



14/68
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO MORFOMETRICO Y CITOQUIMICO DEL
NUCLEO INTERFASICO EN CELULAS
MERISTEMATICAS DE Allium cepa**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
Marco Antonio González Jiménez



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

PARTE I	-INTRODUCCION Generalidades
	-ESTRUCTURAS NUCLEARES Membrana Nuclear Partículas Ribonucleoproteicas Cromatina Nucleolo
	-COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD METABOLICA Acido Desoxirribonucleico Acido Ribonucleico Proteínas
	-ELEMENTOS BIOQUIMICOS DEL NUCLEOLO Acidos Ribonucleicos Nucleolares Proteínas Nucleolares Cromatina Nucleolar Ciclo Generacional del Nucleolo
PARTE II	-ANTECEDENTES
PARTE III	-OBJETIVOS
PARTE IV	-MATERIAL Y METODOS Material Biológico: meristemas de raíz de cebolla (<i>Allium cepa.</i>). Autorradiografía Volumen Nuclear y Nucleolar. Determinación de la cantidad de ADN.
PARTE V	-RESULTADOS Morfología Análisis Cuantitativo
PARTE VI	-DISCUSION
PARTE VII	-CONCLUSIONES.
PARTE VIII	-BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Una de las preocupaciones más importantes del hombre ha sido el estudio de la evolución de los organismos. Actualmente se sabe que los primeros seres vivos aparecieron hace más de 3000 millones de años. Durante ese tiempo se dieron muchos cambios tanto en el ambiente físico como en los organismos. En el precámbrico, la aparición del aparato bioquímico de la fotosíntesis trajo como consecuencia nuevas estrategias adaptativas en los organismos gracias a la presencia de oxígeno. Los primeros organismos que evolucionaron en respuesta a este cambio ambiental pudieron tan sólo tolerar el oxígeno; más tarde las células consiguieron emplear activamente el oxígeno en su metabolismo y con ello obtener más energía a partir de las sustancias alimenticias (44).

Otro paso importante en la evolución fué la aparición de un nuevo tipo de células en las que el material genético se halla ba reunido en un núcleo definido; estas células están mucho más organizadas que las que carecían de núcleo y lo que es más importante sólo las células nucleadas son capaces de una reproducción sexual, carácter que comparte con algunas bacterias, aunque éstas carecen de núcleo, a este proceso se le llama conjugación. Esta reproducción logra la recombinación del material genético, lo que permite la aparición de formas de vida pluricelulares grandes y complejas. Su diversificación fue rápida a principios del cámbrico (41, 44).

Mediante los avances técnicos se ha permitido ir descubriendo poco a poco los más intrínsecos problemas biológicos, hasta llegar a facilitar en nuestros días una visión más precisa de la gran complejidad de los organismos vivos y más en particular de la célula (50).

Así Roberto Hooke en 1665, utiliza por primera vez el término de célula, al descubrir la textura del corcho por medio de los lentes de aumento. Anthony Van Leeuwenhook en 1674 observa cierta organización dentro de ellas, en especial en núcleos de algunos eritrocitos.

Fué Brown en 1831 el primero en descubrir el núcleo como una entidad constante dentro de la célula. Ya antes, en 1773 - Fontana había descrito el nucleolo, pero no reconoció su constancia ni su naturaleza (11, 14).

Purkinje y otros en 1839 dan el término protoplasma para significar el contenido vivo de la célula. Los alemanes Schwann (1839) y Schleiden (1838), presentan la idea de que todos los seres vivos están formados por células, provocando así el nacimiento de lo que más tarde habría de llamarse "teoría celular", en lo que se define un hecho trascendental: la célula es la unidad fundamental no sólo por lo que respecta a su función, sino también en cuanto a su estructura.

La "teoría celular" fué ampliada por Virchow en 1855 - al expresar sus principios de que cada célula se forma por división celular como el fenómeno central en la reproducción de los organismos. Schneider en 1873 observa que antes de la división se forman estructuras cilíndricas en el núcleo; éstas estructuras después fueron denominadas cromosomas por Waldeyer en 1890 (11, - 15, 50).

Llevó un siglo de trabajos morfológicos y bioquímicos para comprender que el núcleo era una estructura celular formada por una envoltura nuclear, nucleolo y cromatina. Bioquímicamente está compuesta de material genético (ADN y ARN), proteínas y fosfolípidos como moléculas importantes (5, 36, 50).

ESTRUCTURAS NUCLEARES

MEMBRANA NUCLEAR.

La membrana nuclear constituye una dependencia del sistema vacuolar citoplasmático. Una de las demostraciones más claras de que la membrana deriva del retículo endoplasmático se produce en la mitosis, en telofase, cuando las cisternas del mismo se disponen alrededor de los cromosomas para formar la envoltura nuclear. Se ha visto que la membrana nuclear es un complejo sistema de membranas.

Este sistema está compuesto por dos membranas con un espacio entre ellas de 100 a 200 A° de espesor, la superficie externa se encuentra en contacto con el citoplasma, muestran granulosos en ARN y probablemente se trata de ribosomas semejantes a los que se encuentran en el resto del citoplasma. La superficie interna no tiene ribosomas. A lo largo de la cubierta y con ciertos intervalos hay poros nucleares que miden 500 a 800 A° y tienen forma circular ó poligonal, su función es el intercambio núcleo citoplasmático (11, 36).

Los poros se encuentran rodeados de formaciones circulares llamadas estructuras anulares, ambas estructuras forman los complejos del poro, que se disponen de forma hexagonal sobre la superficie de la envoltura nuclear (11).

PÁRTICULAS RIBONUCLEOPROTEICAS.

Otros componentes intranucleares fueron observados. En 1962 se mencionan por vez primera los gránulos pericromatinianos (GPC) posiblemente conteniendo ARN (51). En la misma época se describían otros gránulos dentro del núcleo, los gránulos intercromatinianos (GCI) (22, 42, 45). Los estudios sobre las partículas nucleares mencionados recibieron un impulso grande cuando se describió el primer método de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (1), por medio de éste método se llegó a establecer que además de los gránulos pericromatinianos e intercromatinianos existen dentro del núcleo en interfase fibras pericromatinianas (FIC) y cuerpos espiralados (CE) (33).

Los gránulos intercromatinianos son partículas de 200 a 500 A° de diámetro y están distribuidos en cúmulos al azar en áreas de cromatina laxa.

Los gránulos pericromatinianos son partículas individuales de 400 a 600 A° de diámetro distribuidos en la periferia de la cromatina compacta y poseen un halo claro que los separa de la cromatina adyacente.

Las fibras pericromatinianas tienen formas irregulares y un diámetro de 30 a 50 A°, se localizan en zonas adyacentes a la cromatina compacta.

Los cuerpos espiralados están localizados en áreas de cromatina laxa, son fibras de 50 A° enrollados a lo largo de un filamento axial de 0.3 a 0.5 micrometros.

Se ha tratado de entender la estructura y el papel citofisiológico de las partículas ribonucleoproteicas, y se ha sugerido que algunas de ellas podrían representar estructuras de almacenamiento y/o transporte de ARN del núcleo al citoplasma (33, 47).

CROMATINA

El ADN se asocia a proteínas dentro del núcleo formando grandes complejos conocidos como cromatina.

Heitz en 1928 estableció las diferencias entre la cromatina que se encuentra metabólicamente inactiva, conocida como heterocromatina ó cromatina compacta y la cromatina que tiene una estructura laxa y es metabólicamente activa llamada eucromatina ó cromatina laxa. Sin embargo, tanto una como la otra están compuestas de unidades estructurales denominadas nucleosomas (11, 37).

Inicialmente la cromatina se definió como material nuclear con gran apetencia tintórea, no fué hasta que Feulgen y Rosenbek desarrollaron una técnica de tinción específica para cromatina demostrando así su contenido de ADN, y de ésta forma poner de manifiesto en forma cuantitativa y cualitativa la distribución del ADN dentro del núcleo (20, 35).

NUCLEOLO

La visualización del nucleolo con microscopía de luz fué posible con el desarrollo de las técnicas de tinción: anilinas, impregnaciones argénticas, etc., presentándose una variedad de formas, tamaños y número de nucleolos en diferentes tejidos y especímenes (14). Algunos autores clasifican los nucleolos en simples, formados por una esférula única, complejos múltiples, compuestos por estructuras de diferentes formas y tamaños, como los que se encuentran en las células de Sertoli del testículo de mamíferos. También fué determinada su negatividad con las técnicas

de Feulgen y Rossenbek (1924) resultando que el ADN no es componente primordial del nucleolo (4, 20).

Fue Heitz en 1931 el que demostró que el nucleolo se forma sobre una porción definida de un cromosoma del juego haploide, pero no a partir del material del cromosoma. Mc. Clintock (1934), denominó a esta región organizador nucleolar y por medio de translocaciones recíprocas aportó evidencias de que el nucleolo se origina por una actividad propia de esta zona cromosómica (31).

El nucleolo es conocido como el lugar donde se lleva a cabo la síntesis de ARN prerribosomal y el ensamblaje de ribonucleoproteínas, esos productos son subsecuentemente transportados al citoplasma para ser utilizados en la síntesis de proteínas (4, 11, 15).

Estable y Sotelo (1951) por medio de la microscopía óptica y técnicas de impregnación metálica describe la presencia de una trama fibrilar intranucleolar, llamada nucleolonema (18). Casperson (1941) establece la relación entre el tamaño nucleolar y su contenido de ARN determinando que los nucleolos de aquellas células donde se lleva a cabo una intensa síntesis de proteínas, como en las células del páncreas exócrino de conejo, son de tamaño más grande y ricas en ARN, que los de aquellas donde la actividad es menor, como las células de Langerhans. Estos datos fueron confirmados en múltiples ocasiones y en diferentes células (7).

Estudios de volumen nucleolar y de la relación volumétrica entre núcleo y nucleolo, continúan aún siendo realizados por medio de la microscopía óptica (48). La variación de estos parámetros estudiados con métodos de estereología cuantitativa en diferentes estados fisiológicos de un mismo tejido es similar a la variación de la síntesis de ARN nucleolar estimada por autorradiografía cuantitativa (46). De esta manera demuestra objetivamente que las variaciones de tamaño nucleolar que apreciaban cualitativamente se relacionan directamente con su función de centros de formación de ribosomas.

Por medio de la microscopía electrónica se han hecho aportes importantes sobre la estructura del nucleolo ya que da niveles de resolución más elevados. De esta forma en 1965 Bernhard describió 3 elementos ultraestructurales fundamentales en el nucleolo (2): fibras de 50 \AA (5nm) de diámetro, gránulos de 150 \AA (15 nm) parecidos a ribosomas y una matriz difusa. Utilizando digestiones enzimáticas, determinó que los dos primeros elementos mencionados están constituidos de proteínas y ARN, mientras que la matriz contiene solamente proteínas. Se ha observado que estos elementos se encuentran distribuidos en muy diferentes formas en el nucleolo en casi todas las células de los mamíferos, las fibrillas y los gránulos nucleares están mezclados en la constitución nucleosomal, mientras el contenido difuso constituye la parte amorfa. En anfibios, en dípteros, en nemátodos y en muchos tejidos vegetales se observan nucleolos con una parte central compacta, formada por fibrillas y una periférica granular, ésta última puede variar con los estados funcionales de las células en un mismo tejido, esto ha sido observado en células endometriales de ratas castradas donde el nucleolo es compacto y pierde su disposición nucleolonemal y recupera su disposición normal después de una inyección de estradiol. (49).

Ambos componentes se han relacionado con la síntesis de ARN prerribosomal y ribosomal que se unen a proteínas de origen citoplasmático, para formar partículas ribonucleoproteicas antecesoras de los ribosomas (3).

COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD METABOLICA

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) fueron descubiertos por Frederick Miescher en 1868, son considerados las bases moleculares del núcleo (11, 32).

ADN (Acido desoxirribonucleico).

Las moléculas de ADN están formadas por filamentos enrollados en forma de doble espiral, cada filamento consta de una cadena de nucleótidos, todos estos nucleótidos comprenden un azúcar la desoxirribosa, con un grupo fosfato en un extremo de la molécula y un compuesto aromático nitrogenado en el otro. Los dos filamentos poseen bases diferentes y se dispone de acuerdo a reglas simples de apareamiento; cada adenina con una citocina, estas bases permanecen unidas

por puentes de hidrógeno, la sucesión de bases representa la información hereditaria.

La duplicación del ADN significa repetir la secuencia de bases. Este carácter permite transferir información de una generación celular a otra y permite su expresión dentro de cada generación (14, 29, 52).

ARN (Acido ribonucleico).

La estructura del ARN en una molécula sin ramificaciones - que contiene cuatro tipos de nucleótidos, unidos entre si mediante - enlaces 3' - 5' fosfodiéster.

Hay dos diferencias en los grupos químicos de ARN que los distingue del ADN: la primera es la presencia de una ribosa en tanto que el ADN contiene desoxirribosa, idéntico a éste excepto por la presencia de un -OH adicional. La segunda diferencia es que el - ARN no tiene timina sino que en su lugar presenta uracilo.

Una de las hebras del ADN funciona como matriz a la que se le aparean los ribonucleótidos complementarios, semejante a lo que - ocurre en el ADN (adenina con timina-uracilo-, guanina con citocina). Las enzimas ARN polimerasas unen entre sí a los ribonucleótidos . - 3'-5' fosfodiéster son los que mantienen unidos al esqueleto del - ARN, lo hace exclusivamente en presencia de ADN, hecho que sugiere - que éste debe alinear los nucleótidos precursores correctos para que pueda actuar el ARN polimerasa (10,29,52).

La síntesis del ARN es un proceso necesariamente muy preciso, sin embargo no hay pruebas para la existencia de ningún tipo - de corrección de modo que la exactitud global de la transcripción no alcanza las características de copia casi perfecta de la autoduplicación del ADN; sin embargo, no se perpetúan genéticamente los escasos errores que ocurren, puesto que el ARN celular no es autoduplicable (52).

En telofase la transcripción de la información genética a moléculas de ARN y la traducción final en diferentes componentes - proteicos constituye la expresión fenotípica de los genes (8, 11, 36).

PROTEINAS

El ADN se encuentra unido a proteínas entre las cuales se encuentran las histonas que son proteínas básicas pequeñas en estrecha relación con el ADN. Los componentes principales de la cromatina son las 5 histonas H1, H2A, H2B, H3, H4, en micrografías electrónicas la cromatina aparece a menudo como una cadena de cuentas formada por partículas esféricas; nucleosomas de 100 Å, unidas por fibrillas delgadas, conteniendo unos 200 pares de bases que se mantienen juntas por uniones o grupos distintos de histonas (37, 52).

Cada nucleosoma contiene dos componentes de H2A, H2B, H3, H4 respectivamente, las cuatro histonas y muy especialmente la H3 y la H4 juegan un papel clave en la información de nucleosomas cuyo tamaño y forma también aparece invariabilmente en todas las formas de cromatina eucariontica (7, 37). La histona H1 no se encuentra en la conformación básica de los nucleosomas, puesto que fibras cromatínicas reconstruidas *in vitro*, que carecen de ellas, dan el mismo aspecto de difracción de rayos X, que la cromatina nativa. Por el contrario, la cromatina generada *in vitro* que no contenga cualquiera de las cuatro histonas, no es capaz de producir dicho espectro (6, 11, 52).

Se encuentra una masa casi igual de proteínas ácidas unidas más o menos firmemente a los complejos ADN - Histonas, esas proteínas cromosómicas, que no son histónicas, incluyendo las diversas ADN y ARN polimerasa suman más de 100. Hasta donde se sabe, funcionan en la duplicación o la transcripción del ADN, ó en los procesos de control que gobiernan la síntesis de ADN y ARN. Como tales esas proteínas pueden mostrar grandes variaciones de un tipo de células diferenciadas a otras, dentro de un mismo organismo. Las investigaciones recientes tienden a establecer que las proteínas ácidas podrían desempeñar un papel fundamental en el control de la expresión genética, mediante la reactivación de las regiones de genoma enmascarado por las histonas.

A diferencia de las histonas, las proteínas ácidas tienen una vida media corta, hecho que puede correlacionarse con la cantidad metabólica de la cromatina (9, 52).

LOS ELEMENTOS BIOQUIMICOS DEL NUCLEOLO.

Tanto los métodos clásicos como los modernos demuestran la misma composición global del nucleolo : 80 a 85 % de proteínas 12 % de ARN y 6 % de ADN

- a).- La ARN polimerasa una enzima de múltiples sub-unidades.
- b).- Muchas de las proteínas ribosomales.
- c).- Proteínas no ribosomales de alto P. M. que nunca deja al nucleolo.
- d).- Enzimas procesadoras del pre-rARN, entre las que se encuentran enzimas modificadores, metilasas, fosfatasas, endonucleasas productoras de hidrólisis de enlaces específicos durante el procesamiento postranscripcional; proteínas modificadoras de las enzimas quinasas, fosfatasas, etc.
- e).- ARN de alto P.M. : el 45 S producto inicial de la transcripción, los productos intermedios del procesamiento y los productos finales 28 S y 18 S.
- f).- Un ARN de bajo P.M. llamado U 3 , que sólo se encuentra en el nucleolo.
- g).- El 90 % o más de rADN de la célula.
- h).- ADN que no tiene secuencias de prerribosomales, pero está unido al nucleolo.

ACIDOS RIBONUCLEICOS NUCLEOLARES.

Las primeras evidencias de que en el nucleolo se sintetiza el ARN ribosomal fueron aportados por Perry (1962).

Existe un precursor inicial 45 S con alto contenido de gunina y citocina, ésta sufre cambios postranscripcionales que lo convierten en ARN 28 S y 18 S ribosomales. La síntesis de estas macromoléculas se catalizan por un ARN polimerasa específica del nucleolo (5, 10, 39).

Por medio de los rayos ultravioleta se logra la inhibición de la biosíntesis de ARN ribosomal; la síntesis de ARN ribosomal no ocurre en mutantes que no contienen organizadores nucleolares (39).

El proceso de la síntesis de ARN en vivo incluye varias etapas : iniciación, elongación y terminación de la cadena.

La mayor parte del conocimiento que se tiene actualmente de estos procesos fué obtenida en sistemas bacterianos libres de células, recientemente se comenzaron a estudiar esos procesos sintéticos, en nucleolos aislados de células de mamíferos y se ha concluído que los nucleolos aislados poseen los elementos necesarios para mantener la especificidad de la transcripción (23).

PROTEINAS NUCLEOLARES.

Los estudios de Vincent (1965), demostraron por medio de pruebas de solubilidad, electroforesis y características de antigenicidad, que existen proteínas comunes al nucleolo y a los ribosomas, así como otras que están presentes en aquel pero no en estos últimos. Las histonas existen en la misma proporción que el ADN.

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida - demuestra aproximadamente 200 proteínas en el nucleolo de las cuales hay unas 40 fosforiladas. Algunas de éstas proteínas han sido estudiadas con poca profundidad. (3).

CROMATINA NUCLEOLAR.

Bajo esta denominación generalmente se comprende el organizador nucleolar, es decir el ADN que contiene la secuencia donde está confinado el pre-rARN y una enorme cantidad de cromatina adjunta a él. Esa cromatina en su gran mayoría inactiva desde el punto de vista de la transcripción y aparece en los preparados de microscopía óptica y electrónica como la cromatina compacta perinucleolar. En los nucleolos aislados también aparece adherida al resto de la masa nucleolar (13, 17, 24, 43).

Pelling y Berman (1966) utilizan la autorradiografía después de la incorporación de la uridina tritiada (^3H); demostraron claramente que el organizador nucleolar es el sitio activo de la síntesis de ARN y no únicamente un simple lugar de acumulación.

Posteriormente se diseñó una técnica de impregnación con plata amoniacal, hay evidencias que tiñe únicamente a los organizadores nucleolares activos (21).

CICLO GENERACIONAL DEL NUCLEOLO.

Desde el siglo pasado se sabe que el nucleolo desaparece durante la profase o a más tardar a comienzos de la prometafase y reaparece en la telofase, manteniéndose visible durante la interfase. En la etapa de telofase, el material que se dispersa en profase participa en la reconstrucción de los nuevos nucleolos hijos, agrupándose alrededor del ó de los organizadores nucleolares. Estas descripciones fueron confirmadas en células vegetales con microscopía electrónica y con diferentes métodos citoquímicos (18).

Algunos estudios sobre células vegetales indican que el primer signo de reaparición del nucleolo es la formación de pequeños cuerpos densos o pronucleolos en varios *loci* de diferentes cromosomas, y luego emigran juntos o se fusionan, dando lugar a uno a más nucleolos característicos de la especie. Este proceso sugiere que el nucleolo telofásico puede tener un origen doble: el material transportado inespecíficamente por los cromosomas desde la profase y el sintetizado por los organizadores nucleolares (11).

ANTECEDENTES.

Los estudios realizados sobre morfometría y citología - hasta el momento han mostrado que existe una diferencia importante en el volumen nucleolar y nuclear en diferentes tejidos de un mismo organismo, esto ha sido relacionado con la actividad metabólica de la célula.

Estas variaciones en volumen se han tratado de explicar por medio de la utilización de técnicas donde se utilizan sustancias que inhiben (Actinomicina D, bleomicina, cordisepina, ciclohexamida, etc.) ó aumentan la actividad celular (como los esteroides). Otro método frecuentemente utilizado es la incorporación de sustancias precursoras marcadas con isótopos radiactivos en diferentes sistemas celulares, esto nos permite obtener una mejor idea de los sitios donde se lleva a cabo la síntesis de los diferentes-precursores que intervienen en el crecimiento y la maduración celular (12, 46, 49).

En los trabajos realizados por el Dr. Vázquez Nin y Col. sobre los efectos del estradiol en células endometriales de ratas castradas, se observó que después de la castración el volumen nucleolar disminuye, aplicando más tarde estradiol se observó un incremento en el volumen, utilizando uridina tritiada se pudo cuantificar la densidad de marcaje determinándose un incremento en la - síntesis de ARN en el nucleolo después de la aplicación del estradiol (48).

En células nerviosas de médula espinal cervical de embrión de pollo en diferentes estados de desarrollo, se demostró que el volumen nuclear varía irregularmente y la cantidad de ADN por núcleo celular permanece constante en cada uno de ellos, el volumen nucleolar total muestra diferencias significativas entre núcleos con uno y dos nucleolos. En aquellas células con mayor volumen nucleolar hay una mayor actividad metabólica, lo cual indica un mayor trabajo del organizador nucleolar (27).

Estudios realizados sobre el crecimiento de embriones de semillas en germinación (rabano, trigo), utilizando marcadores radiactivos específicos, han mostrado una mayor incorporación de - marcaje en el nucleolo que en otros lugares de la célula esto in-

dica que en el nucleolo se lleva a cabo una mayor síntesis de ARN (12).

OBJETIVOS.

Con base en lo mencionado el presente trabajo se propone determinar si hay diferencia en la síntesis del ARN prerribosomal en las células con uno y dos nucleolos mediante el uso de técnicas de coloración para microscopía óptica, análisis cuantitativo de la imagen, técnicas citoquímicas y autorradiografía cuantitativa, así como se expresa el organizador nucleolar en uno y dos nucleolos. - Para tal efecto se hicieron los siguientes estudios en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* ...

- Mediciones del volúmen nuclear en células con uno ó más nucleolos, así como el volumen total nucleolar.

- Determinación de la actividad transcripcional en los diferentes compartimientos celulares.

- Establecer la cantidad de cromatina por medio de la técnica de Feulgen y densitometría.

MATERIAL Y METODOS.

Los meristemos de raíz de cebolla (*Allium cepa*) fueron incubados en ^3H - uridina en dos periodos, uno por 30 min. y otro por 60 min. (New England nuclear, con una actividad específica de 2.5 Ci/nM a (300 $\mu\text{Ci/ml}$)).

Se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % disuelto en amortiguador de fosfatos a 0.1 M, pH 7.2 durante 90 min., se lavaron en ácido tricloroacético al 3% a temperatura ambiente para evitar en lo posible la radiactividad de fondo.

Nuevamente se lavaron en ácido tricloroacético y en amortiguador de fosfatos hasta la eliminación del fijador, más tarde las raíces fueron osmificadas con tetraóxido de osmio al 2% disuelto en el mismo amortiguador durante 90 min.

Se deshidrataron con alcoholes graduales de 70%, 80%, 90%, y alcohol absoluto, haciendo cambios cada 20 min., los meristemos se colocaron en óxido de propileno realizando cambios con duración de 15 min., cada uno.

Las raíces se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente en una mezcla que contenía 50% de Epon 812 y 50% de óxido de propileno, al término de esto se destaparon los frascos que contenían la mezcla para lograr la completa evaporación del óxido.

Finalmente se incluyeron en Epon 812 de dureza media y se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 24 horas, se realizaron cortes semifinos de 1 μm de espesor, para esto se utilizó un ultramicrotomo de la casa Sorvall; los cortes fueron adheridos a los portaobjetos por medio de calor.

AUTORRADIOGRAFIA.

Para la obtención de los autorradigramas se utilizó una emulsión autorradiográfica Ilford L₄ preparada con 24 horas de anticipación a su uso, como se explica a continuación:

Trabajando en la cámara oscura se dejó la emulsión durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la dilución en agua en una proporción de 3:1, se mantuvo durante 1 hora a baño María a una temperatura de 40°C, agitándola cada 15 min. (Larra y Droz, 1970; Jacob, 1971), la emulsión diluida se dejó a una temperatura de 4°C durante 24 horas.

La emulsión nuevamente fué llevada a la cámara oscura y mantenida a baño María a una temperatura de 40°C, la laminilla se cubrió por Inmersión, se dejaron secar y se guardaron en cajas negras durante un mes a 4°C.

Los autorradiogramas se revelaron utilizando el reactivo para película Kodak D 19, se dejaron secar a la temperatura ambiente; se colorearon con azul de toluidina al 1% durante 4 min., en baño María, evitando de esta forma el enmascaramiento de los gránulos de plata con los posibles precipitados del colorante.

Las micrografías se tomaron utilizando un microscopio de la casa Carl Zeiss y una película Plus X. Para estandarizar todos los procedimientos se utilizó siempre el objetivo 100 X, un aumento intermedio de 2X y un proyector 3.2 X, para los negativos se usó revelador HC-110.

La amplificación de las fotos fué siempre de 5.1 y se obtuvo un aumento final constante de 3296 X. En estas ampliificaciones se midieron las áreas nucleares, nucleolares y citoplasmáticas utilizando planimetría. Se contaron los gránulos de plata en cada uno de los compartimientos mencionados.

VOLUMEN NUCLEAR Y NUCLEOLAR.

Otras laminillas con cortes de meristemas de raíz fueron teñidas con azul de toluidina para determinar el volumen nuclear y nucleolar.

Los parámetros medidos son los siguientes: diámetro mayor nuclear, diámetro menor nuclear (Determinación del volumen nuclear); diámetro mayor nucleolar, diámetro menor nucleolar (determinación del volumen nucleolar).

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio de la casa Carl Zeiss, un ocular micrométrico, un objetivo de 100 X y un aumento intermedio 2X.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE CROMATINA EN NUCLEOS APLASTADOS POR MEDIO DE LA TECNICA DE FEULGEN.

Los meristemas de raíz de cebolla se colocaron en ácido acético al 20 % durante 20 min., se lavaron en agua destilada, para posteriormente realizar un aplastamiento con cada meristemo.

Fu  utilizado hielo seco para separar el cubreobjetos, el tejido ya extendido es fijado por medio de calor al portaobjetos.

Las laminillas se colocaron en una caja coplin con HCl, a 5 N a temperatura ambiente durante 1 hora, se enjuagaron con agua destilada para después tratarlos con el reactivo de Schiff durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 3 veces con una mezcla que contiene : 2.5 ml. de metabisulfito de sodio al 10 % , 2.5 ml. de HCl. al 1 N y 45 ml. de agua destilada, se prepara 5 min. antes de sacar las laminillas.

Se fotografiaron núcleos con uno y dos nucleolos, para esto se utilizó un microscopio de la casa Carl Zeiss y una película Technical-Pan, un objetivo 100 X, un proyector 8X y un filtro verde el revelador utilizado fué Kodak D 19.

Para determinar la cantidad de cromatina en cada núcleo los negativos se colocaron en un densitómetro Ortec 4310 (del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias), se utilizó una cuña de grises para calibrar el fondo del negativo procurando que este cruce en su totalidad al núcleo.

A las gráficas de porcentaje de trasmitancia obtenidas de cada medición se les determinó el área bajo la curva por medio de planimetría.

Finalmente los resultados obtenidos de todos los parámetros medidos fueron analizados estadísticamente calculando el valor promedio, varianza y desviación estadística, se evaluaron las diferencias en pares de grupos mediante la prueba de "t" de Student y la de Mann-Whitney para muestras pequeñas.

En todos los casos se utilizaron programas desarrollados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la U. N. A. M. por el Dr. G. H. Vázquez N n.

RESULTADOS

MORFOLOGIA

Apreciaciones visuales realizadas sobre cortes de meristemas de raíz de cebolla después de haberlos teñido con azul de toluidina nos permitió obtener los siguientes resultados.

Los núcleos son aproximadamente redondeados, algunos presentan uno o dos nucleolos y eventualmente tres, en aquellos que contienen un sólo nucleolo, este toma una posición central, en muy rara ocasión se puede encontrar en la periferia, en el caso de los núcleos con dos nucleolos, la posición de estos parece simétrica, pero este punto no está suficientemente estudiado.

El estudio morfológico de autorradiogramas nos muestra que después de un mes de exposición, las células de meristemas de raíz sometidos a pulsos de 30 y 60 min. de uridina tritiada, mostraron incorporación del material radiactivo.

En los resultados obtenidos se pudo observar una densidad de marcaje mayor en el nucleolo que en otros compartimientos celulares (ver tabla 1 y 2).

En los autorradiogramas de las células interfásicas con los distintos tiempos de incorporación, se realizó una cuantificación de la densidad de gránulos depositados en las diferentes zonas celulares. Los datos obtenidos de 30 y 60 min. de incorporación fueron procesados estadísticamente por separado, para posteriormente comparar los resultados de cada área respectivamente.

Así al comparar las zonas extranucleolares de núcleos con uno y dos nucleolos se encontró que no hay una diferencia significativa en la densidad de marcado ($p > 0.05$) (ver tabla 1 y 2).

Al comparar la densidad de marcado en las zonas nucleolares de núcleos con uno y dos nucleolos, la incorporación del precursor fué similar en ambos, no presentándose una diferencia significativa ($p > 0.05$), los mismos resultados fueron obtenidos al comparar las áreas citoplasmáticas (tabla 1 y 2; foto 1).

Fué determinado el volúmen nuclear de aquellas células con uno y dos nucleolos, los resultados de ambos grupos fueron comparados por medio de la prueba de "t" de Student, los resultados así obtenidos

no mostraron ninguna diferencia significativa en los volúmenes ($p > 0.05$) (ver tabla 3).

El volúmen nucleolar total en núcleos con uno y dos nucleolos se determinó de la misma forma que el volúmen nucleolar, los resultados obtenidos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) siendo mayor en aquellos núcleos con dos nucleolos (ver tabla 3).

Las preparaciones utilizadas para la determinación de la cantidad de cromatina en los núcleos de la células meristemáticas de raíz teñidas con la técnica de Feulgen, fueron observadas en el microscopio óptico, se pudo determinar que la cromatina nuclear se encontraba teñida de un color púrpura, y el área nucleolar permanecía desteñida (foto 2).

Cuando se obtuvieron las gráficas de porcentaje de trasmisividad de núcleos con uno y dos nucleolos se determinó el área bajo la curva y se procesaron estadísticamente los resultados obtenidos de cada grupo fueron comparados, no se encontró ninguna diferencia en la cantidad de ADN ($p > 0.05$) (ver tabla 4).

Tabla 1.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* con 30 min. de incubación con uridina tritiada.

ZONA EXTRANUCLEAR DEL NUCLEO.

NUCLEO

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	11.16	6.2	19	0.67 -
Núcleos con dos nucleolos	14.27	8.89	2	

NUCLEOLO

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	12.84	5.56	19	0.097 -
Núcleos con dos nucleolos	13.17	7.25	4	

CITOPLASMA

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	6.19	2.95	19	0.14 -
Núcleos con dos nucleolos	5.55	3.54	2	

LAS UNIDADES EN QUE SE EXPRESAN ESTAS TABLAS ES NUMERO DE GRANULOS POR UNIDAD DE AREA.

Tabla 2.- Comparación entre la densidad de marcado en células de *Allium cepa* con 60 min. de incubación con uridina tritiada.

ZONA EXTRANUCLEAR DEL NUCLEO.

NUCLEO.

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	15.85	3.73	34	1.34 -
Núcleos con dos nucleolos	12.8	2.31	3	

NUCLEOLO

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	24.5	11.49	34	0.74 -
Núcleos con dos nucleolos	20.82	7.47	6	

CITOPLASMA

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	15.65	11.6	32	0.27 -
Núcleos con dos nucleolos	13.69	9.87	3	

LAS UNIDADES EN QUE SE EXPRESAN ESTAS TABLAS ES NUMERO DE GRANULOS POR UNIDAD DE AREA.

Tabla 3.- Comparación del volúmen nuclear y nucleolar con células con uno y dos nucleolos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa*.

VOLUMEN NUCLEAR				
	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	507.0	257.8	485	1.19 -
Núcleos con dos nucleolos	533.16	201.0	198	

VOLUMEN NUCLEOLAR				
	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	14.23	7.0	322	4.5 +
Núcleos con dos nucleolos	20.57	9.0	116	

LAS UNIDADES EN QUE SE EXPRESAN ESTAS TABLAS ES EN MICRAS CUBICAS.

Tabla 4.- Determinación de la cantidad de cromatina de núcleos con uno y dos nucleolos por medio de la técnica de Feulgen y densitometría.

CANTIDAD DE CROMATINA.

	\bar{X}	des	N	"t"
Núcleos con un nucleolo	10.15	3.83	17	0.45
Núcleos con dos nucleolos	9.48	4.48	17	

LAS UNIDADES EN QUE SE EXPRESAN ESTAS TABLAS SON UNIDADES ARBITRARIAS.



Fig. 1.- Micrografía óptica de células meristemáticas de raíz de cebolla en interfase, incubadas con uridina H^3 durante 30 min., núcleo (Nu), nucleolo (nu), - citoplasma (Ci), gránulos de plata (flechas).

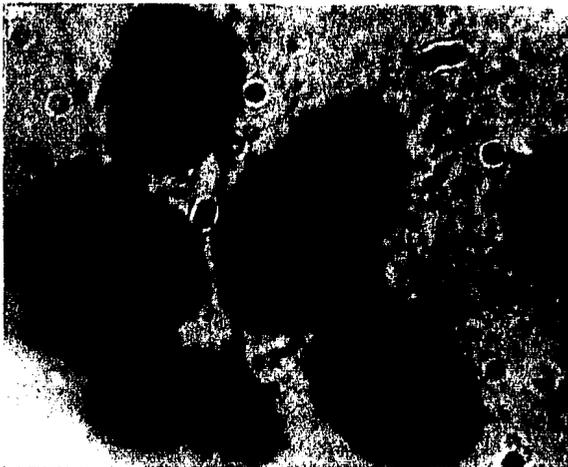


Fig. 2.- Micrografía óptica de células meristemáticas de raíz de cebolla, tratadas con la técnica de Feulgen Cromatina (Cr) y nucleolo (nu).

D I S C U S I O N.

El presente estudio a nivel de microscopía óptica en células interfásicas de meristemas de raíz de *Allium cepa* nos ha permitido establecer ciertas características en la morfología, así como en su actividad metabólica y su contenido de ADN.

La determinación del volúmen nuclear no demostró diferencia alguna en los grupos de núcleos con uno y dos nucleolos.

Las diferencias encontradas en la determinación del volúmen nucleolar en las células con uno y dos nucleolos, se ha interpretado como una diferencia en su actividad metabólica en la síntesis de ARN prerribosomal. Esto pudo ser comprobado cuando las células meristemáticas fueron incubadas durante 30 y 60 min. con uridina tritiada, que es un precursor específico del ARN, en ambos tiempos de incubación se pudo determinar que de los compartimientos celulares, el que presentó un mayor marcaje era el nucleolo, lo cual coincide con lo observado en los trabajos de Delseny 1980/81; Fakan 1981; Vázquez Nin 1983. Al comparar el análisis cuantitativo del marcaje en células con uno y dos nucleolos se pudo determinar que la actividad de la síntesis por unidad de volúmen es la misma. Como las células con dos o más nucleolos tienen un volúmen nucleolar mayor que los que tienen sólo uno, se deduce que aquellos sintetizan más ARN prerribosomal que éstos. Estos resultados también han sido reportados en otros sistemas celulares en las que se ha tratado de establecer una relación entre el tamaño del nucleolo y la síntesis de ARN, así podemos mencionar los trabajos clásicos de MacCarty y col (1936), Edstron (1951) y otros donde se comparan datos morfométricos y autorradiográficos (46,47), así como resultados estereológicos y fisiológicos (48, 49).

Se ha determinado que después de que se realiza la síntesis de ARN, es transportado al citoplasma donde es traducido en proteínas (12, 15).

Nosotros esperábamos encontrar una mayor densidad de marcaje en el citoplasma de aquellas células con nucleolos de mayor vo-

lumen ya que estos han demostrado que tienen más cantidades de síntesis de ARN, pero al comparar las áreas citoplasmáticas de células con uno y dos nucleolos no se encontró diferencia alguna. Esto podría explicarse de la manera siguiente: la densidad de marcaje es similar porque el volumen citoplasmático de las células con dos nucleolos sean mayor que los de un sólo nucleolo o bien que parte de la síntesis de ARN está siendo almacenado en el núcleo por algún mecanismo de la propia célula y es por esto que no se aprecia diferencia alguna en la densidad de marcaje en el citoplasma.

Durante la década de los cuarenta se llevaron a cabo muchos estudios citoquímicos sobre los ácidos nucleicos nucleolares y citoplasmáticos, los que permitieron llegar a conocimientos tan importantes como la constancia del ADN por núcleo y la relación del ARN con la síntesis de proteínas (14).

Por medio de la técnica de Feulgen se ha permitido determinar la cantidad de ADN en diferentes tipos celulares, en las células meristemáticas interfásicas de *Allium cepa* la cantidad de ADN no presentó alguna diferencia significativa en aquellas células con uno y dos nucleolos. Hasta el momento no se ha podido establecer una relación directa entre el volumen nuclear observado y la cantidad de ADN en éstos, se ha observado que a menudo los núcleos de diferentes tejidos varían ampliamente en el volumen, pero conservan una cantidad constante de ADN (ó ploidia). Se ha observado que en la transformación de neuroblastos bipolares a neuroblastos multipolares es acompañado por una descompactación de la cromatina, como un pequeño aumento en el volumen nuclear y en el aumento total de partículas RNP. Se puede pensar que esta descompactación observada en la cromatina sea el inicio para que se desencadenen una serie de procesos que aumenten el volumen nuclear (49).

Varios trabajos se han realizado para tratar de determinar los lugares o sitios donde se lleva a cabo la síntesis de ARN en la célula, para esto se han desarrollado técnicas citoquímicas y autorradiográficas, la técnica de tinción de plata amoniaca! impregna únicamente a los organizadores nucleolares activos. Con esta técnica se ha determinado que la transcripción tiene lugar en los centros fibrilares que contienen ADN_r en el nucleolo. Se ha observado que con esta técnica

el número de centros fibrilares se incrementa cuando la actividad celular aumenta (17, 21, 24, 34, 43).

Con base en esto y de acuerdo a nuestros resultados sobre la constancia en la densidad de marcaje, en el ploidismo así como en la variación del volumen nucleolar, nos indican una mayor actividad metabólica en las células que contienen un mayor volumen nucleolar y este aumento en la transcripción del ARN prerribosomal se debe probablemente a las variaciones fisiológicas de activación de estos centros fibrilares existentes en el juego diploide normal de los cromosomas.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Núcleos de células meristemáticas de *Allium cepa* con uno y dos nucleolos tienen igual cantidad de ADN.
- 2.- En *Allium cepa* la actividad de síntesis de ARN prerribosomal es mayor en células con mayor volumen nucleolar debido a una mayor actividad del organizador nucleolar.
- 3.- La síntesis de ARN prerribosomal en *Allium cepa* es independiente del ploidismo.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Bernhard, W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.*, 27, 250-265; 1969.
- 2.- Bernhard, W. Simposio Internacional " El nucleolo, estructura y función " Resumen de las Comunicaciones. 10-11; 1965.
- 3.- Bouteille, M. Ultrastructural localization of proteins and ribonucleoproteins in the interphase nucleus. 5^o Simposium Gen Transcription In Reproductive Tissue, Mayo 1972.
- 4.- Brachet, A., et Verne, J., *Precis d' histologie*, 4^o Edición, - Masson et Cie. 30-31; 1956.
- 5.- Buch, H. Roo, N.R., and Tothblum, L.I., en *The cell nucleus* - Academ. Press. New York. Vol. 5; 1978.
- 6.- C. Merian and B. Roux, *Nucleosomes arrangement in chromatin* Vol. 5, No. 11; 1978.
- 7.- Caspersen , T., Landstroem-Jyden, H., and Aquilonius, L., *Chromosoma* 2; 111; 1941.
- 8.- Castañeda, M., *Antología de Biología Molecular. Primera Edición* U. N. A. M., 220- 225; 1973.
- 9.- Cole, R.D., Lawson, G.M. and Hsiang, M.W., *H1 histone and the condensation of chromatin and DNA.* Vol. XLII; 253-263; 1978.
- 10.- Darnell, J.E., *The procesing of ARN*, *Sc. Am.* Vol. 249, No. 4 - 70-83; 1983.
- 11.- De Robertis, D. and De Robertis, *Biología Celular y Molecular, - Décima Edición.* " El Ateneo ". Buenos Aires; 301-328; 1983.
- 12.- Delseny, M. and Lorette, A. and Cooke, R., *Studies on ribonucleic acids during radish seed germination: Asearch for potential regulatory mechanisms.* *Israel Journal of Botay*, Vol. 29; 24-258; 1980/81.
- 13.- Dominique, P. Bendayan, M. and Jean-Jacques, D., *Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins and nucleic acids in reticulate nucleoli*, *Biology of the cell.* Vol. 49, No. 1; 29-34; 1983.
- 14.- Du Praw, E.J., *Biología Celular y Molecular.* Omega. Barcelona 252-276; 1971.
- 15.- Dyson, R.D., *Principios de Biología Celular.* Fondo Educativo Interamericano, S.A., México. 320-342 , 1977.
- 16.- Edstron, J.E., *Comp. Neurol.* 107; 195; 1951.

- 17.- Esponda, P. and Giménez - Martín, G., Ultrastructural morphology of the nucleolar organizing region. *J. Ultra. Res.* 59: 509-519; 1972.
- 18.- Estable, C. and Sotelo, L.R., Symposium on fine structure of cell. *Congress cell biol. Leyden*; 170-190; 1955.
- 19.- Fakan, S., Puvion, E. and Spohr, G., Localization and characterization of newly synthesized RNA in isolated rat hepatocytes. *Exptl. Cell. Res.*, 99; 155-164; 1976.
- 20.- Feulgen, R. and Rossembeck, H. Z., *Phys Chem.* 135-203; 1924.
- 21.- Goodpasture, C., Bloom, S.E., Visualization of nucleolar organizing regions in mammalian chromosomes using silver staining *Chromosoma* 53; 25; 1975.
- 22.- Granboulan, N. and Granboulan, Ph., *Cytochimie ultrastructurale du nucleole II. Etude des sites de synthese de RNA dans le nucléole et le noyau.* *Exp. Cell Res.*, 38:604, 1965.
- 23.- Grumnt, I., *In the cell nucleus.* Academic Press, New York, Vol. 5; 373-414; 1978 .
- 24.- Guy, G. and Lepoint, A., The nucleolus-organizing regions (NOR'S) Recent data and hypotheses, *Extrait de biologie cellulaire*, Vol. 35:211-220; 1979.
- 25.- Huges, A., *History of Citology*, Abelard-Schuman London 1959 .
- 26.- Jacob, J., *Revue generale sur l' autoradiographie en microscopie électronique .* *Int. Rev. of Cytology* 30: 91-181; 1971.
- 27.- Jiménez, G.L., González, J.M., Tobalina, A.F., Echeverría, O. M., Vázquez Nin, G.H., *Algunas observaciones sobre la regulación de la síntesis de ARN prerribosomal en células animales y vegetales.* *Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.* 1974.
- 28.- Larra, F. and Droz, B., *Revue générale sur l' autoradiographie en microscopie électronique.* *J. Microscopie* 9: 845-880; 1970.
- 29.- Lehninger, A.L., *Biochemistry.* Worth Publishers. Inc. New York 435-486; 1970.
- 30.- Mac Carty, W.C., *Am. J. Cancer* 26-529; 1936.
- 31.- Mac. Clintook, B., Zellforsh, Z., *Mikrosk. Anat.* 21:294; 1934.
- 32.- Mirsky, A.E., the discovery of DNA. *SC. Am.* Vol. 218: 78-88; 1968
- 33.- Monneron. A. and Bernhard, W., Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultra. Res.* 27:266-288; 1969.

- 34.- Moreno-Díaz de la Espina, S., Ultrastructural aspects of nucleolar fibrillar centres in meristematic cells of *Allium cepa*. *Rxpec.* 32: 1384-1387; 1976.
- 35.- Moyné, G., Feulgen-Derived technique for electron microscopical cytochemistry of DNA. *J. Ultr. Res.* 45: 102-123; 1973.
- 36.- Novikók, A. B., and Eric H., Estructura y Dinámica Celular segunda Edición, pag. 325-328; 1968.
- 37.- Oudet, P., Germond, J. E., Spadafora, G. And Chambon, P., Nucleosome structure. *Phil. Trans. Soc. Lond. B.* 283:241-258; 1978.
- 38.- Perry, R. P., Simposio Internacional " El nucleoló, estructura, y función " Resúmenes de los trabajos; 18-19; 1965:
- 39.- Perry, R. P., The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48:2179; 1962.
- 40.- Raska, t., Rychter, Z. and Smetana, K., Fibrillar centres and condensed nucleolar chormatin in resting and stimulated human lymphocytes. *Vol. 97:15-32; 1983.*
- 41.- Reaney, D.C., On te origin of prokaryotes. *J. Theor. Bio.* 48: 243-251; 1974.
- 42.- Ris, H., An interpretation of ultrastructure. *Sym. Int. Soc. Cell Biol.* 1:69; 1962.
- 43.- Risueño, M. C.; Medina, F. J., Moreno-Díaz de la Espina. Correlation of nucleolar activity and the nucleolar organizing region (NOR) ultrastructure in plants. *Biol. Cell.* 39:167-170; 1980.
- 44.- Schopf, J. W., La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia, Barcelona, España.* pag. 65-74; 1978.
- 45.- Swift, M., Interpretation of ultrastructure. *Symp. Inter. Soc. Cell. Biol.* 1:213-232; 1962.
- 46.- Vázquez Nin, G.H., Echeverría, O. M, and Pedron, J., Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cell, *Bio. Cell.* 35:223-228;1979.
- 47.- Vázquez Nin, G.H. and Bernhard, W., Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani Ring-granules. *J. Ultr. Res.* 36; 842-860; 1979.
- 48.- Vázquez Nin, G.H., Echeverría , O.M., Molina, E. And Fragosó, J. Effects of ovariectomy and estradiol injection on the nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat.,* 102: 308-318; 1978.

- 49.- Vázquez Nin, G.H., Echeverría , O.M., Ortega-Rangel, J.A., Parra Luna, R. and Jiménez-García, L.F., Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition-during neuronal differentiation and maturation. Biol. Cell. 48:17-24 1983.
- 50.- Villanueva, J.R., La célula viva. segunda edición; Editorial Blume. México pag. 15-18; 1970.
- 51.- Watson, M. L., Observations and granule associates with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. J. Cell. Biol. 14:162-167; 1962.
- 52.- Watson, D. J., Biología Molecular del Gen. Fondo Educativo Interamericano, S.A., México, pag. 281-479; 1970.