ARN durante la profase.

Por otra parte la presencia de RNP en cromosomas mitóticos ha sido estudiada por varios investigadores utilizando citoquímica de microscopía de luz en varios tipos de animales y vegetales. A

nivel ultraestructural los estudios sobre cromosomas de plantas y animales, demuestran también la presencia de RNP en el cinetocoro. (Esponda, 1978; Rieder, 1979a y 1979b; Brazelton, 1980).

Hasta ahora los métodos citoquímicos para el estudio del cinetocoro bajo la microscopía electrónica, han sido basados en el uso del método de tinción de EDTA y los resultados indican que los cinetocoros muestran una tinción positiva. Con esto se sugiere que los cinetocoros están formados, parcialmente, de un material distinto al ADN; este material probablemente puede estar formado por proteínas básicas y ribonucleoproteínas. (Esponda, 1978). Las evidencias mencionadas indican que existen RNP asociadas con células en mitosis y en meiosis, pero aún no se ha determinado el tipo de ARN involucrado.

Debido al interés biológico que éste problema representa, el presente estudio se propone investigar si existe síntesis de ARN en células en mitosis y si el cinetocoro es un gen que durante la división celular se encuentra activo.

Se hará un estudio autorradiográfico a nivel de microscopía óptica en células de meristemas de raíces de *Allium cepa* y en células de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, comparando la densidad de marcado en las áreas cromosomales de células en metafase y anafase, con las áreas citoplasmáticas que las rodean. Paralelamente, en los linfocitos se hará la comparación de la radioactividad de la constricción primaria lugar de localización del cinetocoro, con la de los brazos cromosomales.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1.- Material Biológico.

A) Meristemos de Raíces de *Allium cepa* .

Algunas de las raíces de cebolla utilizadas fueron colocadas durante 60 min en colchicina [20 mg/100 ml] y tanto éstas como otras que no recibieron este tratamiento fueron incubadas en períodos de 30 min y 60 min con uridina H³ (New England Nuclear con una actividad específica de 2.5 Ci/mM a [300 µCi/ml].

El procesamiento del material para su observación fue el siguiente:

- Fijación: en glutaraldehído al 2.5% disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.2 durante 90 min. Se hicieron lavados de 5 min cada uno en ácido tricloroacético al 3% a una temperatura de 4°C para evitar en lo posible la radioactividad de fondo. Se mantuvieron en amortiguador de fosfatos durante 24 hrs.

- Postfijación: nuevamente se hicieron lavados en ácido tricloroacético y en amortiguador de fosfatos hasta la eliminación del fijador. Las raíces fueron osmificadas con Os O₄ al 2% disuelto en amortiguador de fosfatos durante 90 min.

- Deshidratación: se realizó con alcoholes graduales al 70%, 80%, 96% y alcohol absoluto, haciendo cambios de 15 min cada uno.

- Preinclusión: se utilizó el óxido de propileno como intermediario. Al último cambio se le agregó 25% de Epón 812 y cada 24 hrs se aumentó la concentración de la mezcla hasta obtener concentraciones de 50% y 75% de Epón 812. Al término de 12 hrs se destaparon los frascos en los que se procesó el material para lograr la completa evaporación del óxido de propileno.

- Inclusión: se incluyó en Epón 812 de dureza intermedia y la polimerización se hizo en una estufa a 60°C por 48 hrs.

El material se cortó en un ultramicrotomo MT 1 de la casa Sorvall; los cortes semifinos de 1 μ de espesor se colocaron en portaobjetos y se adhirieron a éstos con calor.

B) Cultivo de Linfocitos Humanos de Sangre Periférica.

1) Se tomó la muestra en una jeringa heparinizada.

2) Se sembró la sangre en frascos ampula (20 ml) que contenían: 3 ml de medio McCOY'S 5a modificado, 0.25 ml de fitohemeglutinina y 0.02 ml de antibiótico (penicilina-estreptomocina).

3) A estos frascos se agregaron 0.5 ml de sangre completa heparinizada y se incubaron a 37°C durante 48 hrs.

4) Una vez transcurridas las 48 hrs, se agregaron 0.25 ml de colchicina [1 mg/ 1 ml] y se dejó actuar durante 60 min. Después se agregaron 0.9 ml de uridina H³ a [300 μ Ci/ml], $\frac{1}{2}$ hora antes de la cosecha.

5) Se cosecharon los cultivos pasando el contenido de los frascos a tubos de ensaye de 10 ml.

- se centrifugó durante 10 min a 1 500 r.p.m.,
- se desechó el sobrenadante,
- se agitó el botón con una pipeta Pasteur y
- se agregaron 5 ml de solución hipotónica (K Cl 0.75 M)
- se dejaron durante 10 min a 37°C,
- se centrifugó durante 10 min a 1 500 r.p.m.,
- se desechó el sobrenadante,
- se agitó el botón con pipeta Pasteur y
- se agregó la solución fijadora (metanol-ácido acético, 3:1),
- se dejaron reposar durante 20 min a 4°C,
- se centrifugó 10 min a 1 500 r.p.m., se volvió a cambiar el fijador las veces necesarias, hasta obtener un botón blanco y un sobrenadante transparente. Entonces se quitó el fijador hasta dejar sólo $\frac{1}{2}$ ml.

6) Una vez que se obtuvo el botón celular se hicieron las laminillas, goteando el botón (7 gotas por cada laminilla) sobre

los portaobjetos previamente enfriados a $\approx 4^{\circ}\text{C}$; las laminillas se calentaron a la flama hasta que se secaron.

7) Se colorearon con Giemsa al 6% disuelto en amortiguador de fosfatos a pH 6.8, a temperatura ambiente durante 20 min.

8) Se enjuagaron con metanol al 10% y después en agua destilada.

2.- Autorradiogramas.

Con las laminillas de los cortes de meristemas de raíces de *Allium cepa* y las laminillas de frotis de linfocitos humanos, se obtuvieron los autorradiogramas al ser cubiertas con una emulsión autorradiográfica Ilford L₄, preparada con 24 hrs de anticipación a su uso de la manera como se explica a continuación.

Trabajando en la cámara oscura se deja la emulsión durante 30 min a la temperatura ambiente. Después se hace la dilución en una proporción 3:1 y se mantiene durante 1 hr a baño María a una temperatura de 40°C , agitándola cada 15 min. (Larra y Droz, 1970; Jacob, 1971). La emulsión diluida se guarda a una temperatura de 4°C . Las laminillas fueron cubiertas por inmersión con la emulsión diluida Ilford L₄ a temperatura ambiente. Se dejaron secar y posteriormente se guardaron en cajas negras. Se mantuvieron a 4°C durante el tiempo que fue necesario.

Los autorradiogramas fueron revelados después de 1 mes de exposición para lo cual se utilizó revelador KODAK D₁₉, en una proporción 3:1 por 3 min y dejando secar a la temperatura ambiente; se colorearon con azul de toluidina disuelto en borax (ambos al 1%) a baño María por 4 min, evitando el enmascaramiento de los granos de plata.

Las micrografías fueron tomadas con un microscopio Axiomat de la casa Carl Zeiss con película Plus X. Para estandarizar todos los procedimientos se utilizó siempre el objetivo 100 X, un aumento intermedio de 2 X y un proyector 3.2 X. Para los negativos se usó revelador KODAK HC-110 en una proporción 3:1.

La amplificación fue siempre de 5.1 X y se obtuvo un aumento final constante de 3 296 X. En estas amplificaciones se midieron las áreas citoplasmática y cromosómica de las células en división y las áreas citoplasmática, nuclear y nucleolar de las células en interfase, utilizando un digitalizador de coordenadas unido a un microcomputador Hewlett Packard 9 825 S. Se contaron los granos de plata en cada uno de los compartimentos mencionados.

En las amplificaciones de las laminillas de linfocitos se midieron también las áreas centromérica y de la zona del resto del cromosoma (brazos del cromosoma), contando los granos de plata de estos compartimentos celulares.

Finalmente los resultados se analizaron estadísticamente por medio de las pruebas t de "Student" y la de Mann-Whitney (Snedecor, 1971; Schwartz, 1977), empleando el microcomputador arriba mencionado. En todos los casos se usaron programas desarrollados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., por el Dr. G.H. Vázquez Nin.

RESULTADOS

1.- Morfología.

El análisis morfológico del presente estudio autorradiográfico nos permite hacer notar que después de 1 mes de exposición, las células de meristemos de raíz de *Allium cepa* incubadas con uridina H³, muestran incorporación del material radioactivo, aunque se observa un bajo nivel de marcado.

La observación directa de las imágenes (figs. 1-4) de células en mitosis no revela una clara diferencia en la densidad de granos de plata entre las áreas cromosómicas y el citoplasma. Sin embargo las células interfásicas que se muestran en las mismas micrografías tienen una densidad de marcado mayor en el núcleo que en el citoplasma y dentro del núcleo, el nucléolo es el lugar de mayor densidad de granos. Estos núcleos interfásicos demuestran que tanto la incubación con el precursor radioactivo como las manipulaciones tendientes a la obtención de los autorradiogramas fueron exitosas.

En cuanto a los frotis de linfocitos humanos (figs. 5-6), observamos que en las células en división, los cromosomas (cr) muestran una mayor incorporación del material radioactivo (fig. 5) y podemos afirmar que existe una clara diferencia entre la densidad de marcado de las áreas citoplasmática y cromosómica.

Finalmente se observa también que las regiones cercanas a la zona centromérica (cm) que incluye la región del cinetocoro (fig. 6), existe cierta incorporación del precursor radioactivo.

Por lo tanto el estudio cuantitativo de las diferencias de densidad de marcado usando métodos estadísticos, está plenamente justificado.

2.- Análisis Cuantitativo de Autorradiogramas.

Como ya se mencionó (Material y Métodos), en el presente estudio autorradiográfico se incluyeron células en división y células en interfase de meristemas de raíces de *Allium cepa*, incubadas durante 30 min y 60 min con uridina H³ y algunas de las cuales fueron tratadas con colchicina. También se estudiaron células en mitosis de linfocitos humanos de sangre periférica, incubadas con uridina H³.

Se compararon las densidades de marcado de las áreas citoplasmática y cromosómica de las células en división y las áreas citoplasmática, nuclear y nucleolar de las células en interfase.

Células en Mitosis.- En las células de *Allium cepa* en división con 30 min de incubación con uridina H³ [Tabla 1] la diferencia entre la densidad de marcado en las áreas citoplasmática y cromosómica es significativa ($p < 0.001$). En las células tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³ se puede ver [Tabla 2] que la diferencia es también significativa en este caso ($p < 0.001$).

Resultados similares se observan en las células de *Allium cepa* en división con 60 min de incubación con uridina H³ [Tabla 3] y en las que fueron tratadas con colchicina y mantenidas en incubación durante 60 min [Tabla 4] ya que las diferencias en las densidades de marcado son significativas también, con un nivel de confianza de 99.9% de que éste sea un resultado debido a fenómenos biológicos naturales.

En cuanto a las células de linfocitos en división, tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³ se puede observar [Tabla 5] que la diferencia entre la densidad de marcado del citoplasma y los cromosomas es altamente significativa, con un nivel de confianza de 99.9% de que éste también sea un resultado debido a un fenómeno que no se debe al azar.

Células en Interfase.- Las células en interfase de meristemas de raíz de *Allium cepa* con 30 min de incubación con uridina H³

|Tabla 6| muestran que comparando la densidad de marcado entre el área citoplasmática y nuclear, la diferencia es significativa ($p < 0.001$); comparando las áreas nuclear y nucleolar, la diferencia es significativa ($p < 0.001$) y por último, la diferencia entre las áreas citoplasmática y nucleolar es también significativa ($p < 0.001$). Las células tratadas con colchicina y con 30 min de incubación |Tabla 7| muestran que las diferencias entre las zonas de marcado de las áreas citoplasmática y nuclear, nuclear y nucleolar, citoplasmática y nucleolar, son significativas ($p < 0.01$); las densidades de estas últimas áreas fueron analizadas por la prueba de Mann-Whitney debido al reducido número de observaciones.

La densidad de marcado en las células en interfase de meris^{temos} de *Allium cepa*, con 60 min de incubación con uridina H^3 |Tabla 8| fue analizada entre las áreas citoplasmática y nuclear ($p < 0.001$), nuclear y nucleolar ($p < 0.001$) y citoplasmática y nucleolar ($p < 0.001$), resultando las tres comparaciones, estadísticamente significativas. En cuanto a las diferencias de marcado entre las mismas áreas objeto de estudio en células tratadas con colchicina |Tabla 9| son también significativas ($p < 0.001$).

Finalmente en las células de linfocitos en división tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H^3 |Tabla 10| la diferencia en la densidad de marcado entre las áreas de la zona centromérica (que incluye la zona del cinetocoro) y el resto del cromosoma (brazos del cromosoma), no es significativa, existiendo una probabilidad del 0.5% y 1% de que este resultado se deba al azar.

- Figs. { 1-4 } Autorradiografías Ópticas de cortes semifinos de células de meristemos de raíz de *Allium cepa*, en división y en interfase, incubadas con uridina H³.
- Figs. { 5-6 } Autorradiografías Ópticas de frotis de células en cultivo de linfocitos humanos, en división, activadas con fitohemaglutinina, tratadas con colchicina e incubadas con uridina H³ durante 30 min.
- Fig. + 1 + Micrografía Óptica de una célula en metafase. Incubación durante 60 min con uridina H³. 1 600 aumentos.
- Fig. + 2 + Micrografía Óptica de células en división y en interfase. Tratadas con colchicina e incubadas con uridina H³ durante 60 min. 1 600 aumentos.
- Fig. + 3 + Micrografía Óptica de células en división y en interfase. Incubación con uridina H³ durante 30 min. 1 600 aumentos.
- Fig. + 4 + Micrografía Óptica de una célula en anafase: cromosomas (cr) y de una célula en interfase: citoplasma (ci), núcleo (Nu) y nucléolo (nu). Tratamiento con colchicina por 1 hr e incubación con uridina H³ durante 60 min. 1 600 aumentos.
- Fig. + 5 + Micrografía Óptica de linfocitos humanos en división. 1 600 aumentos.
- Fig. + 6 + Micrografía Óptica de linfocitos humanos. Placa metafásica (pm) y región del centrómero (cm). 1 600 aumentos.

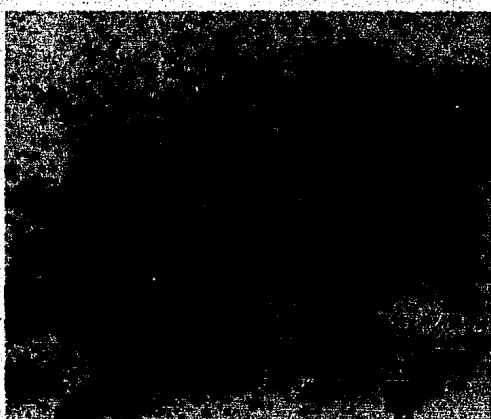
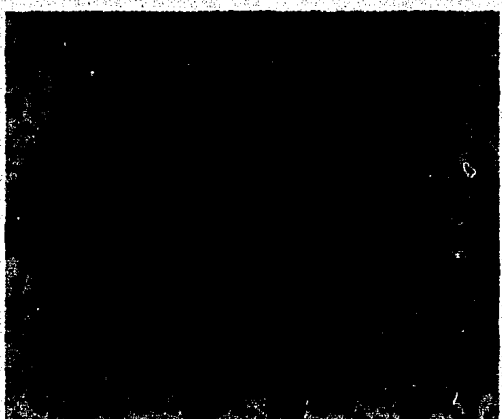
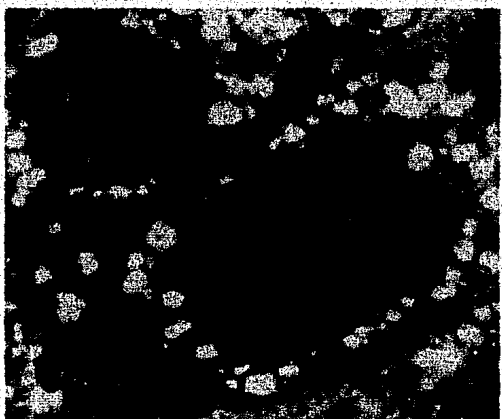
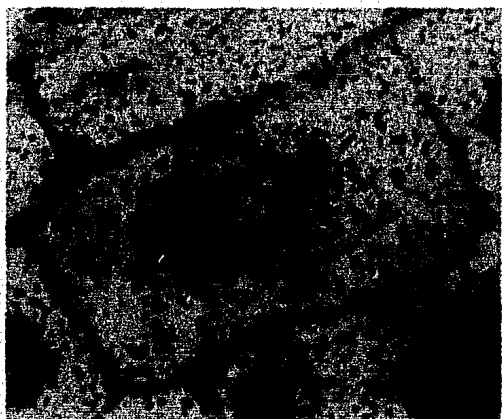


Tabla 1.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en división, con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:	
	Citoplasmática	Cromosómica
	granos / μ^2	
MEDIA	0.7416	1.1441
DESVIACION ESTANDAR	0.4739	0.6917
ERROR ESTADISTICO	0.0699	0.1020
NO. DE OBSERVACIONES	46	46

(-----)

T-ESTADISTICA 3.2551

GRADOS DE LIBERTAD 90

Tabla 2.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en división, tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:	
	Citoplasmática	Cromosómica
	granos / μ^2	
MEDIA	1.3241	2.1002
DESVIACION ESTANDAR	0.2290	0.7151
ERROR ESTADISTICO	0.0488	0.1525
NO. DE OBSERVACIONES	22	22

(-----)

T-ESTADISTICA 4.8480

GRADOS DE LIBERTAD 42

Tabla 3.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en división, con 60 min de incubación con uridina H³.

	Areas:	
	Citoplasmática	Cromosómica
	granos / μ^2	
MEDIA	0.7910	1.4478
DESVIACION ESTANDAR	0.4706	0.8799
ERROR ESTADISTICO	0.0523	0.0978
NO. DE OBSERVACIONES	81	81

(-----)

T-ESTADISTICA 5.9243 ,

GRADOS DE LIBERTAD 160

Tabla 4.- Comparación entre la densidad de
 marcado en células de *Allium cepa* en
 división, tratadas con colchicina y con
 60 min de incubación con uridina H³.

	Areas: Citoplasmática	Cromosómica
	granos / μ^2	
MEDIA	0.7809	1.3260
DESVIACION ESTANDAR	0.1856	0.4782
ERROR ESTADISTICO	0.0333	0.0859
NO. DE OBSERVACIONES	31	31

(-----)
 T-ESTADISTICA 5.9159

GRADOS DE LIBERTAD 60

Tabla 5.- Comparación entre la densidad de marcado en células de linfocitos en división, tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:	
	Citoplasmática	Cromosómica
	granos / μ^2	
MEDIA	1.3182	2.0445
DESVIACION ESTANDAR	0.3712	0.6543
ERROR ESTADISTICO	0.0587	0.1048
NO. DE OBSERVACIONES	40	39

(-----)

T-ESTADISTICA	6.0876
GRADOS DE LIBERTAD	77

Tabla 6.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en interfase, con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:		
	Citoplasmática	Nuclear	Nucleolar
	granos / μ^2		
MEDIA	0.3923	0.8372	3.4355
DESVIACION ESTANDAR	0.2497	0.4603	2.5218
ERROR ESTADISTICO	0.0573	0.1056	0.5786
NO. DE OBSERVACIONES	19	19	19
-----)			
T-ESTADISTICA	3.7034		
GRADOS DE LIBERTAD	36		
-----)			
T-ESTADISTICA	4.4180		
GRADOS DE LIBERTAD	36		
-----)			
T-ESTADISTICA	5.2344		
GRADOS DE LIBERTAD	36		

Tabla 7.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en interfase, tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:		
	Citoplasmática	Nuclear	Nucleolar
	granos / μ^2		
MEDIA	1.0655	1.8494	3.3189
DESVIACION ESTANDAR	0.2158	0.4043	0.6461
	}-----}		
PROBABILIDAD	= 0.01		
	}-----}		
PROBABILIDAD	= 0.01		
	}-----}		
PROBABILIDAD	= 0.01		

Tabla 8.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en interfase, con 60 min de incubación con uridina H³.

	Areas:		
	Citoplasmática	Nuclear	Nucleolar
	granos / μ^2		
MEDIA	0.5515	1.4946	3.4298
DESVIACION ESTANDAR	0.2845	0.6034	1.5387
ERROR ESTADISTICO	0.0424	0.0900	0.2294
NO. DE OBSERVACIONES	45	45	45

T-ESTADISTICA	9.4821		
GRADOS DE LIBERTAD	88		

T-ESTADISTICA		7.8547	
GRADOS DE LIBERTAD		88	

T-ESTADISTICA		12.3392	
GRADOS DE LIBERTAD		88	

Tabla 9.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* en interfase, tratadas con colchicina y con 60 min de incubación con uridina H³.

	Areas:		
	Citoplasmática	Nuclear	Nucleolar
	granos / μ^2		
MEDIA	0.5447	1.2850	4.2978
DESVIACION ESTANDAR	0.1365	0.3321	1.8503
ERROR ESTADISTICO	0.0455	0.1107	0.6168
NO. DE OBSERVACIONES	9	9	9

T-ESTADISTICA	6.1851		
GRADOS DE LIBERTAD	16		

T-ESTADISTICA	4.8079		
GRADOS DE LIBERTAD	16		

T-ESTADISTICA	6.0686		
GRADOS DE LIBERTAD	16		

Tabla 10.- Comparación entre la densidad de marcado en células de linfocitos en división, tratadas con colchicina y con 30 min de incubación con uridina H³.

	Areas:	
	Centrómero	Resto del Cromosoma
	granos / μ^2	
MEDIA	1.6236	1.2483
DESVIACION ESTANDAR	1.4943	0.6942
ERROR ESTADISTICO	0.3050	0.1312
NO. DE OBSERVACIONES	24	28

T-ESTADISTICA 1.1893

GRADOS DE LIBERTAD 50

D I S C U S I O N

El desarrollo de técnicas como la autorradiografía permite, en algunos casos, cuantificar el estudio de los sistemas celulares y utilizarlas en problemas que aún no han podido llegar a resolverse.

Concretamente la opinión de que la síntesis de ARN se detiene durante la mitosis, nos llevó a plantear el presente estudio y contribuir al conocimiento sobre el proceso de transcripción o síntesis de ARN en células mitóticas ya que este problema presenta un enorme interés en biología.

Basándonos en estudios que sugieren la incorporación de uridina H^3 en el ARN de células en mitosis (Brinkley y Stubblefield, 1970; Moyne y Garrido, 1976; Fakan y Nobis, 1978) y en ciertas evidencias que revelan la presencia de RNP en el cinetocoro (Esponda, 1978; Rieder, 1979a y 1979b; Brazelton, 1980), seleccionamos el material que nos permitiría investigar también si el cinetocoro es un gen que durante la mitosis se encuentra activo, es decir, si se expresa en la división celular.

El material biológico fue tratado con colchicina pues esta droga permite localizar mayor número de mitosis sin impedir la síntesis ni el procesamiento postranscripcional del ARN.

Se sabe que la colchicina tiene la propiedad de unirse fuertemente a la tubulina, principal proteína de los microtúbulos. El mecanismo de acción de esta droga es inhibir la polimerización microtubular por el bloqueo de los sitios activos de las subunidades de la proteína y facilitar la despolimerización de los microtúbulos ya existentes. (De Robertis y De Robertis, 1981).

Cuando es aplicada en células en división afecta especialmente los microtúbulos; destruye el huso y al mismo tiempo obstaculiza el movimiento cromosómico. Además se une a las membranas cito

plasmática y nuclear y altera el transporte nucleosídico. (Forer, 1974.

Recientemente Hillmann y Ruthmann (1982) encontraron que inhibidores como la colchicina no tienen un efecto notable sobre las membranas de células meristemáticas. Schumm y Webb (1982) aseguran que esta droga inhibe la liberación del ARN mensajero, actuando sobre el transporte de ARN más bien que sobre el procesamiento y que su efecto puede estar ligado a la membrana nuclear.

Estos estudios sugieren que la colchicina tampoco impediría la migración del ARN en un sistema no compartimentalizado por membranas, como los cromosomas mitóticos. En efecto, en el presente estudio no se han encontrado diferencias entre células tratadas o no con colchicina. En esta forma podemos considerar que los resultados obtenidos en ambos grupos de especímenes son igualmente válidos.

Se utilizaron linfocitos humanos activados con fitohemaglutinina porque se ha establecido que los linfocitos en cultivo celular pueden ser estimulados para que aumenten de tamaño y se dividan (Ham, 1975), por lo que las mitosis son muy numerosas y ejemplifican los fenómenos que suceden en la división de las células de los animales superiores.

Con la uridina H^3 , precursor específico del ARN, obtuvimos la información sobre la localización de la transcripción. La administración del marcado se basó en la duración del ciclo de división celular y de las fases de éste. Según López-Sáez y colaboradores (1966) y González-Fernández y colaboradores (1971), a una temperatura de 20°C, la mitosis dura entre 2.2 hrs y 2.4 hrs; la profase 1.05 hrs, la metafase 0.29 hrs y la anafase 0.21 hrs. Con los tiempos de 30 min y 60 min de incubación con uridina H^3 utilizados en este estudio, la mayor parte de las células que estaban en metafase y anafase en el momento de la fijación, no han ingresado al marcado en una etapa anterior a la mitad de la profase.

La transcripción en los organismos eucariontes ocurre en el núcleo, en donde es sintetizado el ARN, pasando luego al citoplas-

ma. (Clawson y Smuckler, 1982). Se dice que la síntesis de ARN ocupa toda la interfase del ciclo celular (De Robertis y De Robertis, 1982) y que las células mitóticas no sintetizan ningún ARN. (Crippa, 1966; citado por Brinkley y Stubblefield, 1970).

Sin embargo, Brinkley y Stubblefield (1970) encontraron que células metafásicas sincronizadas revelan incorporación de uridina H^3 en el ARN entre el 5% y 10% de los rangos de interfase. Fakan y Nobis (1978) en un estudio ultraestructural sobre los sitios de transcripción durante el ciclo celular y usando autorradiografía de alta resolución, encontraron que ocurre transcripción de ARN, a muy bajo nivel, en la periferia de cromosomas de células CHO en metafase tardía y anafase temprana y que los sitios de transcripción del ARN nucleolar en células interfásicas muestran que hay regiones de cromatina condensada asociadas con la periferia de estas áreas.

En nuestro estudio a nivel de microscopía óptica, obtuvimos resultados que pudieron ser cuantificados estadísticamente, llegando a la conclusión de que existe marcado en células de *Allium cepa* y en linfocitos, en cromosomas en metafase y anafase con una diferencia significativa ($p < 0.001$) en la densidad de marcado en comparación con el citoplasma adyacente de una misma célula tomado como control.

Se cuantificó la densidad de marcado en el citoplasma, en el núcleo y en el nucléolo de células de *Allium cepa* en interfase después de 30 min y 60 min de incubación con uridina H^3 para tener en cada espécimen un control positivo del marcado. Se encontró que la densidad de granos de plata es menor en el citoplasma en comparación con el nucléolo con una diferencia significativa también ($p < 0.001$). Esto último está de acuerdo con estudios que indican que los centros fibrilares nucleolares de células meristemáticas son zonas activas (Moreno-Díaz de la Espina, 1976; Moreno-Díaz de la Espina y col., 1980; Risueño y col., 1979) y apoya el hecho de que en el nucléolo se lleva a cabo un gran volumen de síntesis de ARN.

Respecto al cinetocoro Brinkley y Stubblefield (1970) sostienen la idea de que esta estructura se comporta como un gen clásico, ya que es activado en un momento específico del ciclo de división y es suprimido cuando su función termina; además, que debe ser replicado al mismo tiempo que el cromosoma puesto que el cinetocoro permanece como parte estable e integral. Explican que en el ADN de esta región se producen bandas de ARN alrededor de las cuales pueden agregarse proteínas de los microtúbulos. Sin embargo, el hecho de que los microtúbulos contengan ARN es discutido por algunos autores como Went (1966) y apoyado por otros como Rieder (1979b), quien afirma que el componente RNP del cinetocoro está asociado con los microtúbulos.

Se han hecho diferentes sugerencias acerca de la posibilidad de que un material distinto al ADN se encuentre en el cinetocoro. Las evidencias que han revelado RNP en esta región, (Esponda, 1978; Rieder, 1979a y 1979b; Brazelton, 1980), parecen indicar que el cinetocoro está incorporando el isótopo radioactivo.

Nuestros resultados indican que no existe diferencia significativa entre la densidad de marcado del área centromérica, que incluye la región del cinetocoro, en comparación con el resto del cromosoma. Sin embargo, esto no significa que en esta región la síntesis de ARN esté detenida, puesto que existe incorporación del precursor radioactivo en la misma zona.

La pregunta permanece abierta para seguir investigando si el material RNP que se ha descubierto en el cinetocoro es sintetizado por esta estructura misma, o bien si el ARN asociado a esta región es sintetizado en otro lugar o en esa zona pero en otro momento, es decir, si la síntesis se produce fuera de la metafase o la anafase.

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

- 1).- Podemos concluir que existe síntesis de ARN en cromosomas en metafase y anafase de vegetales y animales.

- 2).- El centrómero no es un lugar de transcripción especialmente activo en mitosis, su actividad sintética se confunde con la de otras zonas cromosómicas.

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

- Avivi, L., and Feldman, M. Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of plants. *Hum. Genet.* 55: 281-295, 1980.
- Brazelton, J.P. Ribonucleoprotein staining of *Luzula* kinetochores. *Canad. J. Genet. Cytol.* 22: 7-10, 1980.
- Brazelton, J.P. The ultrastructure of meiotic kinetochores of *Luzula*. *Chromosoma (Berl.)* 82: 143-151, 1981.
- Brinkley, B.R., and Stubblefield, E. Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and meiosis. In *Adv. Cell Biol.* Prescott, D.M., Goldstein, L., and McConkey, E. (Eds.) 1: 119-185, 1970.
- Castañeda, M. *Antología de Biología Molecular. Primera Edición.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1973.
- Clawson, G.A., and Smuckler, E.A. A model of nucleocytoplasmic transport of ribonucleoprotein particles. *J. Theor. Biol.* 95: 607-613, 1982.
- Conn, E.E., y Stumpf, P.K. *Bioquímica Fundamental. Segunda Edición.* Editorial Limusa-Wiley, S.A. México, 1972.
- Crick, F.H.C. Chromosome structure and function. Future prospects. *Eur. J. Biochem.* 83: 1-3, 1978.
- Dawes, C.J. *Biological Techniques in Electron Microscopy.* Barnes & Noble, S.A. New York, 1971.
- De Robertis, E.D.P., y De Robertis, E.M.F. *Biología Celular y Molecular. Décima Edición.* "El Ateneo". Buenos Aires, 1981.
- De Robertis, E.D.P., y De Robertis, E.M.F. *Fundamentos de Biología Celular y Molecular.* "El Ateneo". Buenos Aires, 1982.
- Dyson, R.D. *Principios de Biología Celular.* Fondo Educativo Interamericano, S.A. México, 1977.
- Esponda, P. Cytochemistry of kinetochores under electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 114: 247-252, 1978.

- Fakan, S., Puvion, E., and Spohr, G. Localization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99: 155-164, 1976.
- Fakan, S., and Nobis, P. Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells. *Exp. Cell Res.* 113: 327-337, 1978.
- Forer, A. Possible roles of microtubules and actin-like filaments during cell-division. In *Cell Cycle Controls*. Academic Press, Inc. New York, 1974.
- González-Fernández, A., Giménez-Martín, G., and De la Torre, C. The duration of the interphase periods at different temperatures in root tip cells. *Cytobiologie* 3: 367-371, 1971.
- Ham, A.W. *Tratado de Histología. Séptima Edición*. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, 1975.
- Hillmann, G., and Ruthmann, A. Effect of mitotic inhibitors on the ultrastructure of root meristem cells. *Planta* 155: 124-132, 1982.
- Jacob, F., Monod, J., Tatum, E.L., Calvin, M., Volfin, P., Bus-sard, A., Prigogine, I., Blangy, D., Brachet, J., Thuillier, P., Changeux, J.P. *Biología Molecular*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, 1981.
- Jacob, J. *Revue générale sur l'autoradiographie en microscopie électronique*. *Int. Rev. of Cytology* 30: 91-181, 1971.
- Kornberg, R.D., and Klug, A. The nucleosome. *Scientific American*. Vol. 244, No. 2: 52-64, 1981.
- Larra, F., and Droz, B. *Revue générale sur l'autoradiographie en microscopie électronique*. *J. Microscopie* 9: 845-880, 1970.
- Lehninger, A.L. *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. New York, 1970.
- López-Sáez, J.F., Giménez-Martín, G., and González-Fernández, A. Duration of the cell cycle and its dependence on temperature. *Zeitschrift für Zellforschung* 75: 591-600, 1966.
- Maeki, K. The kinetochore of the Lepidoptera, II. *Proc. Japan Acad.* Vol. 56 (B): 508-513, 1980.

- Maeki, K. The kinetochore of the Lepidoptera, III. Proc. Japan Acad. Vol. 57 (B): 71-76, 1981.
- Mazia, D. Mitosis and the physiology of cell division. In The Cell. Brachet, J., and Mirsky, A.E. (Eds.). Academic Press, Inc. Vol. 3. New York, 1961.
- Mazia, D. Cómo se dividen las células. En La Célula Viva. Seleccionadas de Scientific American. Segunda Edición. Editorial Blume. México, 1969.
- Mazia, D., Mitchison, J.M., and Van't-Hof, J. In The Cell Cycle Controls. Academic Press, Inc. New York, 1974.
- Mazia, D. La División de las Células. Primera Edición. Compañía Editorial Continental, S.A. México, 1975.
- Mercer, E.H. y Birbeck, M.S.C. Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos. Primera Edición. Editorial Blume. México, 1974.
- Michaux-Ferrière, N. Radioautography applied to development. J. Microscopie Biol. Cell 27: 135-138, 1976.
- Mirsky, A.E., Osawa, S. The interphase nucleus. In The Cell. Brachet, J., and Mirsky, A.E. (Eds.). Academic Press, Inc. Vol. 2. New York, 1961.
- Moens, P.B., and Church, K. Centromere sizes, positions, and movements in the interphase nucleus. Chromosoma (Berl.) 61: 41-48, 1977.
- Moreno-Díaz de la Espina, S. Ultrastructural aspects of nucleolar fibrillar centres in meristematic cells of *Allium cepa*. Experientia 32: 1384-1387, 1976.
- Moreno-Díaz de la Espina, S., Medina, F.J., and Risueño, M.C. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. European J. Cell Biol. 22: 724-729, 1980.
- Moyne, G., and Garrido, J. Ultrastructural evidence of mitotic perichromosomal ribonucleoprotein in hamster cells. Exp. Cell Res. 98: 237-247, 1976.
- Nultsch, W. Botánica General. Primera Edición. Editorial Norma. Cali, Colombia, 1966.

- Puvion, E., and Moyne, G. Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115: 79-88, 1978.
- Rieder, C.L. Localization of ribonucleoprotein in the trilaminar kinetochore of PTK₁. *J. Ultrastruct. Res.* 66: 109-119, 1979a.
- Rieder, C.L. Ribonucleoprotein staining of centrioles and kinetochores in newt lung cell spindles. *J. Cell Biol.* 80: 1-0, 1979b.
- Ris, H. Higher order structures in chromosomes. *Electron microscopy. Vol. III. Ninth International Congress on Electron Microscopy.* Sturgers, J.M. (Ed.). Toronto, Canada, 1978.
- Risueño, M.C., and Moreno-Díaz de la Espina, S. Ultrastructural and cytochemical study of the quiescent root meristematic cell nucleus. *J. Submicr. Cytol.* 11 (1): 85-98, 1979.
- Schopf, J.W. La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia.* Barcelona, España, 1978.
- Schumm, D.E., and Webb, T.E. Site of action of colchicine on release from liver nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Vol. 105, No. 1: 375-382, 1982.
- Schwartz, D. *Méthodes statistiques.* Flammarion Medecine Sciences. Troisième Edition. Paris, 1977.
- Simpson, G.G. *La Vida en el Pasado.* Alianza Editorial, S.A. Madrid, 1967.
- Simpson, G.G. *El Sentido de la Evolución.* Cuarta Edición. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina, 1970.
- Smith, C.U.M. *Biología Molecular.* Editorial Alianza Universidad. Madrid, 1968.
- Snedecor, G.W., y Cochran, W.G. *Métodos Estadísticos.* Compañía Editorial Continental, S.A. México, 1971.
- Vázquez-Nin, G.H., et all. A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie* 16: 243-246, 1973.

Went, H.A. The behavior of centrioles and the structure and formation of the achromatic figure. *Protoplasmatologia* 4: 1-119, 1966.

Zeng, M. Ultrastructural changes of nuclei after treatment with mesodermal inducing. *Scientia Sinica (Series B)*. Vol. XXV 7: 725-729, 1982.