

2 ej
83



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

COMPARACION DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL
NUCLEO CELULAR INTERFASICO EN VARIOS
TEJIDOS DE Romerolagus diazi (Díaz, 1893) y
Oryctolagus cuniculus (Linnaeus, 1758)

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P r e s e n t a :

ANGELICA GONZALEZ MACIEL



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 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.- INTRODUCCION
 - 1.- Antecedentes históricos
 - 2.- Ultraestructura del núcleo interfásico
 - a) Membrana nuclear
 - b) Lámina densa
 - c) Cromatina
 - d) Nucleolo
 - e) Particular ribonucleoprotéicas extranucleolares
 - 3.- Orden Lagomorfa
- III.- Material y método
- IV.- Resultados
- V.- Discusión
- VI.- Conclusiones
- VII.- Bibliografía

I. RESUMEN

Se realizó una comparación a nivel de núcleo celular interfásico en tejidos de dos organismos que divergieron durante su evolución (30 a 40 millones de años), Romerolagus diazi y Oryctolagus cuniculus, utilizando la técnica de contraste preferencial de Bernhard.

Se observaron en todos los tejidos estudiados de ambos organismos, gránulos inter y pericromatinianos, fibrillas y nucleolo, así como regiones blanqueadas en las que el método de tinción preferencial de Bernhard pone de manifiesto a la cromatina compacta.

La estimación cuantitativa del diámetro y volumen de los gránulos pericromatinianos indican una diferencia significativa entre los dos organismos, debida tal vez a algún cambio en la información genética en el procesamiento postranscripcional de los mensajeros o en la composición protéica de dichos gránulos.

II. INTRODUCCION

1.- Antecedentes Históricos

En 1833, hace aproximadamente siglo y medio, el núcleo fue descrito por primera vez por Robert Brown y su existencia fue confirmada más tarde tanto en células animales como vegetales por Schleiden y Schwann en 1839. Sin embargo fue el nucleolo la primera estructura que se describió debido a la gran diferencia que existe entre el índice de refracción de éste y el nucleoplasma circundante (27).

Miescher en 1869, logró aislar el ácido desoxiribonucleico (ADN), hecho que tuvo gran importancia porque impulsó los estudios bioquímicos de los ácidos nucleicos. Más tarde, Mirsky y Pollister en 1964 establecieron que el ácido ribonucleico (ARN) se encuentra en forma de complejos constituidos por ARN y proteínas; posteriormente en 1960, Frenster y col., descubrieron que el extracto de núcleos de timo de ternera presenta partículas de ribonucleoproteína activas en síntesis proteica in vivo e in vitro.

Finalmente, Monneron y Bernhard, describieron la distribución de las estructuras ribonucleoprotéicas intranucleares durante la interfase en células de mamíferos, utilizando el método de tinción preferencial de Bernhard. La iniciación y el avance de la microscopía electrónica, así como los estudios bioquímicos en conjunto han contribuido de manera importante al estudio de la ultraestructura y la bioquímica del núcleo interfásico entre otras cosas (27).

En la actualidad se sabe que en eucariotes el primer ARN transcrito a partir de ADN posee regiones que codifican (exones) y regiones que no lo hacen (intrones) y se le llama ARN premensajero o heterogéneo nuclear. Este se une dentro del núcleo a diversas proteínas conformando

las partículas ribonucleoprotéicas intranucleares, lugar donde se cree, sufre un proceso de maduración (optimización del proceso de transcripción) para luego migrar al citoplasma y acoplarse, como ARN mensajero, a los ribosomas e iniciar el proceso de traducción a proteínas (12).

En eucariontes, la secuencia de eventos de maduración postranscripcional implica fenómenos como los de metilación y poliadenilación de los ácidos ribonucleicos, además de la fragmentación de los genes durante la eliminación de los intrones (4). A nivel ultraestructural es posible diferenciar partículas intranucleares que pueden estar involucradas en estos mecanismos.

Actualmente se conocen algunas de las estructuras ribonucleoprotéicas intranucleares, partículas que tienen relación con el procesamiento postranscripcional del ARN dentro del núcleo, concretamente de Chordata y Arthropoda, además de datos obtenidos en otros invertebrados. Todos estos trabajos de alguna manera han comprobado que existe unidad a nivel nuclear estructural en los organismos animales, es decir, que es un carácter estable, debido tal vez a los procesos que allí se realizan. Por lo anterior es de gran importancia explorar la ultraestructura nuclear en los diferentes phyla y entre organismos considerados como relictos para contribuir al conocimiento de su ultraestructura nuclear ya que podría uniformar el criterio de que ésta se ha conservado a través del tiempo debido a la universalidad de los procesos que allí se realizan (12).

2.- Ultraestructura del núcleo interfásico.

a) Membrana Nuclear. Fue descrita por Callan y Tomlin en 1950 como un sistema de membranas paralelas con grosor cada una de 7-8 nanómetros (nm) incluyendo entre ellas un espacio de unos 30-50 nm de espesor, en observaciones realizadas en el microscopio electrónico que precedieron a las técnicas de cortes finos. La porción externa de la membrana se en-

cuentra frecuentemente cubierta por ribosomas mientras que la interna está en contacto con la cromatina y otros elementos nucleares (27).

El algunas partes los pares de membranas se unen para formar poros octogonales de alrededor de 65nm, a través de los cuales Stevens y Swift (27) observaron el paso de partículas de ribonucleoproteínas (RNP) en configuraciones alargadas. Durante la mitosis la membrana nuclear se fragmenta permitiendo la mezcla de elementos nucleares con el citoplasma y posteriormente empieza a reconstruirse durante la telofase, a partir de los componentes del retículo endoplásmico rugoso, lo que hace pensar que la envoltura nuclear puede ser solamente una región especializada del mismo (16).

b) Lámina densa. Descrita por Fawcett en 1966 en células de invertebrados y posteriormente en varias especies de células de vertebrados, se localiza entre la capa interna de la membrana nuclear y la cromatina periférica; su espesor varía entre 150-800 angstroms. Su naturaleza proteica ha sido demostrada por digestiones enzimáticas tanto en invertebrados como en células de vertebrados. No se ha precisado su función (27).

c) Cromatina. Fleming en 1882 la definió como el material nuclear que toma tinciones básicas en contraste con las sustancias acromáticas que no aceptan los mismos colorantes. Kossell en 1884 observó que el ADN estaba asociado a proteínas básicas a las cuales posteriormente se dió el nombre de histonas.

En 1904 Montgomery describió que ciertos cromosomas permanecen en estado de condensación durante la interfase, fenómeno conocido como heteropicnosis: a los cromosomas que presentaban tal comportamiento se les llamó heterocromosomas (27).

Utilizando técnicas clásicas de tinción se puede observar la distribución de la cromatina en dos categorías: cromatina condensada ó hetero-

cromatina, localizada tanto en la periferia del núcleo, como asociada al nucleolo también conocida como cromatina perinucleolar y la cromatina dispersa que se encuentra distribuida en el espacio nuclear. Ambos tipos de cromatina reaccionan positivamente con la reacción de Feulgen. La cromatina representa a la condición interfásica de los cromosomas y está constituida principalmente por ADN nuclear, protefínas no histónicas y ARN (27).

d) Nucleolo. Estructura observada por Fontana en 1781 en la cual fué determinada la presencia de ARN por Brachet en 1942. El ARN del nucleolo representa el 10% de la masa nucleolar, el 20% de ARN nuclear y el 1.6% de ARN total de la célula, lo cual fue determinado por Stern y col., en - - 1959.

El nucleolo está formado por tres elementos ultraestructurales fundamentales: fibrillas de 10 angstroms de diámetro, gránulos de 150 angstroms parecidos a ribosomas y una matriz difusa. Bernhard por medio de digestiones enzimáticas, determinó que los principales componentes contienen ARN (gránulos y fibrillas) mientras que el tercero contiene solamente protefínas (27).

Fibrillas y gránulos se han relacionado con la síntesis de ribosomas, los cuales resultan del ensamblaje de precursores de ARN ribosomal con protefínas de origen citoplásmico (11). Heitz en 1931 advirtió que el nucleolo se forma sobre una porción definida de un cromosoma pero no a partir del material del mismo. Posteriormente McClintock (1934) denominó a esta región del "organizador nucleolar" y aportó evidencias de que el nucleolo se origina por una actividad propia de esta zona cromosómica. La naturaleza ribonucleoproteica de esta estructura ha sido demostrada por métodos bioquímicos y citoquímicos (27).

e) Partículas Ribonucleoproteicas Extranucleolares. La publicación en 1960 de la técnica de Bernhard para el contraste preferencial de las

partículas ribonucleoprotéicas (RNP) en microscopía electrónica, desencadenó muchas investigaciones sobre estas partículas. Es un procedimiento sencillo, altamente reproducible, que permite el estudio de las estructuras RNP intranucleares sin que la imagen de la cromatina se superponga y produzca incertidumbre sobre la morfología y estructura de las partículas (17).

En cortes ultrafinos tratados con el método preferencial de Bernhard se pueden describir las siguientes partículas RNP:

Gránulos intercromatinianos (GI). Descritos por Swift en 1959; aparecen en los núcleos de muchas células animales como agrupaciones de gránulos de un diámetro promedio de 200-250 angstroms y revelan una distribución irregular entre cúmulos de cromatina. Están interconectados con fibrillas por lo que aparecen como cadenas (11, 12).

Observaciones en secciones ultrafinas, al microscopio electrónico revelan que los GI están constituidos de finas fibras enroscadas. Granboulan y Bernhard en 1961 sugirieron su naturaleza ribonucleoproteica - (18).

Se ha encontrado que son estructuras sensibles a la acción de la pronasa pero algunos autores difieren en cuanto a su resistencia a la RNAasa. Muchas investigaciones concluyen que los GI pueden ser una clase especial de RNP que contienen "especies" diferentes de ARN bien protegidas por proteínas de la acción de la RNAasa (27).

En cuanto a su significado funcional, no ha sido posible correlacionar variaciones cuantitativas de GI con cambios específicos en el metabolismo celular. Se ha observado que su proporción varía por efectos de infecciones virales o por la acción de algunos antimetabolitos como la actinomicina D(27).

Smetana y col., (1963) y Shankar Narayan y col., (1967) sugirieron

que los GI podrían representar ribosomas nucleares en el proceso de migración durante la transferencia del nucleolo hacia el citoplasma (11,17).

Estudios efectuados en años recientes han demostrado que los GI están asociados a la matriz nuclear al igual que el ARN heterógeno nuclear (hn-RNA). Pero se hace patente la necesidad de realizar más investigaciones que aclaren el significado funcional de los GI (18).

Gránulos pericromatinianos (GPC). Estas estructuras fueron descritas por Watson en 1962 (26) como elementos de un diámetro que va de 400 - 500 angstroms. Se presentan en forma individual, distribuidos en la periferia de los cúmulos de cromatina condensada también llamadas "áreas pericromatinianas" y ocasionalmente en áreas de cromatina difusa ó "áreas inter-cromatinianas"; los caracteriza la presencia de un halo claro de 250 angstroms de espesor que los separa claramente de la cromatina circundante.

Su estructura interna es visible con la técnica de contraste para ribonucleoproteínas de Bernhard (acetato de uranio-EDTA-citrato de plomo). Estos gránulos están formados por fibrillas enrolladas cuyo diámetro es según algunos de 30 angstroms y según otros de 15 angstroms (21).

Se ha sugerido que estas estructuras representan una forma de almacenamiento y/o transporte de ARN mensajero.

También se ha sugerido que durante la transcripción se forman fibrillas que posteriormente dan origen a estos gránulos. Se ha reportado que su presencia cerca de los poros nucleares, su aparente desintegración cerca de ellos, así como el paso de material fibrilar a través de éste, sugiere un papel de transporte de información genética hacia el citoplasma (22).

Su frecuencia en el nucleoplasma puede variar por efectos de diversas drogas y estimulantes de la transcripción, sobre todo el tipo hormonal, hecho que apoya la hipótesis de que pueden ser estructuras que almacenan ó transportan ARN mensajero (6,22).

Fibras pericromatinianas (FPC). Son componentes ribonucleoproteicos nucleares que se encuentran en contacto con la cromatina periférica; debido a su enrollamiento, su diámetro ha sido difícil de medir, por lo que se han publicado valores entre 30-50 angstroms, sin embargo algunas veces se han observado individualmente y se ha encontrado un diámetro de 30 angstroms.

Se ha podido visualizar la continuidad estructural entre GI y fibrillas pericromatinianas, e incluso se han observado conexiones entre las fibrillas y los gránulos pericromatinianos (18,27).

Monneron y Bernhard sugirieron que estas fibrillas pueden tener relación con las síntesis de ARN extranucleolar.

Una combinación de las técnicas de microscopía electrónica y autorradiografía han demostrado que el ARN marcado se concentra rápidamente en las regiones que contienen fibrillas pericromatinianas. Este fenómeno apoya la hipótesis de que estas estructuras representan morfológicamente las estructuras nucleoplásmicas que contienen ARN recientemente sintetizado (7,27).

Partículas 30S aisladas frecuentemente contienen estructuras fibrilares vistas en el microscopio electrónico. Las FPC bien pueden ser complejos ribonucleoprotéicos de reciente formación y representar el estado morfológico del ARN heterogéneo nuclear nuevamente sintetizado(13).

Cuerpos espiralados (CE). Monneron y Bernhard los describieron por primera vez como estructuras esféricas que se presentan en áreas intercromatinianas, se observan como fibrillas de 50 angstroms enrolladas a lo largo de un filamento axial alcanzando diámetros de 0.3 - 0.5 micras.

Por su afinidad a la técnica de contraste de Bernhard, se han considerado como estructuras ribonucleoprotéicas, ya que al ser tratadas con pronasa su contraste decrece. Son estructuras difíciles de encontrar, cuya función no se ha determinado hasta ahora e inclusive no se sabe si son constantes o temporales (27).

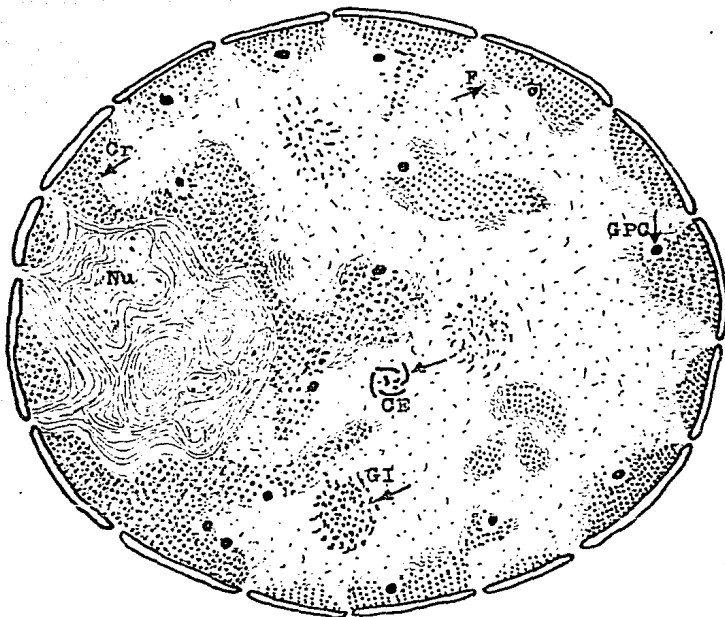


FIGURA 1.

Representación esquemática de un núcleo celular en interfase mostrando algunos de sus componentes ultraestructurales Nucleolo (Nu), cromatina (Cr), gránulos intercromatinianos (GI), gránulos pericromatinianos (GPC), fibrillas (F) y cuerpos espiralados (CE).

3.- Orden Lagomorfa.

Los Lagomorfos comprenden a todos los conejos y liebres, así como a los "pikas". Este orden de los mamíferos está formado por nueve géneros con cuarenta y nueve especies recientes (2).

Son miembros importantes de comunidades terrestres y están ampliamente distribuidos en el mundo; solamente estuvieron ausentes en Australia y en el extremo sur del continente americano, antes de su introducción por el hombre (8, 9).

El origen de los Lagomorfos es casi desconocido, pues se tiene pocas evidencias paleontológicas del tiempo en que se supone aparecieron (fines del paleoceno), y los registros fósiles más representativos, datan de principios del oligoceno. Sin embargo, gracias a los fósiles de Lagomorfa, se sabe que es un orden que surgió independientemente de los roedores.

En la actualidad se conocen tres familias de Lagomorfos, una extinta, la Eurymylidae, conocida solo del paleoceno superior y dos vivientes: la Ochotonidae, representada por los "pikas", y la Leporidae, que incluye a todos los conejos y liebres, y es considerada más evolucionada que la anterior (14). La familia Leporidae probablemente se origino en Asia, aunque la mayor parte de su evolución primitiva ocurrió durante el mioceno y el oligoceno en Norte América (3, 15). Los lepóridos se llegaron a establecer bien en el Viejo Mundo durante el plioceno.

El peculiar grupo de los "pikas" apareció primero en el oligoceno en Eurasia, y posteriormente se diseminaron en Europa y Norteamérica. Los oortónidos llegaron a su más amplia diversificación y distribución durante el período miocénico ocupando Europa y Asia (2). En América del Norte, los "pikas" viven en las altas montañas del suroeste de Estados Unidos (8).

Algunos autores, dividieron a la familia Leporidae en dos subfamilias: La Paleolaginae y la Leporinae.

Dentro de la subfamilia Leporinae se incluye al género Oryctolagus, que junto con Sylvilagus y Lepus. según el registro fósil, ya que se encontraban bien establecidos desde el pleistoceno y en el caso particular de O.cuniculus (conejo de granja) fué traído a América durante los siglos XVII y XVIII cuando el hombre europeo colonizó los continentes descubiertos (14).

Romerolagus diazi es un género perteneciente a la subfamilia Paleolaginae, endémico del Eje Volcánico Transversal y es considerado como uno de los mamíferos más representativos de la fauna del país; su ámbito de distribución es muy restringido, pues ocupa solo la parte Este y Sur del Valle de México (10). Este animal emigró y evolucionó aisladamente (desde hace aproximadamente 30 a 40 millones de años), tomando modalidades muy parecidas a los "pikas", pero por sus características morfológicas, ha sido colocado dentro de la familia Leporidae. Su filogenia es desconocida a ciencia cierta.

La subfamilia Paleolaginae además de Romerolagus, incluye otros dos géneros actuales que presentan características primitivas. Esta subfamilia incluye algunas especies que se encuentran como relictos, en las islas de Riu Kiu al sur de Japón donde se localiza el género Pentalagus y el género Pronolagus que vive en África del Sur (10).

Wilson (1949), considera que Romerolagus es así mismo, un género relicto de la dispersión leporina, ocurrida durante el plioceno tardío, cuyas características propias pudieron haber sido seleccionadas por el medio ambiente del período cuaternario (19).

En el presente trabajo se realiza una comparación de ultraestructura nuclear en interfase de diferentes tejidos en dos especies, Romerolagus diazi y Oryctolagus cuniculus, tales organismos según el registro paleontológico tienen un ancestro común.

Dada la importancia biológica de estas dos especies y el momento evolu

tivo en el que se encuentran, es muy importante realizar estudios de diferentes tipos y es por eso que este trabajo está orientado precisamente al aspecto de la ultraestructura del núcleo interfásico como una contribución al conocimiento de la biología de estos organismos.

III. MATERIAL Y METODO.

1.- Material Biológico.

Se utilizaron dos ejemplares hembras, una de la especie Romerolagus diazi y otra de la especie Oryztolagus cuniculus.

Los ejemplares seleccionados se anestesiaron con éter (J.T. Baker) y perfundieron por vía intercardíaca (ventrículo izquierdo) cortando aurícula derecha, con fijador de paraformaldehído (J.T. Baker)-glutaraldehído (IADD) 2% y 1% respectivamente, durante 27 minutos. En seguida se procedió a extraer muestras de los siguientes tejidos: hígado, intestino, corazón, ovario, útero, cerebelo, y en el cerebro, corteza y núcleo caudado. Estos se fragmentaron en porciones pequeñas (1 mm x 1 mm aprox.) utilizando navajas de afeitar y se introdujeron nuevamente en solución fijadora durante 1 — hora.

2.- Procesamiento del material para Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las muestras se lavaron con amortiguador de fosfato (0.16 M pH 7.2) para posteriormente deshidratarlos. La deshidratación se efectuó con alcoholes graduales y en seguida se introdujeron en óxido de propileno (3 cambios de 15 minutos cada uno), paso intermedio entre la deshidratación y la preinclusión. Posteriormente las muestras se mantuvieron durante 14 horas en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y EPON (MERCK).

Inclusión.

Para incluir el material, se dejó evaporar el óxido de propileno.

Utilizando moldes de plástico, se introdujeron las muestras de tejido en el medio de inclusión (EPON) orientando el material para facilitar el — corte; la polimerización de este compuesto se llevo a cabo en una estufa de 60° C durante 24 horas.

Microtomía.

Los cortes de los bloques fueron obtenidos con ayuda de un ultramicro tomo M T 1 de uso manual y cuchillas de vidrio.

Se obtuvieron cortes semifinos de los tejidos mencionados, de 500 nm aproximadamente de grosor, se montaron en portaobjetos y fueron teñidos con azul de toluidina(J.T. Baker) para la localización de los núcleos de los siguientes tipos de células: Hepatocitos, células epiteliales de intestino, células del corazón, células foliculares del ovario, células epiteliales de útero, células de la corteza cerebral, células en cesto de cajal y de Purkinje del cerebelo y células de axón corto del núcleo caudado. La exploración de los tejidos se realizó con ayuda de un microscopio de luz.

Una vez localizado el material útil, se obtuvieron cortes finos de - aproximadamente 60-90 nm de espesor y se montaron en rejillas de cobre sobre membrana de formvar(MERCK) para su observación en el microscopio electrónico.

Contrastado de los cortes.

Se utilizo el método regresivo del ácido etildiaminotetracético (EDTA) para contrastar por flotación los cortes montados en las rejillas de cobre, utilizando:

- a) Solución de acetato de uranilo(MERCK) al 5% durante 3 minutos , se lavó el material con agua bidestilada y se secó con papel filtro.
- b) Solución de EDTA (J.T. Backer) durante 14-25 minutos, se lavó y secó el material.
- c) Solución de citrato de plomo(MERCK) durante 2 minutos, se lavó y secó el material.

Para evitar la formación de precipitados sobre la preparación se hizo el contraste dentro de una caja de petri que contenía pastillas de NaOH (J.T. Baker) y un algodón con agua, con el cual se proporcionó una atmósfera húmeda.

Este método se utilizó para resaltar preferencialmente las ribonucleoproteínas, y se basa en la capacidad quelante del EDTA.

Se usó primero una tinción general con acetato de uranilo al 5% durante 3 minutos, en seguida se utilizó el EDTA durante un tiempo adecuado, ya que la acción del EDTA varía dependiendo de las diferencias intrínsecas de cada tejido, además de la temperatura de la solución y del grosor del corte. El tiempo de regresión adecuado se determinó utilizando varias muestras de los cortes en observación sometidas a diferentes tiempos de flotación en la solución de EDTA que se preparó con anterioridad con pH 6.6 - 7.0. La solución de EDTA se conservó en refrigeración y para utilizarla se debía llevar previamente a temperatura ambiente.

El EDTA queda preferencialmente los iones uranilo unidos a desoxirribonucleoproteínas; posteriormente el citrato de plomo se usó para resaltar el contraste de los iones unidos a ribonucleoproteínas.

Microscopía.

La observación de los cortes ultrafinos se realizó en un microscopio electrónico EM 9S de la casa Carl Zeiss con el cual se tomaron a un aumento fijo (8 800 X) micrografías de los núcleos de las células de los tejidos ya mencionados en un orden preestablecido para evitar fotografiar un mismo núcleo dos veces.

Análisis de las Micrografías.

Las micrografías así obtenidas, fueron impresas a una amplificación constante de 3.8 X para tener un aumento final uniforme (aprox. 33000 X). Basándose en las micrografías impresas se realizó una comparación cualitativa de los componentes ultraestructurales del núcleo interfásico entre los tejidos mencionados de Romerolagus diazi y Oryctolagus cuniculus.

Se realizó una comparación cuantitativa entre el volumen y diámetro de gránulos pericromatinianos de hepatocitos de los organismos mencionados.

Para ello a partir de las micrografías obtenidas, se localizaron zonas que presentaron gránulos pericromatinianos y se procedió a imprimirlos a un aumento uniforme (aprox. 105600X); una vez impresos se midió el diámetro menor y mayor de estas estructuras con un vernier. Se transformaron las unidades de vernier a milimicras y se calculó el volumen.

IV. RESULTADOS.

Los resultados demuestran que la técnica de tinción preferencial para ribonucleoproteínas es adecuada para los diferentes tejidos de los organismos en estudio, mostrando diferencias únicamente en cuanto al tiempo de EDTA para cada uno de ellos. Se puede decir que en todos y cada uno de los núcleos celulares de los tejidos comparados, se observan perfectamente algunos de los elementos que se muestran en el modelo celular interfásico - (fig 1): la cromatina compacta, representada por las zonas blanqueadas por la acción del EDTA, y las estructuras que contienen ribonucleoproteínas como el nucleolo, los gránulos inter y pericromatinianos y fibrillas contrastadas en oscuro.

Si bien estos componentes están presentes en todos los núcleos de las células de los diferentes tejidos se puede hacer notar que al menos de una manera cualitativa, su cantidad o distribución varía en algunos núcleos y en otros presenta mucha similitud en distribución y cantidad. Lo anterior se puede apreciar en los cuadros I Y II, así como la figura 2 a) y b).

En virtud de que los gránulos pericromatinianos son las estructuras mejor y más estudiadas hasta el momento se seleccionaron para cuantificar su diámetro y volumen. Estas medidas fueron realizadas en las micrografías de núcleos de hepatocitos por ser en ellas donde mejor se apreciaron estas estructuras. Se calcularon los valores de la media, desviación estándar, error estándar y se aplicó la prueba de t y de Student para determinar si existía diferencia significativa entre las dos especies.

Esos datos estadísticos se presentan a continuación:

Para volumen y diámetro en Romerolagus diazi

Volumen

Diámetro

$$\bar{X} = 41985.81 \text{ nm}^3$$

$$\bar{X} = 67.93 \text{ nm}$$

$$S = 18196.49$$

$$S = 10.53$$

$$S\bar{X} = 2877.11$$

$$S\bar{X} = 1.66$$

$$N = 40$$

$$N = 40$$

Para volumen y diámetro en Oryctolagus cuniculus.

$$\bar{X} = 13118.88 \text{ nm}^3$$

$$\bar{X} = 45.88 \text{ nm}$$

$$s = 8431.18$$

$$S = 10.37$$

$$S\bar{X} = 1405.19$$

$$S\bar{X} = 1.27$$

$$N = 36$$

$$N = 36$$

t calculada para volumen

t calculada para diámetro

$$8.70 +$$

$$9.17 +$$

Grados de libertad 74

Grados de libertad 74

Como se puede observar el valor medio tanto para volumen como para diámetro en los dos organismos difiere notablemente, y su error estimado es aceptable por lo que se puede decir que las poblaciones de gránulos pericromatinianos tanto en uno como en otro son notablemente homogéneas. En ambos casos p es menor a 0.05 por lo que se puede decir que sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las 2 muestras.

Cuadro I. Cantidad y distribución de las estructuras ribonucleoprotéicas intranucleares en Romerolagus diazi.

Tejido	Cr.P	Nucleolo	GPC	GI	Fibrillas	CE
Núcleos de hepatocitos	Forma una franja muy ancha	Se presentan en número variable, grande, esféricoide	En gran proporción V=41985.81 D= 67.93	Cúmulos abundantes	Poco frecuentes y repartidas homogéneamente	No se observaron
Núcleos de células epiteliales de intestino	Franja ancha bien definida	Rodeado de gran cantidad de cromatina compacta	Muy frecuentes	Distribuidos de manera homogénea	Poco frecuentes	"
Núcleos de células de corazón	En poca cantidad	Estructura Nucleolomenal	Poco evidentes	Formando cúmulos	Distribuidas homogéneamente	"
Núcleos de células foliculares del ovario	Forma una franja muy delgada	De forma irregular	Poco frecuentes	Cúmulos poco evidentes	Distribuidas homogéneamente	"
Núcleos de células epiteliales del útero	Franja ancha	Pequeño	Poco evidentes	Poco frecuentes y dispersos	Escasas y distribuidas homogéneamente	"
Núcleos de la corteza cerebral	Poca cantidad formando una franja muy delgada	Grande y de forma esféricoide	Poco frecuentes	Gran cantidad formando cúmulos	Distribuidas homogéneamente en el núcleo	"
Núcleos de células de Cajal y de Purkinje del cerebelo	Franja muy delgada	Grande y de forma esféricoide	Poco evidentes	Dispersos homogéneamente	Muy abundantes repartidas por todo el núcleo	"
Núcleos de células de axón corto del núcleo caudado	Franja muy delgada	Grande de forma esféricoide	Poco frecuentes	Forman grandes cúmulos	Dispersas por el núcleo	No se observaron

Valor medio del diámetro (D= nanómetros(nm)) y Volumen (V= nm³) de
gránulos pericromatinianos (GPC) de hepatocitos, cromatina perinuclear
(Cr.P),gránulos intercromatinianos (GI) y cuerpos espiralados (CE).

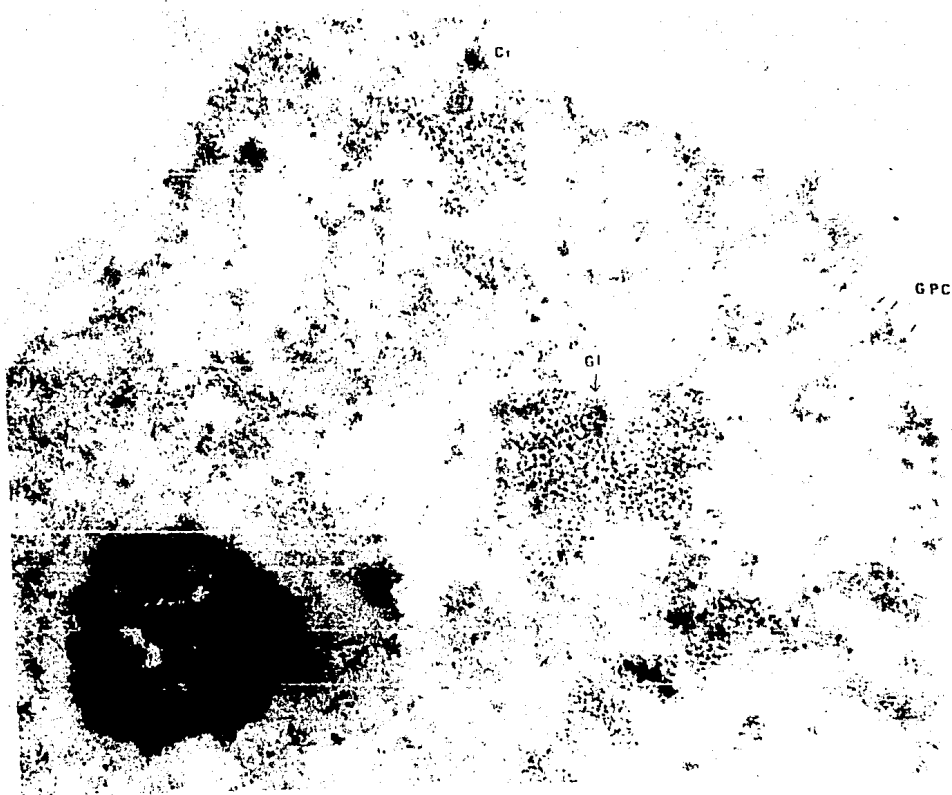
Cuadro II. Cantidad y distribución de las estructuras ribonucleoproteicas intranucleares en Oryctolagus cuniculus.

Tejido	Cr.P	Nucleolo	GPC	GI	Fibrillas	CE
Núcleos de hepatocitos	Poca cantidad formando franja muy delgada	Se presenta en número variable	Poco frecuentes V=13118.88 D=45.88	Cúmulos abundantes	Poco frecuentes dispersas en el núcleo	No se observaron
Núcleos de células epiteliales de intestino	Franja ancha bien definida	Rodeado de gran cantidad de cromatina	Se presentan con mucha frecuencia	En gran proporción formando cúmulos	Poco frecuentes	"
Núcleos de células del corazón	Franja muy delgada	Estructura nucleoloneal	Poco evidentes	Forman cúmulos	Distribuidas homogeneamente en el núcleo	"
Núcleos de células folliculares del ovario	Poca cantidad	De forma irregular	Poco frecuentes	Cúmulos poco evidentes	Distribuidas homogeneamente	"
Núcleos de células epiteliales del útero	Franja ancha	Pequeño y en número variable	Poco evidentes	Escasos y dispersos homogeneamente	Poco frecuentes y dispersos homogeneamente	"
Núcleos celulares de la corteza cerebral	Poca cantidad formando franja delgada	Grande y de forma esferoide	En poca cantidad	Formando cúmulos	Abundantes	"
Núcleos de células en cesto de Cajal y de Purkinje de cerebelo	Franja muy delgada	Esferoide rodeado de gran cantidad de cromatina	Poco evidentes	Dispersos homogeneamente	Muy abundantes	"
Núcleos de células de axón corto del núcleo caudado	Poca cantidad	Esferoide rodeado de gran cantidad de cromatina	Poco frecuentes	Formando grandes cúmulos	Dispersas por el núcleo	"

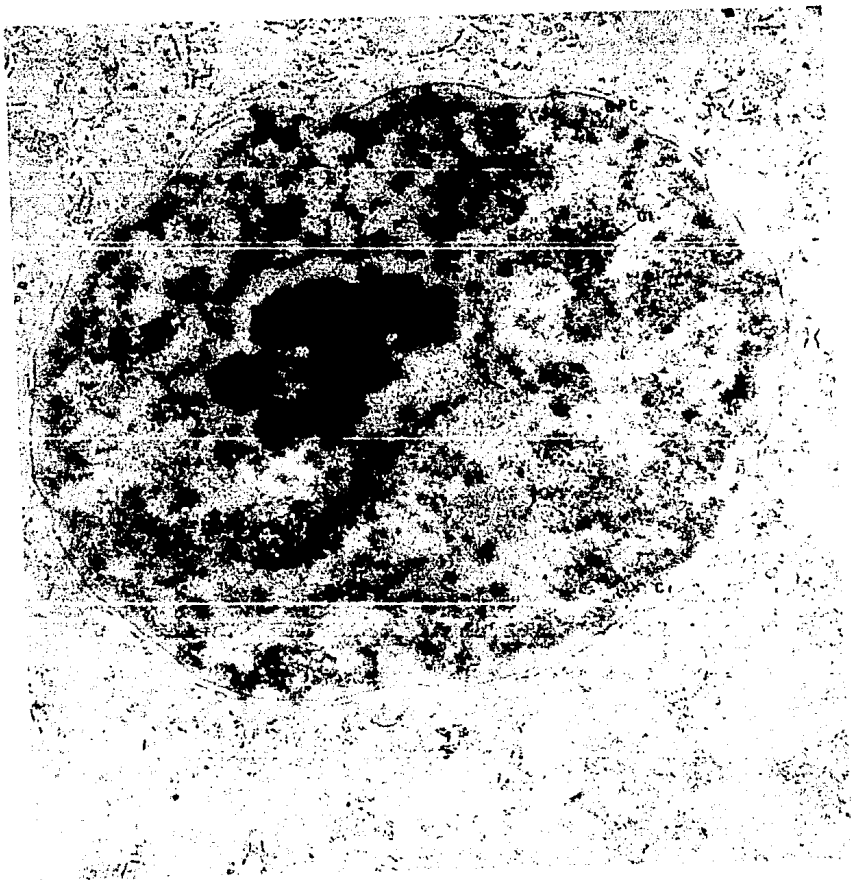
Valor medio del diámetro (D =nanómetros (nm)) y volumen (V = nm^3) de gránulos pericromatinianos (GPC) de hepatocitos, cromatina perinuclear (Cr.P), gránulos intercromatinianos (GI) y cuerpos espiralados (CE).

Fig. 2 Micrografía electrónica del núcleo interfásico de hepatocito,
a) Romerolagus diazi, b) Oryctolagus cuniculus. Ur-EDTA-Pb,
aprox. 30 000 aumentos. Nucleolo (Nu), cromatina compacta (Cr),
gránulos intercromatinianos (GI), gránulos pericromatinianos
(GPC), fibrillas (F).

a) .



b) .



V. Discusión.

Dentro de la interpretación de los resultados, debe considerarse que en general, la conservación de todos los tejidos fué buena. Los tiempos de tinción preferencial para ribonucleoproteínas se determinaron para cada tejido mediante ensayos alrededor de los valores habituales, hasta encontrar los más adecuados. La variación en tiempo para EDTA se de be probablemente tanto al diferente grosor de los cortes (de 60 a 90 nm), como a las diferencias intrínsecas del tejido.

Como se puede observar en los cuadros I y II, la ultraestructura de los núcleos en los diversos tejidos, en ambos organismos, es muy semejante e incluso en los núcleos de células del corazón, ovario, útero, corteza ce rebral, cerebelo y núcleo caudado, la estructura es prácticamente la misma.

Considerando el tiempo en el que los organismos en estudio se separaron de su ancestro, entre 30 Y 40 millones de años, y con base en los datos que se han encontrado sobre la ultraestructura del núcleo celular en interfase, en mamíferos principalmente, se puede decir que no existe diferencia alguna entre los núcleos en interfase de todos y cada uno de los te jidos analizados entre Romerolagus diazi y Oryctolagus cuniculus y que las variaciones en cuanto a distribución de las estructuras que se observan entre algunos núcleos, podría ser debida a la orientación que se le dió al bloque de tejido al cortarlo o al estado funcional de la célula.

Esto sugiere que no ha habido cambio a nivel ultraestructural, lo que implica unidad a nivel de ultraestructura nuclear en los organismos animales (12). Es decir, que durante la evolución de los seres vivos se han constituido estructuras y que si éstas "respetan" los dos principios generales de la organización biológica, el de la mínima energía y el de la selección natural (1), se conservarán y mantendrán de generación en genera-

ción.

Lo anterior puede ser respaldado por todos los estudios sobre ultraestructura del núcleo interfásico en diferentes phyla en los que no se han encontrado diferencias significativas (12).

Como se mencionó anteriormente, existe diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro y volumen de GPC en las dos muestras, sin embargo los valores encontrados quedan incluidos en el rango de valores hasta la fecha encontrados para estas estructuras; los de O. cuniculus se pueden incluir entre los GPC más pequeños encontrados y los de R. diazi pueden ser considerados más grandes que la mayoría de los GPC de otras especies, ya que si bien se han reportado GPC hasta de 60 nm (21,24), hay que hacer notar que el valor medio de estas estructuras en R. diazi es excepcional y que muy pocos GPC tienen tamaños semejantes a estos. ¿Que significado biológico puede sugerir este hecho? Se ha propuesto que estos gránulos pueden funcionar como almacén y/o transporte de ARN mensajero. De hecho se ha observado que su cantidad varía en diversos estados metabólicos (6,23) y que su diámetro puede variar dependiendo de qué segmentos de cromatina se transcriben (24). Sin embargo, lo anterior no explica la diferencia en tamaño de diámetros y volumen de los GPC entre las dos especies.

Se puede sugerir como una posible respuesta a este hecho, que la composición bioquímica de dichos gránulos es diferente ya sea en la información genética o bien puede existir alguna diferencia en su composición proteica. Lo anterior solo puede ser comprobado realizando estudios bioquímicos, por lo que en el futuro sería conveniente realizar estudios de ese tipo.

En el presente trabajo se hicieron análisis cuantitativos únicamente de GPC por lo que sería conveniente realizar cuantificaciones de las demás

estructuras ribonucleoproteicas observadas, así como estudios bioquímicos de las mismas.

VI. Conclusiones.

- 1.- La ultraestructura del núcleo celular interfásico es similar en los organismos en estudio.
- 2.- Los gránulos pericromatinianos difieren en diámetro y volumen entre Romerolagus diazi y Oryctolagus cuniculus.
- 3.- En el tiempo en el que divergieron de su ancestro estas especies, no se aprecian diferencias en la ultraestructura salvo en el tamaño de los gránulos pericromatinianos.
- 4.- Realizar estudios complementarios tanto morfológicos como bioquímicos.

VII. Bibliografía.

- 1.- Cañedo, L.(1979). La Organización Biomolecular. *Naturaleza*. 10:222-227.
- 2.- Cervantes,F.(1980). Biología del conejo de los volcanes. Tesis, Departamento de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 3.- Colbert, E.H.(1969). Evolution of the Vertebrates, Wiley International Edition U.S.A. 331-334.
- 4.- Chambon,P.(1981). Genes fragmentados. *Investigación y Ciencia*. (58): 22-35.
- 5.- Daskal,Y.(1982). Perichromatin Granules. *The Cell Nucleus VIII*. Capítulo 3:117-137.
- 6.- Echeverría, O. M.Vázquez-Nin, G.H. y Pedrón,J.(1980). A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. *Acta Anat.*106:45-56.
- 7.- Fakan,S.Puvion, E. and Spohr,G.(1976). Localization and Characterization of Newly Synthesized Nuclear RNA in Isolated Rat Hepatocytes. *Experimental Cell Research*,99:155-164.
- 8.- Francis,P.(1966). Los mamíferos. Ed. EUDEBA. Argentina:44-45.
- 9.- García-Rey, S.Y.(1976). Estudio Citogenético en Romerolagus diazi. Tesis profesional. Depto. de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 10.- Granados,H.(1979). Basic information on the Volcano Rabbit. Laboratory of Experimental Animal Biology. Depart. of. Biology. Faculty of Sciences U.N.A.M. 940-948.
- 11.- Hoppenstedt,A.P.(1982). Partículas Ribonucleoprotéicas Intranucleares durante la diferenciación Neuronal. Tesis profesional. Depto. de Biología Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 12.- Jiménez, G.L.F.Zavala,P.(1984). Aspectos Ultraestructurales de la Evolución del Núcleo Celular Interfásico en Animales. Comunicación personal.

- 13.- Jiménez.G.L.F.(1983). Estudio de las variaciones cuantitativas de la cromatina durante la diferenciación y maduración neuronal. Tesis profesional. Depto. de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 14.- Juárez.H. y Zulbarán,R.(1983). Estudio sobre el crecimiento y la reproducción del conejo de los volcanes (R.diazi) silvestre en el laboratorio. Tesis profesional. Depto. de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 15.- Kasimierz,K.(1981). Mamíferos. H. Blume, España:229-395.
- 16.- Lockwood, A.P.(1976). La membranas de las células animales. Ed. Omega. España:28-29.
- 17.- Monneron, A. and Bernhard,W.(1969). Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian cells.J. Ultrastructure Research. 27:266-288.
- 18.- Puvion, E. and Moyne,G.(1982). In situ Localization of RNA Structures. The Cell Nucleus. VIII Capítulo 2:59-115.
- 19.- Rojas, M.P.(1951). Estudio Biológico del Conejo de los Volcanes (Género Romerolagus). Tesis profesional. Depto. de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 20.- Uribe-Alcocer,M.(1977). Estudios Citogenéticos en algunas especies de Roedores y Lagomorfa de México. Tesis doctoral. Depto. de Biología. Fac. de Ciencias U.N.A.M.
- 21.- Vázquez-Nin,G. and Bernhard,W.(1971). Comparative Ultrastructural Study of Perichromatin and Balbiani Ring Granules.J. of Ultrastructure Research.36:842-860.
- 22.- Vázquez-Nin,G. Echeverría,O. y Jiménez,L.F.(1983). Los gránulos pericromatinianos, partículas relacionadas con la expresión genética en eucariotes. Curso de Actualización. Procesos Celulares. Memorias. Mexico: - 85-95.
- 23.- Vázquez-Nin,G. Echeverría,O. y Pedrón,J.(1980). Effects of Estradiol

on the Ribonucleoprotein Constituents of the Nucleus of Cultured Endometrial Epithelial Cell. *Biologie Cellulaire*, 35:221-228.

24.- Vázquez-Nin, G. Ortega-Rangel, L.A. and Echeverría, O. (1980). Nuclear Aspect of Neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cellulaire*. 39:143-146.

25.- Wassef, M.A. (1979). Cytochemical Study of Interchromatin Granules. *J. of Ultrastructure Research*, 69:162-167.

26.- Watson, M.L. (1962). Observations of a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell. Biol.* 14:162-167.

27.- Zavala-Padilla, G.R. (1980). Cambios de las partículas ribonucleoprotéicas intranucleares de las células epiteliales endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis profesional. Fac. de Ciencias U.N.A.M.