

4/25
Dupl.
R. 18123

ESTUDIO Y RELACIONES
DE LA HETEROCROMATINA
ASOCIADA AL NUCLEOLO
EN NEURONAS DE RATON

Antonio Rios Guadix

Tesis Doctoral

4/75

R. 32.353

estudio y relaciones
de la heterocromatina
asociada al nucleolo
en neuronas de raton



ESTABLISHED BY THE
AMERICAN PEOPLE
FOR THE PURPOSE OF
PROTECTING THE INTERESTS OF

R. 32,353

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

Departamento de Citología e Histología

ESTUDIO Y RELACIONES
DE LA HETEROCROMATINA
ASOCIADA AL NUCLEOLO
EN NEURONAS DE RATON

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613518288
N.º Copia 615488172

Trabajo presentado por
Antonio Rios Guadix,
Licenciado en Ciencias
Biológicas, para optar
al grado de Doctor.

Esta TESIS DOCTORAL fue presentada por D. ANTONIO RIOS GUADIX en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Fué dirigida por el Prof. Dr. D. Francisco Abadía Fenoll, Catedrático del Departamento de Citología e Histología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Leida el dia 3 de Abril del 1976 ante el Tribunal constituido por los Profesores:

PRESIDENTE: Dr. D. Luis Esteban Carrasco

VOCALES: Dr. D. Fernando Marín Girón
Dr. D. Jorge Fernández López Sáez
Dr. D. Eduardo GARCÍA Peregrín

SECRETARIO: Dr. D. Francisco Abadía Fenoll

Obtuvo la calificación de Sobresaliente Cum Laude.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Abadía Fenoll', written in a cursive style. The signature is positioned below the text of the thesis and is partially obscured by a horizontal line.

FRANCISCO ABADIA FENOLL, Cate-
drático y Director del Departa
mento de Citología e Histología
de la Facultad de Ciencias

CERTIFICO:

Que el presente
trabajo ha sido realizado, bajo
mi dirección, en éste Departameno
to.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Abadia Fenoll', written over a horizontal line.

A mi Familia

A Carmen

A todos aquellos
que anduvieron a mi lado
una parte del camino

Agradezco al Prof. F. Abadía Fenoll, Catedrático y Director del Departamento de Citología e Histología, la dirección de este trabajo, así como el interés mostrado, en todo momento, por el desarrollo del mismo.

Así mismo, mi agradecimiento a mis compañeros del Departamento de Citología e Histología por su ayuda prestada, y a Ma^a del Carmen Moreno Arenas por la confección del manuscrito.

El hombre no escapa al terrible aburrimiento del deber monótono y banal, mas que enfrentándose con las ansiedades y la tensión interior de la creación.

(Teilhard de Chardin;
el Medio Divino)

INDICE

INTRODUCCION

- Introducción.....	1
- Conceptos básicos sobre el material objeto de estudio.....	4
- Variabilidad de los diferentes tipos de Heterocromatina.....	17
- Métodos de estudio actuales.....	22
- Estudios sobre Heterocromatina en células nerviosas.....	30
- Situación actual de los conocimientos acerca de la estructura objeto de estudio.	38
- Plan de trabajo.....	47

MATERIAL Y METODO

- Material empleado.....	49
- Procesamiento del material para las diferentes técnicas.....	53
- Técnicas de tinción y tratamientos efectuados.....	57
- Medios de observación y procedimientos empleados.....	69

RESULTADOS

- Resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas de tinción.....	73
- Peculiaridades del proceder técnico.....	79
- Resultados encontrados tras la realiza- ción de los diferentes tratamientos efec- tuados.....	83
- Observaciones sobre la morfología de la Heterocromatina neuronal asociada al - nucléolo.....	93
- Valores de los parametros analizados.....	98

- Resultados cuantitativos encontrados en cada población celular analizada.....	113
- Resultados comparativos entre ambas poblaciones.....	134

DISCUSION Y COMENTARIO

- Comentario al procedimiento técnico.....	141
- Discusión y comentario de los resultados cualitativos.....	157
- Comentario y discusión de los resultados cuantitativos.....	170

CONCLUSIONES

- Conclusiones.....	180
---------------------	-----

BIBLIOGRAFIA

- Bibliografía.....	190
---------------------	-----

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La significación del núcleo como lugar de ordenación y regulación de la múltiple actividad celular viene marcada, en definitiva, por la presencia en él del DNA, material genético organizado bajo la forma de cromosomas. Este material cromosómico aparece en los núcleos de las células interfásicas formando estructuras visibles, por su condensación -la denominada Heterocromatina-, ó de manera desespirilizada, extendida, -la llamada Eucromatina-, no apreciable morfológicamente. La configuración heterocromática constituye una forma no activa de las porciones genómicas que la presentan; mientras que la eucromática es un reflejo de la actividad que tiene lugar en esos niveles, realizada fundamentalmente bajo la forma de transcripción en RNA. El estudio morfológico y funcional de éstas dos fracciones cromáticas es un punto clave para el conocimiento del grado de actividad nuclear y, por ende, del índice de diversidad en la actividad celular pudiendo reflejarse la amplitud y multiplicidad de ésta en las proporciones nucleares de ambas fracciones.

En el conocimiento del modo en que el Sistema Nervioso realiza su actividad, el estudio del mecanismo íntimo de funcionamiento de sus unidades básicas -las neuronas- constituye un punto primordial de investigación. En éste aspecto, el núcleo neuronal, como lugar de control de ésta actividad, interesa para la profundización en el conocimiento sobre su estructuración y mecanismos de actuación; profundización realizada actualmente desde campos muy diversos y cuyos resultados serán definitivos para llegar a comprender el funciona-

miento neuronal desde sus niveles más básicos.

Los estudios sobre la Heterocromatina neuronal reunen en si la confluencia de éstas líneas de investigación, que se encuentran actualmente entre las de vanguardia de las inquietudes citológicas: por un lado, las investigaciones sobre la organización, características y composición de las estructuras heterocromáticas nucleares, como mecanismo para acceder a la comprensión de su significado e intervención en la vida celular; de otro, las investigaciones acerca de la relación entre los componentes diversos y la actividad general de los núcleos neuronales, que nos conduzcan hacia un mejor conocimiento de como la neurona realiza su especialísima función de integración y ordenamiento.

En éste campo, hemos pretendido abordar uno de los aspectos con la realización del presente trabajo. Para ello, hemos centrado nuestro estudio en uno de los tipos de Heterocromatina neuronal que, por su peculiar localización y amplitud, parece que podrá aportar datos sobre el esclarecimiento de éstos problemas, concretamente se trata de la Heterocromatina asociada al Nucléolo.

CONCEPTOS BASICOS SOBRE EL MATERIAL
OBJETO DE ESTUDIO.-

Aunque ya en el siglo XIX se había observado en el interior del núcleo celular la existencia de estructuras densamente teñidas, en formas variables (manchas, condensaciones, filamentos, etc), no fué hasta 1928 cuando se introdujo el término "Heterocromatina" para designarlas. Fué Heitz quién, estudiando materiales vegetales, estableció las relaciones de éstas estructuras con los cromosomas celulares, al tiempo que introducía el término, adscribiendo a la heterocromatina una serie de características peculiares (Heitz, 1928, 1931, 1933, 1934). Desde éstas fechas, ya lejanas, hasta nuestros días, los estudios sobre heterocromatina se han multiplicado hasta constituir uno de los campos más abordados en la investigación de la estructura y funcionamiento celular.

De acuerdo con las ideas de Heitz, la heterocromatina correspondía a cromosomas, ó regiones cromosómicas, que quedaban en estado denso y empaquetado durante la interfase. Por ello se ponen de manifiesto con las técnicas habituales de colorantes básicos, ó las destinadas a la demostración del material cromosómico, como la clásica reacción de Feulgen para el DNA; de manera que la heterocromatina aparece durante la interfase como "regiones cromosómicas que forman masas de material Feulgen positivo" (Schultz, 1947).

De ésta forma se establecía una diferencia dentro del material que constituía los cromosomas (cromatina); existiendo partes de éstos cromosomas, ó cromosomas enteros, que

sólo aparecían condensadas durante los procesos de división celular (Mitosis y Meiosis), y al comenzar de nuevo la interfase se desempaquetaban; mientras otras partes cromosómicas permanecían condensadas a lo largo de todo el ciclo celular (Interfase y etapa de división). Estos distintos materiales cromosómicos se denominaron "Eucromatina" (EC) y "Heterocromatina" (HC) respectivamente. Ya desde el comienzo se comprobó que el nucléolo no pertenecía a éste tipo de material heterocromático, formando una entidad aparte en las estructuras que conformaban el núcleo interfásico (Heitz, 1956).

La imagen de un núcleo interfásico queda establecida por el nucléolo (ó los nucléolos), y las regiones heterocromáticas de los cromosomas (visibles en forma de condensaciones de aspecto variable), mientras que las regiones eucromáticas no serán observables por su descondensación. En el período de división, sin embargo, el nucléolo desaparecerá y las regiones eucromáticas y heterocromáticas aparecerán condensadas para ofrecer la estructura e imágenes típicas de los cromosomas mitóticos ó meióticos.

Estudios sobre HC han sido realizados tanto durante la interfase celular (Andrew y Andrew, 1944; Karnkowska-Gorska, 1960; Taylor, 1960; Galton y col., 1965; Fraccaro y col., 1965; Tiepolo y col., 1967; entre otros), como durante el período de división (Heitz, 1935; Lima-de-Faria, 1950; 1961; Vosa, 1970; Rowley y Bodmer, 1971; Summer y col. 1971,

entre otros). Los primeros conducen a establecer patrones heterocromáticos de los distintos tipos celulares en relación a su mayor o menor abundancia y a la morfología de éstas estructuras, mientras los segundos conducen al conocimiento de la localización cromosómica de éstas zonas heterocromáticas.

Las características adscritas a las regiones heterocromáticas solo establecen, con respecto a las eucromáticas, una diferencia de comportamiento, y no de naturaleza.

La HC no sería una sustancia específica, sino un estado característico de la propia cromatina, diferente del eucromático (Brown, 1966). Tanto la EC como la HC estarían organizadas bajo las mismas bases estructurales, pero se diferenciarían en cuanto a su comportamiento (espirilización) a lo largo de las distintas etapas del ciclo celular. Una observación en apoyo de ésta idea es el hecho de que la HC no aparece en todos los estadios del desarrollo, faltando generalmente en las etapas embrionarias (Brown, 1966). La HC aparece, por tanto, como una respuesta particular al desarrollo de ciertas regiones cromosómicas que mantienen su estructura condensada a partir de cierto momento.

El fenómeno de "Heteropicnosis negativa" que presentan ciertas regiones cromosómicas (White, 1945) no parece guardar relación con la HC (Schultz, 1947). El término de heteropicnosis negativa se introdujo para designar el -

comportamiento peculiar de algunas zonas cromosómicas que aparecían durante los períodos de división, más claras que el resto del cromosoma. Según Shultz éste fenómeno no sería el opuesto al proceso de heterocromatinización (que también ha sido denominada "Heteropicnosis positiva"), como se creyó durante algún tiempo, sino que es independiente de la naturaleza eucromática ó heterocromática de la región que lo presenta, obedeciendo su aparición a causas distintas. Análisis espectrofotométricos de la concentración de DNA en las zonas heterocromáticas muestran que existe tres veces más cantidad de ácido desoxirribo nucleico en éstas zonas que en las eucromáticas (Lima-de-Faria, 1959); sin embargo éstos mismos análisis aplicados a las regiones que presentan heteropicnosis negativa demuestran que no hay una diferencia apreciable en la concentración de DNA de éstos segmentos con respecto a los eucromáticos (Woodward y Switt, 1964; Woodward, Gorowsky y Swift, 1966).

Una característica de las regiones heterocromáticas de los cromosomas es la de duplicar su DNA más tardíamente que las zonas eucromáticas en el período de síntesis durante la Interfase. Las primeras observaciones de éste fenómeno fueron realizadas por Lima-de-Faria en *Melanoplus differentialis* (Lima-de-Faria, 1959) y ha sido comprobado después en diversos trabajos (Pelc y La Cour, 1960; Karnkowska-Gorska, 1960; Taylor, 1960; Schmid, 1967; Tiepolo y col., 1967), apareciendo como un hecho general de las zonas heterocromáticas. Sin embargo el inverso no siempre parece ser

cierto; es decir no todas las zonas cromosómicas que repliquen su DNA tardíamente tienen que ser heterocromáticas (Lima-de-Faria y Jaworska, 1968).

Aunque a priori cualquier región cromosómica podría presentarse como heterocromática, se ha comprobado que no todas ofrecen ésta característica con la misma frecuencia. Así las zonas de los cromosomas que más frecuentemente aparecen como heterocromáticas son las próximas a los centrómeros (HC centromérica), las que ocupan los extremos de los brazos cromosómicos (HC telomérica) y las adyacentes a la región organizadora del nucléolo en los cromosomas que actúan como organizadores nucleolares (Brown, 1966). De ésta manera, para cada especie, el conjunto de cromosomas que constituyen su dotación genética está caracterizado por unos patrones heterocromáticos específicos para cada uno de ellos. Estas distintas regiones heterocromáticas, así observadas en preparaciones de cromosomas mitóticos ó meióticos, aparecen durante la interfase como masas redondeadas ó alargadas, bién esparcidas por el interior del núcleo y muy frecuentemente adosadas a la cara interna de la membrana nuclear (los denominados cromocentros), ó adheridas al nucléolo en forma de protusiones más o menos voluminosas (HC asociada al nucléolo).

La presencia de HC asociada al nucléolo es un hecho bastante generalizado en multitud de núcleos celulares interfásicos, tanto pertenecientes a tejidos animales como

vegetales. Observaciones de éste tipo de HC ya fueron descritas por Heitz (Heitz, 1928, 1931, 1933, 1934) y confirmadas después por múltiples autores tanto en células somáticas (Einarson, 1933; Andrew y Andrew, 1944; Schultz, 1947; Casperson, 1950; de Robertis y col., 1972; entre otros), como en germinales (Lima-de-Faria y Moses, 1966; Lima-de-Faria y col., 1968).

Ya desde los estudios de Heitz se ha venido creyendo que la HC era genéticamente inerte y funcionalmente inactiva. Esta idea venía basada originalmente en la creencia de que los cromosomas eran genéticamente activos solo durante interfase y no durante el período de división, ya que era durante el período interfásico cuando los genes existentes en ellos se expresaban, mediante la transcripción de RNA, codificando una determinada síntesis protéica; la persistencia en las zonas heterocromáticas de la organización espiralizada en el material cromosómico que las constituye, semejante a como se encontrarían durante las etapas mitóticas, haría inactivo éste material mientras se encontrase en ése estado (Brown, 1966). Por otra parte se ha comprobado la escasez de genes en las regiones heterocromáticas de los cromosomas (Heitz, 1933; Brown, 1966; Hsu, 1962), la HC representa, por tanto, porciones del genoma que se encuentran normalmente inactivas (Grumbach y col., 1963) y ofrece un patrón celular representativo del grado de diferenciación nuclear (Brown y Nur, 1964; Mittwoch, 1967) y con ello una menor amplitud de la expresión génica (Frens -

ter, 1965).

Aunque su aparición responde a un fenómeno similar (mantenimiento de la espiralización durante interfase), no todas las regiones heterocromáticas parecen poseer características semejantes, ni presentar un significado totalmente equivalente. Así suele distinguirse entre una HC constitutiva, una HC facultativa y una HC funcional. La primera estaría constituida por las regiones heterocromáticas presentes en ambos cromosomas homólogos y que mantienen su estado condensado de manera permanente en todos los tejidos y tipos celulares, para una especie determinada (Brown, 1966; Schmid, 1967). La HC facultativa aparecería por condensación de algunas zonas solo en uno de los homólogos, y más frecuentemente por condensación en las hembras, de uno ó ambos cromosomas X (Lyon, 1966). La HC funcional estaría representada por las zonas cromosómicas que se condensan, a partir de un cierto momento del desarrollo, en un tipo celular determinado, como respuesta a la especialización funcional concreta a que lo ha conducido el proceso de diferenciación celular (Frenster y col. 1963; Littan y col., 1964; Fawcett, 1966; Pardue y Gall, 1970; yasmineh y Yunis, 1970). Las zonas de HC constitutiva son comunes para todas las células de un determinado organismo; las de HC facultativa, del tipo X, serán comunes para todas las células de las hembras donde aparece, faltando, sin embargo, en las células de los machos de la misma especie; las regiones de HC funcional, por el contrario, variarán de unos tipos celulares a otros, dentro de un mismo orga

nismo, dependiendo de la función específica que esté desarrollando ese tipo celular concreto.

Estudios realizados en HC facultativa se han referido fundamentalmente a la aparición de éste fenómeno en los cromosomas X de Mamíferos. Un ejemplo de éste tipo de HC lo constituye el "corpúsculo de Barr" que aparece en forma de una mancha muy densa en el núcleo interfásico de células pertenecientes a las hembras de Mamíferos, como resultado de la heterocromatinización de uno de los cromosomas X (Barr y Bertram, 1949; Lima-de-Faria, 1959; Brown, 1966; - Lyon, 1966).

La HC centromérica, la HC telomérica, y la HC adyacente a las regiones organizadoras del nucléolo se consideran como HC constitutiva, y son las formas más frecuentes de aparición de éste tipo de HC (Brown, 1966; Yasmineh y Yunis, 1970; Jones, 1970; Pardue y Gall, 1970; Arrighi y col. 1970; Yunis y Yasmineh, 1971; Hilwis y Gropp, 1973). La HC funcional aparecerá en aquellas regiones cromosómicas que vayan a ser inactivas en un tipo celular concreto, no poseyendo, por tanto, una localización tan precisa como las anteriores (Frenster y col., 1963; Fawcett, 1966; Yasmineh y Yunis, 1970).

Las regiones de HC constitutiva y funcional aparecen durante interfase constituyendo los cromocentros y las masas de HC asociada al nucléolo, que representarían, por

tanto, la imagen interfásica de éstos tipos heterocromáticos.

La HC facultativa actuaría como un mecanismo de compensación en el número de genes activos en un organismo, evitando que en las células de un determinado organismo (hembras) puedan actuar mayor cantidad de genes que en las de otros organismos (machos) de la misma especie por existencia de un mayor número de un cromosoma determinado (2 cromosomas X en las hembras frente a uno solo en el macho) (Brown, 1966).

La función de la HC constitutiva queda aún desconocida. Los estudios realizados apuntan más bien hacia una actividad más estructural que funcional en éste tipo de HC (Brown, 1966; Yunis y Yasmineh, 1971). No obstante se ha mencionado por algunos autores la posibilidad de que la HC constitutiva sea principalmente inactiva pero pueda contener cistrones implicados en la regulación de la expresión génica de otras regiones del cromosoma (Yunis y Yasmineh, 1971).

El hecho de que generalmente la HC constitutiva aparece en los cromosomas separando zonas de actividades diferentes (el centrómero, o la región organizadora del nucleólo, del resto del cromosoma) podría indicar una actuación de delimitación de las zonas de actividades especiales, protegiendo al centrómero y a la región organizadora del núcleolo de posibles alteraciones (Brown, 1966; Yunis y Yasmin

neh, 1971). En éste aspecto se ha comprobado la escasa ocurrencia de fenómenos de crossing-over entre zonas heterocromáticas (Darlington, 1937; Brown, 1966), lo que podría indicar un cierto mecanismo de defensa de éstas zonas de actividades especiales frente a las alteraciones producidas por el crossing-over (Yunis y Yasmineh, 1971).

Por otra parte su existencia en zonas semejantes de ambos cromosomas homólogos podrían tener una influencia en el comportamiento cromosómico durante etapas tales como la mitosis ó la meiosis. Efectivamente, la HC constitutiva proveería de unos patrones específicos a cada pareja de cromosomas, lo que podría ser importante en mecanismos que necesitan de un reconocimiento mutuo entre los cromosomas, tales como el apareamiento entre homólogos durante la meiosis, ó los fenómenos de emigración y orientación cromosómica (Brown 1966; Yunis y Yasmineh, 1971).

La HC también puede influir en la agregación de cromosomas no homólogos para la formación de estructuras en las que intervengan varios de ellos. Agregaciones de cromosomas no homólogos por sus regiones heterocromáticas durante interfase ya fueron descritas por Heitz (Heitz, 1934) en el caso del cromocentro que unía entre sí los cromosomas politénicos de glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Otro ejemplo de éste tipo de agregación heteróloga la constituye la unión de los cromosomas organizadores nucleolares, durante la interfase, por sus regiones formadoras del nucléo

lo para dar lugar a la conformación de éste componente nuclear. Estas agregaciones son frecuentemente observadas en plantas y animales. También se han observado agregaciones de cromosomas no homólogos por sus regiones pericentroméricas ó teloméricas. La heterocromatina presente en éstas regiones puede jugar un papel fundamental en la constitución de tales agregados (Yunis y Yasmineh, 1971). La heterocromatinización parece ser un fenómeno que acompaña también la aparición de cromosomas supernumerarios, pues éstos son fundamentalmente heterocromáticos e incapaces de sufrir crossing-over (Brown, 1966).

Otro papel adscrito a la HC constitutiva es el de establecer barreras de fertilidad que pueden actuar en la diversidad evolutiva y ayudar a la especiación (Yunis y Yasmineh, 1971). En éste aspecto algunos autores (Schmid, 1967 Nadler, 1969) han comprobado una cierta relación entre la cantidad de HC centromérica y la variedad de formas distintas para un determinado grupo de organismos. Así, subfamilias de roedores tales como Microtidae, Muridae y Cricetidae, que presentan una gran cantidad de éste tipo de HC, presentarían una mayor variedad de especies y cariotipos que otros grupos sinónimos como Felidae, donde la HC centrómerica es escasa.

De ésta manera, la HC constitutiva nos aparece mostrando una amplia variedad de formas y patrones y realizando, asimismo, una multiplicidad de funciones.

El papel de la HC funcional sería el de inactivar aquellos genes que no van a ser necesarios para el funcionamiento de un tipo celular concreto, estableciendo una diferencia de funcionalidad entre los diversos tejidos y formas celulares que constituyen un determinado organismo. Esta HC actuaría, por tanto, como un patrón representativo del grado y tipo de actividad funcional de una célula determinada (Brown y Nur, 1964; Frenster, 1965; Fawcett, 1966; Mittwoch 1967).

Sobre el mecanismo que hace transformarse en heterocromática una zona cromosómica determinada, hay pocos datos que nos permitan su esclarecimiento. Existen observaciones acerca del momento en que aparece el fenómeno pero se desconoce aún la causa que lo provoca; parece ser sin embargo, que la heterocromatinización es un fenómeno relacionado directamente con el proceso de diferenciación celular. Lo que se ha dado en llamar el "efecto de posición" (Brown, 1966) parece tener una influencia muy importante en el comportamiento heterocromático de una determinada zona, una vez adquirido éste carácter; puesto que si un gen localizado en una zona heterocromática, y por tanto inactivo, es traslocado a una zona eucromática, cesa su inactividad volviéndose funcional. (experiencias realizadas con *Drosophila melanogaster*).

VARIABILIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS
DE HETEROCROMATINA

La existencia de diferencias interespecíficas en la cantidad relativa de HC es un hecho ampliamente conocido en todos los grupos de organismos eucarióticos. Estas diferencias se han desprendido fundamentalmente de estudios realizados sobre preparaciones cromosómicas, y se refieren a los distintos patrones, en cantidad y localización, de HC constitutiva característicos para las distintas especies -- (Ohno y col. 1957; Kurita, 1958; Caspersson y col., 1968; Vosa, 1970; Arrighi y Hsu, 1971; Forejt, 1973). Según lo anterior, la HC constitutiva presentaría una diversidad entre los distintos grupos taxonómicos, al mismo tiempo que una homogeneidad para todos los organismos de una especie dada.

De ésta manera, la HC constitutiva nos permitiría caracterizar el cariotipo de cada especie, por unos patrones heterocromáticos específicos para cada cromosoma, ofreciéndonos un nuevo medio de estudio en el campo de la diversidad evolutiva. Actualmente hay una gran cantidad de trabajos genéticos sobre cariotipos usando como patrón de estudio la distribución de HC constitutiva.

Estudios recientes muestran, sin embargo, una posible diversidad intraespecífica en la distribución de su HC constitutiva. Así, parecen existir pequeñas variaciones entre organismos de una misma especie, dentro del patrón general que caracterizaría la distribución de su HC constitutiva, lo que podría indicar una especificidad aún mayor de ésta HC como marcador para estudios cariotípicos (Forejt, -

1973; Hoehn y col.1973; Sharma y col.1973).

Diferencias, dentro de un mismo organismo, en los patrones heterocromáticos mostrados por células pertenecientes a distintos tejidos, ya han sido mencionadas en párrafos anteriores. Estas diferencias se desprenden, por el contrario, de estudios citológicos realizados sobre distintos tipos celulares en interfase (Frenster y col., 1963; Littan y col. 1964; Fawcett, 1966). En éste caso las diferencias se refieren, tanto a la HC constitutiva como a la HC funcional.

En efecto, aunque la HC constitutiva parece presentar una distribución semejante, en cuanto a su localización cromosómica y cantidad, para todas las células de un organismo, parece que éstas zonas heterocromáticas pueden manifestarse en interfase formando estructuras variables de unos tipos celulares a otros. Así Lee y Yunis, estudiando la manifestación interfásica de la HC constitutiva de *Microtus agrestis*, encontraron modelos de distribución diferentes para células tales como fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales y neuronas. (Lee y Yunis, 1971). Estos patrones variaban desde fibras alargadas, hasta masas muy compactas dependiendo del tipo celular que se tratase.

Diferencias en las manifestaciones interfásicas de la HC constitutiva han sido comprobadas también en el caso del ratón para distintos tipos celulares: espermátidas,

neuronas, hepatocitos, células de sertoli (Pardue y Gall, 1970; Yasmineh y Yunis, 1971).

Aparte de la diferente manifestación de la HC constitutiva, ya hemos mencionado anteriormente las diferencias existentes entre células de distintos tejidos en HC funcional. El proceso de diferenciación celular lleva a cada tipo celular a adquirir una cantidad específica de HC funcional en relación con la función que vaya a desarrollar. En éste aspecto, las distintas células de un organismo dado, nos -- muestran un amplio mosaico en cuanto a sus patrones heterocromáticos interfásicos, pudiendose decir que prácticamente no hay dos tipos celulares diferentes que muestran un patrón semejante (Frenster, 1965; Fawcett, 1966).

En éste caso, la abundancia ó escasez de HC funcional en una célula determinada ésta en relación con su grado de actividad. Así células de una gran actividad funcional como células epiteliales del epidídimo ó neuronas mostrarían en su núcleo una menor cantidad de HC que otros tipos celulares menos activos en síntesis de RNA como eritrocitos, algunos tipos de células epiteliales ó espermatozoides (Fawcett, 1966).

El hecho de que la HC funcional está en relación con el proceso de diferenciación celular viene también apoyado por la observación de que la cantidad de HC varía, incluso dentro de un mismo tipo celular, con su proceso de ma

duración. Así durante la eritropoyesis la HC de núcleo de - las distintas células que se suceden hasta la formación del eritrocito, va aumentando paulatinamente con la disminución de la actividad sintetizadora (Fawcett, 1966).

METODOS DE ESTUDIO ACTUALES

Actualmente, el estudio de la HC está siendo abordado desde campos muy diversos; lo que permitirá, sin duda, un avance considerable en el conocimiento de su estructura y disposición, así como el de su significado en la fisiología celular.

El desarrollo de métodos de aislamiento y purificación ha permitido la obtención de fracciones puras de HC, con independencia de otros componentes nucleares. Estos métodos de aislamiento se emplean sobre núcleos interfásicos, obteniéndose una serie de fracciones, en una de las cuales se acumulan las masas heterocromáticas de éstos núcleos. Estas fracciones purificadas constituyen un medio muy idóneo para el estudio de su estructura y composición química, al evitar las interferencias producidas por otros materiales nucleares.

A un nivel estructural, el empleo de la microscopía electrónica para la observación de masas heterocromáticas obtenidas por éstos métodos de aislamiento, ha permitido el estudio de su ultraestructura y organización básica. Las observaciones realizadas muestran que las masas heterocromáticas están organizadas sobre una base fibrilar que se empaqueta de manera considerable, y en ocasiones se complementa con formaciones granulares y materiales amorfos (Kaye y McMaster-Kaye, 1966). Los estudios realizados sobre núcleos celulares intactos han permitido comprobar que ésta estructura de la HC obtenida en las fracciones purificadas, se corresponde con la ob-

servada para la HC nuclear "in situ" (Frenster y col., 1963; Frenster, 1965). Esta organización a base de fibrillas se ha constatado también para las regiones de EC, aunque en éste caso las fibrillas no se apelotonan para formar masas densas, observándose la existencia de una continuidad física entre las fibrillas constituyentes de ambos tipos de cromatina -- (Frenster, 1965).

Por otra parte, los elementos fibrilares que aparecen en ambas regiones presentan un grosor semejante, que varía de unas observaciones a otras entre 50 y 250 A, dependiendo del método de preparación de la muestra empleado por los distintos autores (Gall, 1966; Wolfe y Grim, 1967). Esta continuidad y organización básica semejante entre EC y HC -- apoya la idea, ya esbozada desde los comienzos del estudio de éstos materiales, de que la HC no representa un material diferente de la propia cromatina, sino que responde, más -- bién, a una forma especial de estructuración de ésta, distinta de la estructuración eucromática.

Los estudios bioquímicos sobre la composición y funcionalidad de las regiones heterocromáticas, también se han visto facilitados de manera apreciable por los métodos de aislamiento antes expuestos. Estos ensayos han comprobado, por un lado, el escaso índice de actividad sintética de RNA que tiene lugar en las zonas heterocromáticas con respecto a las eucromáticas (Hsu, 1962; Frenster y col., 1963; Littau y col., 1964), resultado indicativo de que el DNA constituyente

de la HC se encuentra, normalmente, inactivo en su mayoría, y que por tanto el grado de heterocromatinización de un núcleo celular será indicativo del grado de actividad de esa célula.

De otro lado, los análisis de secuencias de bases realizados al DNA extraído de las masas de HC funcional, no revelan diferencias apreciables con los realizados sobre el DNA de las regiones eucromáticas (Frenster, 1965). Sin embargo, éstos mismos estudios realizados sobre las zonas de HC constitutiva, revelan una cierta diferencia en cuanto a la composición media de bases entre el DNA de éstas zonas y el DNA eucromático (Yasmineh y Yunis, 1970; Yunis y Yasmineh 1970). Estudios de ultracentrifugación en gradientes de Cloruro de Cesio, junto con técnicas de disociación y reasociación de las cadenas del DNA extraído, han llevado a la conclusión de que una parte, variable de unas especies a otras, del DNA que constituye el genoma de una célula eucariótica, está constituido bajo la forma de una secuencia repetida de manera consecutiva multitud de veces; ésta porción repetitiva del genoma celular se ha denominado DNA satélite ó DNA repetitivo (Walker, 1968; Britten y Kohne, 1968). Análisis del DNA extraído de la HC constitutiva, así como la realización de pruebas de hibridación "in situ", han permitido demostrar cómo este DNA repetitivo se encuentra localizado en las regiones cromosómicas correspondientes a HC constitutiva (Yunis y Yasmineh, 1970, 1971; Arrighi y col., 1970; Yasmineh y Yunis, 1970, 1971; Saunders y col., 1972; Stefos y

Arrighi, 1974; entre otros).

Los estudios sobre bases de éste DNA satélite han revelado la abundancia de Adenina y Timina en su secuencia base (Yunis y Yasmineh, 1970) lo que unido a su repetitividad hace que la condición de bases del DNA extraído de la HC constitutiva varíe respecto a la del DNA eucromática; hecho que no ocurre con el DNA perteneciente a la HC funcional.

Los procedimientos de hibridación y los procesos de disociación y reasociación de las cadenas de DNA extraídas tras centrifugación en gradientes de CsCl, están aportando nuevos métodos de análisis para la localización y estudio estructural de la HC constitutiva de las células eucarióticas.

Otros análisis bioquímicos efectuados sobre las masas de HC y EC extraídas de las células por los procedimientos antes apuntados de purificación se refieren a las proporciones de proteínas y fosfolípidos con respecto a la cantidad de DNA existente. Estudios en éste sentido han mostrado la no existencia de diferencia apreciable, en la proporción de histonas con respecto al DNA, entre la EC y la HC; sin embargo, las regiones eucromáticas poseen unas razones de fosfolípidos/DNA y proteínas residuales/DNA mayores que las encontradas en los análisis de las zonas heterocromáticas (Frenster, 1965; Rose y Frenster, 1965; Ruch y Rosselet, 1970). La posibilidad de obtención, por separado, de

éstas fracciones purificadas de EC y HC, está permitiendo potenciar, de manera patente, los estudios bioquímicos de ambos tipos de cromatina de una manera comparada (Littau y col., 1965; Bonner y col., 1968; Clark y Felsenfeld, 1971) ello a la vez facilitará el ahondar sobre las causas de la distinta organización y funcionalidad de ambos componentes nucleares.

Los estudios sobre HC también se han abordado actualmente desde un punto de vista cuantitativo, mediante la aplicación de métodos citofotométricos (Kiefer, 1973). Estos métodos combinan la unión estequiométrica de algunos colorantes a las cadenas de DNA, con la medida, mediante un citofotómetro, de la densidad en las distintas zonas del núcleo; éstos estudios conducen a valores cuantitativos relativos de la cantidad de DNA en esas diferentes zonas y por tanto al establecimiento de valores medios de HC entre diferentes tipos celulares.

A nivel cromosómico, la localización de las zonas heterocromáticas, realizadas sobre preparaciones cromosómicas, se ha facilitado con la aplicación de nuevas técnicas. Estas incluyen procesos de: disociación y reasociación seguidos de coloraciones adecuadas; métodos de hibridación "in situ"; y métodos de marcado con sustancias fluorescentes.

En el primer aspecto, la disociación y reasocia -

ción de las cadenas de DNA, permite reconocer qué regiones cromosómicas están constituidas por DNA repetitivo, pues éstas serán las zonas que más rápidamente reasociarán debido a las características de su DNA, y recobrarán, por tanto, más rápidamente su estructura inicial. La combinación de éste proceso con la tinción mediante el colorante de Giemsa, se está empleando actualmente de manera amplia para la localización de las zonas de HC constitutiva dentro del cromosoma (Pardue y Gall, 1970; Arrighi y Hsu, 1971; Summer y col., 1971; Wang y Fedoroff, 1971; Patil y col., 1971; Daniel y Lam-Po-Tang, 1973; entre otros).

Los métodos de hibridación "in situ", tras la disociación de las cadenas del DNA apuntadas anteriormente, son también un medio idóneo para el reconocimiento de las zonas cromosómicas constituidas por DNA repetitivo, hecho empleado por otros autores para el reconocimiento de éstas regiones (Pardue y Gall, 1970; Jones, 1970).

Los métodos de marcado con sustancias fluorescentes se basan en la posibilidad de poner de manifiesto las zonas cromosómicas de HC constitutiva usando fluorocromos, y han sido aprovechados también para éstos estudios (Casperson y col., 1968, 1970; Vosa, 1970; Pearson y col., 1970, 1971; entre otros). Incluso la comparación de los resultados obtenidos con los métodos fluorocrómicos y los logrados con las tinciones de Giemsa, tras la disociación y reasociación, están permitiendo reconocer una cierta variedad de -

tro de la propia HC constitutiva, variedad que, sin duda, contribuirá a una mejor sistematización de éste tipo heteroo cromático y a una comprensión más exacta de su significado celular (Vosa, 1970; Lomholt y Mohr, 1971; Gagne y col., -- 1971; Kim, 1973).

ESTUDIOS SOBRE HETEROCROMATINA EN
CELULAS NERVIOSAS



Desde las primeras observaciones microscópicas de las neuronas, se observó como éste tipo celular mostraba un núcleo con escasez de estructuras densas en su interior, en comparación con los de otros tipos celulares. Los núcleos neuronales aparecen, con las técnicas usuales, como estructuras ovaladas ó esféricas, claras, con posición generalmente central dentro del citoplasma neuronal; ésta imagen es representativa de la escasez de HC existente en éstos tipos de núcleos. Desde entonces, ésta escasez heterocromática ha sido comprobada en múltiples observaciones, calificando el núcleo de las neuronas como uno de los más funcionalmente activos entre los de los diferentes tipos celulares que constituyen un organismo (Beams, 1931; Andrews y Andrews, 1942, Fawcett, 1966).

En estudios iniciales sobre la morfología interna de la neurona se apunta ya, tanto ésta escasez de sustancia cromática en su núcleo, como las variaciones existentes entre distintas neuronas en cuanto a la disposición y morfología de éstas sustancias coloreables nucleares (Cajal, 1896). Por otra parte, se diferenciaba también dentro de ésta sustancia cromática, denominada entonces nucleina, aquella parte que constituye el nucléolo y la que forma parte del resto de grumitos y manchas existentes en el núcleo neuronal; la primera parte sería una nucleina falsa ó "paranucleina", mientras que la segunda sería la nucleina verdadera, asimilable a lo que actualmente se conoce como "heterocromatina" (Levi, 1896; Von Leuhossek, 1897; Marinesco, 1905).

Comienzan ya también a hacerse descripciones sobre disposiciones peculiares de la HC neuronal; así Levi describe la existencia de unas zonas basófilas, en forma de media luna, adosadas a la superficie del nucléolo (Levi, 1896). -- Estas zonas basófilas de Levi, descritas para los ganglios espinales, constituyen el primer ejemplo de descripción de HC asociada al nucléolo para células nerviosas, cuya existencia ha sido confirmada posteriormente por otros autores (Marinesco, 1905; Brusa, 1950). Mediante la estimulación nerviosa de las zonas estudiadas, Levi observó una variación en la morfología de éstas zonas basófilas, que se hacían más finas; por el contrario, tras la sección del nervio, ésta HC asociada al nucléolo aparecía más voluminosa y saliente de la superficie nucleolar. Estos hechos parecen indicar una cierta relación entre la morfología de ésta HC y determinados estados funcionales de éstas células nerviosas.

Otra estructura descrita como componente del núcleo neuronal es la denominada por Cajal como "cuerpo accesorio" (Cajal, 1903). Aparece como un componente esférico, distinto del nucléolo, localizado en el nucleoplasma, en un gran número de células nerviosas, tras la impregnación por los métodos argénticos. Este componente argirófilo ha sido analizado posteriormente por otros autores (Tompson y col., 1957), observándose su naturaleza Feulgen negativa, lo que demuestra que ésta estructura no puede considerarse como un componente heterocromático, representando una formación característica del núcleo neuronal cuya composición y significado aún no --

está suficientemente esclarecido.

En 1950 se describió la existencia en los núcleos neuronales de un corpúsculo, denominado "satélite nucleolar" que representaría un grumo heterocromático en relación con el sexo (Bar, Bertram y Lindsay, 1950). Esta estructura heterocromática, descrita inicialmente para las neuronas del gato, estaría constituida por un cromosoma X que permanecería en estado condensado en los núcleos celulares de las -- hembras, faltando en los de los machos. Este tipo de HC, denominada por su relación con el sexo como "cromatina sexual" correspondería a una forma de HC facultativa que actuaría a modo de mecanismo compensador, inactivando uno de los cromosomas X de la hembra, y de éste modo equilibraría el número de genes activos en éstas células con los de las células -- masculinas que solo llevarían un cromosoma X. El corpúsculo de Barr, como se ha venido llamando a ésta cromatina sexual, representa, por tanto, un ejemplo típico de HC facultativa que afecta al cromosoma X.

La cromatina sexual aparecería en las células neuronales del gato como un corpúsculo esférico, de aproximadamente una micra de diámetro, generalmente adosado a la superficie nucleolar, aunque también puede localizarse libre en el nucleoplasma ó en las proximidades de la membrana nuclear. La presencia de cromatina sexual ha sido confirmada en otros tipos celulares del gato (Graham y Barr, 1952), así como en células pertenecientes a otros animales (Moore y --

Barr, 1953; Mylly y Graham, 1954; Prince, Graham y Barr, 1955). Tras la estimulación eléctrica del núcleo del Hipogloso en el bulbo de gato, se observó que el satélite nucleolar de las células de éste núcleo se localizaba preferentemente cerca de la membrana nuclear, volviendo a su posición más frecuente, adosado a la superficie nucleolar, tras un periodo de descanso ó tras la cromatolisis neuronal (Barr y Bertram, 1951).

Aunque algunos autores han tratado de equiparar el satélite nucleolar ó "cromatina sexual" de Barr y Bertram con las "zonas basófilas" de Levi ó el "cuerpo accesorio" de Cajal (Brusa, 1950), las observaciones realizadas indican una diferencia entre las distintas estructuras (Lindsay y Barr, 1955; Tompson y col., 1957). El satélite nucleolar y las zonas basófilas de Levi corresponderían a estructuras heterocromáticas del núcleo neuronal, naturaleza que no puede ser demostrada para el cuerpo accesorio. Por otra parte, las zonas basófilas y la cromatina sexual se diferenciarían entre sí, tanto por su forma, como por la localización y comportamiento. Las zonas basófilas podrían representar regiones de HC asociada al nucléolo del tipo funcional, mientras el satélite nucleolar representaría HC facultativa del tipo X, cuya localización de forma asociada al nucléolo no es siempre constante.

Estudios posteriores han comprobado la existencia de HC asociada al nucléolo para las neuronas de ratón (An -

drews y Andres, 1942). Se describe en éste trabajo la existencia de unos corpúsculos, en número variable, de HC situados sobre la superficie nucleolar, junto con un fino anillo Feulgen positivo que rodea superficialmente éste nucléolo. Estas protusiones de HC asociada al nucléolo son descritas también en éstos trabajos para las neuronas del cerebro humano, aunque de menores dimensiones. Las experiencias realizadas muestran que tras someter los animales a períodos de inanición, éstos cuerpos de HC desaparecen en una gran cantidad de células, quedando solo en ellas el fino anillo heterocromático que rodea al nucléolo. Según estas experiencias, estas masas de HC asociada al nucléolo responderían de manera parecida a como lo hacían las zonas basófilas de Levi frente a la estimulación eléctrica; por otra parte, su naturaleza y localización son factores que acercan entre sí, también, ambas estructuras.

Observaciones sobre HC neuronal han sido realizadas también por otros autores sobre diversos grupos de ellos, así como la existencia de HC asociada al nucléolo en neuronas de roedores que no parece pertenecer a éste tipo de cromatina sexual. Efectivamente, en las neuronas de varios grupos de roedores se han encontrado varias masas de HC asociadas a la superficie del nucléolo, en número y tamaño variables, que no guardan relación con el sexo al aparecer tanto en machos como en hembras; éstos autores constatan, también, en éstos casos la presencia de una fina cubierta de material con carácter Feulgen positivo sobre la superficie del nucléolo.

Estas masas de HC asociada al nucléolo varían, de unas especies a otras, desde masas más o menos redondeadas a caperuzas en forma de media luna adosadas a la superficie nucleolar; para el caso del ratón se describen una ó dos masas, relativamente voluminosas, situadas, en éste segundo caso, de manera opuesta sobre el nucléolo.

Estas observaciones coinciden con las de otros -- autores anteriores para el caso de la HC asociada al nucléolo en las neuronas del ratón; comprobándose, por otra parte, que no corresponden a un tipo de HC facultativa relacionada con el sexo.

La existencia de una ó dos masas de HC asociada al nucléolo en las neuronas del ratón ha sido confirmada también por métodos de aislamiento para estudios bioquímicos (Yasmineh y Yunis, 1970). En éstos casos, tras los procedimientos de fraccionamiento y purificación de fracciones nucleares, se obtiene, en la fracción correspondiente a la HC, junto con las masas heterocromáticas de los cromocentros, los conjuntos formados por nucléolos y HC asociada a ellos en forma de masas redondeadas situadas sobre su superficie.

Estudios más actuales han descrito también la existencia de HC asociada al nucléolo para las neuronas del erizo (Gropp y Citoler, 1970). En éste caso se describe la existencia de una gruesa masa heterocromática, dispuesta sobre la superficie nucleolar, que no está relacionada con el sexo.

Constituiría, por tanto, un nuevo ejemplo de HC asociada al nucléolo posiblemente de tipo funcional.

La célula neuronal constituye, por tanto, uno de los tipos celulares donde la presencia de HC asociada al nucléolo es bastante frecuente, lo que la convierte en un material muy aprovechable para el estudio de éste tipo heterocromático. Esta HC asociada al nucléolo será en unos casos del tipo de HC facultativa sexual; en otros se tratará de una HC funcional ó, como apuntan algunos autores, de una HC de tipo constitutivo. En los casos en que no se trata de cromatina sexual, la significación funcional de ésta HC neuronal asociada al nucléolo, caso de existir, permanece, no obstante, desconocida aún; aunque ya desde las primeras descripciones se haya venido apuntando una posible relación con el estado y grado de actividad neuronal.

SITUACION ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS
ACERCA DE LA ESTRUCTURA OBJETO DE ES-
TUDIO

La situación actual de los conocimientos acerca del significado de la HC asociada al nucléolo en neuronas del ratón es algo confusa, puesto que al coincidir sobre ella estudios desde campos muy diversos, los conceptos utilizados no son siempre equivalentes.

Ya hemos expuesto anteriormente como su existencia viene avalada por resultados obtenidos tanto a partir de estudios morfológicos (Moore y Barr, 1953; Andrews y -- Andrews, 1942; entre otros), como de estudios bioquímicos (Yasmineh y Yunis, 1970). La descripción más generalizada de este tipo de HC consiste en una o dos masas, de forma esférica o alargada, situadas sobre la superficie nucleolar. Por otra parte, parece aceptada la no relación de esta HC asociada al nucléolo con el sexo; no tratándose, por tanto, de una cromatina sexual (Moore y Barr, 1953)

El punto más confuso corresponde al de su catalogación entre los distintos tipos de HC descritos. No se -- trataría de una HC facultativa del tipo X, por lo antes - expuesto, pero su adcripción a un tipo de HC constitutiva o de HC funcional es, aún, un punto discutible.

Los autores de trabajos de tipo bioquímico suelen coincidir en la catalogación de este tipo de HC asociada al nucléolo como HC constitutiva (Yasmineh y Yunis, 1970; Jones 1970; Yunis y Yasmineh, 1971). Estas conclusiones vienen, - sobre todo, indicadas por los resultados de aislamiento de

fracciones e hibridaciones "in situ" con ácidos nucleicos marcados, y utilizando como premisa la localización de DNA repetitivo en la HC constitutiva.

Según los diversos estudios realizados, la HC constitutiva del ratón parece ser una HC de tipo pericentromérico, como se desprende del análisis de preparaciones cromosómicas procedentes de distintos tipos celulares (Pardue y Gall, 1970; Yasmineh y Yunis, 1970; Jones, 1970; Yunis y Yasmineh, 1971). Efectivamente, en todas estas preparaciones, los cromosomas del ratón presentan cerca del centrómero una región heterocromática que, por existir en ambos cromosomas homólogos y en todos los tipos celulares analizados, correspondería a una HC constitutiva. Por otra parte, cuando se realizaron hibridaciones con DNA satélite marcado, se observó como la radiactividad quedaba localizada a nivel de esta HC constitutiva en las preparaciones cromosómicas (Jones, 1970; Pardue y Gall, 1970). La utilización de un procedimiento de tinción con el colorante de Giemsa, tras disociación y reasociación de las cadenas de DNA, mostró que esta técnica aparecía específica para el DNA repetitivo, pudiendo suplir a las hibridaciones para su localización cromosómica (Arrighi e Hsu, 1971). Utilizando estos distintos procedimientos, la localización del DNA satélite en la HC constitutiva ha sido confirmado para múltiples organismos (Stefos y Arrighi, 1974; Schnedl, 1971; Yunis y Yasmineh, 1971; entre otros).

Partiendo de esta correspondencia entre DNA repe

titivo o satélite y HC constitutiva, en preparaciones cromosómicas, se ha tratado de analizar la HC existente en los núcleos interfásicos para su catalogación. Los procedimientos seguidos han sido fundamentalmente dos: realizar hibridaciones con DNA satélite marcado, o con RNA marcado complementarios del DNA satélite, pero sobre células interfásicas en lugar de sobre preparaciones cromosómicas; o bien, extraer la HC de los núcleos interfásicos por técnicas de fraccionamiento, y analizar su contenido en DNA satélite.

Al realizar hibridaciones "in situ" sobre células interfásicas del ratón, con DNA satélite marcado, se observó que este hibridaba fundamentalmente a nivel de las masas de HC -cromocentros y HC asociada al nucléolo-, tanto en células embrionarias del ratón procedentes de un cultivo de tejidos (Jones, 1970), como en otros tipos celulares procedentes de preparaciones histológicas (Pardue y Gall, 1970). También se han realizado hibridaciones sobre células hepáticas del ratón, usando RNA marcado complementario del DNA satélite, mostrando que las hibridaciones se realizan a nivel de la HC asociada al nucléolo presente en este tipo celular (Rae y Franke, 1972)

El aislamiento de fracciones heterocromáticas a partir de diversos tipos celulares del ratón, y el análisis de su contenido en DNA satélite, ha confirmado también la riqueza de éste tipo de DNA en las masas de HC asociada al nucléolo (Schildkraut y Maio, 1968; Yasmineh y Yunis, 1969, 1970). No obstante, no todo el DNA satélite nuclear está localizado

en esta HC asociada al nucléolo, sino que los distintos cromocentros nucleares también presentan una cierta riqueza en este tipo de DNA. Por otra parte, no todo el DNA que entra a formar parte de la HC asociada al nucléolo es de tipo satélite, sino que éste representaría del 30 al 70% del conjunto de DNA que constituye las masas heterocromáticas, según las distintas fuentes (Schildkraut y Maio, 1968; Yasmineh y Yunis, 1970).

Estos resultados parecen catalogar esta HC asociada al nucléolo como HC constitutiva que durante interfase se reúne, formando estas masas heterocromáticas asociadas al nucleólo, como resultado de la agregación de los distintos segmentos pericentroméricos de HC constitutiva localizados en los diferentes cromosomas del ratón (Pardue y Gall, 1970; Rae y Franke, 1972). Otra explicación sería, aquella que relata la existencia de constricciones secundarias en ciertos cromosomas del ratón que, están localizadas cerca de los bloques pericentroméricos de HC constitutiva (Levan y col. 1962; Hsu y col., 1971) lo cual llevaría a la construcción de los bloques heterocromáticos asociados al nucléolo a partir de la agregación interfásica de la HC pericentromérica de esos cromosomas, al unirse entre ellos para la organización del nucléolo (Rae y Franke, 1962).

Si esta HC asociada al nucléolo es de tipo constitutivo, deberá de cumplir, en principio, las condiciones que se vienen adscribiendo a este tipo de HC, tratándose entonces

de una HC genéticamente inerte y semejante para todas las células de un determinado tipo celular, si se acepta el su puesto de un patrón específico de ordenamiento interfásico para dicho tipo celular. De otro modo, habrá que revisar - las características que se atribuyen a la HC constitutiva y catalogar esta HC asociada al nucléolo de manera diferen te.

Apuntando hacia este aspecto se encuentran otra serie de observaciones que indican una cierta actividad ge nética en la HC constitutiva, e incluso, mas concretamente en el DNA satélite, así como una posible variación cuantitativa de las masas de HC asociada al nucléolo en un mismo tipo celular, hechos que nos aconsejan una profundización más sistemática en el estudio de esta HC, antes de su cata logación de una manera más definitiva.

En el aspecto de acción génica, son varios los - trabajos, que apuntan hacia la posible transcripción del DNA satélite en diferentes secuencias de RNA. En el caso - de oocitos de *Xenopus*, existe un DNA satélite que puede hi bridar con rRNA en un 18% de su peso, haciéndolo tanto con el rRNA 18 S como con el 28 S (Brown y Dawid, 1968; Evans y Birnstiel, 1968; Gall, 1969). Para el caso del ratón, se han descrito hibridaciones del DNA satélite con un RNA de gran peso molecular, que pudiera ser de tipo mensajero (Ha rel y col., 1968; Britten y Kohne, 1968, 1969). También en el erizo de mar hay un DNA satélite que codifica un RNA

de tipo mensajero (Kedes y Birnstiel, 1971). En otros casos hay autores que comunican que, las secuencias de RNA transcritas a partir de un DNA satélite no salen al citoplasma, permaneciendo en el interior del núcleo celular con misión desconocida (Balsamo y col., 1973).

Existen algunos trabajos indicativos de la transcripción de secuencias de DNA satélite en rRNA, con la particularidad de que este DNA satélite se encuentra localizado en masas heterocromáticas asociadas al nucléolo que, en determinado momento, comienzan a transcribirse; tal es el caso de una gran masa de HC asociada al nucléolo existente en oocitos de Acheta (Lima-de-Faria, 1969; Lima-de-Faria y col., 1973). Así también, la existencia de masas heterocromáticas, con un papel de organizadores nucleolares, implicados en la formación de rRNA son descritas en *Microtus agrestis* (Natarajan y Sharma, 1971).

Por otro lado, ciertos trabajos apuntan una relación entre el tamaño de la HC asociada al nucléolo y el tamaño del nucléolo, en distintos tipos celulares de diferentes organismos, relación que indicaría una variación de estas masas heterocromáticas, dentro de un mismo tipo celular, quizás relacionada con un grado de actividad celular variable (Weber, 1971; Vagner-Capodano y Stahl, 1974). E incluso se ha mostrado que la activación de las células de la glándula tiroidea de *Microtus agrestis* tiene como resultado una desespirilización de la HC constitutiva relacionada, por otra

parte, con la formación del nucléolo (Schneider y col., -- 1973).

De esta manera, las comunicaciones sobre el significado de la HC asociada al nucléolo y el DNA satélite nos sitúan ante una serie de observaciones, en ocasiones contradictorias, que nos obligan a mantener una cierta prudencia ante la catalogación definitiva y el significado de estas estructuras. Incluso en el caso del ratón, nos encontramos con observaciones sobre una organización nucleolar a partir de los cromosomas sexuales, cuya HC sería la que formara, al unirse en interfase, las masas de HC asociada al nucléolo (Ohno y col., 1957) frente a la organización ya indicada que adscribe el papel de organizadores nucleolares a ciertos autosomas, y a sus HC pericentroméricas la constitución de la HC asociada al nucléolo durante interfase (Levan y col., 1962; Pardue y Gall, 1970). Se ha apuntado, por otro lado, la posibilidad de que el DNA satélite - que aparece en las preparaciones de nucléolos aislados, se encuentre situado intranucleolarmente, por el hecho de que diferentes tratamientos sobre estos nucléolos extraen de ellos mas fácilmente el DNA de la banda principal que el - DNA satélite de estas fracciones (Schildkraut y Maio, 1968).

Toda esta multiplicidad de observaciones y descripciones nos indica, en definitiva, que la comprensión - del significado y constitución de la HC asociada al nucléolo se encuentra, todavía, en las primeras etapas de su con-

secución; aunque, sin duda, el estudio que se está llevando a cabo al abordarla desde campos tan diversos, será uno de los factores que hagan avanzar mas rapidamente hacia este logro.

PLAN DE TRABAJO

PLAN DE TRABAJO

Con la idea de contribuir al conocimiento del significado de la Heterocromatina asociada al nucléolo (HCnu), y más concretamente, al que ésta estructura pueda poseer en la actividad neuronal, hemos realizado este estudio sobre la HC asociada al nucléolo en neuronas del ratón, desarrollando el siguiente plan de trabajo:

- a).- Puesta a punto y discusión de diversas técnicas para la demostración de las estructuras heterocromáticas existentes en las neuronas del ratón albino.
- b).- Descripción de la morfología y organización que presenta la HC neuronal asociada al nucléolo, en este animal.
- c).- Observación del comportamiento de la HC neuronal asociada al nucléolo frente a diversos tratamientos citoquímicos.
- d).- Estudio de los tamaños de esta HC asociada al nucléolo en poblaciones neuronales diferentes.
- e).- Relación del tamaño de la HC neuronal asociada al nucléolo con diversos parámetros celulares.

MATERIAL
Y
METODOS

MATERIAL EMPLEADO

Para la realización de éste trabajo se han usado ratones blancos de laboratorio (*Mus musculus* var. albina) suministrados por el servicio de animales de la Universidad de Granada. Fueron empleados ejemplares adultos de ambos sexos con pesos que oscilaban entre 20 y 30 gr.

Como material de comprobación, con el fin de constatar si las estructuras puestas de manifiesto eran características del material empleado ó se debían a artefactos producidos por los procesos de preparación, fueron usados cerebros pertenecientes a otros animales. Concretamente se emplearon ejemplares de gato (*Felis domestica*) y de rana común (*Rana sculenta*). Los órganos extraídos a éstos animales pasaron por los mismos procesos de fijación, inclusión, corte y tinción a los que se sometió el material procedente de ratones.

Como material de estudio fueron usados un total de 8 cerebros de ratones (5 machos y 3 hembras, y como testigos se emplearon cortes cerebrales procedentes de dos gatos (1 macho y 1 hembra) y dos ranas (1 macho y 1 hembra).

Los ratones fueron anestesiados con eter y decapitados. De cada animal fueron extraídos el cerebro, hígado, riñones y tejido muscular esquelético.

Los gatos fueron anestesiados con eter y perfundidos con fijador de Carnoy, empleado 250 ml para la perfusión.

Finalizada ésta, se extrajo el cerebro de cada animal.

Las ranas fueron anestesiadas con eter y decapitadas. De cada animal fué extraído el cerebro.

Los órganos extraídos, tras ser lavados en agua destilada se depositaron para su fijación en frascos con fijador Carnoy, habiendo sido anteriormente seccionados en trozos apropiados para su mejor penetración por el fijador. Cada pieza fué sumergida en un volúmen de fijador de aproximadamente 25 veces el suyo propio.

Transcurrida la primera hora de permanencia en los frascos de fijación a temperatura ambiente, se renovó el fijador y se colocaron los recipientes en nevera a 4°C. En estas condiciones permanecieron durante 96 horas realizándose durante éste periodo de tiempo una renovación del fijador, concretamente a las 48 horas. El cambio se realizó con nuevo fijador Carnoy enfriado previamente a 4° C, para evitar cambios bruscos de temperatura en los tejidos que estaban siendo fijados.

Transcurrido el período de fijación, los frascos fueron sacados de la nevera, dejando que adquirieran la temperatura ambiente antes de proceder a las operaciones de inclusión.

El fijador empleado fué el líquido de Carnoy con

cloroformo cuya composición es la siguiente: (para 100 ml)

Etanol absoluto (Merck)	60 ml
Cloroformo (Merck)	30 ml
Acido acético glacial (Merck)	10 ml

El fijador era preparado inmediatamente antes de su uso.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA LAS
DIFERENTES TECNICAS

Las piezas, una vez realizada su fijación, fueron incluidas en parafina, para su posterior seccionado, siguiendo los pasos expuestos a continuación:

- Lavado de las piezas en solución saturada de Carbonato cálcico ($\text{CO}_3 \text{Ca}$) en etanol absoluto durante 2 horas, realizándose un cambio con nueva solución a los 60 minutos de permanencia en ella.
- Inmersión en etanol absoluto durante 12 horas, realizando dos cambios a las 2 y 5 horas respectivamente.
- Aclaramiento en Metil-benzoato mediante tres pasos sucesivos de 24 horas cada uno.
- Inmersión en benzol durante media hora, tras renovar el líquido a los 15 minutos de su permanencia en él.
- Paso por benzol-parafina (2:1 v/v) durante 30 minutos en estufa a 60° C.
- Paso por benzol-parafina (1:2 v/v) durante 30 minutos en estufa a 60° C.
- Tres pasos por parafina fundida a 60° C en estufa de 24 horas cada uno.
- Inclusión en parafina y confección del bloque.

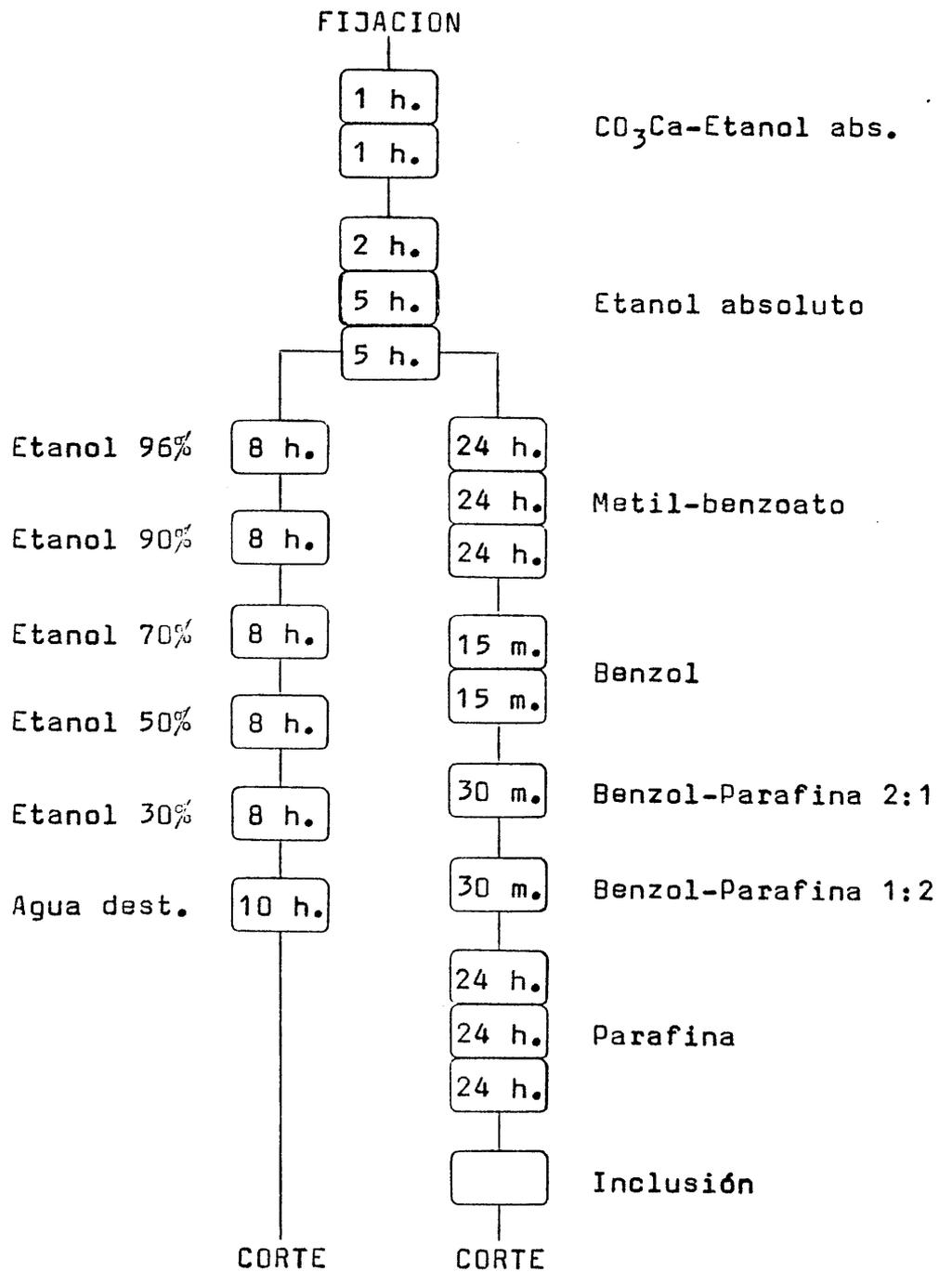
Para comprobar posibles influencias del proceso de inclusión sobre las estructuras a observar, se tomaron piezas pertenecientes a los distintos órganos, los cuales tras

su fijación, se sometieron a corte con el microtomo de congelación según los pasos siguientes:

- Lavado de las piezas, durante 2 horas, en solución saturada de Carbonato cálcico en etanol absoluto, realizando una renovación de la solución a los 60 minutos de permanencia en ella.
- Lavado en etanol absoluto durante 12 horas, realizando renovaciones del alcohol a las 2 y 5 horas.
- Paso por etanol 96% durante 8 horas.
- Inmersión en etanol 90% durante 8 horas.
- Inmersión en etanol 70% durante 8 horas.
- Paso por etanol 50% durante 8 horas.
- Paso por etanol 30% durante 8 horas.
- Lavado en agua destilada durante 10 horas.

Un esquema general del procedimiento de las piezas para su corte vienen representado en el esquema I.

Las piezas incluidas en parafina fueron cortadas a 10 y 20 nm., para los cerebros de ratón y a 10 um para todas las otras piezas. Los cortes se colocaron en recipientes con xilol para su desparafinización durante 24 horas. Una vez eliminada la parafina de los cortes pasaron a un recipiente con etanol absoluto para eliminar el xilol y al mismo tiempo eran pegados sobre portaobjetos. Ya sobre los



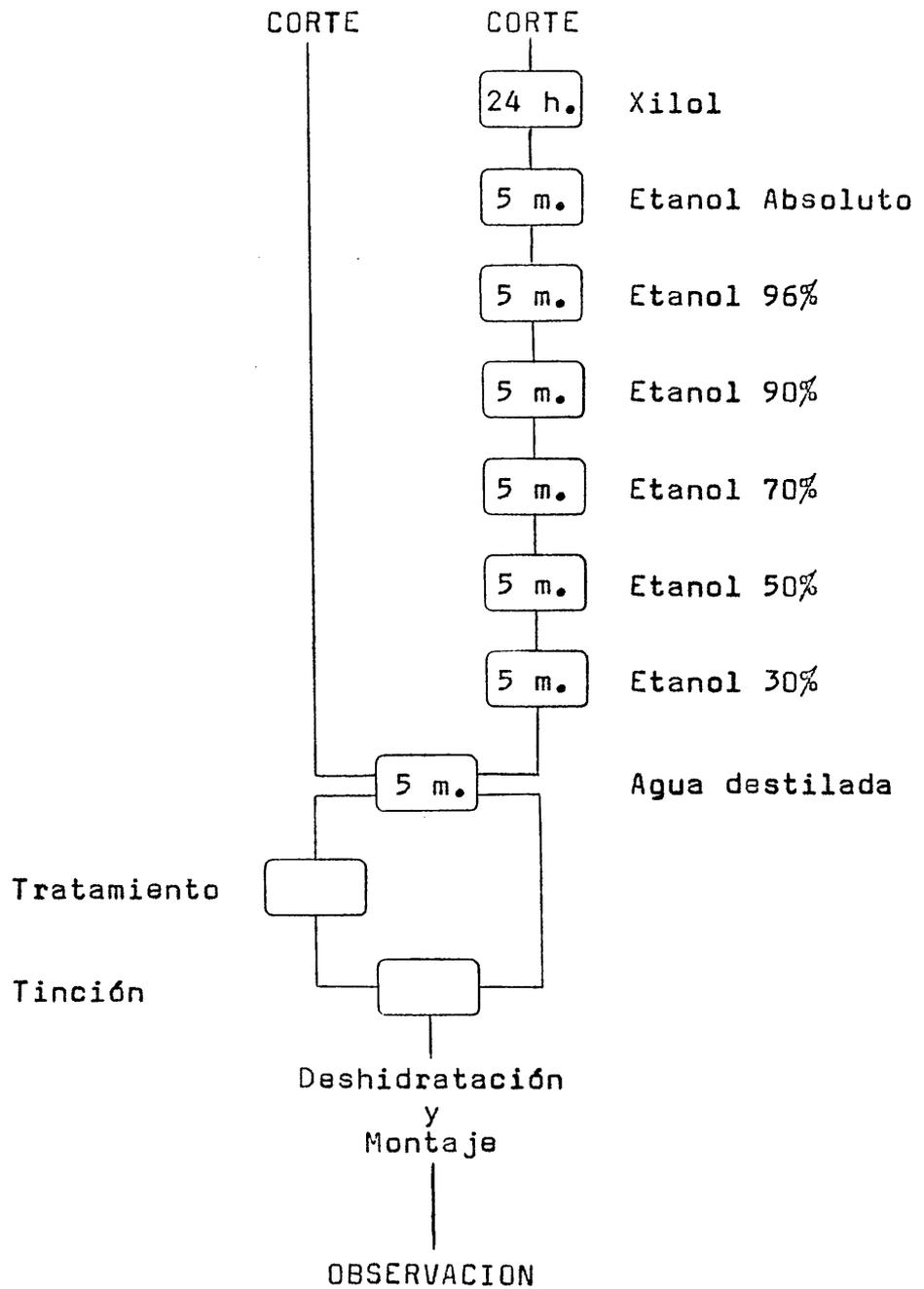
Esquema 1

portaobjetos, los cortes se hidrataron pasándolos sucesivamente por etanol 96%, 90%, 70%, 50%, 30%, y agua destilada, permaneciendo 5 min. en cada uno de los pasos.

Una vez hidratados, los cortes eran sometidos a las correspondientes técnicas de tinción. Los tiempos de dehidratación y diferenciación usados en todos los casos fueron de 1 min. en cada uno de los alcoholes de concentración creciente de 30%, 50%, 70%, 90% y 100%. El agente aclarante empleado fué el xilol y el medio de montaje usado fué Eukit.

Las secciones histológicas obtenidas en el microto_{mo} de congelación ofrecían un grosor aproximado de 20 μ m, --siendo sometidas a las distintas técnicas de manera semejante que los cortes procedentes de inclusión en parafina.

El esquema II muestra los distintos pasos a que --eran sometidos los cortes para su observación.



Esquema II

TECNICAS DE TINCION Y TRATAMIENTOS
EFFECTUADOS

TECNICAS EMPLEADAS

En la realización de éste trabajo se han empleado las siguientes técnicas de tinción:

- a) Método del Verde de Metilo-Pironina
- b) Tinción con Verde de Metilo
- c) Tinción con Pironina
- d) Tinción de Nissl
- e) Tinción con colorante de Giemsa
- f) Reacción de Feulgen
- g) Método del Azur-B

A continuación se describen los métodos de preparación de los distintos colorantes, así como el procedimiento de tinción seguido, para cada una de las técnicas antes enumeradas.

Método del Verde de Metilo-Pironina

La solución colorante se usó a pH = 5.57 en tampón acetato-acético (Walpole) y se obtiene de la siguiente manera.

Solución madre.-

Verde metilo (Merck) purificado	0.10 gr.
Pironina G (Merck)	0.35 gr.
Agua destilada	100.00 ml.

Solución tampón a pH = 5.57.-

Solución acuosa M/5 de Acido acetico (Merck)	10 ml
Solución acuosa M/5 de Acetato sódico (Merck)	90 ml

Se mezclan a partes iguales la solución madre y la solución tampón para obtener la mezcla colorante.

La purificación del verde de metilo, para extraer el violeta de metilo que siempre existe como contaminante en el colorante comercial, se realizó con cloroformo. Este tiene la particularidad de disolver el violeta de metilo, pero no el verde. El colorante comercial era vertido en un recipiente con cloroformo y agitado por espacio de 15 min. Posteriormente se realizaba una filtración y el residuo que quedaba sobre el papel de filtro era desecado para su recolección. Este residuo era sometido a unas nuevas extracciones clorofórmicas hasta que el liquido filtrado aparecía incoloro. El residuo de la última filtración era utilizado en la preparación de la solución colorante.

El proceso de tinción es el siguiente:

- Hidratación de los cortes
- Tinción en la mezcla colorante durante 15 min.
- Lavado en agua destilada durante 2 min.
- Deshidratación y diferenciación
- Aclaramiento en dos cambios de xilol de 5 min, cada uno.
- Montaje

Tinción con Verde de Metilo

La solución colorante se empleó a pH = 5.57 en tam
pón acetato-acético (Walpole). Se obtuvo de la siguiente for
ma:

Solución madre.-

Verde Metilo (Merck) purificado	0.3 gr
Agua destilada	100 ml

Solución tampón a pH = 5.57.-

Solución acuosa M/5 de ácido acético (Merck)	10 ml
Solución acuosa M/5 de acetato sódico (Merck)	90 ml

Para obtener la solución colorante se mezclan a -
partes iguales la solución madre y la solución tampón.

La purificación del verde metilo se realizó de la
forma ya descrita para la preparación de la solución colorant
te de la técnica Verde Metilo-Pironina

El procedimiento de tinción es el siguiente:

- Hidratación de los cortes
- Tinción en la mezcla colorante durante 15 minutos.
- Lavado en agua destilada por espacio de 2 minutos
- Deshidratación y diferenciación
- Aclaramiento en xilol. 2 cambios de 5 min. cada uno
- Montaje

Tinción con Pironina

La solución colorante se realizó en tampón acetato acético (Walpole) a pH = 5.57. Esta solución colorante se obtiene de la forma siguiente:

Solución madre.-

Pironina G (Merck)	0.3 gr
Agua destilada	100 ml

Solución tampón a pH = 5.57.-

Solución acuosa M/5 de ácido acético (Merck)	10 ml
Solución acuosa M/5 de acetato sódico (Merck)	90 ml

Se mezclan a partes iguales las soluciones madre y tampón para obtener el líquido colorante.

El procedimiento de tinción empleado es el siguiente:

- Hidratación de los cortes
- Tinción durante 15 min. en la mezcla colorante
- Lavado de 2 min. en agua destilada
- Deshidratación y diferenciación
- Aclaramiento en xilol. 2 cambios de 5 min. cada uno.
- Montaje.

Tinción de Nissl

La solución colorante se realizó en tampón acetato acético (Walpole) a pH = 4.5. Se obtiene de la forma siguiente:

Solución madre:-

Tionina (Merck)	1 gr
Agua destilada	100 ml.

Solución tampón pH = 4.5

Solución acuosa M/5 ácido acético (Merck)	55 ml
Solución acuosa M/5 acetato sódico (Merck)	45 ml

Mezclar 2.5 ml. de solución madre con 100 ml. de solución tampón.

El procedimiento de tinción fué el siguiente:

- Hidratación de los cortes
- Tinción durante 8 min. en la mezcla colorante
- Lavado en agua destilada durante 2 min.
- Diferenciación y deshidratación
- Aclaramiento en xilol durante 5 min.
- Montaje

Tinción con colorante de Giemsa

La solución colorante se realizó de la siguiente manera:

Solución madre de Giemsa (Analema)	20 ml
Agua destilada	100 ml

El procedimiento de tinción fué el siguiente:

- Hidratación de los cortes.

- Tinción durante 3 min. en la solución colorante
- Lavado en agua destilada durante 2 min.
- Aclaramiento en xilol durante 5 min.
- Montaje

Reacción de Feulgen.-

El reactivo de Schiff para ésta reacción fué preparado siguiendo el método de De Tomasi (1936). Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

Reactivo de Schiff.-

- Disolver 0.5 gr. de Fuchsin Básica (Merck) en 100 ml. de agua destilada hirviendo. Mezclar enérgicamente y dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura de 50° C.
- Filtrar y añadir 10 ml. de HCl 1N al filtrado.
- Añadir 0.5 gr. de Metabisulfito potásico (Merck) y dejar en la oscuridad 24 horas. Al cabo de éste tiempo el líquido adquiere un color rosa pálido.
- Añadir 0.5 gr. de Carbón activo y agitar durante 2 min.
- Filtrar en un embudo con filtro de placa.
- El líquido filtrado, que es incoloro, es el reactivo de Schiff empleado para ésta prueba de Feulgen. Se guarda en nevera a 4° C. Antes de usarlo se deja que adquiera la temperatura ambiente.

Solución de Metabisulfito

Solución acuosa de Metabisulfito potásico (Merck) al -		
10%	5 ml	
Acido Clorhídrico 1N	5 ml	
Agua destilada hasta	100 ml	

La solución de Metabisulfito hay que prepararla inmediatamente antes de su uso.

El procedimiento de tinción empleado fué el si --
guiente:

- Hidratación de los cortes
- Aclarado de los cortes en ClH 1N. a temperatura ambiente
- Hidrólisis en ClH 1N a 60° C. durante 8 min.
- Aclarado en ClH 1N. a temperatura ambiente
- Aclarado en agua destilada
- Colocar los cortes en reactivo de Schiff durante 5 horas
- Verter el reactivo de Shiff y pasar los cortes por tres pa
sos de solución de Metabisulfito de 10 min. cada uno.
- Lavar en agua corriente durante 10 min.
- Deshidratación
- Aclaramiento en Xilol durante 5 min.
- Montaje

Método del Azur-B

La solución colorante se usó con tampón cítrico-
fosfato (Mc Ilvaine) a pH = 4 de la siguiente manera:

Solución tampón a pH = 4.0

Solución acuosa M/10 de ácido cítrico (Merck) 73.8 ml

Solución acuosa M/5 de Fosfato bisódico (Merck) 46.2 ml

La solución colorante se obtiene mezclando 25 mg. de Azur B (Merck) en 100 ml. de solución tampón a pH = 4.0

El procedimiento de tinción empleado fué:

- Hidratación de los cortes
- Tinción durante 2 h. a 37° C en la solución colorante
- Aclarar los cortes en agua destilada
- Pasar los cortes a Alcohol butílico terciario donde se dejan durante 12 horas.
- Aclarar en Xilol durante 5 min.
- Montaje

TRATAMIENTOS REALIZADOS

Durante la realización de éste trabajo se han sometido los cortes a algunos tratamientos con objeto de comprobar la acción de éstos sobre las estructuras que estaban -- siendo estudiadas. Los tratamientos realizados han sido los siguientes:

- a) Tratamiento de disociación y reasociación del DNA
- b) Tratamiento con DNasa
- c) Tratamiento con RNasa

Los medios empleados para éstos tratamientos, así como los procedimientos seguidos, son descritos a continuación.

Disociación y reasociación.-

La disociación de las dobles cadenas de DNA nuclear fué realizada en los distintos cortes mediante incubación en una mezcla de Formamida y solución salina SSC. Esta solución salina está constituida por citrato trisódico y cloruro sódico en las siguientes concentraciones: 1 x SSC = 0.15 M Cloruro sódico 0.015 M Citrato trisódico.

El medio de incubación para la disociación del DNA estaba constituido por

Formamida (Merck)	90 ml
0.1 x SSC	10 ml

En éste medio los cortes permanecieron durante 6 h. a temperatura ambiente.

Tras el tiempo de incubación algunos cortes fueron tratados con formol al 4% durante 5 min. con el fin de bloquear la reasociación de las cadenas y comprobar si había tenido lugar la disociación del DNA. Estos cortes fueron a continuación lavados en agua destilada y teñidos con las distintas técnicas según los procedimientos ya descritos.

Otros cortes, tras la incubación en el medio disociante, pasaron a una nueva incubación en 2 x SSC a 60° C con el fin de reasociar nuevamente las cadenas del DNA disociado. El tiempo de incubación en éste medio, para la reasociación, fué de 1 h. Tras éste período, los cortes fueron lavados en agua destilada y teñidos con las distintas técnicas anteriormente expuestas.

DNasa

La hidrólisis enzimática del DNA para su eliminación de los cortes se realizó por incubación de éstos, durante 1 hora a 37° C, en una solución de DNasa en un medio constituido por 50 mM Cloruro magnésico (Cl_2 Mg), 10 mM Cloruro cálcico (Cl_2 Ca) en 25 mM tampón Tris-ClH a pH = 7.2. La concentración de enzima fué de 1mg./ml de DNasa (Gurr)

RNasa

La hidrolisis enzimática del RNA se realizó por incubación de los cortes en solución acuosa del enzima a una concentración de 1 mg/ml de RNasa (Gurr). En éste medio los cortes fueron tratados durante 1 h. a 37°C. Tras el periodo de incubación, los cortes fueron teñidos por las técnicas --

anteriormente descritas.

El cuadro I muestra las distintas técnicas empleadas sobre los diferentes materiales.

CUADRO I

Se muestran las diferentes técnicas utilizadas sobre los distintos materiales, con y sin tratamiento previo.

En la parte superior vienen indicados los diferentes materiales empleados, así como los grosores de los cortes efectuados sobre ellos. En el lateral izquierdo aparecen los distintos tratamientos realizados, o la inscripción "sin tratar" para aquellos cortes que no fueron sometidos a ninguno de ellos.

Las abreviaturas de las diferentes técnicas de tinción y tratamientos empleados son:

VMP = Tinción con Verde Metilo-Pironina

VM = Tinción con Verde metilo

P = Tinción con Pironina

N = Método de Nissl

G = Tinción con colorante de Giemsa

F = REacción de Feulgen

A-B = Tinción con Azur-B

D = Disociación de las cadenas de DNA

D+R = Disociación y reasociación del DNA

DNasa = Hidrólisis enzimática del DNA

RNasa = Hidrólisis enzimática del RNA

[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

MEDIOS DE OBSERVACION Y PROCEDIMIEN-
TOS EMPLEADOS.

Las observaciones fueron realizadas empleando objetivo de inmersión planacromático. Se efectuaron impresiones fotográficas en blanco y negro y en color para la realización de las diferentes medidas.

Los negativos en blanco y negro de las preparaciones efectuadas con las técnicas del Verde metilo-Pironina y del Azur B, fueron realizadas por triplicado para cada imagen, efectuando una impresión con filtro gris, otra con filtro verde y otra con filtro rojo. Estas distintas impresiones tenían la finalidad de obtener una imagen general y otras dos donde se resaltaran las regiones teñidas de rojo y verde respectivamente. Para el caso de las preparaciones efectuadas con la técnica del Verde metilo, las impresiones en blanco y negro fueron efectuadas empleando un filtro rojo. En las preparaciones efectuadas con las técnicas de Pironina y Feulgen, el filtro usado fue el verde. Para las preparaciones procedentes de tinciones con los métodos de Giemsa y Nissl se emplearon filtros grises y azules para la obtención de los negativos.

Para la obtención de valores cuantitativos se realizaron medidas celulares concernientes a los tamaños de la HC asociada al nucléolo, nucléolo, núcleo y superficie celular.

Para el establecimiento de éstos índices cuantitativos se escogieron dos poblaciones celulares que se diferen

ciaran en el tamaño medio de sus células. A tal efecto, se han escogido dos núcleos bulbares; el núcleo del nervio Hipogloso y el núcleo motor dorsal del nervio Vago. Estos dos núcleos presentan la ventaja de su localización próxima -- (prácticamente discurren de manera paralela entre límites superiores e inferiores del bulbo) y de su naturaleza motora común. Con ésto se han intentado eliminar las variables que pudieran surgir, en los parámetros medidos, como consecuencia de la distinta localización de las poblaciones escogidas, o las debidas a diferencias de funcionalidad sensible o motora.

Las células del núcleo del nervio Hipogloso representan, por otro lado, una población cuyos elementos son de gran tamaño, cercano, incluso, al de las grandes células motoras medulares. Las células pequeñas del núcleo dorsal del nervio Vago representan, por el contrario, una población cuyo tamaño celular medio es relativamente pequeño, y se diferencia apreciablemente del de la población del núcleo del -- nervio Hipogloso.

En cada una de éstas poblaciones se estableció el número aproximado de células que constituye el total de ellas, realizandose las medidas de parámetros celulares sobre una muestra, de cada una de éstas poblaciones, escogida aleatoriamente. Cada una de éstas muestras contenía un número de -- células que representaba un 10% del total de las respectivas poblaciones, y estaban distribuidas a lo largo de diferentes

niveles del nucleo considerado. Las células escogidas debían mostrar las masas de HC asociada al nucléolo dispuestas de manera perpendicular a la dirección de observación, de manera que fueran fácilmente observables y medibles; se descartaron también las células cuyo nucléolo ofrecía la posibilidad de aparecer cortado en la preparación, procurándose que el nucléolo estuviera totalmente contenido en el corte para las células escogidas.

Las células elegidas fueron fotografiadas todas -- ellas a los mismos aumentos, intercalando una retícula ocular que aparecía sobre el negativo superpuesta con la imagen de la célula. Esta cuadrícula servía como índice de escala al haberse calibrado anteriormente las dimensiones de cada cuadro, para los aumentos empleados, con un micrómetro de objetivo. Los negativos obtenidos eran montados sobre un marquito de diapositivas para poder proyectarlos como tales. Los negativos eran proyectados sobre una pantalla horizontal con la ayuda de un espejo situado en ángulo de 45° frente al proyector y en la vertical de la pantalla, tal como se observa en la figura 1.

Sobre cada una de las células proyectadas se realizó la medida de la superficie celular, superficie nuclear, superficie nucleolar, y superficie de la HC asociada al nucléolo que mostraba dicha célula; estas medidas eran expresadas en micras cuadradas utilizando como índice de escala la cuadrícula que aparecía superpuesta .

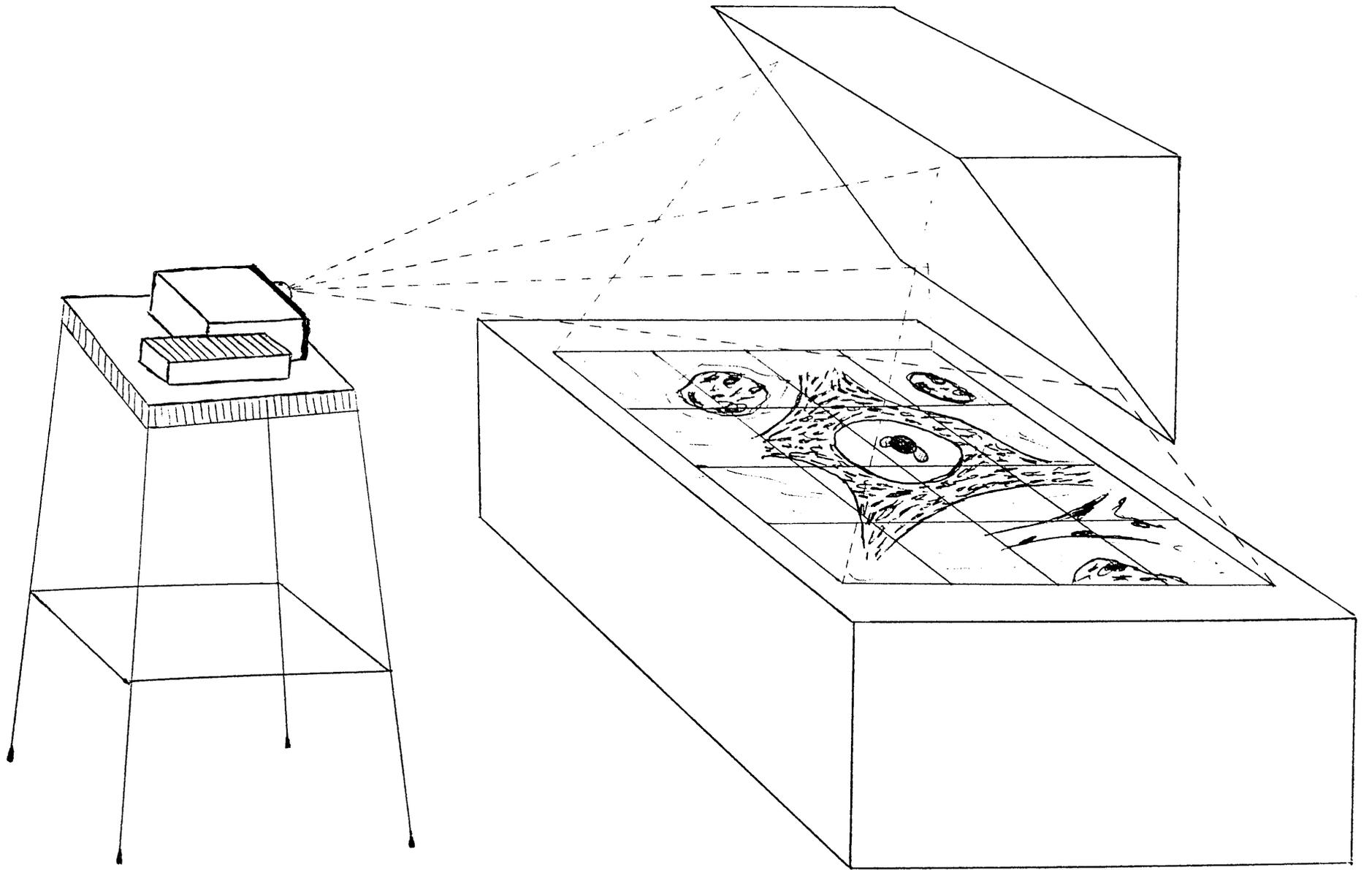


Fig. 1

Sobre éstas medidas celulares se efectuaron los --
cálculos y operaciones subsiguientes para el establecimiento
de índices y comparaciones entre las diferentes poblaciones
estudiadas.

RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS TRAS LA APLICACION DE LAS TECNICAS DE TINCION.

Lámina 1

Aspecto de distintas neuronas del ratón teñidas con diferentes técnicas. Las masas de HCNu vienen indicadas con flechas.

A: Tinción con Verde metilo-Pironina; 3.000 x.

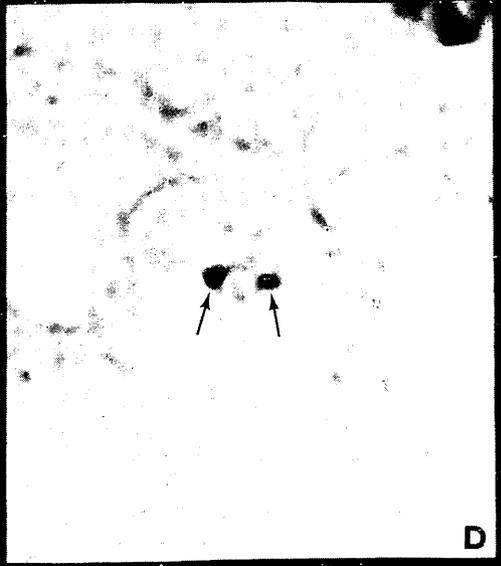
B: Tinción con colorante de Giemsa; 4.000 x.

C: Método de Nissl; 3.000 x.

D: Reacción de Feulgen; 3.500 x.

E: Tinción con Azur-B; 3.000 x.

F: Neurona tratada con DNasa y teñida posteriormente con Verde metilo-Pironina. Los restos de la HCNu, tras este tratamiento, se indican, así mismo, con flechas; 3.000 x.



Las neuronas del cerebro de ratón, en las preparaciones realizadas con la técnica del Verde metilo-pironina, presentan el aspecto mostrado en la figura A de la lámina 1. Su citoplasma, mas o menos granular, aparece teñido de rojo; el núcleo, claro, contiene un nucléolo intensamente teñido de rojo que presenta adosadas a su superficie una o dos masas de color verde; el resto de la zona nuclear muestra algunos grumitos, verdes y rojos, de pequeño tamaño y número escaso.

Debido a las propias características citoquímicas de la tinción con Verde metilo-Pironina, como a la peculiaridad de las imagenes obtenidas, se viene considerando que los componentes celulares basófilos -intra o extranucleares- ricos en RNA, se corresponden con las zonas que aparecen teñidas de rojo; la cromatina nuclear toma, por el contrario, el color verde, revelando su constitución a base de desoxirribonucleoproteinas. De esta forma, en las neuronas del ratón, el nucléolo y el material basófilo citoplasmático, equivalente a los grumos de Nissl, aparecen con coloración roja, mientras que los grumos de color verde azulado intranucleares representarían masas heterocromáticas, destacando entre ellas las de HC asociada al nucléolo por su peculiar tamaño y localización.

Las células neuronales del ratón albino presentan, por tanto, unas masas de HC asociada al nucléolo relativamente voluminosas, mientras que la existencia de cromocentros es,

por el contrario, escasa. En los núcleos de las células gliales aparece, sin embargo, una mayor cantidad de componentes heterocromáticos, bajo la forma de cromocentros, adosados a la cara interna de la membrana nuclear; el citoplasma glial se presenta con un aspecto uniforme, tiñéndose tenuemente de un color rojo rosado.

Esta morfología neuronal se corresponde de manera bastante precisa con la obtenida tras la aplicación de la técnica del Azur-B. Es ésta una tinción de tipo histoquímico usada frecuentemente para diferenciar zonas celulares -- constituidas por DNA y RNA. En los cortes cerebrales de ratón teñidos con esta técnica, las neuronas presentan un citoplasma y nucléolo teñidos de rojo oscuro; los grumos intranucleares aparecen de color verdoso, destacando entre ellos una o dos masas voluminosas adosadas a la superficie nucleolar, tal como se observa en la figura E de la lámina 1. Al igual que con la técnica del Verde metilo-Pironina, tras la tinción con Azur-B, el RNA nucleolar y citoplasmático toma, como vemos, el color rojo, mientras la heterocromatina -- cromocentros y masas de HC asociada al nucléolo -- aparece de color verdoso. Las células gliales presentan un aspecto parecido al que mostraban con la técnica del Verde metilo Pironina, destacando la mayor riqueza heterocromática de sus núcleos.

La observación de la HC asociada al nucléolo puede realizarse también con técnicas monocromáticas como son las

tinciones con colorante de Giemsa o mediante el empleo del método de Nissl.

Tras la tinción con el colorante de Giemsa, el citoplasma neuronal y el nucléolo aparecen de un color azulado, mientras que las masas asociadas al nucléolo lo hacen en azul oscuro, destacando, por su intensidad, de la coloración nucleolar. La imagen de una neurona cerebral del ratón teñida con esta técnica se observa en la figura B de la lámina 1. La tinción con el colorante de Giemsa se revela también como parcialmente fibrilar, apareciendo en los preparados sometidos a esta técnica una mayor cantidad de neuropilo que en los casos de las técnicas anteriormente descritas. La observación de una mayor cantidad de prolongaciones dendríticas en las neuronas teñidas con colorante de Giemsa es también patente al compararlas con las técnicas anteriores.

El método de Nissl ofrece imágenes neuronales muy parecidas a las obtenidas con la tinción de Giemsa, si bien se diferencian en el tono general de la coloración. El aspecto de una neurona teñida con el método de Nissl aparece en la figura C de la lámina 1, mostrando un citoplasma granular de color violeta claro, así como un nucléolo esférico con la misma coloración; la HC asociada al nucléolo aparece con una tonalidad más oscura, destacando del nucléolo por su intansidad y su tono más violeta. La cantidad de neuropilo en las preparaciones de Nissl es, sin embargo, prácticamente nula y parecida, por tanto, a la que aparece con los métodos del -.

Verde-metilo-Pironina o Azur-B.

En los casos de las tinciones con colorante de Giemsa o con el método de Nissl, las células gliales siguen presentando las características antes apuntadas. Su núcleo se revela como mucho más heterocromático que el neuronal, y su citoplasma, difícil siempre de poner de manifiesto, se tiñe tenue y homogéneamente con una coloración semejante a la del citoplasma neuronal.

Hay que hacer notar también, que con estos métodos monocromáticos, la diferenciación entre cromocentros y grumos intranucleares constituidos por RNA, se hace más difícil que con los otros dos métodos, donde aparece una especificidad diferencial. El conjunto de grumitos intranucleares toma con Giemsa ó Nissl coloraciones azuladas o violetas, en tonos variables, haciéndose difícil la diferenciación entre los que tienen carácter cromatínico y los que representarían pequeñas masas de RNA intranucleares.

La aplicación del método de Feulgen permite la observación, de manera muy clara, de la HC asociada al nucléolo, tal como se observa en la figura D de la lámina 1. Efectivamente, este método, al poner de manifiesto solo las estructuras celulares que presentan un carácter desoxirribonucleoprotéico, permite distinguir claramente las masas heterocromáticas adosadas a la superficie nucleolar; junto a ellas, aparecen también los escasos cromocentros existentes en el -

interior del núcleo neuronal. Las imágenes de neuronas del ratón sometidas a este método histoquímico, muestran también una fina capa de cromatina que envuelve superficialmente al nucléolo, más patente en unas células que en otras, de donde emergen las masas de HC, cuya morfología y tamaño son nitidamente delimitadas con ésta técnica. Los núcleos gliales aparecen como estructuras rellenas de una gran cantidad de grumitos rojos, dispuestos principalmente sobre la cara interna de la membrana nuclear.

Las imágenes resultantes de la aplicación de estas distintas técnicas, pone de manifiesto que la HC de las neuronas del ratón albino se encuentra, principalmente, bajo la forma de HC asociada al nucléolo, siendo escasa la cantidad de cromocentros en los nucleos neuronales. Por otra parte, estas masas heterocromáticas asociadas al nucléolo presentan un tamaño relativamente voluminoso, mayor, en algunos casos, que la propia masa nucleolar.

La aplicación de las diferentes técnicas permite, por demás, establecer algunas características propias de esta HC asociada al nucléolo de las neuronas del ratón.

PECULIARIDADES DEL PROCEDER TECNICO

Con respecto a la tinción con Verde metilo-Pironina, hay que hacer notar la diferencia de coloración de esta HC en relación al pH utilizado y al proceso empleado en la técnica. Es fundamental, para la obtención de una coloración homogénea y constante, la purificación del Verde metilo comercial en la forma descrita en el apartado "Métodos", así como una fijación del pH óptimo para el material empleado.

A pHs bajos predomina la tinción de las estructuras celulares que toman el color verde, de manera que a medida que bajamos el pH de la mezcla colorante por debajo de 5 la coloración de citoplasma y nucléolo se va haciendo más tenue, mientras que la HC toma una coloración verdosa de color cada vez más claro. Llega un momento, cuando el pH se ha hecho demasiado bajo, en que desaparece prácticamente la coloración de estructuras ribonucleoproteicas, apareciendo solo las estructuras celulares heterocromáticas en una tonalidad verde clara, coloración que no llega a desaparecer a pHs muy bajos.

Por el contrario, a medida que realizamos el método de tinción a pHs cada vez más básicos, la intensidad de coloración del citoplasma y nucléolo va aumentando, llegando incluso a aparecer la HC en un color azulado, en lugar de verde, posiblemente por tomar, a estos pHs tan altos, las estructuras heterocromáticas algo de pironina y mezclarse los colores verde y rojo.

De manera que es preciso una fijación estricta del pH óptimo para el material usado que permita colorear nitidamente en rojo y verde los componentes celulares constituidos por RNA y DNA respectivamente; de otra forma existirá una -- disminución o enmascaramiento de las coloraciones que repercutirá siempre en la nitidez de las estructuras.

La utilización de cada uno de estos colorantes de manera individual nos ha servido para establecer su respectiva afinidad por las ribo- o desoxirribonucleoproteínas respectivas. Al pH óptimo, ambos colorantes se comportan individualmente de una manera semejante, pero opuesta. Así, al teñir solo con Verde metilo, se teñían tanto las zonas ribonucleicas como las heterocromáticas, pero la intensidad de coloración que tomaba la HC era mucho más intensa que aquella con la que aparecían citoplasma y nucléolo. Por el contrario, tras la utilización solo de la Pironina, como agente colorante, aunque también se tiñen tanto el nucléolo y citoplasma como la HC, la tonalidad de esta última es mucho más débil -- frente al intenso color rojo que adquieren las regiones celulares ricas en RNA.

El estudio del desarrollo de las tinciones monocromáticas efectuadas con el colorante de Giemsa o con el método de Nissl, ha revelado también que sus resultados se deben a una diferencia de afinidad, entre las regiones heterocromáticas y las constituidas por ribonucleoproteína, respecto al colorante utilizado, puesto que los mejores resultados

se obtienen con tiempos de tinción relativamente cortos. Efectivamente, con tiempos muy cortos de tinción, las neuronas muestran unas masas de HC teñidas con cierta intensidad, mientras que el citoplasma y el nucléolo aparecen muy tenues. A medida que aumenta el tiempo de tinción, el contraste ente ambas estructuras va haciendose menos patente, hasta que llega un momento, con tiempos de tinción bastante prolongados, en que ambas regiones celulares muestran una intensidad de coloración prácticamente idéntica, haciendose difícil su diferenciación.

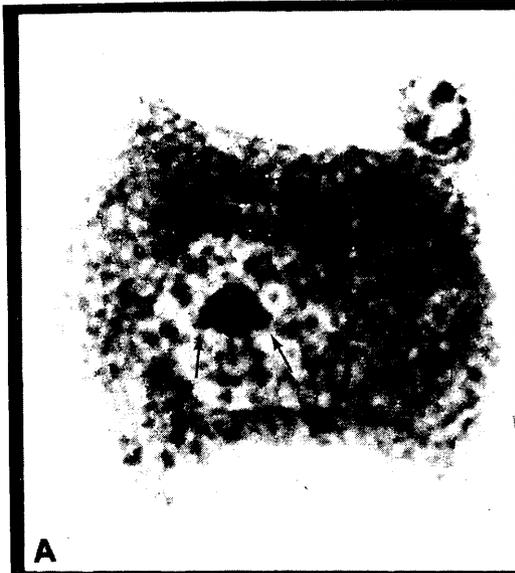
El pH, en este caso, afecta de manera semejante tanto al citoplasma y nucléolo, como a la HC, influyendo sobre la fijación del colorante; de manera, que a pHs bajos es necesario un mayor tiempo de tinción para obtener imágenes claras, pero el colorante continúa fijándose antes sobre las estructuras heterocromáticas que sobre el citoplasma y nucléolo; por el contrario, a pHs altos, el colorante se fija a las estructuras de una manera más rápida, aunque siempre lo hace primero a la HC que a las regiones de naturaleza ribonucleoproteica. De manera que con estos colorantes es conveniente no trabajar a pHs muy elevados para tener una mejor posibilidad de control sobre la diferencia de intensidad en ambas regiones celulares.

RESULTADOS ENCONTRADOS TRAS LA REA-
LIZACION DE LOS DIFERENTES TRATAMIE-
TOS EFECTUADOS.

Lámina 2

Neuronas del raton, tras sufrir distintos tratamientos, teñidas con diferentes técnicas. Las masas de HCnu, o los restos que de ellas quedan tras digestión con DNasa, se indican con flechas.

- A: Hidrólisis con DNasa y tinción con el método de Nissl; --
3.000 x.-
- B: Hidrólisis con RNasa y tinción con Verde metilo-Pironina;
5.000 x.-
- C: Hidrólisis con RNasa y tinción con colorante de Giemsa; --
5.000 x.-
- D: Tratamiento con RNasa y reacción de Feulgen; 4.000 x.-
- E: Tratamiento de disociación del DNA por incubación en Formamida y tinción subsiguiente con Verde metilo-Pironina; 3.000 x
- F: Disociación y reasociación del DNA seguida de tinción con Verde metilo-Pironina; 3.000 x.



Las preparaciones que fueron sometidas a un proceso de disociación de las cadenas de DNA, mediante incubación en formamida, mostraban una desaparición prácticamente total de la tinción subsiguiente sobre las estructuras heterocromáticas.

Los preparados que eran sometidos a esta disociación en formamida, y a un tratamiento posterior en formol para bloquear la reasociación de las cadenas de DNA, tras la tinción con Verde metilo-Pironina mostraban unas neuronas donde habían desaparecido las masas de HCnu, así como el resto de grumitos heterocromáticos que pudieran existir en el interior del núcleo neuronal. La figura E de la lámina 2 muestra una neurona, teñida con esta técnica, tras el tratamiento en formamida.

Cuando el tiempo de incubación no ha sido totalmente suficiente, algunas neuronas muestran una tenue coloración verdosa sobre las estructuras heterocromáticas, coloración que desaparece totalmente con tiempos de incubación suficientemente largos.

El nucléolo y el citoplasma tras la incubación en formamida siguen tiñéndose normalmente, de color rojo, aunque puede apreciarse una cierta acción del medio de incubación también sobre las estructuras ribonucleoprotéicas, consistente, fundamentalmente, en una disminución de la intensidad de la coloración, de manera que nucléolo y citoplasma

muestran un color mas rosado que el rojo intenso con que --
aparecían en la tinción normal, sin incubación alguna.

Esta desaparición de la HC es también demostrable en las células gliales que muestran un núcleo con escasos grumos, teñidos de color rojizo, frente a la riqueza en masas verdosas que ofrecen en situación normal.

La HCnu, tras la incubación en formamida, no puede ponerse de manifiesto con ninguna de las restantes técnicas empleadas; la aplicación del método de Feulgen se revela, así mismo, negativa, no consiguiendo demostrar la existencia de las masas heterocromáticas tras la mencionada incubación. La alteración moderada de las regiones ribonucleoproteicas es también demostrable con las distintas técnicas capaces de teñir estas regiones, patentizándose en una disminución de la intensidad de coloración de estas zonas, en relación a la que adquieren en condiciones normales.

En los preparados que, tras someterlos a la incubación en formamida, fueron incubados posteriormente en medio salino, sin bloqueo previo con formol, para conseguir la reasociación nuevamente de las cadenas de DNA, las masas de HCnu pudieron ser de nuevo, puestas de manifiesto tras la reasociación.

Así, tras la tinción con Verde metilo-Pironina, empleada posteriormente a los procesos de disociación y reaso-

ciación, las neuronas mostraban las típicas masas de HCnu, con la configuración y aspectos característicos, teñidas de verde. Cuando los tiempos de reasociación en medio salino no eran suficientes, la HCnu aparecía tenuemente teñida de verde, coloración que iba aumentando a medida que el tiempo de reasociación era mas prolongado, hasta alcanzar prácticamente la misma intensidad que en situación normal, sin tratamiento alguno. La imagen F de la lámina 2 muestra una neurona teñida con Verde metilo-Pironina, tras someterla a los procesos de disociación seguida de reasociación.

En las células gliales volvían nuevamente a ponerse de manifiesto masas heterocromáticas en el interior de sus núcleos, tras la reasociación en solución salina, que aparecían con la típica coloración verdosa al emplear la técnica del Verde metilo-Pironina. No obstante, tras una hora de reasociación, tiempo suficiente para que aparezcan de nuevo las masas de HCnu en las neuronas, la cantidad de cromocentros en las células gliales era algo menor que la que suele existir en condiciones normales, sin tratamiento alguno. Parece, por tanto, que este tiempo de incubación en medio salino no permite la total reasociación de las cadenas del DNA constituyente de todos los cromocentros, quedando algunos de ellos cuyo DNA no ha terminado de reasociar y no pueden ponerse aun de manifiesto.

La reasociación del DNA que integra la HCnu, y por tanto la posibilidad de volver a poner de manifiesto esta HC, es también demostrable con las distintas técnicas usadas tras

este proceso. Con todas ellas, las masas de HCnu vuelven a mostrarse, presentando las características morfológicas y de coloración que presentaban, con cada una de las técnicas, antes de ser sometidas al proceso de disociación seguido de incubación en solución salina para reasociar nuevamente las cadenas de DNA.

La alteración de las estructuras ribonucleoprotéicas, acaecida como resultado de la incubación en formamida, continúa, no obstante, mostrándose después de la reasociación en medio salino, ya que su presencia en citoplasma y -nucléolo continúa apareciendo, tras la reasociación, con una intensidad de coloración más tenue que la que presenta en -condiciones normales. Parece, por tanto, que la incubación en medio salino no restaura las alteraciones sufridas por -las ribonucleoproteínas celulares tras el tratamiento con -formamida, o que incluso pudiera añadir un nuevo efecto debilitante en estas estructuras, pues la intensidad de coloración de ellas es, en algunos casos, aun menor, tras la disociación y reasociación, que la que presentan tras sufrir solamente el proceso disociativo.

Las preparaciones tratadas con DNasa y teñidas con Verde metilo-Pironina, mostraban unas neuronas que aparecían solamente teñidas de color rojo, habiendo perdido toda afinidad por el Verde metilo de la mezcla colorante. Sin embargo, el nucléolo continuaba mostrando unas pequeñas masas adosadas a su superficie, solo que se diferenciaban de las que aparecen

en situación normal en que su tamaño es más pequeño y en que aparecen teñidas de color rojo. El aspecto de una neurona, teñida con esta técnica tras el tratamiento con DNasa, aparece en la figura F de la lámina 1; el citoplasma y el nucléolo muestran su típica coloración roja de gran intensidad, y adosadas a la superficie nucleolar aparecen unas masas, algo más pequeñas que las existentes en condiciones normales, que se tiñen también de color rojo y con la misma intensidad que nucléolo y citoplasma.

Esta presencia de masas adosadas a la superficie nucleolar, con características tintoriales semejantes a las que ofrecen las regiones ribonucleoprotéicas, tras el tratamiento con DNasa, es también comprobable con las restantes técnicas aplicadas.

La tinción con Azur-B revela unos resultados semejantes a los conseguidos con la técnica del Verde metilo-Pirronina, apareciendo el citoplasma, nucléolo y las pequeñas masas adosadas a éste, en color rojizo, desapareciendo toda coloración verdosa en las células.

La tinción con técnicas monocromáticas revela, del mismo modo, la persistencia, tras la hidrólisis con DNasa, de pequeñas masas adosadas a la superficie nucleolar que muestran unas características de afinidad tintorial semejantes a las de citoplasma y nucléolo. La figura A de la lámina 2 muestra una neurona teñida con el método de Nissl, tras el tratamiento con

DNasa, donde aparecen dos pequeñas masas adosadas a la superficie nucleolar teñidas de color violeta, con la misma intensidad que el citoplasma y el nucléolo. La tinción con el colorante de Giemsa también nos muestra la existencia de masas asociadas al nucléolo teñidas de color azul, con la misma intensidad que la que presenta el citoplasma celular y el propio nucléolo.

En estas preparaciones tratadas con DNasa, la aplicación de la reacción de Feulgen se mostró totalmente negativa, revelando la inexistencia de estructuras celulares de carácter desoxirribonucleoproteico tras la hidrólisis enzimática del DNA.

Por otra parte, la tinción celular usando Verde metilo solo, tras la hidrólisis con DNasa, mostraba que las masas adosadas al nucléolo que persisten tras esta hidrólisis, se tiñen muy tenuemente de color verde, de la misma manera que lo hace el citoplasma y el nucléolo. Sin embargo la tinción solo con Pironina de estas preparaciones, mostraba como estas masas se teñían de rojo intenso, de la misma forma que aparecían el nucléolo y el citoplasma celular.

La aplicación de la hidrólisis enzimática del DNA con DNasa, y la subsiguiente tinción con las diferentes técnicas, revelan, en definitiva, que esta hidrólisis no hace desaparecer totalmente las masas de HCnu, sino que queda un resto de ellas, resistente a la hidrólisis con DNasa, que se

comporta tintorial e histoquímicamente de manera semejante a como lo hacen los componentes celulares ribonucleoproteicos, no afectados por el tratamiento con la enzima hidrolítica del DNA.

La hidrólisis enzimática con RNasa, por el contrario, hace desaparecer de las neuronas todos los componentes de carácter ribonucleoproteico, apareciendo, con la siguiente tinción, solo las estructuras heterocromáticas.

Así tras la tinción con Verde metilo-Pironina, después de someter a la preparación a la acción de la RNasa, las neuronas muestran el aspecto de la imagen B en la lámina 2; el citoplasma y el nucléolo aparecen sin teñir, destacando solo las masas heterocromáticas, teñidas de verde, en el interior del núcleo neuronal. La tinción con Azur-B ofrece imágenes semejantes a las obtenidas con Verde metilo-Pironina, apareciendo solo las masas heterocromáticas en color verdoso.

La figura C de la lámina 2 muestra el aspecto de una neurona, tras la hidrólisis con RNasa, teñida con el colorante de Giemsa. El citoplasma y el nucléolo han perdido su afinidad tintorial, apareciendo solo en las neuronas las estructuras heterocromáticas nucleares teñidas de azul oscuro. El mismo aspecto es mostrado por las neuronas tras la coloración por el método de Nissl, apareciendo solo como estructuras coloreadas en el interior de las células las masas de HC nucleares, que lo hacen en un color violeta oscuro.

La aplicación del método de Feulgen, tras esta - hidrólisis con RNasa, no muestra imágenes diferentes a las que aparecen en situaciones normales, sin hidrólisis alguna, apareciendo solo las estructuras heterocromáticas neuronales en un color rojo púrpura. La Figura D de la lámina II - presenta un ejemplo de la aplicación de este método tras la hidrólisis enzimática del RNA.

Mediante la tinción con Verde metilo solo, o con Pironina solamente, las neuronas tratadas con RNasa ponen de manifiesto únicamente sus masas de HC nuclear, apareciendo, estas teñidas de verde con el primer colorante y en rosa tenue con el segundo.

De esta manera, tras la hidrólisis enzimática del RNA mediante la RNasa, desaparecen de las neuronas las estructuras de carácter ribonucleoproteico, poniéndose de manifiesto solo las estructuras heterocromáticas nucleares, con las diferentes técnicas; estructuras heterocromáticas que siguen manteniendo las afinidades tintoriales, frente a los distintos colorantes, y las características morfológicas que presentaban en situación normal, sin tratamiento alguno. La hidrólisis con RNasa hace que se destaquen de manera muy clara las masas de HCnu, al ser esta, el componente heterocromático más llamativo de los núcleos neuronales.

El cuadro adjunto muestra una síntesis de los diferentes resultados que ofrecen cada una de las técnicas emplea

das, tanto en situación normal como tras los distintos tratamientos realizados, sobre cada uno de los componentes nucleares -nucléolo y HC- analizados. El citoplasma neuronal se comporta siempre de manera paralela al nucléolo frente a las distintas técnicas.

Cuadro II

Resultados de las diferentes técnicas de tinción, con y sin tratamiento previo, sobre los componentes neuronales ribonucleoproteicos y heterocromáticos.

La entrada superior del cuadro representa las diferentes técnicas de tinción; la entrada lateral, los distintos tratamientos -o la ausencia de ellos-, así como los componentes celulares estudiados.

Nu representa el Nucléolo, que sirve de patrón para las estructuras ribonucleoproteicas. HC representa la heterocromatina asociada al nucléolo.

En cada cuadro se ha representado la coloración obtenida y la intensidad de ella mediante signos +. Una raya horizontal significa ausencia de coloración sobre esa estructura concreta.

Las abreviaturas de las técnicas y tratamientos son las mismas que en el cuadro I.

		VMP	VM	P	N	G	F	A-B
sin tratar	Nu	Rojo +++	Verde +	Rojo +++	Violeta ++	Azul ++	-	Rojo +++
	HC	Verde +++	Verde +++	Rojo +	Violeta +++	Azul +++	Púrpura +++	Verde +++
D	Nu	Rojo ++	Verde +				-	Rojo ++
	HC	-	-				-	-
D+R	Nu	Rojo ++	Verde +				-	Rojo ++
	HC	Verde +++	Verde +++				Púrpura +++	Verde +++
DNasa	Nu	Rojo +++	Verde +	Rojo +++	Violeta ++	Azul ++	-	Rojo +++
	HC	Rojo +++	Verde +	Rojo +++	Violeta ++	Azul ++	-	Rojo +++
RNasa	Nu	-	-	-	-	-	-	-
	HC	Verde +++	Verde +++	Rojo +	Violeta +++	Azul +++	Púrpura +++	Verde +++

OBSERVACIONES SOBRE LA MORFOLOGIA
DE LA HETEROCROMATINA NEURONAL ASO-
CIADA AL NUCLEOLO

La HC neuronal asociada al nucleolo, estructura - objeto de nuestro estudio, aparece, con cualquiera de las - técnicas antes expuestas, en las neuronas cerebrales del ra - tón, bajo la forma de masas más o menos voluminosas y bas - tante patentes adosadas a la superficie de la estructura nu - cleolar.

Las observaciones efectuadas, con estas mismas - técnicas, en otros tipos celulares de este animal, también permite observar la existencia de estructuras heterocromáti - cas adosadas a la superficie del nucleolo, aunque de manera menos clara. Esto se debe, en parte, a la mayor abundancia de componentes heterocromáticos en forma de cromocentros en otros tipos celulares del ra - tón en comparación con las cé - lu - las neuronales, y en parte, también, a que estas masas de HC asociada al nucleolo son mayores en las neuronas que en otras células del ra - ton.

Por tanto, la existencia de HC asociada al nu - cle - lo parece ser frecuente en muchos de los tipos celulares del ra - tón albino, aunque destaca en el caso de las neuronas por su claridad y tamaño.

Las preparaciones efectuadas con estas técnicas - sobre material procedente de cerebros de gato y rana ha per - mitido constatar la escasez o ausencia de HC asociada al nu - cle - lo en neuronas de estas otras especies. Efectivamente, las células neuronales del gato o de la rana no presentan -

estructuras heterocromáticas adosadas a su nucleolo, o bien estas aparecen como pequeños grumitos, en número escaso, - que hacen protusión sobre la superficie de este componente nuclear; en cualquier caso, estas pequeñas estructuras heterocromáticas asociadas al nucléolo, en neuronas de estas - procedencias, nunca muestran la amplitud, generalidad, ni tamaño de las que aparecen en las neuronas de ratón.

Las neuronas del ratón albino se ofrecen, de esta manera, como un material bastante idoneo para el estudio de la HC neuronal asociada al nucleolo por la generalidad y - abundancia de esta estructura en sus núcleos, hecho que, - por otra parte, no es exclusivo de las células neuronales de este animal, y que ha sido descrito, por otros autores, para células nerviosas de otros tipos de animales.

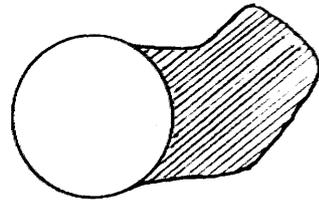
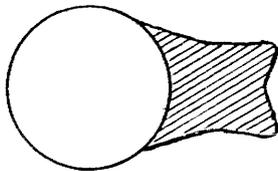
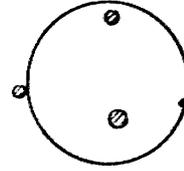
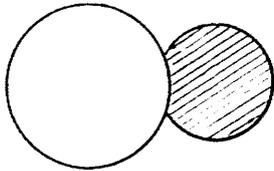
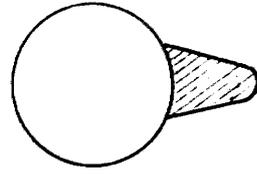
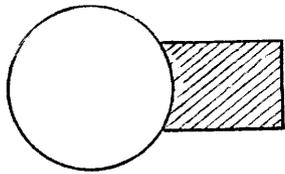
La Heterocromatina asociada al nucleolo (HCnu) en las neuronas del ratón albino, aparece de manera más frecuente en forma de una o dos masas situadas sobre la superficie del nucleolo. En un mismo cerebro, e incluso en una determinada zona, hay neuronas que presentan una sola masa de HCnu, otras presentan dos, e incluso algunas neuronas poseen, independientemente de esta -o estas- masas, una serie de grumitos heterocromáticos muy pequeños, y en número escaso, esparcidos sobre la superficie del nucleolo. El hecho más frecuente es la existencia de dos masas de HCnu y, generalmente, estas suelen disponerse de manera opuesta sobre la superficie nucleolar.

La morfología que muestran estas masas de HCnu es algo variable de unas neuronas a otras. La superficie mostrada en los cortes por estas masas es, generalmente, regular y de manera mas frecuente se acerca a la de un círculo, un trapecio o triangulo, y un rectangulo, según se muestra en el esquema adjunto. En ocasiones estas masas pueden presentar una configuración más irregular, apareciendo como estructuras bifurcadas o como masas alargadas, en angulo. Los pequeños grumitos que ocasionalmente pueden aparecer sobre la superficie del nucleolo suelen hacerlo como puntos muy diminutos.

Cuando estas masas aparecen bajo una constitución circular, la imagen que muestra la superficie nucleolar y la de esta HCnu es la de dos círculos secantes con una pequeña zona común. Las configuraciones en rectangulo o trapecio también muestran, en su base de unión al nucleolo, esta pequeña zona común para ambas estructuras.

El tamaño medio para estas masas heterocromáticas oscila alrededor de $0,5-1\mu$ de longitud por $0,5\mu$ de grosor.

La aparición de uno u otro tipo de configuraciones así como la existencia de una o dos masas, aparece de manera independiente de que el cerebro analizado pertenezca a un individuo macho o hembra. Por otra parte, en un mismo cerebro, e incluso en una determinada zona, coexisten los distintos tipos morfológicos antes descritos, con tamaños también varia



Patrones morfológicos más frecuentes de aparición de la HC asociada al nucléolo. Las masas de HCnu vienen representadas por las zonas ralladas; el nucléolo, por círculo blanco.

En este esquema se han representado únicamente una de las masas asociadas, pudiendo darse el caso de que ambas masas de HCnu, para una misma célula, adopten la misma configuración o aparezcan con formas diferentes.

bles.

La existencia de estas masas de HCnu suele ocurrir en casi todas las neuronas y el tamaño varía entre dimensiones relativamente pequeñas y otras muy voluminosas. Existen no obstante, neuronas, generalmente aquellas cuyo tamaño es muy grande, que no presentan masas compactas de HCnu; en -- estos casos solo existe un pequeño número de diminutas granulaciones heterocromáticas, esparcidos como antes dijimos sobre la superficie del nucléolo, y en ocasiones ni siquiera eso. Esta ausencia de masas de HCnu en algunas neuronas grandes continúa existiendo aún en aquellos casos en que el nucléolo permanece íntegramente comprendido en el grosor del corte (hecho comprobado en cortes de 30μ sobre nucléolos situados cerca del centro del grosor del corte), lo que elimina la posibilidad de que la ausencia de HCnu se deba a una sección del nucléolo que haya dejado fuera del corte la parte correspondiente donde iba adosada esta HCnu.

La configuración de estas masas heterocromáticas suele ser semejante cualquiera que sea la técnica empleada. Con cualquiera de los métodos de tinción utilizados, la HCnu muestra la morfología y disposición a que antes hemos aludido, diferenciándose, como es lógico, tan solo en la coloración con que aparece.

VALORES DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS

El estudio cuantitativo sobre la Heterocromatina neuronal asociada al nucléolo se ha realizado atendiendo a dos conceptos: estudio de los tamaños de esta HCnu en poblaciones neuronales diferentes, y relación de este tamaño con otros parámetros celulares.

A tal efecto, siguiendo el procedimiento expuesto en el apartado de Métodos, se han realizado medidas en un total de 277 células, divididas en dos poblaciones diferentes en cuanto a tamaño celular -núcleos del nervio Hipogloso y dorsal del nervio Vago-

Para cada neurona, se han medido las superficies celular (SC), nuclear (SN), nucleolar (SNu) y la de la HC asociada al nucléolo (SHCnu), Así mismo, se han establecido dos parámetros para cada célula: el que hemos denominado como Índice de Constitución (IC) y la llamada Constante de Organización Nucleolar (CON). El IC de cada célula se obtiene dividiendo la superficie de HCnu entre la superficie del respectivo nucléolo. La CON la hemos obtenido dividiendo la suma de las superficies nucleolar y de HCnu entre la superficie celular, y multiplicando por 100 el resultado. Estos dos valores, presentan un nuevo tipo de relación y de medidas que no habían sido establecidas hasta ahora por otros autores.

Los valores de los distintos parámetros celulares, en ambos núcleos, se ofrecen en las tablas siguientes. En -

ellas, los valores que se refieren a las distintas superficies vienen expresados en micras cuadradas; el IC y la CON no se expresan, como es lógico, en ningún tipo de unidades. Las distintas medidas celulares se han ordenado, en cada núcleo nervioso, según valores decrecientes de la SC.

Las fórmulas que representan los dos nuevos parámetros establecidos vienen expresadas por:

$$IC = \frac{SHCnu}{SNu} \quad CON = \frac{SHCnu + SNu}{SC} \times 100$$

Figura 2

Se indica la posición de los núcleos estudiados en dos cortes de bulbo dados a diferentes niveles.

El corte superior, dado a nivel del cuarto ventrículo, muestra la disposición de ambos núcleos -núcleo del Hipogloso (nH) y núcleo dorsal del nervio Vago (ndV), en el suelo del Ventrículo IV, con el núcleo dorsal del Vago localizado mas externamente que el del Hipogloso.

El corte inferior representa un nivel del bulbo más cercano a la región medular, donde el canal central - aun no se ha abierto para formar el Ventrículo IV. Ambos núcleos se localizan en las cercanías del canal endodimal, situandose el nucleo dorsal del Vago por encima de la zona que ocupa el nucleo del nervio Hipogloso.

Estos dos núcleos presentan una longitud parecida -algo mayor la del nucleo dorsal del Vago- y discurren paralelos por las cercanías del canal endodimal, hasta que, al abrirse este para formar el cuarto ventrículo, el núcleo dorsal del Vago se desvia para situarse mas lateralmente, en el suelo de este ventrículo, casi al mismo nivel que el núcleo del Hipogloso.

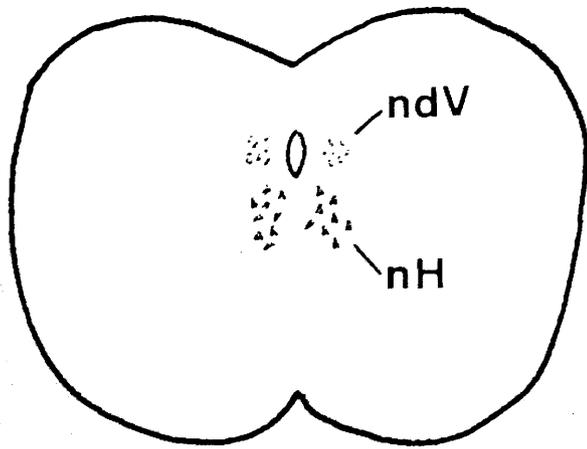
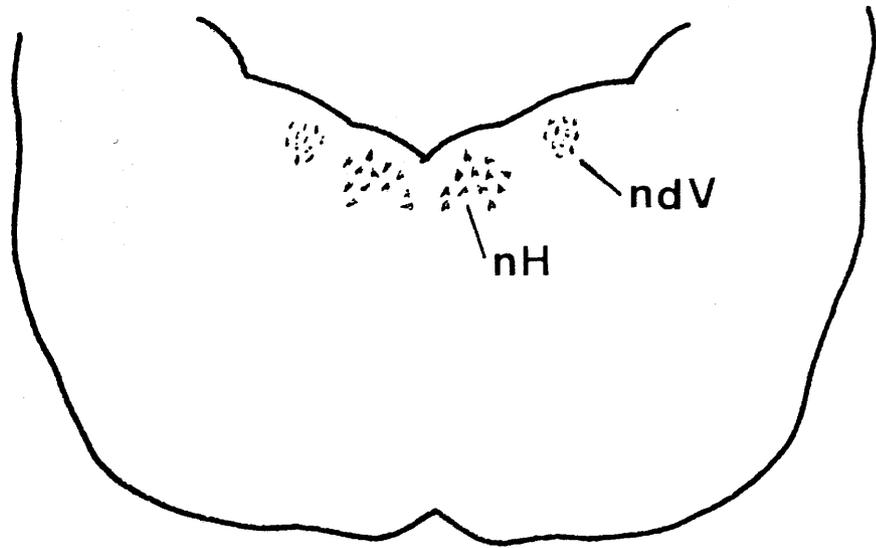
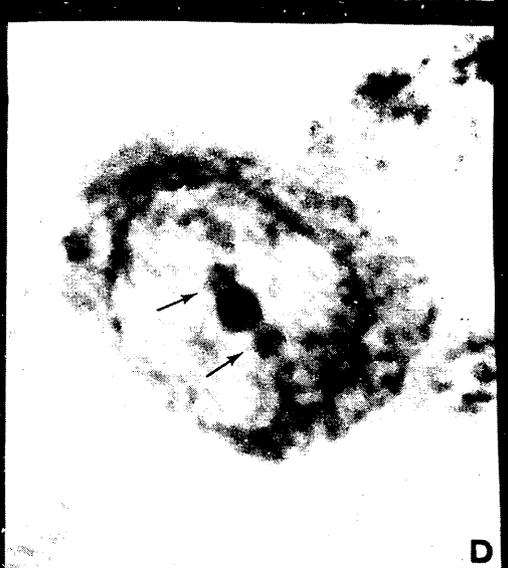
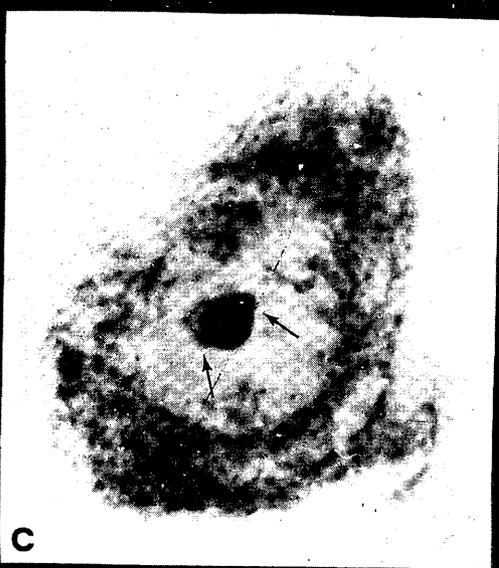
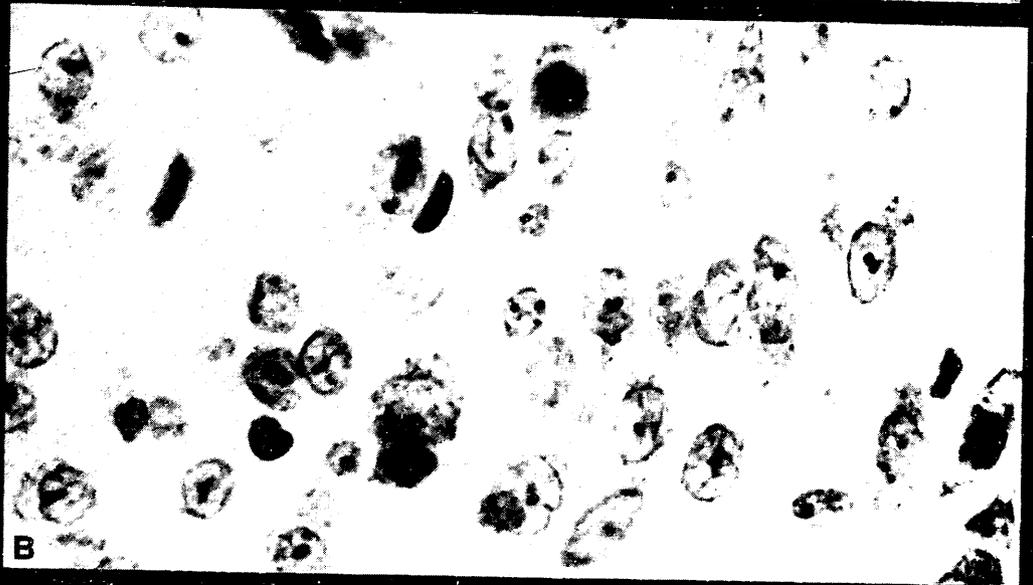


Lámina 3

Las figuras A y B muestran el aspecto general de las células del núcleo del nervio Hipogloso (A) y dorsal - del nervio Vago (B). Tinción con Verde metilo-Pironina. Observe la diferencia de tamaños entre las células de ambas poblaciones. Las dos imágenes se han realizado a los mismos aumentos: 1.000 x.

C: Aspecto de una neurona del núcleo del Hipogloso mostrando un gran nucleolo y pequeña cantidad de HC asociada. - Tinción con Verde metilo-Pironina; 3.000 x.

D: Aspecto de una neurona del núcleo dorsal del Vago con nucleolo más pequeño y grandes masas de HCnu. Tinción con Verde metilo-Pironina; 4.500 x.



MEDIDAS REALIZADAS EN EL NUCLEO DEL NERVIO HIPOGLOSO

Superficie celular (SC)	Superficie nuclear (SN)	Superficie nucleolar (SNn)	Superficie HC asociada al nucleolo (SHCnu)		Indice de Constitución (IC)	Constante de organización nucleolar (CON)
875.56345	170.72947	7.45062	0.00000		0.00000	0.85000
810.19571	130.67485	8.04250	0.00000		0.00000	0.99200
670.89748	134.17546	5.14720	0.00000		0.00000	0.76721
637.08703	132.26199	8.19402	0.00000		0.00000	1.28626
598.26086	119.38096	5.68325	0.00000		0.00000	0.94996
545.98345	119.38096	6.24581	0.00000		0.00000	1.14395
511.88704	153.91892	8.86685	0.00000		0.00000	1.73218
505.48525	93.31848	5.47392	0.41870		0.07648	1.16573
505.48344	120.87306	5.14720	0.00000		0.00000	1.01827
501.73143	125.38047	4.44882	0.22064		0.04959	0.89466
500.92765	99.73323	5.68325	0.00000		0.00000	1.13454
478.32423	129.08049	3.63053	0.55440		0.15270	0.87491
472.64618	143.89502	6.06889	0.00000		0.00000	1.28402
469.05462	113.63222	3.97610	0.41874		0.10530	0.93695
464.62128	178.60263	7.84269	0.00000		0.00000	1.68797
461.20094	115.65800	4.86957	0.00000		0.00000	1.05584
448.56110	107.84327	8.19402	0.00000		0.00000	1.82673
439.91369	123.50195	3.07908	0.78580		0.25520	0.87855
439.22584	130.36478	2.89530	0.73600		0.25420	0.82675
439.15335	137.20294	4.98760	0.27280		0.05469	1.19785

431.39697	109.30506	3.73253	0.63000	0.16878	1.01125
425.60795	75.24713	5.14720	0.00000	0.00000	1.20937
424.53980	116.34287	5.10708	0.69398	0.13588	1.36643
421.35453	128.96032	4.08282	0.32400	0.07935	1.04586
416.99910	128.40136	3.07908	0.69300	0.22506	0.90457
416.60710	110.44860	3.20475	0.45365	0.14155	0.87814
413.48734	113.85488	5.14720	0.32170	0.06250	1.32262
410.77842	118.67166	3.63053	0.45365	0.12495	0.99425
400.49407	159.07335	5.14720	0.32640	0.06341	1.36670
396.48814	125.40168	3.49670	0.44343	0.12681	0.99375
396.43976	100.93254	4.19099	0.81713	0.19497	1.26327
393.27570	140.36425	3.63053	0.51532	0.14194	1.05418
392.08613	111.85353	3.49670	0.22940	0.06560	0.95032
386.57838	122.33822	3.30066	0.53580	0.16233	0.99241
384.86367	112.27764	2.71717	0.62720	0.23082	0.86897
380.79962	110.30951	3.73257	0.49280	0.13202	1.10960
379.50410	117.05578	6.06989	0.00000	0.00000	1.59942
374.80796	74.70269	4.94811	0.00000	0.00000	1.32017
367.81036	102.04372	3.30066	0.83325	0.25244	1.12392
366.32745	107.81775	5.10708	0.51532	0.10090	1.53480
366.32745	104.64026	3.63053	0.43200	0.11899	1.10898
361.49999	115.01343	3.63053	0.00000	0.00000	1.00429
360.85831	89.41410	4.52390	0.21660	0.04787	1.31367
359.79881	98.17312	2.46070	0.76760	0.31194	0.89725
358.51586	121.69804	5.51545	0.00000	0.00000	1.53841
350.22164	91.31771	3.11028	0.53940	0.17342	1.04210
345.78884	125.75228	5.68325	0.49820	0.08766	1.78763
344.36523	123.96534	4.08282	0.36317	0.08895	1.29118

342.38602	93.26908	4.52390	0.31174	0.06890	1.41233
342.22077	92.20046	5.14720	0.00000	0.00000	1.50405
337.97380	113.33220	6.06989	0.00000	0.00000	1.79596
335.16568	153.50172	4.04710	0.19380	0.04788	1.26531
330.75197	85.11615	3.20475	0.32130	0.10025	1.06607
330.31167	114.54431	4.19099	0.90780	0.21660	1.54362
326.16123	87.98852	4.59962	0.50266	0.10928	1.56434
324.93412	110.86314	3.73253	0.40960	0.10973	1.27475
323.93234	82.10179	5.51549	0.00000	0.00000	1.70266
322.16103	108.33022	4.04710	0.28880	0.07135	1.34587
321.32442	91.80305	5.35024	0.00000	0.00000	1.66505
321.15619	114.54431	2.89530	0.13260	0.04579	0.94281
317.10431	119.78308	3.97610	0.30360	0.07635	1.34961
310.67282	71.24324	2.89530	0.40960	0.14147	1.06378
303.66988	93.88695	4.04710	0.00000	0.00000	1.32273
300.33068	99.17646	3.63053	0.55400	0.15259	1.39330
299.63010	95.42586	3.30066	0.00000	0.00000	1.10356
299.38786	76.08806	4.04710	0.08042	0.01987	1.37865
299.19475	113.89023	3.94082	0.48720	0.12362	1.47997
298.12252	131.89631	3.07908	0.66580	0.21623	1.25615
298.00966	62.93976	5.02728	0.00000	0.00000	1.68695
290.48961	79.49049	4.04710	0.35910	0.08873	1.51683
288.94363	77.94749	5.51549	0.00000	0.00000	1.90884
288.36024	76.30130	2.77592	0.73662	0.26536	1.21810
287.22266	106.13613	3.17311	0.46980	0.14805	1.26832
286.39171	96.02080	4.52390	0.00000	0.00000	1.57961
283.28043	86.42652	4.52390	0.00000	0.00000	1.59696
281.14013	85.10594	3.20475	0.57128	0.17826	1.24311

280.49972	80.21479	3.11028	0.69440	0.22325	1.35639
277.96563	75.17197	3.20475	0.63630	0.19854	1.38184
277.03548	101.31401	5.85352	0.02837	0.00484	2.12315
273.57838	49.84494	5.26856	0.73730	0.13994	2.19529
270.84865	85.94907	3.20475	0.28500	0.08893	1.28845
268.07343	71.51262	3.20475	0.69398	0.21658	1.45435
267.10991	99.22553	4.86957	0.20670	0.04244	1.90044
266.01168	80.48379	2.77592	0.45161	0.16268	1.21330
265.93840	80.15038	2.80554	0.44000	0.15683	1.22041
261.35018	85.60004	4.04710	0.35910	0.08873	1.68593
261.24705	81.43993	2.11241	0.77440	0.36659	1.10501
259.63439	81.90332	3.49670	0.55181	0.15780	1.55931
258.12155	91.39488	2.89530	0.73600	0.25420	1.40681
254.64215	104.93258	4.44882	0.34980	0.07862	1.88445
254.48821	111.63723	3.30066	0.32640	0.09888	1.42523
254.25401	95.70413	2.71717	0.91440	0.33652	1.42832
253.40233	86.53105	3.49670	0.00000	0.00000	1.37990
250.40233	86.11919	2.89530	0.44080	0.15224	1.33229
248.74011	66.53956	4.86957	0.00000	0.00000	1.95769
246.21253	79.49049	4.04710	0.21660	0.05351	1.73171
241.76497	116.31169	3.73257	1.02220	0.27385	1.96669
234.98131	74.24488	4.04710	0.27720	0.06849	1.84027
232.77245	56.75732	4.04710	1.08070	0.26703	2.20292
227.44210	56.03546	3.49670	0.32190	0.09205	1.67893
221.64459	68.40143	5.51549	0.19530	0.03540	2.57655
219.86645	57.03292	3.94082	0.00000	0.00000	1.79236
218.08846	62.11179	4.98760	0.00000	0.00000	2.28696
211.59603	75.89956	4.37436	0.11948	0.02731	2.12378

203.34273	64.62444	3.20475	0.19000		0.05928	1.66947
198.32937	50.07490	3.63053	0.63630		0.17526	2.15138

MEDIDAS REALIZADAS EN EL NUCLEO DORSAL DEL NERVI0 VAGO

Superficie celular (SC)	Superficie nuclear (SN)	Superficie nucleolar (SNu)	Superficie HC asociada al nucleolo (SHCnu)		Indice de Constitución (IC)	Constante de organización nucleolar (CON)
328.32208	125.49633	3.98402	0.15934		0.03999	1.26198
321.78815	120.39642	3.22705	0.08963		0.02777	1.03070
305.97177	98.54439	2.54977	0.09511		0.03730	0.86436
269.11982	87.84743	2.54979	0.10145		0.03978	0.98515
265.29012	86.39384	2.80221	0.34906		0.12456	1.18785
264.91680	88.74373	3.22705	0.15934		0.04937	1.27828
256.25123	69.38161	3.22705	0.15934		0.04937	1.32151
249.73760	93.55459	3.59553	0.15217		0.04232	1.50065
242.06829	86.87127	2.54979	0.55799		0.21883	1.28384
237.46688	105.17791	2.54979	0.24900		0.09765	1.17860
237.18797	115.69577	3.22705	0.19022		0.05894	1.44074
233.80158	101.29345	3.22705	0.08963		0.02777	1.41858
231.57057	94.38114	2.87843	0.15934		0.05535	1.31181
225.41517	108.56415	3.22705	0.08963		0.02777	1.47136
219.43925	91.63215	1.43423	1.20518		0.84029	1.20280
218.36354	91.63215	3.22705	0.15934		0.04937	1.55080
217.36746	117.82712	2.54979	0.41849		0.16412	1.36555
216.69041	113.99236	3.59553	0.02536		0.00705	1.67099
204.55906	88.74373	1.68324	0.62139		0.36911	1.12663
200.91352	86.95094	3.22705	0.08963		0.02777	1.65079

197.58672	81.42311	1.95216	0.25363	0.12992	1.11636
196.01325	91.63215	1.68324	0.63746	0.37871	1.18395
195.21635	85.51687	2.24100	0.31704	0.14147	1.31036
194.57917	84.79964	1.43423	0.35858	0.25001	0.92137
193.14481	71.98106	2.54979	0.10145	0.03978	1.37266
192.00913	77.09062	2.87843	0.57067	0.19825	1.79632
190.06652	93.03581	1.39628	0.74074	0.53053	1.12435
186.13301	72.67278	1.20518	0.45653	0.37880	0.89275
185.01715	65.33771	2.87843	0.48805	0.16955	1.81955
184.57908	72.60863	2.87843	0.20291	0.07049	1.66938
183.71247	87.36934	2.24100	0.30436	0.13581	1.38551
183.40375	70.39751	2.24100	0.35858	0.16000	1.41750
178.42384	63.44537	2.87843	0.10145	0.03524	1.67011
176.19271	56.57283	1.43423	1.33155	0.92840	1.56974
175.93387	45.89570	1.43423	0.38044	0.26525	1.03145
169.48976	98.42498	2.54979	0.09511	0.03730	1.56050
169.36017	66.15444	0.63746	1.66172	2.60678	1.35756
164.45996	46.01527	2.87843	0.15934	0.05535	1.84711
163.64324	53.60481	0.80676	0.82430	1.02422	0.99671
163.34426	86.05464	1.68324	0.30436	0.18081	1.21687
162.09933	72.80781	0.99601	0.91306	0.91671	1.17771
160.35641	70.91531	1.43423	0.48805	0.34028	1.19875
159.95802	56.57296	2.24100	0.24900	0.11111	1.55665
158.44389	51.54307	1.43423	1.47105	1.02567	1.83363
156.44200	64.38156	0.80676	0.66577	0.82523	0.94126
152.68719	69.14244	0.99601	1.11597	1.12044	1.38320
152.33857	72.38934	0.99601	0.60872	0.61115	1.05339
151.71107	67.36960	0.80676	1.27153	1.57609	1.36990

150.71506	50.16859	2.87843	0.42028	0.14601	2.12235
150.01459	65.43736	1.43423	0.60871	0.42441	1.36182
148.73286	54.50126	1.20518	1.14133	0.94702	1.57766
148.32464	57.36976	1.68324	0.38044	0.22601	1.39132
147.80681	66.93129	1.68324	0.24900	0.14792	1.30727
147.24899	57.38965	1.95216	0.41215	0.21112	1.60565
146.87065	56.35371	1.20518	0.98915	0.82074	1.46414
146.83066	62.94727	0.35858	0.87502	2.44023	0.84015
145.41637	77.09062	1.95216	0.44385	0.22736	1.64768
145.21707	51.39375	2.24100	0.30436	0.13581	1.75279
144.42029	59.26214	1.20518	0.83697	0.69447	1.41403
144.32077	72.80781	0.63740	1.41399	2.21837	1.42141
143.41432	52.98736	0.99601	1.04622	1.05041	1.42400
143.06573	58.16654	0.99601	1.59787	1.60427	1.81306
142.02985	71.91144	1.20518	0.80676	0.66941	1.41656
141.18328	42.08107	1.43423	0.80677	0.56251	1.58729
140.88452	59.76011	0.80676	1.39496	1.72908	1.56278
139.73906	50.16859	2.24100	0.15218	0.06790	1.71260
139.36065	70.97311	0.80676	0.85600	1.06103	1.19313
139.28086	64.98912	1.68324	1.20518	0.71599	2.07380
138.94229	55.02911	0.63746	1.52177	2.38723	1.55404
138.32465	75.34751	0.80676	0.50726	0.62876	0.94995
138.30501	63.74413	0.80676	1.36960	1.69765	1.57359
137.76695	43.37585	0.35858	2.08905	5.82589	1.70405
137.39838	56.47334	2.24100	0.99601	0.44444	2.35593
137.14944	68.96760	0.63746	1.20518	1.89061	1.34352
137.14944	41.31424	0.63746	1.61838	2.53879	1.64480
136.25301	64.14252	0.99601	0.69748	0.70027	1.24290

135.80499	63.39551	0.63746	1.95216	3.06240	1.90687
135.77508	73.42532	0.80676	1.64859	2.04347	1.80839
135.74800	79.41258	1.39628	0.14815	0.10610	1.13771
135.61206	74.17663	1.39628	0.54321	0.38904	1.43017
133.38458	70.23810	0.80676	0.99601	1.23458	1.35155
132.32900	79.68018	1.20518	0.99601	0.82644	1.66342
131.97035	59.10276	0.80676	1.25547	1.55618	1.56264
131.77111	44.67066	0.80676	1.68324	2.08641	1.88205
131.47225	75.83562	0.63746	1.20556	1.89119	1.40183
130.19080	64.48030	0.34906	0.86505	2.47822	0.93256
130.91452	52.29011	0.99601	0.48805	0.49000	1.13360
130.57589	69.32173	0.99601	1.52177	1.52786	1.92821
130.51611	65.33771	0.80676	0.62774	0.77810	1.09909
129.62964	59.16258	1.68324	0.79893	0.47463	1.91481
129.59059	67.31158	1.39628	1.63866	1.17358	2.34194
129.08197	62.53895	0.48805	1.44568	2.96215	1.49806
129.08197	51.79210	1.68324	0.65944	0.39176	1.81487
128.96042	72.19843	0.96965	1.90048	1.95996	2.22558
128.80302	62.74809	0.48805	2.68892	5.50951	2.46653
128.70347	73.62450	0.80676	1.14133	1.41470	1.51284
127.73727	71.71211	1.68324	0.35858	0.21302	1.59845
127.58782	60.50712	0.63746	1.54713	2.42702	1.71222
126.75137	58.89369	1.43423	0.63746	0.44446	1.63445
125.99428	76.19417	2.24100	0.31704	0.14147	2.03028
125.60557	73.35237	0.62056	0.89587	1.44364	1.20729
124.50026	55.07888	0.63746	1.24501	1.95307	1.51202
123.04601	44.07304	1.20518	0.80676	0.66941	1.63511
121.63185	67.62805	1.43423	0.60871	0.42441	1.67960

121.31314	65.33771	0.48805	2.72924		5.59213	2.65205
120.95122	46.81358	1.39628	0.33951		0.24315	1.43511
120.41671	58.66448	1.20518	0.52174		0.43291	1.43411
120.03818	54.18245	1.43423	0.38224		0.26651	1.51324
119.66954	54.97926	1.20518	0.99601		0.82644	1.83939
119.22152	58.26616	0.80676	1.25547		1.55618	1.72974
119.12178	59.01307	0.63746	1.95634		3.06896	2.17743
118.42459	56.47334	1.20518	0.63746		0.52893	1.55596
118.27524	51.47345	0.68324	1.68324		2.64054	1.96211
116.79118	55.50197	1.43423	0.47092		0.32834	1.62781
116.35531	82.90321	0.78540	0.39506		0.50300	1.01453
116.08413	55.27805	0.99601	1.24964		1.25464	1.93434
115.69577	50.19853	0.80676	1.44422		1.79014	1.94560
115.53630	46.04511	0.80676	1.59357		1.97527	2.07755
114.29125	49.40166	1.95216	0.45653		0.23385	2.10750
114.02833	69.17326	0.47514	0.65432		1.37710	0.99050
113.54418	75.29768	0.63746	1.66762		2.61616	2.03011
113.54418	68.52499	0.63746	1.36960		2.14852	1.76764
113.54418	63.74413	0.63746	0.69748		1.09415	1.17570
113.06622	64.60065	0.80676	0.78171		0.96894	1.40490
111.55218	64.54100	0.80676	1.77879		2.20485	2.31779
111.50732	70.68600	1.63866	0.61111		0.37293	2.01759
111.50713	49.54803	0.78540	0.86420		1.10033	1.48833
110.80514	48.78412	0.80676	1.20518		1.49385	1.81574
109.71975	53.10686	1.68324	0.80676		0.47928	2.26941
109.22831	70.68600	2.18165	0.34906		0.15999	2.31689
108.34527	52.98736	1.43423	0.25363		0.17684	1.55785
106.42641	65.11048	0.62056	0.66667		1.07430	1.20950

106.07421	49.40166	1.20518	1.25547	1.04172	2.31974
105.35723	56.57296	0.63746	0.88770	1.39255	1.35269
105.35723	58.26612	0.48805	1.51259	3.09925	1.89891
103.98269	50.89574	0.63746	1.52178	2.38725	2.07653
102.60817	66.93129	0.35858	1.48227	4.13372	1.79405
102.18974	59.01307	0.63746	1.45418	2.28120	2.04681
102.34986	52.18974	0.48805	1.84264	3.77551	2.27717
101.23363	45.25833	0.48805	1.20518	2.46937	1.67259
100.29746	58.16654	0.63746	1.20518	1.89061	1.83717
100.02858	55.07888	0.63746	1.14133	1.79043	1.77828
99.50066	43.02726	0.63746	0.77992	1.22348	1.42449
98.37512	55.07888	0.63746	1.29350	2.02914	1.96285
98.18600	50.01924	0.48805	1.23645	2.53344	1.75636
96.57250	46.01536	0.48805	1.14133	2.33855	1.58365
95.93498	50.16859	0.63746	1.42033	2.22810	2.14498
95.01867	54.97926	0.80676	0.80676	1.00000	1.69810
94.94597	56.73219	0.62056	0.25926	0.41778	0.92665
93.96284	42.52935	0.48805	1.98374	4.06462	2.63060
90.48672	47.80811	0.48805	1.42666	2.92318	2.11601
89.24177	63.44537	0.80676	0.80676	1.00000	1.80803
89.24177	49.95958	0.63746	0.99601	1.56246	1.83038
88.74373	46.61286	0.35858	0.81162	2.30823	1.31862
87.96684	46.31413	0.63746	0.63746	1.00000	1.45045
86.39384	57.45034	0.34906	0.88976	2.54901	1.43392
86.39384	52.93174	0.47514	0.98765	2.07865	1.69316
85.90510	38.34609	0.48805	1.11045	2.27527	1.86077
84.21191	39.95958	0.48805	1.95295	4.00153	2.89745
84.16218	48.18649	1.20518	0.44385	0.36828	1.95934

83.38532	60.55698	0.48805	1.57251		3.22202	2.47113
82.90321	50.95548	0.78540	0.85186		1.08461	1.97490
80.85536	37.64890	0.48805	0.84965		1.74090	1.65443
80.31761	43.62492	0.35858	1.08428		3.02381	1.79644
79.71995	39.52130	0.63746	1.21145		1.90043	2.31925
78.33561	40.11902	0.48805	1.52178		3.11808	2.56566
76.79446	57.33414	0.78540	0.93355		1.18862	2.23837
74.46745	62.63801	1.17326	0.30865		0.26307	1.99001
73.42532	49.00327	0.35858	1.46368		4.08187	2.48178
71.95119	45.31808	0.80676	0.81878		1.01489	2.25922
63.60757	50.90548	0.78540	0.94444		1.20244	2.71955

RESULTADOS CUANTITATIVOS ENCONTRADOS
EN CADA POBLACION CELULAR ANALIZADA

La observación de los valores de la superficie de HCnu nos indica que el tamaño de esta HC asociada al nucléo lo no es constante para todas las células analizadas; ni siqquiera es semejante para todas las células de un mismo núcleo, sino que cada neurona presenta una cantidad de HCnu - específica, diferente de las de células vecinas. Por tanto, el tamaño de la HCnu, en lugar de ser homogéneo de unas neutonas a otras, aparece como un parámetro celular variable, del mismo modo que pueda serlo el tamaño de su nucléo, núcleo, o el propio tamaño celular.

A partir de los datos obtenidos hemos hallado la correlación existente entre los valores de la SHCnu y los correspondientes de SC, SN y SNu, en cada una de las poblaciones celulares, con objeto de comprobar si existe alguna relación entre el tamaño de la HCnu y los restantes parámetros celulares indicados.

El cálculo de estos coeficientes de correlación lo hemos realizado de manera independiente en cada uno de los núcleos, para comprobar si las relaciones existentes entre la SHCnu y los restantes parámetros, en un núcleo, eran también cumplidas en la población representante del otro núcleo. Para el tamaño de las poblaciones elegidas y según las tablas, un coeficiente de correlación superior a 0,21 se considera representativo con una probabilidad del 99%, pudiendo entonces establecerse que existe una relación entre ambas series de valores.

Por otra parte, hemos calculado los valores medios de cada uno de los parámetros medidos, para realizar las comparaciones pertinentes entre ambas poblaciones celulares.

Pasamos, en primer lugar, a estudiar los valores de los distintos coeficientes de correlación, entre la SHCnu y los restantes parámetros superficiales de las neuronas, en -ambos núcleos.

Cálculo del coeficiente de correlación

La fórmula que expresa el coeficiente de correlación entre una serie de parejas de valores viene dado por - la expresión

$$r = \frac{\rho}{\sqrt{x} \sqrt{y}}$$

siendo

r = coeficiente de correlación

ρ = covarianza

\sqrt{x} = desviación típica de uno de los valores de las parejas

\sqrt{y} = desviación típica del otro valor de las parejas.

Cada uno de estos parámetros viene expresado por las fórmulas

$$\rho = \frac{1}{n} \sum x_i y_i - \bar{x} \bar{y}$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \sum x_i^2 - \bar{x}^2$$

$$\sigma_y^2 = \frac{1}{n} \sum y_i^2 - \bar{y}^2$$

donde

n = número de parejas de la serie

$\sum x_i y_i$ = suma total de los resultados del producto de los valores de cada pareja

\bar{x} = valor medio de uno de los componentes de las parejas.

\bar{y} = valor medio del otro componente de ellas

$\sum x_i^2$ = suma total de los distintos cuadrados de uno de los valores de las parejas

$\sum y_i^2$ = suma total de los diferentes cuadrados del otro de los valores de ellas.

El coeficiente de correlación permite el cálculo de la recta de regresión, que sería la recta bisectriz de las dos rectas expresadas por las fórmulas

$$X - \bar{x} = b^{x/y} (Y - \bar{y})$$

$$Y - \bar{y} = b^{y/x} (X - \bar{x})$$

siendo

$$b^{x/y} = r \frac{\sigma_x}{\sigma_y}$$

$$b^{y/x} = r \frac{\sigma_y}{\sigma_x}$$

Superficie nuclear.- Superficie heterocromatina asociada al nucléolo (SN/SHCnu)

para el cálculo del coeficiente de correlación en tre estos dos parámetros haremos $x = SN$ e $y = SHCnu$

$$\begin{aligned} \sum (SN)^2 &= 1229848.53190 \mu^4 \\ \sum (SHCnu)^2 &= 20.92250 \mu^4 \\ \sum (SHCnu) \cdot (SN) &= 3566.69456 \mu^4 \\ (\bar{SN}) &= 102.69438 \mu^2 \\ (SHCnu) &= 0.33780 \mu^2 \\ n &= 106 \end{aligned}$$

de donde podemos calcular la covarianza y las desviaciones típicas de los dos parámetros

$$\begin{aligned} \rho &= -1.04198 \mu^4 \\ \sigma (SN) &= 32.49936 \mu^2 \\ \sigma (SHCnu) &= 0.28856 \mu^2 \end{aligned}$$

y por tanto el coeficiente de correlación valdrá

$$r = -0.11110$$

Superficie nucleolar.- Superficie heterocromatina asociada al nucléolo (SNu/SHCnu)

para el cálculo del coeficiente de correlación entre estos parámetros haremos $x = \text{SNu}$ e $y = \text{SHCnu}$

$$\begin{aligned} \sum (\text{SNu})^2 &= 2165.52374 \mu^4 \\ \sum (\text{SHCnu})^2 &= 20.92250 \mu^4 \\ \sum (\text{SNu}) \cdot (\text{SHCnu}) &= 129.38336 \mu^4 \\ (\overline{\text{SNu}}) &= 4.33461 \mu^2 \\ (\overline{\text{SHCnu}}) &= 0.33780 \mu^2 \\ n &= 106 \end{aligned}$$

la covarianza y las desviaciones típicas tendrán entonces los valores siguientes

$$\begin{aligned} \rho &= -0.24364 \mu^4 \\ \sqrt{(\text{SNu})} &= 1.28086 \mu^2 \\ \sqrt{(\text{SHCnu})} &= 0.28856 \mu^2 \end{aligned}$$

y el coeficiente de correlación valdrá

$$r = -0.65919$$

Coefficientes de correlación en el núcleo dorsal del nervio

Vago

Superficie celular.- Superficie heterocromatina asociada al nucléolo (SC/SHCnu)

para realizar el cálculo de este coeficiente haremos $x = SC$ e $y = SHCnu$

$$\begin{aligned} \sum (SC)^2 &= 3846398.15873 \mu^4 \\ \sum (SHCnu)^2 &= 184.28663 \mu^4 \\ \sum (SC) \cdot (SHCnu) &= 18782.57501 \mu^4 \\ (\bar{SC}) &= 141.58505 \mu^2 \\ (SHCnu) &= 0.87713 \mu^2 \\ n &= 171 \end{aligned}$$

los valores de la covarianza y las desviaciones típicas de estos parámetros serán

$$\begin{aligned} \rho &= -14.34888 \mu^4 \\ \sqrt{(SC)} &= 49.46948 \mu^2 \\ \sqrt{(SHCnu)} &= 0.55527 \mu^2 \end{aligned}$$

y el coeficiente de correlación tendrá un valor de

$$r = -0.52236$$

Superficie nuclear.- Superficie heterocromatina asociada al nucléolo (SN/SHCnu)

el cálculo de este coeficiente se ha realizado haciendo $x = SN$ e $y = SHCnu$

$$\begin{aligned} \sum (SN)^2 &= 773606.68802 \mu^4 \\ \sum (SHCnu)^2 &= 184.28663 \mu^4 \\ \sum (SN) \cdot (SHCnu) &= 8968.22720 \mu^4 \\ (\bar{SN}) &= 64.95813 \mu^2 \\ (SHCnu) &= 0.87713 \mu^2 \\ n &= 171 \end{aligned}$$

la covarianza y las desviaciones típicas presentan unos valores de

$$\begin{aligned} \rho &= -4.53095 \mu^4 \\ \sigma (SN) &= 17.44869 \mu^2 \\ \sigma (SHCnu) &= 0.55527 \mu^2 \end{aligned}$$

y el coeficiente de correlación presentará el valor siguiente

$$r = -0.46765$$

Superficie nucleolar.- Superficie heterocromatina asociada al nucleolo (SNu/SHCnu)

para calcular el coeficiente de correlación de - estos dos parámetros haremos $x = \text{SNu}$ e $y = \text{SHCnu}$

$$\begin{aligned} \sum (\text{SNu})^2 &= 426.51785 \mu^4 \\ \sum (\text{SHCnu})^2 &= 184.28663 \mu^4 \\ \sum (\text{SNu}) \cdot (\text{SHCnu}) &= 139.87103 \mu^4 \\ (\overline{\text{SNu}}) &= 1.32152 \mu^2 \\ (\overline{\text{SHCnu}}) &= 0.87713 \mu^2 \\ n &= 171 \end{aligned}$$

y los valores de la covarianza y las distribuciones típicas serán

$$\begin{aligned} \rho &= -0.34119 \mu^4 \\ \sqrt{\text{SNu}} &= 0.86477 \mu^2 \\ \sqrt{\text{SHCnu}} &= 0.55527 \mu^2 \end{aligned}$$

el valor del coeficiente de correlación es

$$r = -0.71054$$

Valor de los Coeficientes de correlación

	SC/SHCnu	SN/SHCnu	SNu/SHCnu
Hipogloso	-0.30585 +	-0.11110	-0.65919 +
Vago	-0.52236 +	-0.46765 +	-0.71054 +

Se han señalado con + los valores que son significativos con una probabilidad de 0'99

Valores medios de los distintos parámetros celulares

	SC	SN	SNu	SHCnu
Hipogloso	353.44814 μ^2	102.69438 μ^2	4.33461 μ^2	0.33780 μ^2
Vago	141.58505 μ^2	64.95813 μ^2	1.32152 μ^2	0.87713 μ^2

El análisis de los coeficientes de correlación entre la SHCnu y la SNu indica la existencia de una alta correlación entre ambos parámetros celulares; correlación que -- sería de tipo inverso debido al signo negativo de este coeficiente. Efectivamente, los valores del coeficiente de correlación SHCnu/SNu son los más altos encontrados, tanto en el núcleo del hipogloso, como en el núcleo dorsal del Vago, lo que indica una relación inversa bastante estrecha entre los tamaños de estas dos estructuras.

Esto es tanto como decir que, no solo el tamaño de la HCnu no es el mismo en todas las neuronas de un determinado núcleo, sino que además el tamaño de esta HCnu está en relación inversa con el del respectivo nucléolo, de modo que cuanto mayor es el nucléolo de una neurona, menor cantidad de HCnu presenta esta célula. Esta relación se cumple en las dos poblaciones celulares analizadas.

En la gráfica 1 se ha representado la recta de regresión que relaciona los valores de la SHCnu y los de la SNu respectiva, para el caso de las células estudiadas del núcleo del nervio Hipogloso. Se observa como esta recta representa una correlación inversa donde a medida que disminuyen los valores del tamaño de la HCnu, aumentan los valores del tamaño respectivo del nucléolo asociado. En punteado se han representado las rectas de regresión de Y sobre X y de X sobre Y -cuya bisectriz constituye la recta de regresión conjunta- respectivamente, observándose, por el pequeño ángulo

existente entre ambas, que la relación que une SHCnu y SNu es bastante estrecha, como corresponde también a un valor absoluto tan alto del coeficiente de correlación entre estos dos parámetros.

La gráfica 3 representa la recta de regresión entre la SHCnu y la SNu correspondiente, pero en este caso - para las células del núcleo dorsal del nervio Vago. Se observa también la alta correlación inversa entre ambos parámetros, indicada por el pequeño ángulo de las dos rectas de puntos, así como por el alto valor absoluto del coeficiente de correlación correspondiente.

El coeficiente de correlación entre SHCnu y SN sólo aparece representativo para el caso de las células - pertenecientes al núcleo dorsal del nervio Vago; en el caso del núcleo del nervio Hipogloso el valor de este coeficiente se encuentra por debajo del mínimo significativo. Por otra parte, el valor de este coeficiente de correlación SHCnu/SN es de los tres hallados, el más pequeño dentro de cada núcleo, Ello nos indica que la posible relación existente entre el tamaño nuclear de una neurona y la cantidad de HC asociada a su nucléolo es una relación muy poco estrecha, que se encuentra en los límites de lo significativo y lo aleatorio, pudiendo cumplirse algo más estrechamente en unos conjuntos neuronales que en otros -y de ahí oscilar entre valores significativos o no- dependiendo de las propias características celulares de esa población. Esta correlación,

cuando existe, es también inversa, como indica el signo negativo del respectivo coeficiente.

Por tanto, lo expuesto anteriormente para el nucléolo y su HC asociada de que a mayor nucléolo menor cantidad de HCnu, y viceversa, no se puede afirmar de una manera precisa para el caso del núcleo. Esta correlación inversa entre núcleo y HC es un hecho que puede cumplirse en unas poblaciones celulares y no en otras, y por eso, el tamaño del núcleo neuronal no siempre será un patrón indicativo del contenido en HCnu de esa neurona.

La gráfica 4 muestra la recta de regresión calculada, para el caso de la población celular del núcleo dorsal del nervio Vago, entre los tamaños de la HCnu y del núcleo celular. Se aprecia el carácter inverso de la correlación y la amplitud del ángulo de las dos rectas de X sobre Y e Y sobre X, lo que nos revela que se trata de una correlación muy poco estrecha, hecho indicado también por el escaso valor absoluto del coeficiente de correlación respectivo. Se ha omitido la representación de la recta de regresión entre SHCnu y SN para el caso de la población neuronal del núcleo del nervio Hipogloso, al no resultar significativo el valor del coeficiente de correlación en este conjunto celular.

El coeficiente de correlación entre los tamaños de la HCnu y la SC es significativo, sin embargo, en ambos núcleos estudiados. En ambos casos existe una correlación inversa

cuando existe, es también inversa, como indica el signo negativo del respectivo coeficiente.

Por tanto, lo expuesto anteriormente para el núcleo y su HC asociada de que a mayor núcleo menor cantidad de HCnu, y viceversa, no se puede afirmar de una manera precisa para el caso del núcleo. Esta correlación inversa entre núcleo y HC es un hecho que puede cumplirse en unas poblaciones celulares y no en otras, y por eso, el tamaño del núcleo neuronal no siempre será un patrón indicativo del contenido en HCnu de esa neurona.

La gráfica 4 muestra la recta de regresión calculada, para el caso de la población celular del núcleo dorsal del nervio Vago, entre los tamaños de la HCnu y del núcleo celular. Se aprecia el carácter inverso de la correlación y la amplitud del ángulo de las dos rectas de X sobre Y e Y sobre X, lo que nos revela que se trata de una correlación muy poco estrecha, hecho indicado también por el escaso valor absoluto del coeficiente de correlación respectivo. Se ha omitido la representación de la recta de regresión entre SHCnu y SN para el caso de la población neuronal del núcleo del nervio Hipogloso, al no resultar significativo el valor del coeficiente de correlación en este conjunto celular.

El coeficiente de correlación entre los tamaños de la HCnu y la SC es significativo, sin embargo, en ambos núcleos estudiados. En ambos casos existe una correlación inversa

-el coeficiente de correlación es también negativo- bastante estrecha entre los valores de estos dos parámetros; el valor de este coeficiente de correlación, en ambos núcleos, es intermedio entre los de los coeficientes que relacionan el tamaño de la HCnu con la SN y SNu respectivamente.

Ello nos indica que también respecto al tamaño celular se cumple lo indicado anteriormente con relación a la superficie del nucléolo y, por tanto, a medida que una neurona presenta un tamaño más voluminoso, la cantidad de HCnu en su núcleo será menor. Sin embargo esta correlación es menos estrecha que la que existía entre los tamaños del nucléolo y de su HC asociada respectiva, y por lo tanto, el tamaño celular será un índice menos representativo que el tamaño nucleolar, de la cantidad de HCnu que esa célula presente.

En la gráfica 2 se ha representado la recta de regresión entre SHCnu y SC para el caso de las células del núcleo del nervio Hipogloso. Se observa una menor coincidencia de las dos rectas de regresión punteadas que para el caso de la recta de regresión que relacionaba SHCnu con SNu, indicativa de que la relación entre tamaño celular y heterocromático es menos estrecha; así mismo, el valor absoluto del coeficiente de correlación aparece más pequeño en este caso que en el otro. La recta de regresión representa una relación de tipo inverso donde a valores crecientes de tamaño neuronal se corresponden tamaños más pequeños de la HCnu existente en dicha célula.

La gráfica 5 muestra la recta de regresión, para el caso del núcleo dorsal del nervio Vago, entre estos dos mismos parámetros celulares. Las características de ella son similares a las de la gráfica 2, aunque representa una correlación más estrecha en este caso, puesto que el coeficiente de correlación en este núcleo, para los parámetros mencionados, tiene un valor absoluto algo mayor que el correspondiente coeficiente en el núcleo antes analizado.

En definitiva, los resultados de los distintos coeficientes de correlación nos indican la existencia de - una estrecha relación inversa entre las variaciones de tamaño de la HCnu y las variaciones de tamaño del nucléolo asociada, en ambos núcleos. Ello quiere decir, que un aumento de tamaño del nucléolo va en detrimento de la cantidad de HC asociada a este nucléolo, relación que se cumple de manera general en todas las neuronas analizadas.

Asímismo, esta relación inversa de tamaño, se cumple respecto a la superficie neuronal, aunque de manera menos estrecha, también en ambos núcleos analizados. Normalmente, células de gran tamaño van a presentar poca cantidad de HCnu, y viceversa, pero esta relación ya no se cumple de manera tan estricta como en el caso anterior.

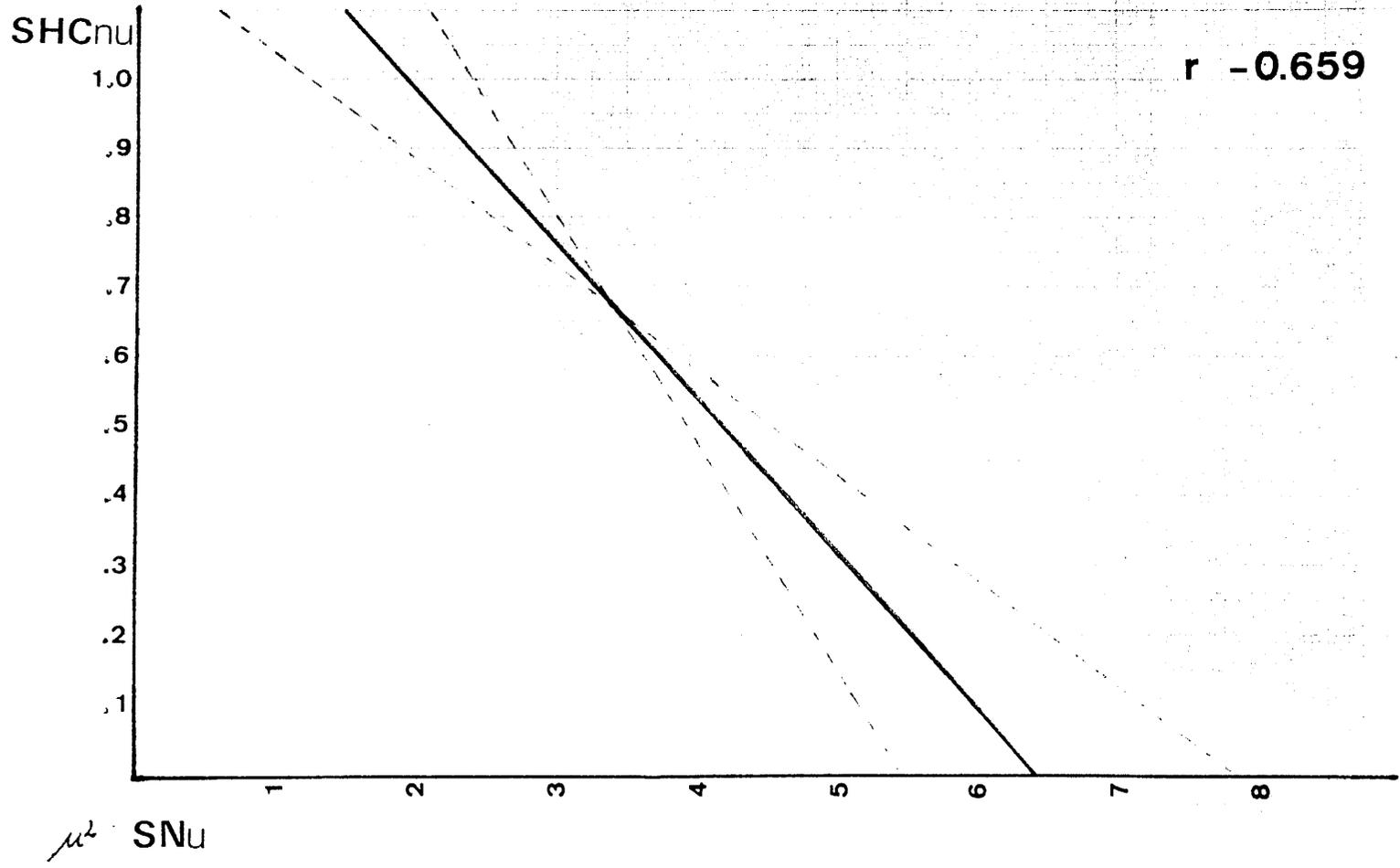
Gráfica 1

Recta de regresión SHCnu/SNu encontrada para las células del núcleo del Hipogloso. Las líneas punteadas representan las rectas de X sobre Y e Y sobre X, cuya bisectriz es la recta de regresión.

En ordenadas se representan valores de la superficie de la HC asociada al nucléolo; en abscisas, los valores de superficie nucleolar. Ambos valores vienen expresados en micras cuadradas.

Se indica, también, el valor del coeficiente de correlación encontrado entre ambos parámetros.

H



Gráfica 2

Recta de regresión encontrada entre SHCnu y SC, para las células del núcleo del Hipogloso. Las líneas punteadas representan, igual que en la gráfica 1, las rectas de regresión de X sobre Y e Y sobre X.

En ordenadas, valores de la superficie de la -- HCnu en micras cuadradas; en abcisas, valores de Superficie celular en las mismas unidades.

Se indica, así mismo, el valor del coeficiente de correlación SHCnu/SC para las células de esta población.

H

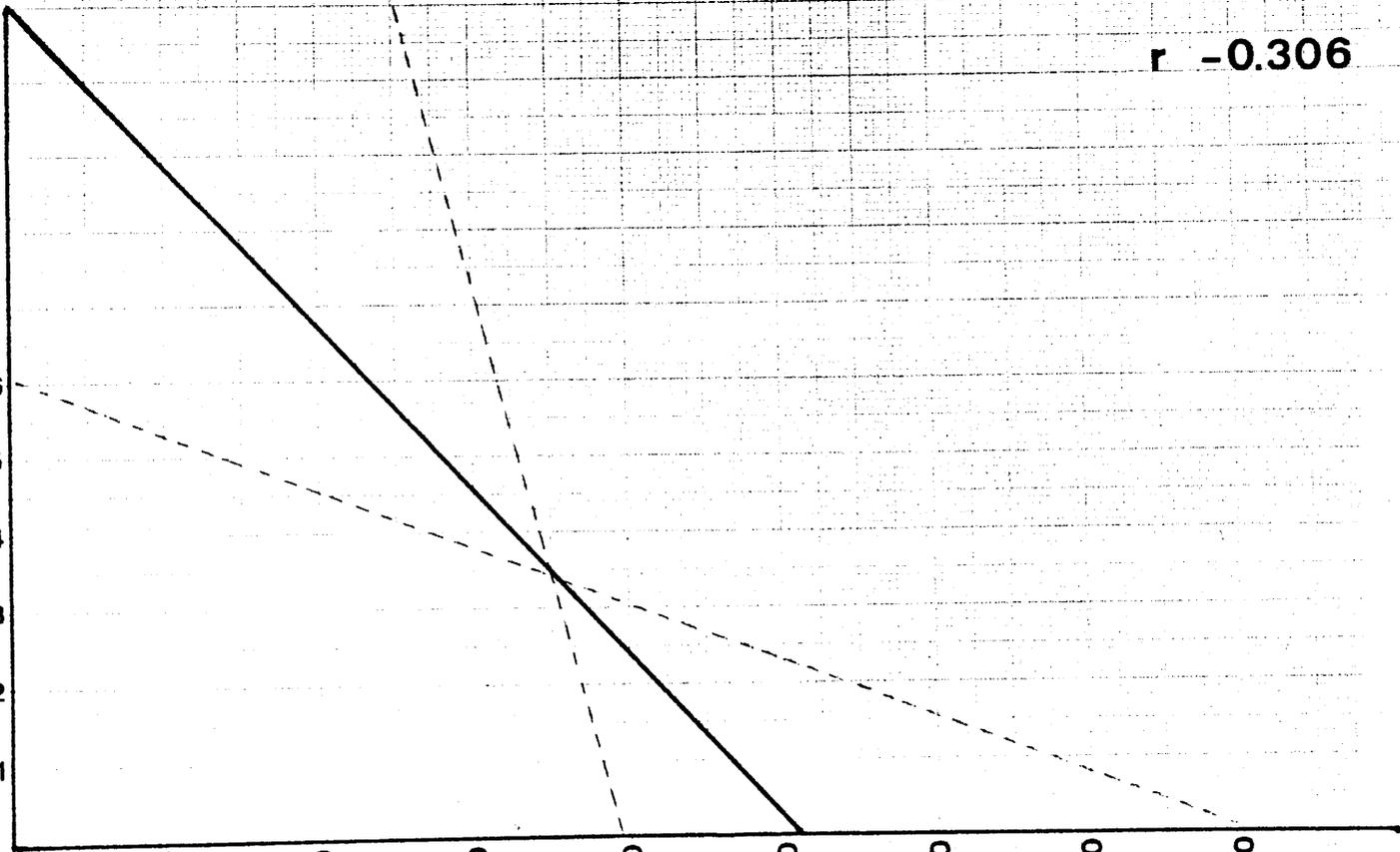
SHCnu

$r = -0.306$

m^2 SC

1.0
.9
.8
.7
.6
.5
.4
.3
.2
.1

100 200 300 400 500 600 700 800



Gráfica 3

Se representa la recta de regresión entre los parámetros SHCnu y SNu, en este caso para las células del núcleo dorsal del Vago. Las líneas punteadas, igual que en gráficas anteriores.

Los valores, en ordenadas, corresponden a SHCnu expresados en micras cuadradas; en abcisas, valores de superficie nucleolar, también en micras cuadradas.

El valor del coeficiente de correlación entre ambos parámetros, para las células de este núcleo, viene indicado en la gráfica.

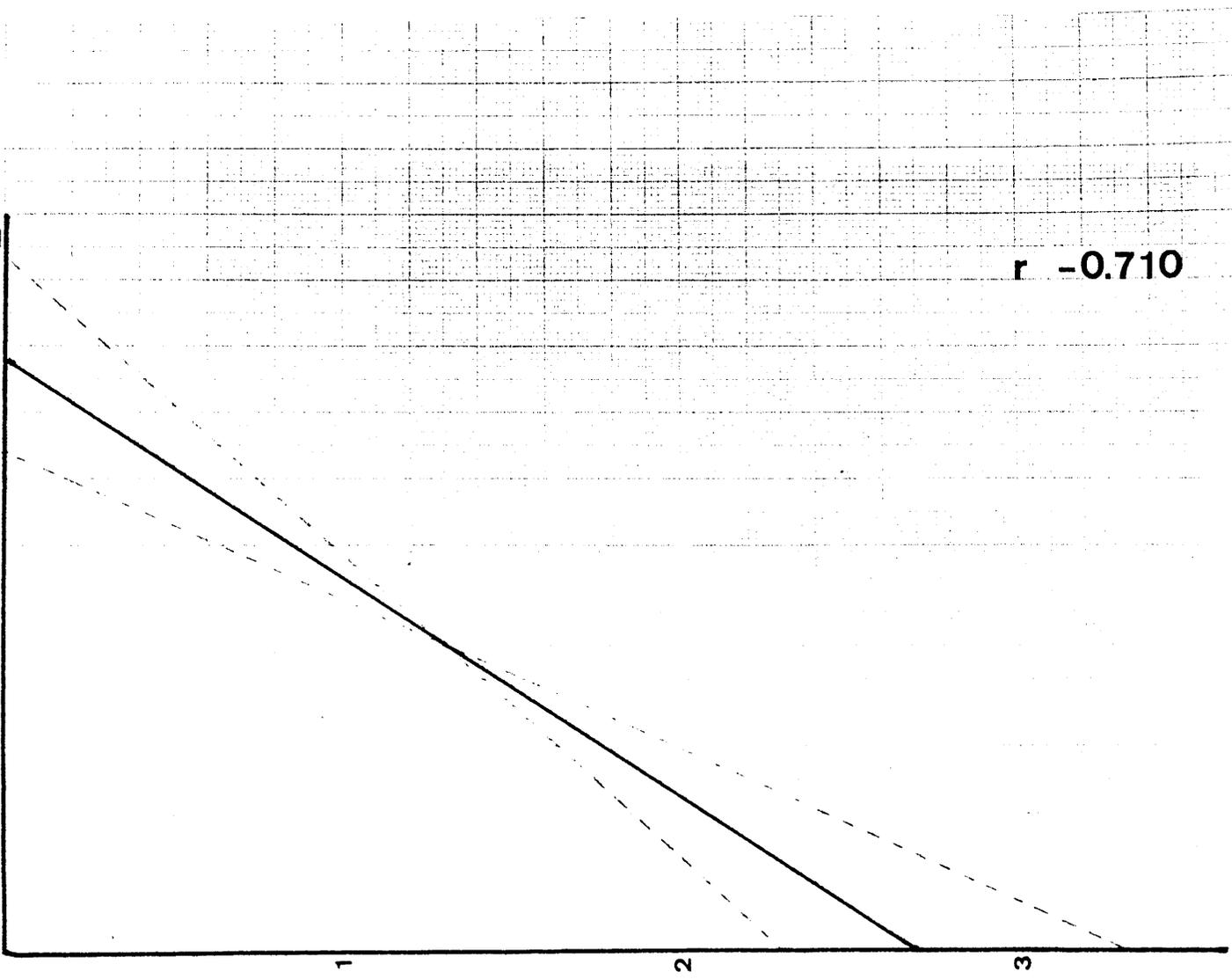
V

SHCnu

r -0.710

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
.8
.6
.4
.2

μ^2 SNU



Gráfica 4

Recta de regresión SHCnu/SN encontrada para las -
células del nucleo dorsal del nervio Vago. Las rectas de X -
sobre Y e Y sobre X vienen representadas en punteado.

Los valores de la superficie de HCnu, expresados en micras cuadradas, se representan en ordenadas; los de SN, en las mismas unidades, en abcisas.

También se indica el valor del coeficiente de correlación entre estos dos parámetros.

V

SHCnu

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
.8
.6
.4
.2

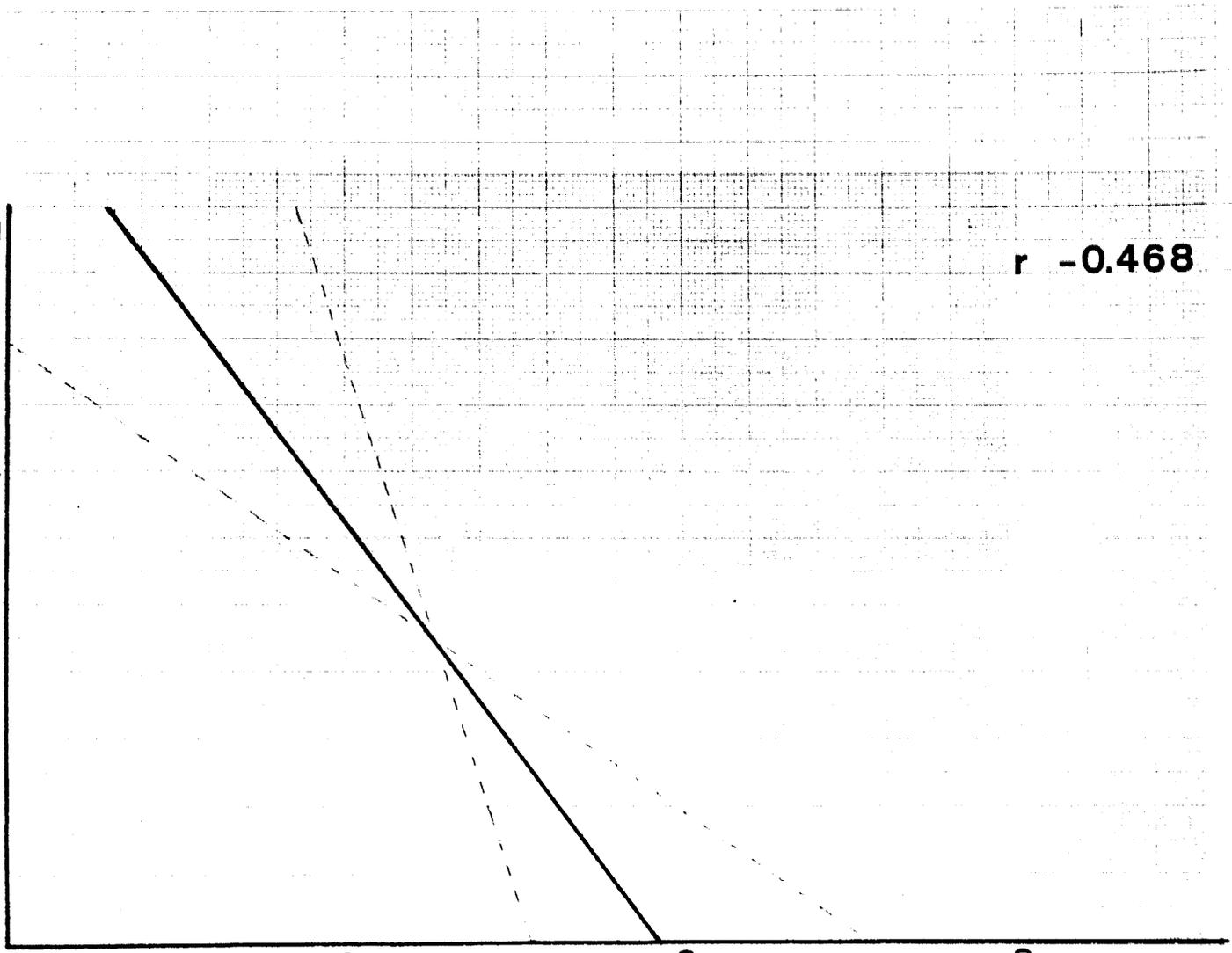
r -0.468

μ^2 SN

50

100

150



Gráfica 5

Representa la recta de regresión, para las células del núcleo dorsal del Vago, entre la superficie de la HC asociada al nucléolo y la superficie celular. Las líneas punteadas, igual que en gráficas anteriores.

Los valores de estos dos parámetros se expresan en micras cuadradas, en ordenadas los de SHCnu y en abscisas los de SC.

También viene indicado el valor del coeficiente de correlación SHCnu/SC para las células de esta población.

V

SHCnu

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
.8
.6
.4
.2

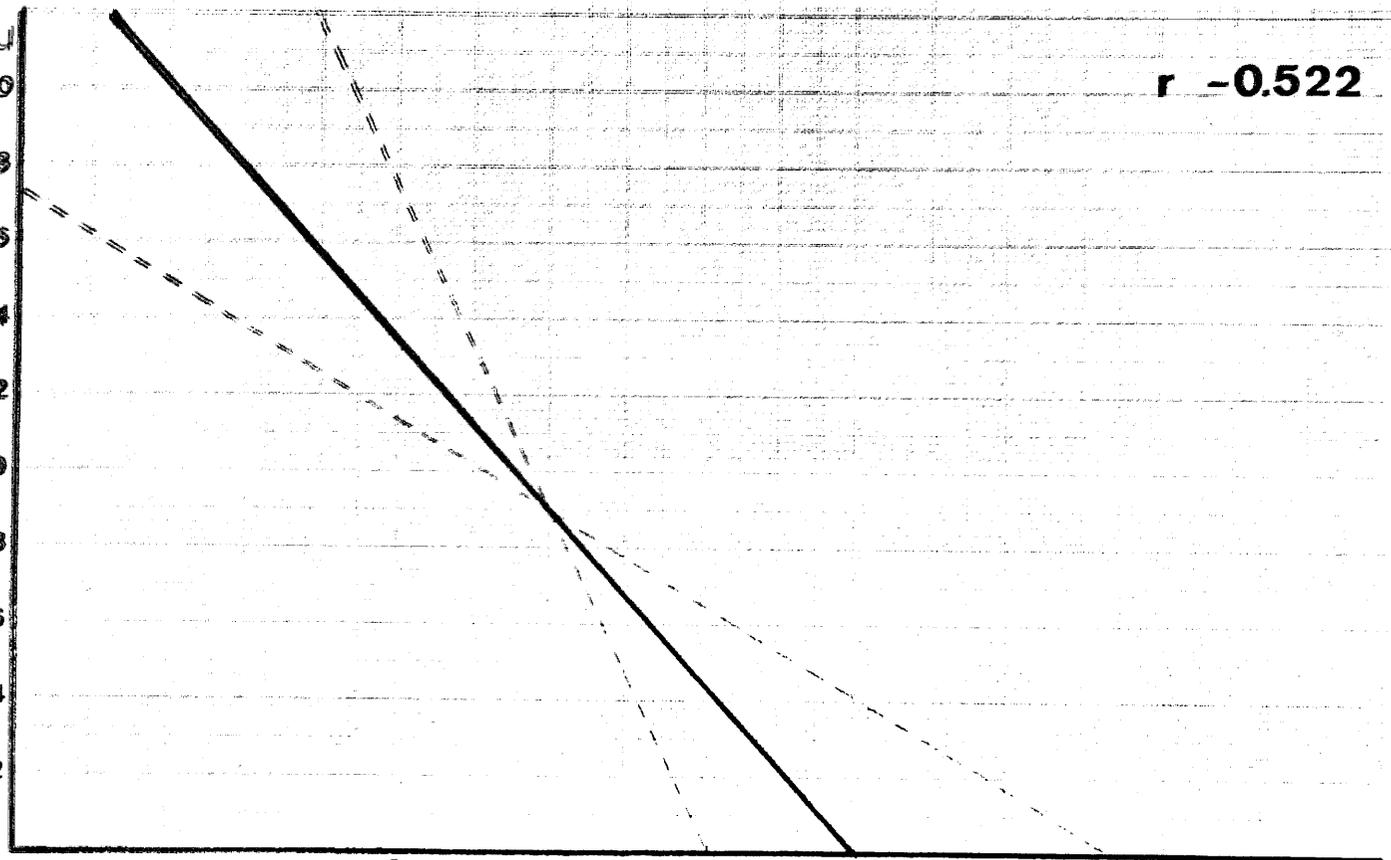
r -0.522

μ^2 SC

100

200

300



Indice de constitución y constante de organización nucleolar en el núcleo del nervio Hipogloso

En esta población celular, el IC presenta un valor medio y una desviación típica de

$$\begin{aligned}(\bar{IC}) &= 0.09609 \\ \surd(IC) &= 0.09165\end{aligned}$$

la CON muestra, aquí, las siguientes valores de la media y la desviación típica

$$\begin{aligned}(\bar{CON}) &= 1.37993 \\ \surd(CON) &= 0.31305\end{aligned}$$

Los valores del IC oscilan, en este nucleo, entre 0 y 0.36659; los de la CON lo hacen entre 0.76721 y 2.57655

Indice de constitución y Constante de organización nucleolar en el nucleo dorsal del nervio Vago

En la población celular de este nucleo el IC presenta un valor medio y una desviación típica siguientes

$$\begin{aligned}(\bar{IC}) &= 1.21005 \\ \surd(IC) &= 1.18411\end{aligned}$$

El valor de la media y de la desviación típica para el caso de la CON es

$$\begin{aligned}(\bar{CON}) &= 1.62775 \\ \surd(CON) &= 0.42002\end{aligned}$$

los valores del IC oscilan, en esta población, entre

0.00705 y 5.82589; los de la CON varían entre 0.84015 y --
2.89745

Valores medios e intervalos de variación de los diferentes
índices celulares

	IC	intervalo de variación	CON	intervalo de variación
Hipogloso	0.09609	0.00000 a 0.36659	1.37003	0.76721 a 2.57655
Vago	1.21005	0.00705 a 5.82589	1.62775	0.84015 a 2.89745

Respecto a los dos nuevos parámetros introducidos, el IC y la CON, las neuronas se comportan, en ambos núcleos, de manera diferente respecto a uno y otro en cuanto a su distribución.

Así, con respecto al IC, en el histograma de frecuencias de la gráfica 6, se observa como existe un intervalo inicial que es el que presenta mayor número de células, disminuyendo paulatinamente este número en los intervalos crecientes sucesivos. Sin embargo, el histograma de frecuencias para la CON en esa misma gráfica, adopta una distribución de tipo normal, situándose mayor número de células en los intervalos centrales.

Esta gráfica representa los histogramas de frecuencias para ambos parámetros en el caso de las células del núcleo del nervio Hipogloso. Se han representado también los valores medios de cada uno de ellos mediante las flechas correspondientes en cada uno de los histogramas. Se aprecia la distribución del IC siguiendo una curva exponencial decreciente, mientras la distribución de la CON se acerca a una curva normal.

La disposición de los histogramas de frecuencias de ambos parámetros para el caso de las neuronas pertenecientes al núcleo dorsal del nervio Vago, representados en la gráfica 7, también adoptan una forma semejante. Se aprecia como en el caso del IC existe, también, un intervalo inicial donde se --

agrupa el mayor número de células, número que va decreciendo en intervalos entre valores superiores. Se trata, por tanto, de una distribución exponencial, bastante parecida a la que adoptaba el IC en el núcleo del Hipogloso. Del mismo modo, el histograma para la CON presenta una mayor cantidad de elementos localizados en los intervalos centrales, adoptando, en este caso, una distribución normal, de igual modo que lo hacía en el núcleo anterior.

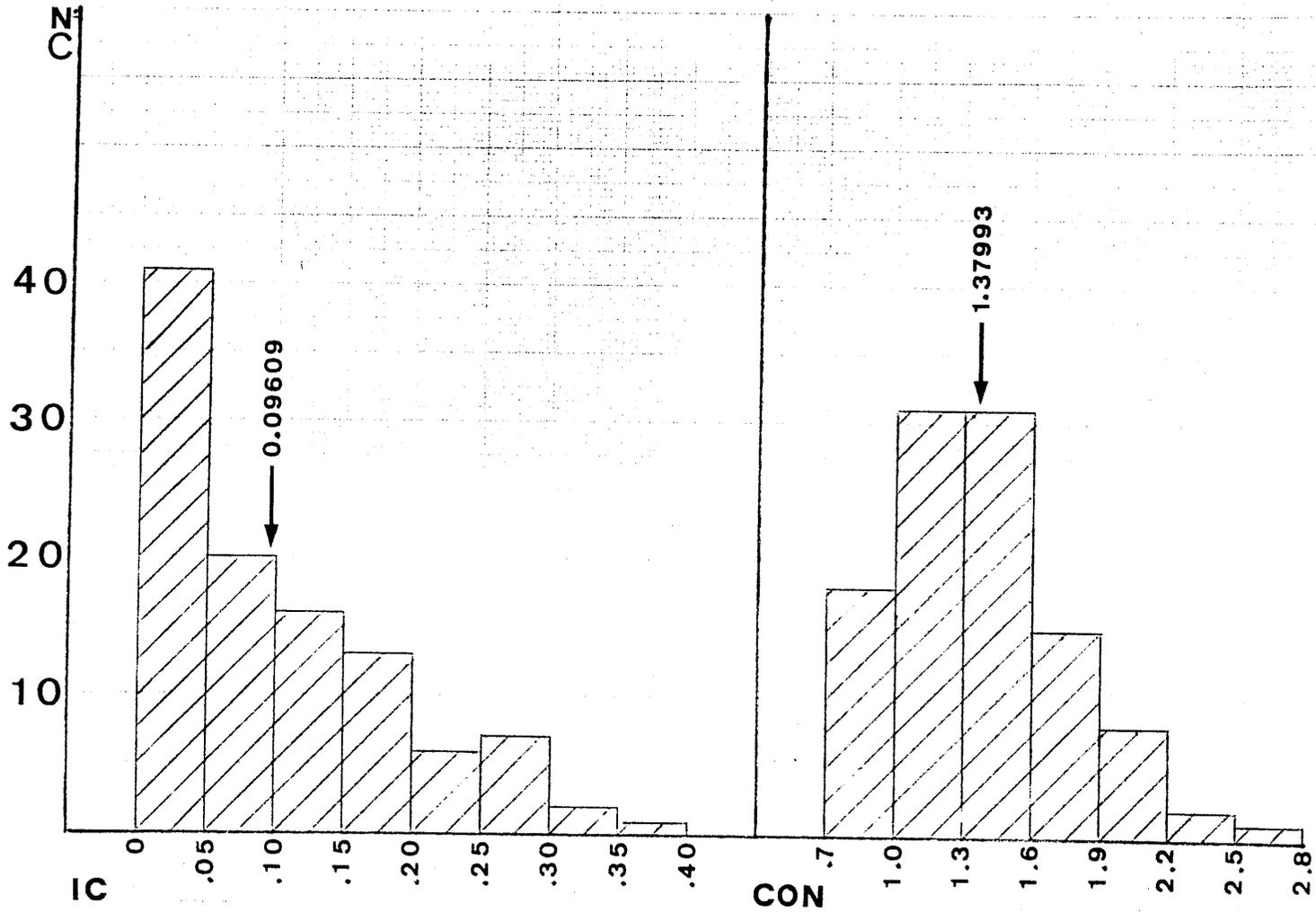
Gráfica 6

Histograma de frecuencias de los diferentes valores del IC y la CON, para las células del núcleo del Hipogloso.

En ordenadas se indican número de células que poseen un valor del parámetro correspondiente en el intervalo que corresponde. En abscisas vienen expresados los diferentes intervalos de distribución de estos valores.

Se han expresado con flechas los valores medios correspondientes a ambos parámetros.

H



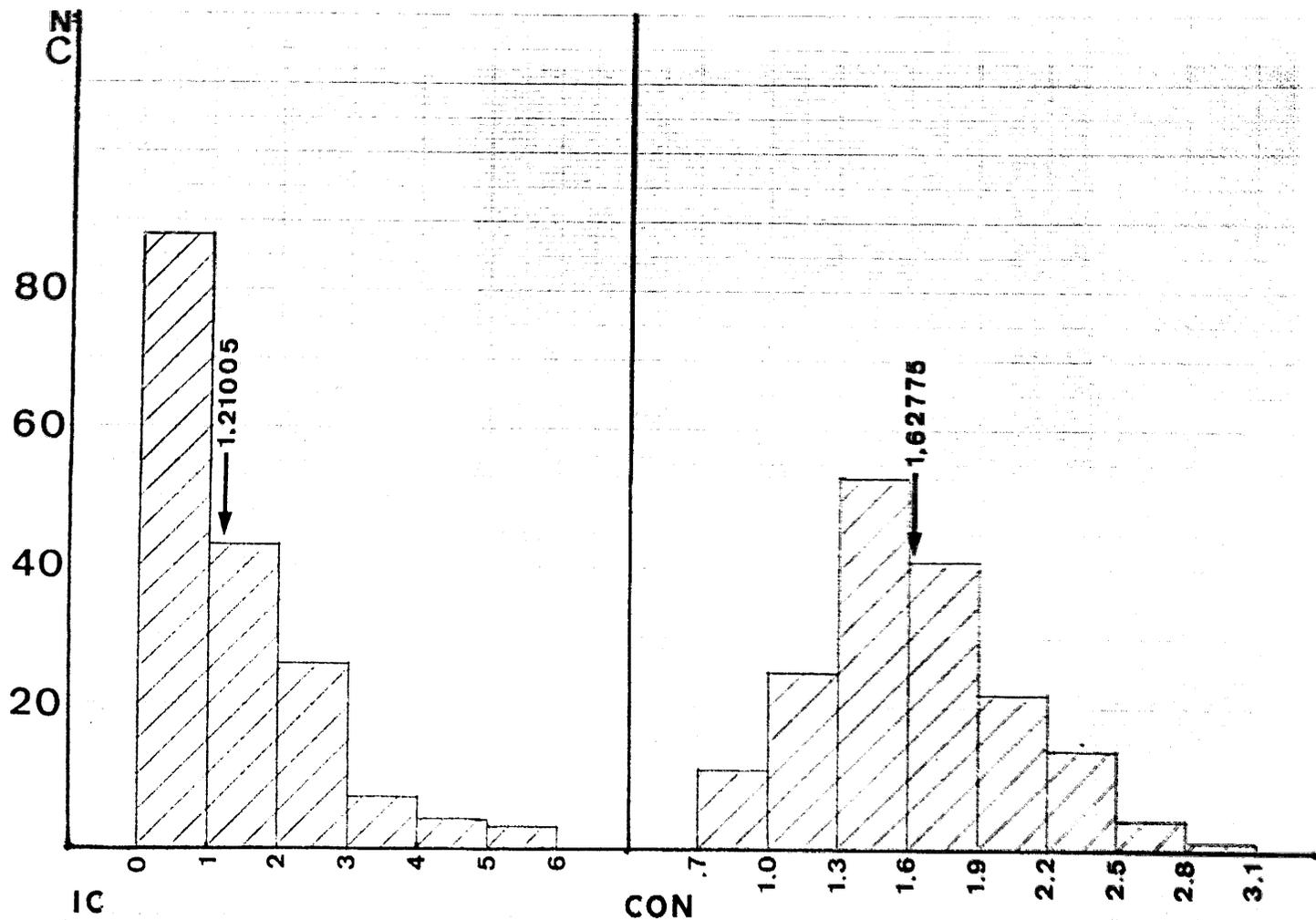
Gráfica 7

Representa el histograma de frecuencias de los diferentes valores del IC y de la CON, pero en este caso, para la población celular del núcleo dorsal del Vago.

Al igual que en la gráfica anterior, los valores de ordenadas representan número de células y los de abcisas los intervalos de distribución de los valores de ambos parámetros.

Las flechas indican, así mismo, los valores medios del IC y de la CON para las células de esta población.

V



RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE AMBAS
POBLACIONES

El análisis comparado de las dos poblaciones escogidas, en cuanto a los valores que adoptan los distintos parámetros celulares medidos, revela algunos datos diferenciadores entre ellas, del mismo modo que afirma una serie de características comunes.

En primer lugar hemos analizado los valores absolutos medios de las distintas superficies neuronales medidas, valores medios que se encuentran reflejados en la gráfica 8. Las neuronas analizadas del núcleo del nervio Hipogloso presentan unos tamaños medios de superficie celular, nuclear y nucleolar mayores que los correspondientes para las neuronas pertenecientes al núcleo dorsal del nervio Vago; sobre todo, son muy significativas estas diferencias en cuanto a SC y SNu, que son más del doble en las neuronas del primer grupo indicado que en las del núcleo del Vago. No ocurre así, sin embargo, con el tamaño medio de la HCnu, siendo la superficie de ella mayor en el caso de las neuronas del núcleo dorsal del nervio Vago, neuronas que presentan casi tres veces mas cantidad de HCnu que las del núcleo del Hipogloso.

Los resultados comparativos de estos parámetros explican lo indicado anteriormente al analizar los distintos coeficientes de correlación. Así resulta lógico la existencia de una correlación negativa entre los tamaños de la HCnu y los restantes parametros celulares, ya que se observa como las células que presentan tamaños mayores de nucléolo, núcleo y superficie neuronal -neuronas del núcleo del nervio Hipogloso-

son precisamente las que presentan unos tamaños de HC asociada al nucléolo más pequeños.

El análisis de los tamaños comparativos de las distintas superficies en ambos núcleos, puede representar, también, la existencia de una correlación más o menos estrecha. Así vemos como la cantidad de HCnu es casi tres veces mayor en las neuronas del núcleo dorsal del nervio Vago que en las del Hipogloso, mientras que por el contrario el tamaño del nucléolo -hablamos siempre en terminos de superficies algo mas de tres veces mayor en las neuronas del Hipogloso. Vemos entonces que la proporción es parecida, pero inversa.

La diferencia en cuanto a tamaños neuronales entre ambos núcleos es, sin embargo, algo mas del doble, siempre a favor de las células del núcleo del Hipogloso. E incluso por lo que respecta a la superficie nuclear, esta diferencia no llega, ni mucho menos, a ser del doble.

De este modo, supuesto un valor determinado del coeficiente de correlación entre SHCnu y Snu, en cada núcleo, no es raro que los valores respectivos de los coeficientes -- SHCnu/SC y SHCnu/SN sean menores que el mencionado coeficiente SHCnu/SNu, y la correlación sea sucesivamente menos estrecha.

De cualquier modo, esta gráfica nos indica claramente

uan acusada diferencia, en términos absolutos, entre la cantidad de HCnu existente en las neuronas del núcleo del nervio Hipogloso y la existente en las células del núcleo dorsal - del nervio Vago; correspondiendo precisamente a las neuronas más pequeñas -aquellas del núcleo del Vago- la existencia de una mayor superficie de HC asociada a su nucléolo.

El estudio comparativo de los dos nuevos parámetros introducidos -IC y CON- podemos verlo reflejado en la gráfica 9. En ella se han representado los valores entre los que oscilan el IC y la CON en ambos núcleos; asimismo se han representado los valores medios respectivos mediante las consiguientes flechas.

Al ser el IC un reflejo de la proporción existente entre los tamaños de la HCnu y del nucléolo de una población determinada, es lógico que su valor oscile entre cifras muy pequeñas para el caso de las células del núcleo del nervio Hipogloso, pues se trata de neuronas con un gran nucléolo y, en comparación, con escasa cantidad de HC asociada a él. Así vemos que en la gráfica los límites entre los que oscila este parámetro son valores muy pequeños. En el caso de las neuronas del núcleo dorsal del nervio Vago, por el contrario, al tener tamaños nucleolares menores que las del núcleo anterior y, -- sin embargo, presentar una mayor cantidad de HCnu, pueden alcanzarse valores del IC relativamente elevados. Eso se refleja en la gráfica por el hecho de que los intervalos de variación de este parámetro, en el caso de estas neuronas, se en-

cuentran más alejados y, aunque el límite inferior presenta un valor bastante bajo, el superior se acerca a un valor de 6.

De igual modo, el valor medio de este IC es muy diferente en ambas poblaciones neuronales y, mientras presenta un valor muy pequeño para las células del núcleo del Hipogloso, su valor es bastante más elevado para el caso de las neuronas del núcleo del Vago.

En definitiva, la gráfica 9, respecto al IC, es un reflejo lógico de las características neuronales en ambos núcleos y de lo representado por este IC. Son los tamaños relativos de HCnu y nucleolo, en ambas poblaciones, y la existencia de esa correlación inversa entre ellos, lo que origina el resultado de la distribución del IC representado en la gráfica.

Con respecto a la CON la situación es, sin embargo, bastante diferente. Este parámetro refleja en realidad la relación existente entre el conjunto Nucleolo-HC asociada con respecto al tamaño celular.

En la gráfica 9 se han representado también los intervalos de variación de la CON en ambos núcleos, observándose como los límites de variación no se diferencian mucho de una población a otra. El valor medio de este parámetro se encuentra, asimismo, bastante más próximo, de un núcleo a otro,

que en el caso del IC.

Este resultado es indicativo de que, independiente de las proporciones relativas que existan entre nucléolo y HC asociada de unas células a otras, el conjunto de estas dos estructuras se mantiene relativamente constante con respecto al tamaño celular. Esto es tanto como decir que nucléolo mas HC asociada parecen disponer, en las neuronas estudiadas al menos, de una superficie determinada dependiendo del tamaño celular de la neurona; independientemente de que esta superficie este desplazada a favor del nucléolo o de la HCnu dependiendo de la población concreta de que se trate.

En la misma gráfica 9 se ha representado un esquema que sintetiza el resultado del comportamiento de estos dos índices -IC y CON- en ambas poblaciones celulares. Los rectángulos representan la superficie media del nucléolo mas la HC asociada a el. El tanto por ciento que esta superficie conjunta representa respecto al tamaño total celular se ha indicado debajo de cada rectángulo. Cada uno de estos rectángulos se encuentra, asimismo, dividido en dos partes que representan los porcentajes medios relativos de SHCnu y SNu en cada núcleo.

Se observa como el valor medio del IC en el núcleo del nervio Hipogloso será bastante bajo al representar la HCnu solo el 7.2% de la superficie conjunta nucleolo-HC asociada, en este núcleo. Sin embargo, el porcentaje de la SHCnu, en el

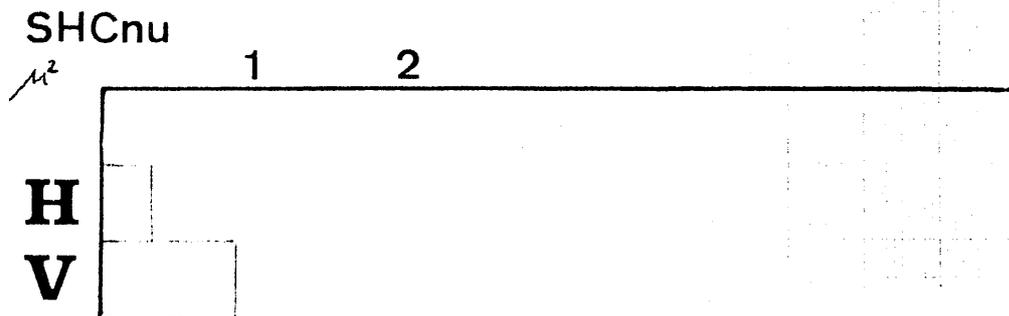
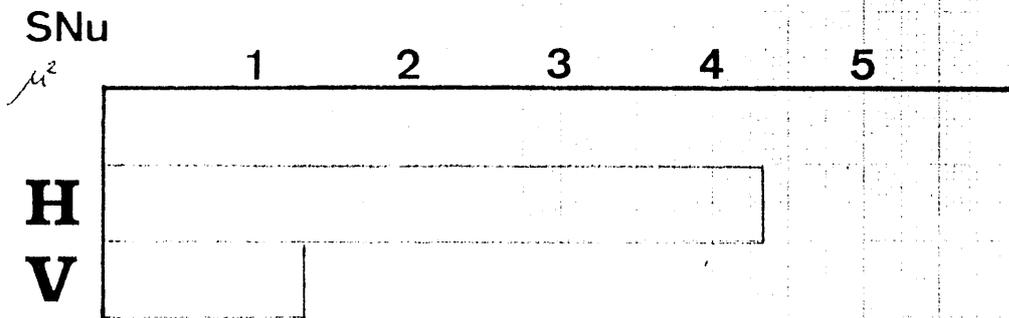
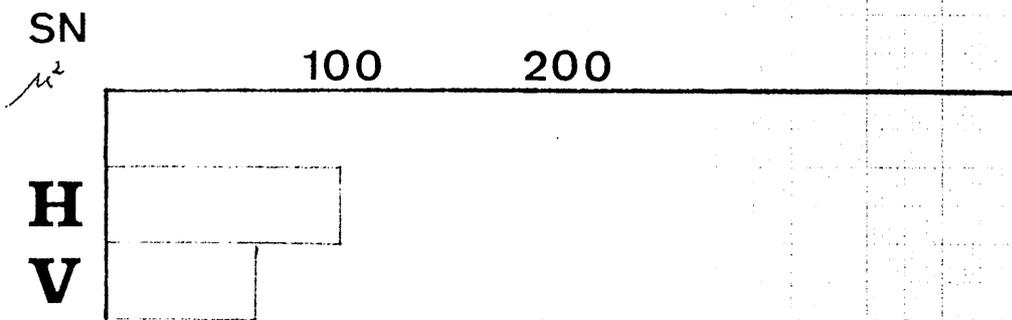
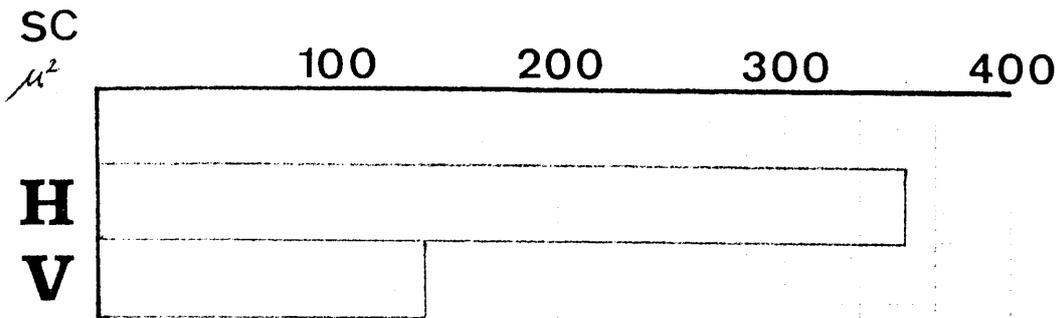
caso del núcleo dorsal del nervio Vago, es bastante mayor, y el valor del IC en el será bastante mas elevado que en el caso anterior.

Por otra parte, el porcentaje de esta superficie conjunta nucleolo-HC asociada, con respecto al tamaño celular, es poco diferente de una población celular a otra y -- esto repercute en que los valores medios de la CON no se en cuentren muy distantes entre ambas poblaciones neuronales.

Gráfica 8

Valores medios de los diferentes parámetros medidos en ambas poblaciones celulares. Se representan los valores medios de las superficies celular, nuclear, nucleolar y de la HC asociada al nucleolo. Estos valores vienen dados en micras cuadradas.

Para cada parámetro se comparan sus valores medios en ambas poblaciones: núcleo del Hipogloso (H) y núcleo dorsal del Vago (V).



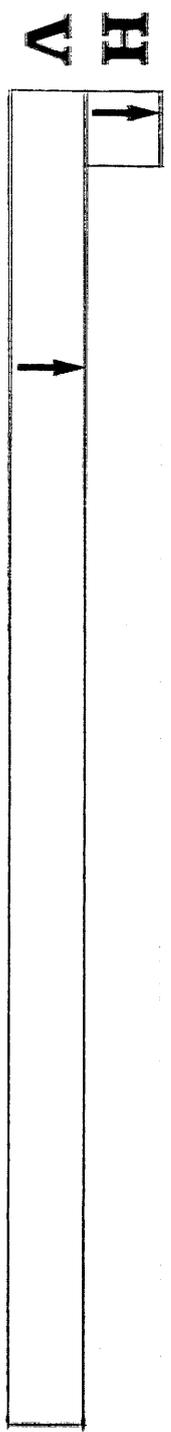
Gráfica 9

La parte derecha representa los intervalos de distribución de los diferentes valores del IC y de la CON en - ambas poblaciones analizadas: núcleo del Hipogloso (H) y dorsal del nervio Vago (V). Se han expresado con flechas los valores medios de estos parámetros en ambos casos.

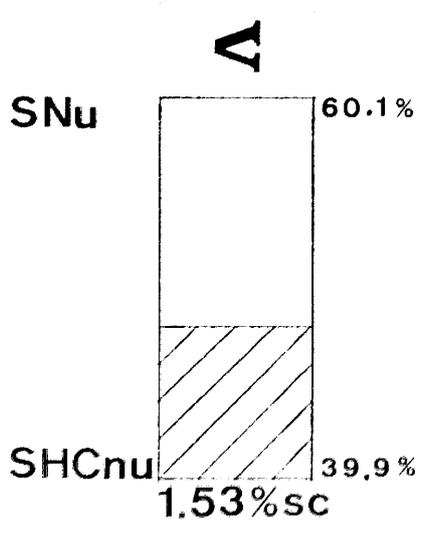
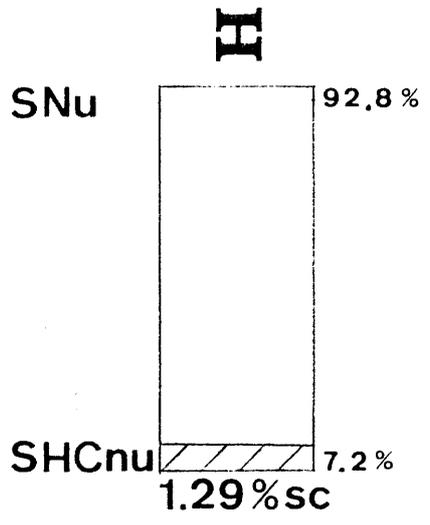
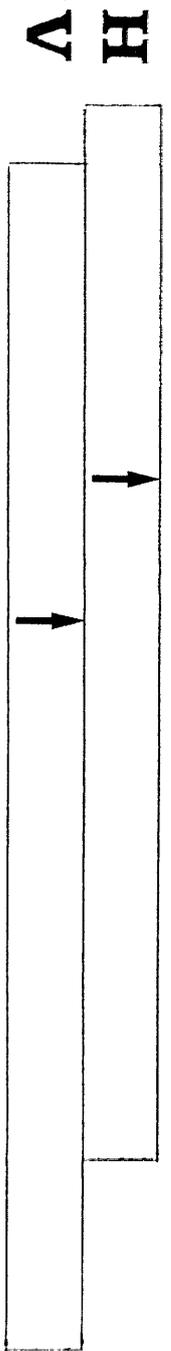
La parte izquierda representa los porcentajes relativos medios que el conjunto SHCnu+Snu representa con respecto al tamaño medio celular, en ambas poblaciones. Este por - centaje viene expresado en la parte inferior de cada rectángulo.

Los rectángulos representan, precisamente, la superficie media del nucléolo mas su HC asociada; rectángulos que se encuentran subdivididos en dos zonas que indican las proporciones existentes entre cada uno de estos componentes -superficie nucleolar media y superficie media de la HC asociada (zona rallada) + para las células de cada una de las - poblaciones.

IC
0 1 2 3 4 5 6



CON
0.7 1.5 2.3 3.1



DISCUSION
Y
COMENTARIO

COMENTARIO AL PROCEDIMIENTO TECNICO

El método por nosotros empleado ha comprendido la aplicación de distintas técnicas para la observación de la HC neuronal. Es conveniente un análisis y discusión inicial de ellas, antes de pasar al comentario de los resultados obtenidos.

Dos métodos bicrómicos, de características histoquímicas, usados han sido la tinción con Verde metilo-Pironina y la tinción con Azur-B. La primera representa una clásica tinción para la demostración de ácidos nucleicos (Pappenheim, 1899) cuyos resultados sobre cada uno de ellos -DNA y RNA- son claramente diferenciadores al utilizar la mezcla de dos colores tan distintos como son el verde y el rojo. Se ha discutido mucho, sin embargo, sobre la afinidad específica de cada colorante por el respectivo ácido nucleico y las características de este ácido para ser teñido de manera óptima.

Ya hemos apuntado, en la descripción de los resultados, como ambos colorantes actúan de manera independiente sobre el DNA y el RNA, cuando el pH está fijado en el punto óptimo de actuación sobre el tejido de que se trate. A ese pH óptimo, la HC se tiñe de verde, mientras el nucléolo y el citoplasma lo hacen en rojo intenso. Pero cuando el pH se desvía de ese valor óptimo, la tinción ya no resulta tan específica, afectando esta variación sobre todo a la unión de la pironina con los componentes celulares, de manera que se incrementa o disminuye la afinidad relativa de este colorante.

Indicábamos también anteriormente, la posibilidad de teñir ambas estructuras -HC y regiones ribonucleoproteicas- con cada uno de los colorantes por separado. Esto indica que el resultado de la tinción no es debido a una especificidad unilateral absoluta de cada tipo de colorante por un tipo de ácido nucléico, sino más bien a la combinación de sus especificidades relativas al emplearlos conjuntamente a un pH adecuado. Apuntando hacia esta conclusión se encuentran observaciones realizadas sobre la tinción de DNA, DNA-histonas y RNA por cada uno de estos colorantes (Kurnich, 1947), resultando que el DNA se teñía con pironina una quinta parte menos que el RNA, y el DNA-histona lo hace en una sexta parte menos. Esto explicaría que, aisladamente, ambos colorantes puedan fijarse sobre ambos tipos de ácidos nucléicos, pero que cada uno de ellos lo haga de manera más intensa sobre uno, DNA en el caso del Verde metilo y RNA para la Pironina.

En cuanto a la razón de esta relativa especificidad de cada colorante por un tipo de ácido nucléico, se han postulado dos fundamentales hipótesis. Una hace coincidir la mayor afinidad del Verde metilo por el DNA dependiendo del grado de polimerización de éste, de modo que si el DNA se encuentra despolimerizado o en cadenas muy cortas su afinidad hacia el Verde de metilo es muy baja y alta respecto a la Pironina, tiñéndose el DNA con la misma intensidad y color que el RNA por la mezcla de ambos colorantes (Kurnick, 1947, -- 1952). Sin embargo, frente a estas observaciones se ha descri-

to que preparaciones de DNA fraccionado por ultrasonido seguían presentando la alta afinidad por el Verde metilo, según descripciones de otros autores (Rosenkrantz y Bendich, 1958). Según otras observaciones, esta alta afinidad del DNA por el Verde metilo estaría condicionada por su estado en doble hélice, pues la disociación de las cadenas de DNA hace bajar considerablemente esta afinidad (Thomas, 1953, 1962; Scott, 1967; Diaz, 1972).

En este aspecto, nuestras observaciones pueden referirse únicamente a la discusión en el caso de la disociación y reasociación del DNA, tratamiento efectuado en nuestras preparaciones.

En situación normal, solo el DNA existente en la HC adquiere la tinción verde con su afinidad específica, mientras que el resto del carioplasma permanece incoloro. Esto parece indicar que el DNA eucromático no presenta apenas afinidad por el Verde metilo y, considerando que el estado eucromático se caracteriza por una actividad transcritora bastante acusada, y por tanto una gran proporción de las cadenas de DNA que se encuentra en este estado estarán con la doble hélice separada para atender a esta copia en RNA de diverso tipo, parece lógico pensar que esta disminución de afinidad pueda deberse a su unión a otras sustancias ó a este estado particular del DNA eucromático, ya que en cuanto al grado de polimerización ho habría a priori, que considerar diferencias entre el DNA eucromático y el hete-

rocromático.

Por otra parte, es un hecho, comprobado también en nuestras preparaciones, que la disociación de las cadenas de doble hélice del DNA hace perder esta afinidad por el verde metilo, ya que tras el proceso de disociación, por incubación en formamida, la HC no aparece teñida de verde por esta técnica del Verde metilo-Pironina.

Queda, sin embargo, como acabamos de apuntar, la posibilidad de que la afinidad característica del DNA por el Verde metilo se deba a la influencia de las proteínas asociadas, que siempre acompañan al DNA en estado heterocromático y que, lógicamente, variarán en disposición al disociarse las cadenas o al encontrarse el DNA realizando una función transcripтора. En apoyo de esta posibilidad se encuentran los hechos de que el complejo DNA-histonas se comporta más específicamente, frente al colorante, que el DNA de doble hélice solo (Kurnick, 1947) y que al tratar frotis de cromosomas con pepsina, la coloración que adquirían con Verde metilo-Pironina era más rojiza, frente al color verdoso de la situación normal (Pearse, 1960). A este respecto, tampoco hay que olvidar la posible influencia estabilizadora que las proteínas cromosómicas pudieran tener sobre el mantenimiento de la estructura reasociada, en doble hélice, de las cadenas de DNA (Diaz, 1972).

De cualquier modo, hemos podido constatar en nuestras

preparaciones, como el DNA heterocromático en situación normal presenta una muy alta afinidad por el Verde metilo y muy baja respecto a la Pironina, siendo la afinidad a la inversa para el caso del RNA. Y por otra parte, nuestras observaciones indican que este DNA heterocromático pierde su afinidad específica por el Verde metilo cuando sufre una separación de sus cadenas por disociación en formamida.

Comprobada esta afinidad relativa de ambos colorantes por un tipo de ácido nucléico, que aunque no es total sí es diferenciadora, resulta también claro, de nuestras observaciones, que cuando ambos colorantes se utilizan conjuntamente a un pH adecuado esta afinidad resulta prácticamente total, quizás por un fenómeno de competencia, fijándose el Verde metilo solo sobre el DNA y la Pironina solo sobre el RNA. Las variaciones de pH afectan, principalmente, a la fijación de la Pironina sobre las estructuras celulares, incrementándose la rapidez e intensidad de esta fijación a medida que crece el pH, y disminuyéndose a pHs bastante ácidos; la fijación del Verde metilo sobre el DNA, sin embargo, apenas queda afectada por la variación de pH.

Se trata, por tanto, de una técnica que resulta muy idónea para la demostración de ácidos nucleicos celulares, siempre que se use a pHs muy fijos y regulados siempre al óptimo sobre el material donde se deba usar.

Con respecto al tampón usado en esta técnica, hemos

de hacer notar la preferencia del tampón Acetato-Acético - (Walpole) sobre el de McIlvaine (Fosfato-Cítrico), pues este último suele precipitar los colorantes con cierta facilidad produciendo una serie de grumos.

En relación con la técnica del Azur-B hay que hacer notar que la hemos usado como un método de comprobación de las estructuras demostrables, sin realizar variaciones - apreciables de parámetros que nos permitan un estudio crítico de ella. Se trata de una técnica, usada también para la diferenciación citológica entre los dos tipos de ácidos nucleicos, cuyos resultados diferenciadores son, del mismo modo, apreciables.

Los resultados por nosotros obtenidos coinciden - con los de otros autores que han usado este método para la diferenciación citoquímica del DNA y del RNA, estudiando precisamente estructuras heterocromáticas adosadas al núcleo (Lima-de-Faria y Moses, 1966). Sobre ella hay que hacer notar también la importancia del pH determinado con que se aplique, sobre todo con vistas a la obtención de coloraciones nítidas sobre los distintos componentes puestos de manifiesto, y la conveniencia de realizar la tinción a una temperatura controlada, hecho que posibilita la regulación - siempre semejante del tiempo de tinción y la consecución de resultados siempre semejantes.

Hemos usado, así mismo, dos métodos de tinción -

monocromáticos como son el método de Nissl y la tinción con colorante de Giemsa. El primero representa la aplicación de una técnica de rutina en cualquier estudio sobre material de origen nervioso; el segundo, el aprovechamiento de un colorante que actualmente es utilizado de manera amplia para muchos estudios acerca de las regiones heterocromáticas en preparaciones cromosómicas.

Con respecto al método de Nissl, ha tenido para nosotros el interés de adaptar al estudio de la HC un método clásico de neurohistología, permitiéndonos, de esta manera, la posibilidad de estudio de estructuras heterocromáticas neuronales en relación a parámetros citoarquitectónicos y morfológicos que, normalmente, son estudiados con este método de coloración.

Esta técnica es, en principio, algo inespecífica, actuando sobre todos los lugares basófilos de la neurona debido al carácter básico de su agente colorante, en este caso la Tionina. Sin embargo, en el desarrollo de ella, hemos encontrado una cierta afinidad diferencial entre los dos tipos de ácidos nucleicos -DNA y RNA- sobre todo realizando modificaciones de pH y tiempo de tinción.

El estudio del desarrollo de la tinción a pHs variables nos ha revelado que la afinidad del colorante por las estructuras celulares es directamente proporcional al valor de este pH, creciendo la intensidad de coloración -para tiempos

constantes de tinción y diferenciación- a medida que el pH es más básico y disminuyendo a pHs ácidos. El estudio de los resultados empleando tiempos de tinción muy cortos nos ha de mostrado también la existencia de esa especificidad diferencial, a que antes aludíamos, en cuanto al comportamiento del colorante ante el DNA o el RNA -habría que hablar mejor de desoxirribo- o ribonucleoproteínas-.

Efectivamente, hemos comprobado como el colorante se fija inicialmente con más intensidad a las estructuras heterocromáticas, mientras que su velocidad de fijación al material basófilo citoplasmático y al nucléolo es más lenta. Esto hace que en las primeras etapas de la tinción, la HC aparezca mas intensamente teñida que las ribonucleoproteínas celulares, tal como indicamos al describir las peculiaridades de las técnicas, llegando un momento en que, al haberse saturado ya de colorante las estructuras heterocromáticas y continuar -sin - embargo- fijandolo las ribonucleoproteicas, las intensidades en ambas zonas se van igualando hasta hacerse parecidas.

El pH incrementa o disminuye de manera parecida la afinidad relativa -o mejor, la velocidad relativa de fijación- hacia el DNA y el RNA, lo que hace que no influya tanto en variar esta afinidad relativa sino en cuanto a alargar o acortar el momento en que las intensidades de ambas regiones se igualan. Es por ello, que trabajando a pHs no demasiado elevados, disponemos de un mayor margen de tiempo en el que se mantendrá la diferencia de intensidad de coloración entre HC y citoplasma

y nucléolo, haciendo posible la regulación mas precisa del tiempo de tinción óptimo para que el contraste entre ambos tipos de estructuras sea más patente.

También en esta técnica, el análisis de los resultados del empleo de diferentes tampones, ha revelado la conveniencia de utilizar el Acetato-Acético (Walpole), en el cual la conservación del colorante, sin alteraciones sustanciales, es más elevada.

La tinción con colorante de Giemsa representa un método clásico en coloración de frotis sanguíneos, que hemos tratado de adaptar al material nervioso, al tratarse de un colorante de material nuclear muy empleado hoy día en estudios sobre cariotipos.

Acercas del mecanismo de actuación de este colorante y de su afinidad específica, los datos que se encuentran en la bibliografía son imprecisos y, en ocasiones, contradictorios. Se trata, sin duda, de un colorante con gran afinidad por el material nuclear de las células, pero, como hemos observado en nuestras propias preparaciones, su unión a componentes ribonucleoprotéicos citoplasmáticos o nucleares, es, también relativamente importante. Incluso es posible que desarrolle una cierta actividad a nivel de membranas, de vainas de mielina, o de componentes neuronales ectoplasmáticos, puesto que hemos observado que posee un cierto carácter fibrilar; carácter demostrado en las preparaciones de tejido nervioso

mediante la puesta de manifiesto de un cierto número de prolongaciones neuronales, tal como apuntábamos en la descripción de los resultados de esta técnica.

La especificidad concreta hacia el DNA se ha referido a la existencia de este ácido nucleico en el estado de doble hélice. Es basado en este concepto como se han desarrollado una serie de técnicas de demostración de la HC cromosómica, en combinación con la naturaleza repetitiva de ciertos trozos de DNA. Las técnicas de demostración de estas regiones cromosómicas se basan en una disociación de las cadenas de DNA, seguida de una reasociación en medio salino neutro; las regiones constituidas por DNA repetitivo reasocian con mayor rapidez y al teñir con el colorante de Giemsa solo estas regiones se ponen de manifiesto al haber vuelto a adquirir rápidamente su configuración nativa. Este método, con variaciones de alguno de los parámetros utilizados, se ha venido empleando actualmente para la localización de estas regiones cromosómicas constituidas por DNA repetitivo (Pardue y Gall, 1970; Jones, 1970).

Por otra parte, modificaciones introducidas en cuanto al tratamiento previo a la tinción con el colorante, ha permitido la demostración de patrones cromosómicos específicos, reflejados en un conjunto de bandas denominadas como "bandas G"- características para cada pareja de homólogos (Summer y col., 1971; Patil y col., 1971).

En cualquiera de los casos, la fijación del colorano

te se relaciona con el mantenimiento o readquisición de la estructura nativa, en doble hélice, de las cadenas de DNA de esa región. Pero existen observaciones que reflejan precisamente una mayor afinidad del colorante por el DNA disociado, en forma por tanto de cadena simple, frente al DNA nativo, afinidad que sería hasta de un 50% mayor (Ahnström y Natarajan, 1974). Incluso, en estas mismas descripciones se apunta que el DNA de tipo repetitivo, nativo, presentaría una menor afinidad por el colorante que el DNA disociado.

Existen también observaciones acerca de que las proteínas cromosómicas más bien disminuirían la afinidad del colorante por el DNA, al establecerse entre ambos una competencia, hecho indicado por el resultado de que la afinidad del colorante por los complejos nucleoprotéicos es menor que para el DNA solo, pareciendo, por tanto, que los resultados de unión específica a regiones cromosómicas concretas pueda depender más de modificaciones, aún desconocidas, introducidas en ciertas regiones cromosómicas con los tratamientos previos a la tinción, que del mantenimiento de una estructura en doble hélice por el DNA de esas zonas - (Ahnström y Natarajan, 1974).

Cualquiera que sea su mecanismo de actuación, aún por dilucidar, este colorante, no obstante, ha mostrado en las preparaciones del tejido nervioso del ratón una mayor afinidad hacia la HC que hacia ninguna otra estructura --

celular; afinidad que, al menos en este caso, no parece muy influenciada por el pH de la tinción, consiguiéndose un contraste apropiado entre la HC y el resto de estructuras neuronales con tal de que el tiempo de tinción sea relativamente controlado, en relación con la concentración de colorante. En nuestras preparaciones no hemos obtenido diferencias significativas entre realizar la tinción a un pH controlado cercano al neutro, y realizarla mediante una solución acuosa del colorante, sin utilizar tampón alguno.

Por lo que respecta a la aplicación del método de Feulgen, ha sido también un método histoquímico utilizado como medio de comprobación, sin ninguna intención experimental. Hemos seguido el método propuesto por De Tomasi (De Tomasi, 1936) para la preparación del reactivo de Schiff y el proceder normal para el desarrollo del proceso. Los resultados con él obtenidos son los normales para esta técnica, destacando las estructuras heterocromáticas neuronales en color rojo púrpura, por su contenido en DNA, tal como expusimos en el apartado de "Resultados".

En cuanto a los distintos tratamientos empleados, para la hidrolisis enzimática de los ácidos nucleicos o para realizar la disociación y reasociación de las cadenas de DNA, merece especial comentario éste último.

Es este un método normalmente empleado sobre preparaciones cromosómicas que hemos trasplantado a las células -

interfásicas. Mediante este procedimiento se intenta localizar las regiones en que existe DNA repetitivo, ya que al estar este constituido por repetición de una secuencia básica multitud de veces, serán estas regiones las que primero reasocien; de esta manera pueden ponerse de manifiesto, pues el resto de regiones cromosómicas tardan mucho más en volver a adquirir las condiciones iniciales.

La disociación del DNA puede llevarse a cabo por mé todos variados tales como altas temperaturas, tratamiento con alcalis o ácidos y tratamiento con agentes orgánicos capaces de romper los puentes de hidrógeno. Sobre preparaciones romosómicas -y a veces sobre preparaciones celulares- se han realizado, fundamentalmente las disociaciones introduciendo las preparaciones en agua hirviendo (John y col., 1969; Arrighi y col., 1970) o mediante el tratamiento con ácidos o álcalis a bajas concentraciones (Birnstiel y col., 1968; Ahnström y Natarajan, 1974). Nosotros hemos comprobado que estos procedimientos de disociación resultan algo drásticos sobre las preparaciones tisulares, alterando la textura del tejido en mayor o menor grado. Al efecto de evitar tales inconvenientes, hemos realizado la disociación de las cadenas de DNA mediante incubación de los preparados en formamida, agente capaz de atacar los puentes de hidrógeno existente entre las dos cadenas de la doble hélice del DNA y usado actualmente en los procesos de disociación y reasociación del DNA (Summer y col., 1971; Church, 1973; Alonso, 1974). El tiempo de incubación lo hemos mantenido hasta conseguir la total desaparición de la

tinción sobre las masas de HCnu.

En las preparaciones teñidas después de la incubación en formamida, para comprobar la consecución de esta disociación, tras finalizar esta incubación los cortes fueron tratados con formol para impedir la posible reasociación que pudiera suceder entre el final de la incubación y el proceso de tinción. Este bloqueo de la reasociación por formilación ha sido comprobado en otros trabajos (Grossman y col., 1961).

Una vez establecido el tiempo de incubación en formamida necesario para la disociación total del DNA constituyente de la HC, cortes disociados fueron sometidos, directamente, a un proceso de reasociación de estas cadenas para comprobar la naturaleza del DNA heterocromático. A fin de poder establecer paralelismos con los resultados obtenidos a partir de preparaciones cromosómicas, hemos limitado el tiempo de reasociación al utilizado en esas preparaciones para la demostración del DNA repetitivo, y hemos usado una concentración de solución salina y temperatura de incubación semejantes a las que se usan en tales casos. Así, usando una concentración de 2 SCC y un tiempo de reasociación de 1 hora a 60°, se observa que en las preparaciones cromosómicas reasocian las regiones que se consideran constituidas por DNA repetitivo, no haciendolo las restantes zonas del cromosoma (Summer y col., 1971). Estos mismos parámetros han sido los mantenidos por nosotros al someter las preparaciones a este

proceso de reasociación, consiguiendo, bajo ella, la reasociación del DNA constituyente de la HCnu.

En cuanto a los tratamientos con enzimas hidrolíticas de los ácidos nucleicos, hemos seguido un procedimiento más o menos rutinario. Para el caso de la DNasa hemos tenido en cuenta, a la hora de elegir el medio de incubación, las necesidades en cationes divalentes activadores (Mg^{++} , Ca^{++}); regulando su concentración a valores adecuados, así como la fijación de un pH conveniente para la actividad del enzima. El tratamiento con RNasa lo hemos realizado con disolución del enzima en agua destilada, tal como vienen usándose normalmente (Pearse, 1960), al no necesitar este enzima de activadores específicos como en el caso anterior. La temperatura de incubación la hemos fijado, en ambos casos, a 37° para facilitar la acción enzimática y producir el mínimo de alteraciones posibles sobre el tejido tratado.

DISCUSION Y COMENTARIO DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

Un punto a considerar inicialmente es la propia naturaleza de las estructuras puestas de manifiesto. La existencia de masas adosadas al nucléolo no representa un artefacto producido por el método empleado, pues la realización de éste método sobre materiales diferentes -ratón, gato y rana- conduce a resultados específicos para cada material, hecho indicativo de que las estructuras puestas de manifiesto representan una característica propia del material analizado -en este caso, el ratón-. Por otra parte, la demostración de ésta estructura con cada una de las diferentes técnicas empleadas habla, también, en apoyo de su existencia real en las neuronas de *Mus musculus*.

La presencia de masas asociadas al nucléolo en distintos tipos celulares del ratón, viene confirmada por la observación de varios autores (Schildkraut y Maio, 1968; Jones, 1970; Pardue y Gall, 1970; Rae y Franke, 1972), algunas de ellas efectuadas sobre las propias células nerviosas (Andrew y Andrew, 1942; Yasmineh y Yunis, 1970). Es necesario, sin embargo, la confirmación de que las estructuras adosadas al nucléolo, puestas de manifiesto en las neuronas del ratón, corresponden a HC asociada al nucléolo. Para dilucidar claramente este punto hemos ampliado nuestro método a la utilización de diversas técnicas cuyos resultados comparados nos ayudarían a confirmarnos más concretamente sobre el, al mismo tiempo que nos permitirían un estudio de estas estructuras desde distintos ángulos. El acompañamiento de estas técnicas por unos determinados tratamientos citoquímicos nos ha permitido, por demás,

tanto complementar el resultado de las técnicas por lo que respecta a la naturaleza de las masas adosadas al nucléolo, como aportar algunos datos sobre la constitución y organización de ellas.

Que las masas adosadas al nucléolo en las neuronas del ratón corresponden a HC asociada al nucléolo, viene confirmado por su comportamiento ante las técnicas de carácter histoquímico utilizadas: método del Verde metilo-Pironina, tinción con Azur-B y reacción de Feulgen. Las estructuras asociadas al nucléolo se comportan, ante estas técnicas, como lo hacen las desoxirribonucleoproteínas, apareciendo Feulgen positivas y de color verdoso con los otros dos métodos. Responde, de este modo, como lo hacen las estructuras heterocromáticas en todos los tipos celulares, pudiendo clasificarse, por ello, como masas de HC asociada al nucléolo, estructura observada también en otros tipos celulares de diversas especies animales y vegetales (Heitz, 1928, 1933, 1934; Einarson, 1933; Schultz, 1947; Casperson, 1950; Lima-de-Faria y Moses, 1966; entre otros). También se han descrito estructuras heterocromáticas asociadas al nucléolo en células nerviosas (Andrew y Andrew, 1944; Gropp y Citoler, 1970) cuyo comportamiento tintorial es semejante al descrito por nosotros.

La respuesta que estas masas asociadas al nucléolo ofrecen ante los distintos tratamientos citoquímicos utilizados son DNasa sensibles, RNasa resistentes y capaces de su -

frir una disociación y reasociación de las cadenas de DNA-es, también, un hecho afirmativo del carácter heterocromático de estas estructuras.

Todo ello nos lleva a la confirmación de que las estructuras asociadas al nucléolo, sobre las que ha versado el estudio realizado, corresponden a Heterocromatina asociada a este componente nuclear, que constituye, además el constituyente heterocromático más llamativo de los núcleos neuronales de esta especie animal -*Mus musculus* var. albina-.

Pasando al comentario del significado de esta HC, un primer punto a discutir sería el de su relación con el sexo del animal, bien por que se trate de un HC facultativa del tipo X -cromatina sexual-, o bien, como han postulado algunos autores (Ohno y col., 1957), por que sean los cromosomas sexuales los encargados de la formación del nucléolo y responsables de la aparición de estas masas heterocromáticas asociadas a el.

En este último aspecto, se ha considerado por estos autores que el cromosoma X y el Y aparecen como cromosomas totalmente heteropicnóticos y de dimensiones desiguales; estos cromosomas, al formar conjuntamente el nucléolo durante interfase, darían lugar a la aparición de dos masas de HC asociadas a el, masas que serian una mayor que la otra y que representarían el fragmento restante del cromosoma sexual correspondiente que no actua como organizador nucleolar. --

Según esto, cabría esperar en los machos del ratón la existencia, en todas sus células, de dos masas desiguales de HC asociada al nucléolo; por el contrario, en las hembras ambas masas serían iguales al intervenir dos cromosomas X en la formación del nucléolo, en lugar de uno X y otro Y.

Las observaciones por nosotros efectuadas demuestran que no aparecen diferencias significativas constantes de tamaño entre las masas de HCnu en neuronas de ratones machos y hembras; por otra parte, dentro de un mismo cerebro perteneciente a un individuo macho o hembra, nos encontramos con neuronas que presentan dos masas de HCnu, otras con una solamente, e incluso algunas neuronas no presentan ninguna. De modo que, ó estas masas no están relacionadas de manera directa con los cromosomas sexuales, ó, si lo están, la cantidad de HC que cada uno de ellos pone de manifiesto durante la interfase puede variar de unas células a otras de manera independiente de que se trate de un individuo macho o hembra, y, por tanto, la cantidad y morfología de esta HCnu no estaría influenciada de forma directa por el sexo del animal.

Nuestras observaciones están mas bien en consonancia con la descripción de otros autores (Levan y col., 1962; Hsu y col., 1971; Rae y Franke, 1972) que adscriben la formación del nucléolo en el ratón a determinados autosomas; esto haría que las posibles variaciones de éstas masas de HCnu no estuvieran relacionadas con los cromosomas sexuales y no cabría esperar diferencias significativas en relación con el sexo del animal.

Por otra parte, el hecho de que no se trate de una cromatina sexual viene confirmada por su existencia tanto en ratones machos como en hembras, y coincide con las conclusiones de diversos autores que han estudiado esta HCnu desde ese punto de vista (Moore y Barr, 1953).

Por lo que respecta a la morfología de las masas de HCnu, nuestras observaciones están en consonancia con las descripciones de diversos autores sobre el mismo material (Andrew y Andrew, 1942; Moore y Barr, 1953; Yasmineh y Yunis, 1970); coinciden, así mismo, con las realizadas sobre HC asociada al nucléolo en neuronas de otras especies (Gropp y Ciotoler, 1970). Esta morfología muestra una cierta variabilidad de unas neuronas a otras, hecho que puede indicar la existencia de varios patrones de organización interfásica en los segmentos cromosómicos heterocromáticos responsables de su formación, o la posibilidad de alteración de un patrón básico semejante, dependiendo de características celulares concretas. De cualquier modo, resulta claro que no todas las neuronas de un determinado animal presentan la misma cantidad de HCnu y que esta HCnu no adopta, en todas las neuronas, una morfología semejante, si bien, la aparición en forma de masas alargadas y situadas de manera opuesta sobre la superficie nucleolar es la mas frecuente; descripción que coincide con lo observado por otros autores (Moore y Barr, 1953).

Un hecho interesante a comentar lo constituye la

respuesta de estas masas de HCnu a los procesos de disociación y reasociación de las cadenas de DNA.

El DNA constituyente de estas masas heterocromáticas se comporta de manera parecida a como lo hace el DNA repetitivo en las preparaciones cromosómicas. Así, tras una hora de incubación en solución salina, tiene lugar la reasociación prácticamente total de las cadenas del DNA disociado que forma esta HCnu. Este tiempo es el mismo que tarda en reasociar el DNA satélite repetitivo de las regiones cromosómicas que lo poseen. Es por esto que las masas de HCnu se comportan, en cuanto a su velocidad de reasociación, como lo hacen las regiones cromosómicas constituidas por DNA satélite repetitivo, hecho indicativo de la posible composición de estas masas a partir de este tipo de DNA.

La observación de que el DNA que constituye esta HCnu sea de tipo satélite repetitivo, coincide con las descripciones de otros autores realizadas a partir de fraccionamientos y análisis de la HC interfásica, o de hibridaciones sobre células interfásicas. En el caso de células hepáticas y de Sertoli, ya es sabido que hibridaciones con RNA complementario del DNA satélite muestran que este DNA es muy abundante en las masas de HCnu (Rae y Franke, 1972); del mismo modo, análisis del contenido en DNA satélite de la HCnu aislada de neuronas de ratón, muestra que esta HCnu contiene una gran proporción de este tipo de DNA.

Nuestros resultados, tras la disociación y reaso-

ciación, nos llevan a coincidir con tales observaciones en el aspecto de que la HCnu de las neuronas de ratón debe estar constituida, en una gran proporción, por DNA de tipo repetitivo, como corresponde a su rapidez de reasociación.

El comportamiento de la HCnu ante la DNasa constituye un punto de discusión sumamente interesante. Tal como describimos en los resultados obtenidos tras la hidrólisis enzimática del DNA, las masas de HCnu no desaparecen totalmente tras la acción del enzima hidrolítico, sino que quedan unos pequeños restos que se comportan de manera semejante a como lo hacen las ribonucleoproteínas. Tres posibles explicaciones pueden referirse a estos resultados: que la hidrólisis del DNA no haya sido total, que queden restos de carácter protéico o de algún tipo de sustancias diferentes de los ácidos nucleicos, o que exista en la constitución de las masas de HCnu alguna cantidad de RNA que no se ve afectado -lógicamente- por la hidrólisis enzimática del DNA.

Acercas de la primera hipótesis hay que hacer notar que estos restos se comportan frente a las distintas tinciones como si se tratara de sustancias ribonucleoproteicas, pues se tiñen de rojo con la técnica del Verde metilo-Pironina, con la misma intensidad que el citoplasma y el nucléolo. Podría pensarse que esta hidrólisis hubiera afectado de alguna manera a los restos de DNA que quedasen, de forma que la afinidad de ellos por la Pironina se hubiera incrementado por un mecanismo desconocido; pero su comportamiento frente

a la reacción de Feulgen se revela negativo. Ello nos hace descartar la posibilidad de que estos restos de las masas de HCnu, que quedan tras la hidrólisis enzimática del DNA, correspondan a DNA no totalmente hidrolizado, a no ser que admitamos la posibilidad de que estos restos de DNA se han modificado estructural o químicamente de tal manera con los tratamientos que han cambiado el comportamiento normal que corresponde al DNA, frente a las pruebas histoquímicas empleadas, comportándose ahora ante ellas de manera parecida a como lo hacen las ribonucleoproteínas celulares; cosa por otra lado poco probable.

En el caso de que estos restos pertenecieran a estructuras de carácter proteico, no afectadas por la hidrólisis enzimática del DNA, habría que considerar la posibilidad de que estas proteínas se comportan, también, ahora de manera diferente a como lo harían en situación normal; pues mientras sin tratamiento adquieren una coloración verdosa con el Verde metilo-Pironina, tras la hidrólisis lo hacen de color rojo. El carácter protéico de estas estructuras podría explicar su reacción Feulgen negativa, pero no se acierta a comprender el mecanismo que haya podido llevar a un cambio de comportamiento de estas proteínas, tras la hidrólisis del DNA.

Otra posibilidad consiste en que estos restos correspondan a RNA constituyente de la HC, que se pone de manifiesto al eliminar el DNA de estas estructuras tras la hidró

lisis enzimática.

La presencia de RNA en la estructuración de las masas de HCnu explicaría el comportamiento tintorial e histoquímico de estos restos -Feulgen negativos y con afinidades tintoriales semejantes a las ribonucleoproteínas-, al mismo tiempo que podría aclarar el comportamiento de las masas de HCnu frente a la técnica del Verde metilo-Pironina, en situación normal. Efectivamente, como describíamos en los resultados, la HCnu se tiñe de color verde con esta técnica cuando el pH se encuentra fijado en un punto adecuado, pero al incrementar este pH, su coloración aparece azulada. Tal como dijimos entonces, la afinidad del DNA por el Verde de metilo no se veía afectada por el cambio de pH -al menos en los intervalos por nosotros analizados-, pero no ocurría así con la Pironina, incrementándose la afinidad de ella por el RNA a pHs cada vez más básicos.

Sería posible la existencia de una pequeña cantidad de RNA en la HCnu que a un pH como el usado por nosotros apenas fijará Pironina, quizás por su localización interna dentro de estas masas heterocromáticas, pero al incrementarse la fijación de Pironina por las ribonucleoproteínas celulares, como consecuencia de una subida del pH, este RNA fijaría una mayor cantidad de colorante, y la mezcla de ambos colores -rojo y verde- en las masas heterocromáticas daría como consecuencia la aparición de un tono azulado.

Tras la hidrólisis enzimática del DNA, quedarían como resto de estas masas heterocromáticas el RNA, que se comportaría tal como lo hacen los restos presentes en nuestras preparaciones.

En este aspecto, nuestras observaciones coincidirían con las realizadas por otros autores al efectuar estudios citoquímicos sobre estructuras heterocromáticas. Así, se ha apuntado la posibilidad de que existiera una cierta cantidad de RNA formando parte de los cromocentros de células del erizo, como resultado del comportamiento de estos cromocentros frente a la misma técnica empleada por nosotros, del Verde metilo-Pironina, y frente a su tratamiento por RNasa (Gropp y Citoler, 1970). Por otra parte, Kaufmann y col. encontraron que la HC aparecía con la técnica del Verde metilo-Pironina de color azulado, color que desaparecía, para pasar el verde puro, tras su tratamiento con RNasa (Pearse, 1960). Estos hechos sugieren, en definitiva, la posible existencia de RNA formando parte de las estructuras heterocromáticas, como se desprendería de su comportamiento frente a los tratamientos expuestos; RNA cuyo tipo y significado quedaría por dilucidar.

Estudios citoquímicos y ultraestructurales a microscopía electrónica, han revelado, así mismo, la existencia de cierta cantidad de RNA formando parte de una masa heterocromática asociada al nucléolo en *Típula* (Lima-de-Faria y Moses, 1966), siendo, también, un hecho en apoyo de la posible existencia de este tipo de ácido nucleico en las estructuras he-

terocromáticas.

Quedaría, no obstante, por explicar, por qué tras la disociación de las cadenas de DNA por incubación en formamida, no se observan restos de las masas heterocromáticas que se comporten de manera parecida a las ribonucleoproteínas. Sin embargo, hay que recordar lo apuntado en su momento sobre la observación de que esta incubación, además de disociar las cadenas de DNA heterocromático, afectaba, en cierto grado, a las ribonucleoproteínas del citoplasma y del nucléolo; afectación que se revelaba por una menor intensidad de la coloración debido, quizás, a una alteración o eliminación de parte de ellas por el medio de incubación. Es posible que la cantidad de RNA existente en la HC sea relativamente pequeña y se afecte por la incubación en formamida de manera que sea prácticamente eliminado o alterado, y de este modo, esa pequeña cantidad no pueda ponerse de manifiesto tras su permanencia en el medio de incubación. Sin embargo, la hidrólisis enzimática del DNA no tendría por que afectar al RNA existente en esos niveles, lo que daría como resultado la posibilidad de ponerlo de manifiesto, tras esta hidrólisis, al formar los restos de las masas de HCnu.

De cualquier modo, aunque nuestras observaciones - apuntan hacia una posible existencia de RNA en las masas de HCnu, esta existencia, para ser confirmada, necesitaría de un estudio, al respecto, específico y de mayor profundidad, idea que constituye uno de nuestros futuros deseos.

Por lo que respecta al comportamiento de las masas asociadas al nucléolo frente a la RNasa su resultado nos afirma en la conclusión de que ellas representan un caso -típico de Heterocromatina asociada al nucléolo en el tipo celular analizado -neuronas de ratón-, zonas por tanto, con un contenido en DNA al no verse afectadas por la hidrólisis enzimática del RNA; hidrólisis que, sin embargo, conduce a la eliminación de los grumos ribonucleoprotéicos citoplasmáticos y del nucléolo.

COMENTARIO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CUANTITATIVOS

El análisis de los resultados cuantitativos nos revela, inicialmente, la existencia de una variabilidad en los valores absolutos del tamaño de la HCnu. Esta variabilidad indica que no todas las neuronas de un determinado organismo presentan la misma cantidad de HC asociada a su nucléolo, siendo esta cantidad un parámetro variable de unas neuronas a otras.

La variabilidad de este parámetro viene avalada, así mismo, por las observaciones realizadas en neuronas tras la extracción del RNA, de manera que sigue apreciándose la diferencia entre unas células y otras en lo que se refiere a la cantidad de HCnu; estas observaciones, tras la eliminación del RNA, eliminan la posibilidad de que la variabilidad de esta estructura se debiera a un fenómeno de enmascaramiento producido por las diferencias en el tamaño del nucléolo respectivo. Es decir, no existe la posibilidad de que la variación en el tamaño de las masas heterocromáticas sea debido a que variaciones en el tamaño del nucléolo puedan cubrir o descubrir, porciones mayores o menores de HCnu, toda vez que tras la utilización de RNasa y extracción correspondiente del nucléolo- el tamaño de la masa heterocromática sigue siendo el mismo.

La existencia de distintos valores en los tamaños de la HCnu es un hecho interesante que permite analizar el significado de esta estructura desde un nuevo punto de vista. Tal como indicamos en su momento, existen diversas --

opiniones (Yasmineh y Yunis, 1970; Jones, 1970; Yunis y Yasmineh, 1971) que catalogan esta HC como de tipo constitutivo; esta HC constitutiva, tal como se conoce actualmente, representaría regiones cromosómicas heterocromáticas de manera permanente, existentes en ambos cromosomas homólogos y semejantes para todos los tipos celulares de una especie dada. Suponiendo que estas regiones cromosómicas de HC constitutiva pudieran manifestarse, durante la interfase, de formas diferentes dependiendo del tipo celular concreto en que se encuentren, no habría que esperar una variación en la cantidad de ella -una vez adoptado ese patrón específico interfásico- en las células de ese determinado tipo. Esto es tanto como decir que, suponiendo que esta HC se manifieste en las neuronas bajo la forma de HC asociada al nucléolo, todas las neuronas deberían poseer la misma cantidad de HCnu, puesto que todas cuentan con la misma proporción de segmentos cromosómicos compuestos por HC constitutiva para formar estas masas adosadas al nucléolo.

Si esto no ocurre así, dos posibles explicaciones podrían existir: o no todas las neuronas utilizan la misma cantidad de segmentos cromosómicos de HC constitutiva para formar la HCnu, entrando entonces los segmentos restantes a formar parte de otras estructuras heterocromáticas interfásicas -cromocentros, por ejemplo-; ó, aunque todas las neuronas utilizan la misma cantidad de segmentos cromosómicos para formar su HCnu, alguna cantidad de estos segmentos heterocromáticos puede desespirilizarse y adquirir la configuración eucromática, haciendo, entonces, variar el tamaño que adquieren .

estas masas de HC asociada al nucléolo.

En el primer caso habría, entonces, que esperar que aquellas neuronas que poseyeran una escasa cantidad de HCnu, tuviesen, por el contrario, una mayor riqueza de cromocentros que aquellas otras que presentan unas grandes masas de HC asociada a su nucléolo. Por otra parte, habría que concebir un mecanismo por el que unas veces entraran a formar parte de esas masas de HCnu mas cantidad de segmentos cromosómicos que otras.

Tras la observación de las neuronas analizadas, no hemos encontrado una diferencia apreciable en la cantidad de cromocentros de unas neuronas a otras. Practicamente todas las neuronas presentan una escasez muy notable de estas estructuras heterocromáticas y esto haria que, caso de existir una mayor abundancia de ellas en algunas neuronas -aquellas que poseyeran menor cantidad de HCnu- esta abundancia fuera facilmente apreciable. Parece, por tanto, poco probable que la diferencia en las cantidades de la HCnu que presentan las distintas neuronas pudiera deberse a una diferencia en la cantidad de segmentos heterocromáticos que entraran a formar parte de su HC asociada al nucléolo.

La segunda posibilidad, apuntada antes, de que parte de la HC que integra la HCnu pudiese adoptar una configuración eucromática, explicaría las diferencias existentes entre unas neuronas y otras, pero entonces no cabria considerar --

esta estructura como HC constitutiva puesto que, al poder adoptar el estado eucromático -dependiendo de características celulares concretas- en mayor o menor grado, no sería una estructura heterocromática de carácter permanente. Habría que considerarla mejor como una HC de tipo funcional que pudiese variar su configuración -eu o heterocromática- dependiendo de las necesidades y características celulares de la neurona donde se encuentre; o bien, habría que concluir que parte de lo que hasta ahora se viene considerando como HC constitutiva, pudiera corresponder, en realidad, a una HC funcional.

De cualquier modo, independientemente del mecanismo que pueda llevar a su formación, la diferencia interneuronal en la cantidad de HCnu existente en sus núcleos postula la existencia de una relación entre esta HC y características celulares concretas, llevando a una interdependencia entre la actividad celular y el tamaño, o expresión, de la HC asociada a su nucléolo, hecho que no cuadra con la típica concepción de una HC inerte, adscrita hasta ahora a la HC de tipo constitutivo.

Estudios anteriores sobre esta HCnu en las neuronas del ratón hablan en favor de esta interdependencia; concretamente, se han observado variaciones en la cantidad y morfología de estas masas heterocromáticas asociadas al nucléolo como respuestas a experimentaciones que inducían alteraciones en la situación general de los elementos nerviosos,

fundamentalmente una inanición celular prolongada (Andrew y Andrew, 1942), hecho que tampoco correspondería a una naturaleza constitutiva de esta HCnu. Existe, así mismo, observaciones de una cierta actividad transcriptor a nivel de ciertas regiones de HC constitutiva en oocitos humanos (Stahl y col., 1975), actividad, al parecer, en relación con la aparición de micronucleolos como respuesta a necesidades especiales de estas células durante el estado de Diplotene. Del mismo modo, la HC constitutiva de *Microtus agrestis*, en las células del tiroides, puede activarse por estimulación realizar una actividad transcriptor (Schneider y col., 1973).

Estos hechos indican, en definitiva, que el considerar a la HC asociada al nucléolo como una HC constitutiva no parece muy adecuado; aparte de que, posiblemente, estructuras heterocromáticas hasta ahora consideradas de carácter constitutivo, puedan tener un significado mas funcional del que se les adscribía.

La variabilidad de las cantidades de HCnu entre unas neuronas y otras aporta, además, la posibilidad de considerar esta nuevo parametro celular en los diferentes estudios que puedan realizarse sobre este material, facultando la realización de comparaciones neuronales desde nuevos ángulos que complementen y enriquezcan las comparaciones clásicas en base a los parámetros morfológicos típicos tales como los tamaños neuronales, nucleares, morfología celular, etc.

En este sentido resultan interesantes las correlaciones encontradas entre los tamaños de la HCnu y los restantes parámetros celulares analizados.

Resulta claramente demostrativa la relación inversa que existe entre los tamaños del nucléolo y de su HC asociada, hecho observado en las dos poblaciones neuronales analizadas. Tanto si se trata de grandes células del núcleo Hipogloso, como de pequeñas neuronas del núcleo dorsal del Vago, existe esta correlación inversa donde, a mayores tamaños del nucléolo, corresponden menores cantidades de HCnu y viceversa. Esta correlación inversa Nucleolo-Heterocromatina asociada ha sido encontrada también por otros autores en materiales diferentes (Vagner-Capodano y Stahl, 1974); concretamente, encontraron en fibroblastos de *Coturnix coturnix japonica* - que las células que poseían un gran nucléolo presentaban pequeñas masas de HC adosadas a su superficie, mientras que en aquellos fibroblastos que poseían nucléolos pequeños, las masas heterocromáticas asociadas eran muy voluminosas.

Esta correlación parece indicar una cierta intervención de la HC asociada en la formación del nucléolo. La explicación más directa sería el que estas masas de HCnu representasen una reserva de cistrones de rDNA y que hubiera una mayor o menor cantidad de ellos en estado inactivo -y por tanto heterocromático-, lo que repercutiría en que el tamaño del nucléolo fuera mas o menos grande, siempre en proporción inversa, dependiendo de esta mayor o menor cantidad de cistrones acti-

vos. Esta hipótesis postularía la formación del material nucleolar a expensas de estas masas de HC asociadas a él y, por tanto, habrían que considerar a esta HC como de tipo funcional, que podría activarse en mayor o menor grado -dependiendo de necesidades celulares-, y llevaría a la formación de nucleolos mas o menos voluminosos.

Existen descripciones, en apoyo de esta idea, que comprueban la formación de material nucleolar a partir de HC asociada a el, HC que se despiriliza en mayor o menor grado, dependiendo de necesidades celulares concretas, y comenzaría a ser activa, originando un incremento en el tamaño nucleolar (Weber, 1971; Natajan y Sharma, 1971). Así mismo, se han descrito formaciones heterocromáticas asociadas al nucléolo que representan cistrones ede DNA ribosómico con capacidad de actuar en determinados momentos de la vida celular de algunos tipos celulares (Lima-de-Faria y Moses, 1966; Lima-de-Faria y col., 1969).

Esto haría catalogar a las masas de HC adosadas al nucléolo de las neuronas del ratón, como depósitos de DNA ribosómico, rDNA que estaría amplificado en esta especie animal y que actuaría en mayor o menor grado, dependiendo de la existencia de una actividad celular más o menos acusada.

Son múltiples las observaciones acerca de la existencia de una cantidad variable de cistrones implicados en la síntesis de rRNA en diferentes especies, como resultado de una

amplificación de estos genes (Brown y Dawid, 1968; Vincent y col., 1969; Malva y col., 1972; Maher y Fox, 1973; Jaworska y Lima-de-Faria, 1973; Wellauer y col., 1974; Mohan y Flavell, 1974; Sinclair y col., 1974). Ello indica que la existencia de una gran cantidad de genes de RNA ribosómico que pueda actuar como reserva, con capacidad de activarse en determinados momentos, es un hecho relativamente abundante en multitud de casos. Las masas de HC asociada al nucléolo en *Mus musculus* pueden representar un ejemplo de amplificación de cistrones de rDNA, con un porcentaje de ellos, en forma activa, variable de unas células a otras.

Este hecho estaría, así mismo, en consonancia con el comportamiento de esta HC frente a los procesos de disociación y reasociación del DNA. La velocidad de reasociación encontrada para el DNA de esta HCnu corresponde, como dijimos en su momento, a un DNA de tipo repetitivo. Es conocida la naturaleza repetitiva del rDNA, puesto que en casi todos los organismos existen múltiples cistrones de este tipo de DNA implicados en la síntesis de RNA ribosómico, multiplicidad que, en ocasiones, llega a ser de varios cientos de miles de secuencias (Shapeville y Haenni, 1972). A una naturaleza repetitiva de este rDNA como la descrita, correspondería una velocidad de reasociación más rápida que a un DNA más heterogéneo como el que constituye otras regiones del genoma.

Hay que considerar, no obstante, la existencia de DNA satélite formando parte de la HCnu del ratón (Rae y Franke,

1972) y la no existencia de RNA complementario a este tipo de DNA encontrada en esta especie (Walker y col., 1969; Flamm y col., 1969). Sin embargo, hay que hacer notar que los diferentes estudios realizados a partir de HCnu purificada, en relación a su contenido en DNA satélite, muestran que no todo el DNA que forma parte de esta HC es de éste tipo, variando los porcentajes obtenidos según los diferentes autores (Schilkraut y Maio, 1968; Yasmineh y Yunis, 1970). Por otra parte, frente a lo dicho más arriba, hay que contraponer diversas observaciones que describen la existencia de distintos RNAs complementarios a las cadenas de DNA satélite; RNAs de tipo aún no establecido totalmente (Britten y Kohne, 1968; 1969; Harel y col., 1968; Cohen y col., 1993). La existencia de RNAs complementarios de DNAs de tipo satélite ha sido comprobada, también, en diferentes especies (Gall, 1969; Kedes y Birnstiel, 1971; Jones y Corneo, 1971; Saunders y col., 1972; Balsamo y col., 1973), y puede ser indicativa de la existencia de una cierta actividad transcriptor a nivel de este DNA satélite, que no se habría considerado inicialmente.

La posible relación de las masas de HCnu con la formación del material nucleolar, bien por representar depósitos de cistrones de rDNA con posibilidad de activación, bien por poder integrarse en la organización del nucléolo con una actividad aún desconocida, no está teñida con las observaciones efectuadas en distintos materiales, sino que aparecería como un ejemplo más de los casos ya descritos.

Esta interdependencia entre nucleolo y HC asociada, sea cual sea el mecanismo por el que se da, queda reflejado en la existencia de esa correlación inversa entre ambas estructuras y provee de un nuevo método de estudio de las neuronas del ratón en relación a ambos parámetros.

Lo expuesto anteriormente explicaría, así mismo, la existencia de una correlación inversa, también, entre el tamaño de la HCnu y el tamaño neuronal, y la no existencia de esta correlación en el caso del núcleo celular. Efectivamente, si la formación del nucleolo se hace a expensas de la HC asociada a él, resulta lógico pensar que células de gran tamaño -y que por tanto poseen una mayor cantidad de ribosomas en su citoplasma para atender a su actividad sintética más acusada- necesitarán estar dotadas de un nucleolo mayor, puesto que la síntesis de material ribosómico en ellas debe estar incrementada, y, consiguientemente, la cantidad de HC que exista asociada a este nucleolo será menor. Existe, de este modo, una interdependencia entre la actividad sintética de la neurona y la cantidad de material cromático asociado al nucleolo que puede permanecer en la forma condensada -heterocromatina-. Cuanto mayor sea una neurona y mayor, por tanto, su actividad sintética, necesaria mayor cantidad de material cromático en estado activo formando parte de su nucleolo, y la cantidad de HC asociada al nucleolo -que representaría el resto de material no activo- debe disminuir. Lo contrario debería suceder en neuronas de pequeña talla -y por tanto de necesidades menores-, pudiendo per-

manecer una mayor cantidad de material formados del nucleolo en estado inactivo, es decir: heterocromático.

No cabría esperar entonces una relación importante entre el tamaño del núcleo celular y la cantidad de HC asociada al nucléolo, pues, en última instancia, esta HC estaría más relacionada con actividades sintéticas que están teniendo lugar a nivel del citoplasma, y por tanto estaría más influida por el volumen de este que por el del núcleo. Ello se manifiesta en que, tal como apuntábamos en los resultados, la relación existente entre HCnu y núcleo celular no podemos considerarla como significativa -a tenor de los valores obtenidos- pues se mantiene en los límites de lo aleatorio. El que en unos casos entre dentro de lo significativo -de forma escasa, en cualquier modo- o no lo haga, dependerá, en definitiva de las proporciones de tamaños que existan entre nucléolo, núcleo y superficie celular, ya que al estar la HCnu correlacionada con dos de estos parámetros -superficie celular y nucleolar-, si el tercero de ellos -superficie nuclear- presenta unos valores proporcionados a los dos anteriores, puede salir una cierta correlación entre el y la HCnu. Si esta proporción entre el núcleo neuronal y nucléolo y tamaño celular no es suficientemente estrecha, la HCnu no mostrará una correlación apreciable con la superficie nuclear.

Este hecho se encuentra reflejado en los resultados obtenidos para los dos núcleos bulbares estudiados. Como se observa en la gráfica 8, la proporción que existe entre el ta-

manño medio del núcleo celular con respecto al tamaño medio de nucléolo y célula, en las neuronas del núcleo del nervio vago, es lo suficientemente estrecha como para que en esta población se obtenga una pequeña correlación entre los tamaños de HCnu y del núcleo. Sin embargo, en las células del núcleo del Hipogloso, la relación que existe entre los tamaños medios del nucleolo y célula respecto al tamaño medio del núcleo celular, es menos proporcionada y no se obtienen valores del coeficiente de correlación significativos para los parámetros SHCnu/SN.

De este modo, la existencia de las distintas correlaciones podría explicar la intervención de la HC asociada al nucléolo en la formación del material nucleolar; intervención que vendría demandada, en mayor o menor grado, por las necesidades funcionales de la célula. Los tamaños de HCnu y núcleo ya quedó expuesto que son independientes, o al menos no guardan una relación directa.

Estas sospechas se ven, por otra parte, avaladas en el estudio comparativo realizado sobre las dos poblaciones celulares analizadas.

Las neuronas integrantes del núcleo del Hipogloso, poseen una menor cantidad media de HCnu que las que integran el núcleo dorsal del Vago. Esto vendría explicado porque las neuronas del primer ejemplo representan un tipo celular de tamaño considerable; por el contrario, las células integrantes

del núcleo dorsal del Vago son neuronas relativamente pequeñas y que, lógicamente, poseen una cantidad de ribosomas menor y una actividad menos acusada.

El estudio de la cantidad de HCnu en las neuronas de ratón, aparece, de este modo, como una posibilidad nueva de clasificación y diferenciación neuronal. En este parámetro celular se verán reflejados el tamaño celular y el de su nucléolo, revelándose como un nuevo valor a tener en cuenta para el análisis de tipos neuronales de esta especie animal.

El análisis de los dos nuevos parámetros introducidos en estos estudios -el Índice de Constitución y la Constante de Organización Nucleolar- merece un comentario antes de finalizar. Ambos parámetros son útiles para el estudio de poblaciones neuronales, pudiendo establecerse valores específicos para cada uno dependiendo de la población analizada.

El IC muestra, sin embargo, una diferencia apreciable, en su valor medio, entre ambos núcleos estudiados. Al ser una representación de la cantidad de HCnu con respecto al tamaño nucleolar, reflejará de forma muy directa la diferencia que pueda haber entre unas poblaciones celulares y otras y, al representar un cociente entre dos valores que varían inversamente, su valor oscilará bastante, de unos conjuntos neuronales a otros, aunque las diferencias entre

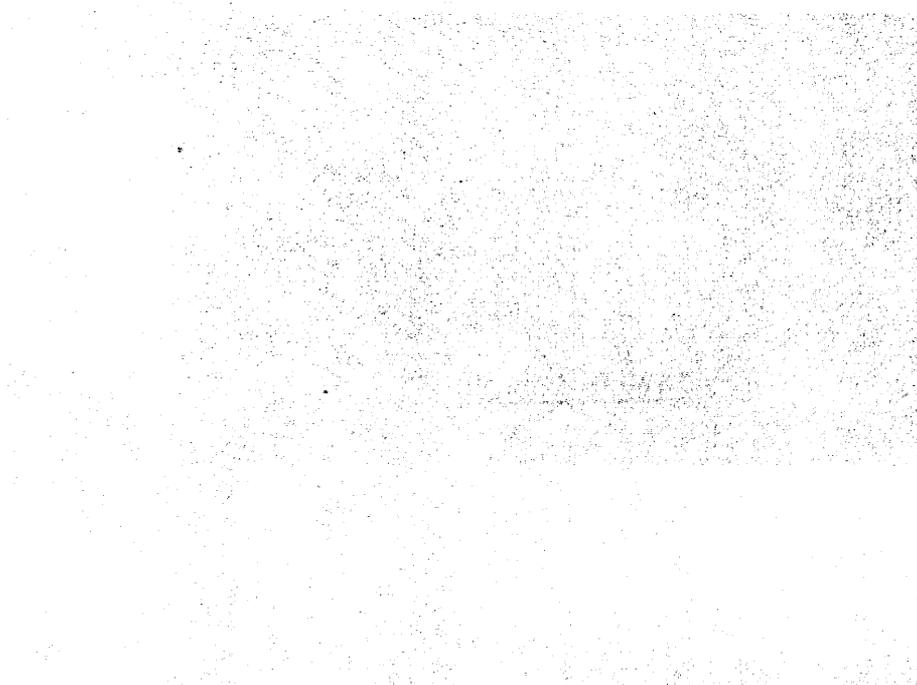
las proporciones de ambas estructuras no sean demasiado grandes. Es, por así decirlo, un parámetro que amplifica \rightarrow las diferencias existentes entre distintos grupos de neuronas en lo que se refiere a la relación existente entre sus nucléolos y su HC asociada. Aparece, por ello, como un índice muy característico de cada población neuronal que puede usarse como parámetro representativo a la hora de establecer comparaciones entre zonas diferentes del cerebro.

La CON es, por el contrario, un parámetro que refleja la relación existente entre el tamaño neuronal y el conjunto de estructuras relacionadas con la organización nucleolar (núcleolo y regiones heterocromáticas asociadas. Dicho de otro modo, la situación conjunta de nucléolo y HCnu dividida por el tamaño celular sería análoga para todas las neuronas de un individuo, independientemente de la relación existente entre HCnu y nucléolo en cada caso (IC). Este parámetro se muestra más representativo, de especie animal, que para establecer valores diferenciales entre poblaciones neuronales distintas. No obstante, aporta, junto con el IC, un nuevo índice a tener en cuenta a la hora de realizar estudios comparativos.

El estudio de estos nuevos parámetros, junto con el de los parámetros celulares clásicos -tamaño celular, nucleolar, morfología neuronal, tipo de ramificaciones, etc.- enriquecerá los análisis comparativos sobre diferentes regiones del cerebro, al mismo tiempo que posibilita el estudio de -

poblaciones neuronales desde un nuevo punto de vista. Estos parámetros significan un nuevo método de análisis neuronal que añadir a todos los que, conjuntamente, podrán llevarnos al esclarecimiento del modo de funcionamiento del Sistema Nervioso.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio acerca de la Heterocromatina neuronal asociada al nucléolo en el cerebro del ratón, y tras la discusión y comentario de los mismos, establecemos las siguientes conclusiones:

- 1^a.- Del estudio diferencial realizado entre la situación que ofrecen el nucléolo neuronal y las masas a él asociadas se deduce, tras el empleo de las diversas técnicas, que tales masas se comportan como Heterocromatina asociada al nucleolo.
- 2^a.- Esta Heterocromatina asociada al nucléolo representa el componente heterocromático más abundante de las neuronas de *Mus musculus*. Es, por el contrario, muy escasa la existencia de estructuras heterocromáticas en forma de cromocentros en el interior del núcleo neuronal.
- 3^a.- La Heterocromatina asociada al nucléolo aparece, más recuentemente, a modo de dos masas alargadas, situadas de manera opuesta sobre la superficie nucleolar. Existe, no obstante, una cierta variabilidad morfológica, con la aparición de configuraciones diversas.
- 4^a.- No se ha encontrado una relación de estas masas de Heterocromatina asociada al nucléolo con el sexo del animal, no tratándose, por tanto, de una cromatina sexual.
- 5^a.- La valocidad de reasociación del DNA constituyente de esta Heterocromatina asociada al nucléolo parece corres

ponder a la de un DNA de tipo repetitivo.

- 6^a.- El comportamiento de esta Heterocromatina asociada al nucléolo frente a la hidrólisis con DNasa, así como ciertas características tintoriales, apoyan la sospecha de la existencia de una cierta cantidad de RNA formando parte de esta estructura heterocromática.
- 7^a.- Los tamaños absolutos de la Heterocromatina asociada al nucléolo son diferentes de unas neuronas a otras, constituyendo la cantidad de esta heterocromatina un parámetro variable característico de cada neurona.
- 8^a.- En la población representada por las células del núcleo del nervio Hipogloso -población de grandes células- la cantidad media de Heterocromatina asociada al nucléolo de sus neuronas es apreciablemente más pequeña que la que posee la población de pequeñas células pertenecientes a las -neuronas del núcleo dorsal del nervio Vago-. Parece existir, por tanto, una cantidad media de Heterocromatina asociada al nucléolo específica de cada población neuronal, cantidad que sería menor cuanto mayor fuera el tamaño medio de las neuronas que integran esa población.
- 9^a.- Dentro de cada población neuronal, existe una correlación inversa bastante estrecha entre los tamaños del nucléolo y de su Heterocromatina asociada; de manera que las neuronas que poseen mayor nucléolo presentan, correlativamente, menor cantidad de Heterocromatina asociada a él, y viceversa.

- 10^a.- Asimismo, hemos encontrado una correlación inversa - entre los valores de la Heterocromatina asociada al nucléolo y el tamaño neuronal, dentro de ambas poblaciones analizadas.
- 11^a.- Para el estudio presente no se puede considerar como significativa la correlación entre el tamaño del núcleo neuronal y la cantidad de Heterocromatina asociada a su nucléolo.
- 12^a.- Las correlaciones encontradas permiten suponer una cierta intervención de la Heterocromatina asociada al nucléolo en la formación de este componente nuclear.
- 13^a.- Cada uno de los nuevos índices establecidos -IC y CON- presenta una distribución de valores característica e independiente (en forma de curva exponencial para el -IC y de curva de Gauss para la CON) en ambas poblaciones analizadas.
- 14^a.- Los valores medios de cada uno de estos índices varían entre ambas poblaciones neuronales analizadas, siendo estos parámetros un índice característico de cada población neuronal, útil en el estudio comparado entre ellas.
- 15^a.- El intervalo de variación de los valores del IC es bastante diferente en las dos poblaciones estudiadas; no ocurriendo lo mismo con los valores de la CON, cuyo intervalo de variación presenta límites muy cercanos en ambas poblaciones neuronales.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA



- AHNSTROM, G y NATARAJAN, A.T. (1974)
Localisation of repetitive DNA mouse cells by in situ hybridization and dye binding techniques.
Hereditas; 76:316.-
- ALONSO, C.(1974)
Hibridacion "in situ" de H³-RNA con el genoma de Drosophila Hydei.
Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias.
- ANDREW, N. y ANDREW, N.L. (1942)
The chromatin content of nerve cells in man in the mouse with special regard to the role of the nucleolus; observation in normal and malnourished specimens.
J. Comp. Neurol; 76: 423.-
- ARIENS KAPPERS, C.V. (1960)
The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man.
Ed. Hafner. New York.
- ARRIGHI, F.E. y HSU, T.C. (1971)
Localization of heterochromatin in human chromosomes
Cytogenetics; 10: 81.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P. y SAUNDERS, G. (1970)
Localization of repetitive DNA in the chromosomes of *Microtus agrestis*
Chromosoma; 32: 224.
- BALSAMO, J.; HIERRO, J.M. y LARA, F.J.S. (1973)
Transcription of repetitive DNA sequences in *Rhynchosciara* salivary glands.
Cell Differ; 2: 119.
- BARR, M.L. y BERTRAM, E.G. (1949)
A morfological distinction between neurons of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoproteins synthesis.
Nature; 163: 676.-

- BARR, M.L. y BERTRAM, E.G. (1951)
 The behaviour of nuclear structures during depletion and restoration of Nissl material in motor neurons.
 J. Anat.; 85: 171.
- BARR, M.L.; BERTRAM, L.F. y LINSAY, H.A. (1950)
 The morphology of the nerve cell nucleus, according to sex.
 Anat. Rec.; 107: 283.
- BEAMS, H.W. (1931)
 Cytological study of the spinal ganglion cells of the rat.
 Ant. Rec.; 49: 309.
- BIRNUSTIEL, M.; SPEIRS, J.; PURDOM, I.; JONES, K.W. y LOENING, V.E. (1968)
 Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite.
 Nature; 219: 454.-
- BONNER, J.; DAHMUS, M.E.; GAMBROUGH, D.; HUANG, R.C.; MARUSHIGE, K. y TUAN, D.Y.H. (1968)
 The biology of isolated chromatin.
 Science; 159: 47.-
- BRITTEN, R.J. y KOHNE, D.E. (1968)
 Repeated sequences in DNA
 Science; 161: 529.
- BRITTEN, R.J. y KOHNE, D.E. (1969)
 Implications of repeated nucleotide sequences.
 in: Handbook of molecular cytology
 ed: Lima-de-Faria. Amsterdam-London pp. 37.-
- BROWN, S.W. (1966)
 Heterochromatin
 Science; 151: 417.
- BROWN, S.W. y NUR, V. (1964)
 Heterochromatic chromosomes in the coccids.
 Science; 145: 130

- BROWN, D.D. y DAWID, I.B. (1968)
Specific gene amplification in oocytes
Science; 160: 272.-
- BRUSA, A. (1950)
A propos de la structure du noyau de la cellule -
nerveuse.
Anat. Anz.; 98:343.-
- CAJAL, S.R. (1896)
Estructura del protoplasma nervioso
Rev. Trim, Micrograf. Año I, fasc. 1.-
- CAJAL, S.R. (1903)
Un sencillo método de coloración selectiva del re-
ticulo protoplasmático y sus efectos en los diver-
sos organos nerviosos de vertebrados e invertebra-
dos.
Trab. Lab. Invest. Biol. Madrid; 2: 129.-
- CAJAL, S.R. (1911)
Histologie du Systeme nerveux de l'homme et des
vertebres.
Ed. Norbert Maloine.
- CASPERSON, J.O. (1950)
Cell growth and cell function
Ed. New York, W.W. Norton.-
- CASPERSSON, T; FABER, S; FOLEY, G.E; KUDYNOWKI, J; MODEST,
E.J.; SIMONSSON, E; WAGH, V y ZECH, L (1968)
Chemical differentiation along metaphase chromoso-
mes.
Exp. Cell Res.; 49: 219.-
- CASPERSSON, T; GAHRTON, G; LINDSTEN, J y ZECH, L (1970)
Identification of the Philadelphia chromosome as
a number 22 by quinacrine mustard fluorescent ana-
lysis.
Exp. Cell. Res.; 63:238.-

- CHAPEVILLE, F. y HAENNI, A.L. (1972)
Biosynthese des proteines. Traduction genetique
Ed. Hermann.
- CHEN, T.R. y RUDDLE, F.H. (1971)
Karyotype analysis utilizing differentially stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes.
Chromosoma; 34: 51.-
- CHURCH, R.B. (1973)
Methods for the study of hybridization and reassociation of nucleic acids extracted from cells of higher animals.
in Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology.
Ed. Maarter J. Chrispeels. John Wiley & Sons.
- CLARK, R.J. y FELSENFELD, G. (1972)
Structure of chromatin
Nature New Biol.; 229: 101.
- COHEN, A.K; HUH, J.Y. y HELLEINER, C.W. (1973)
Transcription of satellite DNA in mouse L-cells.
Can. J. Biochem.; 51: 529
- COMINGS, D.E. (1971)
Heterochromatin of the Indian Muntjac.
Exp. Cell Res.; 67: 441.
- DARLINGTON, C.D. (1937)
Recent advances in cytology.
Ed. Blakiston, Philadelphia;
- DE ROBERTIS, E.D.P; NOWINSKI, W.W. y SAEZ, F.A. (1972)
Biología Celular.
Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
- DE TOMASI, J.A. (1936)
Improving the technic of the Feulgen stain.
Stain Tech.; 11: 137.-

- DIAZ, M. (1972)
Methyl green staining and highly repetitive DNA
in polytene chromosomes.
Chromosoma; 37:131.-
- EINARSEN, L. (1933)
Morphology of chromophil material of nerve cells
and its relation to nuclear substances.
Am. J. Anat.; 53: 141.-
- ELIAS, J.M. (1971)
A simplified and modified methyl green pyronin
stain.
Am. J. Clin. Pathol.; 56: 254.-
- EVANS, D. y BIRNSTIEL, M. (1968)
Localization of amplified ribosomal DNA in the
oocyte of *Xenopus laevis*.
Biochim. Biophys. Acta; 166:274
- FAWCETT, D.W. (1966)
An atlas of fine structure. The Cell. Its organe-
lles and inclusions
Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia and London.
- FLAMM, W.G. (1972)
Highly repetitive sequences of DNA in chromosomes
Int. Rev. Cytol; 31: 1.-
- FLAMM, W.G; WALKER, P.M.B. y McCALLUM, M. (1969)
Some properties of the sigle strands isolated from
the DNA of the nuclear satellite of the mouse (*Mus
musculus*).
J. Molec. Biol.; 40: 423
- FOREJT, J. (1973)
Centromeric heterochomatin polymorphism in the hou-
se mouse. Evidence from imbred strains and natural
populations.
Chromosoma; 43: 187.-

- FRACCARO, M; GUSTVSSON, I; HULTEN, M.; LINDSTEN, J.; MANINI, A. y TIEPOLO, L. (1965)
DNA replication patterns of canine chromosomes in vivo and in vitro.
Hereditas; 52: 265.-
- FRENSTER, J.M. (1965)
Ultrastructural continuity between active and repressed chromatin.
Nature; 205: 1341.-
- FRENSTER, J.M. (1965)
Nuclear polyanions as de-repressor of synthesis of ribonucleic acid.
Nature; 206: 680.
- FRENSTER, J.M. (1965)
Mechanisms of repression and de-repression within interphase chromatin.
in: The Chromosomes: structural and functional aspects.
Eds C.J. Dawe y G. Yerganian. Baltimore, Williams and Wilkens Co., Inc. pág. 78-101.-
- FRENSTER, J.M.; ALLFREY, V.G. y MIRSKY, A.E. (1963)
Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 50: 1026.-
- GAGNE, R; TAUGNAY, R. y LABERGE, C. (1971)
Differential staining patterns of heterochromatin in man.
Nature New Biol.; 232: 29.-
- GALL, J.G. (1966)
Chromosome fibers structured by a spreading technique
Chromosoma; 20: 221.
- GALL, J.G. (1969)
The genes for ribosomal RNA during oögenesis.
Genetics; 61: 121.-

- GALTON, M; BENIRSCHKE, K. y OHNO, S. (1965)
Sex chromosomes of the chinchilla: allocyclic and duplication sequence in somatic cells and behaviour in meiosis.
Chromosoma; 16: 668.-
- GRAHAM, M.A. y BARR, M.L. (1952)
A sex difference in the morphology of metabolic nuclei in somatic cells of the cat.
Anat. Rec.; 112: 709.-
- GROPP, A. y CITOLER, P. (1970)
Vergleichende untersuchungen über heterochromatische strukturen des interphasekerns.
Verh. Anat. Ges.; 64: 57.-
- GROSSMAN, I; LEIRNE, S.S. y ALLISON, W.S. (1961)
The reaction of formaldehyde with nucleotides and T2 bacteriophage DNA.
J. Mol. Biol.; 3: 47.-
- GRUMBACH, M.M; MORISHIMA, A. y TAYLOR, J.H. (1963)
Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 49: 581.-
- HAREL, J; HANANIA, N.; TAPIERO, H.; y HAREL, L. (1968)
RNA replication by nuclear satellite DNA in different mouse cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 33: 696.-
- HEITZ, E. (1928)
Das heterochromatin der Moose.
Jahrb. Wiss. Bot.; 69: 762.-
- HEITZ, E (1931)
Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen.
Planta; 12: 775.

- HEITZ, E. (1933)
Die somatische Heterophyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung.
A. Zelfforsch.; 20: 237.-
- HEITZ, E. (1934)
Über und -heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei *Drosophila*.
Biol. Zbl.; 54: 588.-
- HEITZ, E. (1935)
Chromosomenstruktur und Gene.
Z. Ind. Abst. Vererbgsst.; 70: 402.-
- HEITZ, E. (1956)
in: Chromosomes
Ed: Tjeenk, Willink, Zwolle. Netherlands. pag. 5.
- HILWIG, I. y GROPP, A. (1973)
Decondensation of constitutive heterochromatin in L cell chromosomes by a benzimidazole compound ("33258 Hoechst").
Exptl. Cell Res.; 81: 474
- HOEHN, H y MARTIN, G.M. (1973)
Clonal variants of constitutive heterochromatin of human fibroblasts after recovery from Mitomycin treatment.
Chromosoma, 43: 203.-
- HSU, T.C. (1962)
Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin.
Exptl. Cell Res.; 27: 332.-
- HSU, T.C. y ARRIGHI, F.E. (1971)
Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes.
Chromosoma; 34: 243.-

- HSU, T.C.; COOPER, J.E.K.; MACE, M.L. Lr. y BRINKLEY, B.R.
(1971)
Arrangement of centromeres in mouse cells.
Chromosoma; 34: 73.-
- IORIO, R.J. y WYANDT, H.E. (1973)
Quinacrine studies of sex chromatin and nucleoli
in human brain.
Humangenetik; 20: 329.-
- JAWORSKA, H. y LIMA-DE-FARIA, A., (1973)
Amplification of ribosomal DNA in Aceta. VI. Ul-
trastructure of two types of nucleolar components
associated with ribosomal DNA.
Hereditas; 74: 169.
- JOHN, H.A.; BIRNSTIEL, M.L. y JONES, K.W. (1969)
RNA-DNA hybrids at the cytological level.
Nature; 223: 582.
- JONES, K.W. (1970)
Chromosomal and nuclear location of mouse satelli-
te DNA in individual cells.
Nature; 225:912.-
- JONES, K.W. y CORNEO, G. (1971)
Location of satellite and homogeneous DNA sequences
on human chromosomes.
Nature New Biol.; 233: 268
- KARNKOWSKA-GORSKA, w (1960)
Incorporation of tritium labelled thymidine into
the spinning glands of the silk worm *Bombyx mori* L.
Bulletin Acad. Pol. Sci.; 8: 353.-
- KAYE, J.S. y McMASTER-KAYE, R. (1966)
The fine structure and chemical composition of nu-
clei during spermiogenesis in the house cricket.
I. Initial stages of differentiation and the loss
of nonhistone proteins.
J. Cells. Biol.; 31: 159.-

- KEDES, L.H. y BIRNSTIEL, M.L. (1971)
Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messenger RNA.
Nature New Biol.; 230: 165.-
- KELLERMAYER, N. y KELLERMA, N. (1971)
Perinucleolar chromatin-like bodies in small lymphocytes.
Folia Biol.; 17: 59.-
- KIEFER, R; KIEFER, G; SALM, R.; ROSSNER, R. y SANDRITTER, W. (1973)
A method for the quantitative evaluation of Eu- and Heterochromatin in Interphase nuclei using cytophotometry and pattern analysis.
Beitr. Pathol.; 150: 163.-
- KIM, M.A. (1974)
Identification and characterization of heterochromatin regions in the human metaphase and interphase nucleus.
Humangenetik; 21: 331
- KURNICK, N.B. (1947)
Discussion
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.; 12: 141.-
- KURNICK, N.B. (1952)
The basis for the specificity of methyl green staining.
Exp. Cell Res.; 3: 649.-
- LEE, J.C. y YUNIS, J.J. (1971)
Cytological variations in the constitutive heterochromatin of *Microtus agrestis*.
Chromosoma; 35: 117.-
- LEVAN, A; HSU, T.C. y STICH, H.F. (1962)
The Idiogram of the mouse
Hereditas; 48: 677.-

- LEVI, G. (1896)
Su alcune particolarit  di struttura del nucleo
delle cellule nervose.
Rev. di Patol. nervosa e mentale; vol.I.fas.4:141.
- LIMA-DE-FARIA, A. (1950)
The chromosomes of secale cereale at pachytene
Proc. Seventh Int. Bot. Congre. Pag. 217
- LIMA-DE-FARIA, A. (1959)
Differential uptake of tritiated thymidine into
hetero- and euchoratin in Melanoplus and secale.
J. Biophys. Biochem. Cytol; 6: 457.-
- LIMA-de-FARIA, A. (1961)
Initiation of DNA synthesis at specific segments
in the meiotic chromosomes of Melanoplus.
Hereditas; 47: 674
- LIMA-DE-FARIA, A. (1969)
DNA replication and gene amplification in heterochroma
matin
in: Handbook of Molecular cytology
ed: Lima-de-Faria, Amsterdam-London. pag. 277.
- LIMA-DE-FARIA, A.; BIRNSTIEL, M.L. y JAWORSKA, A. (1969)
Amplification of ribosomal cistrons in the hetero-
chromatin of Acheta.
Genetics; Suppl. 61: 145
- LIMA-DE-FARIA, A. y JAWORSKA, H. (1968)
Late DNA synthesis in heterochromatin
Nature; 217: 138.-
- LIMA-DE-FARIA, A.; JAWORSKA, H. y GUSTAFSSON, T. (1973)
Release of amplified ribosomal DNA from the chromo-
meres of Acheta.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA; 70: 80.-
- LIMA-DE-FARIA, A. y MOSES, M.J. (1966)
Ultrastructure and cytochemistry of metabolic DNA
in Tipula.
J. Cell Biol.; 30: 177.-

- LIMA-DE-FARIA, A; NILSSON, B.; CAVE, D.; PUGA, A. y JAWORSKA, H. (1968)
Tritium labelling and cytochemistry of extra DNA in Acheta.
Chromosoma; 25: 1.-
- LYNDSAY, H.A. y BARR, M.L. (1955)
Further observations on the behaviour of nuclear structures during depletion and restoration of Nissl material.
J. Anat.; 89, 47.
- LITTAU, V.C.; ALLFREY, V.G.; FRENSTER, J.H. y MIRSKY, A.E. (1964)
Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope auto-radio-graphy.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 52: 93.
- LITTAU, V.C.; BURDICK, C.J.; ALLFREY, V.G. y MIRSKY, A.E. (1965)
The role of histones in the maintenance of chromatin structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 54: 1204.-
- LOMHOTL, B. y MOHR, J. (1971)
Human karyotyping by Heat-Giemsa staining and comparison with Fluorochrome techniques.
Nature. New Biol.; 234: 109.
- LYON, M. (1966)
The sex chromatin.
Ed. K.L. Moore. W.B. Saunders, Philadelphia. 370.
- MAHER, E.P. y FOX, D.P. (1973)
Multiplicity of ribosomal RNA genes in vicia species with different nuclear DNA contents.
Nature New Biol.; 245: 170.
- MALVA, C.; GRAZIANI, F.; BONCIENELLI, F; POLITO, L. y ROTOSSA, F. (1972).
Check of gene number during the process of rDNA magnification.
Nature New Biol.; 239: 135.-

- MARINESCO, G. (1905)
 Recherches sur le noyau et le nucleole de la cellule nerveuse.
 Jour. Jur. Psychol. and Neuro.; vol. V; 364.
- MITTWOCH, V. (1967)
 Sex chromosomes
 Ed: New York. Academic Press Inc.
- MOHAN, J. y FLAWELL, R.B. (1974)
 Ribosomal RNA cistron multiplicity and nucleolar organizers in hexaploid wheat.
 Genetics; 76: 33.-
- MOORE, K.L. y BARR, M.L. (1953)
 Morphology of the nerve cell nucleus in mammals with special reference to the sex chromatin.
 J. comp. Neurol.; 98: 213.
- MUKHERJEE, A.B; BLATTNER, P.Y.; y NITOWSKY, N.M. (1972)
 Quinacrine mustard fluorescence of sex chromatin in human amniotic fluid cell cultures
 Nature; 235: 226.-
- MYLLE, M. y GRAHAM, M.A. (1954)
 Sex chromatin in neurons of human frontal cortex and sympathetic ganglia.
 Anat. Rec.; 118: 402.-
- NADLER, F.C. (1969)
 in: Comparative Mammalian Cytogenetics.
 Ed: JK. Benirschke. Springer-Verlag, New York, 227
- NATARAJAN, A.T. y RAPOSA, T. (1974)
 Repetitive DNA and constitutive heterochromatin in the chromosomes of ginea pig.
 Hereditas; 76: 145.
- NATARAJAN, A.T. y SHARMA, R.P. (1971)
 Tritiated uridine induced chromosome aberrations in relation to heterochromatin and nucleolar organisation in *Microtus agrestis*.
 Chromosoma; 34: 168.

- OHNO, S.; KAPLAN, W.D. y KINOSITA, R. (1957)
Heterochromatic regions and nucleolus organizers
in chromosomes of the mouse, *Mus musculus*
Exp. Cell Res.; 13: 358.
- OLSON, K. y DIESKOW, D.A. (1965)
End-point Buffered staining with Thionin
in: *Staining Procedures*.
Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- PAPPENHEIM, A. (1899)
Vergleichende Untersuchungen über die elementare
Zusammensetzung des rothen Knochenmarkes einige
Säugethiere.
Virchow Arch. f. path. Anat.; 157: 19.
- PARDUE, M.L., y GALL, J.G. (1970)
Chromosome localization of mouse satellite DNA
Science; 168: 1356.
- PATIL, S.R.; MERRICK, S. y LUBS, H.A. (1971)
Identification of each human chromosome with a modified
Giemsa stain.
Science; 173: 821.
- PEARSE, A.G.E. (1960)
Histoquímica teórica y aplicada.
Ed. Aguilar, Madrid.
- PEARSON, P.L. (1970)
A fluorescent technique for identifying human chromatin
in a variety of tissues.
Bull European Soc. Human Genetics; 4: 35.
- PEARSON, P.L.; BOBROW, M.; VOSA, C.G. y BARLOW, P.W. (1971)
Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes.
Nature; 231: 326.-
- PELC, S.R. y LA COUR, L.F. (1960)
Some aspects of replication in chromosomes in the
cell nucleus.
Ed. J.S. Mitchell. London. Butterworth and Co. 232.

- PRINCE, R.H.; GRAHAM, M.A. y BARR, M.L. (1955)
Nuclear morphology, according to sex, in *Macacus rhesus*.
Anat. Rec.; 122: 153.
- RAE, P.M.M. y FRANKE, W.W. (1972)
The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin in mouse nuclei.
Chromosoma; 39: 443.
- ROSE, H.G. y FRENSTER, J.H. (1965)
Composition and metabolism of lipids within repressed and active chromatin of interphase lymphocytes.
Biochim. Biophys. Acta; 106: 577.
- ROSENKRAUZ, H.S. y BENDICH, A. (1958)
On the nature of the deoxyribonucleic acid methyl green reaction.
J. Biophys. Biochem. Cytol.; 4: 663.
- ROWDLEY, J.D. y BODMER, W.F. (1971)
Relationship of Centromeric Heterochromatin to -- Fluorescent Banding Patterns of Metaphase Chromosomes in the Mouse.
Nature; 231: 503.
- RUCH, F. y ROSSELET, A. (1970)
A cytochemical study of euchromatin and heterochromatin in roots of *Rhoeo discolor*.
Exp. Cell Res.; 62: 219.
- SAUNDERS, G.F.; HSU, T.C.; GETZ, M.J.; SIMES, E.L. y ARRIGHI, F.E. (1972)
Locations of a human satellite DNA in human chromosomes.
Nature. New Biol.; 236: 244.
- SCHILDKRAUT, C.L. y MAIO, J.J.
Studies on the intranuclear distribution and properties of mouse satellite DNA.
Biochim. Biophys. Acta; 161: 76

- SCHMID, W. (1967)
Heterochromatin in mammals.
Arch. Klaus-Stiff. Vererb. Forsch.; 42: 1
- SCHNEDL, W. (1971)
Analysis of human karyotype using a reassociation technique.
Chromosoma; 34: 448
- SCHNEIDER, E.; HENKAMP, V. y PERA, F. (1973)
Loss of heteropycnosis of the constitutive heterochromatin in specifically activated cells of the thyroid gland of *Microtus. agrestis*.
Chromosoma; 41: 167.
- SCHULTZ, J. (1947)
The nature of heterochromatin
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.; 12: 179.
- SCOTT, J.E. (1967)
On the mechanism of the methyl green-pyronin stain for nucleic acids.
Histochemie; 9: 30.-
- SINCLAIR, J.H.; CARROLL, C.R. y HUMPHREY, R.R. (1974)
Variation in rRNA redundancy level and nucleolar organizer length in normal and variant lines of the Mexican Axolotl.
J. Cell Sci.; 15: 239.
- STAHL, A.; LUCIANI, J.M.; DEVICTOR, M.; CAPODANO, A.M. y GAGNE, R. (1975)
Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage.
Humangenetik; 26: 315.
- STEFOS, K. y ARRIGHI, F.E. (1974)
Repetitive DNA of *Gallus domesticus* and its cytological locations.
Exp. Cell Res.; 83: 143.

- SUMMER, A.T.; EVANS, H.J. y BUCKLAND, R.A. (1971)
New Technique for Distinguishing between human
Chromosomes.
Nature. New Biol.; 232: 31.-
- TAYLOR, J.H. (1960)
Asynchronous duplication of chromosomes in cultured
cells of Chinese hamster.
J. Biophys. Biochem. Cytol.; 7: 455.-
- THOMAS, R. (1953)
La reaction des acides desoxyribonucleiques et du
virus de la mosaïque du tabac avec le vert de me-
thyl et la pyronine.
Arch. int. Physiol.; 6: 270.-
- THOMAS, R. (1962)
Recherches sur la structure et les tinctions des
acides desoxyribonucleiques. Etude genetiques et
chimiques.
Actualites biochimiques; 21: 1.-
- THOMPSON, B.K.; HAGGAR, R.A.; BARR, H.L. (1957)
The accesory body of Cajal in nerve cell nuclei of
the cat.
J. Comp. Neurol.; 108: 253.-
- TIEPOLO, L.; FRACCARO, M.; HULTEN, M.; LINDSTEN, J.; MANNINI,
A. y PEN-MIND, L.M. (1967)
Timing of sex chromosome replication in somatic and
germ-line cells of the mouse and the rat.
Cytogenetics; 6: 51.-
- VARGER-CAPODANO, A.M. y STAHL, A. (1974)
Size correlation between heterochromatin and nucleo-
lus during intephase in the quail, *Coturnix coturnix*
japonica.
Experientia; 30: 277.
- VICENT, W.S.; HALVERSON, H.O.; CHEN, H.R. y SHIN, D. (1969)
A comparison of ribosomal gene amplification in uni-
and multinucleolated oocytes.
Exp. Cell Res.; 57: 240.

- VON LENHOSSEK. (1897)
 Veber den Bau der Spinal ganglienzellen des men-
 chen.
 Arch. fur Psychiatr.; Bd. XXIX; 2.
- VOSA, C.N. (1970)
 Heterochromatin Recognition with Fluorochromes.
 Chromosoma; 30: 366
- WALKER, P.M.B. (1968)
 How different are the DNAs from related animals?
 Nature.; 219: 228.
- WALKER, P.M.B. FLAMM, W.G. y Mc LAREN, A. (1969)
 Highly repetitive DNA in rodents in:
 in: Handbook of molecular cytology
 Ed: Lima-de-Faria. Amsterdam-Londo: 53.
- WEBER, F. (1971)
 Korrelierte formveränderungen von nukleolus und
 nukleolusassoziiertem heterochromatin bei der ga-
 ttung Carabus (Coleoptera)
 Chromosoma; 34: 261.
- WELLAUER, P.K.; REEDER, R.H.; CARROLL, D.; BROWN, D.D.; DEUTCH,
 A.; HIGASHINAKAGAWA, T. y DAWID, I.B. (1974)
 Amplified ribosomal DNA from *Xenopus laevis* has he-
 terogeneous spacer lengths.
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 2823.-
- WHITE, M.J.D. (1945)
 Animal cytology and Evolution.
 London and New York, Cambridge. University Press.
- WOLFE, S.L. y J.N. GRIM. (1967)
 The relationship of isolated chromosome fibers to
 the fibers of the embedded nucleus.
 J. Ultrastruct. Res.; 19: 382.
- WOODARD, J.; GOROWSKY, M. y SWIFT, H. (1966)
 DNA content of a chromosome of *Trillium erectum*:
 effects of cold treatment.
 Science; 151: 215.

- WOODARD, J. y SWIFF, M. (1964)
The DNA content of cold treated chromosomes.
Exptl. Cell Res.; 34: 131.
- YASMINEH, W.G. (1971)
Satellite DNA in calf heterochromatin
Exp. Cell Res.; 64: 41.
- YASMINEH, W.G. y YUNIS, J.J. (1969)
Satellite DNA in mouse autosomal heterochromatin
Biochem, Biophys. Res. Commun.; 35: 779.
- YASMINEH, W.G. y YUNIS, J.J. (1970)
Localization of mouse satellite DNA in constitutive
heterochromatin.
Exptl. Cell Res.; 59: 69.
- YUNNIS, J.J.; YASMINEH, W.G. (1970)
Satellite DNA in constitutive heterochromatin of -
ginea pig.
Science; 168: 263.
- YUNIS, J.J. y YASMINEH, W.G. (1971)
Heterochromatin, Satellite DNA and Cell Function.
Science; 174: 1200.