

00341
1
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INMUNOLocalizaciOn ULTRAESTRUCTURAL
DE ACIDOS NUCLEICOS EN CELULAS
MERISTEMATICAS RADICALES DE *Allium cepa*.

T R A B A J O
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
Especialista en Microscopía Electrónica
Aplicada a las Ciencias Biológicas
P R E S E N T A
REBECA ISABEL NAJERA BELFORT

Director del trabajo:

DRA. OLGA M. ECHEVERRIA MARTINEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

INMUNOLOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE ACIDOS NUCLEICOS
EN CELULAS MERISTEMATICAS RADICALES DE *Allium cepa*.

T R A B A J O
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
Especialista en Microscopía Electrónica
Aplicada a las Ciencias Biológicas
P R E S E N T A
REBECA ISABEL NAJERA BELFORT

Director del trabajo: DRA OLGA M. ECHEVERRIA MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1994

**INMUNOLocalIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE ACIDOS NUCLEICOS
EN CELULAS MERISTEMATICAS RADICALES DE *Allium cepa*.**

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía
Electrónica, de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.**

Quisierá agradecer sinceramente a las siguientes personas:

Dra. Olga M. Echeverría M. Directora de Tesis, por su paciencia, guía y apoyo, y por todos sus conocimientos y experiencia que me brindó en la elaboración de este trabajo.

Dr. Hebert G. Vázquez-Nin por permitirme el realizar mi tesis dentro de su grupo de trabajo, por su constante apoyo y sus valiosas aportaciones que me brindó en la elaboración de este trabajo.

Dr. Luis Felipe Jiménez García por revisar y hacer importantes sugerencias en la escritura de este trabajo.

M. en C. Marco Antonio González Martínez por revisar este trabajo, y su apoyo en la realización de las técnicas empleadas.

Dr. Miguel Lara Flores por aceptar incondicionalmente ser mi revisor en este trabajo.

Un agradecimiento muy especial para las siguientes personas:

Dra. Gloria Soberón Chávez de quien he recibido su apoyo en mi formación profesional, así como su entusiasmo para que realizara la especialidad en Microscopía Electrónica.

Dr. Jaime Martínez Salazar por sus ánimos e ideas para el mejoramiento del trabajo escrito.

Biol. Beatriz Palmeros Sánchez por su amistad, su apoyo y constantes e incansables estímulos para lograr la terminación de esta etapa.

A mis compañeras y amigos.

Quiero dedicarla:

A mi Familia

A Lucio, a July y Ari para que logren algun día
mayores éxitos en su camino por la vida.

A mis Padres

Julieta Y Rogerio

INDICE

1. Resumen.
2. Introducción.
 - 2.1 *Allium cepa*.
 - 2.1.1 Tejido meristemático radical
 - 2.1.2 Estructura celular
 - 2.1.3. Núcleo
 - A Envoltura nuclear.
 - B Cromatina
 - 2.1.4 Ribonucleoproteínas.
 - A Nucleolo.
 - B Fibras pericromatinianas.
 - C Granulos pericromatinianos.
 - D Granulos intercromatinianos.
 - 2.1.4 Splicing.
 - 2.2 Inmunolocalización.
3. Objetivo.
4. Materiales y metodología.
 - 4.1 Preparación de las muestras.
 - 4.2 Observación de las muestras.
 - 4.3 Inmunolocalización.
 - 4.3.1 Tabla
 - 4.4 Observación.
 - 4.5 Diagramas de flujo.
5. Resultados.
 - 5.1 Figuras
6. Discusión.
7. Conclusiones.
8. Referencias.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la distribución de ácidos nucleicos en células meristemáticas radicales de *Allium cepa* (cebolla).

Se procesó el tejido vegetal con técnicas convencionales para microscopía electrónica, fijados en paraformaldehído al 4% e incluidos en resina de London Resins White (L. R. White). Para el inmunomarcaje se utilizaron cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de grosor que se incubaron en presencia de los diferentes anticuerpos y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo.

La localización fue realizada por medio de inmunolocalización indirecta con dos anticuerpos a nivel ultraestructural, utilizando para ello anticuerpos específicos como α DNA contra ácido desoxirribonucleico (DNA), Y12 contra ribonucleoproteínas de pequeño tamaño (snRNPs), α U₁ contra ribonucleoproteínas de pequeño tamaño de U₁ (U₁snRNPs), FA₁₂ contra ribonucleoproteínas heteronucleares (hnRNPs) y R₁₁₃₁ contra 5'-CAP.

Los resultados muestran que las partículas de oro del α DNA se encuentran localizadas principalmente en la cromatina compacta de núcleos de células meristemáticas radicales de *Allium cepa* (cebolla). En la pericromatina encontramos los snRNPs, U₁snRNPs, hnRNP y 5'-CAP.

Se concluye que empleando técnicas de inmunocitoquímica y anticuerpos específicos se reconocen en las células vegetales moléculas de DNA, snRNPs, U₁snRNPs, hnRNP, 5'-CAP similares en morfología y composición a las de los núcleos de células animales.

INTRODUCCION.

Allium cepa (cebolla)

La palabra cebolla empezó a utilizarse en el siglo XII, siendo su procedencia el término *Caepulla*, diminuto de *Caepa*, nombre que utilizaban los latinos para designar a la cebolla. Pertenece al género *Allium*, de la familia de las Liliáceas, y casi todos sus miembros son plantas silvestres. La cebolla es una planta monocotiledónea que tiene generalmente entre unos 60 a 80 cm de altura y contiene: disulfuro de alilpropilo, hierro, una esencia lacrimógena, azúcares, vitaminas B, C y D, calcio, magnesio, sodio y potasio, entre otras sustancias.

Se cultiva en Europa y América principalmente, se puede cultivar a partir de semillas o transplante, aunque generalmente es más fácil del último modo. Florece en verano y sus flores forman un ramillete en forma de globo. Las flores tienen seis pétalos blancos, pequeños y extendidos, con seis estambres.

En cuanto a los frutos de la cebolla, son diminutas cápsulas llenas de semillas negras y pequeñas. La cebolla es un bulbo redondo y esta formado de varias capas delgadas, hacia el cuello del bulbo encontramos las hojas y hacia la base está la raíz, que por lo general no es abundante, ni gruesa.

Tejido meristemático radical

El tejido meristemático está constituido por células generalmente pequeñas, con membranas muy delgadas, citoplasma abundante, sus vacuolas son pequeñas y numerosas, su núcleo es voluminoso, el condrioma que presentan es homogéneo, carecen de plastos.

En la raíz, como en toda la planta se llevan a cabo diferentes procesos como son el de división celular, aumento y maduración de las células.

Los ápices de las raíces en crecimiento han sido usados a menudo en estudios sobre el desarrollo vegetal. La zona activa de células en división celular en raíz, se extiende a considerable distancia del ápice. La distribución de la actividad meristemática difiere, en las diversas regiones de la raíz.

En raíces de *Allium cepa*, el primer estadio de desarrollo de las células basales del ápice, es un engrosamiento radial sin aumento de longitud, excepto el asociado con las divisiones celulares. Poco antes de que se alcance el diámetro final, las células empiezan a alargarse, lentamente al principio y acelerándose después. La división celular es propia de células que experimentan un engrosamiento y alargamiento radial. En la región del engrosamiento radial la membrana es todavía pobre en sus componentes de celulosa, pectina y los polisacáridos no celulósicos. Durante la transición del estadio de desarrollo al de alargamiento radial, todos los componentes celulares experimentan un aumento en cantidad, y la pectina aumenta por unidad de superficie con respecto a la membrana. Durante el alargamiento, el aumento en componentes celulares es directamente proporcional al aumento en superficie de la célula. Después del estadio de alargamiento radial, los componentes aumentan notablemente por unidad de superficie de la pared celular.

Parece existir una relación casual entre el ritmo de crecimiento de la raíz y la proximidad de los elementos maduros al meristemo apical, ambos hechos son afectados por condiciones ambientales, por el tipo de raíz y por el estadio de su desarrollo.

En la raíz el sistema vascular se diferencia como estructura axial independiente de los órganos laterales y es posible reconocer la dirección en la que se lleva a cabo la diferenciación del meristemo vascular primario en la misma. A medida que el meristemo apical añade nuevas células, la delimitación del tejido meristemático se presenta en las nuevas porciones de la raíz.

Estructura celular.

En la actualidad con el empleo de técnicas de microscopía electrónica se ha llegado al conocimiento de la organización ultraestructural y molecular de las células procariontes y células eucariontes. La estructura interna de las células eucariontes resulta ser más compleja que las de células procariontes (Darnell *et al.* 1990). Ambos tipos celulares están rodeados por una membrana plasmática y además las células eucariontes contienen membranas internas que limitan y separan regiones específicas del resto del citoplasma. Estas membranas definen a las estructuras subcelulares llamadas organelos (Darnell *et al.* 1990); generalmente el organelo mas grande en la célula es el núcleo. Otros organelos celulares son las mitocondrias, en las que se genera la oxidación de pequeñas moléculas generadas por ATP celular; el retículo endoplásmico rugoso y liso, que es un complejo de membranas en el cual se lleva a cabo la síntesis de proteínas y lípidos; aparato de Golgi que tiene varias funciones, de las cuales las principales son la segregación y concentración del material sintetizado por la célula; las vacuolas u organelos que almacenan fluidos celulares, agua, iones y nutrientes como sacarosa y desechos moleculares (Darnell *et al.* ,1990 y De Robertis y De Robertis, 1983).

Núcleo.

Dentro de la célula, cada organelo desempeña una función determinada en el desarrollo y metabolismo de la célula (Darnell *et al.*, 1990). El núcleo, es el organelo en el cual se lleva a cabo unas de las funciones mas importantes de la célula: la replicación y la transcripción genética.

En su interior se alojan las desoxirribonucleoproteínas, ribonucleoproteínas, histonas o proteínas basicas llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4, proteínas no-histonicas como DNA-polimerasas, RNA-polimerasa, helicasas, topoisomerasas etc. y el nucleolo o nucleolos (Darnell *et al.*, 1990). Algunas de las proteínas antes mencionadas influyen en la replicación del DNA y en la transcripción del DNA a RNA (Albert *et al.*, 1989).

Envoltura nuclear.

El núcleo celular está formado de complejos multimacromoleculares delimitado por la envoltura nuclear. Esta última es una estructura formada por dos membranas; la membrana externa que está en continuidad con el retículo endoplasmático y la membrana interna que se encuentra en estrecha relación con la cromatina compacta (Albert *et al.*, 1989). Las dos membranas están separadas por una cisterna perinuclear y presentan discontinuidades o poros nucleares; cada uno de los cuales está rodeado por una estructura discoidal llamada anillo, que junto con el poro forman el complejo de poro nuclear. Estos complejos de poro están compuestos de un anillo circular de 70 a 80 nm de diámetro, el cual esta revestido por 3 anillos compuestos a su vez por ocho proteínas. A través de estos poros se lleva a cabo el intercambio de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (Albert *et al.*, 1989).

Adherida a la parte interna de la envoltura nuclear se localiza la lámina nuclear, la cual es una estructura fibrosa formada por tres proteínas denominadas laminas descrito en (Jiménez-García y Segura, 1993). Se piensa que la lámina nuclear desempeña un papel importante en la organización de la envoltura nuclear y que también mantiene la cromatina condensada o inactiva en la periferia, distante de la cromatina laxa o activa (Albert *et al.*, 1989).

Cromatina.

Una fibra de cromatina es una cadena flexible de nucleosomas enlazados entre sí, como las cuentas de un collar. Esta forma estructural requiere de la participación de 8 moléculas de histonas, dos copias de cada uno de los 4 tipos altamente conservados, H2A, H2B, H3 y H4 (Darnell *et al.*, 1989).

Así, en cada nucleosoma las histonas forman un núcleo protéico, alrededor del cual se enrolla en forma de espiral un fragmento de 146 pb de DNA de doble cadena (Albert *et al.*, 1989). Un nucleosoma se une al siguiente, por medio del llamado DNA enlazante, al cual se encuentra asociada la histona H1, que le da flexibilidad y plegamiento a la cadena de nucleosomas (Albert *et al.*, 1989).

En células eucariontes existen dos tipos de cromatina: la compacta también llamada heterocromatina y considerada transcripcionalmente inactiva y la cromatina no-condensada o eucromatina (Albert *et al.*, 1989 y en Jiménez-García y Segura, 1993). Esta última es transcripcionalmente activa, y se puede observar a nivel de microscopio electrónico con la técnica descrita por Vázquez-Nin *et al.* (1973). La eucromatina la podemos encontrar distribuida laxamente entre la cromatina compacta en el núcleo (Monneron y Bernhard, 1969). La

cromatina compacta se localiza a lo largo de la membrana interna de la envoltura nuclear, asociada a los nucleolos y en forma de cúmulos dispersos en el nucleoplasma.

Nucleolo.

El nucleolo es un organelo celular que solo es visible en el núcleo interfásico o núcleo que no está en mitosis ya que desaparece al comienzo de la etapa de profase para reaparecer al final de la telofase. Funcionalmente, el nucleolo es el sitio donde se sintetiza y procesa el RNA prerribosómico (prerRNA), después de ser procesado el rRNA también es ensamblado en el nucleolo para formar los ribosomas mencionado en (Jiménez-García y Segura, 1993). Al microscopio electrónico se observa formado de estructuras granulares y fibrilares, las cuales se denominan centros fibrilares, componente fibrila denso y región granular. El nucleolo en células animales y algunas células vegetales se encuentra delimitado por la cromatina perinucleolar en (Jiménez-García, 1988).

Los centros fibrilares están formados de: fibras pertenecientes a los organizadores nucleolares (NORs), la RNA polimerasa I encargada de transcribir el rDNA, las proteínas del organizador nucleolar que se tiñen con plata (Ag-NORs). Estos centros también son ricos en fibrilarina y la fosfoproteína C23. En estos centros fibrilares puede ocurrir la transcripción temprana del prerRNA.

La región fibrilar densa está compuesta de abundantes fibras de 40 a 80 Å de espesor. Contiene proteínas que se tiñen con plata (Ag-NORs), fibrilarina y los fosfoproteínas C23 y B23. Probablemente representa el sitio con más actividad transcripcional y de procesamiento del pre-rRNA.

La región granular está constituida de gránulos de 150 a 200 Å de

diámetro, es rica en la fosfoproteína B23 e intermediaria del procesamiento del precursor pre-rRNA. Representa el sitio de procesamiento más tardío, en la maduración y almacenamiento de prerribosomas.

Ribonucleoproteínas (RNPs) extranucleolares.

En 1969 Bernhard desarrolló una nueva técnica para visualizar estructuras que contienen RNA y proteínas, como son las ribonucleoproteínas (RNPs), se han clasificado en: fibras pericromatinianas (FPC), los gránulos pericromatinianos (GPC), los gránulos intercromatinianos (GIC), los cuerpos espiralados (CE).

Fibras pericromatinianas (FPC).

Las fibras pericromatinianas presentan forma irregular, un diámetro variable entre 30 a 50 Å, se localizan en el borde de la cromatina compacta, y son fácilmente destruidas por RNAsas.

En 1989 Jiménez-García *et al.* describe la presencia de las fibras pericromatinianas en células de animales, plantas y hongos, observaron que estas se localizan principalmente en la periferia de la heterocromatina, o región pericromatiniana y ocasionalmente las encontramos en el espacio intercromatiniano, sobre todo cuando se realiza la síntesis de RNA.

Los estudios autoradiográficos y citoquímicos de Fakan y Bernhard (1973); sugiere que existe la migración de las fibras pericromatinianas hacia el espacio intercromatiniano, en donde se entremezclan con la cromatina dispersa. También se ha demostrado que las fibras pericromatinianas contienen elementos proteicos relacionados con la eliminación de los intrones, las snRNPs y el factor esencial de splicing llamado SC35 que no forma snRNPs durante el procesamiento nucleotídico del pre-mRNA o splicing (Spector *et al.*, 1992).

Gránulos Pericromatinianos (GPC)

Utilizando la técnica del EDTA Monneron y Bernhard (1969) observaron en células de mamíferos los gránulos pericromatinianos como cuerpos esféricos de 300 a 500 Å de diámetro y rodeados por un halo claro de aproximadamente 250 Å de espesor. Los GPC están localizados en la periferia de la cromatina compacta y se encuentran formados de fibras de 10 a 30 Å de diámetro irregularmente enrollados. Vázquez-Nin (1971) sugiere que los GPC se forman por el enrollamiento de las fibras pericromatinianas durante el proceso de transcripción y en Jiménez-García y Segura (1993).

Vázquez-Nin y Bernhard en (1971) encontraron similitudes entre los gránulos pericromatinianos y los gránulos de Balbiani, estos últimos atraviesan el poro nuclear hacia el citoplasma en forma de bastones y los granulos pericromatinianos parece ser que atraviesan el poro en forma de fibra. En estudios realizados por Vázquez-Nin *et al.* (1990) se demuestra que estos gránulos son formas de almacenamiento y transporte del RNA mensajero, después de que ha sido procesado.

Granulos intercromatinianos (GIC).

Estas estructuras nucleares son partículas de 200 a 250 Å de diámetro, en células de mamíferos se asocian en cúmulos interconectados por fibras. En contraste, en células de plantas e invertebrados, son escasos y se observan muy dispersos; se encuentran en grupos pequeños y distribuidos al azar en las áreas intercromatinianas. (Jiménez-García *et al.*, 1989).

Empleando técnicas de inmunolocalización y posterior análisis ultraestructural, Spector *et al.* (1983) y Fakan (1984) demostraron que los GIC contienen ribonucleoproteínas de pequeño tamaño (snRNPs) . Los GIC parecen estar relacionados con el almacén y/o ensamblado de proteínas y

RNAs en (Jiménez-García y Segura, 1993).

Splicing.

El splicing o procesamiento del hnRNA para convertirlo en mRNA maduro, consiste en el corte específico de los intrones o regiones no codificadoras por medio de una operación compleja realizada por los spliceosomas. Estas estructuras nucleares están compuestas de pre-mRNA, snRNPs (U_1 , U_2 , U_4 , U_5 y U_6) y factores de splicing que no forman snRNPs (SC35). En este proceso en el que participan elementos con acción en cis y en trans, existen secuencias consenso específicas para el corte y el empalme de los presensores del mRNA; así es un mecanismo de transesterificación que involucra dos pasos, el de ruptura y el de ligado. La secuencia en que se lleva a cabo este proceso es la siguiente: primero U_1 snRNP interacciona con el pre-mRNA en el sitio de unión, entre el primer exón y el intrón, en ausencia de ATP. Después se incorpora U_2 snRNP, el cual interacciona a su vez con el sitio de empalme, en una reacción dependiendo de ATP. Enseguida se le unen U_5 snRNP y el conjunto de U_4/U_6 snRNPs. Después de un cambio conformacional que provoca la desestabilización del apareamiento de bases entre U_2 y U_4 snRNAs de las correspondientes snRNPs, se produce un spliceosoma activo. En el cual inmediatamente ocurre la reacción de corte o splicing (Steitz, 1988)

Inmunolocalización

En los últimos años, la Inmunolocalización ha tenido un desarrollo tan acelerado que se ha convertido en una técnica fina y directa utilizada en estudios a nivel ultraestructural (Spector, 1983; Fakan, 1986; Vázquez-Nin, 1990; Moreno Díaz de la Espina, 1992). Con ayuda de esta técnica se han identificado y localizado, tanto en células animales como en células

vegetales, gran diversidad de moléculas, algunas tan importantes como el DNA (Acido desoxirribonucleico), el RNA (Acido ribonucleico), los snRNPs (Ribonucleoproteínas de tamaño pequeño) y hnRNPs (Ribonucleo proteínas heteronucleares). De esta manera, también se han podido localizar a nivel Ultraestructural, algunos de los sitios en los cuales se llevan a cabo ciertas funciones celulares, tales como el procesamiento del DNA, RNA y proteínas (Sass, 1984; Puvion, 1984; Lesser, 1989; Vázquez-Nin, 1986,1990).

La Inmunolocalización se basa en la detección de antígenos utilizando anticuerpos que reaccionan específicamente con ellos. Los antígenos son moléculas diversas como proteínas, polisacaridos, lípidos y ácidos nucleicos. Estas moléculas purificadas y administradas a un animal distinto del cual se obtuvieron, activan el sistema inmune, produciendo los anticuerpos. Los linfocitos, son las células que a través de un largo proceso producen anticuerpos específicos contra estos compuestos exógenos. La gran afinidad de los anticuerpos por su antígeno, le otorga una gran especificidad a la reacción de reconocimiento, disminuyendo las reacciones inespecíficas y cruzadas con otros componentes (Bozzola y Russel, 1992). En la inmunocitoquímica, al anticuerpo se utiliza como un reactivo para localizar *in situ* el antígeno contra el cual fué preparado. El anticuerpo se aplica al tejido en estudio, y al interactuar con el antígeno tisular forma un complejo antígeno-anticuerpo fácil de localizar (Hyatt, 1989).

Existen dos métodos de inmunolocalización: el método directo en el cual se usa un solo anticuerpo y el método indirecto que utiliza dos anticuerpos. En la inmunolocalización indirecta, el corte de tejido se hace reaccionar con el primer anticuerpo, que es específico contra la molécula que se

desea localizar, posteriormente el tejido se hace reaccionar con un segundo anticuerpo que reconoce al primero. El segundo anticuerpo está acoplado a una molécula visible con el microscopio electrónico tales como el oro y la ferritina, que producen una marca electrodensa que permite la visualización directa del antígeno al observar los cortes ultrafinos al microscopio electrónico (Harris, 1991).

El presente trabajo, se realizó con el objeto de localizar en el núcleo de células meristemáticas de *Allium cepa*, las partículas que intervienen en el procesamiento del hnRNA. Así como conocer su distribución.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar la distribución ultraestructural del DNA nucleoplásmico, así como de las partículas ribonucleoproteicas nucleares: snRNPs, U₁snRNPs, hnRNP y 5'-CAP, en células meristemáticas radicales de *Allium cepa* . Para ello se realizó inmunolocalización *in situ* a nivel de microscopía electrónica.

MATERIALES Y METODOLOGIA.

Preparación de las Muestras. Para la obtención de los meristemos radicales de *Allium cepa*, los bulbos se pusieron en contacto con agua limpia durante dos días o hasta que las radículas alcanzaron una longitud de 4 mm. La preparación del tejido vegetal se inició con la fijación de los meristemos en paraformaldehído al 4%, disuelto en solución amortiguadora de fosfatos a pH7.2. Los meristemos se fijaron durante 5min al vacío y posteriormente se colocaron 90 min a 4°C, lavándose varias veces con solución amortiguadora de fosfatos a pH7.2. Después de la fijación, el siguiente paso fué la deshidratación gradual del tejido procediendo de la siguiente manera: el bloque de tejido se sumergió en soluciones acuosas ascendentes de alcohol etílico, se inició con una concentración del 30% y se continuó con concentraciones de 40%, 60%, 70%, 80% y 90%. La permanencia en cada una de las distintas soluciones fué de una hora a 4°C. Al final, se le hicieron tres cambios en alcohol al 100%, durante una hora en cada uno a 4°C. El proceso de preinclusión del tejido deshidratado también se hizo a 4°C y de forma gradual, se inició colocando el tejido durante tres horas en una mezcla formada por una parte de London Resins White (L.R.White) y una parte de etanol al 100%. El bloque de tejido se pasó a una mezcla de dos partes de L.R.White y una parte de

alcohol etílico al 100% durante tres horas, los meristemas se mantuvieron durante 12 horas en L.R.White, al final de este tiempo se hicieron 3 cambios más de una hora cada uno. Para la inclusión, los bloques de tejido se colocaron en cápsulas de gelatina llenas con L.R.White. La reacción de polimerización de la resina, se hizo a una temperatura de 50°C y durante doce horas (Diagrama 1).

Observación de las Muestras. Antes de proceder a la preparación de los cortes para microscopía electrónica, se hizo una evaluación y reconocimiento general del tejido meristemático radical incluido en la resina acrílica. Se obtuvieron cortes semifinos de un grosor aproximado de 240 nm en un ultramicrotomo Sorvall MT2. Para observar las condiciones del tejido fijado que se procesó y delimitar la zona de estudio, los cortes se montaron en portaobjetos, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en un microscopio óptico Carl Zeiss. Después de localizar y escoger la zona deseada, se procedió a la obtención de cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de grosor, los cuales fueron montados en rejillas de 100 barrotes por pulgada. Para observar los cortes obtenidos y hacer un reconocimiento estructural de las células meristemáticas, los cortes se contrastaron por flotación en acetato de uranilo durante 5 min y después en citrato de plomo por 2 min. Las rejillas fueron observadas en un

microscopio electrónico Carl Zeiss modelo EM10 a diferentes aumentos (Diagrama 2).

Inmunolocalización. El inmunomarcado de los DNA, snRNPs, U₁RNPs y 5'-Cap se realizó como lo descrito por Fakan *et al.*, (1984); en los cortes ultrafinos, los cuales se mantuvieron en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Como primer paso, con la finalidad de evitar uniones inespecíficas, el corte de tejido se bloqueó con suero normal de cabra (NGS). Esto se hizo colocando la rejilla con los cortes sobre una gota de NGS disuelto en buffer salino de fosfatos (PBS) en una proporción de 1:50. Se quitó el exceso de NGS de las rejillas con papel filtro e inmediatamente después, se colocaron sobre una gota de solución de PBS-BSA-tween que contenía el primer anticuerpo (los anticuerpos empleados se describen en el Cuadro 1). Las diluciones que se utilizaron en cada una de las inmunolocalizaciones realizadas en este trabajo, se presentan resumidas en la Tabla 1. El primer anticuerpo se dejó reaccionar con los cortes durante 17 hrs a una temperatura de 4°C.

Después de transcurrido el tiempo de reacción con el primer anticuerpo, las rejillas se enjuagaron por goteo y por flotación en PBS-tween y en PBS. Inmediatamente después de que se enjuagaron, éstas se colocaron durante 3 min sobre una gota de NGS 1:50. Se transfirieron a la solución

que contenía el segundo anticuerpo diluido en PBS dejándose reaccionar durante 30 min. Para finalizar, las rejillas se enjuagaron varias veces por goteo y por flotación con PBS y posteriormente con agua bidestilada. Se dejaron secando en un ambiente libre de polvo. Las características del segundo anticuerpo, así como las diluciones empleadas para cada una de las inmunolocalizaciones realizadas, se detallan en la Tabla 1.

Cuando las rejillas estuvieron totalmente secas, se contrastaron durante 2 min en acetato de uranilo y durante 1 min en citrato de plomo (Diagramas 3 y 4).

Observación. Las rejillas con los cortes totalmente procesados, se observaron y analizaron utilizando un microscopio electrónico marca Carl Zeiss Modelo EM10.

Después de observar las preparaciones procesadas para las diferentes inmunolocalizaciones, se obtuvieron micrografías electrónicas a diferentes aumentos. Se utilizaron placas Kodak Electron Microscope Film de 8x10 cm. La película se procesó según las especificaciones recomendadas por el fabricante. Para las impresiones se utilizó papel fotográfico de diferente contraste (F2, F3, F4, F5). Sobre las imágenes impresas se realizó el análisis.

CUADRO DESCRIPTIVO DE ANTICUERPOS 1

Nombre	Tipo	Procedencia	Molécula contra la cual está dirigida	Descripción:
α DNA	Monoclonal	Progen	DNA	Reacciona contra la moléculas de DNA. molécula donde reside la información genética.
Y12	Monoclonal	Lerner <i>et al.</i> , 1981	snRNPs	Reconoce epitopes filogeneticamente conservados comunes a partículas snURNP conteniendo U1, U2, U5 Y U4-U6. snRNAs
FA12	Monoclonal		hnRNPs	Reacciona contra las proteínas específicas A, A', B, B', C y C' de peso molecular de 68 y 120 KDa , que al unirse a las hnRNA forman las hnRNPs.
R ₁₁₃₁	Monoclonal	Bringmann <i>et al.</i> , 1983	snURNAs	Reacciona directamente con la guanosina modificada en el extremo 5' o 2,2,7-trimetilguanosina, conocida como estructura CAP de los snRNPs. Este anticuerpo puede inmunoprecipitar tanto a U1, U2, U5 y el complejo U4-U6.
α U ₁	Monoclonal	Billings <i>et al.</i> , 1982	U ₁ RNPs	Este anticuerpo reacciona contra U ₁ snRNPs, que es el snRNP más abundante e importante para el inicio del splicing del hnRNA para transformarlo en mRNA

TABLA 1 CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS EMPLEADOS EN EL PROTOCOLO DE INMUNOCITOQUIMICA.

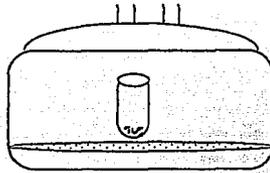
α -CUERPO No1	DILUSION	TIEMPO	α -CUERPO No2	MEDIDA GRANO DE ORO	DILUSION	TIEMPO	MOLECULA QUE RECONOCE
α ADN	1:30	17 hrs	GAM IgM	10 nm	1:30	30 min	ADN
γ 12	1:10	17 hrs	GAM IgG	15 nm	1:20	30 min	snRNP
FA12	1:25	17 hrs	GAM IgM	10 nm	1:30	30 min	hnRNP
R ₁₁₃₁	1:50	17 hrs	GAR	15 nm	1:30	30 min	snURNA
α U ₁	1:50	17 hrs	GAM IgG	15 nm	1:30	30 min	U ₁ snRNP

DIAGRAMA 1

Preparación del Tejido Vegetal



Obtención de los meristemas.



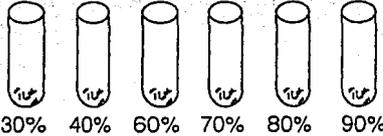
Fijación en Paraformaldehído al 4%

5 min en vacío



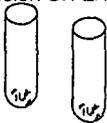
90 min a 4°C

Deshidratación con Etanol



Incubación de 60min a 4°C en cada concentración

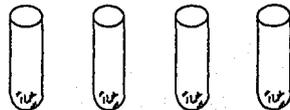
Preinclusión en LRW /Etanol



1/1 2/1

3 hrs en cada concentración

Preinclusión en LRW



12 hrs. 1hr 1hr 1hr

Polimerización de 12 hrs. a 50°C

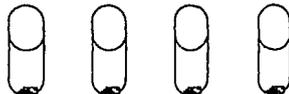


DIAGRAMA 2

Observación de las muestras

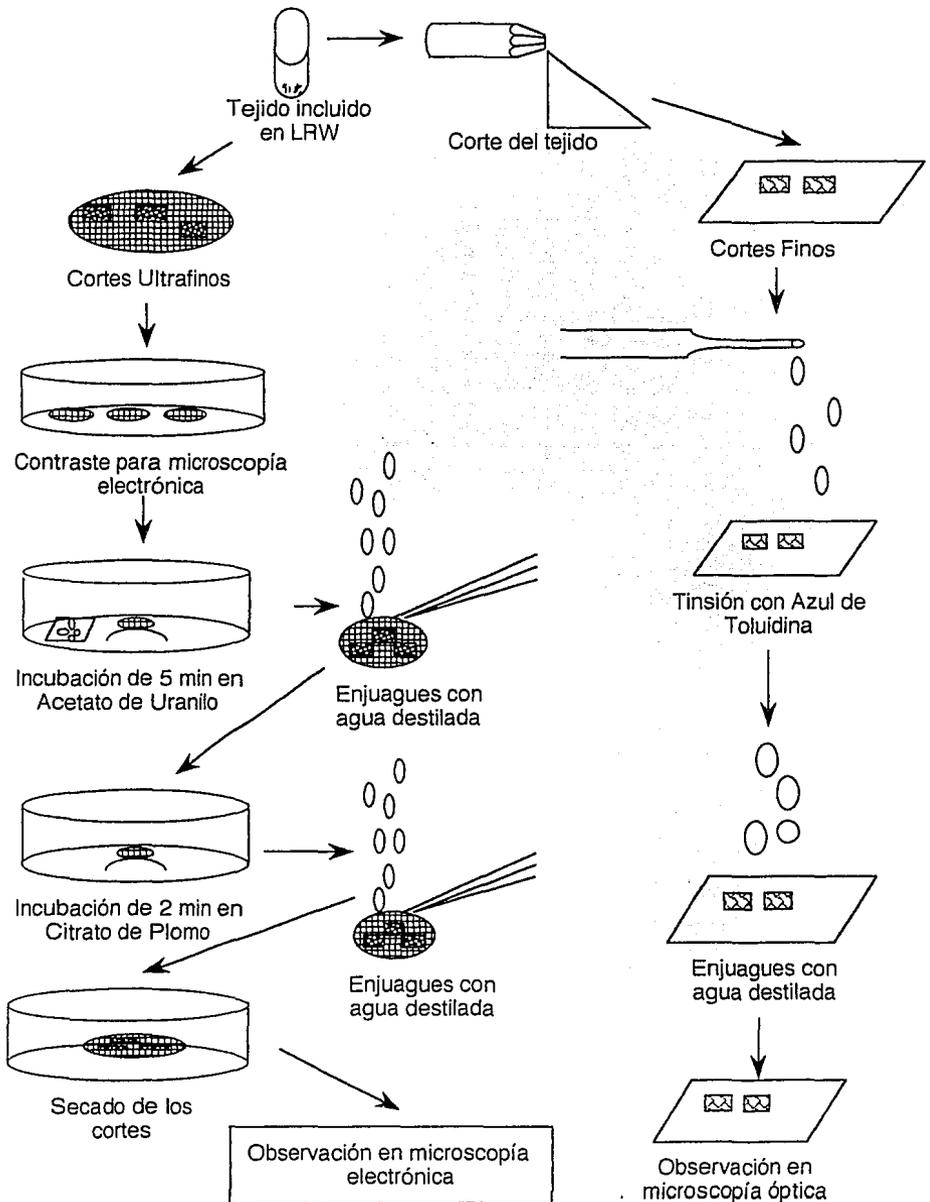


DIAGRAMA 3

Diagrama del Inmunomarcado

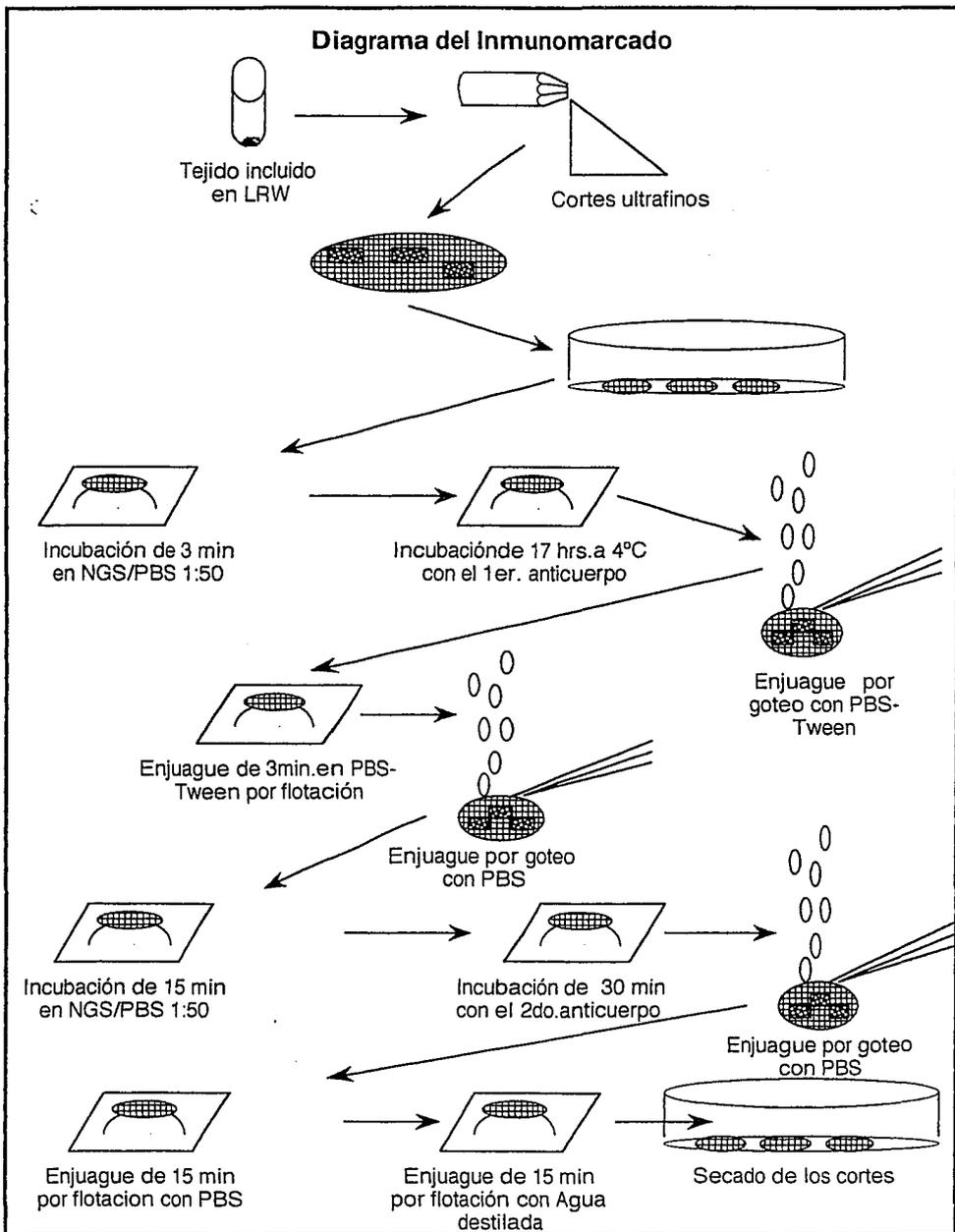
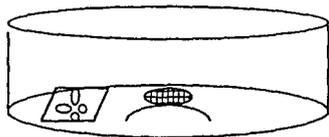
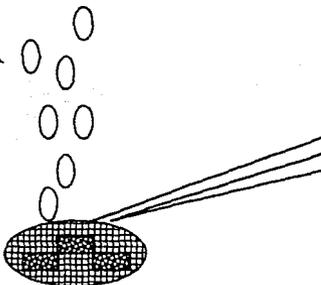


DIAGRAMA 4

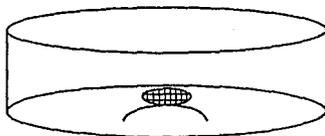
Contraste de cortes del Inmunomarcado



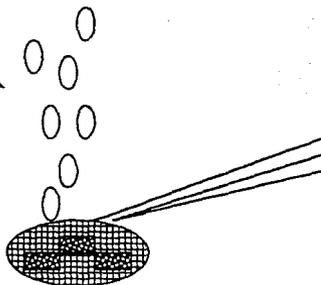
Incubación de 2 min
en Acetato de Uranilo



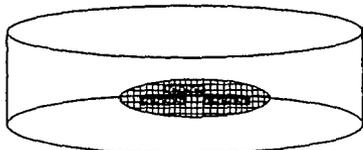
Enjuague por goteo
con agua destilada



Incubación de 2 min
en Citrato de Plomo



Enjuague por goteo
con agua destilada



Secado de los cortes

Observación al microscopio
electrónico

RESULTADOS

Con técnicas de inmunolocalización a nivel ultraestructural en células meristemáticas radicales de *Allium cepa* (raíz de cebolla), localizamos algunas de las diferentes moléculas que intervienen en la vía de síntesis de proteínas, como son: DNA, snRNPs, U₁snRNP, hnRNAs, y 5'-CAP de snRNAs empleando anticuerpos específicos como α DNA, Y12, α U₁, FA₁₂ y con R₁₁₃₁

En la electromicrografía de la Figura 1 se muestra el panorama de una célula meristemática radical de *Allium cepa* (cebolla), usando técnicas de microscopía electrónica convencionales de fijación con paraformaldeído, inclusión con LRWhite y contraste con acetato de uranilo y plomo. En la que apreciamos la forma celular alargada, con sus estructuras celulares bien preservadas, al núcleo reticulado rodeado por la envoltura nuclear, en su interior se ven los cúmulos de cromatina compacta, observándose como está unida a la membrana interna de la envoltura nuclear, en esta electromicrografía señalamos dos nucleolos. La región citoplasmática se puede observar claramente, limitada por la pared celular, la membrana citoplasmática y en su interior al retículo endoplásmico, numerosas mitocondrias, vacuolas típicas de células meristemáticas.

Inmunolocalización de DNA.

En los cortes ultrafinos de células meristemáticas radicales de *Allium cepa* localizamos ultraestructuralmente los sitios ocupados por la cromatina compacta y laxa, en esta inmunolocalización empleamos como primer anticuerpo el α DNA, anticuerpo monoclonal de ratón. En las electromicrografías de la Lámina 1 se ilustra parte del núcleo de una célula meristemática radical de cebolla, las flechas señalan las marcas sobre el área de la cromatina compacta y en la cromatina laxa.

Las marcas en el citoplasma de las células meristemáticas fueron muy bajas con respecto a las observadas en el núcleo, no encontramos marca del anticuerpo α DNA, asociada al espacio intercromatiniano.

Inmunolocalización de snRNPs

En la Lámina 2 se muestra la localización ultraestructural de las partículas snRNPs acopladas al anticuerpo monoclonal anti-Sm (Y12), observadas en cortes ultrafinos de células meristemáticas radicales de *Allium cepa*. Nuestras observaciones nos llevaron a localizar el anticuerpo en la periferia de la cromatina, en las electromicrografías a, b y c de la Lámina 2 así como la ausencia de marcas del anticuerpo Y12 en el área de la cromatina compacta.

Inmunolocalización de U₁.

Cuando empleamos el anticuerpo α U₁, anticuerpo monoclonal de ratón contra proteínas de 70kDa de las partículas U₁RNPs, en cortes ultrafinos de células meristemáticas radicales de cebolla, encontramos las marcas distribuidas en la pericromatina y en la región intercromatiniana, como se muestra con flechas en las electromicrografías a y b de la Lámina 3.

En estas electromicrografías no observamos marcas del anticuerpo α U₁ sobre los acumulos de cromatina y el citoplasma.

Inmunolocalización de hnRNPs

Se detectaron las hnRNPs empleando anticuerpos que reaccionan contra estas partículas. Usamos el anticuerpo monoclonal de ratón FA12 que reconoce específicamente a la proteína que se une a las hnRNAs (ácido ribonucleico heteronuclear) formando el complejo hnRNPs. En las electromicrografías a y b de la Lámina 4 se muestra a diferentes aumentos una parte del núcleo, con flechas mostramos las marcas del anticuerpo FA12, localizadas en la región pericromatiniana. Estos resultados nos sugieren que en núcleos de cebolla es muy probable que estas partículas proteicas estén asociadas con los hnRNAs recién sintetizados, que se localizan en la misma región.

Inmunolocalización de RNA's con 5'-CAP.

En las electromicrografías a y b de la Lámina 5, se ilustra la localización del anticuerpo monoclonal de conejo R₁₁₃₁, que se une específicamente a las moléculas de 5'-CAP de snURNAs. Las partículas de oro se encuentran en la periferia de la cromatina compacta y en la región intercromatiniana. Se realizó la inmunolocalización con este anticuerpo para tener una idea más amplia de la distribución ultraestructural de las partículas que participan en el evento del splicing.

Con nuestras observaciones hechas en cortes de células meristemáticas radicales de *Allium cepa* confirmamos que los eventos de transcripción y splicing se llevan a cabo en la zona pericromatiniana, así mismo comprobamos que en las células vegetales se encuentran partículas RNP similares en morfología y composición a las de los núcleos de células animales, de tal manera que a este nivel la morfofisiología de núcleos animales y vegetales es similar.

DISCUSION

En el presente trabajo empleando anticuerpos específicos como α DNA, Y12, α U₁, FA₁₂ y R₁₁₃₁, se han localizado diferentes moléculas que intervienen en la vía de expresión génica, como son DNA, snRNPs, U₁snRNPs, hnRNPs, snURNA's con 5'CAP respectivamente. De los resultados obtenidos podemos concluir que los eventos de transcripción y splicing de células meristemáticas de *Allium cepa*, se llevan a cabo en la zona pericromatiniana e intercromatiniana del núcleo.

Las marcas del anticuerpo α DNA se observaron claramente ya que los núcleos de *Allium cepa* son reticulados y con abundante cromatina compacta. El contar con este tipo de cromatina nos permite comparar con otros estudios hechos en núcleos no-reticulados en los cuales la cromatina es menos abundante (cromocentricos), Moreno Díaz de la Espina *et al.* (1991) observaron que en núcleos de células de *Lycopersicon esculentum* (tomate) la marca del α DNA es baja en comparación con la que observamos en núcleo de *Allium cepa*, esto nos sugiere que la diferencia en cantidad de marca se debe probablemente al tipo de organización de la cromatina. Otro factor que puede influir es el contenido de DNA nuclear, ya que Barlow (1977) reportó para *Allium cepa* 33.5 pg. de

contenido de DNA por núcleo, cantidad considerablemente más alta con respecto a otros núcleos de plantas.

En varios estudios previos, se han empleado anticuerpos monoclonales específicos contra los snRNPs (Y12). En células de mamíferos, células HeLa S3 (Leser, 1989), núcleos politénicos de glándulas salivales de *Chironomus thummi* (Vázquez-Nin, 1990) y en cromosomas politénicos de glándulas salivales de *Chironomus tentans*. (Sass y Pederson, 1984) han estudiado que el anticuerpo Y12 se encuentra localizado en la periferia de la cromatina e incluso en las fibras pericromatinianas, acoplándose en los sitios donde se lleva a cabo la transcripción. En el inmunomarcado de células meristemáticas radicales de cebolla encontramos que los sitios en los que se encuentran localizadas las marcas corresponderían a los mismos sitios celulares mencionados anteriormente.

Con el estudio de inmunomarcado de moléculas U_1 snRNPs encontramos las marcas distribuidas en la región del espacio intercromatiniano y en la pericromatina. Siendo U_1 snRNPs una molécula que participa en el proceso del splicing al igual que otros snRNPs, encontramos un patrón similar con los anticuerpo αU_1 e Y12 mencionado anteriormente. En observaciones hechas en células HeLa S3 Spector (1983 y 1990), en núcleo de glándulas salivales de *Chironomus thummi* Vázquez-Nin (1990), y en núcleo de

mamíferos (Carmo-Fonseca, 1991) se ha descubierto que los U₁snRNPs se encuentran distribuidos a través del nucleoplasma. En nuestras observaciones en *Allium cepa* se encuentran en sitios similares a los reportados por estos autores.

En estudios realizados por Fakan *et al.* (1986), utilizando anti-hnRNP demostraron la presencia de hnRNPs en los gránulos pericromatinianos en núcleos de células de hígado de ratón y de rata. Spector (1983) empleando drogas que inhiben la síntesis de hnRNA, reporta que los hnRNPs y los snRNPs se encuentran localizados en los mismos sitios y que los snRNPs están involucrados en el procesamiento de los hnRNPs, ocurriendo esta interacción en el nucleoplasma donde se lleva a cabo la síntesis de los hnRNAs. Nuestras observaciones en *Allium cepa* son similares con lo observado en células animales por Fakan *et al.* (1986) y Spector (1983).

En las inmunolocalizaciones realizadas con el anticuerpo R₁₁₃₁, aislado de células Ehrlich (Bringmann *et al.* 1983) pudimos observar las marcas en la región pericromatiniana y en el espacio intercromatiniano de núcleos de *Allium cepa*, la localización de las snRNA's es similar a la observada con los anticuerpos Y12, α U₁ y FA12. En experimentos de inmunoprecipitado realizados con este anticuerpo por Bringmann *et al.*, 1983 detectaron que el anticuerpo no reacciona con todas las especies de snRNA's corroborando

con esto, que el U6snRNA en células de ratón no contiene $m_3^{2,2,7G}$ -cap y que la cantidad de precipitación de snRNPs es similar a la obtenida con el anticuerpo FA12. Spector *et al.*, 1992 en sus experimentos realizados en células de ovario de hamster encontraron la misma distribución para los anticuerpo Y12 como para $\alpha m_3^{2,2,7G}$ -cap y concluyeron que la distribución de las partículas que reconocen estos anticuerpos (snRNPs y snURNA's) es reflejada en la fisiología de la célula. Y Hamm *et al.* (1990) y Fischer y Luhrmann, (1990) descubrieron que el 5'-CAP estructura de snURNAs es un componente esencial de snRNPs, en estudios realizados en núcleos de oocitos de *Xenopus*.

En nuestras observaciones describimos la organización nuclear, en cuanto a sus componentes estructurales y el tipo de cromatina de las células meristemáticas radicales de *Allium cepa*.

En nuestro estudio de inmunolocalización ultraestructural de los componentes nucleares que participan en el splicing, se determinó que el núcleo de células meristemáticas radicales, tiene un alto contenido de cromatina compacta en forma reticulada, lo que nos permite ver la distribución de los componentes de RNPs y moléculas de DNA, con mayor claridad con respecto a otros tejidos vegetales como el de *Lycopersicon esculentum* (tomate), que presenta núcleo no-reticulado con cromatina

laxa, y un bajo contenido de cromatina compacta, en el que los componentes de RNPs y DNA son escasos. Pudimos observar una distribución de los RNPs en la región pericromatiniana y en asociación con las fibrillas pericromatinianas como lo descrito al respecto por Vázquez-Nin *et al.* (1992).

En estudios realizados por Sass *et al.* (1984) en cromosomas politénicos de *Chironomus tentans* con anticuerpos específicos U₁snRNPs, observaron que las U₁snRNPs están involucradas en el splicing del mRNA y que la mayoría de los sitios de actividad transcripcional contenían a las U₁snRNPs en alta proporción, en los anillos de Balbiani, y consideran que las U₁snRNPs son más abundantes, y evolutivamente conservadas de las U₁snRNPs. Nuestros resultados están de acuerdo con estos autores tanto en la distribución de las U₁snRNPs como en el grado de su conservación.

En observaciones hechas por Carmo-Fonseca *et al.* (1991) se sugiere la posibilidad de que los transcriptos recién sintetizados pueden formar un complejo con las U₁snRNP y posiblemente con otros factores aún no identificados, ya que ciertos experimentos mostraron que hay una asociación de U₁snRNP con los hnRNA en los sitios de la transcripción de los genes.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. En la región pericromatiniana del núcleo de *Allium cepa*, encontramos localizados los hnRNPs, U₁snRNPs y RNA's con 5'-CAP.
2. En el espacio intercromatiniano encontramos fundamentalmente a las RNPs de pequeño tamaño, ricas en uridina (snRNPs).
3. La cromatina compacta se marca densamente con el anticuerpo α DNA y se observa un marcado menos intenso en el espacio intercromatiniano que corresponde a fibras de cromatina laxa.
4. Nuestras observaciones nos permitieron confirmar que los eventos de transcripción y splicing se llevan a cabo en la zona pericromatiniana.
5. Utilizando técnicas inmunocitoquímicas y anticuerpos específicos, se reconoce en las células vegetales partículas RNP similares en morfología y composición a las de los núcleos de células animales.

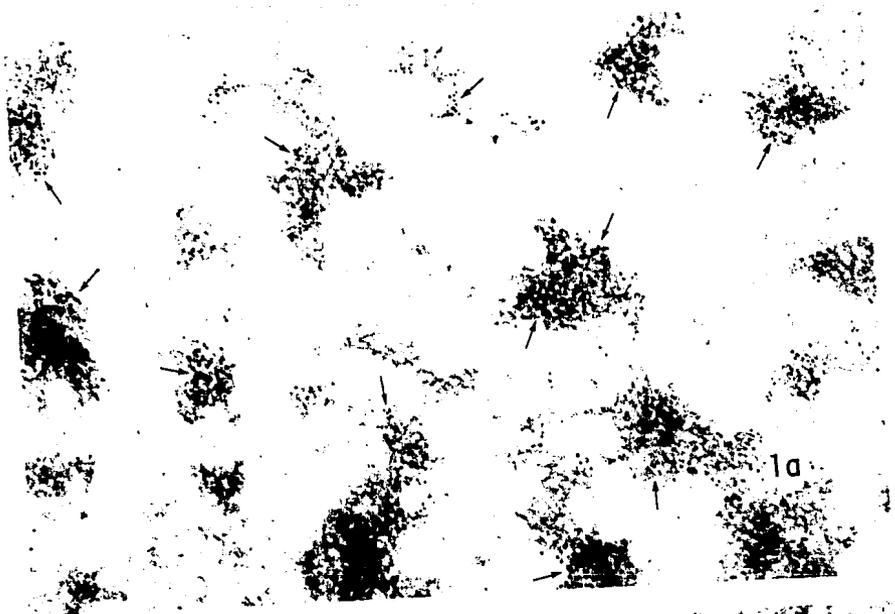
FIGURA 1 Célula meristemática radical de *Allium cepa* (cebolla). Fijada en paraformaldehído al 4%, contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se puede observar el Citoplasma (C) delimitado por la pared celular (P); observándose en su interior las vacuolas (v), mitocondrias (m), retículo endoplásmico (r), en el núcleo (N) se observa la cromatina compacta (c), fibras pericromatinianas (f) y nucleolo (n). 14,400x.



LAMINA 1

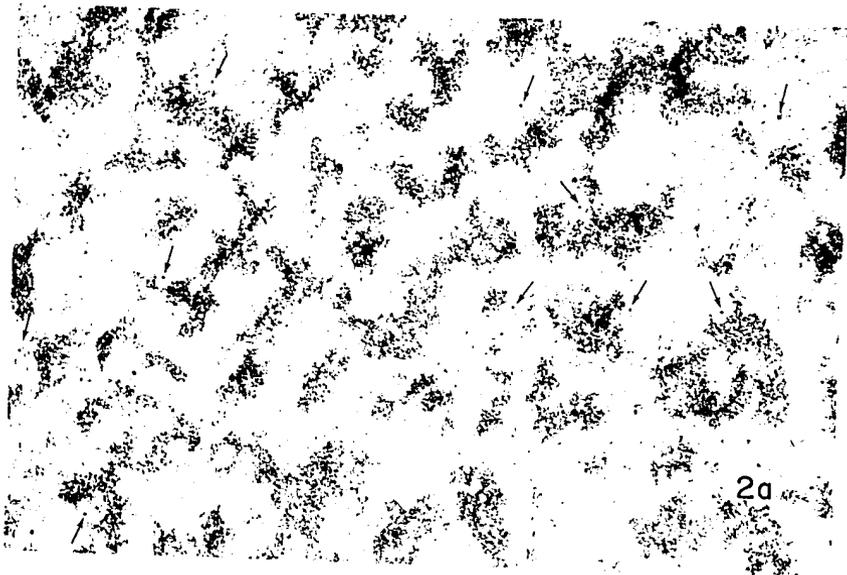
Compuesta por tres electromicrografías a grandes aumentos de diferentes zonas de núcleos de célula meristemática radical de *Allium cepa* (cebolla). Se observan grumos de cromatina compacta marcados positivamente con el anticuerpo monoclonal α DNA, así como las fibras de cromatina laxa.

A) 37,500x B) 44,000x. C) 48,000x.



LAMINA 2

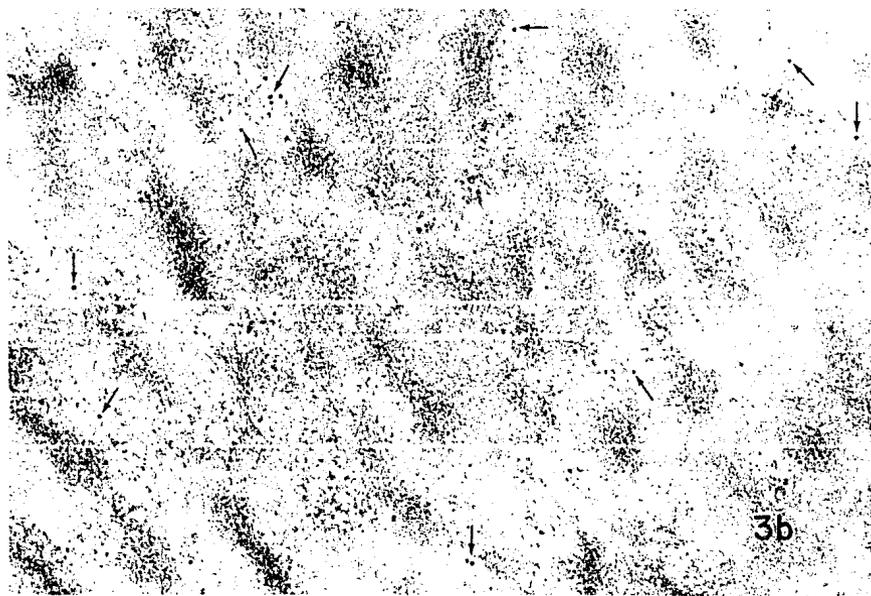
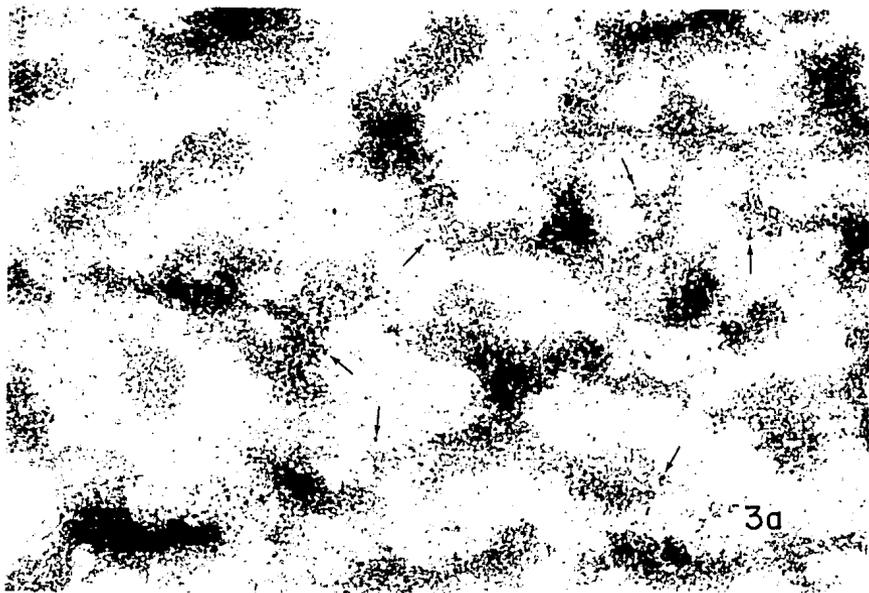
Lamina en la que se muestra tres imagenes a diferentes aumentos, de la inmunolocalización de los RNPs de pequeño tamaño, ricos en uridina (snRNPs) observados fundamentalmente en el espacio intercromatiniano. Las flechas muestran las partículas de oro acopladas al anticuerpo monoclonal Y12. A) 19200x. B) 50,000x. C) 44,000x.



LAMINA 3

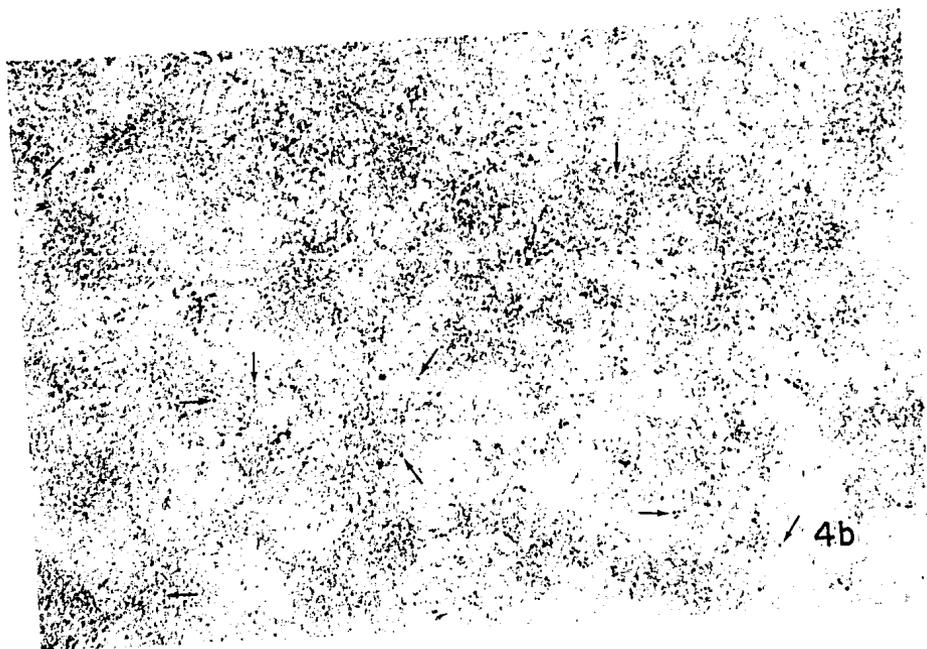
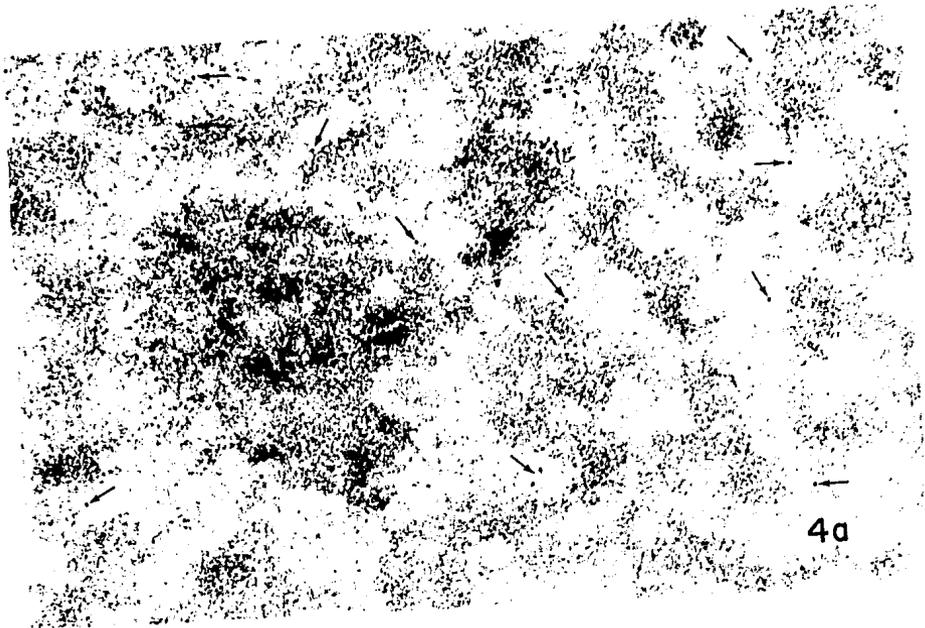
Diferentes aumentos del inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal αU_1 , en zonas de núcleos de células meristemáticas radicales de *Allium cepa*, con flechas se señalan las partículas de oro acopladas a U_1 snRNPs localizadas en la pericromatina.

A) 37,500x B) 25,000x



LAMINA 4

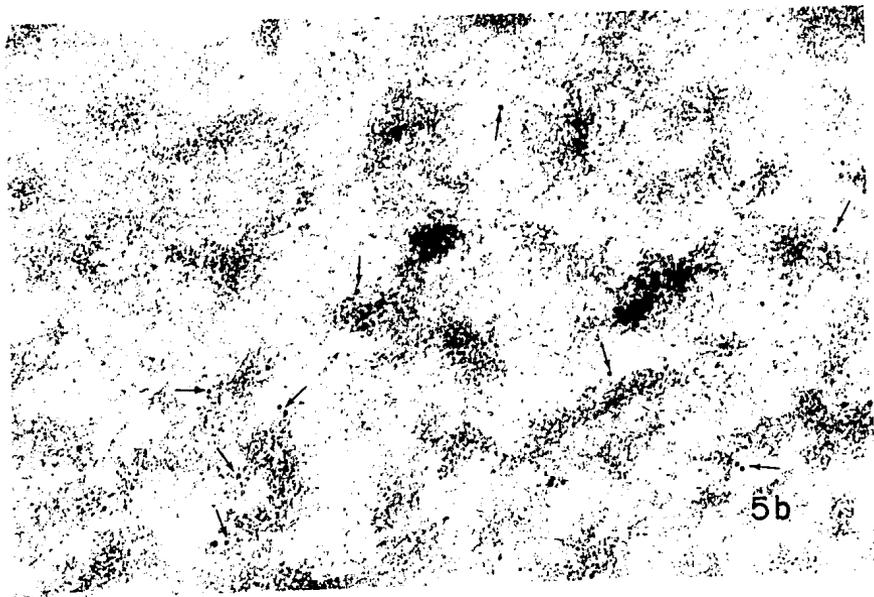
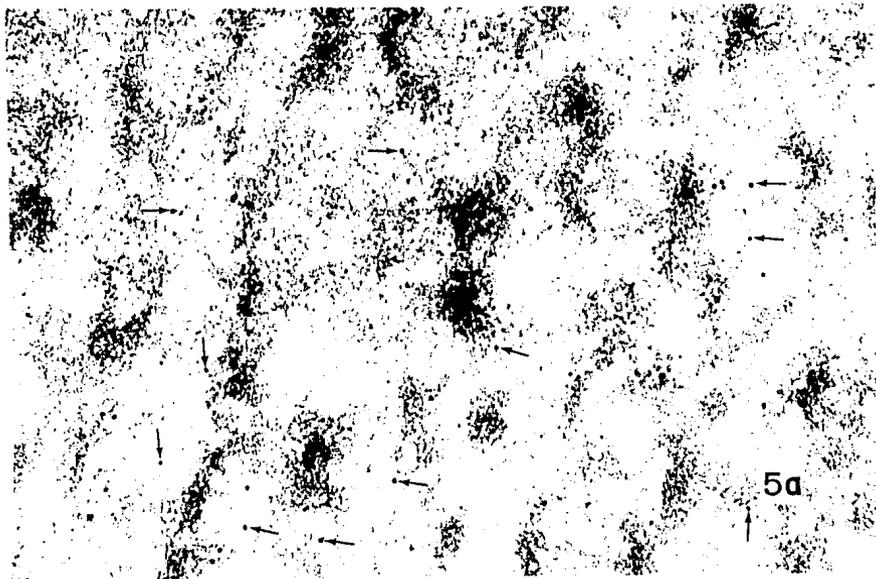
Lamina con electromicrografías de diferentes zonas de núcleos de célula meristemática de *Allium cepa*, con las flechas se indica que el anticuerpo monoclonal FA12 está fundamentalmente distribuido en la pericromatina reconociendo a las hnRNPs. A) 51,200x B) 35,200x



LAMINA 5

Lamina donde mostramos zonas de núcleos de células meristemáticas de *Allium cepa*, localizandose en la región pericromatineana el inmunomarcado del anticuerpo monoclonal R₁₁₃₁ que reconoce el 5'-CAP.

A) 32,000x B) 31,250x



REFERENCIAS CITADAS

- Albert, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1989 Molecular Biology of *The Cell*, Edition. Garland, New York.
- Bernhard, W. 1969 A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27,250-265
- Barlow, P. W. 1977. Determinants of Nuclear chromatin structure in angiosperms. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Paris.* 12^a Série Tome 18, 193-206
- Billings P. B., Allen R. W., Jensen F. C., Hoch S. C. 1982 Anti-RNP Monoclonal antibodies derived from a mouse strain with lupus-like autoimmunity. *J. Immunol.* 128, 1176-1180
- Bringmann P., Reuter R., Jutla, Rinke J., Appel B., Bald R. and Lührmann R. 1983 5'-Terminal Caps of snRNAs are Accessible for Reaction with 2,2,7-Trimethylguanosine-specific Antibody in Intact snRNPs. *J. Biol. Chem.* 258, (5) 2745-2747
- Bozzola J. J., Russell L. D. 1992. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists.* Published in the USA by Jones and Bartlett, 9, 234-275
- Carmo-Fonseca, M., Tollervey D., Pepperkok R., Barabino S. M. L., Merdes A., Brunner Ch., Zamore P. D., Green M. R., Hurt E. and Lamond A. I. 1991. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO Journal* 10 (1), 195-206
- Darnell, J., Lodish H., Baltimore D. 1990 *Molecular Cell Biology.* Published in the USA by Scientific American Books Second Edition, Parts I y II 17-449
- Fakan, S., Leser G. and Martin Terence E. 1984. Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins as Visualized by Immunocytochemistry on Thin Sections. *J. of Cell Biol.* 98, 358-363

Fakan, S., Leser G. and Martin Terence E. 1986. Immunoelectron Microscope Visualization of Nuclear Ribonucleoprotein Antigens within Spread Transcription Complexes. *J. Cell Biol.* 103, 1153-1157

Fakan, S. & Bernhard, W. 1973 Nuclear labelling after prolonged ^3H -uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 79 431-444

Fischer, U. and Lührmann R. 1990 *Science* Vol. 249, 786-789

Kastner, B. and Lührmann R. 1989 Electron microscopy of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles: shape of the particle and position of the 5' RNA terminus *The EMBO Journal* Vol. 8 (1) 277-286

Hamm J., Darzynkiewicz E. Thara S. M. and Mattaj J. 1990. *Cell* 62, 569-577

Harris, J.R. 1991. *Electron Microscopy in Biology: A Practical Approach* IRL Press New York 4, 59-81

Hyatt, A.D. 1989. In *Colloidal gold: Principles, methods and applications* Academic Press, London 2, 19-31

Jiménez-García, L. F. 1988 El núcleo : Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, U. N. A. M. México

Jiménez-García, L. F., Elizmunda, J. M., López, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría O. M., & Vázquez-Nin, G. H. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocists. *Biosystems* 22,103-116

Jiménez-García, L. F., Segura M. L. 1993 El origen y la evolución del núcleo celular. *Tópicos de Biología Evolutiva.* 8, 155-174

Lerner E. A., Lerner M. R., Janeways C. A. Steitz J. A. 1981 Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2737-2741

Leser, G. P., Fakan S. and Martin Terence E. 1989 Ultrastructural distribution of ribonucleoprotein complexes during mitosis: snRNP antigens are contained in mitotic granules clusters. Eur. J. Cell Biol. 50, 376-389

Monneron, A. and Bernhard W. 1969 Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells J. Ultrastructural Research 27, 266-288

Moreno Díaz de la Espina, S. Barthelley I., Cerezuela M. A. 1991 Isolation and ultrastructural characterization of the residual nuclear matrix in a plant cell system. Chromosoma 100, 110-117

Moreno Díaz de la Espina, S., Mínguez A., Vázquez-Nin G. H. and Echeverría O.M. 1992. Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. Chromosoma 101, 311-321

Puvion, E., Viron A. and Xu F. X. 1984. High Resolution Autoradiographical Detection of RNA in the interchromatin Granules of DRB-treated Cells. Exp. Cell Res. 152, 357-367

Sass H., and Thoru Pederson. 1984. Transcription-dependent Localization of U1 and U2 Small Nuclear Ribonucleoproteins at Major sites of Gene Activity in Polytene Chromosomes. J. Mol. Biol. 180, 911-926

Spector, D. L., Schrier, W.H., Busch, H. 1983 Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. Biol Cell 49 1-10

Spector, D. L. 1990 Higher order nuclear organization: Three dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles Proc. Nat. Acad. of Sc. of the USA 87, 147-151

Spector, D. L., Lark, G., Huang, S. 1992 Differences in snRNP localization between transformed and nontransformed cells. *Molecular Biology of the Cell* 3 555-569

Steitz, J.A. June 1988. "Snurps". *Scientific American* 36-41

Vázquez-Nin, G. H., Ortega-Rangel J. A., Echeverría O. M., Parra R. and Jiménez-García L. F. 1983. Changes in Nuclear Ribonucleoprotein Constituents and Chromatin Disposition during Neuronal Differentiation and Maturation. *Biol. Cell.* 47,

Vázquez-Nin, G. H., Echeverría O. M. , Zavala G. , Jiménez-García L. F., González M. A. and Parra R. 1986. Relations between Nucleolar Morphometric Parameters and Pre-rRNA Synthesis in Animal and Plant Cells. *Acta Anat.* 126, 141-146

Vázquez-Nin, G. H. and Bernhard, W. 1971 Comparative ultrastructural study of perichromatin and balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36 842-860

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

Vázquez-Nin, G. H., Echeverría O. M., Pedron J. 1979 Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. cell.* 35, 221-228

Vázquez-Nin, G. H., Echeverría O. M. , Fakan S., Lesser G. and Martin T. E. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi* . *Chromosoma* 99, 44-51

Vázquez-Nin, G. H., Echeverría O. M., Jiménez-García, L. F., Agredamo, M.L.T., Segura , V.M.L., Ramos, C.H. Martínez, E. 1992 La microscopía Electrónica ofrece nuevas claves sobre la evolución de las plantas primitivas (Triuridales). 1er Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica, Mérida, Venezuela.

**We live only to discover beauty.
All else is a form of waiting.
Gibrán**