

Estructura y función de los cromosomas plumulados

por

Ana Mercedes Espinoza*, Pedro E. León*, Gabriel Macaya*,
Ana Lucía Fuentes* y José María Gutiérrez**.

(Recibido para su publicación el 18 de enero de 1980)

Abstract: In this paper we review recent work on the structure of chromomeres and loops in lampbrush chromosomes, and we discuss several of the hypotheses that attempt to explain lampbrush function. Regarding lampbrush structure the following conclusions are reached: many, but not all loops probably represent transcription units, involving both unique and repeated sequences. Lampbrush chromomeres evidently contain more than one cistron and cannot be equated with polytene bands. The questions now raised address the functional or developmental relationships that may occur among the cistrons in individual chromomeres. In addition, each chromomere could conceivably contain similar repetitious DNA sequences as previously proposed by others or merely sequences with similar base ratios.

Concerning lampbrush chromosome function, we discuss Master-Slave, several reprogramming hypotheses and Cavalier-Smith's recent proposal. *In situ* hybridization autoradiographs of labelled DNA to nascent RNA in lampbrush loops indicate that loops are static structures with at least one promoter and that processing begins within the loop. This observation, along with the predominance of single copy sequences in transcripts, precludes the need for a corrector mechanism.

Reprogramming hypotheses implicitly view development as an algorithm with a temporal component which requires an initial reprogramming event or preprogramming. The mechanism may involve the transfer of information that later participates in cellular differentiation to localized regions in the cytoplasm.

Changes at the level of the chromatin fiber remain a possibility, but under a static loop model could only involve a small fraction of the total chromatin. The Cavalier-Smith proposal makes some interesting predictions that may resolve the C-value paradox. Concerning lampbrush chromosome structure the requirement of nucleoskeletal RNA predicts the intense transcription of untranslatable sequences but does not clearly tie this meiotic stage with embryogenesis.

En los ovocitos de anfibios y de muchas otras especies animales (incluyendo el hombre) ocurren transformaciones extraordinarias durante la primera profase meiótica (Callan, 1956, 1963; Davidson, 1968; Macgregor, 1977). El ovocito au-

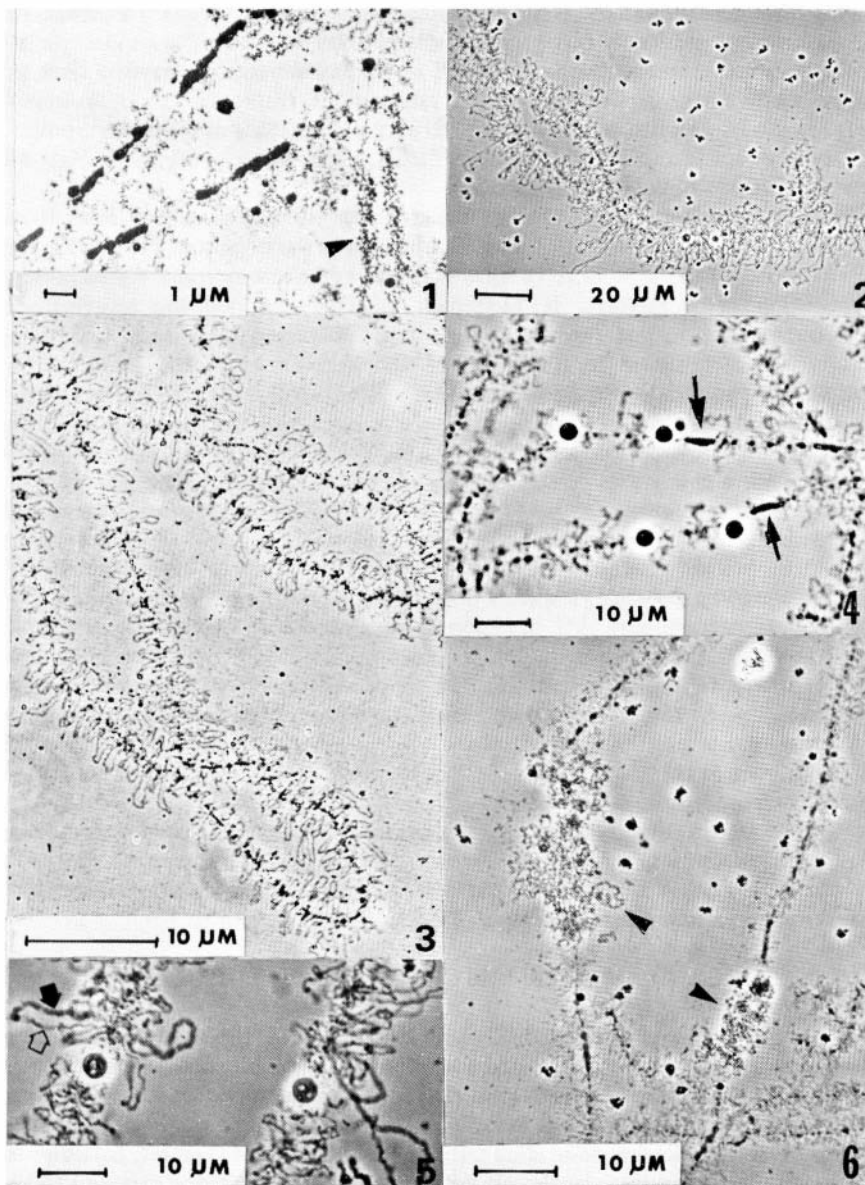
* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.
** Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

menta notablemente de tamaño y entra en una fase de síntesis intensa de sustancias necesarias para la embiogénesis temprana (Davidson, 1968; Denis, 1968; Kedes *et al.*, 1972; Macgregor, 1977). Además, los cromosomas diploténicos, localizados dentro de un núcleo gigantesco, adquieren forma plumulada, pudiendo aislarse manualmente y verse al microscopio de luz con contraste de fases (Callan & Lloyd, 1960, Macgregor, 1977) o al microscopio electrónico (Miller *et al.*, 1970; Mott y Callan, 1975; Figs. 1 y 2).

Los cromosomas plumulados son típicos del diplotene con las dos cromátidas sostenidas en los quiasmas. Cada cromátida presenta una fibra de desoxiribonucleoproteína (DNP) que a intervalos regulares se arrolla sobre sí para dar origen a los cromómeros (Callan, 1963; Bishop, 1977; Macgregor, 1977, 1980). A cada cromómero se asocian dos o un múltiplo de dos asas (Fig. 3) de longitud variable que en la vitelogénesis temprana de salamandras alcanzan un tamaño de 5 a 100 μm . Los centrómeros y telómeros por lo general no presentan asas (Fig. 4; Callan, 1963; Macgregor, 1977; Kezer *et al.*, 1980). Cuando se separa un cromómero mediante tensión mecánica se rompe en dos mitades las cuales quedan unidas por dos asas formando un puente doble (Callan, 1963). Algunas observaciones indican que una sola fibra desoxiribonucleoprotéica (DNPica) se extiende desde una punta a otra de cada cromátida (Gall, 1963; Kavenoff *et al.*, 1973). Se cree que el cromómero se mantiene unido por fuerzas secundarias (Bishop, 1977) y a través de puentes disulfuro (Hill *et al.*, 1973).

Las asas por lo general son asimétricas, ya que muestran diferente grosor en los sitios de inserción en el cromómero (Callan, 1963). Frecuentemente tienen una inserción fina que se ensancha en forma gradual (Fig. 5). Se ha visto que algunas asas gigantes presentan una secuencia característica en cuanto al período de máxima extensión durante la ovogénesis (Callan y Lloyd, 1960; Callan, 1963).

- Fig. 1. Corte fino de parte de un cromosoma plumulado del tritón *Taricha granulosa*, preparado según Kezer *et al.*, (1980) y visto al microscopio electrónico. La flecha indica la posición de un asa gigante que sale del campo.
- Fig. 2. Cromosoma plumulado visto con microscopía de contraste de fases, sin tinción. Las dos cromátidas son sostenidas en los sitios de quiasmas y cerca del centro del bivalente se presentan dos esferas que permiten identificar este cromosoma como el número 13 en la salamandra *Ambystona macrodactylum*. Los gránulos libres son nucleolos extracromosómicos.
- Fig. 3. Cromosomas plumulados de *B. subpalmata* centrifugados en una cámara circular con un vidrio cubreobjetos de fondo y observado por contraste de fases. De esta forma se obtienen las asas en un mismo plano.
- Fig. 4. Fotografía por contraste de fases de parte de un cromosoma plumulado que presenta dos esferas a la par de cada centrómero (flechas). Nótese la ausencia de asas en el centrómero. Cortesía del Dr. James Kezer.
- Fig. 5. Ampliación que permite observar asas grandes con una inserción fina (flecha abierta) y una inserción gruesa (flecha sólida). En un locus adyacente se presenta una esfera.
- Fig. 6. Parte de un bivalente con una región de asas granulares (flechas) fotografiado con microscopía de contraste de fases. Cortesía del Dr. James Kezer.



Una actividad de los cromosomas plumulados que los distingue de otros cromosomas diploténicos es la intensa transcripción llevada a cabo en las asas. (Gall y Callan, 1962; Snow y Callan, 1969). En general cada asa representa una unidad de transcripción aunque en ciertas asas existe variación en la morfología de los complejos ribonucleoprotéicos (RNPIcos) (Angelier y Lacroix, 1975). La posición fija de algunas asas grandes y otros marcadores permite en muchos casos identificar sin ambigüedad al cromosoma en cuestión (Fig. 5). Sin embargo, la mayoría tiene similitud entre ellas, particularmente en salamandras tropicales como *Bolitoglossa* (Fig. 3). Se ha descrito también otras estructuras asociadas al eje de las cromátidas como los gránulos axiales, y las esferas, (Callan, 1963, Kezer *et al.*, 1980, Figs. 4-7) cuyo significado biológico se desconoce.

Los espermatoцитos de algunos insectos presentan durante la primera división meiótica cromosomas similares a los plumulados de los ovocitos (Hess, 1973; Keyl, 1975). En *Drosophila* se observa unas pocas asas en el cromosoma Y y su presencia se relaciona con factores de fertilidad. Se ha visto que los espermatoцитos de diversos organismos presentan una etapa de cromatina difusa, que se cree resulta al desenrollarse la fibra DNPIca fuertemente empacada en los cromómeros del paquitene (Ris, 1945; Kezer y Macgregor, 1971; Klaterská, 1978). Se ha notado la similitud en la estructura y secuencia de aparición de la "etapa difusa" en los espermatoцитos de los machos y la etapa de cromosomas plumulados. Sin embargo, se desconoce en detalle las transformaciones previas al diplotene plumulado; por esto se hace difícil establecer homologías entre estas dos etapas. La secuencia de las transformaciones profásicas se puede estudiar solamente en los machos de aquellos organismos cuyos procesos meióticos presentan algún tipo de sincronía natural, ya que es difícil distinguir entre la "etapa difusa", el leptotene y el preleptotene. Tal situación la presentan los testículos de salamandra, que ha permitido demostrar que en los cromosomas de la etapa difusa se incorpora gran cantidad de uridina tritiada (Fig. 8). Parece entonces que en esta etapa ocurre una transcripción muy intensa como en la etapa plumulada del ovocito. Sin embargo aún no existen estudios cuantitativos sobre los niveles endógenos de nucleótidos en las diferentes etapas de la meiosis, por lo que la suposición anterior debe tomarse con cautela.

Otro hecho interesante es que 5 géneros de salamandras presentan cromosomas supernumerarios, que también asumen forma plumulada pero no parecen ser indispensables desde el punto de vista del desarrollo normal y no tienen consecuencias fenotípicas conocidas (Macgregor, 1977).

ORGANIZACION DE LOS CROMOSOMAS PLUMULADOS

De los primeros estudios de Callan (1967) surgió la hipótesis de "extensión y retracción polarizada" que intentaba explicar la organización del complejo asa-cromómero. Se basaba en observaciones como la asimetría de las asas, la existencia de una relación inversa entre el tamaño del cromómero y la longitud de éstas y la incorporación asimétrica de uridina tritiada en algunas asas gigantes. Esta hipótesis proponía que durante la ovogénesis los cromosomas plumulados exponen todo su ADN mediante el desenrollarse progresivo del asa por una de las inserciones, y su retracción por la otra, hasta que se transcribe la totalidad del ADN contenido en el cromómero. Según esta hipótesis las asas aumentan de longitud cuando su velocidad de extensión es mayor que la de retracción, mantienen su talla constante cuando se igualan ambas velocidades y disminuyen de tamaño cuando la tasa de retracción es

mayor que la de extensión (Callan, 1963). Los resultados obtenidos por el grupo de Callan (Old *et al.*, 1977) indican que las asas no se extienden y retraen, sino que son estáticas al menos en su inserción fina.

Los estudios recientes de Sommerville y Malcolm (1976) y Old *et al.*, (1977) favorecen otro modelo para explicar la organización del par asa-cromómero. Dicho modelo supone que el promotor de la transcripción se encuentra en la inserción fina y que hacia la inserción gruesa se produce la transcripción de moléculas de ARN progresivamente más largas.

Las asas: Con base en las consideraciones anteriores surgen varias preguntas: ¿cuáles son las secuencias de ADN presentes en las asas en relación a las que permanecen en el cromómero? ¿qué función cumplen las secuencias transcritas? ¿cuál es la organización de la fibra de DNP en relación a las histonas y a las proteínas ácidas del núcleo?

En relación con esta última pregunta existen pruebas que la fibra de DNP en éstos, como en otros cromosomas, presenta el arreglo típico de "rosario" en que a cada cuenta se le llama un nucleosoma (Fig. 9).

En los nucleosomas cuatro de las cinco histonas se asocian con 140 pares de bases en tetrámeros, dos de estos formarán el octómero que constituirá cada una de las cuentas del rosario (Olins y Olins, 1974, Kornberg, 1974; Oudet *et al.*, 1975). Además se ha observado por microscopía electrónica estructuras supranucleosomales en núcleos aislados de ovocitos (Fig. 10) que posiblemente contienen 8 nucleosomas y otras proteínas (Hozier *et al.*, 1977; Scheer y Zentgraf, 1978). Algunas proteínas ácidas del núcleo aparentemente participan en la estabilización de los nucleosomas y supranucleosomas. Aparentemente hay nucleosomas de conformación diferente en la fibra DNPica en transcripción (Flint y Weintraub, 1977).

Se ha descrito al menos cuatro tipos de ADN en los cromosomas de organismos eucarióticos, que toman en cuenta el grado de repetición de las secuencias y su tamaño y función (Britten y Kohn, 1968; Davidson *et al.*, 1975; Hood *et al.*, 1975). La primera de las cuatro clases es el ADN satélite, altamente repetido, de localización centromérica, no transcrito, y variable en cuanto a la longitud de su secuencia unitaria, aunque con frecuencia se repite un motivo corto de 6 a 14 nucleótidos. La segunda clase son las secuencias únicas que se cree incluyen los genes estructurales y cuyos productos de transcripción se traducen a polipéptidos funcionales. El tercer tipo lo constituyen algunos genes estructurales como los de las histonas y los genes de los ARN ribosomales y de transferencia, presentes de varios a cientos de veces en el genoma, por lo cual se consideran como ADN repetido funcional. La cuarta categoría incluye una clase muy grande de secuencias llamadas secuencias intermedias o de mediana repetición, que probablemente no tienen una función desde el punto de vista transcriptivo-tractivo pues se aísla poco ARN complementario a ellas. Además, divergen rápidamente durante la especiación y contienen sólo de 200 a 500 pares de nucleótidos. Mizuno y Macgregor (1974) estiman que cerca del 50% del genoma de la salamandra *Plethodon cinereus* y el 80% del genoma de *P. vehiculum* consiste de secuencias de mediana repetición. Dicha fracción representa del 90 al 95% del genoma del tritón *Triturus cristatus* (Rosbach y Ford, 1974)

También se ha descrito varios tipos de organización de las secuencias de ADN en diferentes organismos eucarióticos (Davidson *et al.*, 1973). Uno de estos lo caracteriza el ADN de *Xenopus* y consiste en la alternancia de secuencias repetidas y secuencias únicas. Las secuencias únicas tienen una longitud de 800 a 1.500 pares de nucleótidos y los elementos repetidos, aproximadamente 300 pares. El otro patrón

lo tipifica *Drosophila* y difiere del anterior en que las secuencias repetidas intercaladas forman bloques de 1.500 pares de nucleótidos en promedio y sólo el 10% de las secuencias repetidas tienen menos de 500 pares. Además, los elementos en simple copia se extienden al menos 10.000 pares de nucleótidos sin ser interrumpidos por secuencias repetidas. Estudios posteriores que incluyen diversos organismos eucarióticos, parecen indicar que existe toda una gradación entre los tipos de organización presentes en *Xenopus* y *Drosophila* (Davidson *et al.*, 1973; G. Macaya, datos no publicados).

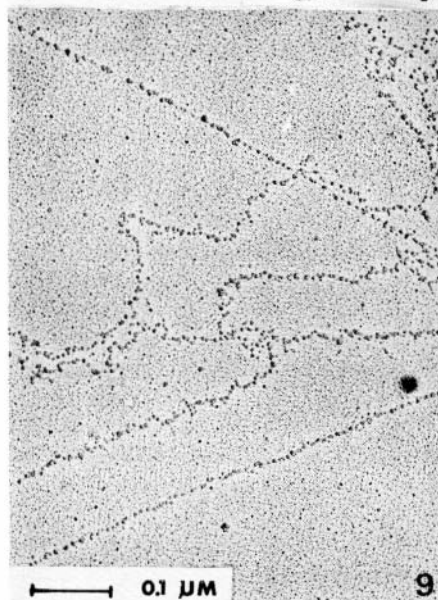
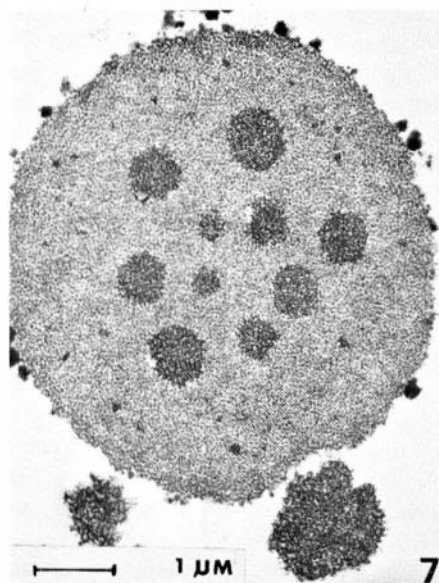
En los anfibios de las subclases Anura y Urodela, se ha encontrado especies cercanas que varían mucho en su valor C o sea la cantidad de ADN por núcleo haploide (Morescalchi, 1973; Mizuno y Macgregor, 1974; Sommerville y Malcolm, 1976; Baldari y Amaldi, 1977). Estas diferencias se deben a la gran variabilidad en la cantidad de secuencias de mediana repetición (Mizuno y Macgregor, 1974; Baldari y Amaldi, 1977).

Los datos de cinética de reasociación indican que el porcentaje de ADN de mediana repetición aumenta al incrementarse el valor C. Sin embargo, al comparar las dos subclases entre sí Baldari y Amaldi (1977) encontraron que la diferencia en el contenido de ADN concierne a todos los tipos de secuencias, tanto las repetidas como las únicas. Se supone entonces que tanto las secuencias únicas como las de repetición intermedia divergen con el tiempo, aunque estas últimas lo hacen más rápidamente. Es probable que la duplicación de secuencias y su posterior divergencia hayan sido eventos de gran importancia en la evolución de los eucariones (Ohno, 1970).

Estas cuatro clases de ADN aparentemente pueden formar parte de las asas, aunque en proporciones diferentes. El ADN satélite se concentra alrededor de los centrómeros, y por lo general forma cromómeros sin asas (Fig. 6). Sin embargo, existen algunas secuencias tipo satélite que sí se transcriben dando origen a asas (Gould *et al.*, 1976; Hartley y Callan, 1978; Varley *et al.*, 1980).

Algunas secuencias funcionales repetidas como por ejemplo el ADN ribosomal en salamandras y tritones, forman un par conspicuo de asas que corresponden al organizador del nucleolo. En otras salamandras el organizador aparece como una colección de asas más complejas (Kezer y Macgregor, 1973). En todo caso se cree que el ADN ribosomal del organizador no se transcribe en su totalidad; muchas

- Fig. 7. Corte fino de una esfera, vista al microscopio electrónico en que se demuestra que son estructuras compuestas.
- Fig. 8. Autorradiografía de espermatocitos en meiosis, incubados en presencia de uridina tritiada. El núcleo en el centro se encuentra en la etapa difusa y ha incorporado la uridina. El núcleo superior en paquitene incorporó menos radioactividad.
- Fig. 9. Fibras de DNP preparadas de ovocitos de *B. subpalmata* en condiciones que disuelven muchas proteínas cromosomales (pH 10 con detergente fotoflow al 0,01%). En cromosomas plumulados se presenta también el arreglo de rosario, en que cada cuenta es un octómero de histonas, llamado un nucleosoma. Fotografía al microscopio electrónico.
- Fig. 10. Bajo condiciones menos rigurosas de aislamiento (pH = 9,2; sin detergente) aparecen estructuras supranucleosomales cuyo diámetro indica que pueden contener ocho nucleosomas. Fotografía al microscopio electrónico.



copias permanecen en el cromómero. Es evidente que gran parte del ARN ribosomal (18S + 28S) se transcribe a partir de los nucleolos libres que son muy numerosos y de gran actividad sintética en esta etapa (Fig. 11). Barsacchi *et al.* (1977) utilizaron la técnica de hibridación *in situ* con el fin de ubicar los genes ribosomales 5S en los cromosomas plumulados del tritón *Triturus vulgaris* y encontraron que dichos genes constituyen un solo cromómero con su par de asas.

En estudios recientes se ha localizado algunas secuencias repetidas en las asas del cromosoma 1 de *T. vulgaris* tales como las secuencias de los genes de las histonas y otras secuencias de repetición intermedia (Pukkila, 1975). La técnica consiste en hibridar ADN marcado al ARN "naciente" de las asas. Old *et al.* (1977) purificaron los genes de las histonas de ADN aislado de erizos de mar, los clonaron en vehículos bacterianos y obtuvieron marcaje en pocas asas que presentaban, cerca de la inserción gruesa, una porción no marcada con una gran cantidad de matriz RNP. El híbrido se localizó en un segmento corto del eje (a unos pocos micrómetros de la inserción fina), en asas de una longitud de 200 μm . Por lo tanto en estas asas se transcriben otras secuencias además de los genes para las histonas. Se deduce también que las asas no se desenrollan y retraen continuamente y que los mensajes para las histonas se cortan del extremo de la molécula que continúa transcribiéndose. Se supone que a esto último se debe la ausencia de marcaje en el extremo de la inserción gruesa en los híbridos (Macgregor y Andrews, 1977; Old *et al.*, 1977). Macgregor y Andrews (1977) localizaron en este mismo cromosoma secuencias de repetición intermedia aisladas por reasociación y marcadas *in vitro*. Además encontraron marcaje discontinuo en las asas, preferencialmente en el cromosoma número uno. Por simplicidad supusieron que ocurre una repetición en tandem de una sola secuencia en el eje de cada asa. Estos autores observaron también un marcaje rápido en cromosomas mitóticos en híbridos ADN:ADN, lo que sugiere que hay otras secuencias que se repiten tanto como las anteriores pero no tienen un arreglo en tandem o no se transcriben durante la etapa plumulada. Es interesante notar que esta región del cromosoma 1 no forma quiasmas durante la meiosis lo que en parte explicaría el confinamiento de dichas secuencias.

Varios investigadores se han interesado en estudiar otros aspectos de la transcripción en ovocitos de anfibios. En *Xenopus* y *Triturus* el mARN se transcribe preferencialmente de las secuencias únicas del genoma (Rosbach y Ford, 1974). Según estos investigadores la complejidad de la población de mARNs en ovocitos es tal que cada asa podría contener una secuencia informacional que al transcribirse generará una especie diferente de mARN. Los estudios de Sommerville y Malcolm (1976) apoyan esta conclusión general; sin embargo la organización de las secuencias en el producto primario de la transcripción, y por ende en las asas, parece ser más compleja. El hnARN de las gástrulas de erizo de mar presenta secuencias de repetición intermedia intercaladas con secuencias únicas (Smith *et al.*, 1974). En *Triturus* sólo el 15% del hnARN tiene secuencias repetidas, la mayoría forma híbridos moleculares con secuencias únicas (Sommerville y Malcolm, 1976). Si la maduración de ARN "naciente" comienza en las asas, algunas secuencias no estarían representadas en el hnARN. Podría suponerse que ciertas asas contienen solamente secuencias repetidas como algunas que codifican por ARN 5S (Pukkila, 1975) y las que no son digeridas por enzimas de restricción.

Según Sommerville y Malcolm (1976) la mayor parte del ADN del ovocito (más del 95%) está inactivo en el cromómero, y del 2 al 4% se transcribe a hnARN. Si sólo el 3% del hnARN transcrito se constituye en mARN, se obtiene que las secuencias codificantes del ovocito representan de 0,05 a 0,1% de la totalidad del genoma. Dicha cantidad de ADN podría codificar por 7.500 a 15.000 especies

diferentes de mRNA, valor similar al estimado para el número total de asas en el genoma haploide. Además la cantidad de ADN cromosómico presente en forma de asas se aproxima a los valores obtenidos por hibridación. Estudios con microscopía electrónica (Miller *et al.*, 1970) revelan la presencia de fibras laterales de RNP que emergen del eje de las asas y que originan estructuras similares a las plumas descritas por Miller en los genes ribosomales extracromosómicos (Fig. 11). Se supone entonces que cada asa representa una unidad de transcripción aunque ocasionalmente se observan asas con asimetría doble (Angelier y Lacroix, 1975). En los casos estudiados, se deducen dos aspectos de las asas: el gran tamaño de los productos primarios transcritos y la presencia frecuente de secuencias únicas. Es probable que las asas representen la forma que las unidades de transcripción adquieren al ser simultáneamente transcritas por muchas polimerasas.

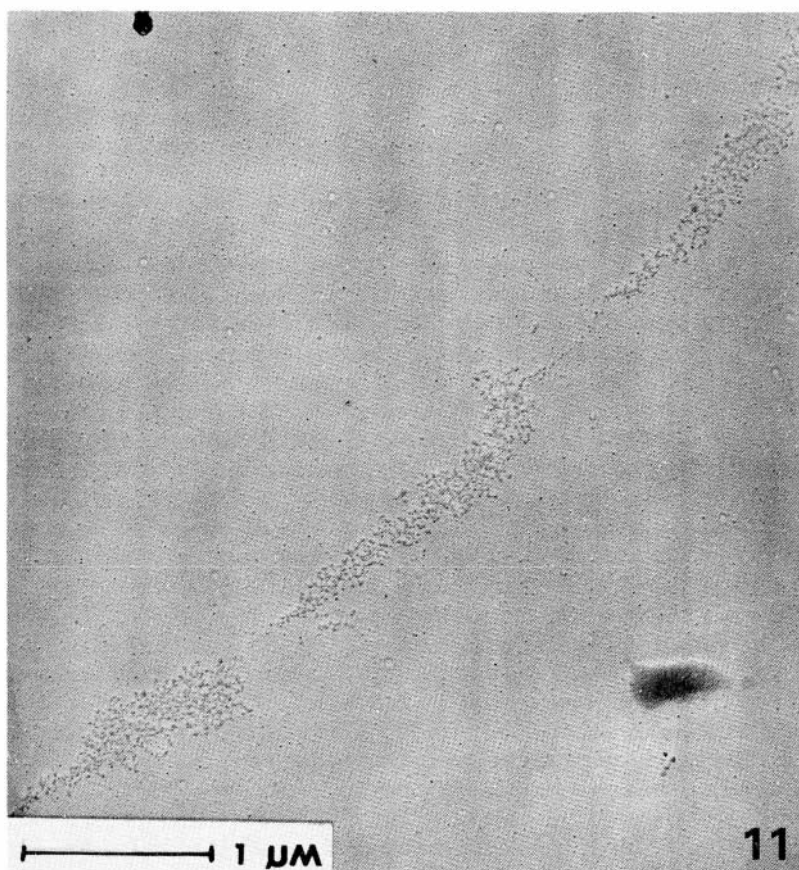


Fig. 11. Las plumas de Miller son genes ribosomales extracromosómicos repetidos en tandem, que son transcritos simultáneamente por muchas polimerasas. Entre cada "pluma" aparece una región no transcrita, de función desconocida.

Los cromómeros: Son entidades estructurales evidentes durante la primera profase meiótica, y se cree que en cromosomas politénicos de dípteros forman las bandas, al alinearse lateralmente (Figs. 3-6).

Los trabajos genéticos en dípteros indican que en general cada banda se identifica con un cistrón (Muller y Prokofyeva, 1935; Judd *et al.*, 1972; Hochman, 1973), aunque la cantidad de ADN por banda potencialmente podría codificar por unos 30 genes (Rudkin, 1965). Las bandas además, dan origen a "puffs"* y anillos de Balbiani, unidades transcripcionales cuya aparición, en algunos casos, se relaciona con la síntesis de proteínas específicas (Grossbach, 1973).

Existe, por lo tanto, una discrepancia en atribuirle una función simple al cromómero y la cantidad de ADN contenida en él. Esto se puede conciliar si suponemos que la actividad sintética se restringe a ciertos segmentos del ADN y que el resto no participa en la codificación, o si lo hace su producto es degradado rápidamente. Judd *et al.* (1972) consideran al cromómero como una unidad genética. Proponen que contiene, además del gen estructural, ADN cuya función es reguladora, por lo que su tamaño estará determinado por la cantidad de ADN de regulación. Por otra parte, Callan (1967) en su hipótesis del "amo-esclavo" (Master-Slave) consideraba que el cromómero está formado por una sola secuencia repetida un gran número de veces, cuyo tamaño depende del número de copias de la secuencia dada. Como se verá luego, dicha hipótesis ha sido descartada con experimentos efectuados por el mismo Callan.

Vlad y Macgregor (1975) al estudiar organismos relacionados filogenéticamente, pero con valor C muy diferente se preguntaron si muestran cromómeros más grandes o si tienen un mayor número de ellos. Utilizaron dos salamandras del género *Plethodon* cuyos cariotipos son casi idénticos encontrando que, *Plethodon dunii* con 38,8 pg de ADN por núcleo haploide, tiene de 60 a 70% más cromómeros que *P. cinereus* con 20 pg/núcleo. Aparentemente la variación en el tamaño del genoma puede atribuirse a diferencias en la cantidad de ADN de repetición intermedia (Mizuno y Macgregor, 1974). Dichas secuencias se distribuyen en forma equilibrada a través de todo el cariotipo, ya que el número y las dimensiones relativas de los cromosomas son similares en ambas especies. Como las secuencias de repetición intermedia constituyen la mayor parte del genoma (50% en *P. cinereus* y 80% en *P. dunii*), la mayoría del ADN cromomérico debería ser de repetición intermedia. Como además cerca del 90% del ADN total es cromomérico y el 40% del genoma de *P. cinereus* presenta secuencia única (Vlad y Macgregor, 1975), los cromómeros deben también contener esta clase de secuencias. En estas dos especies la cantidad de secuencias únicas es muy similar y suponiendo que la intercalación es uniforme, se concluye que el espaciamiento de estas secuencias es sustancialmente mayor en aquellas especies con valor C elevado. En estos organismos no puede establecerse una relación numérica directa entre cromómeros y secuencias únicas. Es probable que en cromosomas plumulados y en otros cromosomas meióticos los cromómeros no correspondan a cistrones, como en el caso de las bandas en cromosomas politénicos. Sin embargo Callan (1973) determinó que el número de "replicones" en la fase pre-meiótica de síntesis de ADN es similar al número de cromómeros. Macgregor (1977) propone que cada cromómero contiene ADN rico en una familia de secuencias repetidas. Un modelo alternativo sobre la organización de los cromómeros no requeriría una repetición estricta de secuencias sino similitud en

* "puffs" son ensanchamientos en el eje de los cromosomas politénicos que surgen a partir de un cromómero

el contenido proporcional de bases a lo largo de grandes segmentos de la fibra (Macaya *et al.*, 1976).

Parece inevitable que al menos en cromosomas plumulados cada cromómero contiene varios cistrones. Difícilmente puede suponerse que un reptil como *Bipes* (Macgregor y Klosterman, 1979), con 1.000 cromómeros por genoma haploide, sólo presente 1000 genes. Se abre entonces la posibilidad que el cromómero agrupe varios cistrones y surge entonces la pregunta sobre la relación temporal y funcional de estos cistrones. En un caso, varios genes en el cromómero podrían expresarse secuencialmente, por ejemplo varias isoenzimas que se expresen en diferentes períodos del desarrollo. En el otro caso, varias funciones metabólicas relacionadas podrían asociarse en un cromómero y expresarse en sincronía. Por ahora la evidencia genética en eucariones es tan escasa que no permite evaluar estos modelos en forma definitiva.

FUNCION DE LOS CROMOSOMAS PLUMULADOS

Durante el diplotene plumulado de la meiosis los gametos femeninos se preparan para desarrollo embriológico. Siendo la embriogénesis temprana una etapa muy desprotegida en muchos organismos, la selección natural posiblemente ha operado estableciendo mecanismos para acortarla. Es posible que la multiplicación génica del ADN ribosomal (Hourcade *et al.*, 1973) represente uno de estos mecanismos.

Se han planteado varias hipótesis acerca de la función de los cromosomas plumulados. Callan (1967) propuso la hipótesis denominada "amo-esclavo", basada en el concepto ya descartado del cromómero como una estructura dinámica. Según esta hipótesis durante el desenrollamiento de las asas las secuencias repetidas se corrigen con base en una secuencia "amo". Sólo cuando esta secuencia muta se observa un efecto genético en la pregenie. Queda ahora claro que muchas asas no presentan secuencias repetidas exclusivamente, y que el producto de la transcripción proviene en gran parte de secuencias únicas, por lo cual dicha corrección es innecesaria.

Como los cromosomas plumulados participan en la producción de mARNs de larga vida, las asas de estos cromosomas se podrían definir como un conjunto de estructuras especializadas en la síntesis y en el empacamiento de gran cantidad de productos génicos precozmente (Davidson, 1968). En esta hipótesis el énfasis recae en el producto de la transcripción. Una versión reciente por Davidson y Britten (1979) de regulación por medio de secuencias repetidas, supone que el ARN regulador, que se transcribe de ADN repetitivo, se hibrida bajo condiciones fisiológicas con ARN pre-mensajero para permitir su exportación y/o procesamiento. La etapa plumulada podría participar en la producción de ARN regulador para el desarrollo (León, 1975). Este autor también propuso que la fibra DNPica del asa interactúa con el nucleoplasma y tal exposición altera y reprograma la fibra. Suponiendo que la extensión y retracción ocurra, todo el genoma sería afectado. Tal exposición permitiría por ejemplo la incorporación y/o liberación de moléculas reguladoras, la modificación química del ADN expuesto o de proteínas cromosomales. La naturaleza estática de las asas implica que tal reprogramación afectaría una pequeña fracción del genoma (5%) por lo que este tipo de mecanismo parece menos factible. Otra idea propuesta considera que el estado plumulado representa una liberación general del genoma, que reprograma la aparición de estados diferenciados. Un dato congruente con esta hipótesis son los cambios cualitativos y cuantitativos en las proteínas cromosómicas durante el transcurso de la diferenciación y la embriogé-

nesis (Bentinen y Comb, 1971; Hill *et al.*, 1971; Easton y Chalkley, 1972; Searle y Aronson, 1973; Spiegel *et al.*, 1973; Ruderman *et al.*, 1974).

Por otra parte Gurdon (1968) transplantó núcleos somáticos a ovocitos nucleados o enucleados, y vio cómo éstos sufren un proceso de hinchamiento y transcripción, que se correlaciona inversamente con el estado de diferenciación del tejido del cual se obtuvo el núcleo. Tal hinchamiento va precedido por la incorporación de proteínas citoplasmáticas recién sintetizadas (Merriman, 1969) lo que parece indicar que dicho proceso es un requisito para la síntesis de ADN y para el desarrollo embriológico posterior. Recientemente DeRobertis y Gurdon (1979), utilizando electroforesis de proteínas en dos dimensiones, han demostrado que núcleos de riñón microinyectados son reprogramados en el citoplasma del ovocito, a producir proteínas ovocitarias. Los experimentos de Gurdon no permiten decidir si las "substancias reprogramadoras" actúan solo en las etapas tempranas (hasta la blástula). Es posible, que como en el caso de la sustancia "O+" del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) existan otras substancias reprogramadoras que actúen tardíamente. Sin embargo, es probable que muchas de estas sustancias producidas en el ovocito tengan su efecto en las etapas tempranas de desarrollo embrionario.

La hipótesis más reciente sobre la función de los cromosomas plumulados (Cavalier-Smith, 1978) propone que estos participan en la producción de ARN nucleoesquelético, que permite inflar el núcleo y aumentar el área de intercambio con el citoplasma. Cavalier-Smith supone que el ADN del núcleo puede cumplir funciones de control, transcripción y traducción en cuyo caso se clasifica como ADN génico. Existe otro tipo de ADN que no codifica y cuya secuencia propiamente no está sujeta a estricta selección natural. Sólo la *cantidad* de este tipo de ADN lo está, pues el valor C correlaciona directamente con el volumen del núcleo y con el volumen de la célula. En ADN nucleoesquelético, como Cavalier-Smith lo ha llamado, da origen al ARN nucleoesquelético, cuando es transcrito en el ovocito.

Los trabajos con núcleo microinyectados (DeRobertis y Gurdon, 1979) demuestran que algunos genes no son traducidos en el ovocito por lo que tal vez tampoco sean transcritos. Otra evidencia indica que algunos genes de hecho no son transcritos, por lo que probablemente no todos los promotores del genoma se encuentren activos durante el diplotene plumulado. Es notable, en todo caso, la tasa de transcripción durante el diplotene plumulado, que es al menos un orden de magnitud superior al de otras células (Davidson y Britten, 1979).

CONSIDERACIONES FINALES

Las hipótesis de reprogramación propuestas (Gurdon, 1968; León, 1975; DeRobertis y Gurdon, 1979) implícitamente conciben el proceso embriológico como un algoritmo cuyo componente temporal requiere de una reprogramación inicial, o preprogramación. DeRobertis y Gurdon (1979) han demostrado que el citoplasma del ovocito suprime el programa sintético de núcleos diferenciados, cuando éstos son microinyectados, y activa genes ovocitarios aún en núcleos de especies diferentes. Los estudios con la sustancia "O+" en el ajolote también apoyan un tipo de preprogramación en que substancias sintetizadas por el ovocito determinan luego la diferenciación de algunas células.

La forma en que esta preprogramación ocurre es desconocida. Evidentemente los núcleos somáticos inyectados en el citoplasma ovocitario remedan los eventos que efectúa el núcleo del ovocito, incluyendo una transcripción intensa. Aunque no existen aún pruebas formales definitivas, parece improbable que la reprogramación

involucre toda la fibra DNPica o que cambie la secuencia o composición del ADN. También se ha sugerido que la producción de ARN regulador durante el diplotene plumulado es necesaria para instituir el programa de desarrollo adecuado en los núcleos embrionarios (León, 1975; Davidson y Britten, 1979). Debe notarse que la propuesta de Cavalier-Smith no es incompatible con la hipótesis de reprogramación, aunque resulta trivial si éstas son correctas.

La utilidad de estas ideas depende del valor predictivo que tengan. A nuestro juicio las siguientes predicciones pueden ser sometidas a prueba:

- a) Si la propuesta de Cavalier-Smith es correcta, gran cantidad de ARN nucleoesquelético, no codificante, debe producirse en el núcleo del ovocito; alternativamente el ADN nucleoesquelético debe aumentar proporcionalmente al tamaño del ovocito y la transcripción *per se* no define el volumen nuclear y celular. Macgregor al final de su reciente artículo (1980) menciona algunas observaciones que favorecen esta segunda idea de Cavalier-Smith.
- b) Si las hipótesis de reprogramación son correctas, las sustancias reprogramantes deberían ser aislables, y su efecto podría demostrarse con técnicas de microinyección. Por ejemplo, si en la vesícula germinal se produce ARN regulador (Davidson y Britten, 1979) éste podría aislarse y demostrar alguna actividad determinativa en el mismo sentido que la sustancia "O + " del ajolote lo es. Si la fibra de ADN se modifica, por ejemplo, por metilación, las modificaciones deberían ser detectables comparando cromatina de otras etapas con los cromosomas del diplotene plumulado. Si las modificaciones son importantes para el desarrollo, los núcleos microinyectados, capaces de dar origen a un organismo, deberían sufrir las modificaciones correspondientes. La activación del genoma podría meramente implicar una hiperactivación de ciertos genes; esta idea predice modificaciones en los parámetros de la transcripción, a saber, iniciación, terminación y atenuación en el progreso de las polimerasas.

Es indudable que muchas de las dudas que persisten, pronto serán esclarecidas, y concordamos con las recientes observaciones de Macgregor (1980) sobre el continuo reto que representan estos cromosomas para aquellos que se interesan en la organización y expresión del material genético.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. James Kezer, de la Universidad de Oregón, U.S.A., por las fotografías de las Figuras 4 y 6, y al Dr. H.C. Macgregor de la Universidad de Leicester, Inglaterra, por adelantarnos manuscritos en preparación.

Parte de este trabajo fue efectuado gracias a la ayuda de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (02-07-03-83); y al aporte del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas a los Drs. Macaya y León.

RESUMEN

Los cromosomas plumulados aparecen en los ovocitos de muchos organismos durante el diplotene de la meiosis. Cada una de las cromátidas de estos cromosomas

consta de una fibra de desoxiribonucleoproteína que a intervalos regulares se arrolla sobre sí dando origen a los cromómeros. Por lo general se asocian a cada cromómero dos, o un múltiplo de dos asas, producto de una intensa transcripción. Cada cromómero contiene varios cistrones, en contraste con lo encontrado en cromosomas politénicos de dípteros. Las asas representan unidades de transcripción donde se copian secuencias repetidas y únicas. Cada cromómero podría constar de una familia de secuencias repetidas o simplemente de secuencias con un contenido similar de bases.

Se han planteado varias hipótesis acerca del funcionamiento de los cromosomas plumulados, conocidas como la del "amo-esclavo", las de reprogramación y las propuestas recientes de Cavalier-Smith. En esta revisión se discuten estas hipótesis y con base en ellas se establecen predicciones que experimentos futuros decidirían cuál de ellas explica en forma consistente el papel que juegan los cromosomas plumulados.

REFERENCIAS

- Angelier, N., & J.C. Lacroix
1975. Complexes de transcripcion d'origines nucleolaire et chromosomique d'ovocytes de *Pleurodeles waltlii* et *P. poireti* (Amphibiens, Urodeles). *Chromosoma* (Berl.), 51: 323-335.
- Baldari, Cosima, & F. Amaldi
1977. Length and interspersión of repetitive and non repetitive DNA sequences in four amphibian species with different genome size. *Chromosoma* (Berl.), 61: 359-368.
- Barsacchi-Pilone, G., Nardi, F. Andrónico, R. Batistone, & M. Durante
1977. Chromosomal localization of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela) I. Localization of the DNA sequences complementary to 5S rRNA. *Chromosoma* (Berl.), 63: 127-137.
- Bentinen, L.C., & D.G. Comb
1971. Early and late histones during sea urchin development. *J. Mol. Biol.*, 57: 355-358.
- Bishop, J.O.
1977. Lampbrush chromosomes brought up to date. *Nature*, 268: 588-540.
- Britten, R., & D.E. Kohn
1968. Repeated sequences in DNA. *Science*, 161: 592-540.
- Callan, H.G.
1956. The lampbrush chromosomes of *Sepia officinalis* L., *Anilocra physodes* L. and *Scyllium catulus* Curv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of Amphibia. *Estrattodalle "Publ. Staz. Zool. Napole"*, 29: 329-336.
- Callan, H.G.
1963. The nature of lampbrush chromosomes. *Int. Rev. Cytol.*, 15: 1-34.
- Callan, H.G.
1967. The organization of genetic units in chromosomes. *J. Cell Sci.*, 2: 1-7.
- Callan, H.G.
1973. DNA replication in the chromosomes of eukaryotes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 38: 195-203.

- Callan, H.G., & L. Lloyd**
1960. Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B, 283: 135–219.
- Cavalier-Smith, T.**
1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. J. Cell Sci., 34: 247–278.
- Davidson, E.H.**
1968. Gene activity in early development. Academic Press.
- Davidson, E.H., & R. Britten**
1979. Regulation of gene expression: Possible role of Repetitive Sequences. Science, 204: 1052–1059.
- Davidson, E.H., B. Hough, C. Amenson, & R. Britten**
1973. General interspersion of repetitive with nonrepetitive sequence elements in the DNA of *Xenopus*. J. Mol. Biol., 77: 1–23.
- Davidson, E.H., G.A. Galau, R. C. Angerer, & R. H. Britten**
1975. Comparative aspects of DNA organization in Metazoa. Chromosoma (Berl.), 51: 253–259.
- Denis, H.**
1968. Role of messenger ribonucleic acid in embryonic development. Adv. Morph., 7: 115–150.
- DeRobertis, E.M., & J.B. Gurdon**
1979. Gene transplantation and the analysis of development. Sci. Amer., 241: 74–82.
- Easton, D., & R. Chalkley**
1972. High resolution electrophoretic analysis of the histones from embryos and sperm of *Arabacia punctata*. Exp. Cell. Res., 72: 502–508.
- Flint, S.J., & H. M. Weintraub**
1977. An altered subunit configuration associated with the actively transcribed DNA of integrated adenovirus genes. Cell, 12: 783–794.
- Gall, J.G., & H.G. Callan**
1962. H³-uridine incorporation in lampbrush chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci., wash., 48: 562–570.
- Gall, J.C.**
1963. Kinetics of deoxyribonuclease action on chromosomes. Nature, 198: 36–38.
- Gould, D.C., H.G. Callan, & A.C. Thomas**
1976. The action of restriction endonucleases on lampbrush chromosomes. J. Cell Sci., 21: 303–313.
- Grossbach, V.**
1973. Chromosomes puffs and gene expression in polytene cells. Cold Spring Harb., Symp. Quant. Biol., 38: 619–627.
- Gurdon, J.B.**
1968. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocyte. J. Embriol. Exp. Morph., 20: 401–414.
- Hartley, S.E., & H.G. Callan**
1978. RNA transcription of the giant lateral loops of the lampbrush chromosomes of the american newt *Notophthalmus viridescens*. J. Cell Sci., 34: 279–288.

- Hess, O.**
1973. Local structural variations of the Y chromosome of *Drosophila hydei* and their correlation to the genetic activity. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38: 663-671.
- Hill, R.J., A.L. Poccia, & P. Doty**
1971. Towards a total macromolecular analysis of sea urchin embryo chromatin. J. Mol. Biol., 61: 445-462.
- Hill, R.J., K. Maundrell, & H.G. Callan**
1973. Proteins of the newt germinal vesicle nucleus. Nature, 242: 20-22.
- Hochman, B.**
1973. Analysis of a whole chromosome in *Drosophila*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38: 581-589.
- Hood, L., J.H. Wilson, & W.B. Wood**
1975. Molecular biology of eukaryotic cells. Vol. I, W.A. Benjamin Inc.
- Hourcade, D., D. Dressler, & J. Wolfson**
1973. The nucleolus and the rolling circle. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38: 537-550.
- Hozier, J., M. Renz, & P. Nehls**
1977. The chromosome fiber: evidence for an ordered superstructure of nucleosomes. Chromosoma (Berl.), 62: 301-317.
- Judd, B.H., M.W. Shen, & T.C. Kaufman**
1972. The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 71: 139-156.
- Kavenoff, R., L.C. Klotz, & B.H. Zimm**
1973. On the nature of chromosome-sized DNA molecular. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38: 1-8.
- Kedes, L.H., B. Hogan, G. Cognetti, S. Selvig, P. Yanover, & P. Gross**
1972. Regulation of translation and transcription of messenger RNA during early embryonic development. Cold Spring Harb. Symposium of Quantitative Biology, 34: 717-723.
- Keyl, H.G.**
1975. Lampbrush chromosomes in Spermatocytes of *Chironomus*. Chromosoma (Berl.), 51: 75-91.
- Kezer, J., & H.C. Macgregor**
1971. A fresh look at meiosis and centromeric heterochromatin in the red-backed salamander, *Plethodon cinereus cinereus* (Green) Chromosoma, (Berl.), 33: 146-166.
- Kezer, J., & H.C. Macgregor**
1973. The nucleolus organizer of *Plethodon cinereus cinereus* (Green) II. The lampbrush nucleolus organizer. Chromosoma (Berl.), 42: 427-444.
- Kezer, J., P.E. León, & S. Sessions**
1980. Structural differentiation of the meiotic and mitotic Chromosomes of the salamander *Ambystoma macrodactylum*. Chromosoma (Berl.), (en prensa).
- Klaterská, I.**
1978. Structure of eukaryotic chromosomes: The differences between mammalian (mouse) grasshopper (*Stethophyma*) and plant (*Rosa*) chromosomes as revealed at the diffuse stage of meiosis. Hereditas, 88: 243-253.

- Kornberg, R.D.**
1974. Chromatin structure. A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184: 868–871.
- León, P.E.**
1975. Function of lampbrush chromosomes: A hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 55: 481–490.
- Macaya, G., J.P. Thiery, & G. Bernardi**
1976. An approach to the organization of eukaryotic genomes at a macromolecular level. *J. Mol. Biol.*, 108: 237–254.
- Macgregor, H.C.**
1977. Lampbrush chromosomes, p. 339–357. *In* R.A. Echardt & Hsueh-Jei Li (eds.). *Chromatin and chromosome structure*. Academic Press.
- Macgregor, H.C.**
1980. Recent developments in the study of lampbrush chromosomes. *Heredity*, (En prensa).
- Macgregor, H.C., & C. Andrews**
1977. The arrangement and transcription of “Middle repetitive” DNA sequences on lampbrush chromosomes of *Triturus*. *Chromosoma (Berl.)*, 63: 109–126.
- Macgregor, H.C., & L. Klosterman**
1979. Observations on the cytology of *Bipes (Amphisbaenia)* with a special reference to its lampbrush chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 72: 67–87.
- Merriman, R.W.**
1969. Movement of cytoplasmic proteins into nuclei induced to enlarge and initiate DNA or RNA synthesis. *J. Cell Sci.*, 5: 333–349.
- Miller, O.L., Jr., B.R. Beatty, B.A. Hamkalo, & C.A. Thomas, Jr.**
1970. Electron microscopic visualization of transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35: 505–512.
- Mizuno, S., & H.C. Macgregor**
1974. Chromosomes, DNA sequences, and evolution in salamanders of the genus *Plethodon*. *Chromosoma (Berl.)*, 48: 239–296.
- Morescalchi, A.**
1973. Amphibia, p. 233–348. *In* A.B. Chiarelli & E. Capanna (eds.). *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press.
- Mott, M.R., & H.G. Callan**
1975. An electron-microscope study of the lampbrush chromosomes of the newt *Triturus cristatus carnifex*. *J. Cell Sci.*, 17: 241–261.
- Muller, H.J., & A.A. Prokofyeva**
1935. The individual gene in relation to the chromosome. *Proc. Nat. Acad. Sci., wash.*, 21: 16–26.
- Ohno, S.**
1970. *Evolution by gene duplication*. London: Allen y Unwin.

- Old, R.W., H.G. Callan, & K.N. Gross
1977. Localization of histone gene transcripts on newt lampbrush chromosomes by *in situ* hybridization. *J. Cell Sci.*, 27: 57-80.
- Olins, A.L., & D.E. Olins
1974. Spheroid units (V. bodies). *Science*, 83: 330-332.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard, & P. Chambon
1975. Electron microscope and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4: 281-300.
- Pukkila, P.J.
1975. Identification of the lampbrush chromosome loops which transcribe 5s ribosomal RNA in *Notoptalmus (Triturus) viridescens*. *Chromosoma (Berl.)*, 53: 71-89.
- Ris, H.
1945. The structure of meiotic chromosomes in the grasshopper and its bearing on the nature of chromomeres and lampbrush chromosomes. *Biol. Bull.*, 89: 242-257.
- Rosbach, M., & P.J. Ford
1974. Polyadenylic acid-containing RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Mol. Biol.*, 85: 87-101.
- Ruderman, J.V., C. Baglioni, & P.G. Gross
1974. Histone mRNA and histone synthesis during embryogenesis. *Nature*, 247: 36-38.
- Rudkin, G.
1965. The relative mutabilities of DNA in regions of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 52: 665-681.
- Scheer, U., & H. Zentgraf
1978. Nucleosomal and supranucleosomal organization of transcriptionally inactive rDNA circles in *Dytiscus* oocytes. *Chromosoma (Berl.)*, 69: 243-254.
- Searle, R.L., & A.I. Aronson
1973. Chromatin-associated proteins of the developing sea urchin embryo. I. Kinetics of synthesis and characterization of non-histone proteins. *J. Mol. Biol.*, 75: 633-645.
- Smith, M.J., B.R. Hough, M.E. Chamberlin, & E.H. Davidson
1974. Repetitive and non-repetitive sequences in sea urchin heterogeneous nuclear RNA. *J. Mol. Biol.*, 85: 103-126.
- Snow, M.H.L., & H.G. Callan
1969. Evidence for a polarized movement of lateral loops of newt lampbrush chromosomes during oogenesis. *J. Cell Sci.*, 5: 1-25.
- Sommerville, J., & D. Malcolm
1976. Transcription of genetic information in amphibian oocytes. *Chromosoma (Berl.)*, 55: 183-208.
- Spiegel, M., E.S. Spiegel, & P.S. Meltzer
1973. Qualitative changes in the basic protein fraction of developing embryos. *Develop. Biol.*, 21: 73-86.
- Varley, J.M., H.C. Macgregor, & H.P. Erba
1980. Satellite DNA is transcribed on lampbrush chromosomes. *Nature*, 283: 686-688.
- Vlad, M., & H.C. Macgregor
1975. Chromomere number and its genetic significance in lampbrush chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 50: 327-347.