

104
rej.

ESTADO DE GUERRERO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CITOQUIMICO DE LAS
PARTICULAS RIBONUCLEOPROTEICAS EN CORTEZA
CEREBRAL DE RATA.

T E S I S

Que para obtener el Título en la
BIOLOGO

presentan

AURORA LOPEZ ROSAS
ALMA ORTIZ PLATA



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.

Indice:

Introducción	1
• Envoltura nuclear	1
• Matriz nuclear	1
• Cromatina	2
• Núcleo interfásico	2
• Gránulos pericromatinianos	3
• Fibras pericromatinianas	3
• Gránulos intercromatinianos	3
• Cuerpos espiralados	4
• Nucleolo	4
• Síntesis del ARN	5
• Procesamiento postranscripcional	6
Objetivos	9
Materiales y Métodos	10
• Técnica 1	11
• Técnica 1a	12
• Técnica 2	13
• Técnica 2a	14
• Técnica 3	15
• Técnica 4	16
• Técnica 4a	17
• Técnica 4b	18
• Técnica 5	19
• Técnica 5a	20
• Técnica 5b	24
• Técnica 6	25
Resultados	27
• Selección de técnicas	27
• Técnica diseñada	28
• Cadenas ribonucleoproteicas	30
Discusión	33
Conclusiones	36
Bibliografía	37

Introducción:

Las primeras observaciones que se hicieron del núcleo celular, las realizó Leewenhoek en 1770 en los glóbulos rojos del salmón. Bauer en 1802 ya había dibujado núcleos de vegetales de células del tejido laxo, pero sus trabajos fueron publicados tiempo después. Robert Brown, que conocía los trabajos de Bauer, con un microscopio simple con aumentos hasta de 300 diámetros descubrió pequeñas partículas que se observaban continuamente en las células de orquídeas y que después de 5 años las denominó *areola* o núcleo. Valentin en 1836 introdujo este término en células de animales. (Hughes A., 1959.; Albarracín-Teulón A., 1983.) A partir de estos estudios, se realizaron investigaciones más profundas para aclarar su estructura y función, dado que se descubrió que este organelo no sólo es importante porque contiene el material genético, sino porque es fundamental para la regulación del metabolismo celular. (Busch H., 1974.; Newport J y Spann T., 1987.)

En este estudio se pretende analizar un poco más las interrelaciones de las estructuras ribonucleoproteicas en el núcleo interfásico, así como su papel dentro de los procesos postranscripcionales por medio de microscopía electrónica y citotquímica ultraestructural. Para poder entender la importancia de estas estructuras ribonucleoproteicas, es necesario tener un panorama general de lo que se conoce como núcleo interfásico, el cual se describe a continuación.

Envoltura nuclear.

En los organismos eucariontes se separan los procesos de transcripción y traducción por medio de la envoltura nuclear, la cual está compuesta de dos membranas que son prolongaciones del retículo endoplásmico y están separadas por un espacio perinuclear de 20 a 40 nm de espesor, (Alberts B. y col., 1986.) la superficie externa de la envoltura nuclear presenta ribosomas adheridos y la interna una lámina densa que es una red fibrilar compuesta por tres proteínas cuyo peso molecular va de 60 a 75 kd. Presenta propiedades y secuencias de aminoácidos que las relacionan con los filamentos intermedios. (Aebi U. y col., 1986.) La envoltura nuclear está interrumpida por los complejos de poro, cuyo diámetro aproximado es de 80 nm, están constituidos por ocho gránulos proteicos que forman un anillo y con frecuencia presentan un gránulo central.

Matriz nuclear.

La matriz nuclear está constituida principalmente por proteínas ácidas, casi en un 80% y por un pequeño porcentaje de ARN, ADN y fosfolípidos. Las proteínas forman filamentos de 3 a 22 nm de diámetro, organizados en una red, la cual puede regular

potencialmente la forma nuclear, y se ha sugerido que tiene un papel fundamental en funciones nucleares como la duplicación, transcripción y eventos postranscripcionales de procesamiento y transporte. (Newport J y Spann T., 1987.; Capco D.G., Wang K.M., 1982)

Cromatina.

La cromatina está constituida por una unidad estructural repetitiva denominada nucleosoma. Los nucleosomas están formados por dos moléculas de cada una de las histonas conocidas como H_2A , H_2B , H_3 y H_4 que forman un octámero, asociado a una doble hebra de ADN aproximadamente de 200 pares de bases. Estos se arreglan en una forma más condensada por medio de la histona H_1 y forman una fibra de 30 nm de diámetro, a la cual se asocian proteínas con funciones de regulación de la expresión génica. (Alberts B. y col., 1986.; Pardoll D. M. y col., 1980.)

Núcleo interfásico.

En el núcleo interfásico la cromatina se encuentra tanto en forma compacta, considerada transcripcionalmente inactiva, como descondensada, en la que la región pericromatiniana es transcripcionalmente activa y la de la región intercromatiniana es transcripcionalmente menos activa.

El núcleo también presenta estructuras ribonucleoproteicas las cuales se han podido estudiar por la innovación de una técnica de contraste regresivo preferencial. (Bernhard W., 1969.) Ya que estas estructuras son parte importante en este trabajo se les presta una mayor atención en su descripción y pueden ser observadas en el esquema de la figura 1.



Fig. 1. Esquema del núcleo celular interfásico de hígado de rata, realizado por Bernhard (1969), en el que se muestran las estructuras ribonucleoproteicas. El esquema del nucleolo es cortesía de Jiménez-García L.F. (Tesis doctoral en preparación).
 cr: cromatina; gpi: gránulos pericromatinianos; gic: gránulos intercromatinianos; →: fibras pericromatinianas; nu: nucleolo; f: región fibrilar; g: región granular; pnc: cromatina perinucleolar; fc: centro fibrilar; dfr: región fibrilar densa.

Gránulos Pericromatinianos.

Fueron descritos por Watson en 1962 y están constituidos por fibras de 1 a 3 nm de grosor (Smetana K., 1977; Smetana K., 1979.) que forman un gránulo electrodenso de 44 nm de diámetro, con un halo claro de 25 nm, el cual es característico de estas estructuras pero no se conoce su naturaleza. Algunas fibras salen y se asocian a otras. Los estudios de caracterización y aislamiento mostraron que su composición es ARN heterogeneonuclear y proteínas, tienen un coeficiente de sedimentación de 40S. (Daskal Y., Komaromy L. y Busch H., 1980.; Daskal Y., 1981.) Por su morfología se han relacionado con los anillos de Balbiani. (Skoglund U. y col., 1986.) Ambos se localizan cerca de los cúmulos de cromatina compacta y algunas veces se encuentran aislados en el área intercromatiniana. Se sugiere que funcionan como almacén y/o transporte intranuclear de ARN pre-mensajero o mensajero (Vázquez Nin G. y Bernhard W., 1971.; Vázquez Nin G. y col., 1978.; Vázquez Nin G., 1979.)

Fibras Pericromatinianas.

En 1969, Monneron y Bernhard las describieron como estructuras de 3 a 5 nm de diámetro. Estas se consideran como el sustrato morfológico del ARN heterogeneonuclear (Bachelierie J-P., Puvion E. y Zalta J-P., 1975.), ya que al estimular la transcripción con cortisol se observa un incremento en su número. Colateralmente se dieron pulsos cortos de uridina tritiada, lo cual permitió marcarlas y corroborar que algunas se transforman en gránulos pericromatinianos. (Moyné G., Puvion E. 1976.; Vázquez Nin G. y Bernhard W., 1971.)

Gránulos Intercromatinianos.

Los estudios citoquímicos realizados por Swift en 1963, permitieron evidenciar estos gránulos; pero Monneron y Bernhard en 1969 los caracterizaron como gránulos intercromatinianos y comprobaron su naturaleza ribonucleoproteica. Presentan un diámetro de 20 a 30 nm que se unen por fibras y forman agregados de varios tamaños.

Por el uso de drogas que inhiben la síntesis de ARN heterogeneonuclear y estimulan la síntesis de ARN ribosomal se sugirió que los gránulos son sitios de transferencia o acumulación de ARN nucleolar. (Puvion E., 1982.; Puvion E. y col., 1984b.; Puvion E. y col., 1984a.)

Se localizan en el área intercromatiniana del núcleo y aún cuando su función no ha sido bien definida, se cree que participan en la maduración del ARN pre-mensajero. (Fakan S. y Puvion E., 1980; Fakan S. y col., 1984)

Cuerpos Espiralados.

Törö y Röhlich en 1966 describieron en células de trofoblasto de rata y ratón una estructura semejante a los cuerpos espiralados que denominaron cuerpo glomerular. Posteriormente, Monneron y Bernhard (1969) los caracterizan como un agregado más o menos esférico de 0.3 a 0.5 micras de diámetro, compuesto por fibras enrolladas de 40 a 60 nm de grosor, que son paquetes de fibras de 5 nm de grosor. Estos cuerpos presentan un arreglo concéntrico de sus paquetes de fibras, lo cual da una apariencia de espiral.

Se observan en el área intercromatiniana y aún con la utilización de la técnica preferencial para ribonucleoproteínas no se encuentran con frecuencia, lo cual no ha permitido conocer su significado biológico.

Además de estas partículas, el núcleo presenta otra estructura de naturaleza ribonucleoproteica, denominada nucleolo, que fue descrito por Felice Fontana en 1781.

Nucleolo.

Esta estructura produce el ARN ribosomal (de 80 a 90% del ARN total) de la célula eucariótica, está constituida principalmente por tres zonas: la región granular compuesta por partículas pre-ribosomales de 15 nm de diámetro que frecuentemente ocupa la parte más periférica del nucleolo; la región fibrilar densa formada por fibras de 3 a 4 nm de diámetro que corresponden a los transcritos de ARN pre-ribosomal que es el precursor común (45S) que posteriormente a través de un complejo procesamiento forman los ARN ribosomales (28S, 18S y 5.8S); y los centros fibrilares laxos que contienen el ADN donde están los genes que codifican para los ARN ribosómicos. Estos tienen la característica de estar repetidos y dispuestos en hilera a lo largo de la cadena del ADN, separados por secuencias espaciadoras que no son transcritas. Todos los organismos tienen copias múltiples de los genes de ARN ribosomal, por ejemplo las bacterias tienen de 8 a 22 copias y otros como el *Xenopus* tiene 450 copias de genes ribosómicos. (De Robertis y De Robertis H., 1983).

El ADN ribosomal está contenido en la llamada región del organizador nucleolar (NOR) que puede ser visualizada como constricciones secundarias en algunos cromosomas metafásicos y, a partir de esta región, el nucleolo es formado después de la mitosis. (Jordan E.G. y Cullis C.A., 1982)

Asociada al nucleolo se encuentra la cromatina densa perinucleolar, la cual se extiende hacia los poros nucleares. El nucleolo presenta proteínas características conocidas como B23 y C23, las cuales se localizan en la región granular y en la región

fibrilar densa y centros fibrilares respectivamente, también son característicos del nucleolo la proteína fibrilarina, que se localiza en regiones similares a la proteína C23. (Ochs L. R. y col., 1985) y la ARN polimerasa I que se ha observado en los centros fibrilares. (Scheer V. y Rose K.M., 1984.) En el nucleolo existen además alrededor de 400 proteínas, muchas de las cuales no han sido caracterizadas.

Síntesis de ARN.

En eucariontes existen tres tipos de enzimas, conocidas como ARN polimerasas que catalizan la síntesis de ARN. La ARN polimerasa I transcribe los ARN ribosomales de la subunidad grande, el ARN polimerasa II transcribe los genes que se traducirán a proteínas y el ARN polimerasa III transcribe una variedad de ARN estable muy pequeño, que incluye ARN de transferencia y el ARN 5S ribosomal.

Debido a que el ARN polimerasa II transcribe todos los precursores del ARN mensajero, la descripción sobre síntesis se enfocará exclusivamente a esta polimerasa.

Existen sitios específicos de comienzo y término de la transcripción, que definen una unidad de transcripción específica. Los sitios específicos de comienzo se conocen como promotores y se caracterizan por ser secuencias que se localizan antes de la región copiada en ARN y porque ciertas secuencias se conservan a través de las especies. Estas secuencias son esenciales para que se una e inicie su función la polimerasa II y determinan la eficiencia con la que transcribe, lo cual se refleja en tiempos cortos o largos de transcripción. Por regla se sabe que al menos dos secuencias antes del sitio de iniciación, además de la secuencia llamada TATA box, que es altamente conservada en el sitio -25, se requieren para una transcripción eficiente de cada gen. Algunas veces, la posición y orientación de estos elementos con respecto al sitio de inicio es muy importante. Otras secuencias que no son altamente conservadas son CCAAT aproximadamente en el sitio -73, el factor de transcripción sp1 y múltiples copias de GC. (Watson y col., 1987)

Los precursores del ARN mensajero son modificados covalentemente en sus extremos, lo cual lo diferencia de los otros transcritos. Al extremo 5' se une un capuchón de trimetilguanosa, que posteriormente mediará la unión con el ribosoma, esto ocurre antes de que termine la transcripción, el ARN sigue creciendo en dirección 5'-3' a una velocidad de 30 nucleótidos por segundo hasta llegar a la señal de término, que son en promedio 8000 nucleótidos; para completar el transcrito primario del ARN, la enzima poli-A polimerasa adiciona de 100 a 200 residuos de ácido adenílico al extremo 3', su función es desconocida, pero se piensa que es útil en el proceso de maduración y en la salida del ARN mensajero maduro al citoplasma. (figura 2)

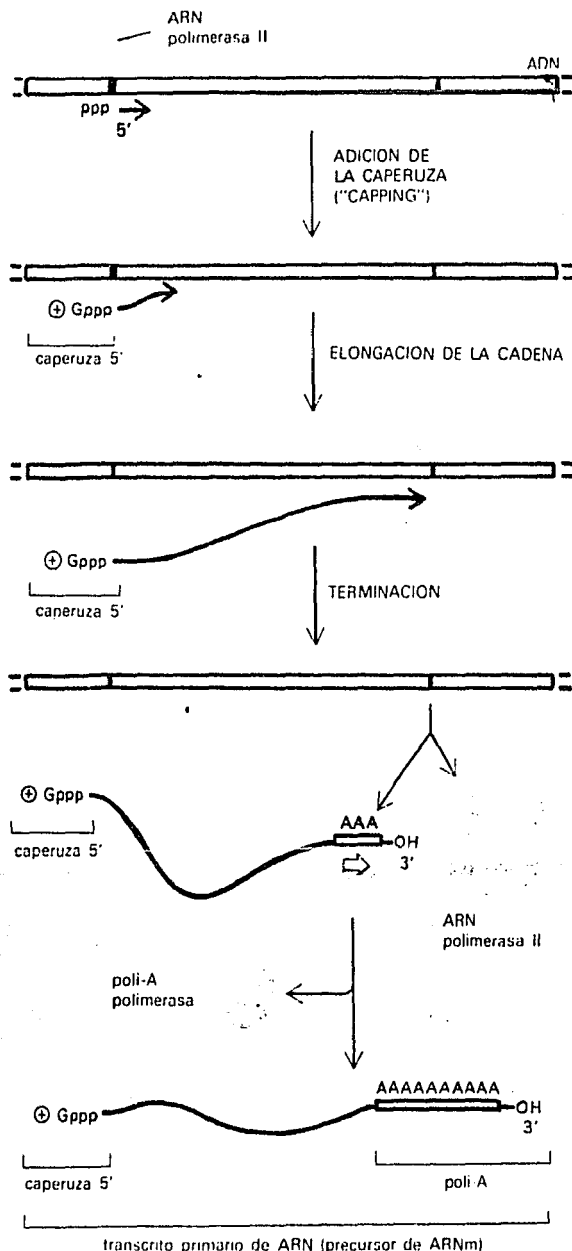


Fig. 2. El transcrito de ARN producto de la ARN polimerasa II.

La transcripción con ARN polimerasa II se caracteriza por regiones promotoras como TATA box, CCAAT y regiones ricas en GC antes del sitio de iniciación. La enzima continúa la transcripción y el transcrito sufre dos transformaciones covalentes, una en el extremo 5' con la unión de trimetil guanósina y otra en el extremo 3' con la adición del poli-A para constituir el transcrito primario o precursor del ARN mensajero.

Procesamiento postranscripcional.

El ARN producto de la transcripción no se encuentra libre, sino que conforme es sintetizado, se asocia a proteínas y forman partículas ribonucleoproteicas. De éstas, los gránulos pericromatinianos se han asociado al ARN heterogeneonuclear (hnARN) el cual debe ser procesado, para constituir el ARN mensajero. (Darnell J. E. Jr., 1983.)

La transcripción en los genes de eucariontes produce un ARN precursor en mosaico, ya que las secuencias codificantes llamadas exones, son frecuentemente interrumpidas por zonas de ADN no codificante llamadas intrones. El precursor debe sufrir reacciones de ruptura y unión denominada maduración del ARN en las que los intrones son eliminados para producir una molécula de ARN funcional. (Cech T. R., 1987.)

Actualmente se han postulado diferentes formas de procesamiento del ARN. (Lewin B., 1987) La auto-maduración a través de interacciones moleculares o la maduración que requiere interacciones entre factores celulares y señales de reconocimiento específico. Los primeros candidatos como factores de reconocimiento involucrados en la maduración del precursor del ARN mensajero (pre-m ARN) son las partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNPs), (Busch H. y col., 1982.) las cuales consisten de una molécula de ARN de 56 a 217 nucleótidos y aproximadamente 10 diferentes proteínas. Se conocen como U_1 , U_2 , U_4 , U_5 y U_6 , cuya abundancia es de 200,000 a 1,000,000 de copias por célula y contienen un capuchón (*cap*) de trimetilguanosina en el extremo 5' de la molécula, con excepción del U_6 , la cual contiene un capuchón no identificado; recientemente se han encontrado U_7 , U_8 , U_9 y U_{10} con una abundancia muy baja. (Galli G. y col., 1983.; Reddy R. y col., 1985.)

Para una exacta y eficiente maduración del ARN se requiere de cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}), de guanosina o un nucleótido de guanosina y diferentes RNP pequeñas nucleares.

La maduración se inicia por la unión covalente de un nucleótido de guanosina que provoca la ruptura en el sitio 5' de maduración del intrón por medio de una transesterificación. Esto genera una nueva conformación en el ARN intrónico en forma de lazo, cuyo extremo 5' se une a una adenosina que se localiza de 20 a 30 nucleótidos antes del sitio 3' de maduración. Posteriormente este sitio sufre una transesterificación que induce la eliminación del intrón en forma de lazo y la unión de los exones.

El posible mecanismo de acción de los snRNPs en este proceso de maduración se

ha investigado ultimamente y se ha propuesto el siguiente modelo (figura 3).

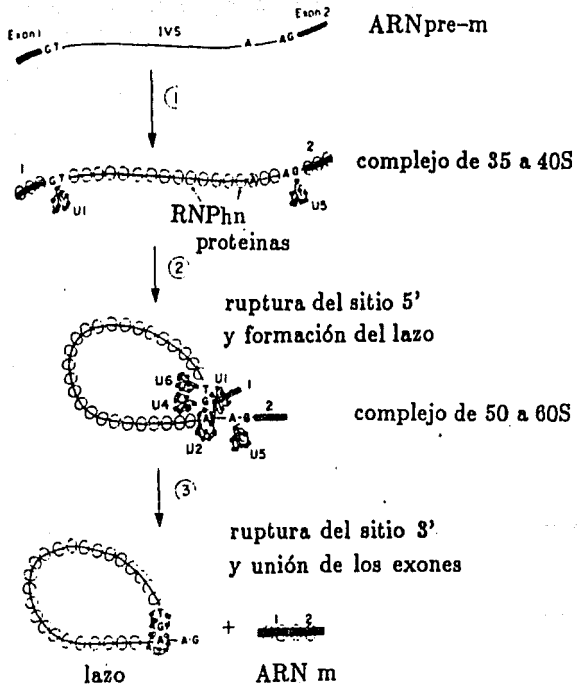


Fig. 3. Esquema que muestra el modelo de formación del complejo de maduración. Tomado de Maniatis T. y Reed R., 1987. *Nature* 235: 673-678.

En el primer paso, se forma un complejo de 35 a 40S en el cual, las snRNPs U_1 y U_6 se unen a los sitios de maduración 5' y 3' respectivamente debido a interacciones entre bases complementarias de estos con el ARN intrónico y las proteínas de la ribonucleoproteína heterogeneonuclear se unen a sitios inespecíficos. Para la formación del lazo y la ruptura del sitio 5' con la participación de las snRNPs U_4 , U_6 y U_2 cuyos sitios de interacción no se conocen y constituyen un complejo de 50 a 60S.

Finalmente se lleva a cabo la ruptura del sitio 3', la unión de los exones y la liberación del intrón.

No se conoce el posible mecanismo de acción de los snRNPs en los complejos de maduración, pero son indispensables. La cinética de este modelo está basada en estudios de formación de complejos de maduración *in vitro*, en el que se separaron los diferentes componentes y se analizaron electroforéticamente (Padgett R.A. y col., 1984.; Chabot B. y col., 1985.; Padgett R.A. y col., 1986.; Konarska M. y Sharp P.A., 1987.)

Objetivos:

Con base en los conocimientos que se tienen acerca de las partículas ribonucleoproteicas y dada su importancia, en este trabajo se estudió su estructura y participación en los procesos nucleares, por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una técnica que permita estudiar con el microscopio electrónico la estructura fina de las partículas ribonucleoproteicas en núcleos celulares.
2. Estudiar las partículas ribonucleoproteicas por medio de la técnica diseñada.

Materiales y Métodos.

Con el fin de desarrollar una técnica para investigar las relaciones entre cromatina y ribonucleoproteínas, primero se llevo a cabo una revisión bibliográfica de metodologías, las cuales nos ayudaron a desarrollar la metodología que nos fue útil.

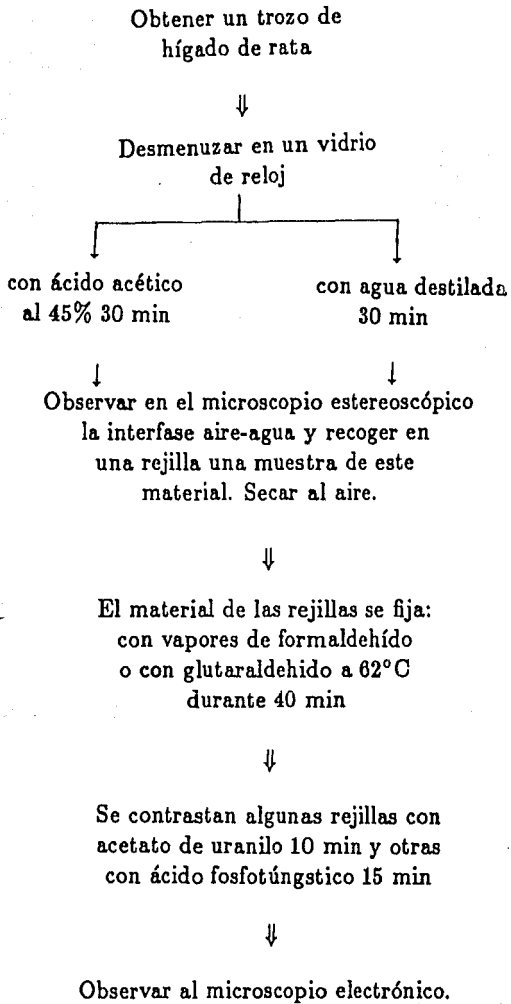
Se seleccionaron 5 técnicas que fueron realizadas tal cual o se modificaron para lograr obtener resultados satisfactorios. Con base en éstas se desarrollaron once técnicas y cada una tuvo su fundamento en por lo menos una de las técnicas seleccionadas.

Para tener un panorama general de las técnicas desarrolladas en relación con las técnicas que se tomaron como base, se realizó un listado que las correlaciona.

Técnica Basada en:

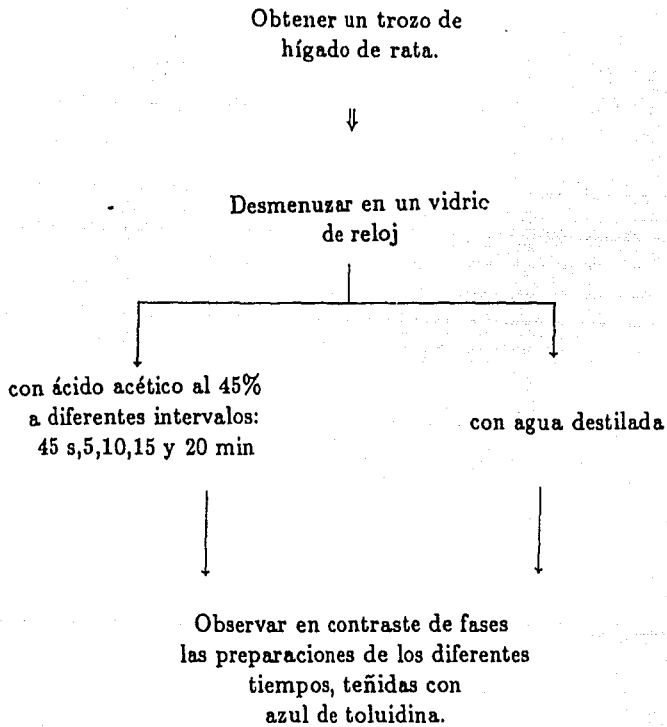
- 1, 1a Burkholder G. D. 1977.
- 2, 2a Miller T. E., Huang Ch., Pogo O. 1978.
- 3 Wunderlich F., Giese G., Herlan G. 1984.
- 4 Roodyn D. B. 1972.
- 4a, 4b Roodyn D. B. 1972. y Wunderlich F., Giese G., Herlan G. 1984.
- 5, 5a, 5b Puvion-Dutilleul F y Puvion E. 1980.

Técnica 1:



Burkholder G. D. 1977. Can. J. Genet. Cytol. 19:21-29.

Técnica 1a:



Burkholder G. D. 1977. Can. J. Genet. Cytol. 19:21-29.

Técnica 2:

Hígado en pedacitos en
5 ml de amortiguador 1



Homogeneizar, en 25 ml
del amortiguador 1*

Tomar una muestra
para observar con
el microscopio óptico.

Centrifugar 800g 10 min

↓
descartar sobrenadante

Resuspender botón en 30 ml
de amortiguador 1



Tomar una muestra para
observar al microscopio óptico

realizar 3 veces

↓
Ultimo botón resuspenderlo
en 2.5 ml amortiguador 2*
y 12.5 ml amortiguador 3*



Centrifugar 800g 10 min



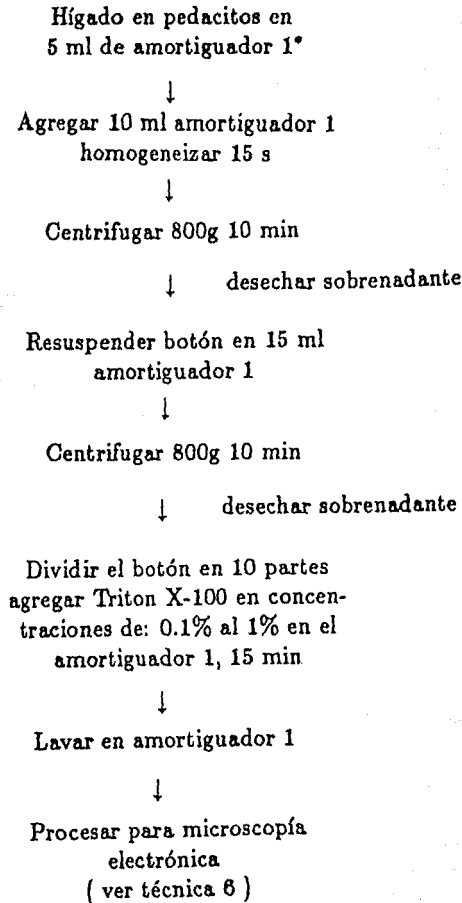
Procesar para microscopía
electrónica
(ver técnica 6)

*Los amortiguadores usados contenían:

1. Tris-HCl 25mM, Sacarosa 0.25M, MgCl₂ 2.5mM pH 7.5
2. Tris-HCl 25mM, NaCl 0.1M, MgCl₂ 5mM pH 8
3. Tris-HCl 25mM, NaCl 0.9M, MgCl₂ 5mM pH7.2

Miller T.E., Huang Ch., Pogo O. 1978. J. Cell Biol. 76: 675-691.

Técnica 2a:



Miller T. E., Huang Ch., Pogo O. 1978. *J. Cell Biol.* 76:675-691.

*El amortiguador usado contenía: 1. Tris-HCl 25mM, Sacarosa 0.25M, MgCl₂ 2.5mM pH 7.5

El aparato utilizado para homogeneizar fue un Homogenizador-sonicador Polytron de aspas, con el que se disgregó el tejido y se rompieron parcialmente las células, para obtener núcleos con las subsiguientes centrifugaciones.

Técnica 3:

Hígado en pedacitos
en 5 ml amortiguador fosfatos
0.16M pH 7.2

⇓

Homogeneizar, agregando 10 ml
amortiguador fosfatos

⇓

Centrifugar 800g 10 min

⇓

desechar sobrenadante

Resuspender el botón en 15 ml
amortiguador fosfatos.

⇓

Centrifugar 800g 10 min

⇓

desechar sobrenadante

Agregar Triton X-100 de
0.1% a 1% en amortiguador
fosfatos 15 min

⇓

Lavar en amortiguador fosfatos

⇓

Procesar para microscopía
electrónica
(ver técnica 6)

Wunderlich F., Giese G., Herlan G. 1984. J.Cell Phys. 120: 211-218.

Técnica 4:

Hígado en pedacitos



Homogeneizar en 5 vol. de
ácido cítrico 0.025M 4°C



Filtrar en embudo con gasa
a 4°C



Centrifugar 2500 rpm 10 min



desechar sobrenadante

Resuspender 10 vol. ácido cítrico



repetir 3 veces

Dividir el botón en 4 partes:

1. Control en ácido cítrico
2. 0.1% Triton X-100
3. 0.5% Triton X-100
4. 1.0% Triton X-100
durante 15 min



Tomar muestras en
rejillas



Contrastar



desechar Triton X-100
o ácido cítrico



Fijar con glutaraldehído 2.5% 1hr



Dividir cada muestra en 2



Post-fijar en OsO_4
0.1% 1hr

Procesar para microscopía
electrónica
(ver técnica 6)

Roodyn D. B. 1972. in "Subcellular Components: preparation and fractionation (G.D. Birnie, ed) 2nd ed. London 1972.

Técnica 4a:

Esta técnica es igual a la anterior, solo que en ésta se centrifugó después del Triton X-100.

Debido a los resultados obtenidos con la técnica anterior se realizaron dos variantes de este ensayo, la primera consistió en la eliminación de los amortiguadores 2 y 3, y se usaron en su lugar el detergente Triton X-100 en diferentes concentraciones, con el fin de romper los núcleos. En la segunda se usó amortiguador de fosfatos en lugar del amortiguador 1 para comparar el efecto de la estructura nuclear.

Técnica 4b:

A la técnica 4a se le realizaron tres modificaciones que consistieron en:

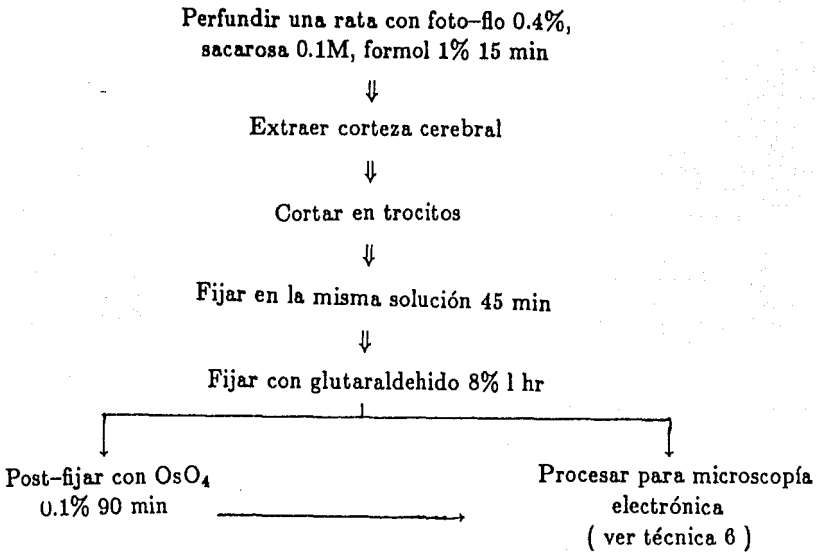
1. El último botón se dejó 30 min en Triton X-100.
2. Cada muestra se homogeneizó en su respectiva concentración de Triton X-100, con un control sin homogeneizar.
3. Las preparaciones fueron sombreadas con aluminio.

Esta técnica se basa en los trabajos de Dounce y col. (Roodyn D. B. 1972) que en esencia consiste en la lisis celular a pH bajo, en una solución hipotónica de ácido cítrico y al cual se le agregó Triton X-100 a diferentes concentraciones.

Posteriormente para facilitar el procesamiento del material se centrifugó después de aplicar el Triton X-100. Debido a lo obtenido se incrementó el tiempo de aplicación del detergente, homogeneizando una parte en presencia de éste, en sus respectivas concentraciones.

Además del contraste habitual con acetato de uranilo y citrato de plomo se utilizó el contraste preferencial para cromatina (Vázquez Nin G., Chávez B., Thomas-Martin C., 1973.) y un sombreado ligero con aluminio, utilizando un evaporador Coating System E306A Edwards.

Técnica 5:



Puvion-Dutilleul F., Puvion E. 1980. J. Cell Sci. 42: 305-321.

La rata fue anestesiada con éter, posteriormente se procedió a realizar la perfusión a través del corazón para que así por medio del aparato circulatorio las soluciones llegaran al cerebro. Primero se perfundió con una solución salina al 0.9% que se dejó correr por 5 min, tiempo suficiente para lavar, inmediatamente se cerró el flujo de ésta y se dejó correr la solución fijadora por 15 min, la cual contenía formol 1%, sacarosa 0.1M y foto-flo 0.4% a pH 9, cuyo efecto además de fijar, es producir la extensión de la cromatina de las neuronas.

Después se extrajo la corteza cerebral, se cortó en trozos de 3 a 5 mm y se dejaron inmersos en la solución fijadora antes mencionada hasta completar una hora. Para obtener una mejor fijación se sustituyó la solución anterior por glutaraldehido 8% por una hora con cambios cada 10 min. Se lavó con amortiguador de fosfatos 0.16M pH7.2, una parte de los fragmentos se post-fijaron en tetraóxido de osmio 1% 90 min y ambos grupos fueron procesados de acuerdo a la técnica usual para microscopía electrónica.

Técnica 5a:

Perfundir una rata con foto-flo 0.4%,
sacarosa 0.1M, formol 1% 15 min



Extraer corteza cerebral



Cortar en trocitos



Fijar en la misma solución 45 min



Lavar con agua bidestilada 1 hr con
cambios de 10 min



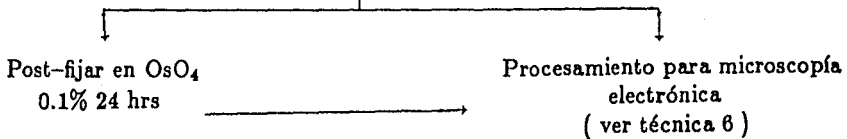
Dividir la muestra en 6 grupos para
someterlos a tratamiento enzimático
a 37°C.



Fijar con glutaraldehido 8% 1 hr



Enjuagar en amortiguador fosfatos



La rata fue procesada de igual forma que en la técnica antes descrita hasta la obtención de la corteza cerebral, se dejó 1 hr en la solución fijadora. Los fragmentos fueron divididos en 6 grupos, los cuales fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo 1:

Pronasa 0.01% pH 7.4 10 min

↓

Lavar en vehículo de enzima
(agua bidestilada pH 7.4) 1 hr
con cambios cada 15 min

↓

ARNasa 0.1% pH 6.8 12 hrs

↓

Lavar en vehículo de enzima
(agua bidestilada pH 6.8)

Grupo 2:

Vehículo de Pronasa 10 min

↓

Lavar 1 hr

↓

ARNasa 12 hrs

↓

Lavar en vehículo de ARNasa

Grupo 3:

Pronasa 10 min



Lavar en vehículo de Pronasa 1 hr



ADNasa I 500U/ml 12 hrs



Lavar en vehículo de enzima
(NaCl 0.15M, MgCl₂ 0.1% en
agua bidestilada)

Grupo 4:

Vehículo de Pronasa 10 min



Lavar en vehículo de Pronasa 1 hr



ADNasa I 12 hrs



Lavar en vehículo de ADNasa I

Grupo 5:

Pronasa 10 min
↓
Lavar en vehículo de Pronasa 1 hr
↓
Vehículo de ADNasa 12 hrs
↓
Lavar en vehículo de ADInasa

Grupo 6:

Vehículo de Pronasa 10 min
↓
Lavar en vehículo de Pronasa
↓
Vehículo de Pronasa 12 hrs
↓
Lavar en vehículo de Pronasa

Puvion-Dutilleul F., Puvion E. 1980. J. Cell Sci. 42:305-321.

Una vez realizado lo anterior los grupos fueron fijados en glutaraldehído 8% por una hora con cambios cada 10 min. Cada grupo se dividió en dos, uno de ellos se post-fijo en tetraóxido de osmio 0.1% 24 hrs, el otro fue deshidratado en alcoholes etílicos graduales e incluidos en resinas epóxicas.

Técnica 5b:

Perfundir una rata con foto-flu 4%
sacarosa 0.1M, formol 1% durante 15 min

⇓

Extraer corteza cerebral

⇓

Cortar en trocitos

⇓

Fijar en la misma solución 45 min

⇓

Lavar con agua bidestilada 1 hr
con cambios cada 10 min

⇓

Tratamiento enzimático ARNasa 0.1% 37°C
1/2 hr., 1hr., 2hrs., 3hrs., 4 hrs. y control
en vehículo de la enzima para cada tiempo

⇓

Fijar en glutaraldehido 8% 1 hr

⇓

Enjuagar en amortiguador fosfatos

⇓

Deshidratar en alcoholes graduales

⇓

Oxido de propileno

⇓

Preincluir

⇓

Incluir en resina epóxica

Esta técnica se realizó igual que la técnica 5a, se modificó el tiempo de incubación en la enzima y con el uso de ARNasa solamente.

Técnica 6:

Perfundir una rata con paraformaldehido
4%, glutaraldehido 1% por 15 min



Extraer la corteza cerebral



Cortar en trocitos



Fijar en la misma solución 45 min



Lavar con amortiguador fosfatos

Post-fijar con OsO_4
0.1% 90 min

Deshidratar en alcoholes graduales

1. 2 cambios 70% 10 min c/u
2. 2 cambios 80% 10 min c/u
3. 2 cambios 90% 10 min c/u
4. 3 cambios 100% 10 min c/u



Oxido de propileno 3 cambios
de 10 min c/u
(agente intermediario)



Preincluir en óxido de propileno
resina epóxica 1:1 24 hrs a tem-
peratura ambiente.



Incluir en resina epóxica
24 hrs 60° C

Ortega Rangel J.A. 1986. Tesis Doctoral. Biología, Fac. Ciencias, UNAM, México.

En la técnica 6 se utilizó una rata joven, la cual fue anestesiada con éter y perfundida durante 15 min con paraformaldehído 4% y glutaraldehído 1%, posteriormente se obtuvo la corteza cerebral, se cortó en fragmentos de 3 a 5 mm y se continuó fijando en dicha solución por 45 min, después fueron lavados en amortiguador de fosfatos 0.16 M pH 7.2.

Una parte se postfijó con tetraóxido de osmio 0.1% por 90 min, realizado lo anterior los dos grupos se deshidrataron en alcoholes etílicos graduales de 70%, 80%, 90% y 100% con dos cambios de 10 min cada uno, excepto el de 100% en el que se realizó un tercer cambio. Como agente intermediario se utilizó óxido de propileno, se dejaron los fragmentos durante 30 min con cambios de 10 min cada uno.

Se realizó la preinclusión con el agente intermediario y la resina epóxica en proporción 1:1 por 24 hrs; por último se incluyeron en epon, se dejaron polimerizar en la estufa a 60°C por 24 hrs.

Todos los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo MT2. Primero se realizaron cortes semifinos de 0.5 micras aproximadamente, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y borax al 1%, lo que nos permitió localizar núcleos de neuronas, para así realizar cortes ultrafinos.

Los cortes con tetraóxido de osmio fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cortes sin tetraóxido de osmio se contrastaron de acuerdo a la técnica preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969).

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico EM10 Carl Zeiss, se tomaron fotos a diferentes aumentos y voltajes.

Resultados:

Selección de técnicas.

Al analizar las diferentes técnicas de los artículos consultados, se comenzó con la técnica de Burkholder (1977), la aquí llamada técnica 1, en la que para extender cromosomas de glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* en una superficie de agua, utilizó ácido acético al 45% debido a que aparentemente éste debilita la membrana celular y nuclear y permite su ruptura en la superficie del agua. Con ésto como antecedente se realizó la primera técnica, con lo cual se obtuvieron estructuras celulares no identificadas, pero no se logró obtener extendidos nucleares, por lo que se varió el tiempo de acción del ácido acético y se observó que a los 45 segundos se obtienen núcleos limpios con una estructura alterada, por lo que se decidió no seguir utilizando esta técnica.

La técnica 2 se realizó basándose en el artículo de Miller, Huang y Pogo (1978), quienes obtienen matrices nucleares con ribonucleoproteínas al someter núcleos aislados a diferentes amortiguadores. Al aplicar esta técnica y observar al microscopio electrónico, se vió que los núcleos se encontraban vacíos o con poca cromatina, ésto hace pensar que los amortiguadores 2 y 3 y la centrifugación fue muy drástica, pues al resuspender el botón en el amortiguador y realizar la última centrifugación, se formó un objeto parecido a un coágulo, lo cual hace suponer que el ADN fue desnaturalizado.

En la técnica 2a se omitió el uso de los amortiguadores 2 y 3 para evitar la formación del coágulo y porque se encontró que las ribonucleoproteínas son sensibles a concentraciones mayores de 0.5M de NaCl. (Faiferman I. y col., 1971.; Faiferman I., Pogo O.A., 1975.) Además de que se utilizó Triton X-100 en diferentes concentraciones para romper los núcleos, ya que este detergente afecta a lípidos sin alterar la subestructura de las partículas. (Kaufmann S.H., Coffey D.S., Shaper J.H., 1981.) De las concentraciones probadas, la de 1% dió mejores resultados, se encontraron núcleos rotos, con extendimiento de la cromatina y con material fuera de ellos y se pudieron observar cadenas de partículas.

Para comparar el efecto del amortiguador Tris-HCl se realizó un ensayo colateral en el que se sustituyó por amortiguador de fosfatos (Técnica 3) y se obtuvieron núcleos con cromatina más o menos compacta, sin lograr romperlos, lo cual impide visualizar las ribonucleoproteínas y la cromatina.

En los experimentos anteriores se obtuvieron núcleos, pero con restos citoplásmicos por lo que en la cuarta técnica se aplicó la técnica del ácido cítrico para obtener núcleos sin contaminantes y usando Triton X-100 para romperlos. Los núcleos

depositados sobre rejillas mostraron ausencia de envoltura nuclear y una aparente extensión periférica de la cromatina, pero ésta no fué suficiente como para poder distinguir su estructura.

El material que se incluyó en epon, se dispersó en todo el bloque, por lo que no fue posible realizar cortes de éste para ser observado al microscopio electrónico. En la técnica 4a se centrifugó para evitar la dispersión del material, pero se formó un botón denso que impidió una buena inclusión y por lo tanto, no fue posible procesarlo.

En la técnica 4b, se logró un mayor extendido de la cromatina en el material sin homogeneizar depositado sobre rejillas, que al ser sombreado con aluminio evidenció fibras de cromatina. El material homogenizado se dañó demasiado y se observaron solamente restos nucleares que no fue posible identificar.

Los resultados hasta el momento fueron analizados y aún cuando se lograron algunos avances, como es en el caso de la técnica 4b, no fueron lo suficientemente satisfactorios, ya que los hepatocitos presentan gran parte de su cromatina en forma condensada, lo que hace más difícil su extensión sin que sufra daño, por lo que se decidió para las siguientes técnicas, utilizar corteza cerebral de rata, ya que las neuronas al tener una gran actividad de síntesis muestran una cromatina menos condensada, que facilitan la extensión de ésta.

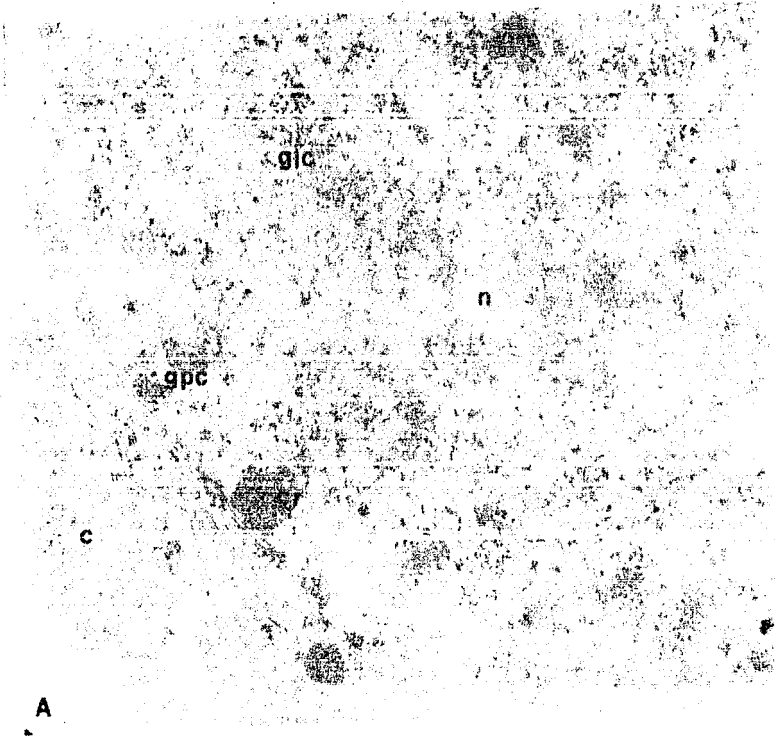
Técnica diseñada.

La técnica 5 se llevó a cabo con algunas modificaciones al trabajo de Puvion-Dutilleul F. y Puvion E., (Puvion-Dutilleul F., Puvion E., 1980.) quienes realizan la descondensación de la cromatina modificando la técnica de Miller O. (Miller O.L. Jr., Bakken A.H., 1972.)

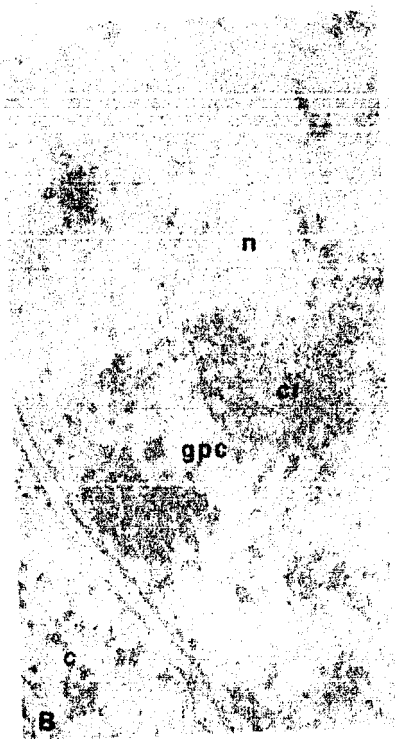
Las modificaciones fueron:

1. Primera fijación por perfusión.
2. Segunda fijación por inmersión.
3. Refuerzo de fijación con glutaraldehído 8%.

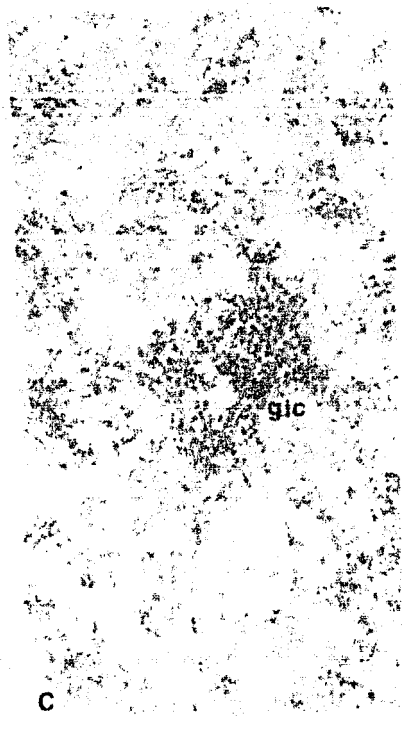
Los núcleos obtenidos con esta técnica mostraron que este tratamiento dió buenos resultados ya que al compararlos con núcleos tratados con la técnica usual para microscopía electrónica (técnica 6, figura 4), se pudo observar que la acción de las sustancias



A

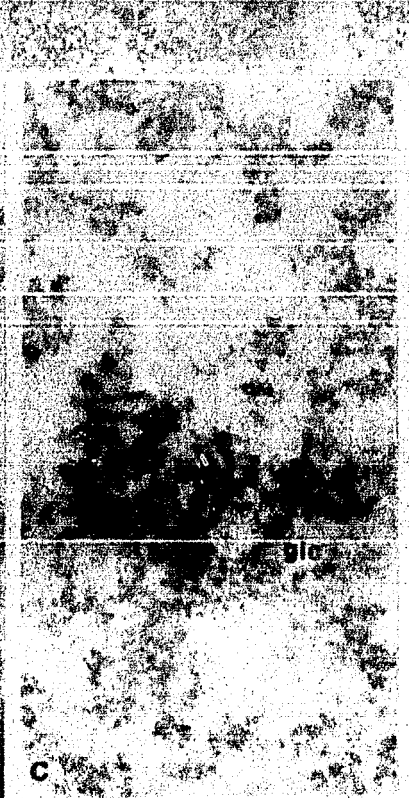
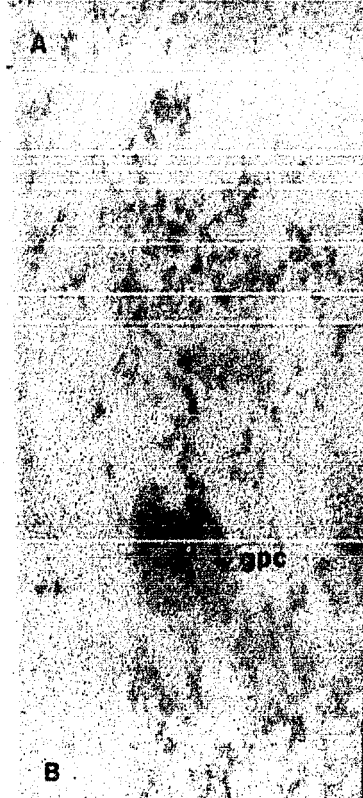
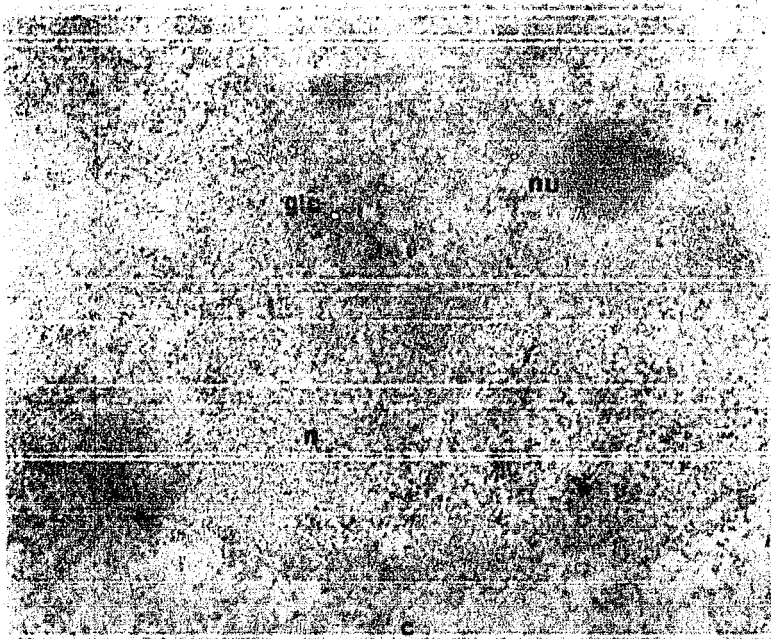


B



C

usadas provocó deterioro del citoplasma, una ruptura parcial de la envoltura nuclear que permitió la salida de su contenido, y se logró la extensión de la cromatina sin llegar a la visualización de nucleosomas. Las partículas ribonucleoproteicas fueron más evidentes, se pudieron observar gránulos pericromatinianos típicos, algunos con una expansión parcial que los hace de mayor tamaño, y se llegaron a observar algunos de estos gránulos pericromatinianos conectados a gránulos más pequeños por una fibra. Los gránulos intercromatinianos se encuentran en cúmulos interconectados por una fibra o solos y se pueden localizar cerca del nucleolo, el cual conserva su estructura compacta. Además en la región intercromatiniana se encontraron cadenas de partículas ribonucleoproteicas (figura 5).



A

B

C

Cadenas ribonucleoproteicas.

La técnica 5 permitió evidenciar la presencia de cadenas, formadas por partículas unidas por un filamento, que se localizan en el área intercromatiniana y que fueron positivas con la técnica de contraste regresivo preferencial para ribonucleoproteínas (figura 6).

Con el objeto de averiguar la distribución de las partículas a lo largo de la cadena, se aplicó un análisis estadístico, para lo que se midieron los diámetros de las partículas, la longitud de las cadenas y las distancias entre partículas. Las partículas presentaron un diámetro entre 13 y 20 nm; la longitud de las cadenas es variable mostrando que su tamaño es de 75 a 675 nm (ver figura 7 y tabla 1).

	Longitud de la cadena nm.	Diámetro de las partículas nm.	Distancia entre partículas nm.
No. de observaciones	70	369	219
\bar{x}	251.51	14.26	7.83
ds	131.64	3.29	2.98

Tabla 1.

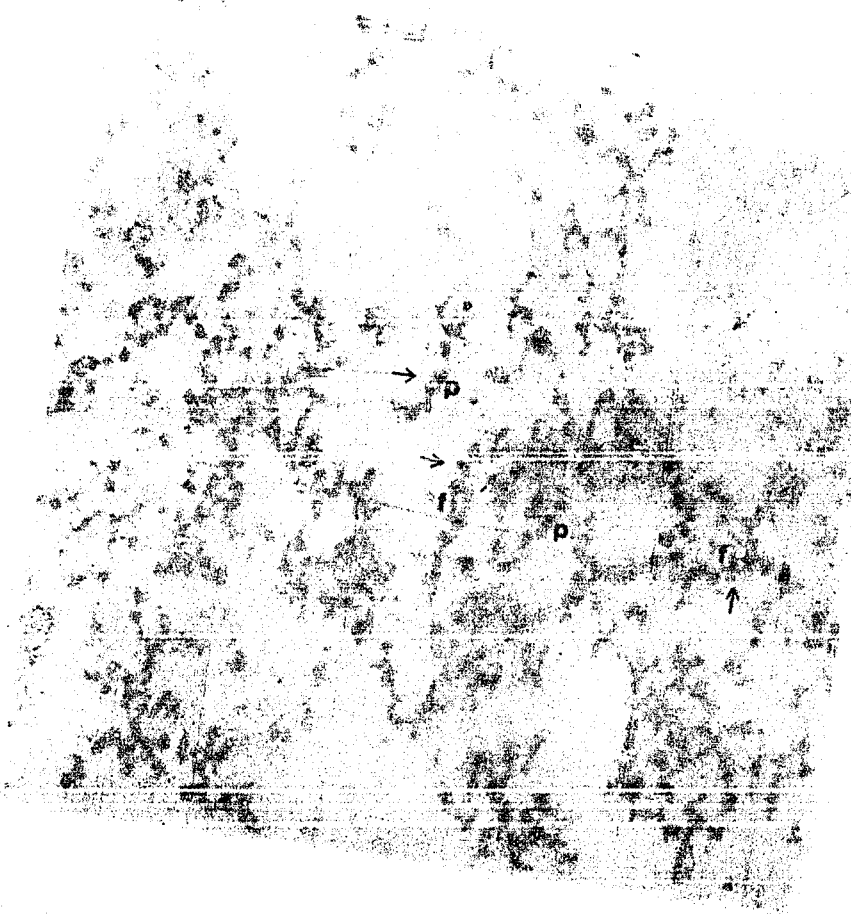


Fig. 6. Cadenas ribonucleoproteicas obtenidas con la técnica diseñada con contraste uranilo-plomo 150,000 X. →
p: gránulo ribonucleoproteico; f: filamento de ARN.

LONGITUD de las CADENAS

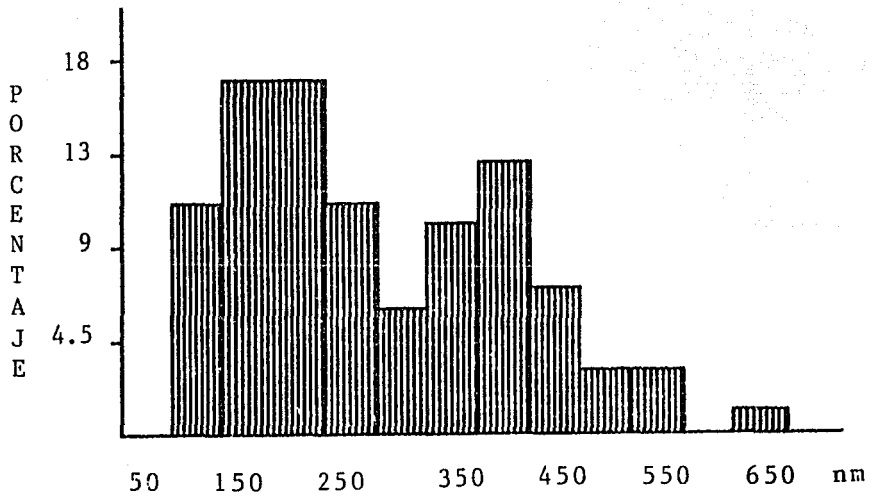


Fig. 7. Histograma que muestra la frecuencia relativa de las longitudes de las cadenas, agrupadas en clases de 50 nm.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La figura 8 muestra el histograma de las frecuencias relativas del diámetro de las partículas expresadas en porcentaje, en el que se puede observar que la mayoría de los diámetros de éstas se encuentran entre 10.0 y 17.5 nm, intervalo que abarca desde el comienzo de la clase B hasta el fin de la D.

En la figura 9 se muestra el histograma de distancias entre partículas, en el que se puede observar que éstas son variables, y el análisis de varianza mostró que existe una gran dispersión de los datos.

La figura 10 representa la longitud de las cadenas y el número de partículas por cadena que fueron analizadas por medio de regresión lineal, la cual mostró que existe una correlación entre estos parámetros de 0.68.

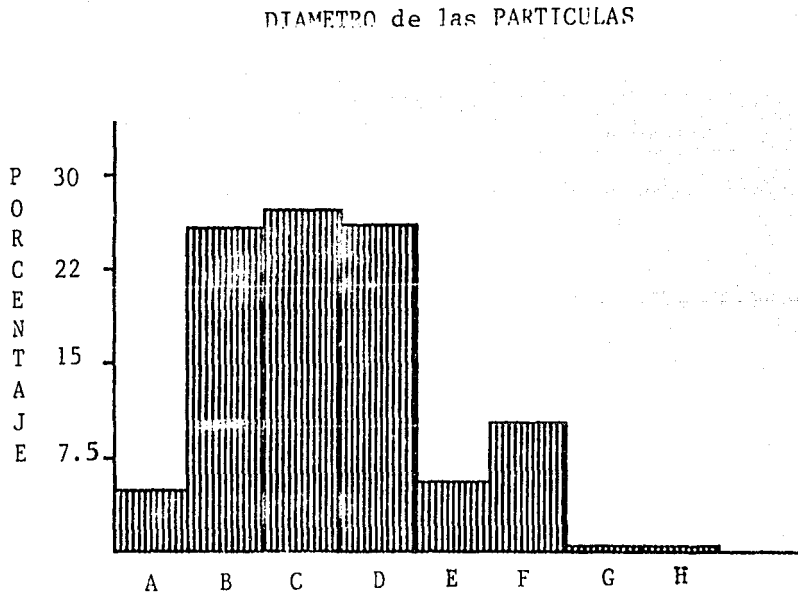


Fig. 8. El histograma muestra la distribución del diámetro de las partículas.
 Las letras representan los puntos medios de clase: A: 8.75 B: 11.25 C: 13.75
 D: 16.25 E: 18.75 F: 21.25 G: 23.75 H: 26.25 nm

DISTANCIA entre PARTICULAS

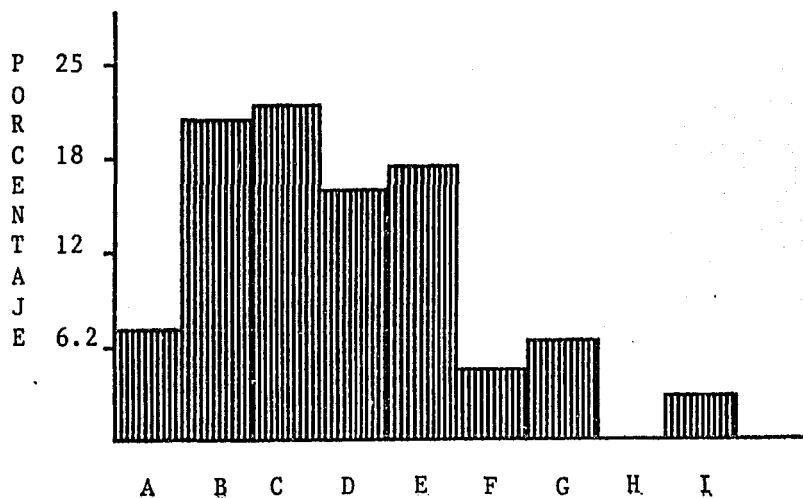


Fig. 9. El histograma muestra la distribución de las distancias entre las partículas.
 Las letras representan los puntos medios de clase: A: 3.75 B: 5.25 C: 6.75
 D: 8.25 E: 9.75 F: 11.25 G: 12.75 H: 14.25 I: 15.75 nm

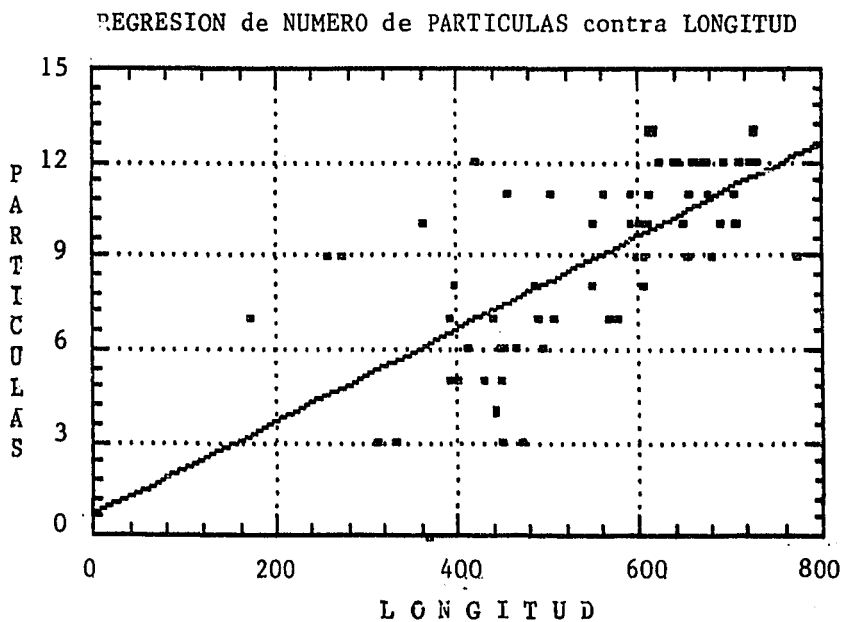


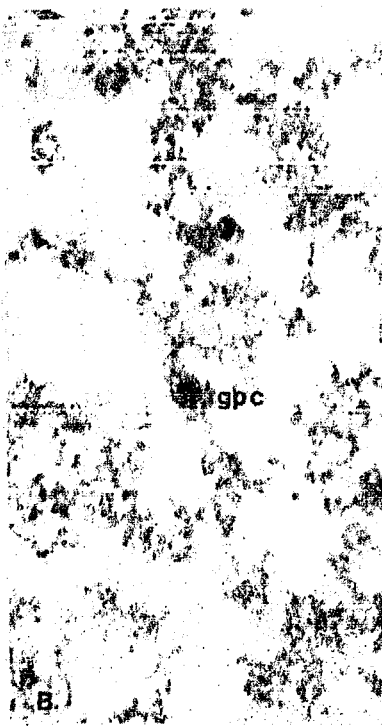
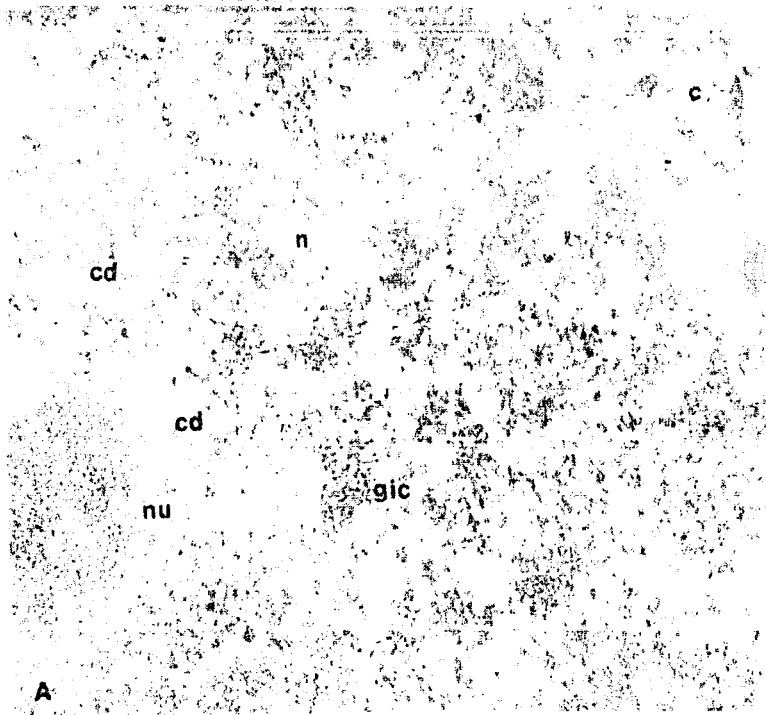
Fig. 10. Gráfica de regresión lineal que representa las longitudes de las cadenas contra el número de partículas.

Para saber si el filamento que une a las partículas es ARN se realizó la técnica 5a que produjo colapso en la estructura nuclear. Esto condujo a realizar la técnica 5b en la que se modificó el tiempo de incubación de 12 hrs a 5 tiempos diferentes (4, 3, 2, 1 y $\frac{1}{2}$ hrs). De los diferentes tratamientos realizados, el de $\frac{1}{2}$ hr fue el que permitió la observación de cadenas, ya que en los tratamientos restantes los núcleos sufrieron un colapso de sus estructuras al igual que en la técnica 5a, en la que no fue posible realizar un análisis cuantitativo.

El aspecto que presentan los núcleos tratados $\frac{1}{2}$ hr con ARNsa fue de una ligera digestión, ya que permitió observar una envoltura nuclear parcialmente rota, cromatina y gránulos pericromatinianos parcialmente extendidos, éstos últimos permitieron observar su constitución filamentosa, cúmulos de gránulos intercromatinianos típicos y nucleolo ligeramente laxo (figura 11). Con este tratamiento las cadenas se encuentran solamente como partículas ribonucleoproteicas alineadas ya que el filamento de unión fue digerido por la ARNsa. Estas partículas presentan un diámetro de 17.4 nm en promedio, el cual es mayor al diámetro de las partículas tratadas sólo con la técnica diseñada ($p < 0.001$, tabla 1), esto se piensa que es debido a que la digestión con ARNsa provocó una disgregación de las partículas, ya que estas contienen ARN y las hizo de mayor tamaño; algunas partículas muestran el resto de un filamento que antes las unía en forma de cadena y otras sin filamento de unión (figura 12). La distancia entre estas partículas es variable, la media es mayor que la de la tabla 1 ($p < 0.001$, tabla 2).

	Diámetro de las partículas nm.	Distancia entre partículas nm.
No. de observaciones	42	23
\bar{x}	17.42	22.53
ds	4.37	12.3

Tabla 2.



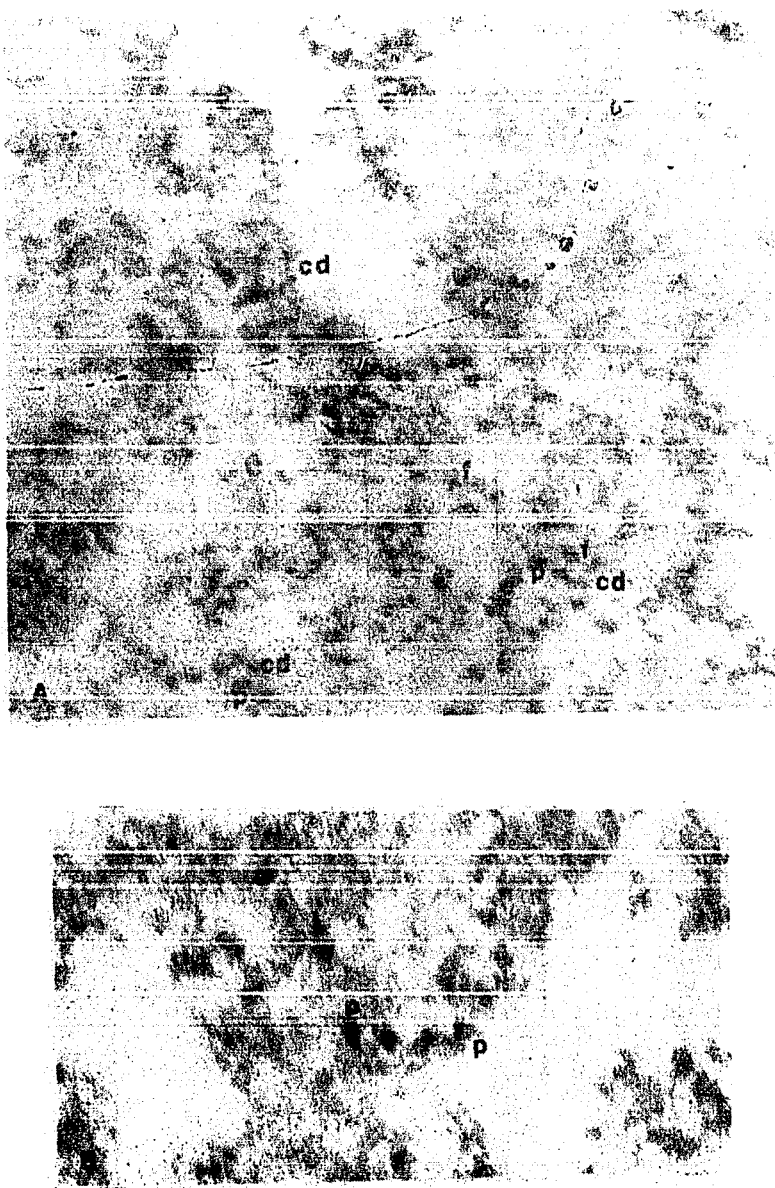


Fig. 12. Corteza cerebral de rata con la técnica diseñada con contraste uranilo-plomo.
A) Cadenas ribonucleoproteicas (cd) sin tratamiento enzimático 138,000 X.
B) Digestión parcial con ARNsa 0.02 mg/ml media hora a 37°C de las cadenas ribonucleoproteicas, donde se observan las partículas ribonucleoproteicas alineadas y con un resto del filamento que las unía 118,000 X.
cd: cadenas; p: partículas; f: filamento.

Discusión:

Al comparar la técnica diseñada con las realizadas a lo largo del trabajo, se puede observar que ésta última dió resultados satisfactorios y reproducibles, en los que se logró de una manera parcial tanto la extensión de la cromatina, como la ruptura de la envoltura nuclear, así como una mejor visualización de las ribonucleoproteínas.

Aún cuando con las primeras técnicas se logró una extensión del contenido nuclear, ésta no fue suficiente para poder realizar un análisis de las partículas ribonucleoproteicas, ya que los experimentos fueron realizados con núcleos enteros en los que sólo se podía estudiar la cromatina periférica y pocas partículas ribonucleoproteicas que salían del núcleo roto; además de que éstas estructuras no podían ser bien visualizadas, ya que el resto de el núcleo permanecía entero en forma compacta, en donde se pudo observar como un cuerpo obscuro. Los núcleos en cortes, presentaron una extensión parcial sólo en las zonas rotas de la envoltura nuclear, de donde salía la cromatina que podía ser observada en los núcleos enteros, mientras que las estructuras del resto del núcleo mantuvieron una ultraestructura normal pues no fueron extendidas con la técnica, por lo que las zonas útiles para estudio eran limitadas.

Con la técnica implementada (técnica 5) se encontró que los núcleos presentaban la cromatina con una expansión parcial en la que no se llegó a la visualización de los nucleosomas, sino sólomente se logró que tanto las zonas compactas como las laxas se extendieran, lo que permitió observar su ultraestructura. Las partículas ribonucleoproteicas también sufrieron una expansión; se encontraron algunos gránulos pericromatinianos de mayor tamaño y algunos de éstos estaban conectados a pequeñas cadenas de partículas, los gránulos intercromatinianos se encontraron formando cúmulos y algunos de ellos, conectados por una fibra. Estos y el nucleolo mantuvieron su estructura normal.

Lo más notable de los núcleos tratados con esta técnica, es la presencia de partículas unidas por un filamento que hemos llamado cadenas, las cuales no son fáciles de visualizar con la técnica usual de microscopía electrónica (técnica 6). Con la técnica de contraste regresivo preferencial para ribonucleoproteínas y el estudio citoquímico (técnica 5b) se encontró que las cadenas son de naturaleza ribonucleoproteica y las partículas son estructuras que son afectadas parcialmente por la acción de la ARNasa 0.02 mg/ml durante media hora a 37°C, pues aumentan de tamaño evidenciando la degradación parcial del ARN que forma parte de ellas. Bajo estas condiciones el filamento que une a las partículas es degradado, como es demostrado no solamente por las observaciones de partículas alineadas sin el filamento de unión, sino además por el aumento de las distancias promedio entre partículas y sobre todo por la enorme variación de estas distancias evidenciada por la desviación estándar que se muestra

en la tabla 2. De todo esto, inferimos que las partículas están constituidas por ARN y proteínas asociadas que le confieren mayor estabilidad y los filamentos son ARN sensibles a la acción de la enzima.

Para poder interpretar los resultados obtenidos, realizamos una revisión de los trabajos sobre las partículas ribonucleoproteicas y específicamente sobre partículas asociadas a filamentos y encontramos que a partir de 1964, Samarina y col. (1966) iniciaron las investigaciones de la organización estructural y funcional de las partículas ribonucleoproteicas que contienen ARN premensajero. En 1966, Girard y Baltimore obtuvieron *in vitro* partículas ribonucleoproteicas muy estables y en 1967 Samarina y col. postularon la existencia de éstas partículas en núcleos de células eucariontes, con un coeficiente de sedimentación de 30S, cuyo ARN de una sola hebra está organizado en forma compacta, lo que permite la accesibilidad a factores externos como enzimas o proteínas reguladoras. Stévenin y col. en 1969, al proporcionar aminoácidos marcados a extractos nucleares asociaron el ARN heterogéneo nuclear con el ARN mensajero, debido a que el marcado aparece en ambos, además éste marcado también lo encontraron en un pico de 30S. A partir de 1972, el grupo de Jacob y Stévenin aislaron las partículas ribonucleoproteicas que contenían ARN heterogéneo nuclear y demostraron que éstas no son productos de artefactos, contaminación celular o degradación, sino que son partículas de 20 a 30 nm asociados a la matriz y que presentan un poco más del 4% de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares en su composición. Además caracterizaron dos clases de unidades de ribonucleoproteínas heterogéneo nuclear, una formada por partículas de 30 a 50S y otra por complejos heterogéneos de 50 a 200S. En 1980, Martin y col. visualizaron con microscopía electrónica a las partículas ribonucleoproteicas heterogéneo nuclear como cuentas de collar, donde las partículas de 20 a 30 nm de diámetro y un coeficiente de sedimentación de 30 a 50S, se unen por un filamento sensible a ARNasa. El análisis de éstas partículas mostró que están constituidas por aproximadamente 500 nucleótidos de marcado rápido y una serie de 8 o más proteínas, cuyos polipéptidos están clasificados como grupo A, B y C; éste último se localiza en las partículas 40S que caracterizó LeSturgeon 1978 y se sabe que son importantes para la maduración.

Con base en lo anterior, nosotros podemos relacionar las cadenas observadas con las partículas ribonucleoproteicas que contienen ARN heterogéneo nuclear, por su tamaño y porque el filamento que las une es sensible a la ARNasa. Además, con el análisis cuantitativo encontramos que la longitud de las cadenas es variable, el diámetro de las partículas no varía significativamente y es independiente de la longitud de la cadena y que, las distancias entre las partículas es también variable y su número se incrementa conforme aumenta la longitud de la cadena, pero no en una relación lineal. Todo ésto lo podemos interpretar al relacionarlo con el proceso de maduración y con la relación intrón-exón que existe en el ARN. Acerca del proceso de maduración, sabemos que en éste participan los ARN pequeños nucleares, que Spector

y col. en 1983 y Puvion y col. en 1984a por medio de inmunolocalización con anti-Sm y anti-RNP los encontraron tanto en las partículas ribonucleoproteicas heterogéneo nucleares 30S como en los gránulos intercromatinianos; posteriormente Fakan y col. en 1986, también por inmunolocalización demostraron la presencia de ribonucleoproteína pequeño nuclear U_1 en estructuras tipo gradiente (diferente a los árboles de Miller) y en material fibrogranular semejante a nuestras cadenas; ellos sugieren que los gránulos intercromatinianos pueden ser almacén de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares por lo que nosotros sugerimos que las cadenas pueden ser gránulos pericromatinianos desenrollados o fibras intercromatinianas que se asocian con las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares faltantes o necesarias, localizadas en los gránulos intercromatinianos para así constituir los complejos de maduración. En los que las partículas constituyen la porción del ARN heterogéneo nuclear que está siendo eliminado (intrón) por el conjunto de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares y el filamento que se encuentra entre las partículas es ARN heterogéneo nuclear (exón) que tiene codificada parte de la información necesaria para la síntesis de moléculas aprovechables por el metabolismo celular. Las cadenas se encuentran en la zona intercromatiniana y son independientes de los gránulos intercromatinianos, aún cuando las cadenas pueden estar cerca de los cúmulos y el diámetro de sus partículas es semejante, se piensa que las cadenas no son agregados de los gránulos intercromatinianos que debido a la técnica sufrieron una descompactación, sino que son ARN premensajero que está en proceso de maduración.

Con este trabajo no se puede afirmar la estricta correspondencia entre estructura y función, porque se realizó básicamente a un nivel ultraestructural y el análisis citoquímico fue realizado exclusivamente para corroborar si el filamento de unión y las partículas contienen ARN.

Conclusiones:

La técnica diseñada (modificación de la técnica de Puvion- Dutilleul F. y Puvion E. 1980) dió resultados satisfactorios y reproducibles, ya que con esta técnica se logró obtener tanto una ruptura, como un extendido parcial de los núcleos de corteza cerebral de rata, con los cuales se pudo realizar el estudio ultraestructural y citoquímico de las partículas ribonucleoproteicas principalmente.

Las cadenas ribonucleoproteicas encontradas con ésta técnica tienen una longitud que oscila entre 68 y 629 nm. Están constituidas por partículas, parcialmente sensibles a la ARNasa, de 14.26 ± 3.29 nm de diámetro, unidas por un filamento sensible a ribonucleasa y una separación de 7.38 ± 2.98 nm entre partícula y partícula.

Bibliografía

- Aebi U., Cohn J., Buhle L., Gerace L. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**: 560-564.
- Albarracín-Teulón A. 1983. *La teoría celular*. Ed. Alianza Universidad. España. 298 pp.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. 1986. *Biología Molecular de la Célula*. 3ª ed., Ed. Omega. Barcelona. 1232 pp.
- Bachelierie J-P., Puvion E., Zalta J-P. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* **58**: 327-337.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruc. Res.* **27**: 250-265.
- Burkholder G.D. 1977. Whole mount electron microscopy of the nucleolus in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 21-29.
- Busch H., 1974. Structures and functions of the nuclear envelope. *The Cell Nucleus*. Academic Press. New York. 219-347 pp.
- Busch H., Reddy R., Henning D., Spector D., Epstein P., Domae M., Liu M., Chirala S., Schreir W., Rotblum L. 1982. Small nuclear RNP's and RNA processing gene regulation. *Gene regulation*. Ed. O'Malley B.W. 167-187.
- Capco D.G., Wan K.M., Penman S. 1982. The nuclear matrix: three-dimensional architecture protein composition. *Cell* **29**: 847-858.
- Cech T.R. 1987. The Chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science*. **236**: 1532-1539.
- Chabot B., Black D.L., LeMaster D.M., Steitz J.A. 1985. The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science*. **230**: 1344-1349.
- Darnell J.E. Jr. 1983. The processing of RNA. *Sci. Am.* **249**(4): 72-83.
- Daskal Y., Komaromy L., Busch H. 1980. Isolation and partial characterization of perichromatin granules. *Exp. Cell Res.* **126**: 39-46.
- Daskal Y. 1981. Perichromatin granules. *The Cell Nucleus*. Ed. Busch H. Vol. VIII. 117-137. Academic Press. New York.
- De Robertis y De Robertis H. 1983. *Biología Celular y Molecular*. 10ª ed., Ed. Ateneo. Argentina. 613 pp.
- Faiferman I., Hamilton M.G., Pogo O. 1971. Nucleoplasmic ribonucleoprotein particles of rat liver II. Physical properties and action of dissociating agents. *Biochim. Biophys. Acta* **232**: 685-695.
- Faiferman I., Pogo O.A. 1975. Isolation of a nuclear ribonucleoprotein network that contains heterogeneous RNA and is bound to the nuclear envelope. *Biochem.* **14**(17): 3809-3816.

- Fakan S., Puvion E. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* **65**: 255-299.
- Fakan S., Leser G., Martin T. 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* **98**: 358-363.
- Fakan S., Leser G., Martin T. 1986. Immunoelectron microscope visualization of nuclear ribonucleoprotein antigens within spread transcription complexes. *J. Cell Biol.* **103**: 1153-1157.
- Fawcett D.W. 1966. On the occurrence of fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am. J. Anat.* **119**: 129-146.
- Galli G., Hofstetter H., Stunnenberg H.G., Birnstiel M.L. 1983. *Cell* **34**: 823.
- Hughes A. 1959. *A history of cytology*. Abelard-Schuman. Great Britain. 158 pp.
- Jacob M., Devillers G., Fuchs J.P., Galinaro H., Gattoni R., Judes C., Stevenin J. 1981. Isolation and structure of RNP fibrils containing hnRNA. *The Cell Nucleus*. Ed. Busch H. Vol. VIII. 193-246. Academic Press.
- Jiménez-García L.F. 1985. Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico. Tesis de Maestría. Biología. Fac. Ciencias. UNAM. México.
- Jordan E.G., Cullis C.A. 1982. *The nucleolus*. Cambridge University Press. Great Britain. 218 pp.
- Kaufman S.H., Coffey D., Shaper J.H. 1981. Considerations in the isolation of rat liver, nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* **132**: 105-123.
- Konarska M.M., Sharp P.A. 1987. Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell* **49**: 763-774.
- LeSturgeon W.M., Lobstein L., Walker W.B., Beyer L. 1981. The composition and general topology of RNA and protein in monomer 40S RNP particles. *The Cell Nucleus*. Ed. Busch H. Vol IX. 37-49. Academic Press.
- Lewin B. 1987. *Genes III*. Ed. John Wiley y Sons. USA. 761 pp.
- Maniatis T., Reed R. 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**: 673-677.
- Martin T.E., Pullman J.M., McMullen M.D. 1980. *Cell Biology: a comprehensive treatise*. Ed. Prescott D. M.
- Miller O.L., Beatty B.R. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science*. **164**: 955-957.
- Miller O.L., Bakken A.H. 1972. Morphological studies of transcription. *Endocrinol. Act. Suppl.* **168**: 155-177.
- Miller T.E., Huang Ch., Pogo O. 1978. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing HnRNA. *J. Cell Biol.* **76**: 695-691.
- Monneron A., Moulé Y. 1968. Etude ultrastructurale de particules ribonucleoprotéiques nucléaires isolées à partir du foie de rat. *Exp. Cell Res.* **51**: 531-554.
- Monneron A., Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruc. Res.* **27**: 266-288.

- Moyne G., Puvion E. 1976. Visualiation of transcriptional activity in the cell nucleus. 6th. *Eur. Congress on Electron Microscopy, Jerusalem*. 14-19.
- Newport J., Spann T. 1987. Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48: 219-230.
- Ochs L.R., Lischwe M.A., Spohn W.H., Busch H. 1985. Fibrilarin a new protein of the nucleolus identified by autoimmunesera. *Biol. Cell* 54: 123-134.
- Ortega-Rangel J.A. 1986. Estudio cuantitativo de las partículas ribonucleoproteicas nucleares, durante la diferenciación y maduración de los neuroblastos en la médula espinal del embrión de pollo. Tesis Doctoral. Biología. Fac. Ciencias. UNAM. México.
- Padgett R.A., Konarska M.M., Grabowski P.J., Hardy S.F., Sharp P.A. 1984. Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science*. 225: 898-903.
- Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S., Sharp P.A. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1119-1150.
- Pardoll D.M., Vogelstein B., Coffey D.S. 1980. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell* 19: 527-536.
- Puvion-Dutilleul F., Bernadac A., Puvion E., Bernhard W. 1977. Visualization of two different types of nuclear transcriptional complexes in rat liver cells. *J. Ultrastruc. Res.* 58: 108-117.
- Puvion E., Moyne G. 1978. Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 115: 79-88.
- Puvion-Dutilleul F., Puvion E. 1980. New aspects of intranuclear structures following partial descondensation of chromatin: A cytochemical and high resolution autoradiographical study. *J. Cell Sci.* 42: 305-321.
- Puvion E., Lange M. 1980. Functional significance of perichromatin granule accumulation induced by cadmium chloride in isolated rat liver cells. *Exp. Cell Res.* 128: 47-58.
- Puvion E. 1982. Presence of RNA in the interchromatin granules of cells treated with dichlorobensimidazole riboside (DRB). *Biol. Cell* 43: 147-150.
- Puvion E., Viron A., Assens C., Leduc E.H., Jeanteur P.H. 1984a. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs isolated rat liver cells. *J. Ultrastruc. Res.* 87: 180-189.
- Puvion E., Viron A., Xu X. 1984b. High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB-treated cells. *Exp. Cell Res.* 152: 357-367.
- Reddy R., Henning O., Busch H. 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 60-88.
- Roodyn D. B. 1972. *Subcellular Components: preparation and fractionation*. 2^a. ed., Ed. Birnie G. D. Londres.

- Samarina O.P., Krichevskaya A.A. y Georgiev G.P. 1966. Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid. *Nature*. **210**: 319-322.
- Scheer V., Rose K.M. 1984. Localization of RNA poll in the interphase cell and mitotic chromosome by light and electron microscopy immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 1431-1435.
- Skoglund U., Andersson K., Strandberg B., Daneholt B. 1986. Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. *Nature* **319**: 560-564.
- Smetana K. 1977. Further cytochemical studies on the perichromatin region of the cell nucleus. *Biol. Cell*. **30**(3): 207-210.
- Smetana K. 1979. Perichromatin granules. *The Cell Nucleus*. Ed. Busch H. Vol. VIII. Academic Press. New York. 123-127.
- Spector D.L., Schrier W.H., Busch H. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell* **49**: 1-10.
- Swift H. 1963. Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exp. Cell Res. Suppl.* **9**: 54-67.
- Törö I. Jr., Röhlich P. 1966. A new cytoplasmic component in the trophoblast cells of the rat and mouse. *Anat. Record* **155**: 385-400.
- Vázquez-Nin G.H., Bernhard W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruc. Res.* **36**: 842-860.
- Vázquez-Nin G.H., Chavéz B., Thomas-Martin C. 1973. A preferential method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie* **16**: 243-246.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Molina E. y Fragozo J., 1978. Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta anat.* **102**: 308-318.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M. y Pedrón J., 1979. Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell*. **35**: 221-228.
- Wassef M. 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruc. Res.* **69**: 121-133.
- Watson M.L. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* **14**: 162-167.
- Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steits J.A., Weiner A.M. 1987. *Molecular Biology of the gene*. Vol. I 4^a. ed., Ed. The Benjamin/Commings Publishing Co. Inc. USA. 744 pp.
- Wunderlich F., Giese G., Herlan G. 1984. Thermal down-regulation of exportable rRNA in nuclei. *J. Cell Phys.* **120**: 211-218.