

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS DE LA DISTRIBUCION ESPECIAL  
DE LA CROMATINA EN NUCLEOS CELULARES EN G0.  
CASI ISODIAMETRICOS Y FUERTEMENTE  
ANISODIAMETRICOS.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
( B I O L O G I A )  
P R E S E N T A :  
BIOL. ERNESTINA UBALDO PEREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0151/00

Asunto: Asignación de jurado  
Expediente: 31653

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
Presente

Por este conducto informo a usted, a través de esta División, que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado a la BIOL. ERNESTINA UBALDO PEREZ el siguiente jurado para obtener el grado de la Maestría en Ciencias (Biología):

Presidente	Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Primer vocal	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Segundo vocal	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Tercer Vocal	Dra. María de Lourdes Segura Valdéz
Secretario	M. en C. Lourdes Teresa Agredano Moreno
Suplente	Dra. Clara Esquivel Huesca
Suplente	Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Título de la tesis: Analisis de la Distribución Espacial de la Cromatina en Núcleos Celulares en Go, Casi Isodiamétricos y Fuertemente Anisodamétricos.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, 03 de febrero del 2000.

LA JEFE DE LA DIVISION

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

**ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA  
CROMATINA EN NÚCLEOS CELULARES EN G<sub>0</sub>, CASI  
ISODIAMÉTRICOS Y FUERTEMENTE ANISODIAMÉTRICOS.**

**Tesis presentada por la Biol. Ernestina Ubaldo Pérez para obtener  
el grado de Maestro en Ciencias (Biología)**

Director de tesis: Dr. Gerardo H. Vázquez Nin

Esta tesis se elaboró en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la facultad de Ciencias en colaboración con el Laboratorio de Procesamiento de Imágenes del Centro de Instrumentos de la UNAM. Bajo la dirección del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

## DEDICATORIAS

- ♣ A mamá María y a mis hijos Oscar y Elisa<sup>†</sup> como testimonio de mi cariño y por darme la oportunidad de alcanzar una estrella más.
- ♣ A mis hermanos Amado y Alberto por su apoyo y cariño.
- ♣ A todo el personal del Laboratorio de microscopía Electrónica y de la Facultad de Ciencias de la UNAM.
- ♣ A la memoria de Rodrigo y de Epitacio Ubaldo Granados por todo el apoyo que me dieron en vida y su inmenso cariño.
- ♣ A mi creador por darme esta nueva oportunidad

## AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin y a la Dra. Olga Echeverría Martínez por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo.

A los miembros del jurado: Luis Felipe Jiménez García, Dra. Lourdes Segura, Dra. Guadalupe Zavala, M. en C. Lourdes Agredano y Dra. Clara Esquivel Huesca, por la revisión del manuscrito y sus valiosas sugerencias.

De una manera muy especial a el Biol. Gabriel López Velázquez , Jorge Márquez y al Dr. Gabriel Corkidi, agradezco todo el apoyo que me dieron para el manejo de los programas para la captura, procesamiento y análisis de imágenes en la computadora.

A Marco Antonio González, Francisca Fernández, Martha Salcedo y José del Carmen Benítez por su apoyo e invaluable amistad.

A Bernardino, Rafael, Silvia, Ernestina y a todos mis amigos y compañeros no mencionados que me ofrecieron su ayuda desinteresada y colaboraron de alguna manera en el desarrollo de este trabajo.

# INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
Antecedentes.....	4
Ultraestructura del núcleo interfásico.....	9
Cromatina.....	17
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
<b>METAS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
Técnicas de tinción preferencial del ADN del núcleo interfásico.....	28
Manejo del programa captura de imágenes en computadora.....	35
<b>RESULTADOS</b>	
Técnicas y Procedimientos.....	41
Análisis cualitativo de las imágenes .....	43
Análisis cuantitativo de las imágenes tridimensionales de la cromatina compacta.....	45
<b>DISCUSION.....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>
<b>PIES DE FIGURAS.....</b>	<b>71</b>



## RESUMEN

El estudio de la arquitectura de la cromatina de los núcleos celulares en interfase en organismos eucariontes es de gran importancia, porque su objetivo es analizar la distribución del material genético, cuando se encuentra funcionalmente activo. Estos estudios se proponen identificar patrones repetitivos en las distribuciones espaciales de la cromatina compacta para establecer similitudes y diferencias en distintos tipos celulares, en estados funcionales particulares o entre estados patológicos y normales.

Se han acumulado evidencias que demuestran que los cromosomas no están distribuidos al azar y que durante la interfase la cromatina está asociada a la envoltura nuclear, a los nucleolos y a la matriz nuclear, pero no hay conclusiones definitivas que demuestren como están arreglados.

Los estudios que sugieren la posibilidad de un orden estructural dentro del núcleo durante el periodo de interfase, son relativamente confiables y no confirman la equivalencia de cuerpos de cromatina para todos los cromosomas.

En nuestras investigaciones encontramos que existen patrones para la disposición de la cromatina del núcleo interfásico con técnicas de tinción preferencial de PTA y de NAMA-Ur aplicadas previamente al tejido biológico, analizando cortes ultrafinos subsecuentes y por el seguimiento de las imágenes de los núcleos completos en el microscopio electrónico de transmisión. Estas imágenes fueron grabadas y llevadas a la computadora para su digitalización y captura mediante programas del Sistema Imagenia 5000(Biocom).

Con este paquete también se analizaron diversos parámetros de las imágenes y se desplegaron reconstrucciones tridimensionales realizadas a partir de cortes seriados. El conjunto de la cromatina de cada núcleo o solamente algunos grumos se rotaron en todos los sentidos para su mejor análisis. Con estos métodos encontramos que la cromatina compacta está adosada a la envoltura nuclear, las masas de cromatina de mayor talla están relacionadas con el nucleolo al que rodean casi totalmente.

Se individualizaron en promedio  $23 \pm 1.42$ (DE) cuerpos de cromatina para cada núcleo. El volumen promedio de la cromatina compacta fue del 57.8 % del volumen nuclear. El contenido de ADN en el núcleo es prácticamente constante en la mayoría de los núcleos y el número de cuerpos de cromatina corresponde aproximadamente con el juego cromosómico haploide de las células somáticas de rata.

# INTRODUCCIÓN

## ANTECEDENTES :

La célula es la unidad estructural y funcional fundamental de los seres vivos. El conocimiento de la organización submicroscópica o la ultraestructura de la célula es de interés fundamental porque prácticamente todas las transformaciones funcionales y fisicoquímicas se relacionan con la arquitectura macromolecular de la célula. De esto se deduce que el estudio de la estructura interna del núcleo celular es de gran importancia para el conocimiento de los mecanismos de la expresión de los genes durante la interfase. Desde 1770, el núcleo fue observado por diversos autores (Leewenhoek, Tremley, Muller, Hewson, Purkinje, Brown, etc.), descrito como una areola circular simple o como una estructura redonda y oscura situada en el centro de la célula ( en Mirsky y cols.,1961; Darnell y cols, 1990; Karp, 1996; Lamond y Earnshaw, 1998).

Clásicamente los seres vivos se separan en dos grupos: los procariontes y los eucariontes. La principal diferencia entre ambos tipos es que en los procariontes el material genético no está contenido en un compartimiento especial, delimitado por la envoltura nuclear característica de los eucariontes. En los procariontes el material genético está localizado en una región irregular por no poseer membrana que lo rodee. Los eucariontes poseen un núcleo muy complejo circundado por una envoltura nuclear que contiene la mayor parte del ADN presente en la célula y organizado en cromosomas. El ADN en los eucariontes está asociado con proteínas

histónicas y no histónicas en nucleosomas y estructuras supranucleosómicas que forman la cromatina.

Las células de un organismo multicelular tienen forma y estructura variables y se diferencian de acuerdo con su función específica en diferentes tejidos y órganos. Esta especialización funcional hace que las células adquieran características especiales, aún cuando en todas ellas reconoce un modelo de organización común. En general todas las células pasan por dos períodos en el curso de su vida, uno de interfase y otro de división.

Durante la división celular el núcleo experimenta una serie de cambios complejos claramente regulares y constantes. En este proceso la envoltura nuclear y el nucleolo se disgregan y la sustancia cromática se condensa en cuerpos intensamente coloreados llamados cromosomas (del griego chroma = color y soma = cuerpo). En el estado interfásico, los cromosomas generalmente no son visibles porque se encuentran en un estado de dispersión de grado variable y sus componentes macromoleculares están distribuidos laxamente dentro de la envoltura nuclear ( en De Robertis y De Robertis, 1986).

El concepto de que la información genética es transferida por moléculas de ácidos nucleicos y no por proteínas, se fue desarrollando gradualmente, a raíz del descubrimiento del ADN por Miescher en 1869, al aislarlo del núcleo de células de pus. Miescher descubrió que la nucleína, que contenía fósforo estaba constituida por una porción ácida, que hoy conocemos como ADN y una porción básica en la que se encuentra la proteína. Posteriormente descubrió una sustancia similar en las cabezas del espermatozoide de salmón, separó la fracción de ácido nucleico y estudio algunas de sus propiedades ( en Díaz y Hicks, 1988).

En 1879 el biólogo alemán Walther Fleming logró observar el ADN presente en el núcleo celular distribuido en pequeños gránulos a los que le denominó como "cromatina". Esto condujo a una larga serie de estudios minuciosos que demostraron que el ácido nucleico del timo se encuentra tanto en los núcleos de las células vegetales como de los animales. Levene en 1910 mostró que la pentosa del ácido nucleico del timo es la ribosa. En 1929 Levene y London descubrieron que el azúcar del ácido nucleico del timo es la 2-desoxirribosa. ( en Avers, 1991).

En la década de 1930-40 se realizaron otros avances que permitieron cambiar las designaciones de ácido timonucleico por la de ácidos nucleicos. Por estos años también se determinó el ARN, lo que permitió desarrollar el concepto de que los dos tipos de ácidos nucleicos se presentan juntos en todas las células. El ADN está formado por moléculas de desoxirribosa, conectadas por moléculas de fosfato y unidos a bases púricas o pirimídicas distintas: la timina (T), la adenina (A), la guanina (G) y la citosina (C). En un principio se pensó que el ADN contenía cantidades iguales de A, T, G y C, siendo una simple repetición de las cuatro bases. Sin embargo una estructura así no podría contener la información de decenas de miles de genes que posee la mayor parte de las especies (en Lehninger y cols.,1972).

Durante años se consideró que el ADN era una molécula de almacenamiento de fosfatos. A pesar de la gran cantidad de hallazgos en los estudios efectuados sobre el ADN, poco era lo que se sabía con respecto a la estructura molecular hasta 1953. En este año Watson y Crick dieron a conocer su modelo tridimensional de la estructura del ADN. El modelo proponía que el ADN está formado por dos largas

cadena, una al lado de la otra, constituidas por nucleótidos alineados a la manera de una escalera de doble hélice. La estructura helicoidal de doble hélice, compuesta por fosfatos, desoxirribosa y bases nitrogenadas. Los datos de la estructura del ADN obtenidos mediante difracción de rayos X publicados por Wilkins y colaboradores en 1953, simultáneamente con el modelo de Watson y Crick, sirvieron para confirmar que el ADN tenía una estructura helicoidal (en De Robertis y De Robertis, 1986).

Después de la publicación del trabajo de Watson y Crick, resultó claro que la estructura de ambas cadenas de ADN es complementaria: las bases T y C en una cadena se encuentran siempre frente a las bases A y G en la otra. Este fenómeno conocido como apareamiento de bases explica cómo se duplican las moléculas de ADN durante la división celular, asegurando que las células hijas reciban la misma información genética de las células progenitoras. Las dos cadenas se separan y funcionan como moldes para las cadenas nuevas sintetizadas de acuerdo con la regla del apareamiento de bases. Los resultados son dos hélices dobles idénticas a la molécula precursora, una para cada célula hija.

Una suposición acertada fue que la información genética se encontraba oculta en la secuencia de las bases en el ADN y que de alguna forma se transfería esta información genética desde el núcleo, que contiene el ADN, hacia el citoplasma, donde se sintetizan las proteínas. El ARN posee una estructura muy similar al ADN, actúa como mensajero entre el núcleo y el citoplasma. El ARN pre mensajero (se transcribe a partir del ADN como molde, de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases, en el que la uridina (U) ocupa el lugar de la timina. Una secuencia de ADN, por ejemplo, AAGGTCTAA, se transcribirá en ARN como la secuencia

UCCAGAUU. Existen 20 aminoácidos esenciales diferentes, por lo que no puede existir una relación 1:1 o 2:1 entre las cuatro bases (A, U, G y C) y los aminoácidos. Se descubrió que la combinación de tres bases, denominada triplete o codón forma el código para un aminoácido. Con las cuatro bases pueden formarse 64 tripletes diferentes, mientras que sólo existen 20 aminoácidos (Lehninger, 1979).

Feulgen y Rossenbeck describieron en 1924 un método para visualizar mediante el uso del microscopio la presencia del ácido desoxirribonucleico. De esta forma se fue conociendo mejor la citoquímica del núcleo. Actualmente se designa al material Feulgen positivo como cromatina. Esto permitió demostrar que el ADN se encuentra tanto en los núcleos de las células vegetales como de los animales. También en las décadas de los cuarenta Mirsky y Hans Ris demostraron independientemente que la cantidad de ADN por núcleo es constante en las células corporales de un organismo dado. Efectuando cuentas celulares y análisis químicos Mirsky y Vendrely demostraron que hay  $6 \times 10^{-9}$  miligramos de ADN por núcleo en células somáticas, pero sólo  $3 \times 10^{-9}$  miligramos de ADN por núcleo en óvulos o espermatozoides ( Mirsky and Ris, 1948,1951; Vendrely, 1955).

El estudio de la arquitectura de los núcleos celulares en interfase en organismos eucariontes es de gran importancia porque su objetivo es relacionar la distribución interfásica del material genético cuando éste se encuentra funcionalmente activo con la bien conocida imagen metafásica de los cromosomas transcripcionalmente inactivos. Estos estudios se proponen además identificar patrones repetitivos en las distribuciones espaciales de la cromatina compacta, para establecer similitudes y diferencias en distintos tipos celulares, estados funcionales o entre estados patológicos y normales.

La distribución de la cromatina en los núcleos interfásicos se reconoce visualmente en diferentes tipos celulares de muestras observadas al microscopio electrónico. Es así que la observación de los núcleos permite la discriminación de tipos celulares en numerosos tejidos animales y vegetales. Esta experiencia diaria de citólogos e histólogos sugiere la existencia de un cierto grado de orden y similitud en la distribución de las estructuras nucleares entre células de un mismo tipo.

### **ULTRAESTRUCTURA DEL NÚCLEO INTERFÁSICO**

El núcleo de una célula eucariontica es la estructura más prominente, y está presente como una masa de material amorfo, viscoso, encerrado por una compleja envoltura nuclear. Dentro del núcleo se encuentran, fibras nucleoproteicas, cromatina, matriz nuclear, uno o más nucleolos y el nucleoplasma.

Actualmente hay muchos trabajos sobre el núcleo celular durante la mitosis y durante la interfase. Morfológicamente se definen tres regiones: la región de cromatina compacta, la región intercromatiniana y la región del cuerpo nucleolar. En la primera se encuentra distribuida la cromatina inactiva en transcripción, de pre-mRNA rodeada de la región pericromatiniana, que es la sub-región donde la transcripción tiene lugar más activamente. La región intercromatiniana se define como el espacio nuclear que se encuentra entre cúmulos de cromatina compacta.

El nucleolo es el sitio de síntesis del pre-r ARN y de las primeras etapas de formación de los ribosomas (Díaz y Hicks, 1988).



El microscopio electrónico demostró que el núcleo interfásico está rodeado por una envoltura o membrana nuclear formada por una cisterna especial del sistema de endomembranas celular, que está atravesada por poros. En el lado nuclear los poros están alineados por canales de nucleoplasma, situados entre grumos más condensados de cromatina, que se adhieren a una lámina fibrosa de proteínas de 50 a 80 nm de espesor que está unida a la membrana interna (De Robertis, 1986 ; Karp, 1996).

**MATRIZ NUCLEAR.** La matriz nuclear está constituida por tres elementos, la lámina, los restos nucleolares y la matriz nuclear interna. La matriz nuclear interna es una red tridimensional de filamentos que corresponden a un esqueleto de ribonucleoproteínas, que retienen la integridad y forma del núcleo. La lámina nuclear, el complejo de poro y el nucleolo residual, todos estos componentes se interconectan. Esta red proteica provee los sitios de anclaje de la cromatina y tiene un papel central en la organización topológica específica del ADN. Se ha sugerido que está involucrada en el proceso de la regulación de la replicación y de la transcripción del ADN. La matriz nuclear también participa en el procesamiento del ARN (Getzenberg, 1994).

**ENVOLTURA NUCLEAR.** La envoltura nuclear está formada por cisternas del retículo endoplásmico y está constituida por dos membranas lipídicas, una interna y otra externa que se continúa con el retículo endoplásmico. Entre las dos existe un espacio intermembranal de 10 a 15 nm.

Las membranas están fusionadas localmente en regiones llamadas complejos de poro, que constan de una abertura estrecha bordeada por gránulos grandes de proteínas dispuestos en forma radial. En cada una de las dos membranas de la envoltura adyacente a la superficie nucleoplásmica de la membrana interna hay una red fibrosa de proteínas llamada lámina nuclear, que se une a la membrana por un lado y a la cromatina condensada por el otro, por medio de diferentes clases de proteínas. La membrana externa de la envoltura nuclear tiene frecuentemente ribosomas adheridos.

Dentro de la envoltura o membrana nuclear se encuentra el nucleoplasma. El núcleo se comunica con el citoplasma a través de los poros nucleares. La envoltura nuclear además de constituir un límite que separa los componentes y actividades nucleares y citoplásmicos, permite un intercambio dinámico entre los dos compartimientos celulares y es flexible para desensamblarse y ensamblarse nuevamente durante la división y reorganización nuclear.

**POROS NUCLEARES.** La envoltura nuclear se encuentra perforada por numerosos poros, que están constituidos por estructuras proteicas supramoleculares altamente organizadas y embebidas en la doble membrana nuclear. Cada poro está formado por una estructura conocida como complejo de poro, compuesta por más de 100 proteínas diferentes denominadas nucleoporinas.

El modelo de la estructura del complejo de poro más aceptado es el propuesto por Franke y Scheer (1970, 1974), el cual consiste de dos anillos estructurales anulares, localizados en los márgenes nuclear y citoplásmico del poro. Ambos

anillos tienen un diámetro externo de aproximadamente 110 nm conformados por 8 gránulos esféricos.

Hacia la región externa y lejos de la apertura del poro se extienden fibrillas que parten de los elementos granulares. Entre los dos anillos se encuentran ocho rayos en forma de cuña, cuyas bases se encuentran ancladas al margen del poro y sus ápices se extienden hacia el centro del mismo. El anillo nuclear se encuentra asociado a elementos fibrosos que se extienden hacia el interior del núcleo formando una especie de receptáculo conocido como canasta del poro la cual posee un anillo terminal. Aún así el canal del poro a través del cual pasan las moléculas entre el núcleo y el citoplasma sólo tiene 9 nm de ancho ( en Newport y Forbes, 1987; Avers, 1987).

El anillo que bordea un poro en cada superficie de la envoltura nuclear está compuesto de ocho gránulos de proteína dispuestos en un patrón de simetría radial.

La retención de la forma nuclear y de los complejos de poro nuclear es resultado de la existencia de una lámina nuclear subyacente a la envoltura nuclear. Por consiguiente una función de las proteínas de la lámina puede ser organizar los complejos de poro nuclear y de la envoltura y mantener la cromatina condensada inactiva cerca de la periferia nuclear y lejos de la cromatina activa no plegada; que está en el resto del núcleo.

## RIBONUCLEOPROTEÍNAS

**GRÁNULOS PERICROMATINIANOS (GPCs).**- Descritos en 1962 primero por Swift y después por Watson, como cuerpos esféricos individuales. Monneron y Bernhard (1969) demostraron su naturaleza ribonucleoproteica. Estos gránulos se encuentran en los núcleos de todos los animales, plantas y hongos estudiados hasta el momento, así como en muchos protistas, es decir que tienen un origen anterior a la adquisición de los plástidos y la separación de los eucariontes multicelulares actuales (Jiménez-García y col., 1989).

Los GPC se localizan cercanos a conglomerados de cromatina compacta (de donde toman el nombre), son corpúsculos individuales de 300 a 500 Å de diámetro rodeados de un halo claro ( en Vázquez Nin y col., 1983, Daskal y col., 1981).

Se ha sugerido que funcionan almacenando y/o transportando intranuclearmente el ARN mensajero o pre-mensajero (Vázquez Nin y Bernhard, 1971).

Experimentos de los efectos del estradiol sobre la frecuencia de los GPCs en células endometriales de rata, llevaron a proponer que dicha hormona tiene un efecto postranscripcional regulatorio sobre el transporte del ARN del núcleo al citoplasma (Vázquez Nin y col., 1978, Vázquez Nin y col., 1979, Echeverría , y col., 1980). Estos autores demostraron que la abundancia de los GPCs depende de la relación entre la velocidad de síntesis de ARN y su migración al citoplasma y que dichos gránulos probablemente correspondan a un almacén intranuclear de mensajeros maduros (revisado en Vázquez Nin y Echeverría, 1996).

Se ha demostrado también que la cantidad de gránulos pericromatinianos varía de acuerdo al momento citofisiológico en el que se encuentre la célula. Así durante la

diferenciación de las neuronas, los gránulos pericromatinianos son muy escasos en células matriz y neuroblastos, mientras que en neuronas inmaduras después de haber establecido contactos sinápticos son muy abundantes (Vázquez Nin y col., 1980, Vázquez Nin y col., 1983).

Observaciones similares se realizaron durante la maduración funcional de las fibras musculares en el momento de recibir la inervación motora (Zavala y col., 1992). Todos estos resultados sugirieron que el incremento del número de los GPC en estados muy precisos del desarrollo, refleja la aparición de un control postranscripcional de la expresión genética en forma de una regulación de la exportación de los ARNm durante algunas etapas de la maduración funcional de las células ya diferenciadas (Vázquez Nin y col., 1983, Zavala y col., 1992).

**FIBRAS PERICROMATINIANAS (FPCs).** Las fibras pericromatinianas son estructuras ribonucleoproteicas de 30 a 50 Å y hasta 1200 Å de largo. Fueron descritas por Monneron y Bernhard en 1969. Utilizando técnicas autorradiográficas y bioquímicas se ha demostrado que las FPCs son el substrato morfológico del ARN mensajero inmaduro o heterogéneo nuclear (pre-mRNA o hnARN) (Bachelierie y col., 1975, Fakan y Puvion, 1976).

**GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS (GICs).** Los gránulos intercromatinianos son estructuras granulares EDTA positivas, difícilmente hidrolizables con ARNasa, muy pequeñas (200 a 300 Å de diámetro), que en animales están ampliamente distribuidos formando grupos en las regiones intercromatinianas (Monneron y Bernhard, 1969).

Están presentes en animales, plantas y hongos, se encuentran agrupados en vertebrados y dispersos en invertebrados (Jiménez García y col., 1989).

Son estructuras que contienen ARN protegido por proteínas. Algunos autores los consideran como componentes de la matriz nuclear, debido a que conservan su distribución característica después de extracciones con ADNasa y altas concentraciones de sales. Debido a que incorporan uridina tritiada muy lentamente se piensa que contienen ARN estable. En estas partículas ribonucleoproteicas se han localizado proteínas con actividad enzimática, entre ellas la ATPasa, GTPasa y NAD-pirofosfatasa ( en Fakan y Puvion, 1980).

Wassef en 1979, demostró que los GICs contienen grandes cantidades de fosfoproteínas, por lo que se pueden hacer evidentes utilizando la tinción del oxinitrato de bismuto.

Por medio de la inmunodetección se ha establecido que los cúmulos de GICs contienen ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), y el factor de splicing SC35, considerándose como estructuras de almacén o ensamblado de factores de splicing y UsnRNAs, involucrados en el procesamiento postranscripcional de pre-ARNm. Jiménez García y Spector en 1993, propusieron una hipótesis y dieron evidencia de un movimiento de estos factores de los GICs hacia las FPCs, en donde realizan su función. Visa y colaboradores (1993) corroboraron la presencia de UsnARN U1 y U2 en los GICs mediante hibridación *in situ* de alta resolución.

**CUERPOS ESPIRALADOS.** Son estructuras ribonucleoproteicas de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, constituidas por fibras de 15 a 25 nm de grosor enrolladas sobre un eje, por lo que muestran un arreglo concéntrico dando la apariencia de una espiral. observados por primera vez por Ramón y Cajal, Monneron y Bernhard en 1969 los redescubrieron en hepatocitos, pero no pudieron relacionarlos con ninguna función específica.

Actualmente se sabe que están involucrados en el metabolismo nuclear del ARN, contienen ribonucleoproteínas, proteínas nucleolares como la fibrilarina y la proteína específica la p80 coilina, el U3 snRNA. Se ha propuesto que los cuerpos espiralados pueden estar participando en el metabolismo del pre- rRNA y del pre-mRNA.

**NUCLEOLO.** Morfológicamente el nucleolo es la estructura más prominente del núcleo. Es una estructura no rodeada por membrana, a veces en contacto con cromatina compacta. Los nucleolos son producidos a partir de segmentos específicos de los cromosomas llamados regiones organizadoras del nucleolo (NOR) que corresponden a los genes y ADN. La mayoría de las proteínas se tiñen con nitrato de plata amoniacal en las regiones del nucleolo en las que probablemente se localiza el NOR, son la C23 y la B23, las cuales son de pH bajo y se caracterizan por poseer alto contenido de grupos fosfato y aminoácidos de punto isoelectrico bajo (Takeuchi y Takeuchi, 1984). Un genoma puede incluir uno o más cromosomas con NOR y por tanto puede haber uno o más nucleolos en el mismo

núcleo. Sin embargo los nucleolos se fusionan, de modo que un recuento nucleolar no es una indicación del número de NORs en un complemento de cromosomas.

En muchos casos la región organizadora del nucleolo (NOR) está localizada cerca del extremo de un cromosoma y una pequeña perilla o satélite del cromosoma se proyecta más allá de la NOR.

En el complemento cromosómico humano los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 contienen NORs y cada uno de ellos está decorado con un satélite en el extremo del más corto de los dos brazos cromosómicos ( en Avers, 1991).

En una célula humana diploide típica, debido a la fusión de los cinco pares de NORs, generalmente el núcleo en interfase sólo tiene un nucleolo grande.

El nucleolo es una fábrica para la síntesis de ARN ribosómicos y el ensamblaje de precursores de subunidades del ribosoma.

Los RNA ribosómicos sintetizados en el núcleo se transcriben de los genes de ARNr (ADNr) agrupados y repetidos en tándem en la NOR. La organización estructural del nucleolo consta de una zona granular, una zona fibrilar, una zona de cromatina y una matriz nucleolar.

El nucleolo puede agrandarse en células activas y reducirse en células inactivas debido principalmente a expansión o reducción de la zona granular. La ARN polimerasa I cataliza la transcripción de los ARN nucleolares (en Hozak, 1995):

**CROMATINA.** Se llama cromatina al complejo interfásico constituido por ácido desoxirribonucleico, histonas y proteínas no histonas.



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

Heitz en 1928, distinguió dos componentes en la cromatina: La cromatina en forma condensada "heterocromatina" y la cromatina dispersa "eucromatina". La heterocromatina permanece condensada en toda la interfase entre las divisiones nucleares y la eucromatina está muy extendida y laxamente distribuida en los núcleos (en De Robertis, 1986).

Estudios autorradiográficos a nivel de microscopía electrónica muestran que las regiones de la cromatina dispersa o eucromatina son las zonas donde se lleva a cabo la transcripción activa (Kuroiwa y Tanaka, 1971). Los numerosos genes situados en los bloques de cromatina compacta no se expresan. Taylor demostró en 1960 que las regiones heterocromáticas de los cromosomas se replican considerablemente más tarde que las regiones eucromáticas durante la fase S del ciclo celular.

La heterocromatina en células animales frecuentemente se halla cerca de la envoltura nuclear y también adherida al nucleolo (en Alberts B. y col., 1989; De Robertis, De Robertis, 1986; Wilson y Morrison, 1976).

Actualmente se reconocen dos tipos de heterocromatina, la facultativa y la constitutiva. La primera forma una zona compacta en uno de los miembros de un par cromosómico como el corpúsculo de Barr en hembras de mamíferos y está presente en los núcleos de algunas células y no en otras. La segunda corresponde a la que se localiza en la región de los centrómeros y telómeros o formando zonas

definidas en ambos miembros del par cromosómico, en todas las células de un individuo y en todos los individuos de una misma especie (en De Robertis y De Robertis, 1986).

Cuando se habla de cromatina se describe al ADN desespiralizado o parcialmente desespiralizado durante la interfase, mientras que cuando se habla de cromosomas, se describe al material cromatínico altamente condensado visible durante la mitosis (Moreno y Schwartzman, 1978).

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

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

En los extendidos de cromatina se reconocen unidades repetitivas o "nucleosomas", como esferas de 10 nm en forma de cuentas de collar unidas entre si por un filamento de ADN (Van Holde y col., 1974; Tsanev y Petrov, 1976; Yakura y col., 1978). El empaque del ADN en el nucleosoma es de 5 a 7 veces, en la fibra gruesa de 40 veces y en el cromosoma metafásico de 5,000 a 10,000 veces (en Cordunella, 1978; De Robertis y De Robertis, 1986).

Diversos estudios físicos y bioquímicos realizados en cromatina aislada permitieron determinar sus características y demostrar que son las mismas que las que

presentan los cromosomas y que consiste fundamentalmente en ADN, ARN, proteínas histónicas y no histónicas, fosfolípidos y cationes (Lehninger, 1979; Morton-Bradbury, 1978; Pardon y Richards, 1979).

Mucho se ha adelantado en el conocimiento de la bioquímica del núcleo, pero se sabe muy poco de la organización espacial de los componentes nucleares. Con el desarrollo de la microscopía electrónica fue posible estudiar más a fondo la organización subcelular, con mayor poder de resolución.

Uno de los primeros estudios de la cromatina interfásica en microscopía electrónica lo realizó Bretschneider en 1952. Este autor describió un sistema de filamentos irregulares de 80 a 300 Å de diámetro. Tiempo después Ris (1955) describió fibras con un diámetro de 200 Å. No obstante, las observaciones de Ris sobre la estructura fina de la cromatina no tuvieron la aceptación que merecían.

Mientras tanto otros investigadores indicaban dimensiones muy variables para las fibras de cromatina. Se encontró que las fibras tenían un grosor de 200 a 500 Å en células de las glándulas salivales de *Drosophila* y en cromosomas de *Trasdescantia*. Por su parte, Du Praw (1965a, b, 1966) estudió los núcleos con las técnicas introducidas por Anderson (1951) y observó que muchas de las fibras individuales de cromatina estaban enganchadas a la envoltura nuclear, específicamente en los bordes de los poros. Ris describió la presencia de fibras interfásicas de 200 a 300 Å de diámetro, lo que despertó cierta controversia. El mismo Ris después de llamar la atención respecto de estas estructuras, llegó a la conclusión de que cada fibra de 200 Å se dividía en varias fibras que representaban

a moléculas simples de proteína-ADN. Sin embargo, esa estructura de múltiples bandas no pudo ser confirmada por Du Praw (1965a).

Estudios experimentales posteriores confirmaron que la heterocromatina es un estado diferenciado de la cromatina asociado a la condición de mayor plegamiento. De acuerdo con estos conceptos los núcleos interfásicos contienen regiones de fibras de cromatina tanto condensadas como difusas.

En 1964 se demostró por primera vez, utilizando núcleos de timo de ternera, que la cromatina difusa es el lugar principal de la incorporación de los precursores del ARN.

Frenster y colaboradores (1963) separaron la cromatina condensada y difusa en fracciones diferentes y observaron que más del 80% del ADN nuclear se encuentra normalmente en la fase condensada. Por el contrario, únicamente el 17% del ARN nuclear se encuentra en la fracción difusa. Puesto que en ambas fracciones había histonas ricas en lisina en una proporción aproximadamente igual (20% del total de la histona), no resultaba claro de que manera estas histonas están implicadas en el proceso de condensación de la cromatina interfásica. No obstante, el hecho de que la fracción de histonas desempeñe realmente un papel en esta condensación era significativo, sobre todo en vista de que las fibras de ADN se superenrollan y se pliegan por su asociación con las histonas. En la mayoría de los núcleos interfásicos la cromatina condensada se encuentra a lo largo de la pared interna de la envoltura nuclear, asociada a los nucleolos y en forma de grumos dispersos en el nucleoplasma (Brasch y Setterfield, 1974, Comings, 1968, Monneron y Bernhard, 1969). Visto de esta forma, la individualidad de los cromosomas no es identificable.

La idea de que los cromosomas están ordenados durante la interfase fue expresada por Rabl en 1885. Posteriormente, la posibilidad de que los cromosomas estén arreglados en un patrón ordenado en el núcleo interfásico, ha inquietado a muchos investigadores (Avivi y Feldman, 1980, Bak y col., 1979, Bourgeois y col., 1985, Comings, 1968, Evans y Filion, 1982, Murray y Davies, 1979, Hadlaczky y col., 1986, etc.).

Se han acumulado evidencias que demuestran que los cromosomas no están distribuidos al azar y que la cromatina está asociada a la envoltura nuclear, a los nucleolos y a la matriz nuclear, pero no hay conclusiones definitivas que ayuden a demostrar como están arreglados (Avivi y Feldman, 1980, Comings, 1968, Evans y Filion, 1982, Murray y Davies, 1979).

Algunos investigadores intentaron identificar a cada uno de los cromosomas en forma individual en el núcleo interfásico sin resultados satisfactorios (Bourgeois y col., 1985). Sin embargo otros estudios citológicos han demostrado que tanto en plantas como en animales los cromosomas en interfase están siempre unidos a la membrana nuclear (Avivi y Feldman 1980, Bak y col., 1979, Bourgeois y col., 1985, Murray y Davies, 1979).

Al parecer los cromosomas nunca llegan a descondensarse a tal punto que pierdan su integridad tridimensional en distintos dominios durante la interfase (Stack y col., 1977).

Todas las observaciones descritas anteriormente sugieren la existencia de un orden en la disposición de las estructuras nucleares, sin embargo la organización de la cromatina y el arreglo de los cromosomas no están bien definidos en las células animales.

Existen muchas evidencias de la existencia de orden en el núcleo interfásico, pero en su mayoría son indirectas porque se derivan de estudios que no incluyen a todos los cromosomas. Se han utilizado métodos sofisticados como: irradiación de laser-ultravioleta, microscopía de fluorescencia, hibridación *in situ*, autorradiografía, marcado de secuencias clonadas con tritio, inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, técnicas de reconstrucción tridimensional, etc., para probar que secuencias específicas de ADN tienden a ocupar territorios específicos y si tienen cierto orden.

Murray y Davies (1979) reconstruyeron cuerpos cromatínicos en el núcleo interfásico de eritrocitos maduros de anfibios y determinaron el número de sitios de unión a la envoltura nuclear. Sus resultados sugieren que el número de cuerpos de cromatina es aproximadamente igual al número de cromosomas del juego diploide.

Sin embargo sus observaciones no son suficientes para demostrar si los cromosomas están dispuestos en un patrón ordenado en el estado interfásico.

Bourgeois y col. (1982) hicieron reconstrucciones tridimensionales en células humanas y encontraron que la región en la cual el nucleolo está unido a la envoltura nuclear es estable durante la interfase y determinaron que existen patrones de distribución de la cromatina durante la interfase (Bourgeois y col., 1985).

Todas estas técnicas junto con los estudios bioquímicos han aportado importante información acerca de la asociación de los cromosomas con el nucleolo, la envoltura nuclear y los complejos de poro. Hasta ahora no hay evidencias que demuestren que existen patrones de la disposición de los cromosomas interfásicos ya que existen muchas dificultades técnicas que limitan su estudio más profundo. Vázquez Nin y su grupo llevan muchos años tratando de superar estas dificultades

para ayudar a esclarecer la disposición de la cromatina o de los cromosomas. Vázquez Nin y sus colaboradores desarrollaron un método de tinción preferencial de la cromatina (PTA) tanto en estado compactado como extendido, basado en el uso de glicolmetacrilato como medio de inclusión y el ácido fosfotúngstico como agente contrastante que impulsó la continuidad de una línea de investigación (Vázquez Nin y col., 1973, Esquivel y col., 1987).

Este procedimiento ha permitido estudiar la disposición tridimensional de la cromatina en hepatocitos durante la interfase (Esquivel y col., 1987, 1988, 1989), encontrando que la técnica del PTA es aplicable a estudios ultraestructurales relacionados con la cromatina y que requieran seriación de los cortes ultrafinos. Además esta técnica tiene la ventaja de permitir un contraste posterior ya sea con uranilo-plomo o con otros métodos, como el de Bernhard (1969) para RNP.

Más tarde Vázquez Nin y su grupo, mediante la utilización de la técnica de tinción preferencial del PTA en bloque del tejido biológico que complementa y facilita la manipulación de largas series de cortes ultrafinos incluidos en resinas epóxicas y con la adecuación de un programa computarizado para el procesamiento y análisis de la imagen, a partir de imágenes digitalizadas, lograron la reconstrucción tridimensional de la cromatina compacta de núcleos interfásicos de linfocitos (López Velázquez y cols. 1993, 1996).

Este programa de computación permitió además la cuantificación de parámetros particulares para comprender el fenómeno en estudio. Las imágenes digitales sometidas a una serie de procesos resaltaron las propiedades de la cromatina, eliminando las estructuras consideradas como ruido, distinguiéndose la disposición de sus partes logrando crear un escenario tridimensional con una representación

numérica de las distribuciones de los cuerpos de cromatina, para ser analizadas con un enfoque morfométrico.

El despliegue de las imágenes permite reconocer patrones de distribución que anteriormente no era posible discernir (López Velázquez y cols., 1996). En el núcleo de linfocitos de rata estos autores encontraron 22 grumos de cromatina compacta, en promedio y también pusieron de manifiesto que la cromatina compacta de estos núcleos ocupa el 63% del volumen nuclear.

Otro hallazgo de relevancia biológica fue que los cuerpos de mayor volumen corresponden a los que contienen al NOR. Estos cúmulos ocupan un 39 % del volumen de la cromatina compacta de cada núcleo (López Velázquez y cols., 1995). Los resultados obtenidos son de interés biológico ya que aportan evidencias que sugieren que la disposición de la cromatina no es al azar.



## OBJETIVO

El principal objetivo del presente estudio es determinar si existen distribuciones de la cromatina compacta que se repitan en núcleos en G<sub>0</sub>, isodiamétricos y provistos de abundante heterocromatina en las neuronas granulosas del cerebelo de rata.

La elección de este objetivo se basa en las siguientes razones:

- ♣-Trabajos anteriores demostraron que en linfocitos el conjunto de la cromatina compacta no se distribuye al azar.
- ♣-Esta demostración no se ha llevado a cabo en otros tipos celulares.
- ♣-Las células no comprometidas en el ciclo mitótico no duplican su ADN y se mantienen en estados funcionales aproximadamente iguales unos de otros, disminuyendo así posibles diferencias en la distribución de las regiones de cromatina extendida y compacta.
- ♣-En los núcleos isodiamétricos se puede asumir que la distribución de la cromatina sea similar a lo largo de cualquiera de sus diámetros.
- ♣-La abundancia en heterocromatina nos aproxima a la situación en la que la enorme mayoría de la cromatina cromosómica se encuentra en estado compacto en interfase, lo que podría favorecer una distribución con dominios espaciales para cada cromosoma o grupos de éstos.

## METAS

♣-Obtener la reconstrucción tridimensional de varios núcleos interfásicos de neuronas de la capa granulosa del cerebelo de rata utilizando un programa para computadora desarrollado en el Centro de Instrumentos de la UNAM.

♣-Analizar los cuerpos tridimensionales con el mismo programa en busca de similitudes.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se sacrificaron 12 ratas blancas para diseccionar el cerebelo, se hicieron trocitos pequeños de aproximadamente un milímetro de grosor, los cuales se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en buffer de fosfatos 0.16 M. pH 7.2. Los trozos de tejido se tiñeron en bloque con solución de ácido fosfotúngstico (PTA), probándose diferentes pH de 1.0 a 3.0, de acuerdo a la técnica publicada por Esquivel y cols. en 1987. Esas muestras de tejido se lavaron, se deshidrataron y se incluyeron en una resina epóxica (Glycide ether 100, Merck). Los cortes de las muestras incluidas en resinas hidrosolubles como LR White, Glicol Metacrilato y Lowicryl, se tiñeron con PTA a pH diferentes. Algunos cortes antes del contraste se sometieron a lavados con soluciones de ácido clorhídrico 0.2 N. a diferentes tiempos, otros cortes se lavaron con agua oxigenada a diferentes concentraciones y tiempos, otros cortes cuando estaban flotando se les aplicó vapores de acetona, cloroformo o xilol y se calentaron, para determinar si con estos procedimientos se mejoraba el rendimiento de la técnica de tinción preferencial para ADN. Los cortes ultrafinos se observaron en un microscopio electrónico para explorarlos y determinar con cual modificación se obtenían mejores contrastes de la cromatina. Cabe mencionar que para lograr la mejor tinción preferencial del ADN en bloque de los núcleos de las neuronas de la capa granulosa del cerebelo de rata, se logró después de muchos intentos en diferentes tiempos.

Una vez obtenida la técnica de tinción preferencial para ADN (Fig. 1), se procedió a hacer cortes seriados en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E), utilizando

cuchillas de vidrio. Se levantaron de 150 a 200 cortes ultrafinos dentro de una rejilla con una ranura de 2x1 mm de lado, llamadas anillos de Sjöstrand. Para esto se necesita adquirir la destreza en el corte y montado de los cortes ultrafinos dentro del anillo de Sjöstrand.

La observación de los cortes ultrafinos de 70 a 90 nm de grosor se hizo en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10 operado a 60 KV, donde se hizo también el seguimiento a las imágenes de los núcleos en todas las series de cortes ultrafinos hasta comprobar que no se había perdido ningún corte y la reconstrucción era completa. Las imágenes de 20 series de núcleos de neuronas de la capa granulosa de cerebelo de rata se registraron en videograbaciones en cassettes ED T120 de 246 m (Sony) por medio de una cámara CCD integrada al microscopio electrónico y acoplada a una videograbadora.

Todas las imágenes fueron grabadas a 2500 aumentos medidos sobre la pantalla fluorescente del microscopio electrónico.

En los diagramas de flujo 1 y 2 se muestra el procesamiento del material biológico con más detalle. En el diagrama del flujo 1, también se pueden ver los detalles de la técnica de tinción preferencial en bloque para ADN llamada NAMA-Ur, de Testillano y cols. (1991). Este es un método citoquímico que tiñe preferencialmente el ADN y enmascara las otras estructuras por medio de la acción de una hidrólisis alcalina débil (procedimiento NA), el cual no afecta al ADN, enseguida se hace una obstrucción de los grupos amino y carboxilo por medio de una metilación-acetilación (procedimiento MA) y finalmente los cortes se contrastan con acetato de uranilo.

La preinclusión e inclusión en resinas epóxicas, así como la polimerización se llevan a cabo en la forma habitual (ver diagrama).

Se cortaron largas series de cortes ultrafinos que se montaron en los anillos de Sjöstrand mencionados. Las series se recogieron por tensión superficial con el anillo de Sjöstrand desnudo con una gota del agua de la barquilla. Posteriormente se colocaron en un bastidor cubierto de una membrana de Formvar mas bien gruesa, para que resista la sobreexposición al haz de electrones producida por el seguimiento prolongado que se hace en las largas series de cortes ultrafinos, al estar explorando y obteniendo imágenes, hasta obtener varios núcleos completos. Una vez secos los anillos con las series de cortes ultrafinos se desmontan del bastidor con un cono de vidrio especialmente diseñado cuya parte superior es del tamaño de las rejillas (3 mm).

El procedimiento final para completar la técnica de NAMA-Ur es el contraste de los cortes (procedimiento Ur) con acetato de uranilo acuoso al 5% a 60 °C durante una hora. Completado el tiempo se sacaron de la estufa los anillos aún flotando sobre el colorante, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel filtro. Cabe mencionar que la técnica de NAMA-Ur se aplicó para ver que ventajas tenía con respecto a la técnica de PTA.

Una vez observados y grabados en cassette los veinte núcleos enteros de las series de cortes ultrafinos, se colocó el cassette en una videograbadora conectada a una computadora y en ella se procedió a realizar el procedimiento de adquisición o captura de las imágenes de los núcleos enteros. Para ello se utilizó el siguiente equipo:

- Videograbadora Hi-Fi Stereo VHS ( Sony)
- Monitor para imágenes analógicas (Sony Trinitron)
- Computadora Dell System 310 provista de:

Microprocesador matemático 80387

Memoria RAM 4 MB

Disco Duro con 100 MB

Monitor Supercom S-VGA

Mouse Serial ( Microsoft)

Monitor NEC/ MultiSync 3D RGB (formato de video americano estándar).

Tarjeta MVP-AT de Matrox Electronic Systems con 1 MB de memoria configurada en cuatro memorias de 512x512x8 bits (para manejar y desplegar hasta cuatro imágenes).

-Cassettes DE, T120, VHS( Sony).

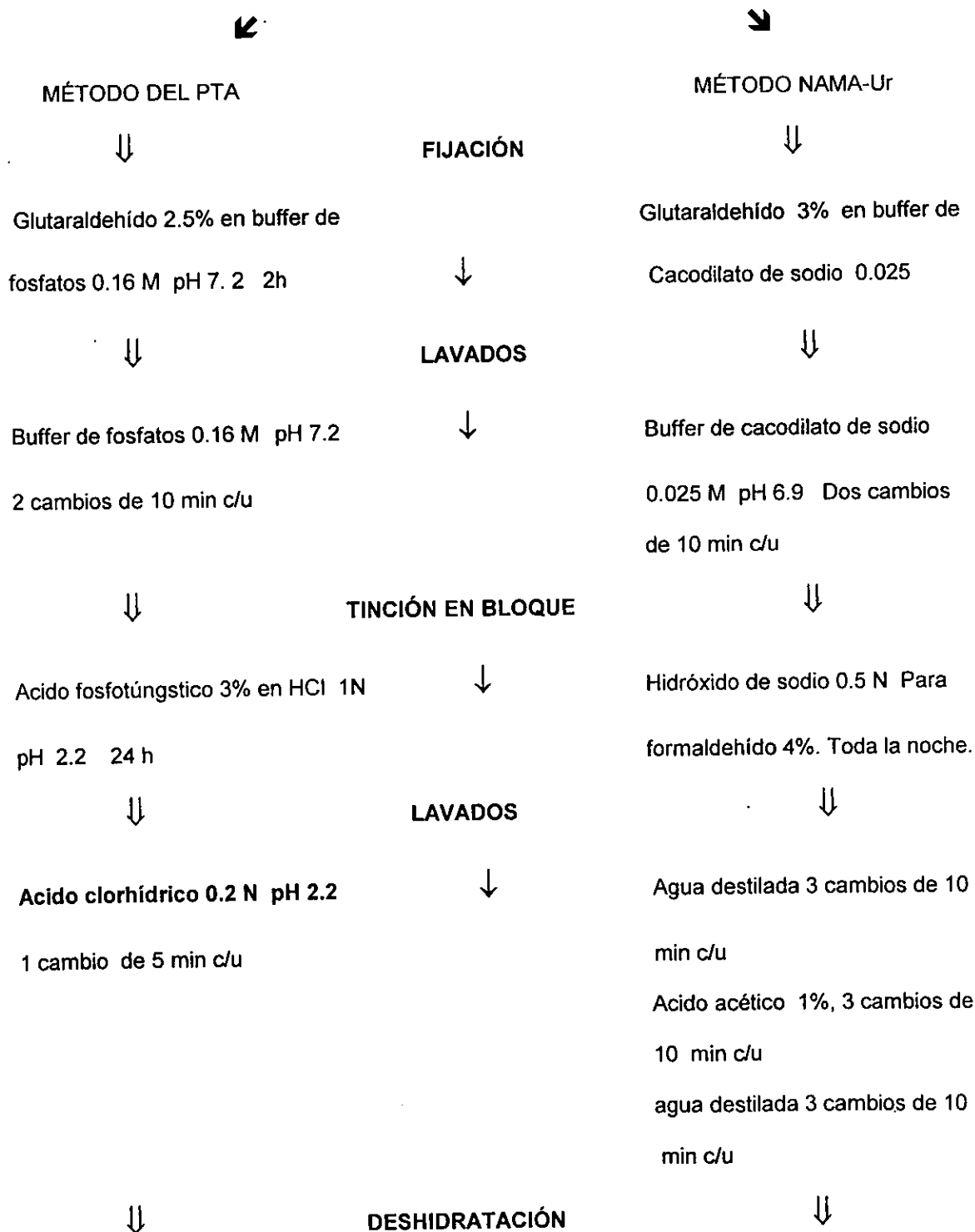
-Discos flexibles de 3.5" 2HD.

#### PROGRAMAS:

Sistema IMAGENIA 5000, (BIOCOM-UNAM) y rutinas desarrolladas específicamente para este trabajo e integradas al sistema.

# DIAGRAMA DE FLUJO 1 : TÉCNICAS DE TINCIÓN PREFERENCIAL DEL ADN DEL NÚCLEO INTERFÁSICO.

## ESPECÍMENES BIOLÓGICOS



Etanol : 50,70,80,90,96 y 100%

20 min c/u ; etanol 100%

dos cambios de 20 min c/u

Metanol: 30,50,70,80,90,96 y 100%

tres cambios de 10 min c/u



### METILACIÓN- ACETILACIÓN



Metanol- anhídrido acético v:v

(5:1) a 25 °C 24 h

Metanol 100 % 2 cambios de

20 min c/u



### INTERMEDIARIO



Oxido de propileno 2 cambios

de 10 min c/u



Oxido de propileno 2 cambios

de 10 min c/u



### PREINCLUSIÓN



Oxido de propileno -Epón (1:1)

24 h



Oxido de propileno -Epón ( 1:1)

24 h

### INCLUSIÓN Y POLIMERIZACIÓN



Mezcla Epón en molde plano a 60 °C

durante 24 h.

Mezcla Epón en molde plano a 60 °C

durante 24 h.

### CORTES



Series de cortes ultrafinos montados

en rejillas de Sjöstrand.

Series de cortes ultrafinos montados

en rejillas de Sjöstrand.





**CONTRASTE**



Acetato de uranilo acuoso al 5 %  
a 60 ° C, durante 1 h.



**OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO**



**IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE NÚCLEOS ENTEROS**



**GRABACIÓN EN VIDEOCASETE**



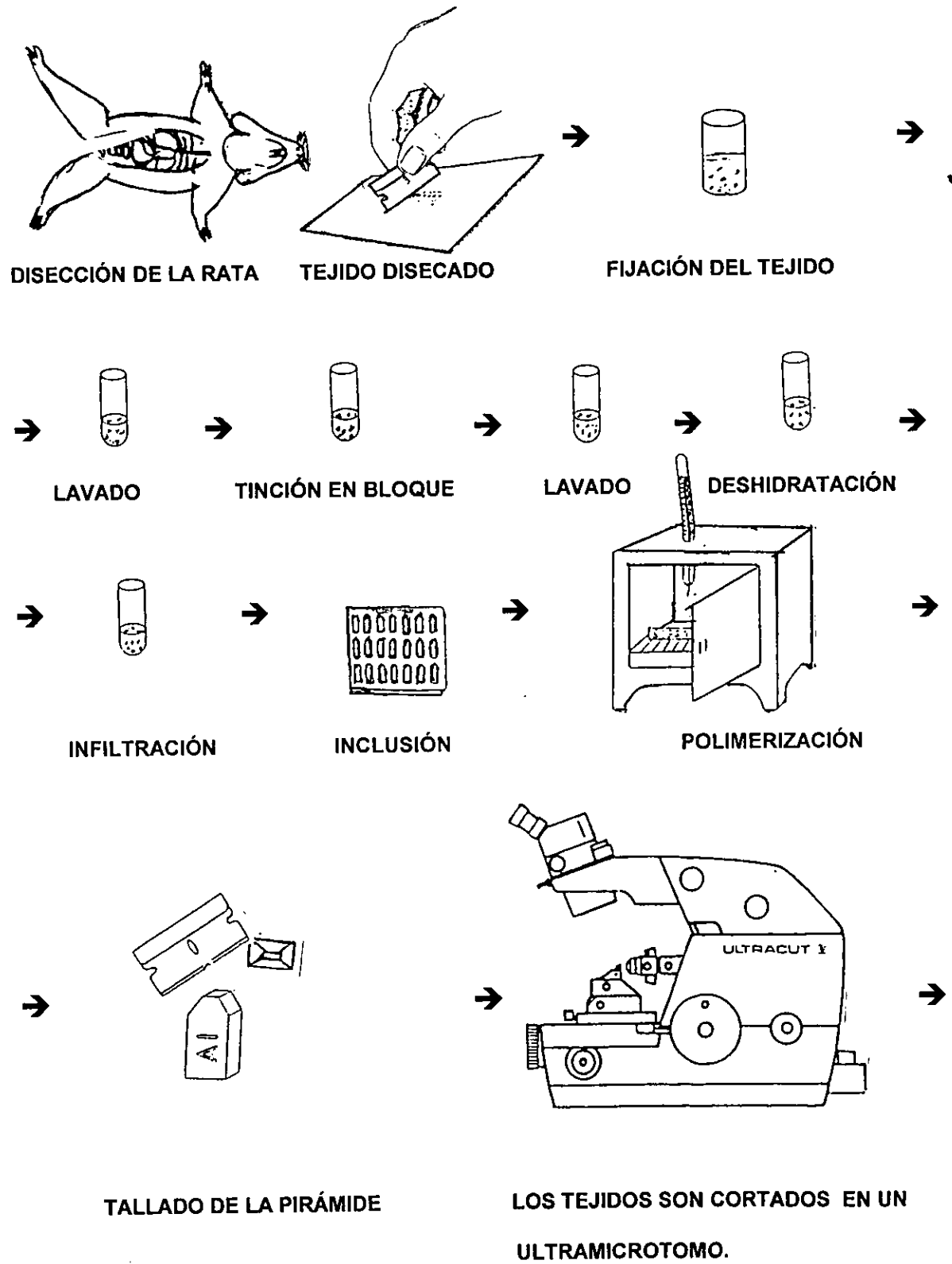
**PROCESAMIENTO DIGITAL DE LAS IMÁGENES EN COMPUTADORA**



**RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL ESPACIAL DE NÚCLEOS ENTEROS.**

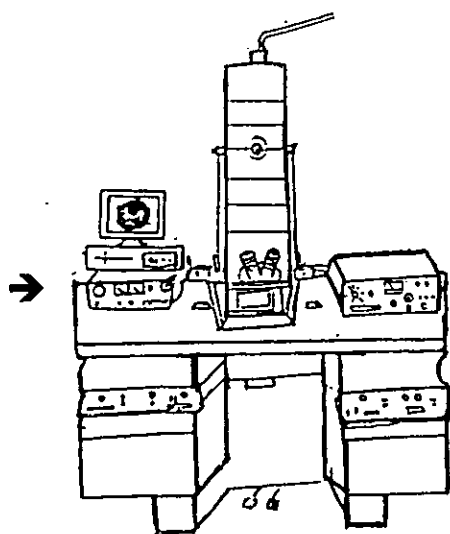
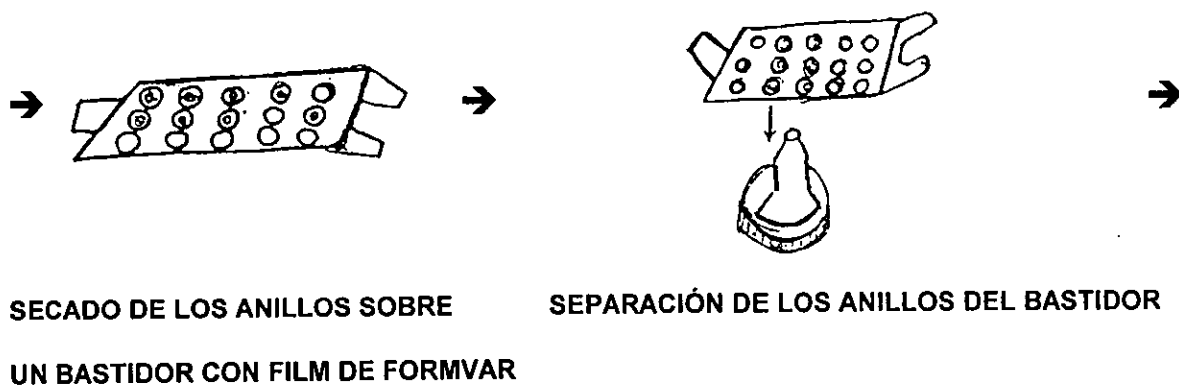
**DIAGRAMA DE FLUJO 2**

**PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL**

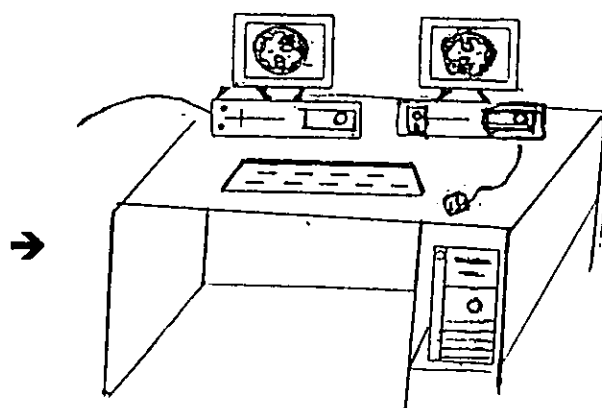


CONTINUA DIAGRAMA DE FLUJO 2

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL.



OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO  
ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN



PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES  
EN COMPUTADORA.

## MANEJO DEL PROGRAMA PARA LA CAPTURA DE IMÁGENES EN LA COMPUTADORA:

La captura de imágenes se llevó a cabo mediante programas del Sistema IMAGENIA 5000 (BIOCOM UNAM), pasando la imagen de la videocinta directamente a un monitor RGB. Después de este proceso se pasó al aislamiento de las estructuras de interés del resto de la célula. Esta operación se realizó manualmente trazando el contorno exterior del núcleo.

Posteriormente se realizó una segmentación basada en el umbral de intensidad (nivel de gris) que es elegido por el operador. El umbral separa los grises que corresponden a la cromatina compacta de los matices de las otras regiones de la imagen. Esto es posible porque el contraste empleado tiñe mucho más intensamente la cromatina compacta que las otras estructuras celulares. El resultado es una imagen con la cromatina compacta en blanco y todo lo demás en negro. A este proceso se le llama binarización de las imágenes, esto es, designar un valor de 255 en la escala de grises para las estructuras de interés y un valor de 0 para el fondo. Esta imagen se graba en disco duro o en disco flexible, para su posterior proceso constituyendo un archivo de imágenes al que se puede recurrir en cualquier momento. Se repiten los mismos pasos para todas las imágenes de la serie.

Terminados estos procesos se lleva a cabo el marcado de poros nucleares. Éste se realizó manualmente marcando un punto de color gris en el lugar donde se encuentran espacios claros entre los bloques compactos de cromatina que corresponden a dichos poros. Por último las imágenes fueron reducidas a una

cuarta parte de su tamaño (128x120 pixeles) y con el proceso denominado amalgamado de mosaicos se acomodaron secuencialmente en grupos de 16 cortes por pantalla hasta completar la serie del núcleo.

La siguiente etapa de trabajo fue el procesamiento, análisis y despliegue en 3D utilizando un sistema de reconstrucción tridimensional desarrollado por el físico Jorge Márquez Flores del Centro de Instrumentos, UNAM, el cual consta de dos subsistemas (WSEG3D y WVOX3). El sistema permite observar la serie de los diferentes cortes de que consta el núcleo desplegando las imágenes, una tras otra y en orden. Cabe señalar que el sistema presenta rutinas específicas para el alineamiento de los cortes mediante el cálculo de los centros de masa de cada uno de ellos. También se pueden hacer despliegues tridimensionales de la distribución completa de la cromatina o de partes de ella y realizar cortes en la reconstrucción tridimensional obteniendo vistas en los ejes X, Y y Z.

Debido a que la cromatina compacta de los núcleos estudiados aparece continua en la región adyacente a la membrana nuclear y eventualmente en otros lugares, se aplicó un proceso de erosión en 3D, el cual remueve un máximo de 4 voxeles del grosor de la cromatina, quitando los puentes que comunican a los grumos y dejándolos aislados (Fig. 2). El voxel es el elemento de volumen, así como el pixel

es la unidad de área. La cromatina erosionada se guarda en memoria con otro nivel de gris, de manera que se puede recuperar posteriormente.

El siguiente paso consistió en caracterizar cada grumo de cromatina aislado mediante proceso de segmentación y etiquetado automático asignándoles un color (Fig. 2A). Otro paso fue la recuperación de la cromatina erosionada, dándole un

color blanco, lo que nos permitió estimar la cantidad de material que fue erosionado. Este proceso es útil para los cálculos morfométricos de la masa total de cromatina.

La siguiente etapa fue la dilatación condicionada, este proceso hace que los grumos individualizados ocupen todo el volumen de cromatina que fue erosionado, esta dilatación de los cuerpos es regida por jerarquías de volumen. Al final de este proceso la cromatina en su totalidad estaba dividida en regiones y cada una de ellas etiquetada con un diferente color.

La relación entre los grumos individualizados y la envoltura nuclear, así como entre los grumos y la distribución de poros, pudo analizarse mediante la creación de representaciones de la superficie nuclear en mapas bidimensionales. En estos mapas se muestran las áreas de contacto con la superficie nuclear de cada uno de los grumos de cromatina compacta identificado por su color y además la disposición de los poros nucleares correspondientes (Figs. 3, 3A). Utilizando esos mapas, se realizó la estimación de la distribución de poros midiendo su densidad numérica en las áreas internas de las zonas de contacto de los grumos de cromatina compacta con la envoltura nuclear y en las áreas limítrofes entre un grumo y otro. Para ello se empleó otro de los programas del paquete Imagenia 5000.

Mediante el Subsistema WVOX3, se llevó a cabo el análisis cualitativo de los despliegues tridimensionales de la cromatina, cuando ésta ya ha pasado por todos los procesos antes mencionados. De esta manera se puede visualizar al núcleo desde diferentes ángulos e inclusive realizar cortes a través de él para observar la relación que existe en el arreglo de los grumos de cromatina individualizados con

anterioridad. Existe la posibilidad de observar reconstrucciones parciales espaciales tanto de todo el núcleo como de cuerpos elegidos por el operador (Fig. 4 A-F).

El despliegue de estas imágenes está basado en el uso de los mencionados elementos de volumen o voxels, los cuales contienen información de volumen, área, profundidad, factor de forma y posición con respecto a cada uno de ellos. Finalmente se utilizaron procesos de animación de imágenes, los cuales permitieron observar la rotación espacial de cada uno de los núcleos o de los grumos de cromatina por separado.

Las estimaciones morfométricas se realizaron después de delimitar los grumos de cromatina. Los parámetros del núcleo, de la distribución total de cromatina y de las masas individuales fueron: superficie, volumen, número de cuerpos, factor de forma y otros (Tablas 1 y 2).

## RESULTADOS

### TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Diversos autores han desarrollado diversos métodos citoquímicos para teñir el ADN nuclear *in situ*, a nivel de microscopía electrónica de transmisión, los cuales son muy provechosos al enfocarse al estudio de la cromatina interfásica del núcleo celular de eucariontes. Desafortunadamente casi siempre se aplican a fracciones de centrifugación o a cortes aislados (Gautier y Schereyer., 1970; Peters y Giese, 1971; Moyne , 1972; Vázquez Nin y cols., 1973; Derenzini y Farabegoli. 1990; Testillano y cols., 1991; Hayat, 1993). El análisis de la cromatina al microscopio electrónico en cortes seriados se logró aplicando la modificación de Esquivel y col. (1987) a la técnica de Vázquez Nin y col. (1973), que se basa en el uso del ácido fosfotúngstico a bajo pH sobre trozos de tejido. Este procedimiento resultó excelente por su preferencia por el ADN, por su elevado contraste y por ser una técnica sencilla, rápida y barata. Aunque este procedimiento había sido empleado con éxito anteriormente (Esquivel y cols., 1988 y 1989, López Velázquez y cols., 1996), en el presente trabajo se hicieron algunas modificaciones a la técnica inicial. Se encontró, que utilizando PTA a pH muy bajos (de pH 2.1 a 2.3) y tiempos largos, de 18 hasta 24 horas, en los diferentes tejidos, se obtiene el contraste preferencial del ADN. El pH adecuado para tejido nervioso y la pulpa blanca de bazo fue pH 2.2, para células epiteliales de intestino delgado pH 2.1 y para hepatocitos pH 2.3.

También el método de tinción preferencial para ADN en bloque llamado NAMAUr de Testillano y colaboradores (1991), mostró un alto contraste en la cromatina, las



demás estructuras no se tiñen y aparecen como áreas claras. El inconveniente de esta técnica es lo complicada y tardada durante todo su desarrollo, aunque tiene la ventaja de que si se quiere hacer estudios de extensiones grandes de tejido la tinción es muy uniforme. Esta característica permite estudiar muchas células en un sólo bloque, lo que no se puede lograr con la técnica de PTA porque la sustancia de contraste aplicada al trozo de tejido penetra pequeñas distancias, por lo que el bloque debe ser muy pequeño, para asegurar el éxito de la técnica. La aplicación de estas dos técnicas sobre el tejido en bloque facilitó el estudio del seguimiento de la distribución de la cromatina compactada y extendida en todo el núcleo celular.

Los cortes ultrafinos tratados con estas técnicas de tinción en bloque mostraron densidad electrónica fundamentalmente sobre la cromatina compacta y extendida (Fig. 1A). El nucleolo y las estructuras RNPs aparecen mucho menos electrodensas que las masas de cromatina condensada. Alternativamente ambas técnicas son herramientas útiles para el estudio de la distribución de la cromatina compacta y laxa, aún dentro del nucleolo.

Las resinas epóxicas son las más adecuadas para la obtención de largas series de cortes ultrafinos, la proporción adecuada para estos requerimientos es de: Epón 4.3 g; DDSA 4.3 g; NMA 1.4 g; DMP30, 0.33 g. Cualquier modificación en esta relación alteran la dureza del bloque, dificultando la obtención de tiras continuas de cortes ultrafinos. Es conveniente preparar la resina en el momento en que va a ser utilizada.

La viscosidad de todo medio de inclusión es de gran importancia para la obtención de bloques que tengan un determinado rango de dureza adecuada para la obtención de cortes ultrafinos.

Otro requisito para la obtención de series largas en línea recta, es el retallado de la pirámide, que deberá ser en forma truncada y en rectángulo con una muesca en un extremo. Esta muesca sirve para determinar durante la observación en el microscopio electrónico cual es el primer corte y cual es el último de cada subserie. El tamaño de la cara de corte dependerá del número de cortes que se deseen montar dentro de un anillo de Sjöstrand o de un solo agujero de 1x2 mm.

## **ANÁLISIS CUALITATIVO DE LAS IMÁGENES EN DOS Y EN TRES DIMENSIONES**

Las imágenes obtenidas in vitro al microscopio electrónico muestran la cromatina densamente contrastada, reconociéndose el sitio que ocupa el nucleolo por el espacio aclarado de color gris claro (Figs. 1 y 1A).

Se observó que la cromatina compacta parece una masa continua adosada a la envoltura nuclear con proyecciones irregulares que se extienden hacia el nucleoplasma a manera de red.

La cromatina compacta del núcleo interfásico se encuentra en su mayoría formando una capa de espesor variable en contacto con la parte interna de la envoltura nuclear, únicamente interrumpida por los complejos de poro nucleares. También se

observó que se encuentran de uno a tres cuerpos de cromatina de mayor tamaño que son los que se relacionan con el o los nucleolos. El número de nucleolos varía de 1 a 3 por núcleo .

Para realizar las reconstrucciones espaciales tridimensionalmente en la computadora se procesaron las imágenes utilizando los sistemas WSEG3D y WVOX3D, esto permitió observar la serie completa de cortes ultrafinos, desplegando las imágenes de los diferentes cortes de que consta un núcleo, una tras otra y en orden (Fig. 2A).

Durante el procesamiento de las imágenes cada uno de los 20 núcleos fue sometido a un proceso de erosión, segmentación, etiquetado y dilatación de la cromatina para separar cuerpos de cromatina, individualizarlos y diferenciarlos unos de otros (Figs. 2, 2A).

Se hicieron reconstrucciones espaciales tridimensionalmente de cada uno de los cuerpos individualizados o de todos juntos sin perder las dimensiones relativas de la cromatina.

Se hizo el despliegue espacial de los cuerpos de cromatina compacta individualizados, observando las diferentes caras de cada uno por medio de la rotación de masa de cromatina compacta individuales, en grupos pequeños o de todos los cuerpos de cromatina que tiene un núcleo a la vez (Fig. 4A - 4F).

Estas observaciones permitieron poner en evidencia las siguientes características morfológicas de los grupos de cromatina compacta que se repiten en todos los núcleos:

- Prácticamente todos los cuerpos de cromatina contactan con la envoltura nuclear, ocupando áreas aproximadamente proporcionales a su tamaño (Figs. 3 y 3A).
- Los poros de la envoltura nuclear se distribuyen en su mayoría en las cercanías de los límites de las áreas de contacto de los grumos de cromatina compacta con dicha envoltura (Figs. 3 y 3A).
- Los grumos cuya masa principal está apoyada sobre la cubierta nuclear presentan numerosas prolongaciones hacia el nucleoplasma. Algunas de estas prolongaciones recorren largas distancias y contactan con otros grumos.
- Las masas de mayor talla son las relacionadas con el nucleolo, al que rodean casi totalmente.

#### **ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS IMÁGENES TRIDIMENSIONALES DE LA CROMATINA COMPACTA.**

Utilizando los métodos de reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados descritos y el paquete de programas Imagenia 5000, se pudo obtener representaciones numéricas de las distribuciones de los cuerpos de cromatina compacta y de cada uno de ellos individualmente. Los resultados se muestran en la tablas 1 y 2.

En la tabla 1 se encuentran los datos del análisis de las distribuciones tridimensionales totales en los 20 núcleos completamente reconstruidos.

Se encontraron en promedio 23 (6.35 DS = Desviación Estándar) cuerpos de cromatina claramente individualizados en cada núcleo.

En la gráfica 1 se hace la comparación del volumen nuclear con el volumen total de la cromatina de cada núcleo.

La cromatina compacta ocupa 0.583 (DE = 0.0414) del volumen nuclear, en promedio, lo que corresponde al 58.3% del mismo.

Se encontraron núcleos como el K, L, N y O que presentan un volumen mucho mayor que la mayoría de los otros núcleos, a veces más del doble. Si se construye una clase con los núcleos de más de 40 micras cúbicas de volumen (J, K, L, N, O, P) se comprueba que dichos núcleos son en promedio 38% más grandes que los 14 restantes. Como el volumen parcial ocupado por la cromatina compacta en este grupo es similar al de la población general, se deduce que tienen más cromatina compacta que los otros núcleos.

El factor de forma de la distribución total de la cromatina compacta dentro del núcleo fue de 0.132. El factor de forma es la relación entre la superficie y el volumen de cada cuerpo y es una medida de la irregularidad de dicho cuerpo. El dato mencionado indica que la distribución de la cromatina es muy regular y tiende a una esfera, cuanto mayor sea el cociente más irregular es el objeto.

Se encontró una media de 23 cuerpos de cromatina compacta por núcleo. De estas masas de cromatina individualizadas, 22 en promedio presentaron uniones a la membrana nuclear.

De uno a tres cuerpos por núcleo son de mucho mayor tamaño que el resto de ellos y corresponden, como se había advertido en el estudio morfológico, a los que contienen a los nucleolos. Estos grumos ocupan en promedio del 39 al 42 % del volumen total de la cromatina compacta de cada núcleo (Gráfica 1).

En la tabla 2 se muestran los datos morfométricos obtenidos sobre el volumen y número de cuerpos de cromatina compacta perinucleolar de todos los núcleos. La talla relativa de los corpúsculos de cromatina densa que rodean a los diferentes nucleolos varía desde ser casi igual hasta ser uno 3.5 veces mayor que el otro (Tabla 2).

El número de nucleolos en estas neuronas es de 1 a 3 coincidiendo con el número de cuerpos cromáticos grandes. Los más frecuentes son los núcleos con 2 nucleolos.

En la gráfica 1 y en la tabla 2 se hace la comparación del volumen de la cromatina perinucleolar de los grupos de cromatina 1 y 2 con los cuerpos de cromatina de menor tamaño, encontrando que más del 50 % de los núcleos contienen de 2 a 3 grupos de cromatina de mayor tamaño y el resto son de menor tamaño.

Otro resultado importante fue la obtención de mapas de la superficie nuclear, conteniendo las áreas de los cuerpos de cromatina formados, la disposición de los poros nucleares así como las áreas de contacto con la envoltura nuclear.

El número de poros promedio fue de 516 por núcleo. Se midieron 635 áreas en los cuerpos de cromatina para evaluar la densidad numérica de la distribución de los poros separándolos en los que están dentro de las superficies de contacto de los cúmulos de cromatina compacta con la envoltura nuclear (centrales) y los que se sitúan en los límites de dichas superficies (periféricos). El análisis de 316 áreas centrales mostraron un promedio de 21.8 poros por  $\mu\text{m}^2$ . La densidad numérica de la distribución de poros en 319 áreas periféricas medidas dio un promedio de 60

poros por  $\mu\text{m}^2$ . Este resultado es tres veces mayor que los obtenidos en las áreas centrales de los cuerpos de cromatina.

La gráfica 2 nos muestra la distribución de los poros en los grumos de cromatina compacta. Los datos obtenidos indican que los poros se sitúan mucho más frecuentemente en la periferia de los grumos de cromatina compacta que en su interior.

**TABLA 1**  
**CROMATINA NÚCLEO INTERFÁSICO.**

Núcleo	Volumen núcleo	Volúmen cromatina	Centro de masa	Factor de esfericidad	Número de poros	Número de cuerpos de cromatina	Uniones a membrana
A	25.48	15.70	3.60	0.143	451	22	22
B	33.54	21.29	3.23	0.101	392	10	7
C	27.64	17.27	3.00	0.090	373	25	25
D	28.56	16.75	3.67	0.140	477	24	23
E	25.87	15.54	3.95	0.126	364	16	15
F	25.03	14.06	3.77	0.113	305	19	19
G	30.27	16.66	4.38	0.141	359	25	23
H	26.10	15.97	3.57	0.127	368	22	22
I	36.47	21.08	3.31	0.122	532	22	22
J	41.22	19.47	3.99	0.164	605	32	30
K	54.85	31.15	3.18	0.176	968	24	23
L	50.16	27.00	3.10	0.140	743	38	38
M	37.55	22.23	2.94	0.103	561	20	20
N	45.60	28.72	3.80	0.124	759	26	26
O	45.12	25.09	3.69	0.131	516	26	24
P	40.49	24.04	4.05	0.195	724	28	28
Q	26.88	16.83	3.02	0.096	401	18	17
R	22.37	13.86	3.50	0.135	476	14	14
S	30.07	15.82	3.76	0.135	522	30	30
T	25.70	14.50	3.28	0.142	431	26	26
X	33.95	19.65	3.54	0.132	516	23	22
SD	9.46	5.19	3.98	0.026	169	6.4	6.6

Volumen en  $\mu\text{m}^3$

**TABLA 2**  
**CROMATINA PERINUCLEOLAR**

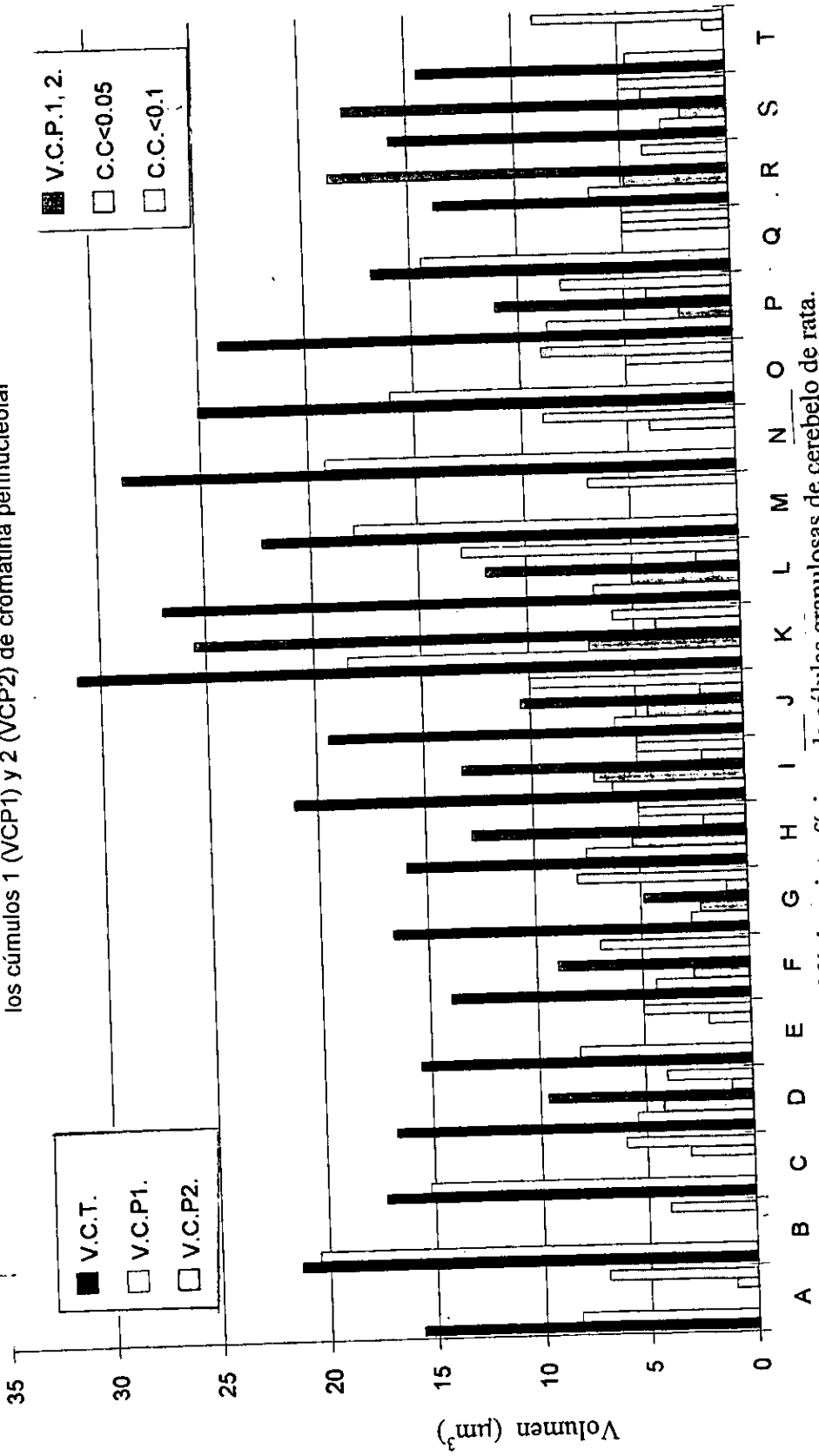
Núcleo	Cromatina Peri nucleolar cuerpo 1	Cromatina Peri nucleolar cuerpo 2	Cromatina Peri nucleolar cuerpos 1+2	Número de nucleolos
A	8.31	---	---	2
B	20.42	---	---	2
C	15.22	---	---	3
D	5.44	4.21	9.65	1
E	8.09	---	---	1
F	4.38	2.65	9.03	2
G	2.67	2.22	4.89	2
H	7.57	5.34	12.91	2
I	6.20	7.10	13.30	2
J	6.03	4.46	10.49	2
K	18.41	7.14	25.55	3
L	6.87	5.05	11.92	2
M	17.94	---	---	2
N	19.21	---	---	3
O	16.11	---	---	2
P	8.67	2.47	11.14	2
Q	14.48	---	---	2
R	6.52	4.88	11.40	2
S	3.08	2.18	5.26	2
T	4.66	---	---	1
X	10.01	4.53	11.23	2
SD	5.89	1.92	5.56	0.56

Volumen en  $\mu\text{m}^3$



# GRÁFICA 1

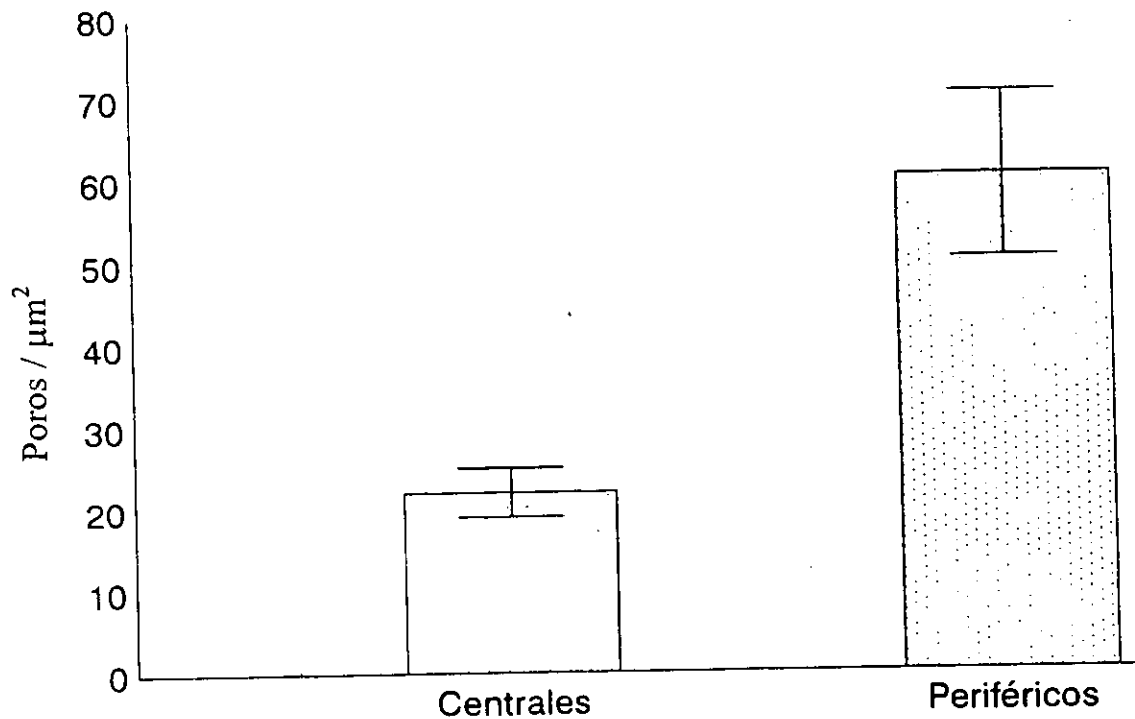
Comparación del volumen de la cromatina total (VCT) con el volumen de los cúmulos 1 (VCP1) y 2 (VCP2) de cromatina perinucleolar



Núcleos interfásicos de células granulosas de cerebelo de rata.

## GRÁFICA 2

Distribución de los poros nucleares en los cuerpos de cromatina de células granulosas de cerebelo de rata.



## DISCUSIÓN

Las observaciones directas de cortes aislados o seriados del núcleo de neuronas granulosas del cerebelo muestran que la cromatina compacta es una capa continua que se extiende por la cara interna de la envoltura nuclear y tiene prolongaciones hacia el interior del núcleo. El uso de Imagenia 5000 y de los programas de procesamiento tridimensional de la imagen desarrollados especialmente (López-Velázquez y col., 1996), nos han permitido aislar grumos de cromatina compacta a partir de las imágenes de series completas de cortes de núcleos.

La ausencia de límites visibles entre los grumos se debe a la superposición de los bordes de los cúmulos de cromatina compacta adyacentes en el espesor de los cortes. Una vez que se ponen de manifiesto los bordes y se individualizan los cúmulos, aparece el problema del reconocimiento de patrones repetitivos en la forma tamaño y distribución de esas estructuras. Como el núcleo de una neurona granulosa no mantiene una orientación especial con respecto a las otras neuronas granulosas, las series de cortes muestran distribuciones que pueden diferir entre sí por dos razones: una es que sean diferentes y la otra es que aún siendo muy similares la orientación de los cortes muestran perspectivas muy disímiles de masas parecidas. El uso de los programas de despliegue y rotación en tres dimensiones permitió comparar varias vistas de la distribución de la cromatina compacta en los diferentes núcleos.

A pesar de las variaciones del tamaño de los núcleos y de los cambios en el número de nucleolos, las similitudes entre las distribuciones de cromatina compacta

de los núcleos estudiados se ponen de manifiesto por la muy baja variación de la relación entre el volumen nuclear y el volumen ocupado por la cromatina compacta. La desviación estándar es 14 veces menor que la media ( $X = 0.583$ ,  $DE = 0.0414$ ). La observación de que el número promedio de bloques de cromatina compacta por núcleo ( $23 \pm 6$  DE) sea muy cercano al número haploide de cromosomas de la ratón (21), sugiere que cada grumo podría estar formado por la unión de dos cromosomas. Esta posibilidad se refuerza con los hallazgos anteriores de López-Velázquez y colaboradores (1996) que demuestran que los linfocitos de rata también tienen un número de grumos de cromatina compacta cercano a 21. En efecto en ese trabajo se encontraron  $22 \pm 4$ (DE) cúmulos de cromatina por núcleo en dichas células. Evidencias indirectas derivadas del uso de varias metodologías indican que los cromosomas homólogos están apareados en interfase o por lo menos que ocupan lugares muy cercanos en los núcleos de mamíferos (Cohen y Show, 1964; Goldman y col., 1977; Hadlaczky y col., 1986). El apareamiento somático fue descubierto por Metz (1916) en los núcleos interfásicos de Dípteros. Posteriormente algunos autores consideraron que ésta era una propiedad general de la distribución cromosómica interfásica (Comings, 1968). En las plantas también se ha encontrado apareamiento somático de cromosomas homólogos y se ha demostrado que el fenómeno es regulado por genes específicos (Westergaard 1964; Avivi y Feldman 1980). Sin embargo, la generalidad no es total pues en algunas plantas (Fussell 1977; Leitch y col., 1990) y en algunos animales (Cremer y col., 1982; Schardin y col. 1985; Ferguson y Ward, 1992; ver también la revisión de Hilliker y Appels, 1989), no se ha encontrado apareamiento de cromosomas

homólogos en interfase. En eritrocitos nucleados de *Triturus cristatus*, que son células con la cromatina extremadamente compacta, se encontró que cada grumo de cromatina interfásica corresponde a un cromosoma condensado (Murray y Davies, 1979). Este es también el caso del corpúsculo de Barr. Tanto estudios clásicos (Lyon, 1972) como modernos realizados empleando hibridación *in situ* (Schardin y col., 1985), demuestran que el mencionado cuerpo de cromatina corresponde a uno de los dos cromosomas X compactado de las hembras de los mamíferos. Sin embargo, este no es el caso de los grumos de cromatina de la mayoría de las células. Por ejemplo, la cromatina perinucleolar que se observa como un bloque único de cromatina, está formado por la asociación de las regiones centroméricas de varios cromosomas que contienen organizador nucleolar (Leger y col., 1994). Los grumos de cromatina de las neuronas granulares del cerebelo, así como los de los linfocitos previamente estudiados (López-Velázquez y col., 1996), no son tan compactos como los del tritón o como el corpúsculo de cromatina X y a diferencia de éstos, están perforados por canales que desembocan en los poros de la envoltura nuclear.

En las neuronas granulares cerebelosas como en los linfocitos (López-Velázquez y col., 1996), los cuerpos de cromatina compacta tienen tallas muy variables, los más pequeños probablemente no contengan un par de cromosomas o ni siquiera uno, mientras que los más grandes deben estar formados por la superposición de partes de varios cromosomas.

Los grandes cuerpos de cromatina que rodean al nucleolo son muy irregulares pero presentan un patrón de superficies curvas similar. Estas características cualitativas

de irregularidad y similitud son confirmadas por datos morfométricos. Efectivamente, el bajo valor del factor de forma y su escasa dispersión, medida por la desviación estándar ( $X = 0.132 \pm 0.026$  DE), demuestran la irregularidad y la similitud respectivamente. Belmont y cols., (1989) estudiaron los dominios estructurales en gran escala de la cromatina en estado interfásico y describen altos niveles de organización de la cromatina.

De los 467 cuerpos de cromatina individualizados en los veinte núcleos estudiados, 454, es decir el 97%, tienen contacto con la envoltura nuclear. En los linfocitos presentaron contacto con la envoltura nuclear el 91.7% del los grumos de cromatina compacta (López-Velázquez y col., 1996). Estos resultados apoyan la hipótesis emitida por Comings (1968, 1980) sosteniendo la existencia de asociaciones específicas entre la cromatina y la envoltura nuclear.

Numerosos trabajos proveen evidencias que apoyan que el núcleo interfásico de diferentes tejidos y en especial el sistema nervioso central (SNC) presentan diferentes organizaciones espaciales de la cromatina y sostienen que no son al azar (Manuelidis, 1984a,b; Manuelidis y Borden, 1988; Billia y de Boni, 1991; Holowacz y De Boni, 1991; De Boni, 1994; Mello, y cols. 1994). Los dominios específicos de los cromosomas en el núcleo interfásico de células eucarióticas tienen un arreglo ordenado en una gran variedad de organismos (Broccoli y Cooke, 1994).

Por otra parte, se ha encontrado que aparte de la rotación del núcleo en su conjunto, existen movimientos de la cromatina y del nucleolo (Pomerat y col., 1967; De Boni y Mintz, 1986; Hay y De Boni, 1991).

El presente estudio de la disposición tridimensional de la cromatina muestra similitudes estadísticamente significativas de la distribución de la cromatina

compacta, entre 20 núcleos reconstruidos totalmente. Además hay evidencias de la existencia de patrones repetitivos de la cromatina compacta en núcleos interfásicos de células animales como hepatocitos de rata (Esquivel y cols., 1989) y linfocitos de bazo de rata (Velázquez y cols., 1996).

Sin embargo esos resultados no aportan datos definitivos en relación a la teoría que sostiene que los cromosomas individuales de mamíferos ocupan territorios discretos en el núcleo interfásico (Haaf y col, 1991; Lichter y cols., 1988).

Por otra parte, se ha encontrado que determinados dominios cromosómicos, como el del centrómero, ocupan posiciones específicas dentro del núcleo (Moroi y cols., 1981; Manuelidis y Ward, 1984). La localización de cada dominio cromosómico parece que depende del tipo celular, el estado fisiológico y el estado de diferenciación de la célula. Esta compartimentalización territorial de los cromosomas puede tener un significado funcional durante la interfase (Cremer y cols, 1993). La observación de similitudes en la distribución de cromatina en células neuronales del hombre y el ratón (Manuelidis y Borden, 1988), ha reforzado el mencionado punto de vista que asocia la distribución espacial de los cromosomas a la función celular (Park y De Boni, 1992; Günter y cols., 1995).

La eficiencia de la tinción preferencial para ADN tienen bases muy distintas en las dos técnicas empleadas en este trabajo. La tinción con el ácido fosfotúngstico es empírica y es preferencial por el ADN en un rango de pH en el que existen tungstatos libre en la solución del mencionado ácido. A pH más alto estos tungstatos se reducen en gran proporción, se pierde la especificidad apareciendo numerosas estructuras celulares contrastadas densamente. Los tungstatos se combinan con los grupos básicos de las proteínas y con los compuestos

polihidroxílicos a diferentes pHs (Esquivel y col. 1987). En el caso del NAMA-Ur, como se dijo más arriba, la tinción preferencial se debe fundamentalmente al bloqueo de varios grupos que pueden reaccionar con el acetato de uranilo (Testillano y col. 1991).



## CONCLUSIONES:

Nuestros resultados suministran evidencias de la existencia de patrones repetitivos en la disposición de la cromatina compacta rechazando la posibilidad de que está dispuesta al azar.

El aislamiento de 23 cuerpos de cromatina durante la reconstrucción tridimensional espacial sugiere que pueden corresponder a pares de cromosomas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson D. J.** 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. Garland Publishing. Inc. New York & London. pp 95-106.
- Anderson T. F.** 1951. Techniques of preservation of three-dimensional structure in preparing specimens of the electron microscope. *Trans. NY Acad.Sci.* ( 2) 13:130-134.
- Avers Ch.**1991. *Biología Celular* .Segunda Edición.Grupo Editorial Iberoamericana. pp 533-748.
- Avivi L, and Feldman M.** 1980. Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus. *Hum. Genet.* 55: 281-295.
- Bachellerie J. P., Puvion E., and J. O. Zalta.** 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58:327-337.
- Bak A. L., Bak P., and J. Zeuthen.**1979. Higher levels of organization in chromosomes. *J. Theor. Biol.* 76: 205-207.
- Belmont S. A., Braundeld Michael B., Sedat W. J.,and Agard D. A.** 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma (Berl)* 98: 129-143.
- Bernhard W.** 1969. A new staining procedure for electron microscopical citology. *J. Ultrastruct Res.* 27:250-265.
- Billia F., and De Boni U.** 1991. Localization of centromeric satellite and telomeric DNA sequences in dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Cell. Sci.* 100:219-226.

- Bouteille M., Laval M., and Dupoy-Coin.** 1974. Mammalian Chromosomes. In *The Cell Nucleus* Vol.1 Chapt. 1 pp 3 ( Ed. H. Busch) . Academic Press N.Y.
- Bourgeois C. A., Hemon D., and Boutielle M.** 1982. Changes in the nucleolus during interphase in synchronized cells. *J.Ultrastruc. Res.* 81: 257-267.
- Bourgeois C. A., Laquierre F., Hemon D., Hubert H., and M. Boutielle.** 1985. New data on the in situ position of inactive X chromosome in the interphase nucleus of human fibroblasts. *Human. Genet.* 69: 122-129.
- Brasch K., and Setterfield G.** 1974. Structural organization of chromosome in interphase nuclei. *Exp. Cell. Res.* 83: 175-185.
- Broccoli D, and Cooke H.J.** 1994. Effect of telomeres on the interphase location of adjacent regions of the human X chromosome. *Exp. Cell Res.* 212: 308-313.
- Cohen M.M, and Shaw M.W.** 1964. Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.*32:386-395.
- Comings D. E.** 1968. The rationale for and ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Amer. J. Genet.* 20: 440-460.
- Comings D. E.** 1972. The structure and function of chromatin . *Adv. Hum. Genet.* 3: 237-421.
- Comings D. E.** 1980. Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum. Genet.* 53: 131-143.
- Cordunella L.** 1978. El nucleosoma. *Investigación y Ciencia.* 22: 44-53.
- Cremer T., Cremer C., Baumann H., Luedtke E.K., Sperling K., Teuber V.,and Zorn C.** 1982. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in

Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV microbeam experiments. *Hum. Genet.* 60:46-56.

**Cremer T., Kurz A., Zurbel R., Dietzel S., Rinke B., Scherthan H., Ried T., Cremer C., and Lichter P.** 1993. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* .63: 777-792.

**Darnell J., Lodish H., and Baltimore D.** 1990. *Molecular Cell Biology. Evolution and the cell theory.* Scientific American Books. Second Edition. pp 1-15

**Daskal Y.** 1981. Perichromatin granules. In *The Cell Nucleus*.8:117-137. ( Ed. H. Busch.). Acad. Press Inc. N. Y.

**De Boni U.** 1994. The interphase nucleus as a dynamic structure .*Int. Rev. of Cytology* .150: 149-171.

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

**Derenzini M., and Farabegoli F.** 1990. Selective staining of nucleic acids by osmium-amine Complex in thin section from lowicryl-embedded samples. *J.Histochem. Cytochem.*38(10):1495-1501.

**De Robertis E. D. P.,and De Robertis E. M. F.** 1986. *Biología Celular y Molecular* .11 ed.. El Ateneo. pp 1 339.

**Díaz Z.C., y Hicks J. J.** 1988. *Bioquímica e Inmunología.Regulación de la expresión genética.* 1:578-749.

- Du Praw E. J.** 1965a. Macromolecular organization of nuclei and chromosomes: a folded fibre model based on whole montent electron microscopy. *Nature*.206 :338-343.
- Du Praw E. J.** 1965b. The organization of nuclei and chromosomes in honeybee embrionic cells.*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*53:153-161.
- Du Praw E.J.** 1966. Evidence for a “folder fiber”, organization in human chromosomes. *Nature*.209: 577-581.
- Echeverría O. M., Zavala G., Benitez A., and Vázquez Nin G.H.** 1980. Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cell*.39: 139-142.
- Esquivel C.** 1988. Estudio de la Disposición de la Cromatina en Núcleos Interfásicos de Hepatocitos .Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias .U.N.A.M. México.
- Esquivel C., Rovira P., Echeverria O., and Vázquez Nin G. H.** 1987. A simple staining method for chromatin compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy* 21: 103-110.
- Esquivel C., Vázquez Nin G.H., and Echeverria O.** 1989. Evidence of repetitive patterns of chromatin distribution in cell nuclei of rat liver. *Acta Anatomica*. 136: 94-98.
- Evans K. J., and W. G. Fillion.** 1982. The Distribution of chromatin in the interphase nucleus of *Zebrina pendula*. *Can. J. Gen. Cytol.* 24: 583-591.
- Fakan S. E., and Puvion E.** 1976. Localization and characterization of newly synthesited nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exptl. Cell Res.* 99: 155-164.

- Fakan S. E., and Puvion E.** 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65: 255-300.
- Ferguson M., and Ward D.C.** 1992. Cell cycle dependent movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101:557-565.
- Feulgen H. R. and Rossebeck H.Z.** 1924. Mikroskopischchemischer nachweis einer nucleinsure von typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernen in mikroskopischen. *Hoppe- Seyler's Z. Phys. Chem. Präparaten.* 135: 203-248.
- Franke W.W., and Scheer U.** 1970. The ultrastructure of the nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Ultrastruct. Res.* 30: 288-316.
- Franke W. W., and Scheer U.** 1974. Structures and functions of the nuclear envelope. In *the Cell Nucleus.* 1:244-256 ( H. Busch). New York London, Academic Press.
- Frenster J. H., Alfred V. G., and Mirsky A.E.** 1963. En: *Biología Celular:Núcleo Interfásico.* pp 87- 533. Du Praw (1971).
- Fussell C.P.** 1977. Telomere associations in interphase nuclei of *Allium cepa* demonstrated C-banding. *Exp. Cell Res.* 110:111-117.
- Gautier A., and Schereyer M.** 1970. Feulgen like electron stains for tissue sections. *Congr. Inter. Microsc. Electron.* pp 559-560.
- Getzenberg R. H.** 1994. Nuclear matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. *J. Cell Biochem.* 55: 22-31.

- Goldman I.L., Zolotarev V.M., and Vasileva S.F.** 1977. The space location of chromosomes in the somatic cell nuclei. IV. Homologous chromosomes in guinea pig and domestic pig cells. *Tsitologija* 19:855-863.
- Günter Wolf, Michael Beil, and Hans Guski.** 1995. Chromatin structure analysis based on a hierarchic texture model. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 17,Nº 1:25-34.
- Haaf T., Hayman D. L., and Schmidt M.** 1991. Chromosomes topology in mammalian interphase nuclei. *Exp. Cell. Res.*192:325-332.
- Hadlaczky G. Y., Went M. and N. R. Ringertz.** 1986. Direct evidence for the non random localization of mammalian chromosomes in the interphase nucleus. *Exp. Cell. Res.* 167: 1-15.
- Hay M., and De Boni U.** 1991. Chromatin motion in neuronal interphase nuclei. *Cell. Motil. Cytoskel.* 18: 63-75.
- Heitz E.** 1928. Das heterocromatin der moose. *Jahrb. Wiss. Botan.* 69: 762-819.
- Hilliker A.J., and Appels R.** 1989. The arrangement of interphase chromosomes: structural and functional aspects. *Exp. Cell Res.* 185:297-318.
- Holowacz T.,and De Boni U.**1991. Arrangement of kinetochore protein and satellite DNA in neuronal interphase nuclei: changes induced by gamma-aminobutyric acid (GABA). *Exp Cell Res.* 197: 36-42
- Hozak P.** 1995. Catching RNA polymerase I in flagranti: ribosomal genes are transcribed in the dense fibrillar component of the nucleolus. *Exptl. Cell Res.* 216: 285-289.

**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 protocists. *Biosystems*. 22: 103-116.

**Jiménez García L.F., and Spector D.L.** 1993. In vivo evidence that transcription and pre-mRNA splicing are coordinated by recruiting mechanism. *Cell*.73: 47-60.

**Karp G.** 1996. *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments.*

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

**Lamond I A, and W. C. Earnshaw.** 1998. Structure and function in the nucleus. *Science*. 280;24 april, 547-553.

**Leger I., Guillaud M., Krief B., and Brugal G.** 1994. Interactive computer-assisted analysis of chromosome I colocalization with nucleoli. *Cytometry*. 16:313-323.

**Lehninger A.L.** 1979. *Biochemistry* Worth Publisher. Inc. New. York. pp 629-768.

**Leitch A.R., Mosgöller W., Schwarzacher T., and Bennett M.D.** 1990. Genomic in situ hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J. Cell Sci.* 95:335-341.

**Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., and Ward D. C.** 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234.



- López Velázquez G.** 1993. Estudio Computarizado de la Disposición Tridimensional de la Cromatina Compacta en Núcleos Interfásicos de Linfocitos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- López Velázquez G., Márquez J., Ubaldo E., Corkidi G., Echeverría O., and Vázquez Nin G. H.** 1996. Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nucleus of G0 rat lymphocytes. *Histochem. Cell. Biol.* 105:153-161.
- Lyon M.F.** 1972. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47:1-35.
- Manuelidis L.** 1984a. Active nucleolus organizers are precisely positioned in adult central nervous system cells but not in neuroectodermal tumor cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43: 225-241.
- Manuelidis L.** 1984b. Different central nervous system cell type display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3123-3127.
- Manuelidis L.** 1990 A view of interphase chromosomes. *Science* 250: 1533-1540.
- Manuelidis L., and Borden J.** 1988. Reproducible compartmentalization of individual chromosome domain in human C.N.S. cell revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* 96: 397-410.
- Manuelidis L., and Ward D. C.** 1984 Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81: 3123-3127.

- Mello M. L. S., Vidal B. D., Planding W., and Schenck U.** 1994. Image analysis: video system adequacy for the assortment of nuclear phenotypes based on chromatin texture evaluation. *Acta Histochem. et Cytochem.* 27: 23-31.
- Miescher F.** 1871. Hoppe Seyler. *Med. Chem. Untersuch.* 4: 441. Translation (1955). In "Great Experiments in Biology". (M. Gabriel and S. Fogel, eds.). p 233. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. New Jersey.
- Mirsky A. E., and S. Osawa.** 1961. The Interphase nucleus. In *The Cell* .2:677-770 Cap. 10 (Brachet J., and Mirsky A.E. Eds). Academic Press N. Y.
- Mirsky A. E., and Ris H.** 1948. El núcleo Interfásico. En *Biología Celular y Molecular*. pp 87-533. Du Praw. 1971. Ediciones Omega.
- Mirsky A. E., and Ris H.** 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.* 34: 475- 482.
- Mirsky A. E.** 1968. The discovery of DNA. *Sci. Amer.* 218: 87-88.
- Mitchell J. S** 1960. In "The Cell Nucleus". (H. Busch). Academic Press. New York.
- Moens P. B., and Church K.** 1977. Centromere sizes positions and movements in the interphase nucleus. *Chromosoma* .61: 41-48.
- Monneron A., and Bernhard W.** 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrast Res.* 27: 266-288.
- Moroi Y., Hartman A. L., Nakane P. K., and Tan E.M.** 1981. Distribution of kinetochore (centromere) antigen in mammalian cell nuclei. *J. Cell. Biol.* 90: 254-259.
- Morton-Bradbury R.** 1978. La chromatine. *La Recherche* 9(91): 644-653.

- Moreno A. R., and Schwartzman B.** 1978. Principios de Biología Celular. El Ateneo. Buenos Aires.pp 216.
- Moyne G.** 1972. Une methode cytochimique de mise en évidence del'ADN á l'usage de la microscopie electronique. C.R. Acad. Sc. Paris D. 274: 247-250.
- Murray A. B., and H. G. Davies.** 1979. Three-Dimentional reconstruction of the chromatin bodies in the nuclei of mature erythrocytes from the newt *Triturus cristatus*. The number of nuclear. envelope attachment sites. J. Cell. Sci. 35: 59-66.
- Newport J. W.,and Forbes D. J.** 1987. The nucleus structure function and dynamics. Annu. Rev. Biochem. 56: 535-565.
- Pardon J.F., and Richards B.M.** 1979. Physical Studies of Chromatin. In The Cell Nucleus. Busch H. Ed. Academic Press New York. Vol 7 pp. 371-412.
- Park P. C., and De Boni U.** 1992. Spatial rearrangement and enhanced clustering of kinetochores in interphase nuclei of dorsal root ganglion neurons in vitro. Association with nucleolar fusion. Exptl Cell Res. 203: 222-229.
- Peachey D. L., and Heath P. J.** 1989. Reconstruction from stereo and multiple tilt electron microscope images of thick sections of embedded biological specimens using computer graphic methods. Journal of Microscopy .Vol.153. Pt 2 pp193-204.
- Peters V. D., and Giese H.** 1971. Electronemikroskopischer Nachweis von DNS. Acta Histochem. 40:119-125.
- Pomerat C. M., Hendelman W. J., Raiborn C., Massey J. F.** 1967. In the neuron. H. Hyden De. (Elsevier, New York).pp 119-173.
- Rabl C.** 1885. In " Morphologisches Jahrbuch". (C. Gegangaur ed.). 10: 214-330.

- Riss H.** 1955. In the Submicroscopic structure of Chromosomes. Symposium on the Fine Structure of Cells. Leiden Holland. pp121. Willey (Interscience ).
- Roger M.S.** 1988. A simple method for collecting and mounting ribboned serial sections of epoxy embedded specimens. *Stain .Technology* 63: 23-26.
- Schardin M., Cremer T., Hager H. D., and Lang M.** 1985. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster X man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Human. Genet.* 71:281-285.
- Sippel A.E., Schafer G., Faust N., Saveressig H., Hecht A., and Bonifer C.** 1993. Chromatin domains constitute regulatory units for the control of eukaryotic genes. *Cold Spring Harb Sym Quant Biol.* 58: 37-44.
- Stack S.M., Brown D. B., and W.C. Dewey.** 1977. Visualization of interphase chromosomes. *J. Cell. Sci.* 26: 281-299.
- Swift H.** 1962. In " The interpretation of ultrastructure". (R. J. C. Haris ed.) 1: 213-228. Academic Press New York.
- Tajima Y., Kato K., Utsumi N., and Hosoi K.** 1994. Computer-aided image analysis applied to imunogold-silver staining evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) reactive sites in paraffin section. *Histochem.* 102:177-181.
- Takeuchi Y. K., and Takeuchi Y. K.** 1984. Interchromatin granules in the dividing embrionic ectoderm cells of postimplantation rat embryos: an electron microscopic silver-staining study. *J. Electron. Microsc.* 33: 151-159.
- Taylor J. H.** 1960. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of chinese hamster. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 455-464.

- Testillano P. S., Sánchez-Pina M. A., Olmedilla A., Ollacarizqueta M. A., Tandley C. J., and Risueño M. C.** 1991. A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J. of Histochem. & Cytochem.* 39(10):1427-1438.
- Tsanev R, and Petrov P.** 1976. The substructure of chromatin and its variations as revealed by electron microscopy. *J. Microsc. Biol. Cell.* 27: 11-18.
- Van Holde K. E., Sahasrabodde C.G., and Schaw B.R.** 1974. A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res.* 1: 1579 \*.
- Van Velthoven R., Petein M., Zlotta A., Oosterlinck W.J., Van Der Meijden A., Zandona C., Roels H., Pasteels J.L., Schulman C., and Kiss R.** 1994. Computer-assisted chromatin texture characterization of Feulgen-stained nuclei in a series of 331 transitional bladder cell carcinomas. *J. Pathol.* 173: 235-242.
- Vázquez Nin G. H., and Bernhard W.** 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatinian and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36: 842-860.
- Vázquez Nin G. H., Chávez B., and C. Tomás Martín.** 1973. A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie.* 16: 243-246.
- Vázquez Nin G., Echeverría O. M., Molina E., and Frago 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 ribonucleoproteic constituents of the nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat.* 102: 308-318.

- Vázquez Nin G. H., Ortega Rangel J. A., Echeverría O. M.** 1980. Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell.* 39: 143-146.
- Vázquez Nin G.H., Ortega Rangel J.A., Echeverría O. M., Parra M.R., and Jiménez-García L.F.** 1983. Changes in the nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *Biol. Cell.* 48: 17-24.
- Vázquez Nin G. H., and Echeverría O. M.**1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40: 7-16.
- Vendrely R.** 1955. In "The Nucleic Acids". ( E. Chargaff and J. Davison eds.) 2:155. Academic Press New York.
- Visa N., Puvion-Dutilleul F., Bachellerie J.P., and Puvion E.** 1993. Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution in situ hybridization: a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60:308-321.
- Walker P R., and M. Sikorska.** 1987. Chromatin structure further evidence against the existence of a beaded subunit for the 30 nm fiber. *J. Biol. Chem.* 262(25): 12218-12222.
- Wassef M.** 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 121-133.

- Watson M. L.** 1962. Observations of a granule associated with chromatin in the nuclear of cells of rat and Mouse. *J. Cell Biol.* 13: 162-167.
- Watson J.D., and Crick F.H.G.** 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171: 737-964.
- Weimer R., Haaf T., Krüger J., Poot M., and Schmid M.** 1992. Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in GO, G1, S, G2, and early S phase in human lymphocytes. *Hum. Genet.* 88: 673-682.
- Westergaard M.** 1964. Studies on the mechanism of crossing over. 1. Theoretical considerations. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* 34:359:405.
- White L., Wain., Sandra C., Harbuck, and Noble L.W.** 1994. Demostration of nucleolar organizer region associated protein. Utility of Bielschowsky stain and Counter stains. *J. Histotechnology* 17: 99-103.
- Wilson G.B., and Morrison J.H.** 1976. *Cytology.* Reinhold Pub. Corp.
- Wilkins M. H. F., Stokes A. R., and Wilson H. R.** 1953. Molecular structure of deoxyntose nucleic acids. *Nature.*171:738.Cap. XII.
- Woodcock C. L., Bruce F. M., and Frank J.** 1991. Ultrastructure of chromatin three-dimentional reconstruction of isolated fibers. *J. Cell Science.* 99: 107-114.
- Yakura K., Fukuei K., and Tani Fuji S.** 1978. Chromatin subunit structure in different tissues of higher plant. *Plant and Cell Physiol.* 19:1381-1390.
- Yamada M., and Yoshida S.** 1972. Graphic stereo reconstruction of serial section. *J. Microsc.* 95: 249-256.
- Yoshifumi Tajima, Kohtaro Kato, Nobuo Utsumi, and Kazuo Hosoi.**1994. Computer-aided image analysis applied to immunogold- silver staining: evaluation of

proliferating cell nuclear antigen (PCNA) - reactive sites in paraffin sections. Histochemistry 102:177-181.

**Zavala G. , Aguilar X. , Jiménez L. F., Echeverría O. M, and Vázquez Nin G.**1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during the differentiation of muscle cells in the chick embryo. Biol. Cell.76:159-165.

**Zuccotti M., Piccinelli A., Rossi P., Garagna S., and Redi C. A.** 1995. Chromatin organization during mouse oocyte growth. Mol. Rep. Devel.41: 479-485.



## Pies de Figuras

Figuras 1 y 1A. Células granulosas del cerebelo contrastadas con el método del ácido fosfotúngstico. La figura 1 muestra una vista de pequeño aumento de la capa granulosa del cerebelo donde se advierte que la cromatina está mucho más densa que el resto de los componentes celulares. 6000 X. En la figura 1 A se observa la distribución de la cromatina a mayor aumento. La cromatina laxa se ve como fibras delgadas que se extienden desde los grumos compactos por el espacio intercromatiniano. La cromatina perinucleolar forma un anillo incompleto alrededor del nucleolo, que aparece gris homogéneo. 28500 X.

Figuras 2 y 2A. Imágenes generadas por la computadora en diferentes etapas de procesamiento previo al análisis tridimensional.

La figura 2 muestra los grumos de cromatina que se han separado unos de otros por erosión de algunos píxeles y han sido marcados con colores diferentes.

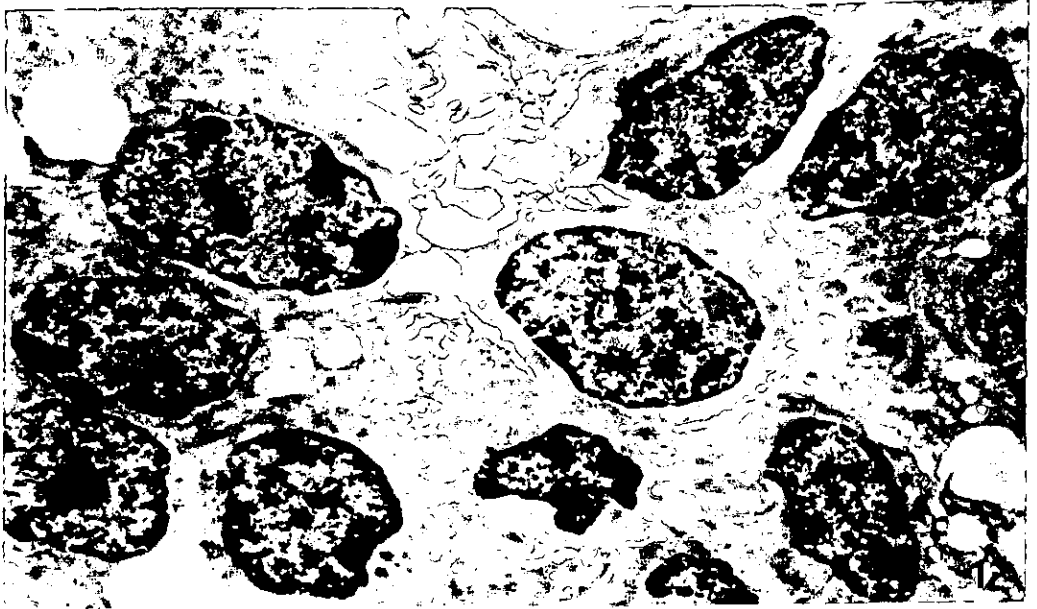
La figura 2A muestra una serie de cortes virtuales perpendiculares a los cortes reales producidos físicamente por el ultramicrotomo. En estas imágenes se ha restaurado la parte erosionada.

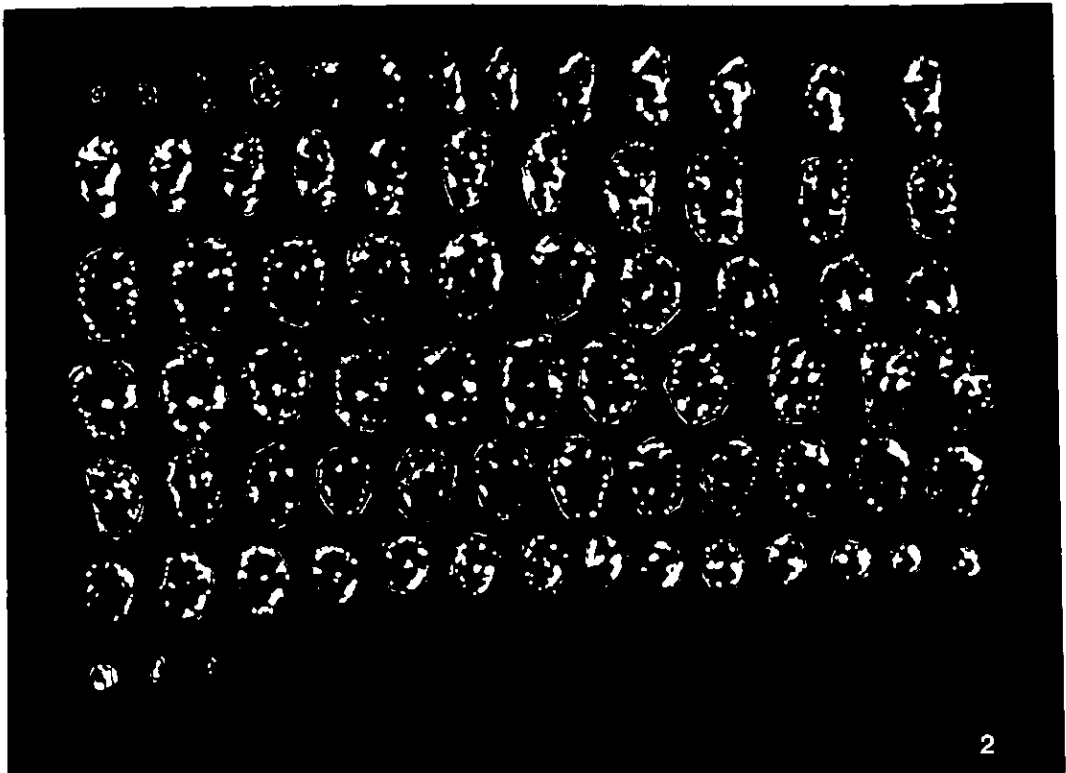
Figura 3. Mapa de la superficie de un núcleo de neurona granulosa del cerebelo mostrando las áreas de contacto de cada grumo de cromatina compacta marcado

con el color adjudicado por la computadora. Los poros nucleares aparecen en gris claro. El ancho aumenta al separarse del ecuador y es máximo en los polos. Esto se debe al procedimiento utilizado para pasar una superficie tridimensional a un plano.

Figura 3A. Imagen de la superficie del esferoide nuclear. Las áreas de colores corresponden a las superficies de contacto de los cuerpos de cromatina densa. Los poros aparecen en gris claro.

Figuras 4A a 4F. Reconstrucciones tridimensionales de grupos de grupos de cromatina compacta etiquetados con diferentes colores.





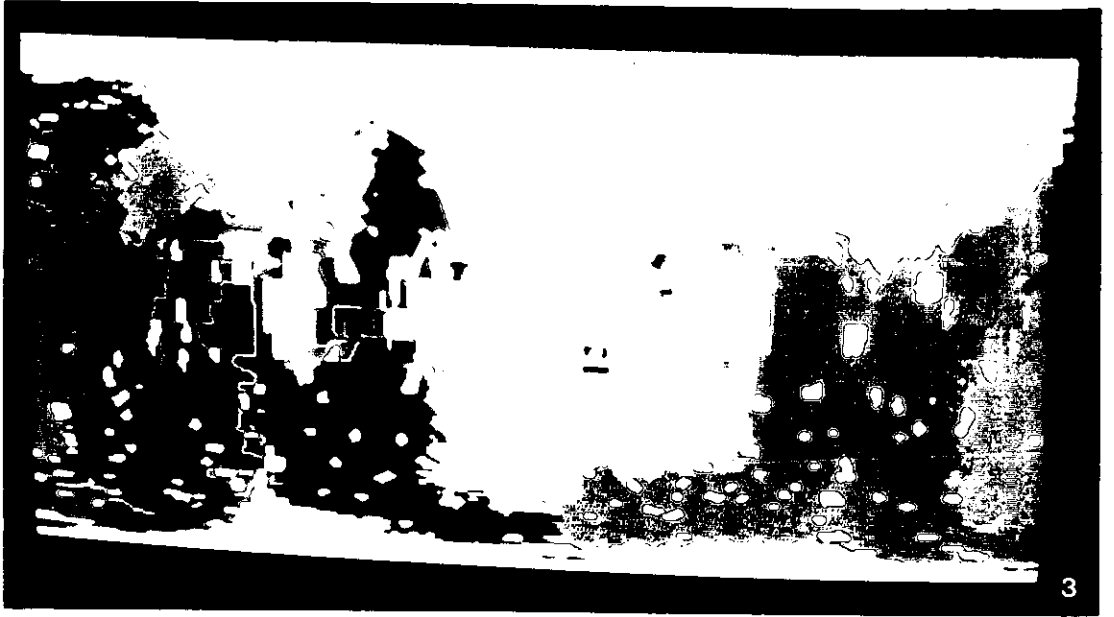
2

**EROSIÓN DE LA CROMATINA COMPACTA**

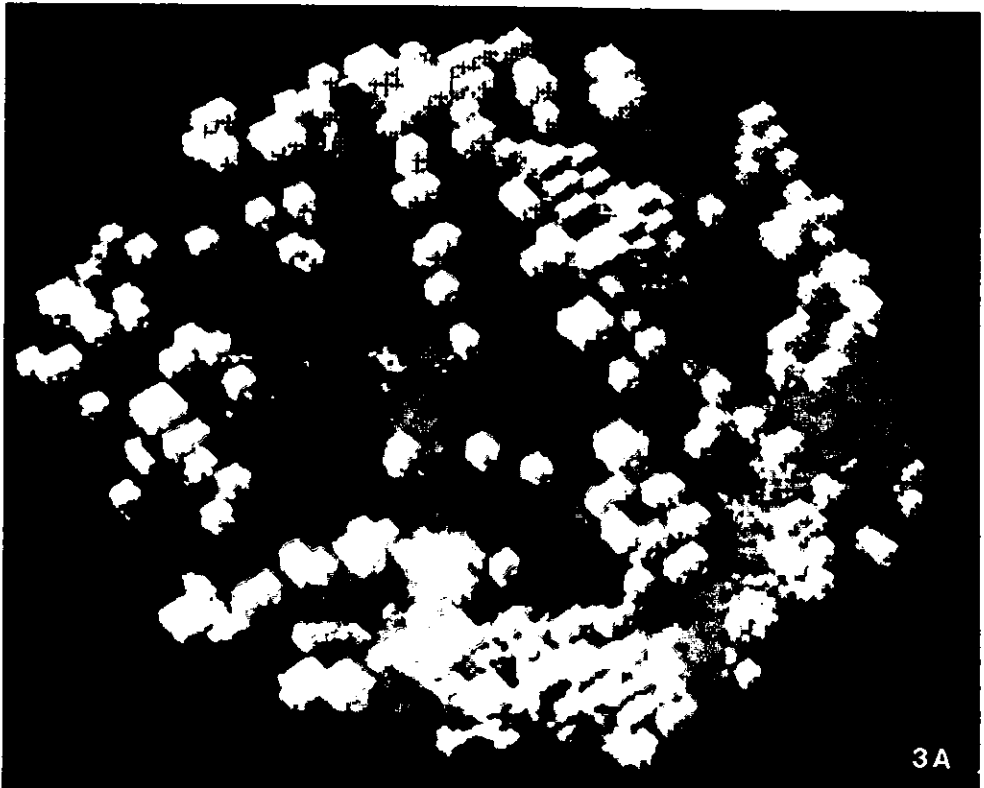


2A

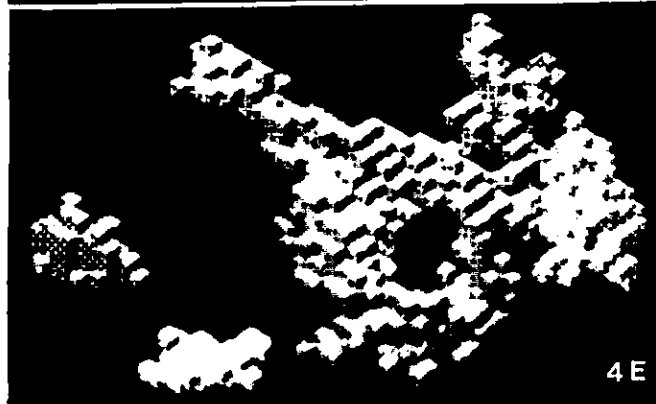
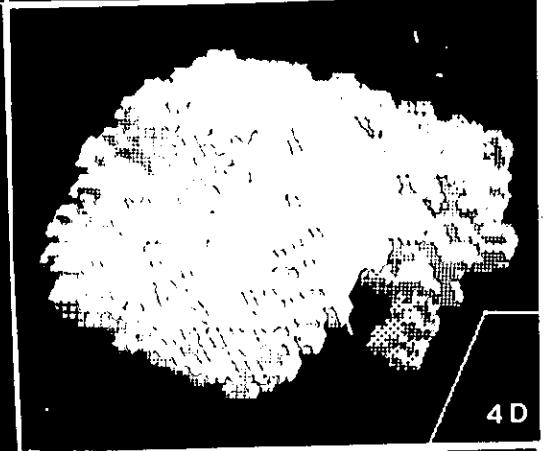
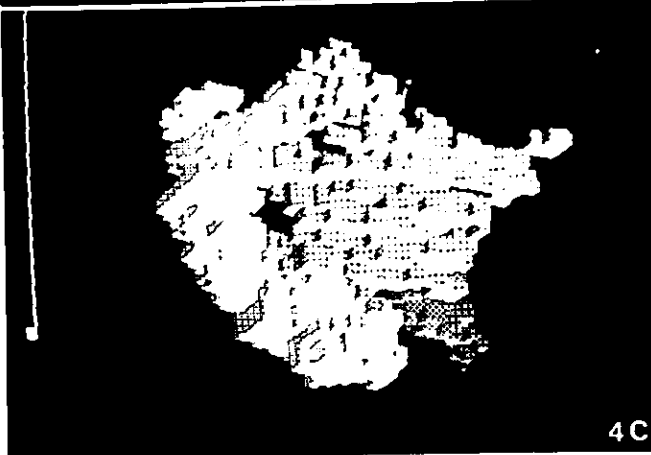
**SEGMENTACIÓN Y ETIQUETADO AUTOMÁTICO DE LA CROMATINA**



**MAPAS DE SUPERFICIE NUCLEAR CON DISPOSICIÓN  
DE POROS**



**RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE TODOS  
LOS CUERPOS DE CROMATINA CON  
DISPOSICIÓN DE LOS POROS NUCLEARES**



**RECONSTRUCCIONES PARCIALES DE CUERPOS DE CROMATINA**