

2 ej 100



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIONES ENTRE LA CROMATINA Y
LOS GRANULOS INTERCROMATINIANOS
ESTUDIADOS EN CORTES SERIADOS**

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

IRMA GRACIELA HERNANDEZ PEREZ



México, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | |
|--------------------------|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Objetivo | 11 |
| Material y Metodos | 12 |
| Resultados | 16 |
| Discusión | 33 |
| Conclusiones | 37 |
| Bibliografía | 38 |

RESUMEN

1

Previamente se ha encontrado que hay una relación espacial entre algunas de las ribonucleoproteínas intranucleares y la cromatina; sin embargo, no se conoce algún tipo de cromatina que se asocie a los gránulos intercromatinianos (GIC). En este trabajo se estudió con más detalle la relación entre ambos componentes por medio de técnicas citoquímicas ultraestructurales.

Se estudiaron hepatocitos de rata interfásicos de rata normal adulta. Las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica y los cortes seriados fueron contrastados alternadamente para ribonucleoproteínas (RNPs) de acuerdo con Bernhard (1969) o para cromatina de acuerdo con Esquivel y col. (1987).

Los acúmulos de GIC son continuos en 3 a 12 cortes y su tamaño promedio corresponde a dos poblaciones que son significativamente diferentes.

Estos acúmulos de GIC muestran la presencia de cromatina laxa en su interior. Además no se observó una asociación directa entre el nucleolo y los acúmulos de GIC, lo que sugiere un origen no nucleolar para estas estructuras. No obstante, se observó también un grado moderado de asociación entre los acúmulos de GIC y la región pericromatiniana, en la cual tiene lugar predominantemente la transcripción del RNA extranucleolar.

INTRODUCCION

Las preocupaciones del hombre por el conocimiento científico y su afán por indagar la organización estructural básica de la célula, lo condujeron al perfeccionamiento de los sistemas ópticos del microscopio durante el siglo pasado.

Es así como Robert Brown llegó al descubrimiento del núcleo celular en 1830. Otro resultado fue la formulación de la teoría celular, realizada por Schwann y Schleiden en 1838, misma que sirvió de base para descubrir que los seres vivos están formados por células nucleadas y que la célula es la unidad funcional de los organismos.

Posteriormente, en 1855 Virchow desarrolló el siguiente principio: "Todas las células derivan de células preexistentes".

Más tarde, el desarrollo de métodos de tinción, aislamiento y análisis de productos nucleares hizo posible que Miescher en 1871 descubriera el DNA en núcleos de mamíferos. En 1942 Brachet demostró que el RNA se concentraba en el nucleolo y citoplasma. Los avances posteriores en el conocimiento del núcleo y elementos que lo constituyen se han llevado a cabo en virtud del desarrollo y perfeccionamiento de técnicas en el campo de la microscopía electrónica en correlación con estudios citoquímicos.

Actualmente, uno de los aspectos fundamentales de la investigación del núcleo se centra en el entendimiento de su ultraestructura en interfase, período durante el cual se produce la duplicación del DNA, la transcripción del RNA y la síntesis de proteínas.

El estudio precursor que sentó las bases del conocimiento sobre la distribución y estructura fina de los diversos componentes que contienen ribonucleoproteínas, fue realizado por Monneron y Bernhard en 1969 en el núcleo interfásico de células de mamíferos, utilizando el método de tinción preferencial (Bernhard, 1969). Esta técnica se basa en el uso de agentes quelantes

que blanquean la cromatina y contrastan las estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) intranucleares, como gránulos pericromatinianos, intercromatinianos, fibras peri e intercromatinianas y cuerpos espiralados (Fig. 1). De este trabajo se han desprendido innumerables investigaciones que correlacionan estudios citoquímicos, autorradiográficos y de inmuno marcado que sugieren la posible participación de estos elementos nucleares en procesos de transporte, almacén y procesamiento postranscripcional de los RNAs.

Dado que la morfología del núcleo presenta un patrón de distribución de sus componentes, en las células de mamíferos es posible establecer y evaluar por medio de estudios indirectos, patrones de disposición de la cromatina en el núcleo interfásico (Esquivel C. y col. 1989), así como también realizar estudios comparativos de la ultraestructura a diferentes niveles de organización en los animales (Jiménez García, 1985). En este trabajo se pretende abordar aspectos morfológicos que permitan esclarecer las relaciones entre los gránulos intercromatinianos (GIC) y la cromatina del núcleo.

A continuación se describirá un panorama general de los componentes del núcleo en interfase:

Envoltura Nuclear.- Característica de células eucariontes, fue descrita por Callan y Tomlin en 1950 como un sistema de dos membranas con un espacio entre ellas de 20 a 40 nm de espesor; la membrana en algunos casos es continua con los canales y cisternas del retículo endoplásmico y frecuentemente está cubierta por ribosomas, mientras que la cara interna está en contacto con la lamina densa. Presenta complejos de poro, constituídos por ocho gránulos proteicos que forman un anillo y un gránulo central. Stevens y Swift en 1966 comunicaron el paso de partículas de ribonucleoproteínas (RNP) en configuraciones alargadas a través de los poros. La envoltura nuclear aísla los procesos centrales de replicación de DNA y síntesis de RNA de los ribosomas citoplásmicos, donde el mensaje genético es traducido en proteínas (Alberts B. y col. 1983).

Lamina Densa.- Fue descrita por primera vez por Fawcett en 1966 en núcleos de vertebrados. Se localiza adyacente a la membrana interna de la envoltura

nuclear y a la cromatina compacta de la periferia. Es una red fibrilar proteica cuyo espesor varía entre 15 y 80 nm (Busch H. 1983). Se piensa que tiene un papel estructural de soporte y forma dentro del núcleo.

Cromatina.- Es el término designado por Flemming en 1882, al material del núcleo celular que toma tinciones básicas. Kossel en 1884, descubrió las histonas observando que estas proteínas básicas están unidas al DNA de la cromatina. Años más tarde, Mirsky A. y Ris H. (1951), descubrieron otro tipo de proteínas no histónicas también unidas al DNA. La cromatina es un complejo de desoxirribonucleoproteína (DNP), que forma una estructura llamada nucleosoma, la cual constituye la unidad básica de la estructura del cromosoma (Comings 1972).

La variedad de métodos de tinción selectivos para ácidos nucleicos o cromatina, van desde métodos para microscopía de luz como la reacción de Feulgen, hasta tinciones con técnicas para microscopía electrónica como los métodos de contraste específico para cromatina, obtenidos por Gautier (1970); Peters (1971) y Moyne (1972). Otro método de contraste preferencial para desoxirribonucleoproteínas (DNP) en estado compacto y extendido, es el que se basa en el uso de Acido Fosfotungstico (PTA), mismo que fue desarrollado por Vázquez-Nin y col. en 1973. En el mismo año, Cogliati y Gautier proponen la utilización de una amina de osmio para dar una reacción de tipo Feulgen para DNA y polisacáridos. Todos estos estudios han permitido visualizar la localización de la cromatina en el núcleo.

Se ha postulado que la cromatina laxa o usualmente referida como euromatina expresa el estado morfológicamente activo del DNA en la transcripción y la cromatina compacta o heterocromatina representa el estado inactivo. En recientes estudios se ha confirmado que la euromatina de la región pericromatina, es a partir de la cual se transcriben los RNAs asociados a las fibras pericromatinianas (Derenzini M. y col. 1978).

Fibras Pericromatinianas (FPC).- Monneron y Bernhard en 1969 las describieron como estructuras de 3 a 5 nm de diámetro y naturaleza ribonucleoprotéica. Se localizan en zonas adyacentes a la cromatina condensada. Los experimentos

de Petrov y Bernhard (1971) demostraron que las fibras incrementan en número después de estimular la transcripción de Cortisol en hepatocitos de rata. Sin embargo, en el mismo año se obtuvieron efectos contrarios al utilizar α -amanitina, droga que inhibe la síntesis de RNA extranucleolar, donde no se observaron FPC (Petrov y Sekeris, 1971). El efecto inhibitorio que produce el DRB sobre la síntesis del RNA heterogéneo nuclear, demostró que las fibras decrecen en número, lo que sugiere que estas estructuras sean el sustrato morfológico del hnRNA.

La naturaleza de las FPC se ha estudiado en técnicas citoquímicas combinadas con autoradiografía ultraestructural después de la incorporación con ^3H -uridina, lo que permite una mejor localización de los sitios de transcripción del RNA (Fakan y Bernhard, 1971). Bachelierie y col. (1975) por medio de estudios bioquímicos y ultraestructurales mostraron que las FPC contienen hnRNA recién sintetizado. Posteriores estudios comprobaron que la incorporación de la ^3H -uridina coincide con los sitios de las fibras pericromatinianas y que la gran mayoría de este marcado está representado por cadenas crecientes de pre-mRNA o hnRNA (Moyné y Puvion, 1976; Fakan y col. 1976; Puvion y col., 1978).

Fibras Intercromatinianas (FIC).- Se ha observado que aparecen en el espacio intercromatiniano como resultado de la migración de las fibras formadas en las áreas pericromatinianas (Nash y col., 1975; Puvion y Moyné, 1978); también se sugiere que su RNA es procesado durante este período (Fakan y col., 1976).

Gránulos Pericromatinianos (GPC).- Fueron descritos por Swift en 1962 y por Watson en el mismo año. Usualmente se localizan en la periferia de los grumos de cromatina compacta y la mayoría de las veces se encuentra rodeado por un halo claro que lo separa de ésta. El diámetro del gránulo varía entre 350 y 600 A° y la periferia del halo es de casi 250 A° de grosor. La subestructura del gránulo muestra que está formado por fibras de 30 A° de grosor densamente empaquetadas (Monneron y Bernhard, 1969). La naturaleza ribonucleoprotéica de los gránulos se comprobó por medio de digestiones enzimáticas en combinación con la técnica del EDTA (Bernhard, 1969). Se ha

observado que los GPC son capaces de desintegrarse en forma de fibras y migrar del núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares (Monneron y Bernhard, 1969).

Se les ha asignado un papel importante en el almacenamiento y/o transporte de los RNA mensajeros o premensajeros (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). El estudio que apoya esta hipótesis fue desarrollado por Moyne y Puvion (1976), utilizando Cordicepina como inhibidor parcial del RNA mensajero, se observó un incremento en el número de GPC. Otro estudio describió que la cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas, produce un incremento en el número de GPC (Daskal I. y col., 1975), aunque también, Vázquez-Nin y col. (1978,79), observaron un efecto muy claro de la acción del estradiol en la transcripción y/o transporte del RNA, efectos que se correlacionan con las variaciones en número y tamaño de los GPC.

Gránulos Intercromatinianos (GIC).- Fueron descritos por primera vez por Swift en 1959. Posteriormente su composición ribonucleoproteica (RNP), fue sugerida por Monneron y Bernhard (1969). Tienen un diámetro de 200 a 250 Å, aparecen como acúmulos de partículas que se interconectan por medio de fibras delgadas (Puvion y Bernhard, 1975; Wassef, 1979). La disposición de acúmulos ha sido observada en todas las células de vertebrados (Jiménez García y col., 1989).

Los estudios citoquímicos comprobaron la resistencia de los GIC a la pronasa seguida de la RNasa, así como también se comprobó que son altamente contrastados por el método de Bernhard (1969), preferencial para ribonucleoproteínas. Esto sugiere que los GIC contienen un RNA bien protegido por un fuerte y resistente componente protéico. Posteriormente Wassef en 1979 mostró histoquímicamente que los gránulos contienen una gran cantidad de fosfoproteínas.

Debido a que la función de los GIC es aún poco clara, se han derivado innumerables estudios que pretenden esclarecer dicho problema. Fakan y Bernhard en 1973, usando autorradiografía ultraestructural combinada con el método de Bernhard (EDTA), demostraron que hay una preferencial incorporación

de ³H-uridina en la periferia de la mayoría de los acúmulos de GIC, por lo que la sugerencia original de que estas estructuras contienen un RNA ligeramente marcado parece ser confirmada con estos experimentos.

Varios investigadores han especulado que los GIC pueden jugar un papel en la síntesis o transporte de ribosomas en el núcleo (Bouteille y col., 1974; Fakan y Puvion, 1980).

El análogo de la adenosina, ribosido de diclorobenzimidazol (DRB), el cual inhibe la síntesis de RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), induce en las células de hígado de rata una considerable acumulación de GIC simultáneamente con la desaparición de la mayoría de las fibras ribonucleoproteicas (Puvion y col., 1979).

Puvion en 1982 y posteriormente en 1984, al estudiar autorradiografía ultraestructural en células tratadas con DRB, demostró que la droga induce en los gránulos intercromatinianos la acumulación de moléculas de RNA sintetizados en otro lugar del núcleo; asimismo, comprobó que la actinomomicina-D, que inhibe la síntesis de RNA ribosomal, evita el marcado de los GIC después de subsecuentes tratamientos con DRB, sugiriendo por lo tanto que los gránulos contenían moléculas de RNA ribosomal, además de observar claramente que los acúmulos de GIC aparecen en contacto con los gránulos nucleolares de los cuales parecen derivar. Otro estudio demostró que los gránulos intercromatinianos son completamente diferentes del componente granular del nucleolo (Takeuchi y col., 1984).

Recientes estudios han mostrado que estas estructuras contienen RNA mensajero inmaduro o heterogéneo nuclear (pre-mRNA o hnRNA) y que están asociados con RNAs intranucleares de tamaño pequeño, ricos en residuos de uridina (UsnRNA) (Spector y col., 1983; Fakan y col., 1984), las cuales han sido implicadas en el procesamiento (Lener, 1980; Rogers, 1980), en el transporte de hnRNA (Prestayko, 1970) o posiblemente un papel estructural en la arquitectura nuclear (Fakan y col., 1984).

Cuerpos Espiralados (CE).- Fueron vistos por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969, como estructuras que forman un agregado más o menos esférico

co de 0.3-0.5 μ m de diámetro, en áreas intercromatinianas. Estan compuestos por fibras de 40 a 60 nm de grosor que se enrollan a un eje. Aparecen como entidades morfológicamente distintas de los otros elementos estructurales del núcleo. Muestran positividad con la técnica de contraste preferencial para RNPs del uranilo-EDTA-plomo y la RNasa seguida de pronasa los digiere parcialmente, por lo que se han considerado como elementos que contienen ribonucleoproteína. No se conoce su función, ni se ha determinado si su presencia es constante en todos los organismos.

Matriz Nuclear.- Consiste de fibras de 50 a 60 A^o de grosor que forman una red proteica y contiene además un poco de DNA, RNA, carbohidratos y fosfolípidos (Berezney y col., 1977). Se le ha considerado como material nuclear residual que se obtiene después de un tratamiento con altas concentraciones de sal y digestión con nucleasa. Los núcleos desprovistos de cromatina y nucleoplasma contienen lamina densa y proteínas del complejo de poro, residuos de nucleolo y una red interna proteica que conecta a estos elementos. La presencia de ribonucleoproteínas (RNPs) unidas a la matriz ha sido descrita por Faiferman y col., (1975); Mcknight y col., (1976). Otras investigaciones han descrito la presencia de ribonucleoproteínas de tamaño pequeño (snRNPs) asociadas a la matriz nuclear (Deimel y col., 1977; Northeman, 1977; Miller y col., 1978a, 1978b).

Se le ha asignado un papel importante en la regulación e integración estructural de los procesos nucleares (Berezney, 1979). Estructuras semejantes en tamaño y densidad a los gránulos intercromatinianos se han localizado en la red proteica (Hancock y col., 1982; Spector y col., 1983).

Nucleolo.- Fontana en 1781 lo describió como una "mancha". Representa uno de los sitios más activos de síntesis de RNA en la célula y contiene los genes de DNA ribosomal (rdNA) en los que está codificado el RNA ribosomal. El RNA ribosomal se sintetiza en forma de precursor inmaduro o pre-rRNA, 45S en los mamíferos (Bernhard, 1970).

El nucleolo está constituido principalmente por las siguientes regiones:

a) región granular; compuesta por gránulos de 150 a 250 A° de diámetro, contiene proteínas como la B23, ribocarina, proteínas L-r y s-r, participa en el procesamiento y maduración de pre-ribosomas, formación de subunidades grande (L) y pequeña (s), almacén y estructura; b) región fibrilar densa: compuesta por fibras de 40 a 80 A° de espesor, está constituida por las proteínas B23, C23, fibrilarina p180, 45S, juega un importante papel en la transcripción del rDNA y procesamiento temprano del pre-rRNA; c) región fibrogranular: formada por fibras de 40 a 80 A° de espesor y de 200 a 400 A° de largo, los gránulos miden de 150 a 200 A° de diámetro, contiene proteínas C23 y fibrilarina, participa en el procesamiento y estructura; d) centro fibrilar: constituido por fibras de 50 A° de grosor, contiene proteínas C23, fibrilarina, RNA pol.I y rDNA, establece el ensamble y desensamble de cromatina nucleolar. La transcripción no se ha determinado en esta región (Jiménez García, 1988).

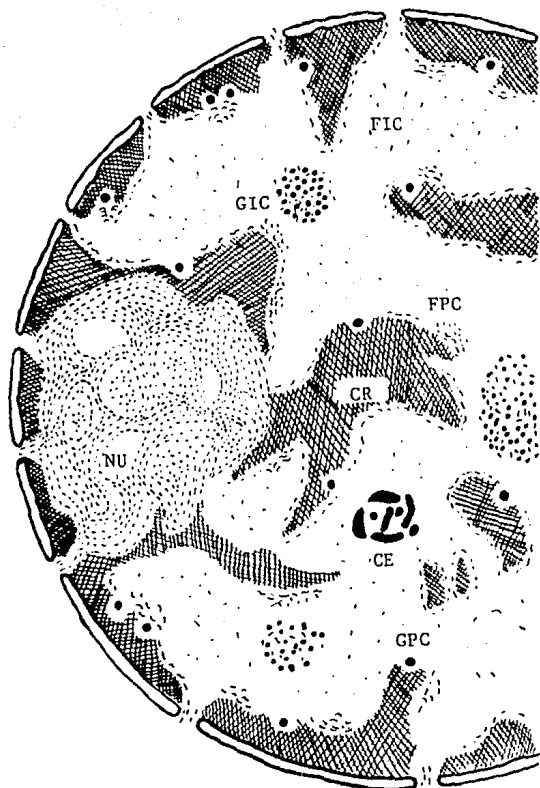


Fig. 1 Esquema del núcleo celular interfásico de hígado de rata, que muestra las partículas ribonucleoproteicas. GPC: gránulos pericromatinianos; GIC: gránulos intercromatinianos; FPC: fibras pericromatinianas; FIC: fibras intercromatinianas; CE: cuerpos espiralados; NU: nucleolo; CR: cromatina. (Monneron y Bernhard, 1969).

OBJETIVO

Caracterizar las relaciones entre la cromatina y los gránulos intercromatinianos en cortes seriados implementando métodos de tinción alterna, uno para cromatina y otro para ribonucleoproteínas.

MATERIAL Y METODOS

Fragmentos de hígado de rata fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.2M a pH 7.2 durante 90 min. Posteriormente se lavaron durante 30 min., haciendo cambios cada 5 min. con una solución isotónica de sacarosa o con HCl 0.2M a pH 2.1 y 2.3, ajustando el pH con NaOH 0.2M. La tinción en bloque preferencial para cromatina fue realizada con ácido fosfotungstico (PTA) durante una hora (Esquivel C. y col., 1987). De la solución madre de PTA se tomó una alícuota que se ajustó a pH 2.1 y 2.3 con NaOH 0.2M. Inmediatamente se procedió a la deshidratación en una serie de alcoholes etílicos graduales de 70%, 80% y 96% con dos cambios de 10 min. cada uno y alcohol de 100% con tres cambios de 15 min. cada uno. Después se realizaron tres cambios de 20 min. cada uno con óxido de propileno como agente intermedio.

La preinclusión se llevó a cabo con una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica (Glycide ether 100, Merk), en proporción 1:1 durante 18 hrs. a temperatura ambiente. Directamente de este paso se incluyeron las muestras en la resina, que polimerizó durante 24 hrs. en una estufa a 60°C. (Diagrama)

En un ultramicrotomo MT2 Sorvall se obtuvieron cortes seriados de aproximadamente 90 nm de grosor, los que se recogieron en anillos de Sjöstrand y se depositaron sobre membranas de formvar. Series de 12 cortes fueron colocados en cada anillo.

Posteriormente se realizó una tinción con acetato de uranilo al 3% durante 20 o 30 seg. a temperatura ambiente.

En los cortes impares fueron fotografiados algunos núcleos e identificados con una inicial (A, B, C, . . . N). En total 14 núcleos fueron estudiados, 6 de la primera serie y 8 de la segunda. Estas micrografías electrónicas se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión EM 10 (Carl Zeiss) a 10 000 aumentos utilizando un voltaje de 60 kv.

Métodos de contraste para ribonucleoproteínas:

a) En la primera serie se aplicó un pretratamiento con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) durante 30 min. Posteriormente se utilizó el método preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), que consistió de un contraste con acetato de uranilo al 3% por 3 min., seguido de la solución de EDTA durante 20 min. y finalmente citrato de plomo a temperatura ambiente por 10 min.

b) La segunda serie también fue pretratada con EDTA por 30 min. El contraste para RNPs se llevó a cabo con la técnica de contraste general que consistió de acetato de uranilo al 3% a 37°C durante 45 min. y citrato de plomo a temperatura ambiente por 10 min.

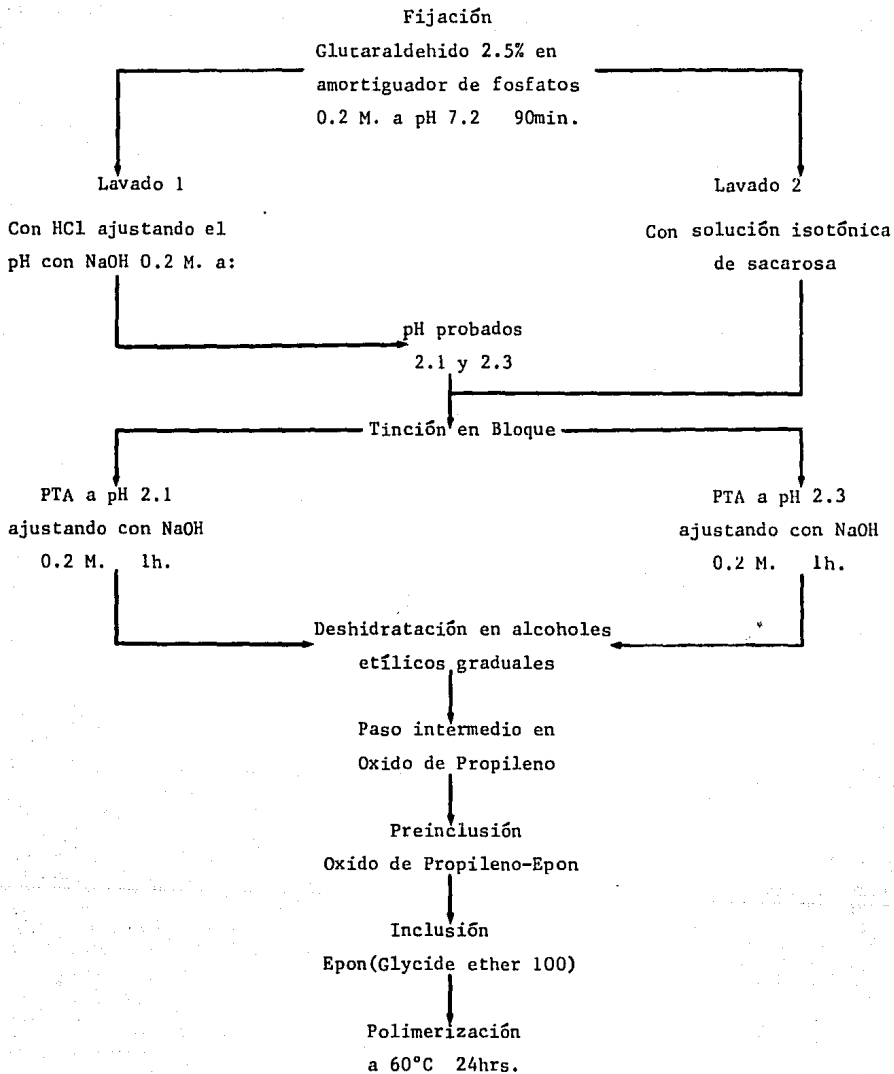
En seguida se obtuvieron las micrografías de los núcleos A, B, C, . . . N en los cortes pares, bajo las mismas condiciones y aumentos.

De esta forma se obtuvieron reconstrucciones parciales de cada núcleo, que consistieron de 12 cortes cada una. En ellas fueron analizadas las fotografías de cortes contrastados con EDTA para seleccionar los acúmulos de gránulos inter cromatinianos (GIC) continuos en dos o más cortes. Sobre esas micrografías se delimitaron los acúmulos de GIC y se hicieron esquemas en papel celofán. En cada núcleo los acúmulos fueron identificados con números romanos.

Posteriormente los esquemas fueron superpuestos sobre las fotografías de sus correspondientes núcleos teñidos con PTA. El análisis de estos núcleos se basa principalmente en la determinación de las características de la cromatina que se encuentra en el interior del acúmulo y la que está en contacto con la periferia del mismo. Estas observaciones estuvieron sujetas a una evaluación cuantitativa, interpretándose los datos estadísticamente.

El volumen de los acúmulos de GIC fue calculado de acuerdo a un programa diseñado por el Dr. Vázquez-Nin en una microcomputadora Franklin ACE 1200,

con un sistema de procesamiento de imagen. Una vez localizados los acúmulos continuos en 3 a 12 cortes, se seleccionaron las micrografías electrónicas midiéndose su periferia con una plumilla sobre la tableta digitalizadora, el volumen total del acúmulo se expresó en μm^3 . Los datos fueron manejados estadísticamente, calculándose el valor promedio (\bar{X}), desviación standard (D.E.) e histogramas de frecuencia.



TECNICA PTA-EPON

RESULTADOS

La técnica de PTA-EPON, dió buenos resultados en cuanto a la tinción del PTA y obtención de cortes seriados. Los mejores resultados de contraste del PTA se obtuvieron a pH 2.3 y reforzando la tinción con acetato de uranilo durante 20 o 30 seg., esta prueba permitió una mayor definición de la cromatina.

En cuanto a la técnica del EDTA, el método b) mostró acúmulos de gránulos intercromatinianos (GIC) fuertemente contrastados aún cuando la cromatina no fue totalmente blanqueada.

En la figura 2 se muestran cortes adyacentes de un núcleo de hepatocito de rata con las técnicas alternadas de contraste, una preferencial para cromatina y otra para ribonucleoproteínas.

El análisis de las micrografías electrónicas de los núcleos seriados y contrastados alternadamente con EDTA mostraron la presencia de acúmulos de GIC continuos en 3 a 12 cortes. En la figura 3a y 3b se ilustra la continuidad de los acúmulos. El análisis cuantitativo de estas observaciones determinó la existencia de 122 acúmulos de diversos tamaños en los 14 núcleos. El número de acúmulos y distribución de tamaños fueron calculados estadísticamente (Gráfica 1) observándose una frecuencia mayor de acúmulos pequeños (47%) en comparación a los grandes (4%); es notable que la frecuencia decrece al incrementarse el tamaño.

Para el estudio de la cromatina se estudiaron las secciones de los acúmulos teñidos con PTA, obteniendo un total de 226 secciones de éstos. En la tabla 1 se resumen estos datos.

Se observó que de las 226 secciones, 16 muestran cromatina compacta en su interior (Fig. 4, B-2), 71 cromatina extendida (filamentos delgados, Fig. 4, A-2) y 30 semicondensada (cromatina ligeramente condensada, Fig. 5, C-2). En 9 se presentó a la vez cromatina compacta y semicondensada, en 17 cromatina compacta y extendida y en 35 semicondensada y extendida. En 48 secciones no

se definió cromatina (Tabla 2). El análisis cuantitativo más detallado de estos datos se representan en la gráfica 2, y en la que se observa una mayor frecuencia de cromatina extendida en el interior del acúmulo (31%) en comparación con una pequeña frecuencia relativa de acúmulos con cromatina condensada (7%).

Con el propósito de evaluar una relación entre la periferia del acúmulo y la cromatina que rodea a éste, se analizaron las 226 secciones y se encontró que en ellas existen 66 contactos con cromatina compacta, 136 están en el espacio intercromatiniano en contacto con cromatina extendida, 17 con la semicondensada y 7 con la perinucleolar (Tabla 3). La frecuencia relativa de esta relación fue calculada (Gráfica 3). Se observa una significativa asociación con cromatina extendida (60%); la cromatina perinucleolar presenta una baja frecuencia (3%). Estos resultados indican que los acúmulos de GIC no son sitios de exclusión sino que mantienen una estrecha relación con la cromatina.

Los resultados del volumen promedio de los acúmulos de GIC se presentan en la tabla 4. Gráficamente estos datos muestran que no hay diferencias significativas entre los acúmulos de 3, 5, 7 y 9 cortes; sin embargo, si existen diferencias entre los acúmulos que corresponden a 3 y 11 cortes (Gráfica 4).

Fig. 2. Núcleo de hepatocito de rata en cortes adyacentes. A) Tinción en PTA a pH 2.3 por 1 hr. Se observa cromatina compacta altamente contrastada (C); cromatina extendida en el espacio intercromatiniano (E); nucleolo (NU). B) Corte adyacente del mismo núcleo, contrastado por el Método de Bernhard después de un pretratamiento con EDTA. Cromatina compacta desteñida (C); acúmulos de gránulos intercromatinianos densamente contrastados (GIC); nucleolo (NU). (X 20 000).

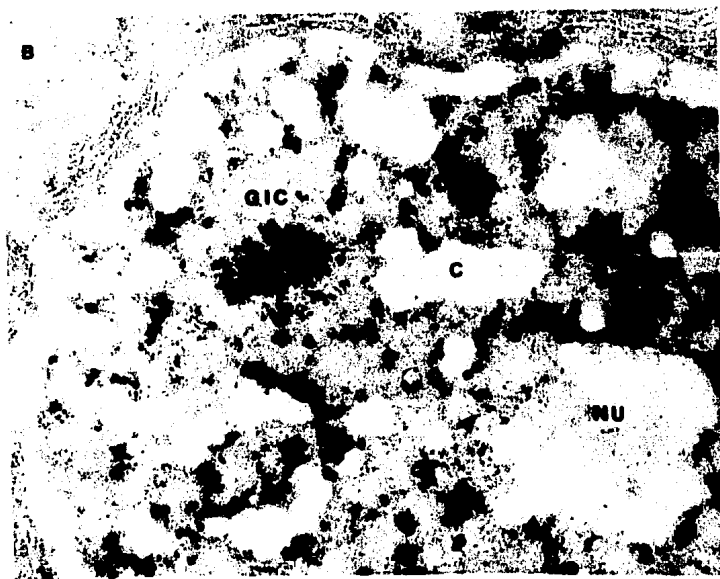
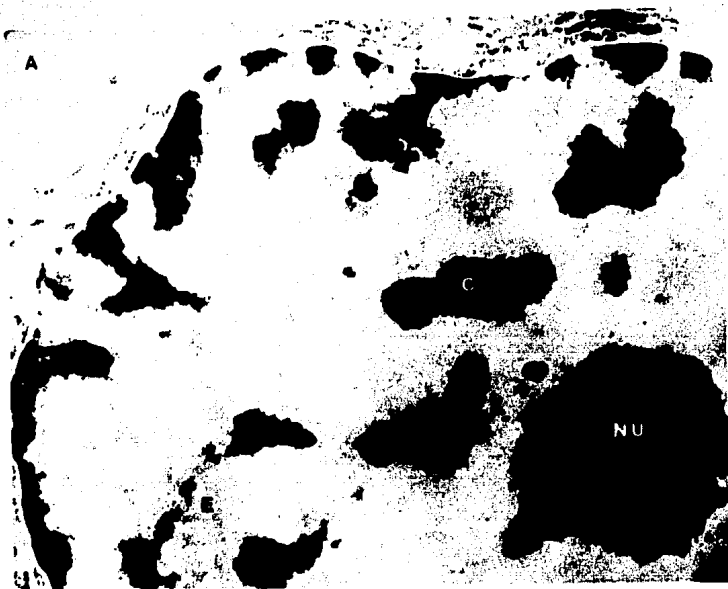


Fig. 2

| No. de Corte | ACUMULOS | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----------|----|-----|----|---|----|-----|------|----|---|----|-----|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
| H ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| H ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| H ₄ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| H ₅ | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| H ₆ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| H ₇ | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| H ₈ | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| H ₉ | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| H ₁₀ | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H ₁₁ | | | | 0 | | | | | | 0 | 0 | 0 |
| H ₁₂ | | | | 0 | | | | | | 0 | 0 | 0 |

| No. de Corte | ACUMULOS | | | | | | | | |
|-----------------|----------|----|-----|----|---|----|-----|------|----|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX |
| L ₂ | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| L ₃ | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| L ₄ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| L ₅ | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| L ₆ | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| L ₇ | | | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | |
| L ₈ | | | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| L ₉ | | | | 0 | | | 0 | 0 | 0 |
| L ₁₀ | | | | 0 | | | 0 | 0 | 0 |

Fig. 3a Cuadros que ilustran el tamaño de los acúmulos de GIC en los cortes seriados de núcleos. La inicial con número indica el nombre del núcleo y número de corte, cada número romano representa un acúmulo de GIC; (0): presencia de GIC.

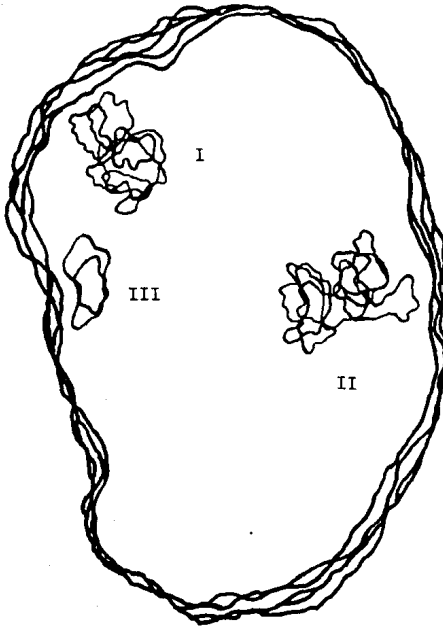
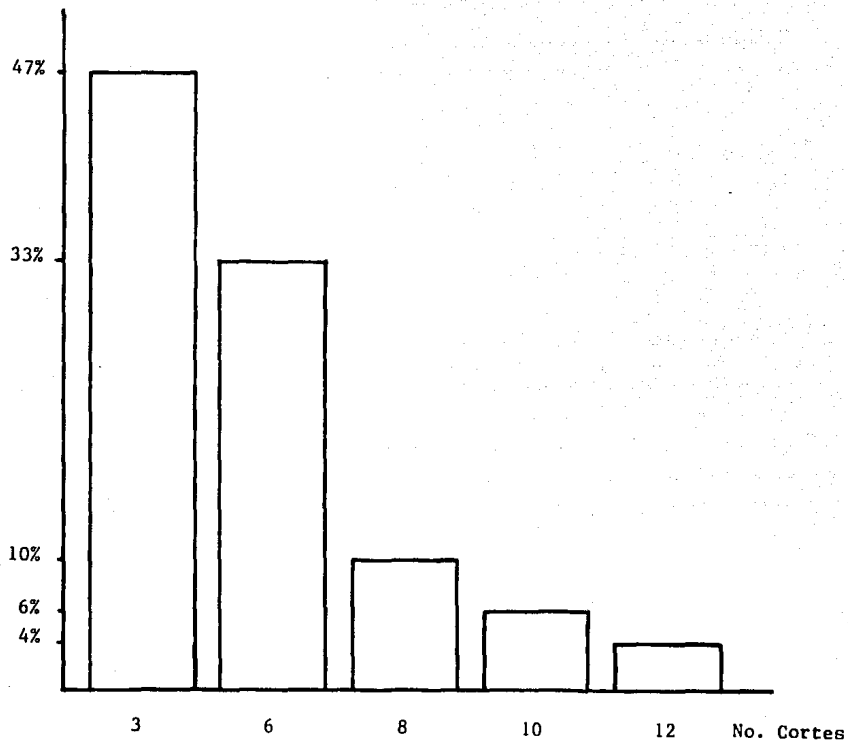


Fig. 3b Esquema que ilustra la continuidad de 3 acumulos de GIC en cortes alternos de un núcleo de hepatocito de rata. La continuidad del acumulo III ocurre en 2 cortes; los acumulos I y II son continuos en 5 cortes.



Gráfica 1. Histograma que representa el tamaño de los acúmulos de GIC en los 14 núcleos estudiados. Se observa que la frecuencia de los acúmulos pequeños (3 cortes) es mayor, en comparación a los acúmulos grandes. Ordenada: frecuencia relativa en porcentaje, abscisa: número de cortes en los que se encuentra el acúmulo.

| NUCLEO | No. DE ACUMULOS PRESENTES | SECCIONES DE ACUMULOS ESTUDIADAS |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|
| A | 6 | 8 |
| B | 12 | 22 |
| C | 7 | 10 |
| D | 14 | 15 |
| E | 10 | 30 |
| F | 9 | 16 |
| G | 10 | 20 |
| H | 12 | 25 |
| I | 4 | 7 |
| J | 9 | 17 |
| K | 6 | 7 |
| L | 9 | 17 |
| M | 6 | 15 |
| N | 8 | 17 |
| TOTAL | 122 | 226 |

Tabla 1. Muestra el número de acúmulos de GIC presentes en los cortes seriados de cada núcleo y el número de secciones analizadas en estos. En los 14 núcleos estudiados se identificaron 122 acúmulos continuos y 226 secciones de ellos.

Fig. 4 Cortes seriados de hepatocitos de rata con la técnica de contraste al terno. Los cortes tratados con EDTA (Fig. A1 y A3), muestran un acúmulo de gránulos intercromatinianos (gic) continuo; en A2 se obser va que en el interior del acúmulo hay cromatina extendida (e); un gru mo de cromatina condensada (c) está cercano al acúmulo. La serie B muestra otro acúmulo de gic continuo (Fig. B1 y B3), en cuyo interior hay dos grupos de cromatina compacta (c); cromatina perinucleolar (p). (X 24 900).

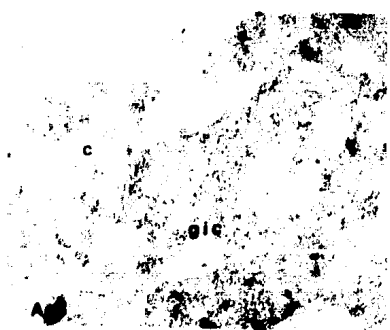
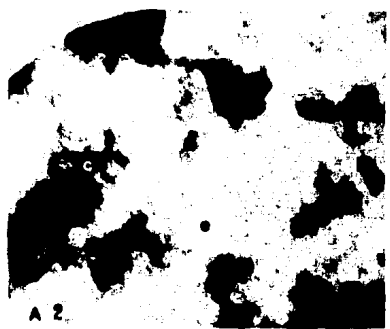
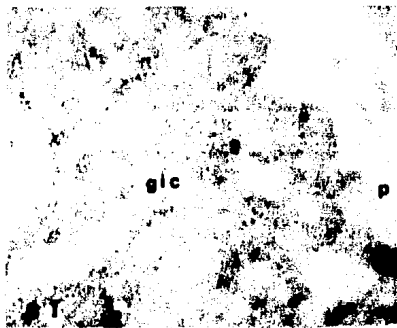


Fig.4

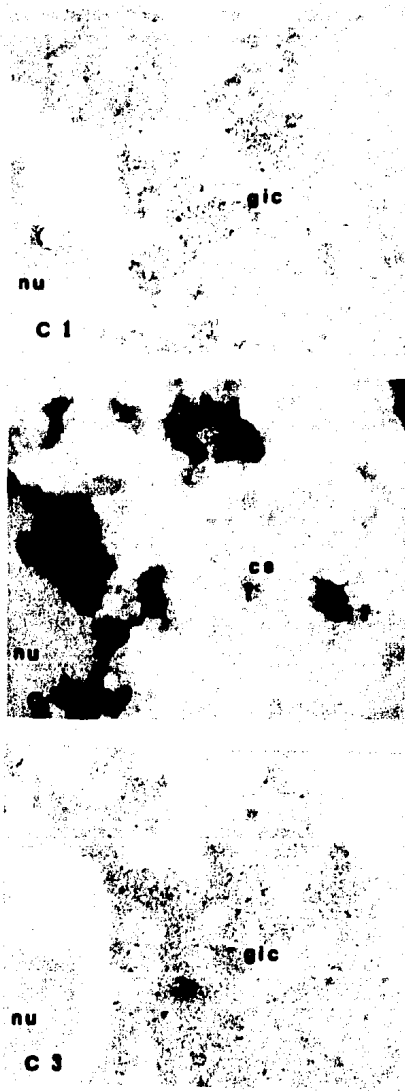


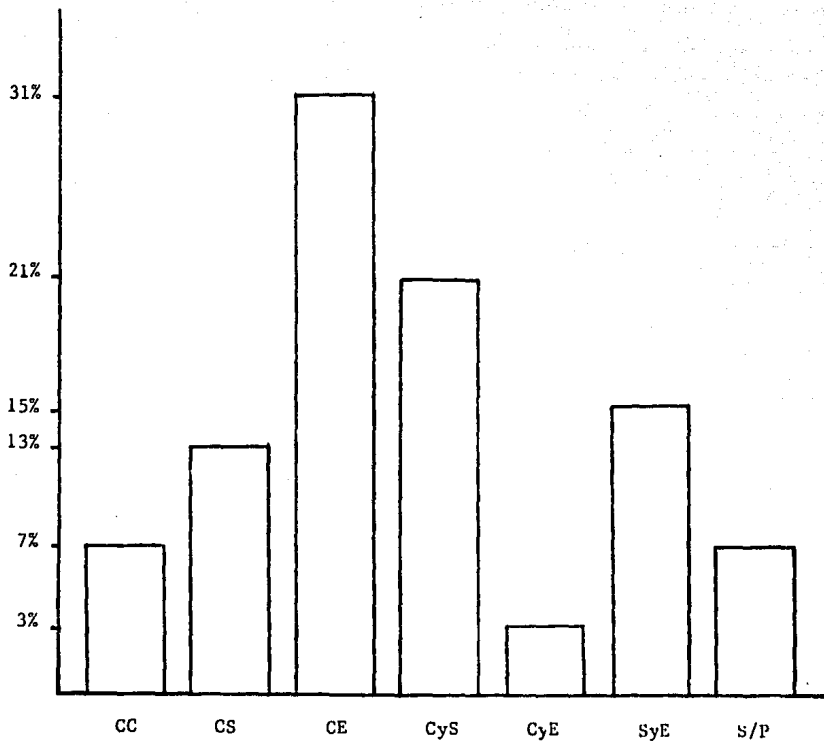
Fig. 5

| No. DE SECCIONES DE ACUMULOS | PRESENTAN | TIPO DE CROMATINA |
|------------------------------|-----------|----------------------------|
| 16 | " | Compacta |
| 30 | " | Semicondensada |
| 71 | " | Extendida |
| 9 | " | Compacta y Semicondensada |
| 17 | " | Compacta y Extendida |
| 35 | " | Semicondensada y Extendida |
| 48 | " | S/Particularidades |
| 226 | | TOTAL |

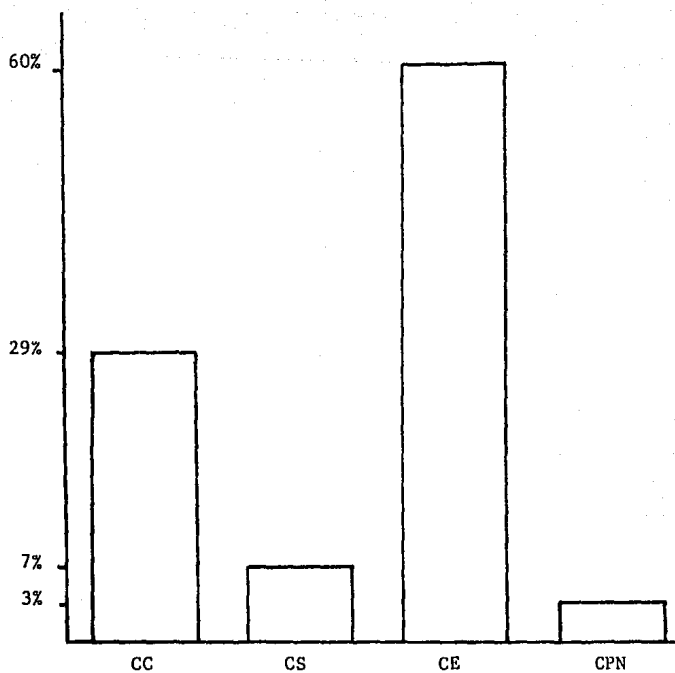
Tabla 2. Tipos de Cromatina Interna en los acúmulos.

| No. DE SECCIONES DE ACUMULOS | EN CONTACTO CON | CROMATINA PERIFERICA |
|------------------------------|-----------------|----------------------|
| 66 | " | Compacta |
| 17 | " | Semicondensada |
| 136 | " | Extendida |
| 7 | " | Perinucleolar |
| 226 | | TOTAL |

Tabla 3. Tipos de Cromatina Periférica que se asocia a los acúmulos de GIC.



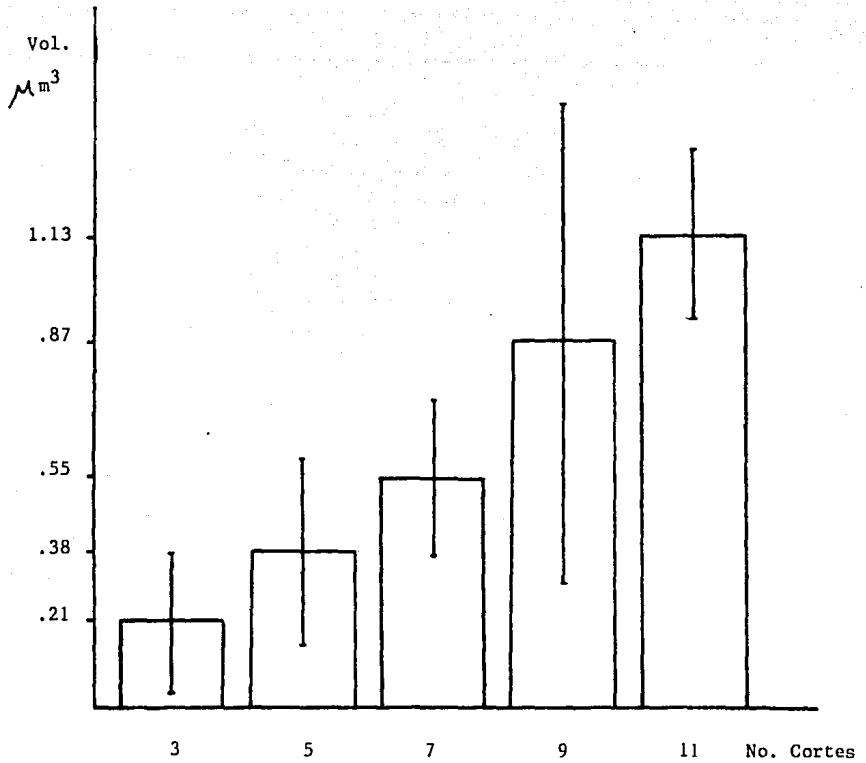
Gráfica 2. Histograma donde se observa un mayor porcentaje de cromatina extendida (31%), en el interior de las secciones de GIC, en comparación con cromatina compacta (7%) y semicondensada (13%). También se observó un alto porcentaje (21%) en secciones donde no quedo definida la cromatina (S/P).



Gráfica 3. La cromatina periférica mostró un patrón similar al anterior, ya que se obtuvo un alto porcentaje de cromatina extendida (60%), seguido de un 29% de cromatina compacta (CC), un 7% de semicondensada (CS) y finalmente un porcentaje bajo de cromatina perinucleolar (CPN).

| TAMAÑO DEL ACUMULO DE GIC | VOLUMEN (μm^3) | |
|------------------------------|-----------------------------|-------------|
| | \bar{x} | + - D.E. |
| Cortes 3 | 0.21 | + 0.17 |
| Cortes 5 | 0.38 | + 0.23 |
| Cortes 7 | 0.55 | + 0.19 |
| Cortes 9 | 0.87 | + 0.58 |
| Cortes 11 | 1.13 | + 0.2 |

Tabla 4. Volumen promedio y desviación standard calculado para las diferentes categorías de tamaño de los acúmulos intercromatinianos (GIC)



Gráfica 4. Histograma que representa el volumen promedio de los acúmulos de GIC para las diferentes categorías de tamaño. Hay diferencias significativas entre los acúmulos de 3 y 12 cortes.

DISCUSION

En este trabajo se demostró por primera vez que los acúmulos de gránulos intercromatinianos en hepatocitos de rata normal, están asociados en su interior con cromatina laxa, lo que confirma los primeros estudios de Fakan y Bernhard (1973), sobre el metabolismo del RNA extranucleolar.

Los resultados mostraron que los acúmulos de GIC se asocian a diversos tipos de cromatina tanto en su interior como en su periferia, lo que sugiere que los acúmulos no son sitios de exclusión, sino que mantienen una estrecha relación con la cromatina (Tabla 2 y 3).

Varios autores por medio de autorradiografía ultraestructural en combinación con la técnica preferencial para RNP a base del EDTA, demostraron que la incorporación de ^3H -uridina se encontró específicamente en los bordes de cromatina compacta o región pericromatiniana (Fakan y Bernhard, 1971; Vázquez-Nín y Bernhard, 1971; Fakan y col., 1976; Moyné y col., 1977; Fakan y Nobis, 1978), lo que confirmó la participación de esta región en los procesos de transcripción del RNA extranucleolar (Monneron y Bernhard, 1969). Los resultados aquí expuestos muestran un porcentaje moderado de asociación entre la región cromatiniana y la periferia de los acúmulos de GIC, además un alto porcentaje de acúmulos con cromatina laxa en su interior (Gráfica 2 y 3). Estos hallazgos coinciden con los estudios de Fakan y Bernhard (1973), en el cual demostraron que hay incorporación de ^3H -uridina en la periferia de la mayoría de los acúmulos y no lo hay en su interior. Los resultados sugieren que la cromatina extendida en el interior del acúmulo no se transcribe, o si lo hace, no es detectable con las técnicas autorradiográficas. Cabe señalar que la asociación entre los demás tipos de cromatina y los acúmulos de GIC no interpretan un significado citofisiológico, que pudiera ser apoyado por trabajos previos.

Spector (1983), encontró con anticuerpos anti-Sm, específicos para snRNPs, partículas de tamaño y densidad similar a los gránulos intercromatinianos, estos descubrimientos lo llevaron a sugerir que los GIC contienen

snRNPs y que están implicados directamente con hnRNPs (premensajeros). Por las anteriores evidencias es posible considerar un origen extranucleolar para estas estructuras.

Además la distribución de los acúmulos de GIC en los dominios intercromatinianos de la matriz nuclear, propone su interacción con ésta, lo que coincide con previos reportes sobre la presencia de RNPs unidas a la matriz (Faiferman y col., 1975; Micknight y col., 1976). Recientemente se ha observado que algunas proteínas antigénicas están asociadas con la matriz nuclear y con los acúmulos de gránulos intercromatinianos en células en interfase y mitosis (Turner y Franchi, 1987). La asociación a la matriz nuclear no es una evidencia fuerte que aclare el origen de los GIC, ya que también restos de nucleolo se asocian a ella (Miller y col., 1978a, 1978b).

Por el contrario, Puvion y otros investigadores han propuesto varias hipótesis sobre el papel de los gránulos intercromatinianos en el metabolismo del RNA nucleolar. Puvion (1984), demostró que en los hepatocitos de rata pretratados con actinomicina-D, la cual inhibe la síntesis de rRNA, seguidos de marcado con ³H-uridina y postincubación con DRB (análogo de la adenosina), los gránulos intercromatinianos no se marcan, por lo que se consideró que éstos contienen moléculas de RNA de origen nucleolar. Además observaron que los acúmulos están en contacto con el componente granular del nucleolo, del cual parecen derivar. Al respecto, en el presente trabajo, se observó un escaso contacto con el nucleolo (Gráfica 3).

Las técnicas morfológicas cuantitativas fueron necesarias para evaluar y caracterizar la frecuencia y distribución tanto de cromatina como de acúmulos de GIC en el núcleo.

Las reconstrucciones parciales de cada núcleo demostraron que los acúmulos de GIC son continuos en 3 a 12 cortes y que el tamaño de éstos varía notablemente, siendo la frecuencia mayor de acúmulos pequeños (Gráfica 1). Debido a la naturaleza continua de los acúmulos de GIC, se visualizó la estructura tridimensional de éstos, encontrando que morfológicamente los acúmulos forman

un complejo similar y comparable con los grumos de cromatina compacta que se han observado en un modelo tridimensional del núcleo eucarionte (Esquivel, 1988), en el cual los acúmulos ocupan preferencialmente los espacios de la región intercromatiniana.

Se encontró que el volumen promedio de los acúmulos de GIC fue significativamente diferente para dos tipos de población, los acúmulos chicos (3 cortes) y los acúmulos grandes (11 cortes), no observándose diferencias entre las demás categorías de tamaño. Al respecto cabe señalar que la periferia del acúmulo en los cortes teñidos para cromatina (PTAs) fue estimada por la superposición de los cortes adyacentes (EDTAs). Esto dió un dato aproximado del volumen promedio para cada categoría de tamaño.

La puesta a punto de la técnica alternada de contraste para cromatina y ribonucleoproteínas en los cortes seriados, permitió el estudio de las relaciones entre ambos componentes nucleares, ya que la tinción del PTA evidenció con alto contraste la cromatina compacta y extendida. Asimismo la técnica para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), mostró gránulos intercromatinianos contrastados, lo que hizo posible abordar aspectos morfológicos entre dicha relación. La cromatina en el interior de los acúmulos se puso de manifiesto sin que la imagen de los GIC se superpusiera o produjera incertidumbre sobre la morfología de la cromatina; lo que dió lugar a una caracterización de los diversos grados de compactación de la cromatina asociados con el interior de los acúmulos de GIC (Tabla 2).

Se utilizaron hepatocitos de rata porque en los mamíferos y otros vertebrados superiores los GIC forman acúmulos (Jiménez García y col., 1989), que posibilitan el reconocimiento del grupo en varios cortes ultrafinos seriados.

En el presente trabajo, la técnica de PTA-EPON dió buenos resultados en cuanto a la tinción y obtención de cortes seriados de núcleos de hepatocitos de rata. Respecto a la tinción se comprobó que la especificidad del ácido fosfotungstico (PTA) es debida estrictamente a la preparación de la solución, es decir; el pH y a la aplicación de la misma en bloque. El rango de pH

empleado es el mismo que han reportado con buenos resultados (Vázquez-Nin y col., 1973; Esquivel y col., 1987), salvo que aquí se utilizó acetato de uranilo para reforzar el contraste de la cromatina en los cortes. Las bases químicas de la reacción entre la cromatina y la solución de PTA aún son desconocidas.

CONCLUSIONES

- 1) El método de tinción alterna con dos técnicas de contraste para microscopía electrónica que se desarrolló en este trabajo, permitió el estudio de las relaciones entre la cromatina y los gránulos intercromatinianos.
- 2) Las reconstrucciones parciales de cada núcleo demostraron que los acúmulos de GIC son continuos en 3 a 12 cortes.
- 3) Los acúmulos de gránulos intercromatinianos no son zonas de exclusión ya que contienen en su interior cromatina.
- 4) Los acúmulos de GIC tienen cromatina laxa en su interior que al parecer no se transcribe. Además, presentan un grado moderado de asociación a zonas activas en su periferia.
- 5) No se observó asociación directa entre los gránulos intercromatinianos y el nucleolo.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland, New York. 1146 p.
- Bachelier J.P., Puvion E. and Zalta J.P. (1975). Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complex isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58:327-337.
- Berezney R. and Coffey D.S. (1977). Nuclear Matrix isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 73:616-637.
- Berezney R. (1979). Dynamic properties of the nuclear matrix. The Cell Nucleus. H. Busch, ed., Academic Press. New York. 7:413-456.
- Bernhard W.A. (1969). A new Staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastructure Research.* 27:250- 265.
- Bernhard W.A. (1970). Problems of structure and function in 1970. Institut de Recherches sur le Cancer Villejuif (France).
- Bouteille M., Laval M., and Dupuy-coin A.M. in Busch H. (Ed). (1974). The Cell Nucleus. Ac. Press. New York. 1974. I:5-64.
- Busch H., Reddy R., Rothblum L.R., and Choi Y.C. (1982). SnRNAs, SnRNPs and RNA processing. *Ann. Rev. Biochem.* 51:617-653.
- Cervera J., Bagueña-Cervellera R. and Martínez A. (1985). The effects of zinc chloride on the RNP structures in HEP-2 cells: Accumulation of perichromatin granules. *Journal of Ultrastructure Research* 93:129-137.
- Cogliati R., et Gautier A. (1973). Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif "de type Schiff". *C.R. Acad. Sc. Paris.* D. 276:3041.

Comings D.E. (1972). The structure and function of chromatin. *Adv. Hum Genet* 3:237-431.

Daskal I., Merski J.A., Hughes J.B. and Busch (1975). The effects of cycloheximide on the ultrastructure of rat liver cells. *Exptl. Cell. Res.* 93:395-401.

Deimel B., Louis C. and Sekeris C. (1977). The presence of small molecular weight RNAs in nuclear ribonucleoprotein particles carrying hn RNA. *FEBS Lett.* 73:80-84.

De Robertis E.D.P. y De Robertis E.M.F. (1981). Biología Celular y Molecular. El Ateneo, México. 613 p.

Derenzini M., Novello F. and Pession-Brizzi A. (1978). Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural pattern. *Exptl. Cell. Res.* 112:443-451.

Esquivel C., Rovira P., Echeverría OI and Vázquez-Nin G.H. (1987). A simple staining method for chromatin in electron microscopy compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy.* 21:103-110.

Esquivel C., Vázquez-Nin G.H., Echeverría O. "Evidence of repetitive patterns of chromatin distribution in cell nuclei of rat liver". *Acta Anatómica*. (En Prensa).

Esquivel C., (1988). "Estudio de la disposición de la cromatina en núcleos interfásicos de hepatocitos". Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Faiferman I., and Pogo A.O. (1975). Isolation of a nuclear ribonucleoprotein network that contains heterogeneous RNA and is bound to the nuclear envelope. *Biochemistry.* 14:2808-2816.

- Fakan S. and Bernhard W. (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 67:129-141.
- Fakan S. and Bernhard W. (1973). Nuclear labelling after prolonged ^3H -uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Experimental Cell Research.* 79:431-444.
- Fakan S. (1976). High resolution autoradiography as a tool for the localization of nuclei acid synthesis and distribution in the mamalian cell nucleus. *J. Microsc. (Oxf.)* 106 (part 2):159-171.
- Fakan S., Puvion E., and Spohr G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exptl. Cell Res.* 99:155-164.
- Fakan S. and Nobis P. (1978). Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells. *Exp. Cell Res.* 113:327-337.
- Fakan S. and Puvion E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65:255-299.
- Fakan S., Leser G. and Martin T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98:358-363.
- Fawcett D. W. (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am. J. Anat.* 119:129-146.
- Gautier A. and Schereyer M. (1970). "Feulgen-like" electron stains for tissue sections. 7^o Cong. Inter. Microscop. Elect., Grenoble, Favard P., ed., 559-560.

Ghosh S., and Ghosh I. (1980). Ultrastructural characterization of collapsed interchromatin material in α -amanitin treated cells. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 18:1082-1085.

Hancock R. and Boulikas T. (1982). Functional organization in the nucleus. Int. Rev. Cytol. 79:165-213.

Jiménez García L. F. (1985). Evolución nuclear en animales. Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico. Tesis de Maestría, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Jiménez García L. F., Elizundia J.M., López Zamorano B., Maciel A., Zavala G., Echeverría O.M. and Vázquez-Nin G. H. (1989). "Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi, and protoctists. BioSystems.

Jiménez García L. F. (1988). El nucleolo: relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Lener M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L. and Steitz J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? Nature. 283:220-224.

Mcknight S. L. and Miller O. L. (1976). Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of Drosophila melanogaster. Cell. 8:305-319.

Miller T.E., Huang C. Y., and Pogo A. O. (1978)a. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complex containing hn RNA. J. Cell Biol. 76:675-691.

Miller T. E., Huang C. Y. and Pogo A. O. (1978)b. Rat liver nuclear skeleton and molecular weight RNA species. J. Cell Biol. 76:692-704.

Mirsky A. E. (1971). The structure of Chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68:2945-2948.

- Monneron A., and Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mamalian cells. *J. Ultrastructure Res.* 27:266-288.
- Moyne G. (1972). Une méthode cytochimique de mise en évidence de l'ADN-l'usage de la microscopie electronique. *C. R. Acad. Sc., Paris*, D274:247-250.
- Moyne G., and Puvion E. (1976). Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus. Sixth European Congress on Electron Microscopy, Jerusalem.
- Moyne G., Nash R. E. and Puvion E. (1977). Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cell.* 30:5-16.
- Nash R. E., Puvion E., Bernhard W. (1975). Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA. *J. Ultrastruc. Res.* 53:395-405.
- Northemann W., Scheurlen M., Gross U. and Heinrich R. C. (1977). Circular dichroism of ribonucleoprotein complexes from rat liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76:1130-1137.
- Peters V.D. and Giese H. (1971). Elektronenmikroskopischer nachweis von DNS. *Acta Histochem.* 40:119-125.
- Petrov P., and Bernhard W. (1971). Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of interphase nucleus. *J. Ultrast. Res.* 35:386-402.
- Petrov P., and Sekeris C.E. (1971). Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation. *Exptl. Cell Res.* 69:393-401.
- Prestayko A. W., Tonoto M. and Busch H. (1970). Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.* 47:505-515.
- Puvion E. and Bernhard W. (1975). Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 67:200-214.

- Puvion E. and Moyné G. (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. A high resolution quantitative autoradiographical and cytochemical study. *Exptl. Cell Res.* 115:79-88.
- Puvion E., Bachellerie J. P. and Burglen M. J. (1979). Nucleolar perichromatin granules induced by dichlorobenzimidazole riboside. *J. Ultrastruct. Res.* 69:1-12.
- Puvion E. and 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 of cell treated with dichlorobenzimidazole riboside (DRB). *Biol. Cell.* 43:147-150.
- Puvion E., Viron A. and Xu X. (1984)a. High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB-treated cells. *Exptl. Cell Res.* 152:357-367.
- Puvion E., Viron A., Assens C., Leduc E. H. and Jeanteur P. H. (1984)b. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells. *Journal of Ultrastructure Research.* 87:180-189.
- Rogers J. and Wall R. (1980). A mechanism for RNA splicing. *Proc. Natl. Sci.* 77:1877-1879.
- Spector D. L., Schrier W. H. and Busch H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell.* 49:1-10.
- Stevens B. J. and Swift H. (1966). RNA transport from nucleus to cytoplasm in *Chironomus* salivary glands. *The Journal of Cell Biology.* 31:-5-77.
- Swift H. (1959). *Symp. Mol. Biol. Univ. Chicago.* pp. 266-303.

Swift H. (1963). Cytochemical studies on the fine structure. *Exptl. Cell Res. Suppl.* 9:54-67.

Takeuchi I. K. and Takeuchi Y. K. (1984). Interchromatin granules in the diving embryonic ectoderm cells of postimplantation rat embryos. An electron microscopic silver staining study. *J. Electron Microsc.* 33:151-159.

Turner B. M. and Franchi L. (1987). Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. of the Cell Science.* 87:269-282.

Vázquez-Nin G.H. and Bernhard W. (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani rings granules. *J. Ultrastruc. Res.* 36:842-860.

Vázquez-Nin G. H., Chávez B. and Tomas Martín C. (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie.* 16:243-246.

Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M. and Fragoso J. (1978). Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anatómica.* 102-308-318.

Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M. and Pedron J. (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cells.* 35:221.

Wassef M. (1979). Acytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69:121-133.

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