

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CITOQUIMICO DE LOS
GRANULOS INTERCROMATINIANOS EN NUCLEOS EN
INTERFASE Y MITOSIS DE JITOMATE (*Lycopersicon
esculentum*) Y CEBOLLA (*Allium cepa*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIA (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. MARCO ANTONIO GONZALEZ JIMENEZ

DIRECTOR: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



VIRREYDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0065/00

ASUNTO: Asignación de jurado

DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA.

Presente

Por este conducto informo a usted que ha sido ratificado como director de tesis del BIOL. MARCO ANTONIO GONZALEZ JIMENEZ, alumno de la Maestría en Ciencias (Biología Celular).

Asimismo, comunico a los siguientes académicos que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas los ha designado como sinodales del citado alumno para optar por el grado correspondiente:

Presidente	Dra. Concepción Sánchez Gómez	
Primer vocal	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo	
Segundo vocal	Dr. Luis Felipe Jiménez García	
Tercer vocal	Dr. Alfonso Cárabez Trejo	
Secretario	Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla	
Suplente	M. en C. Lourdes Teresa Agredano Moreno	
Suplente	Dra. María de Lourdes Segura Valdez	

Título de la tesis: Estudio Ultraestructural y Citoquímico de los Granulos Intercromatinianos en nucleos en Interfase y Mitosis de Jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y Cebolla (*Allium cepa*).

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. 13 de enero del 2000.

LA JEFE DE LA DIVISION

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del
Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.**

Quisiera agradecer sinceramente al Dr. Luis Felipe Jiménez García. Director de tesis, por su paciencia, guía y apoyo, por sus conocimientos y experiencia brindada en la elaboración de este trabajo.

Gracias a los integrantes del jurado por el tiempo brindado en la revisión del trabajo y hacer importantes sugerencias y comentarios en la escritura de este:

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Dra. Sandra Luz Gómez Arrollo

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

M. en C. Lourdes Teresa Agredano Moreno

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Un agradecimiento muy especial para las siguientes personas

Dra. Olga Margarita Echeverría y al Dr. Gerardo Vázquez–Nin por su amistad y apoyo que siempre me han brindado.

Dra. María Elena Calderón Segura por la revisión del trabajo, pero principalmente por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Microscopia Electrónica del Instituto Nacional de Perinatología.

INDICE

	Pag
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCION.....	2
II.- ESTRUCTURAS NO RIBONUCLEOPROTEICAS.....	3
Envoltura Nuclear y Poro Nuclear.....	3
Lámina Nuclear.....	4
Cromatina.....	5
Matriz Nuclear.....	6
Maduración del ARN pre-m.....	7
Maduración del ARN pre-r.....	9
III.- RIBONUCLEOPROTEINAS INTRANUCLEARES.....	10
Nucleolo.....	10
IV.- RIBONUCLEOPROTEINAS NO NUCLEOLARES.....	11
Fibras Pericromatinianas.....	11
Fibras Intercromatinianas.....	12
Gránulos Pericromatinianos.....	12
Cuerpo Nuclear.....	13
Cuerpos Espiralados.....	14
Gránulos Intercromatinianos.....	15
V.- MITOSIS.....	16
Profase.....	19
Estructura y Función del Cinetocoro.....	21
Prometáfase.....	22
Fragmentación de la Envoltura Nuclear.....	22
Metafase.....	23
Anafase.....	24
Telofase.....	26
Citocinesis.....	27
VI.- OBJETIVOS.....	29
VII.- MATERIAL Y METODOS.....	30
VIII.- RESULTADOS.....	33
Interfase.....	33
Mitosis.....	34
Figuras 1-8	
IX.- DISCUSION.....	35
X.- REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

Se presentan datos adicionales sobre el núcleo en interfase de jitomate (*Lycopersicon esculentum L*), obtenidos por medio de algunas técnicas de microscopía electrónica de transmisión. Se utilizaron células apicales de meristemos de embrión en estado quiescente así como células en estado activo con 3 días de germinación. Se incluyeron en las resinas Epoxicas y acrílicas. Las muestras se contrastaron con uranilo-EDTA-plomo, método preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs), con la técnica de oxinitrato de bismuto específico para gránulos intercromatinianos (GICs) y con ácido fosfotúngstico preferencial para cromatina. En células en estado activo de jitomate con la técnica para RNPs, los GICs se observan dispersos en el nucleoplasma y los gránulos pericromatinianos (GPCs) se encuentran asociados a la cromatina compacta; en el nucleolo, la zona fibrilar y la granular se contrastan fuertemente. En células en estado quiescente, se presenta gran cantidad de fibras mezcladas con componentes granulares en el espacio intercromatiniano. En células activas se notan ocasionalmente cuerpos nucleares en forma de anillo, que son negativos con el contraste preferencial para cromatina (PTA). Con esta técnica, en el nucleolo se aprecian inclusiones de cromatina o cromatina que penetra hacia el interior. Con la técnica de oxinitrato de bismuto se analiza la distribución de los GICs en interfase y mitosis en las células del meristemo de jitomate y de cebolla (*Allium cepa*). En interfase los GIC se encuentran dispersos en el espacio intercromatiniano. Durante la profase, metafase y anafase, los GICs se asocian a la superficie de los cromosomas y otra parte se distribuye en el espacio celular circundante, durante la telofase, se observan en las regiones intercromatinianas de las células hijas. Nuestros resultados sugieren que al menos una fracción de los GIC es heredada de la célula madre a las células hijas, lo que podría involucrar su utilización durante los primeros eventos del procesamiento del ARNpre-m en células que inician la etapa de G1. Además, se describen cuerpos nucleares en forma de anillo y centros fibrilares heterogéneos en los nucleolos de jitomate.

I.- INTRODUCCIÓN

Las células son las unidades estructurales y funcionales de la vida. Las células eucariontes están divididas en diferentes compartimientos, en los que se ejecutan distintas funciones. En el núcleo existen también varias zonas con actividades muy particulares como son la transcripción, procesamiento del ARN y replicación (van Driel y col.1991).

El núcleo fue descrito por primera vez por Leewenhoek en el siglo XVII y en 1831 Brown le da el nombre. Inicialmente, se consideró como una estructura amorfa, debido a los conocimientos muy limitados sobre su organización ultraestructural y funcional (De Robertis 1981). Recientemente, el desarrollo de nuevas técnicas en el campo del análisis ultraestructural, combinadas con técnicas citoquímicas, autoradiográficas, de inmunolocalización e hibridación *in situ*, han generado una nueva visión de la estructura nuclear y de su funcionamiento, por lo que actualmente se considera al núcleo como una estructura molecularmente muy compleja y organizada, así como altamente dinámica.

El ciclo de división celular en células eucarióticas está convencionalmente dividido en dos etapas: la interfase y la mitosis. La interfase es un período de intensa actividad celular en la cual la célula se está preparando para empezar a dividirse y dar origen a dos células hijas con la misma información genética y características morfológicas de la célula madre. La interfase consta de tres fases, designados como G1, S y G2. La primera tiene lugar después de la mitosis y es principalmente una etapa de aumento del material citoplasmático, incluyendo varios organelos. También en este lapso, de acuerdo con una hipótesis actual, se sintetizan sustancias que inhiben o estimulan el periodo S y el resto del ciclo, como por ejemplo la síntesis de histonas para la nueva cromatina, las ciclinas C, D y E esenciales para que la célula entre a la fase S, de tal modo que determinarán si la división celular tendrá o no lugar. El periodo S sigue al G1, los cromosomas de las células eucarióticas tienen múltiples orígenes de replicación de ADN que son activados en la fase S del ciclo celular (Nelly y col 1993). Durante el periodo G2 se forman algunas estructuras implicadas directamente con la mitosis, como son los componentes de las fibras del huso, así como la

síntesis de ciclinas A y B que son esenciales para que la célula entre a la fase de mitosis (Santela 1998).

Estudios de microscopía óptica y electrónica han establecido que los componentes estructurales del núcleo en interfase comprenden, (a) desoxirribonucleoproteínas (DNP) como la cromatina laxa y compacta, (b) los complejos de fosfolípidos como la envoltura nuclear, (3) los complejos proteicos como el poro, la matriz nuclear, la lámina nuclear y (4) las ribonucleoproteínas como el nucleolo y las proteínas extranucleolares. En este trabajo se describen brevemente estos componentes, haciendo más énfasis en las ribonucleoproteínas no nucleolares, especialmente en los gránulos intercromatíneos.

II.- ESTRUCTURAS NO RIBONUCLEOPROTEICAS

- Envoltura nuclear y Poro Nuclear

El núcleo se encuentra separado espacialmente del citoplasma por una doble membrana denominada envoltura nuclear. Se encuentran separadas por un espacio perinuclear con un espesor variable de 10-15 nm. Es una estructura con una función importante en el intercambio núcleo-citoplasma, se piensa que sirve de sitio de anclaje para la cromatina en interfase. La membrana externa se continua con el retículo endoplásmico rugoso, la membrana nuclear interna se encuentra adyacente a la lámina nuclear y a la cromatina (De Robertis 1981). Ambas membranas se fusionan en varios puntos, formando los llamados poros nucleares, estos se encuentran ocupados por complejos macromoleculares llamados complejos del poro nuclear (CPN), que controlan el paso de moléculas hacia el interior y exterior del núcleo (Paine y col. 1975, Carmona-Fonseca y col. 1991, Agutter y Prochnow 1994, Jarmolowski y col 1994). EL modelo de poro pone de manifiesto su estructura simétrica y la composición de las subunidades que los forman. Presentan una simetría octagonal alrededor de un eje central que es perpendicular al plano de la membrana nuclear. Se componen de dos anillos coaxiales separados ampliamente con un diámetro interno de 80 nm, uno reviste el nucleoplasma y el otro al citoplasma. Ocho proyecciones radiales se extienden entre ambos anillos haciendo contacto con una partícula localizada

centralmente que tiene un diámetro de 35 nm (Gerace y Burke 1988, Reichelt y col 1990). El canal central de los CPN está involucrado en el transporte activo, mientras que los canales periféricos que miden 10 nm de diámetro cada uno, al parecer su función es de recambio de pequeñas moléculas (Goessens 1984, Helslop-Harrison y Bennet 1990, Agutter y Prochnow 1994, Lamond y Earnshaw 1998). Estudios recientes muestran nuevos aspectos de los CPN que han ampliado el conocimiento que tenemos de ellos. Actualmente sabemos que la cara interna y externa de los CPN son idénticas. El complejo de porc tiene una masa molecular de 124 millones de Daltones y formada principalmente por proteínas (Gerace y col 1982, Snow y col 1987, Holt y col 1987, Wozniak y col 1989, Chrystopher y Akey 1989, Carmon-Fonseca y col 1991, Finlay y col 1991).

- Lamina Nuclear

Es una capa electrodensa, presente en la mayoría de las células de mamíferos, se encuentran adyacentes a la membrana interna de la envoltura nuclear, mide alrededor de 30 a 100 nm de espesor. Las proteínas que forman la lámina nuclear están compuestas por uno a tres polipeptidos grandes, las llamadas laminas, A ($M_r = 70$ K), B ($M_r = 68$ K) y C ($M_r = 60$ K), que se encuentran en la misma proporción en el núcleo interfásico (Gerace y Blobel 1980). Las laminas A y C son homólogas a los filamentos intermedios del citoesqueleto, y probablemente comparten un antepasado evolutivo común (Krohner y Benavente 1986, Aebi y col. 1986, Lebel y Raymond 1987). El papel de las laminas nucleares en la integridad de la envoltura nuclear y su ensamble ha sido estudiado utilizando extractos libres de células de *Xenopus* (Newport y col. 1990) y extractos mitóticos de ovarios de hamster chino (CHO) (Thibodeau y Vincent 1991). Al extraer las laminas en estos sistemas se observó la inhibición del ensamble de la envoltura nuclear (Newport 1990, Peter y col. 1990).

- Cromatina

La cromatina está constituida por ADN combinado con grandes cantidades de proteínas histonas y proteínas no histónicas. Durante el proceso de división celular, la cromatina se condensa progresivamente hasta adquirir la forma de cromosomas. El número de los cromosomas presentes en las células de los distintos organismos varía, por ejemplo *Haplopappus gracilis*, una hierba anual del desierto tiene 4 cromosomas por célula; la col, 120; el girasol, 34, el trigo 42; *Allium cepa*; 16, *Lycopersicon esculentum*; 24, el humano, 46, (Raven y col. 1991, Howles 1996).

La cromatina en eucariontes se ha dividido de acuerdo a su estado de condensación durante la interfase en dos clases, la heterocromatina y la eucromatina. La heterocromatina es la forma condensada durante la interfase y por tanto se considera inactiva transcripcionalmente. Está dispuesta en una banda de manera irregular en la periferia nuclear, nucleolo y en parches a través del nucleoplasma. Este tipo de cromatina se divide en las formas constitutiva y facultativa. La primera tiene un alto contenido de secuencias repetidas (secuencias de ADN-SATELITE) que se localiza en la región centromérica del cromosoma, se presenta en grandes formaciones en tandem, comprende aproximadamente el 10% del genoma humano (Kelly 1985, Stuurman y col 1992) y cuya función es desconocida. Por otro lado la heterocromatina facultativa consiste de cromatina potencialmente activa e involucra la condensación en interfase de un cromosoma o un grupo de cromosomas de un par homólogo tal es el caso del cuerpo de Barr (Kelly, 1985).

La proporción de la heterocromatina presente en el núcleo se modifica con respecto a la actividad transcripcional. En las células eucarióticas, un promedio aproximado del 90% de la cromatina es transcripcionalmente activa en un tiempo dado, pero toda la cromatina inactiva no puede estar en estado condensado (Manuelidis 1990, Stuurman y col 1992). Sin embargo, el 10% de la cromatina que es transcripcionalmente activa se encuentra siempre en la forma de eucromatina descondensada y se ha confirmado que quizás sólo la eucromatina de la región pericromatiniana es a partir de la cual se transcriben los ARNms (Derenzini 1978). La cromatina en la mayoría de las células mantiene un grado de

compactación en particular, en las células nerviosas (Vázquez-Nin y col. 1983) y musculares (Zavala y col. 1992) del embrión de ave, que a través una serie de transformaciones se define gradualmente durante el proceso de diferenciación.

La cromatina bioquímicamente se encuentra constituida por nucleosomas que son secuencias repetidas de ADN e histonas. Cada nucleosoma posee dos de cada una de las histonas denominadas H2A, H2B, H3 y H4, la histona H1 tiene una función de unión (Felsenfeld 1978, De Robertis 1981, Kurnberg y Klug 1991). Para que se lleve a cabo la transcripción, al nucleosoma se le asocian proteínas como la HMG14 y la HMG17 que son proteínas de alta movilidad (Weisbrod 1982). Cuando el ADN se encuentra asociado a las histonas formando los nucleosomas se han encontrado sitios hipersensibles a algunas endonucleasas, estos se caracterizan por tener un alto contenido de bases A y T que se unen a HMG5. El empaquetamiento del ADN en cromatina y cromosomas, por intervención del nucleosoma, hace posible que el ADN de eucariontes sea mantenido dentro de un volumen relativamente pequeño y a la vez su función, se conserve de manera adecuada (Derenzini 1978).

- Matriz Nuclear

La mayor parte de la maquinaria nuclear requerida para la replicación, transcripción, procesamiento del ARN y su transporte hacia el citoplasma, esta localizada en dominios discretos en el núcleo, Estos dominios se encuentran asociados con la matriz nuclear, la estructura de soporte que realiza una función clave en la compartimentalización de este organelo (Nickerson y Penman 1992). Entre los componentes mejor conocidos de la matriz están las laminas, polipéptidos de 60,000 a 70 000 Mr, que se han localizado inmunologicamente en la envoltura residual, pero no en la matriz interna. Se ha observado que los filamentos de la matriz nuclear no son completamente desensamblados durante la mitosis, algunos de ellos quedan adheridos a los cromosomas y otra parte a las demás estructuras amitóticas, se ha sugerido que esta red mitótica puede servir como una estructura central en que la matriz nuclear de las células hijas es construida (Nickerson y

Penman 1992). La organización de la matriz nuclear en las células meristemáticas en proliferación de *Allium cepa*, es similar a lo establecido en otros eucariontes en los que se han realizado extracciones bajo las mismas condiciones, se han descrito tres componentes morfológicos principalmente : el complejo lamina-poro residual, la matriz interna y el nucleolo residual. La matriz tiene una estructura fibrogranular compuesta de fibras de 5 a 10 nm y gránulos de 20 a 25 nm, su componente proteico residual, tiene un patrón complejo constituido por polipéptidos de diferente tamaño (Moreno Díaz de la Espina, 1991). En la matriz nuclear de *Daucus carota* (zanahoria), *Vicia faba* (haba), *Pisum sativum* (chícharo) se presentan filamentos intermedios, el peso molecular de éstos es similar a las laminas que se presentan en células animales (Frederick y col 1992) . Existe poca información sobre la matriz nuclear de plantas, probablemente debido a que sus núcleos son difíciles de preparar y obtener en buenas condiciones *in situ* (Moreno Díaz de la Espina 1991).

- Maduración del ARNpre-m

La maduración del pre-mARN se lleva a cabo por medio de una serie de cortes de la hebra del ARN inmaduro. Los fragmentos que se liberan de la hebra se les llama intrones, son secuencias que no codifican para proteínas, en tanto las secuencias codificadoras que se unen van a formar parte de la hebra madura y se denominan exones. A este proceso de corte y empalme se le conoce como "splicing" (Alberts y col 1994, Howles 1996). En células HeLa infectadas con adenovirus se demostró que el proceso de transcripción y "splicing" del pre-mARN tiene una organización espacial y temporal en el núcleo interfásico, sugiriéndose que el mecanismo de reclutamiento que regula la localización de transcritos y factores de "splicing" surge en respuesta al inicio de la actividad transcripcional (Jiménez-García y Spector 1993).

El "splicing" del pre-mARN nuclear se realiza por medio de una estructura llamada spliceosoma. Este se encuentra ensamblado por partículas ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) ricas en uracilo tales como U1,U2,U4,U5,U6 (Sharp 1987 , Anderson

y col 1989), demostrándose que estas snRNPs están asociadas a componentes nucleares tales como fibras pericromatinianas, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados y matriz nuclear (Spector 1983, Fakan y col 1984, Nyman y col 1986, Ferreira 1994). Otros componentes que conforman al spliceosoma son factores esenciales de "splicing" como el SC35 con una masa molecular de 35 K, que tiene propiedades similares al factor de "splicing" designado como SF2, ambos son requeridos para los primeros pasos de la reacción de "splicing" .

Se ha observado que en extractos nucleares en los cuales el antígeno SC35 ha sido eliminado no hay actividad de "splicing", demostrándose también que este factor es requerido para el ensamble del spliceosoma (Spector y col 1991). En células HeLa, usando técnicas de fluorescencia y microscopía electrónica se ha detectado el factor SC35 asociado a partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares únicamente en puntos o manchas (Powell y col 1997).

Los snARNs y los factores esenciales de "splicing" que no forman snRNPs funcionan como componentes indispensables para el corte en el pre-mARN, de esta forma, el U1 interviene en el sitio de corte 5' a través de la interacción de pares de bases del snARN U1 y el sitio de corte, formándose una ramificación o "lariat" entre dos exones y un intron, para la liberación del "lariat" se lleva a cabo un segundo corte en el extremo 3', este reconocimiento es efectuado por el U2, y principalmente por U5 snRNP, respectivamente.

Se ha sugerido que el snARNU6 actúa como un componente catalítico en el spliceosoma y es regulado negativamente a través de su hibridación con U4 snARN formando un complejo snRNPU4/U6 . Con la liberación del "lariat" se unen ambos exones dando como resultado una hebra de ARNm maduro (Kandels-Lewis y Séraphin 1993).

- Maduración del ARN pre-r

En el nucleolo es el compartimiento en que el precursor del ARN ribosómico (ARN pre-r) es sintetizado, en él se realiza una serie de divisiones para la maduración del ARN ribosómico (ARNr), a través de una serie de divisiones nucleótidas y modificaciones en los ARNs maduros 18S, 5.8S y 28S, los cuales se ensamblan con proteínas para formar las subunidades ribosómicas, que también contienen varios ARNs pequeños nucleolares (snoARNs). La mayoría de estos snoARNs contienen una proteína llamada fibrilarina que es un componente de la región fibrilar del nucleolo (Steitz y col 1995).

En el núcleo de células de ratón se han encontrado evidencias de que el primer evento de procesamiento de pre-rARN se inicia en el espacio externo 5' del transcrito (5'ETS), en el cual intervienen por lo menos 4 snoRNAs: U14, U17(E1), E3, y U3. El más abundante de éstos es el U3 ($\sim 10^6$ moléculas por célula), que es esencial para el corte cerca del extremo 5' del transcrito. La unión del U3 puede ser considerada indispensable para que se inicie el proceso, en levaduras esta interacción es esencial para la producción del ARNr 18S (Hughes y Ares 1991, Beltran y Tollervey 1995 citados por Steitz y Tycowski 1995).

El segundo componente snoRNP nucleolar más abundante es el U8 es requerido para la división "upstream" del ARNr 5.8S así como en el extremo 3' del ARNr 28S. El menos abundante de los snoRNP es el U22 que es esencial para el procesamiento de ambos extremos 5' y 3' del ARNr 18S. El U14 es necesario para la maduración del ARNr 18S (Zagoriski y Fournier 1990 citados por Steitz y Tycowski 1995, Enright y col.1996, Rivera-León y Gerbi 1997).

III.- FIBONUCLEOPROTEINAS INTRANUCLEARES

- Nucleolo

Los nucleolos son el sitio de la biogénesis de los ribosomas (Warner 1990). En el nucleolo ocurre la síntesis, procesamiento y la producción de las moléculas del pre-ARNr así como su asociación con proteínas no ribosómicas, éstos eventos son coordinados en un tiempo y espacio de manera dependiente. Se ha establecido que la formación de ribosomas es un proceso vectorial que puede ser correlacionado con los diferentes componentes morfológicamente del nucleolo. (Puvion y Moyne 1981, Hadjiolov y col 1985). En estos sitios, los diferentes tipos de ARNs 18s, 28s y el 5.8s son sintetizados y ensamblados con proteínas como las ribosómicas S1 y 5 sRNA (Hugle y col 1985a).

Los diferentes pasos en la biogénesis del ribosoma corresponden a dominios nucleolares que pueden ser identificados por su morfología. Estos tres dominios básicos son : los centros fibrilares (FCs) que se encuentra delimitado por gránulos de 15-20 nm y fibrillas de 5-10 nm en la región central, éste es el sitio donde se localiza el ADNr u organizador nucleolar (NOR) (Hadjiolov 1985, Echeverría M y col 1994), el componente fibrilar denso (Dfc), formado por fibrillas de 3-4 nm de diámetro y el componente granular (GC) constituido por gránulos de 15 nm de diámetro (Luck y Lafontainen 1980, Somerville 1986, Puvion-Dutilleul y col 1991).

IV.- RIBONUCLEOPROTEINAS NO NUCLEOLARES

Las ribonucleoproteínas se encuentran involucradas en cada paso a lo largo de la expresión génica en eucariontes. La mayoría de los ARNs en la célula además de los mRNAs, son parte de la estructura molecular de la maquinaria ARN-Proteína que son identificados como partículas o conglomerados ribonucleoproteicos.

- **Las fibras pericromatinianas (FPs).** Fueron observadas por primera vez en cortes ultrafinos, con el contraste preferencial para ribonucleoproteínas (Monneron y Bernhard 1969). Son una población heterogénea de constituyentes fibrilares de diámetro variable de 3 a 5 nm hasta 120 nm de largo, que en cortes longitudinales, exhiben partículas de tamaño irregular formando fibras largas. Las FPs se encuentran principalmente en la vecindad del borde de la cromatina condensada. Esta área comúnmente llamada región pericromatiniana, representa la región nucleoplásmica donde se lleva a cabo la síntesis del ARN heterogéneo nuclear (ARN hn) (Fakan 1978, Novello y col. 1978). Monneron y Bernhard en 1969 sugieren que ellas pueden representar la expresión morfológica de la transcripción del RNA extranucleolar. Observaciones en diferentes modelos biológicos han mostrado su gran variabilidad dinámica, en hepatocitos extraídos de hígados de ratas disminuye la cantidad de Fps, las cuales se restablecen después de la administración de cortisol (Petrov y Bernhard 1971). Un marcado incremento en la densidad de fibras pericromatinianas se observó durante el proceso de preimplantación en la embriogénesis de mamíferos (Fakan y Odartchenko 1980).

Experimentos con autorradiografía de alta resolución, muestran que el ARNm se marca rápidamente y se encuentra asociado a FPs en la cromatina activa y en la periferia de la cromatina compacta (Bachelierie y col. 1975) lo mismo se encontró en cultivos primarios de hepatocitos ambos bajo condiciones normales (Fakan y col. 1976). Este tipo de experimentos demuestra que las FPs representan el sitio de síntesis de ARN extranucleolar reciente. El desarrollo de anticuerpos específicos para diferentes componentes nucleares

ha abierto un nuevo campo a la investigación *in situ* de los constituyentes nucleares por inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica.

Mediante esta metodología se demostró que las proteínas core RNPhn (Fakan y col. 1984), distintos antígenos ribonucleoproteínas pequeños nucleares (RNPsn) (Puvion y col. 1984a, Fakan y col. 1984) y los componentes splaisosómicos SC-35 están asociados con las fibras pericromatinianas (Spector y col 1991). Por medio de la hibridación *in situ* de ácidos nucleicos en cortes ultrafinos a nivel ultraestructural se ha confirmado la presencia de snARNU1 y U2 así como de ARN poly A en las fibras pericromatinianas (Benavente y col. 1987).

- **Fibras Intercromatineanas (FIC).** Pueden representar el estado intercromatiniano de las FPC durante su migración por el nucleoplasma (Puvion y Moyne 1978). Cuando se utilizan pulsos cortos de 5 minutos de uridina tritiada y experimentos de casa de 2 a 4 horas, en el espacio intercromatiniano aparecen marcas de radiactividad asociada a fibras ribonucleoproteicas por lo que se ha postulado que éstas podrían representar el sustrato morfológico de los hnARNs libres en el nucleoplasma o de migración al citoplasma (Busch 1983).

-**Gránulos Pericromatinianos (GPC).** Fueron observados por Watson en 1962. Se encuentran en la periferia de la cromatina compacta y se presentan por lo general como partículas aisladas, caracterizadas por un halo claro alrededor de ellas, su tamaño varía entre los 35 y 50 nm. Mediante extracciones enzimáticas y químicas se ha demostrado que éstas se encuentran constituidos por RNPs y filamentos enrollados (Monneron y Bernhard 1969).

En algunos estudios en los que se han utilizado drogas, agentes físicos y hormonas se ha observado la variación de estas partículas ribonucleoproteicas en los núcleos de hepatocitos de hígado de rata expuestos a α -amanitina (Petrov y Bernhard 1971), cortisol (Moyne y col 1977), nitomicina (Daskal y col 1980). Mediante la supresión y estimulación de hormonas como el estradiol en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* se demostró que esta

hormona juega un papel importante en la expresión génica de la célula, así mismo se consideran que los GPCs son un almacén de ARNm en equilibrio entre la síntesis y su salida al citoplasma, además se encontró que el estradiol aumenta la salida de los ARNm con una cinética más rápida que con la que se genera el incremento de la transcripción (Vázquez-Nin y col. 1978, 1979). Echeverría y colaboradores (1991) encontraron que la testosterona tiene efectos similares sobre el núcleo de células epiteliales de la próstata ventral de ratas.

En el núcleo de *Chironomus* se han identificado estructuras semejantes a los GPCs y se han designado como gránulos de Balbiani, estos se originan de las bandas de cromatina extendida, y migran hacia la envoltura nuclear, su comportamiento se ve alterado por sustancias que inhiben o estimulan la transcripción indicando una posible función de almacenamiento y/o transporte intranuclear de los complejos de ARN-Proteínas (Vázquez-Nin y Eernhard 1971). Usando este mismo modelo y mediante la utilización de anticuerpos contra RNPs involucradas en el "splicing" Vázquez-Nin y colaboradores (1990) encontraron que éste se lleva a cabo fundamentalmente en los sitios de transcripción sobre la fibra que posteriormente se pliega para formar los gránulos de Balbiani, equivalentes a los GPCs de mamíferos. De esto se deduce que ambas estructuras, son equivalentes y parecen contener ARNm maduro y por tanto se consideran como un almacén de ARNm. El mapeo con microscopía electrónica con filtro de energía permitió demostrar la presencia de fósforo en los gránulos de Balbiani en glándulas salivales de *Chironomus tentans* y *Ch. thummi* (Vázquez-Nin y col. 1997).

-Cuerpos nucleares (CN) Presentes en núcleos de células animales y de plantas. En células de plantas tanto en núcleos de tipo reticulado y cromocéntrico se presentan como estructuras esféricas y pequeñas. En *Cicer aietinum* los cuerpos nucleares se localizan cercanos al nucleolo y se encuentran constituidos por una estructura filamentosa y de una sustancia amorfa. Las técnicas citoquímicas revelan que los cuerpos esféricos se tiñen en forma similar a la región fibrilar del nucleolo (Luck 1982), en *Licopersicon esculentum*, se han localizado en contacto con la parte granular y también dispersos en el

nucleoplasma, su número varía de uno a tres (Moreno Díaz de la Espina 1992), estas estructuras exhiben una organización fibrilar, al parecer representan centrómeros. Su centro es de naturaleza ribonucleoproteica ya que es positiva a la técnica para RNPs. Desaparecen durante la mitosis, reapareciendo en G1. Su función no es conocida.

-Los cuerpos espiralados (CE). Han sido conocidos por años como componentes nucleares ocasionales, asociados frecuentemente al nucleolo, tienen 1 μ m de diámetro. Monneron y Bernhard en 1969 los denominaron cuerpos espiralados. En estas estructuras se han localizado una cantidad de proteínas nucleolares y ARNs importantes para el procesamiento del ARNr incluyendo fibrilarina y el ARNs U3 (Jiménez-García y col 1993).

Los CE pueden ser fácilmente reconocidos por inmunofluorescencia mediante la localización de la proteína p80 coilina (Andrade y col., 1993, Raska y col. 1991). La inmunolocalización ultraestructural reveló que los CE contienen componentes snRNP (Fakan y col 1984) tales como snARNU1 y U2. Estos datos fueron confirmados por inmunofluorescencia (Carmo-Fonseca y col. 1991,1992), sin embargo se encontró que el factor de "splicing" SC-35 no está asociado con los CE. Estudios recientes han demostrado que los cuerpos espiralados son estructuras dinámicas durante el ciclo celular, desaparecen en la mitosis y se reensamblan en G1 (Spector y col. 1992, Andrade y col. 1993). También se encontró que los cuerpos espiralados en plantas presentan un patrón de marca con uridina H3, así como cationes inorgánicas, ortofosfatos y actividad de fosfatasa ácida nuclear, lo que sugiere que estas estructuras deben estar relacionadas con el metabolismo del ARN en el núcleo, pero no involucradas en la transcripción (Moreno Díaz de la Espina y col 1980).

-**Gránulos Intercromatinianos (GIC)** fueron descritos por primera vez por Swift en 1959 (Swift 1959). En células de mamíferos se presentan en cúmulos formados de gránulos de 20-25 nm interconectados por fibras muy delgadas formando una red en el espacio intercromatiniano del núcleo y en plantas se encuentran dispersos o constituyendo pequeños cúmulos (Moreno Díaz de la Espina y col. 1992). Mediante análisis citoquímicos, extracciones enzimáticas, químicas y contrastes preferenciales se ha evidenciado que los GICs contienen un ARN bien protegido por proteínas principalmente fosforiladas (Granboulan y Bernhard 1961, Swift 1963, Waseff 1979, Fakan 1986). Se ha indicado que estos componentes se marcan débilmente con uridina tritiada (Fakan 1978, Puvion y Moyne 1981) y contienen pocas proteínas core RNPhn (Fakan y col 1984, Leser y col 1989) lo cual sugiere que estas RNPs no son un sitio de transcripción. Se ha observado su variación en infecciones virales (Wassef 1979) y con agentes fisicoquímicos que actúan en diferentes etapas del metabolismo del ARN (Puvion y Moyne 1981).

Recientemente con hibridación *in situ* se ha notado la presencia de ARN poly A en estos cúmulos (Visa y col 1993b). En plantas (*Allium cepa* y *Lycopersicon esculentum*) por medio de contraste con oxinitrato de bismuto se ha observado que los GICs tienen una serie de características comunes a los GICs de animales, son resistentes a una doble digestión con pronasa y ARNasa I y poseen un alto contenido de fosfoproteínas (Medina 1989, Moreno Díaz de la Espina 1992). Los GICs son parte de la matriz nuclear interna, esto se encontró mediante nucleasas y extracción de núcleos con detergentes y amortiguadores con alto y bajo contenido de sales (Berezney 1977). En años recientes, la utilización de diferentes anticuerpos contra componentes nucleares ha permitido un gran avance en la comprensión del funcionamiento de los GIC, ellos contienen snRNPs (Fakan y col 1984), muestran una acumulación de todos los factores de "splicing" que han sido probados tal es el caso de antígenos snRNPs (Spector 1983, Carmo-Fonseca y col 1992), la proteína SC-23 (Spector 1991) así como U1 y U2 snARN. Sin embargo el análisis de cortes semifinos, de

células brevemente marcadas con uridina tritiada e inmunomarcadas para los antígenos Sm snRNPs muestra que los sitios de síntesis de ARN intranucleolar no coinciden con el área nuclear enriquecida con snRNP que corresponde a los cúmulos de GIC (Spector 1990).

Los GICs se han estudiado más ampliamente en células animales tanto en condiciones normales como experimentales, se ha demostrado que forman parte de la matriz nuclear interna y se supone que son un sitio de acumulación de snRNPs y/o maduración y transporte de rRNPs. (Spector 1983). La presencia de algunas proteínas nucleolares en ellos corrobora la relación entre los GIC y el nucleolo (Clevenger 1984). Recientemente Mintz y col 1999 han purificado bioquímicamente los GICs del hígado de ratón , identificaron 33 proteínas conocidas , varias de ellas relacionadas con la maduración del pre-ARNm y tres nuevas proteínas.

Los GICs se han estudiado durante el ciclo celular en células animales, usando contrastes preferenciales para RNPs, plata amoniacal y con anticuerpos dirigidos contra snRNPs (Thiry 1995), y con el contraste preferencial con oxinitrato de bismuto (Krzyowska-Gruca 1985). En estos trabajos, se reporta que durante la mitosis los GICs se dispersan en el citoplasma, desaparecen a finales de la telofase y reaparecen en las células hijas. En células de plantas, estas ribonucleoproteínas (GIC) se han estudiado poco y por tal motivo se desconoce su comportamiento durante la fase de división o mitosis por lo que en este trabajo se realizara la identificación de estas RNP durante la división celular en meristemas de raíces de jitomate y cebolla mediante la utilización de la técnica de contraste preferencial con oxinitrato de bismuto desarrollada por Locke y Hui (1977).

V.- MITOSIS

Una célula puede originarse sólo mediante la división de otra célula pre-existente. Esta a su vez, depende de la previa división del núcleo. Los núcleos se dividen por mitosis produciéndose la separación en partes iguales de los cromosomas entre las dos células hijas, manteniéndose así la continuidad del número cromosómico.

Se ha observado que el período mitótico en células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* es de 2.4 horas a una temperatura de 20°C y de 1.75 horas a 25°C, en *Arabidopsis thaliana* a 23°C es de 2.8 horas (López-Sáez y col 1966, Deltour y col. 1985). También se ha demostrado que la temperatura afecta la duración absoluta de cada uno de los diferentes estados morfológicos del ciclo celular (interfase y fases de la mitosis), pero la relación proporcional entre la duración de cada uno de estas etapas del ciclo y la duración total del mismo, permanece constante (González- Fernández y col 1971, Comai y Harada 1990).

La regulación de la duración del ciclo celular tiene lugar principalmente por su detección en un punto específico de G1 y se dice entonces que la célula se encuentra en estado G0; se considera que la célula es retirada del ciclo. Cuando las condiciones cambian y se reanuda su crecimiento, las células entran nuevamente en período G1 (Mazia 1975).

La célula transcurre la mayor parte de su vida en interfase y en ella como se ha mencionado, se llevan a cabo intensas actividades metabólicas, de síntesis proteica (Thibodeau y Vincent 1991, Tang y col 1994), duplicación del material genético (Kelly y col 1993, Howles 1996) y de muchos elementos celulares que serán divididos equitativamente durante la mitosis.

Al comienzo de las fases S y de la mitosis se producen señales citoplásmicas solubles; como son el factor activador de la fase S y el factor promotor de la fase de mitosis (MPF) (Alber.s y col 1994). El primero promueve la fase S y prepara a la célula para la fase M.

El MPF se identificó inicialmente en ovocitos de rana detenidos en profase I y se consideró como el principal factor encargado de la maduración del ovocito y su progresión en los demás eventos de la división meiótica (hasta la etapa de metafase II); sin embargo el MPF se ha logrado identificar en la mayoría de las células eucariontes en fase M. Actualmente se sabe que el MPF puede regularse por fosforilación (Murray y col 1989, Alberts y col 1994). La regulación del paso de interfase a mitosis en células eucariontes es disparada universalmente por la proteína kinasa 34kDa cdc2 (Nurse 1990, Rosenblatt y col 1992), dicha proteína (cdc2) se incrementa rápidamente al final de la interfase, asociándose con una ciclina mitótica p34cdc2, por tanto el MPF es una proteína cinasa que fosforila a H1, la activación e inactivación del MPF es el elemento que controla el ciclo mitótico de las células eucarióticas (Murray y Kirschner, 1989 Frank 1992).

Por otro lado, se ha identificado una proteína de 56 Kd que se acumula durante la interfase y desaparece en la fase de M, reapareciendo nuevamente en la siguiente interfase, debido al surgimiento en forma cíclica de estas proteínas se han denominado ciclinas (Rosenblatt y col 1992).

Las ciclinas permanecen en concentraciones estables en células que sufren división celular, siendo necesaria su degradación para que la célula alcance el estado de interfase, etapa en la que se ha señalado con anterioridad, comienza nuevamente a sintetizarse y acumularse intracelularmente hasta activar nuevamente al MPF (Gu y col 1992, Rosenblatt y col 1992). Se ha propuesto una enzima inactivadora del MPF (inactivasa del MPF) que tendría una función antagónica al de la ciclina; sin embargo aun no se ha podido demostrar su existencia. El MPF en forma activa es una cinasa que fosforila un gran número de proteínas (enzimas) indispensables para desencadenar los eventos característicos de la fase M (Grandin y Charbonneau 1991).

Al término de la mitosis las fosforilasas eliminan los fosfatos y con ellos inactivan todas la enzimas, resultando en el restablecimiento de la estructura interfásica de la célula.

Durante la mitosis se observan los siguientes rasgos bioquímicos generales: disminución de la síntesis proteica (hasta un 75%), disminución de los niveles de AMPc, fosforilación de las histonas (en particular la H1) durante la condensación cromosómica y detención de la síntesis de ARN, que se demuestra por la falta de colocación de uridina tritiada en células en división (Prescott 1976, De Robertis 1987, McIntosh y Koonce 1989).

Desde un punto de vista práctico las etapas de la mitosis se dividen en : profase, prometáfase, metafase, anafase y telofase.

- Profase

La transición de la etapa G2 a la profase es paulatina y poco nítida (Alberts y col 1994). Entre los principales eventos celulares de la profase tenemos los siguientes:

a) Los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto se desensamblan, desestabilizándose la forma celular original, adquiriendo una forma esférica característica de las células en división. La despolimerización de los microtúbulos se debe a cambios en el centro organizador de microtúbulos (COMT) del centrosoma o centro celular. El COMT está constituido por un complejo proteico de material electrodensito a partir del cual se generan microtúbulos (sitios de nucleación y producción microtubular); cuando este material rodea a los centriolos a esta región celular se le conoce como centrosoma o centro celular (aunque en los vegetales superiores sabemos que no existe centriolos durante el proceso mitótico, está presente el

COMT que organiza y genera los microtúbulos correspondientes). Se ha estudiado el ciclo del centrosoma, en el cual se observa una duplicación del par de centriolos que se inicia desde G1, siguiendo una etapa de transición de esta duplicación en la fase S y terminando en G2 al completarse íntegramente la duplicación centriolar. En profase los dos pares de centriolos (y por ende el par de centrosomas) se van separando gradualmente dirigiéndose a los extremos opuestos de la célula (sitios conocidos como " polos"). Cada COMT del par de centrosomas organiza un grupo de microtúbulos que parten en forma radial de éste,

constituyendo los ásteres y conforme se alejan paulatinamente hacia los polos, surgen algunos microtúbulos polares, que participan en la formación del huso mitótico (MacIntosh y Koonce 1989). Las plantas superiores, como las angiospermas y la mayoría de las gimnospermas, carecen tanto de centriolos como de ásteres (lo cual como ya se ha señalado, implica que el COMT organice el resto de las estructuras del huso mitótico); por lo que en estos casos puede hablarse de una mitosis anastral o bien de mitosis astrales en los organismos que si presentan centriolos y ásteres (Wolfe 1980).

b) El tráfico general de membranas se detiene, de tal forma que no puede observarse pinocitosis, fagocitosis y exocitosis. Además durante la profase se suprime la síntesis de ARN y de proteínas.

c) La condensación paulatina de la cromatina en cromosomas. Es bien sabido que los cromosomas (dos cromátidas hermanas unidas por un centrómero o constricción primaria) solo son observables durante la división celular. En un estudio realizado a nivel de microscopía de barrido de alta resolución en células meristemáticas de raíz de cebada y centeno se observó que el inicio de la condensación se lleva a cabo en la región centromérica y las cromátidas son frecuentemente discernibles en la región telomérica sin descondensar (Martín 1996); sin embargo, cuando las células interfásicas son fusionadas con células en fase de M, se logra condensar prematuramente la cromatina, lo que demuestra la existencia de una cromátida simple en G1, mientras que en G2 los cromosomas están constituidos por dos cromátidas lo que prueba la duplicación del ADN en la etapa intermedia (S); este hecho también sugiere la existencia en las células en división de un factor citoplásmico (MPF) responsable de provocar en las células en interfase los cambios propios de las células mitóticas (MacIntosh y Koonce 1989).

La máxima condensación de la cromatina se presenta hasta la metafase, por lo que esta etapa suele utilizarse para estudios citogenéticos del cariotipo. Como resultado de la condensación de la cromatina se forma un número característico de cromosomas propios de la especie por ejemplo *Lycopersicon esculentum* tiene 24 cromosomas y *Allium cepa* 16.

La condensación de la cromatina es dirigida por la fosforilación de una serie de cinasas de histonas que provocan a su vez la fosforilación de las histonas H3; así como la hiperfosforilación de las histonas H1 (Hohmann 1976)

La topoisomerasa II es la principal enzima que organiza la cromatina en cromosomas, esto ha sido comprobado mediante el uso de inhibidores específicos de esta enzima (McIntosh y Koonce 1989).

-Estructura y Función del Cinetocoro

Las cromátidas hermanas se encuentran unidas entre sí por medio de estructuras conocidas como centrómeros, su ubicación a lo largo de los cromosomas es variable, ello permite clasificar morfológicamente a los cromosomas: en metacéntricos, submetacéntricos o acrocéntricos y telocéntricos. Los centrómeros presentan a ambos lados, estructuras especializadas, que al observarse con el microscopio electrónico se encuentran formadas por tres láminas sobrepuestas con diferentes grados de densidad electrónica: a) la lámina interna está en contacto con la cromatina, b) la lámina intermedia de densidad menor y c) la lámina externa constituida por material denso y tiene un grosor de 40 nm, además sobre su superficie se observa una corona o collar de finos filamentos. Existen dos cinetocoros por cada cromosoma metafásico, es decir uno por cada cromátida y representan el sitio específico donde los microtúbulos del huso se unen fuertemente para dirigir la migración de las cromátidas en la fase M (Brinkley y Stubbs 1970, Blaczonek y Brinkley 1987, Earnshaw 1991).

En las células del endospermo de *Haemaphysalis*, la región cinetocórica de los cromosomas durante la prometáfase temprana está compuesta por lo menos de 4 subunidades (gránulos), dos por cada cromosoma hermano, estas subunidades se asocian después de su unión con los microtúbulos. Los microtúbulos se unen asincrónicamente a cada subunidad, después del rompimiento de la envoltura nuclear (Bajer 1987).

- Prometafase

La prometafase puede dividirse en dos etapas principales :

- a) Prometafase temprana se caracteriza por la fragmentación de la envoltura nuclear y marca el final de la profase y el inicio abrupto de la prometafase.
- b) Prometafase tardía consiste en la conexión e interacción de los microtúbulos con el cinetocoro, dando como resultado la orientación de los cromosomas y su movilización hasta situarse en un solo plano (el placa metafásica). Este marca el fin de la prometafase y el inicio de la metafase (Dyson 1977).

- Fragmentación de la Envoltura Nuclear

La fosforilación de las tres lámina, ocurre durante la prometafase, está se produce en diferentes sitios de las cadenas polipeptídicas de las láminas provocando la fragmentación de la envoltura nuclear en pequeñas vesículas (Gerace 1980). Se ha propuesto que una de las tres proteínas permanece adherida a los fragmentos vesiculares de la envoltura nuclear, mientras que las dos restantes se encuentran solubilizadas en el citoplasma. Durante la telofase ocurre un fenómeno inverso de reensamble, por un procedimiento bioquímico de desfosforilación, organizándose nuevamente los tres elementos estructurales de la envoltura. Esta sucesión de eventos se conoce como ciclo de la envoltura nuclear (Gerace y Blobel 1980). Inmediatamente después de la fragmentación de la envoltura nuclear ocurren interacciones de los microtúbulos del huso mitótico con los cinetocoros de los cromosomas, a este conjunto de microtúbulos se les denomina fibras cromosómicas.

Los microtúbulos presentan dos extremos, uno de ellos se conoce como extremo (-) “menos “ o de crecimiento lento, este extremo se localiza en los polos; y el extremo (+) “más “ o de crecimiento rápido se encuentra en la parte media de los microtúbulos polares, o bien adheridos al cinetocoro. Los microtúbulos son polímeros dinámicos constituidos por una proteína dimérica designada como tubulina. El ensamble y desensamble de las subunidades de la tubulina tienen lugar en el extremo (+), el cual se adhiere al cinetocoro, en este sitio se han identificado por inmunolocalización una serie de proteínas que

posiblemente participan en la unión de la tubulina al cinetocoro (Blaczon y Brinkley 1987).

- Metafase

Cuando los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica, existe un equilibrio de fuerzas provocada por los microtúbulos. Los cromosomas avanzan hacia adelante y atrás en forma oscilatoria, ajustando constantemente su posición metafásica (Mc Intosh y Koonce 1989, Alberts y col 1994). Si se fragmenta un microtúbulo con un haz de rayo láser, el cromosoma migra inmediatamente hacia el polo opuesto. Esto demuestra que las mismas fuerzas que provocan la formación de la placa metafásica, son las que provocan la migración de los cromosomas a la fase siguiente (anafase) (McIntosh y Koonce 1989).

La tensión generada en ambos lados de los microtúbulos cinetocóricos con orientación bipolar permite la estabilidad de los cromosomas, estableciéndose una relación de fuerza de tensión con la estabilidad del anclaje y viceversa. Cuando los cromosomas se alinean en el ecuador, su eje longitudinal forman un ángulo recto con las fibras del huso (Ault y Nicklas 1989).

Como ya se ha mencionado, la fosforilación específica de las histonas H1 y H3 (de los nucleosomas), debe terminarse antes de que la condensación cromosómica sea total. La condensación de los cromosomas puede bloquearse utilizando un inhibidor de la topoisomerasa II como es el caso de la novobiocina que actúa de una manera reversible, además de esta enzima existen otras cinasas de histonas, algunas de ellas son sintetizadas durante G2 (Hernández 1984, Earnshaw y col 1985, Newport y Spann 1987).

Se ha propuesto como base de la condensación la formación de puentes S-S a través de las fibras de las proteínas. En los cromosomas de células meristemáticas de raíz de cebada y centeno durante la metafase y anafase se presenta el mayor grado de condensación de los cromosomas mostrando una estructura compacta con una superficie lisa (Martin 1996).

- Anafase

Durante la anafase se rompe el equilibrio de fuerzas existentes en metafase y los cromosomas se mueven hacia los polos a una velocidad constante (De Robertis 1987, Mcclintosh y Koonce 1989). La anafase comienza abruptamente con la separación sincrónica de las cromátidas hermanas de cada cromosoma metafásico, ya que cada uno de sus extremos está relacionado con microtúbulos cinetocóricos. La señal no se ejerce directamente sobre el huso mitótico; se ha sugerido que la señal involucra un incremento en las concentraciones citosólicas de calcio. Esta liberación de Ca^{2+} está mediada y regulada por las vesículas de retículo endoplásmico que se encuentran alrededor de las fibras del huso (Santella 1998). Con la utilización de colorantes como el quin-2 y fura 22 para teñir Ca^{2+} libre intracelular se ha observado un incremento de Ca^{2+} (0.4 M) en la transición de metafase a anafase (Ratan y Shelanski 1986). El mecanismo por el cual las células pueden generar un gradiente sustancial de Ca^{2+} en el citoplasma durante la anafase es desconocido; sin embargo se piensa que puede ser una señal química que modifica la permeabilidad de los canales de calcio en las vesículas que rodean a los microtúbulos del huso, quedando aun incierto que factores intervienen en la liberación de esta hipotética señal química (Earnshaw 1991). Una vez que el "disparador" ha sido liberado, se inicia súbitamente la anafase, con la separación de las cromátidas hermanas en su punto de unión con el centrómero. Aparentemente este evento es independiente de que el cromosoma esté unido o no al huso, por lo que se considera un evento regulado a través del mismo cromosoma. Un mecanismo propuesto considera al centrómero como el responsable de este proceso debido a que este es una secuencia de ADN que bloquea su duplicación en la fase S, y por lo tanto, el centrómero es un segmento de ADN no replicado, por tal motivo mantiene unidas las cromátidas. Durante la anafase ocurriría la repentina duplicación del centrómero y con ello las cromátidas se separan mutuamente. Este modelo no ha podido comprobarse. Los movimientos de las cromátidas comprenden dos mecanismos distintos y bioquímicamente independientes que se denominan anafase "A" y anafase "B". La anafase "A" se refiere al movimiento de las cromátidas hacia los polos asociado a un acortamiento progresivo de los microtúbulos de cinetocoro; mientras que la anafase "B"

consiste de un alargamiento de los microtúbulos polares (o continuos) al doble de la distancia que presentaban en metafase. En los vegetales, la anafase “B” prácticamente no provoca aumento en la longitud de los microtúbulos polares (Ratan y Shelanski 1986). La anafase “B” aparentemente requiere de ATP ya que es inhibida por vanadato , una droga que bloquea la acción de ATPasas y reactivos sulfhidrilos en bajas concentraciones (Cande 1986). En cambio la Anafase “A” no es afectada por el vanadato, sin embargo la aplicación de drogas como: taxol, D2O, colchicina, vimblastina, o bien bajas temperaturas o presiones hidrostáticas bloquean la despolimerización de los microtúbulos. (Cande 1986, Ratan y Shelanski 1986).

La anafase “A” : el mecanismo exacto que generan las fuerzas que conducen las cromátidas hacia los polos no está bien aclarados; recientemente se han propuesto (Alberts y col 1994) dos posibles modelos mediante los cuales el cinetocoro pudiera generar las fuerzas necesarias para el movimiento anafásico de la cromátidas.

- a) Proteínas “caminadoras” de microtúbulos semejantes a la dineína o cinecina del cinetocoro, las cuales hidrolizan ATP, utilizando la energía de está para jalar la cromátida a lo largo de los microtúbulos ; el extremo positivo de los microtúbulos es el que se despolimeriza. El movimiento de las cromátidas es dirigido por la hidrólisis del ATP.
- b) El movimiento de las cromátidas depende del desensamble de los microtúbulos, conforme las subunidades de tubulina se separan , el cinetocoro tiende a deslizarse a lo largo del microtúbulo, esto se debe a que las proteínas del cinetocoro tienen gran afinidad por la tubulina polimerizada, de tal manera que con la finalidad de restaurar la unión con las paredes de los microtúbulos, el cinetocoro avanza en dirección a los polos.

En metafase las fibras del cinetocoro permanecen con una misma longitud, por un mecanismo equilibrado, existiendo pérdida de subunidades en el extremo (-), mismas que son recuperadas por la adición de subunidades en el extremo (positivo) del cinetocoro. En la anafase este equilibrio se pierde, ocurriendo en la mayoría de los organismos la pérdida de subunidades en el extremo positivo , en levaduras y otros organismos, la pérdida ocurre en

ambos extremos de las fibras (Alberts y col 1994). Recientemente se han reconocido mediante anticuerpos (anti-MAP 1C) proteínas semejantes a la dineína citoplasmática asociada a los cinetocoros de mamíferos (Yoshida 1990), este hecho refuerza la idea de que el ATP maneja la migración de cromátidas a través de proteínas caminadoras que tienen actividad ATPasa.

Anafase "B" : Reconstrucciones tridimensionales por medio de cortes seriados para microscopía electrónica han demostrado que los microtúbulos polares se sobreponen en la zona ecuatorial del huso en forma antiparalela; estos microtúbulos se deslizan entre sí en las porciones de sobreposición y aumentan su longitud a partir de sus extremos (positivos), incrementando igualmente la distancia existente entre los polos de la célula (Hernández 1984, Alberts y col 1994). El crecimiento de los polímeros se da en forma simultánea (Ratan y Shelanski 1986).

Otra molécula capaz de unirse a los microtúbulos y que puede generar el deslizamiento por hidrólisis del ATP es la cinesina; su posible participación esta latente, ya que no ha podido demostrarse hasta ahora (Alberts y col 1994).

- Telofase

Es la etapa final de la mitosis, en este periodo los fragmentos de la membrana nuclear se asocian en la periferia de las cromátidas , rodeándolas parcialmente, posteriormente se fusionan entre sí para formar de nuevo dos núcleos, cada uno correspondiente a una célula hija. La repolimerización de la envoltura nuclear es dirigida por fosfatasas que desfosforilan las proteínas de la envoltura nuclear, lo que determina su reconstitución.

Un tipo de proteínas unidas a los fragmentos vesiculares de la membrana nuclear, se autoensamblan, por otro lado dos tipos de proteínas solubles en el citoplasma que forman la lámina nuclear permiten el restablecimiento no solo de esta última sino además de los poros nucleares y de las membranas nucleares.

La desfosforilación de las histonas, es un fenómeno crucial para que los cromosomas se descompacten hasta cromatina, el inicio de la descondensación se lleva a cabo en la región telomérica, adquiriendo finalmente una apariencia microscópica propia de la interfase (Tolosa 1984, Martin 1996), reanudándose la síntesis de ARN, una vez que las envolturas nucleares se ha formado, reagrupándose los elementos que conforman el nucleólo en cada uno de los núcleo hijos con lo cual se hacen evidentes y funcionales (De Robertis 1987, Alberts 1994). Los cromosomas en profase y telofase son particularmente adecuados para realizar estudios del arreglo y organización de la cromatina en cromosomas de plantas (Martin 1996).

- Citocinesis

Corresponde a la división citoplasmática de las células hijas, se inicia durante los últimos eventos de la anafase, y se continúa a lo largo de la telofase, culminando en el momento en que las células comienzan la interfase (en particular G1).

En las células animales, se forma el surco de división celular, en ángulo recto en relación con el eje longitudinal de la célula. El huso mitótico desaparece gradualmente excepto en la porción media de la célula en la que se observa un mayor número de microtúbulos que atraviesan la porción electrodensa a ambos lados, mientras otros terminan en el ecuador. (Beams 1976).

La segmentación de las células hijas es debida a la participación de filamentos de actina, la agrupación de estos elementos en haces, forman el anillo contráctil, que se relaciona con la porción citoplásmica de la membrana plasmática. Este anillo contráctil se ensambla espontáneamente alrededor de la célula a nivel del cuerpo medio, de tal manera que la superficie celular se pliega y se profundiza formando el surco, iniciándose así la división celular. Con este mecanismo el cuerpo medio se comprime y se estrecha, formándose un pequeño istmo que mantiene la comunicación citoplasmática entre las dos células hijas, hasta separarlas finalmente.

La fuerza que determina la constricción del anillo es ejercida según diversas evidencias experimentales por filamentos de actina y miosina, interaccionando de una manera similar a la que ocurre en el músculo.

Es importante señalar que de todos los elementos del citoesqueleto, solo los microtúbulos y microfilamentos (actina y miosina) tienen una participación activa en la división celular; en tanto los filamentos intermedios no son utilizados, permaneciendo estáticos alrededor de los núcleos hijos hasta que son separados por efectos de la segmentación (Mc Intosh y Koonce 1989).

Durante la citocinesis de las células animales se requiere una mayor cantidad de membranas plasmáticas, la biosíntesis de estas se da poco antes del inicio de la división permaneciendo almacenadas en forma de vesículas, durante la mitosis (Hernández 1984). En las plantas superiores, este mecanismo tiene como rasgo especial la formación de una estructura conocida como placa celular, constituida por microtúbulos polares con una organización paralela dando una configuración cilíndrica conocida como fragmoplasto; además existen vesículas provenientes del aparato de Golgi que son transportadas a lo largo de los microtúbulos hasta la región ecuatorial donde se agrupan y fusionan construyendo con ello una estructura discoidal en la parte media de la célula, llamada placa celular temprana; las vesículas contienen los precursores bioquímicos de esta estructura como son la pectina y hemicelulosa, estas sustancias son liberadas por ellos en el momento de su cohesencia. Los microtúbulos localizados a ambos lados de la placa celular precoz se desensambla reorganizándose nuevamente, ahora en las porciones laterales, conduciendo nuevamente otras vesículas (con sus correspondientes precursores), permitiendo que la placa se extienda en dirección periférica hasta unirse con los límites celulares laterales. El último paso consiste en la depositación de microfibrillas de celulosa en el interior de la placa con lo que obtiene su consistencia habitual. Las dos células hijas mantienen cierta continuidad citoplasmática a través de ciertos poros llamados plasmodesmos (Bajer 1968, Alberts 1994).

VI- OBJETIVOS

- Caracterizar por medio de técnicas citoquímicas para microscopía electrónica el núcleo de células meristemáticas de *Lycopersicon esculentum* en estado quiescente y en estado activo, con énfasis en los cuerpos nucleares y los centros fibrilares de los nucléolos
- Estudiar la distribución de los gránulos intercromatinianos durante la mitosis en células meristemáticas de *Lycopersicon esculentum* y *Allium cepa* por medio de técnicas de contraste preferencial como el oxinitrato de bismuto.

VII.- MATERIALES Y METODOS

Procesamiento para resina acrílica (LR White)

Para este estudio se utilizaron meristemos de raíz de cebolla y jitomate. Las semillas de jitomate se colocaron en una cámara húmeda a temperatura constante de 25°C para su germinación, por otro lado los bulbos de cebolla se colocaron en contacto con agua para el crecimiento de las radículas a temperatura ambiente. A los 3 días de germinación los meristemos de 3 a 4 mm de largo fueron fijados con glutaraldehído al 6 % en amortiguador de fosfatos a 0.16 M a pH de 7.2 durante 90 min, manteniéndolos al vacío durante 5 min, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con el mismo amortiguador, se deshidrataron con alcoholes graduales de 30,40,50,60,70,80,96 y 100% en cada uno de ellos se dejaron una hora excepto en el alcohol absoluto en el cual se realizaron tres cambios de una hora cada uno.

En la preinclusión se efectuaron tres cambios, en el primero se colocaron los meristemos en una mezcla con una parte de resina LR White por dos partes de alcohol absoluto durante 3 horas, el segundo cambio fue dos partes de resina por una de alcohol absoluto durante tres horas y el tercer cambio con resina pura durante 24 horas. Todo este proceso desde la fijación hasta la preinclusión se realizó a una temperatura de 4°C. Los meristemos finalmente se incluyeron en resina pura en cápsulas de gelatina que se polimerizaron a temperatura de 50°C durante 18 a 20 horas. De los bloques obtenidos se hicieron cortes para microscopía óptica de aproximadamente 0.5 μm de grosor, de estas preparaciones se seleccionaron las zonas de mitosis y se cortaron para microscopía electrónica, los cortes con un grosor de 60 a 90 nm, se colocaron sobre rejillas de cobre de un solo agujero para su posterior contraste con oxinitrato de bismuto. Se utilizó como testigo hígado de ratón para verificar el contraste procesándose en las mismas condiciones que el tejido vegetal.

La solución de contraste se preparó de la siguiente manera :

Solución A .- oxinitrato de bismuto: Se disolvieron 400 mg de tartato de sodio en 10 ml de cloruro de sodio al 1N , se mantuvo en agitación y se le agregaron 200 mg de oxinitrato de bismuto.

Solución B .- amortiguador de trietanolamina 0.2M a pH de 7.0

Mezcla final .- Se adicionaron 2 partes de la solución B a una parte de la solución A , las rejilla con los cortes se flotaron en esta solución durante una hora, posteriormente las rejillas se lavaron con amortiguador de trietanolamina 0.1 N , pH7.

Las preparaciones fueron observadas al microscopio electrónico (Carl Zeiss EM-10) y se tomaron micrografías electrónicas de las diferentes etapas de la mitosis, para su posterior análisis en papel.

Procesamiento para resina epódica (Epon 812)

Las radículas de semillas de jitomate en estado quiescente, meristemas de jitomate con tres días de germinación, fueron fijados con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos a 0.16 M a pH 7.2 durante 90 min, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con el mismo amortiguador para continuar con una deshidratación con alcoholes graduales (30,40,50,60,70,80,96 y 100%) se realizaron dos cambios de 10 min en cada uno, excepto en el absoluto en el cual se hicieron tres cambios de 15 minutos, posteriormente los meristemas se colocaron en óxido de propileno, en el cual se efectuaron tres cambios de 10 min cada uno, finalmente los meristemas se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente en una mezcla que contenía una parte de óxido de propileno por una de resina (Epon 812). Los meristemas se incluyeron en resina pura y se polimerizaron a 60°C durante 24 horas. Los cortes ultrafinos de 60 a 90 nm para microscopía electrónica, se contrastaron con la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (Monneron y Bernhard 1969), las preparaciones se flotaron durante 3 minutos en acetato de uranilo posteriormente se lavaron con agua bidestilada para flotarlos en EDTA (ácido etilendiaminotetracético) durante 20 minutos, se realiza un lavado con agua bidestilada para flotarlos durante 2 minutos en citrato de plomo, finalmente se lavan con agua bidestilada y

se dejan secar para su observación al microscopio electrónico. Otras preparaciones se flotaron en ácido fosfotúngstico a pH 2.3 durante una hora para el contraste de la cromatina (Vázquez-Nin y col 1973). Cada una de estas preparaciones se observó al microscopio electrónico tomándose micrografías electrónicas de las mismas.

VIII.- RESULTADOS

- Interfase

En núcleos de células meristemos de raíces de jitomate en estado quiescente con el contraste preferencial para ribonucleoproteínas, en el interior del núcleo, en el espacio intercromatiniano se presentan gran cantidad de fibras mezcladas con componentes granulares; estos últimos son más grandes que los ribosomas, la cromatina se observa blanqueada en cúmulos grandes y compactos al igual que la cromatina perinuclear, el nucleolo se aprecia pequeño, compacto y en su periferia cromatina compacta. En su interior destacan dos componentes principalmente una parte granular más clara y menos abundante entremezclada con zonas más compactas de material fibrilar denso (Fig 1).

En células meristemáticas de jitomate con 3 días de germinación, con el contraste preferencial para ribonucleoproteínas a diferencia de los núcleos de células en estado quiescente no se presentan tantas fibras en el espacio intercromatiniano, la cromatina se observa blanqueada y distribuida en pequeños cúmulos en el nucleoplasma, cromatina perinuclear, y otra adosada a la periferia del nucleolo. Los nucleolos se notan de mayor tamaño que en el estado quiescente, observándose los centros fibrilares, los centros fibrilares densos y los componentes granulares, en cuanto a los gránulos pericromatinianos son escasos y se encuentran principalmente cerca de la cromatina compacta. Los gránulos intercromatinianos se evidencian generalmente dispersos o bien formando pequeños cúmulos en el espacio intercromatiniano unidos por finas fibras. Las fibras pericromatinianas se presentan en el borde de la cromatina compacta, los cuerpos nucleares son positivos a esta técnica, en su interior se aprecia un componente granular, cuando están presentes, se encuentran de uno a tres y siempre cercanos al nucleolo (Fig 2).

Ocasionalmente en los núcleos activos se encontraron estructuras anulares, siendo negativos al contraste preferencial para cromatina (ácido fosfotúngstico) (Fig 3a) al igual que otros cuerpos nucleares (Fig 3b), en estas micrografías se destaca principalmente la distribución de la cromatina perinuclear, perinucleolar y pequeños cúmulos en el nucleoplasma (Fig 3a y b). En el nucleolo con esta misma técnica, se observa mejor la

inclusión de cromatina intranucleolar (Fig 4a) siendo más densa en la parte periférica en donde se aprecian gran cantidad de fibras (fig 4b).

- Mitosis

El seguimiento de los GICs durante el ciclo celular en los núcleos de células meristemáticas de *Lycopersicon esculentum* y *Allium cepa* no se llevó a cabo con la técnica tradicional de contraste preferencial para ribonucleoproteínas, ya que cuando la cromatina se ha compactado y ha desaparecido la membrana nuclear, el espacio del nucleoplasma es invadido por proteínas nucleares y nucleolares, formando una capa pericromosómica que rodea a cada cromosoma durante la mitosis, como se puede observar en la figura 5 con un contraste preferencial para ribonucleoproteínas, esta zona es más densa alrededor de los cromosomas, la organización de esta estructura es distinta a la que se observa en los cromosomas y el citoplasma, durante la interfase. Sin embargo con el contraste preferencial de oxinitrato de bismuto preferencial para los GICs se logró obtener buenos resultados en ambas especies, se utilizó un fragmento de tejido de hígado de ratón como muestra testigo para este contraste, en los cortes ultrafinos de los hepatocitos se pueden apreciar cúmulos de GICs en el espacio intercromatiniano fuertemente contrastado al igual que los gránulos pericromatinianos asociados principalmente a los cúmulos de cromatina compacta, el nucleolo permanece ligeramente contrastado al igual que la cromatina (Fig 6a). En los corte de cebolla y jitomate la distribución y comportamiento de los GICs en interfase se pueden apreciar dispersos o en pequeños cúmulos en el espacio intercromatiniano (Fig 6b,c), durante la mitosis, en profase, conforme la cromatina se va compactando algunos GIC se adosan a los cromosomas quedando una fracción dispersa en el nucleoplasma (Fig 7a,b). Cuando los cromosomas se han alineado en el eje del huso durante la metafase (Fig 7c,d) o bien se han desplazado hacia los polos en anafase (Fig 7e,f), algunos de los GICs se encuentran asociados en la periferia de los cromosomas. Al final de la telofase (Fig 7g,h), cuando la placa de división (fragmoplasto) se esta formando y los cromosomas se han empezado a descompactar una parte de los gránulos intercromatinianos se encuentran asociado a la cromatina, se puede apreciar un incremento de estos gránulos en el nucleoplasma al inicio de la fase G1 de las células hijas (Fig 8).

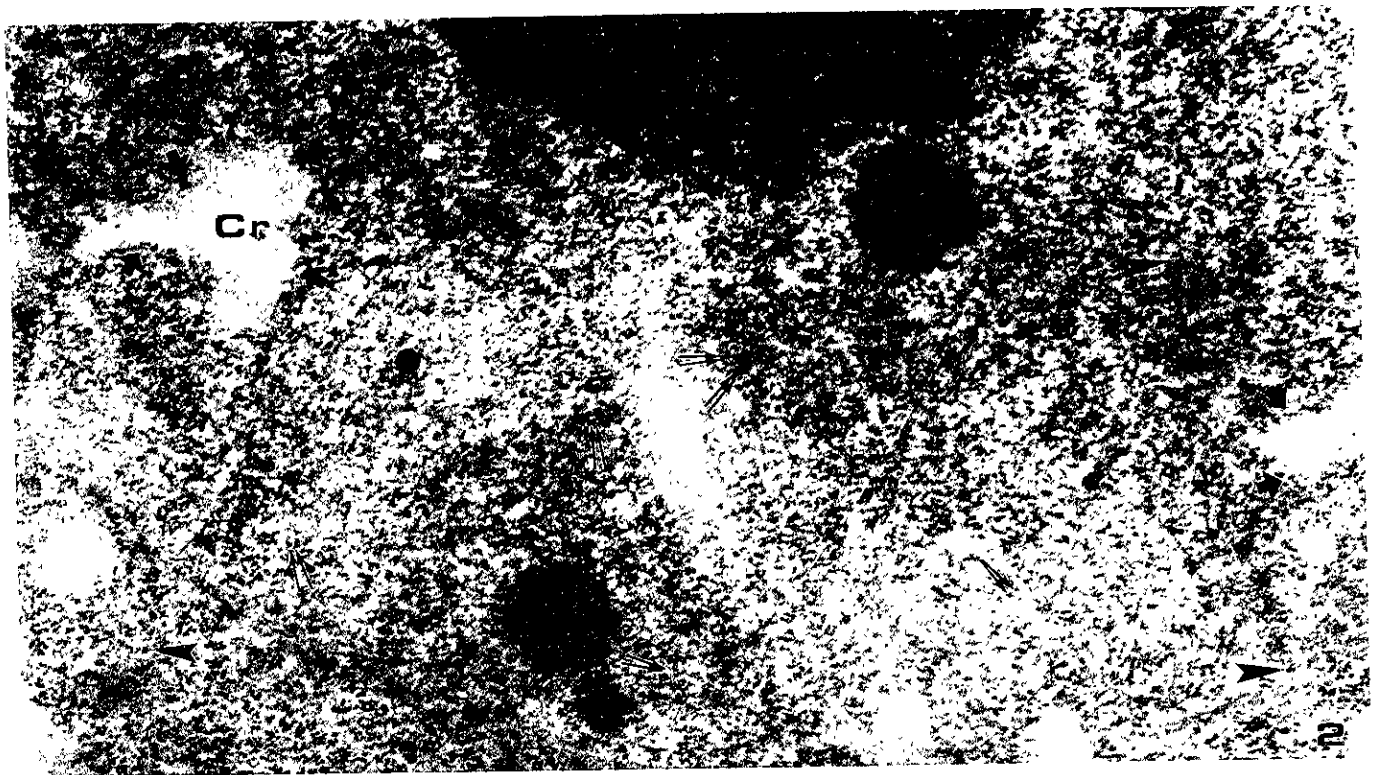
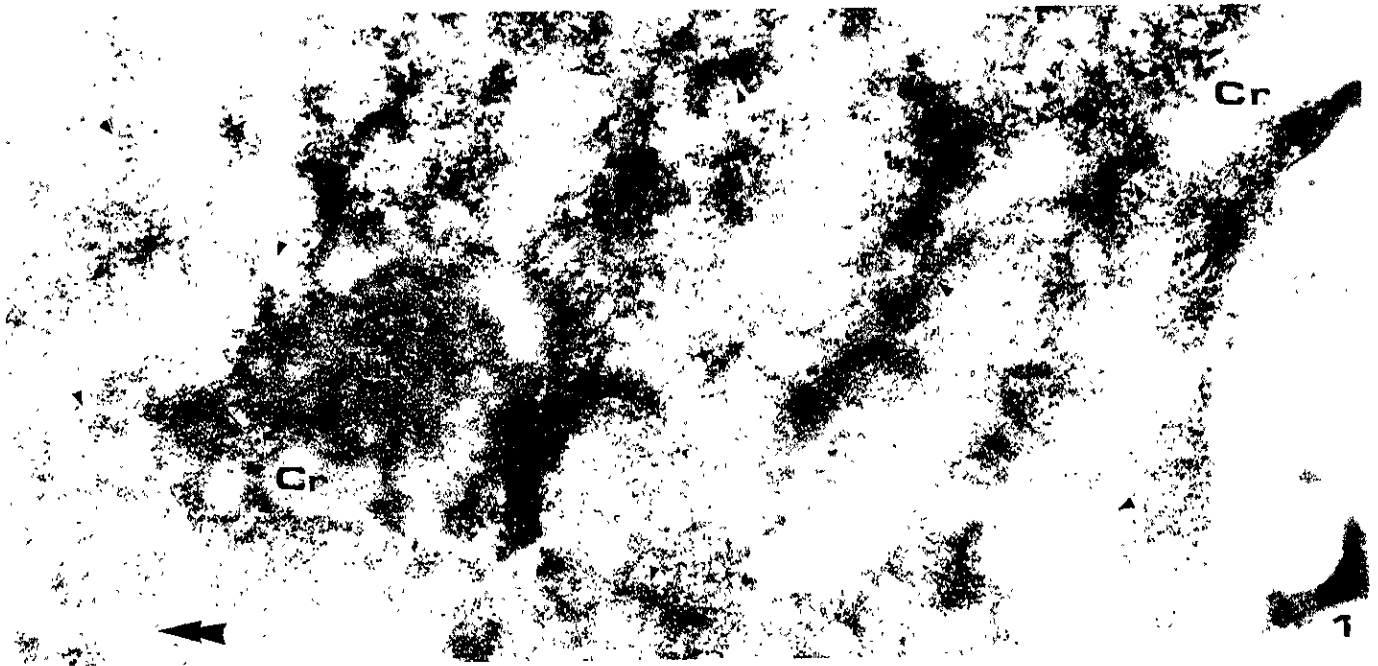


FIG. 1.- Célula quiescente de jitomate, contraste con Ur-EDTA-Pb. Nucleolo (Nu) pequeño y compacto rodeado por cromatina blanqueada (Cr). En el nucleoplasma se presentan grandes cúmulos de cromatina blanqueada y compacta. En el espacio intercromatiniano se observa material granular y fibrilar entremezclado (cabezas de flechas), 31 500 X. **FIG. 2.-** Célula de jitomate en interfase . Contraste con Ur-EDTA-Pb, nucleolo (Nu) es grande con material granular y fibrilar denso entremezclado . Se presentan pequeños cúmulos de cromatina (Cr) blanqueada. En su borde se observa fibras pericromatinianas (flechas). Cercanas a la cromatina se presentan gránulos pericromatinianos (cabezas de flecha), los gránulos intercromatinianos dispersos o en pequeños cúmulos (dobles flechas). 32 000X.

FIG.3a.- Núcleo en interfase de jitomate.
 Contraste con fosfotúngstico. Destaca la
 presencia de estructura anular (Ea) y
 nucleolo (Nu) negativos a esta técnica.
 Se presenta cromatina perinuclear (Cr) en
 negro 28 000X.

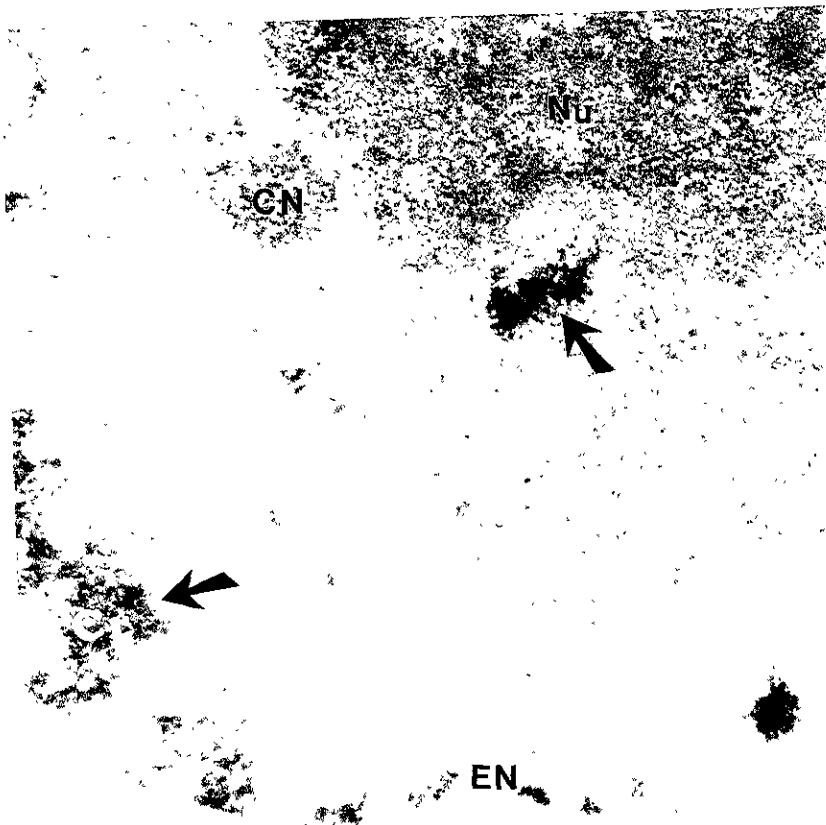


FIG.3b.- Núcleo de jitomate en
 interfase. contraste con ácido
 fosfotúngstico, nucleolo (Nu) cercano
 a él se pueden presentar de uno a tres
 cuerpos nucleares (Cn), en negro se
 observan cúmulos de cromatina (Cr)
 perinuclear y perinucleolar
 (flechas), envoltura nuclear (EN).
 31 000X.

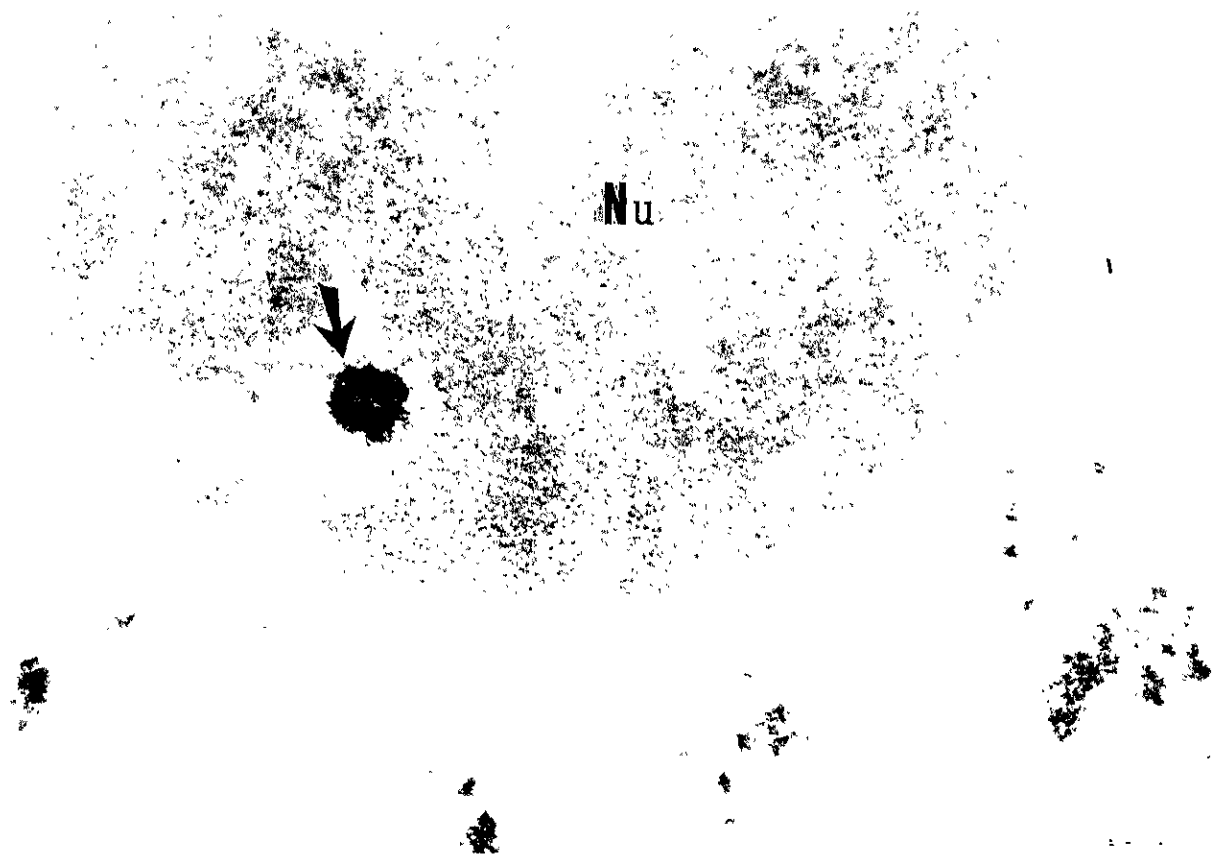


FIG. 4a.- Núcleo de jitomate en interfase. Contraste con ácido fosfotúngtico. En el nucleolo (Nu) se observa una inclusión de cromatina intranucleolar(flecha). 31 250X.

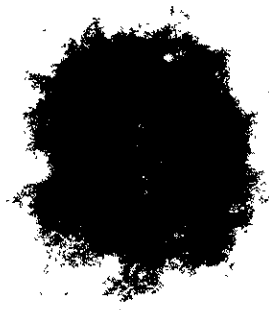


FIG.4b.-Cromatina intranucleolar, a mayor aumento. En la parte central es más densa que en la periferia en donde se aprecian gran cantidad de fibras. 40 000X.

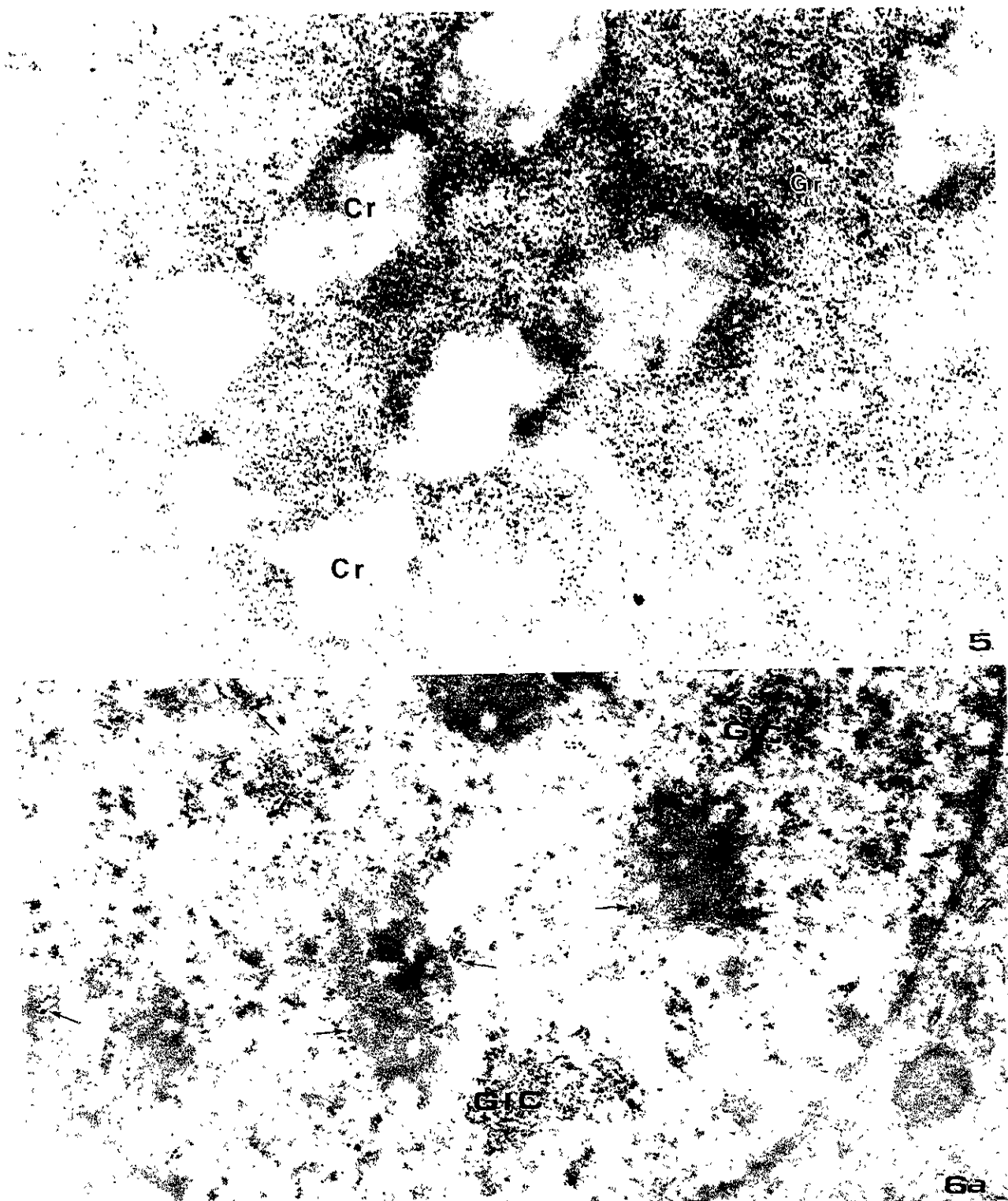


FIG.5.- Cromosomas (Cr) de jitomate en anafase temprana. Contraste Ur-EDTA-Pb . En la periferia de los cromosomas se aprecia una capa pericromosomal constituida de proteínas nucleares , nucleolares y ribosomas. 37 500X. FIG.6a.-Núcleo de hepatocito de hígado de ratón. Contraste con oxinitrato de bismuto, se aprecian cúmulos de gránulos intercromatinianos (GIC) en el espacio intercromatiniano, fuertemente contrastados al igual que los gránulos pericromatinianos (flechas), 21 600X.

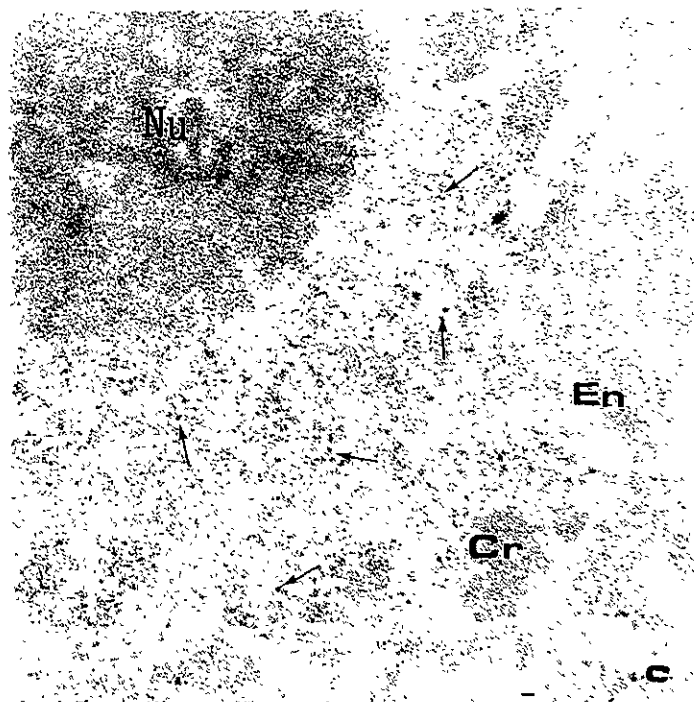
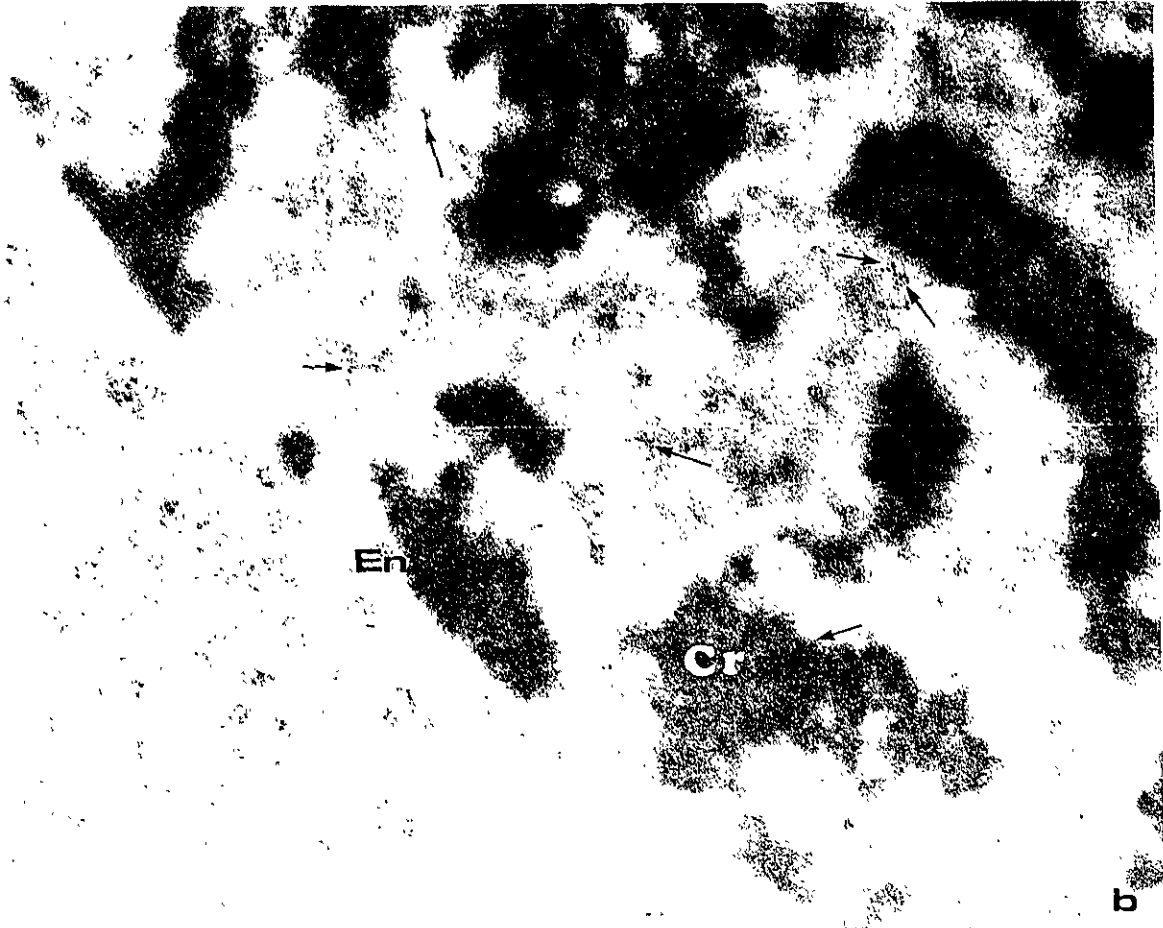


FIGURA 6b,c.- Núcleos de cebolla (b) y jitomate (c) en interfase. Contraste con oxinitrato de bismuto para gránulos intercromatinianos (GICs). La distribución y comportamiento de estos es la misma, se pueden apreciar dispersos o en pequeños cúmulos en el espacio intercromatiniano (flechas). Cromatina (Cr), nucleolo (Nu), envoltura nuclear (En). b.- 62 000X, c.- 94 500X.

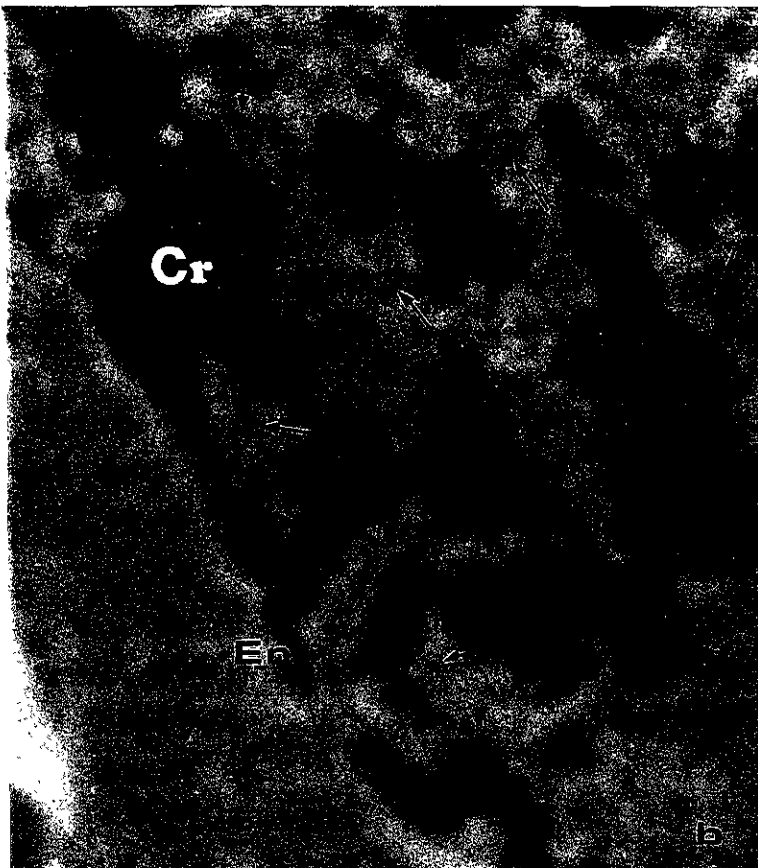
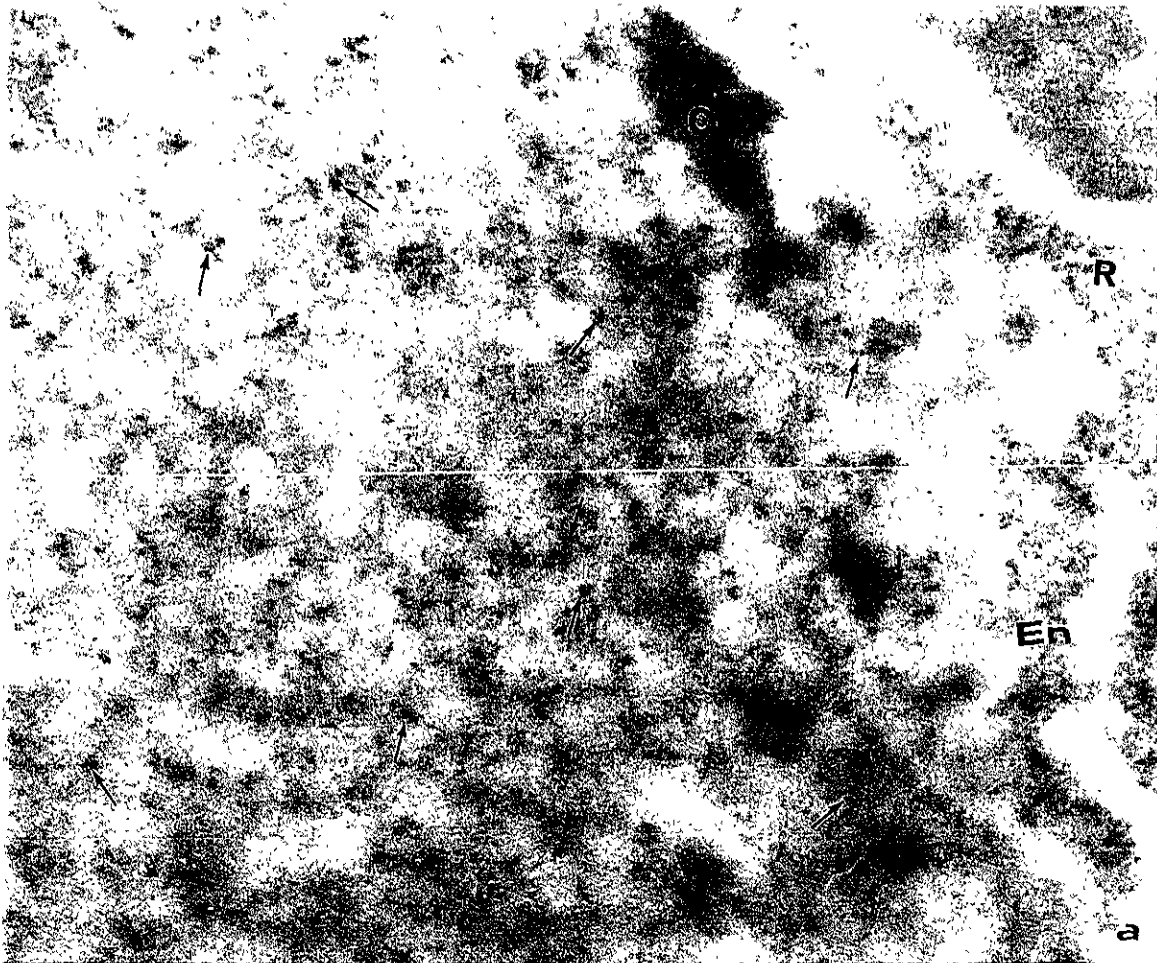


FIGURA 7a,b.- Profase en células de jitomate (a) cebolla (b). Contraste con oxinitrato de bismuto. Conforme la cromatina (Cr) se va compactando, algunos gránulos intercromatinianos se adosan a los cromosomas quedando una fracción dispersa en el nucleoplasma (flechas), envoltura nuclear (En), ribosomas (R). a.- 75 000X, b.- 40 000 X.

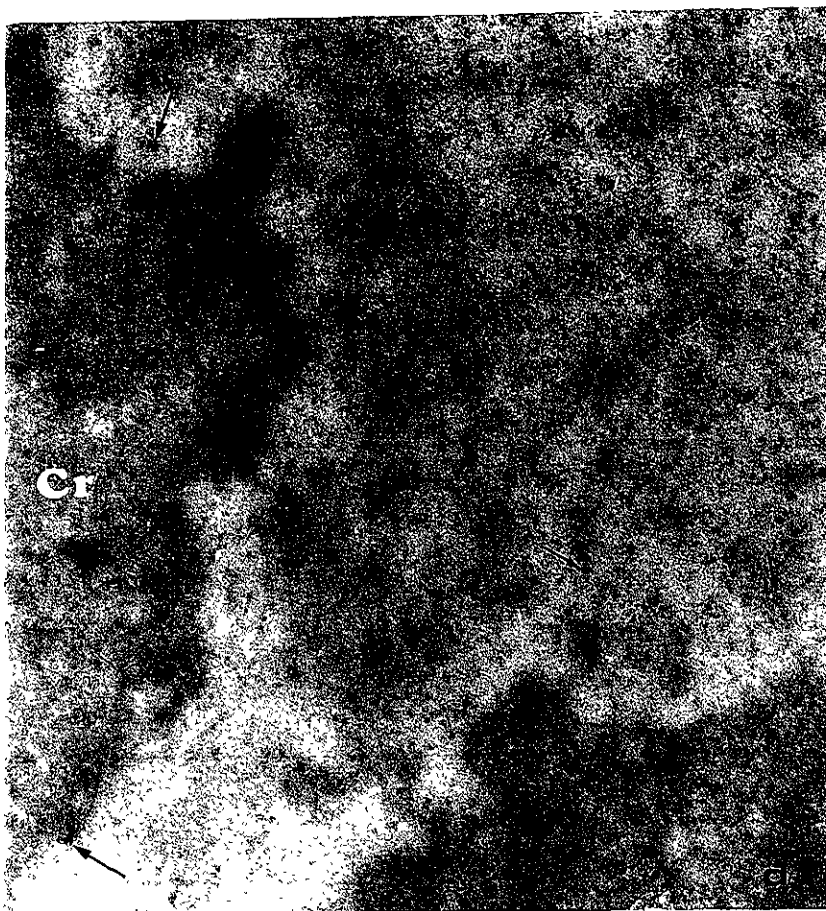
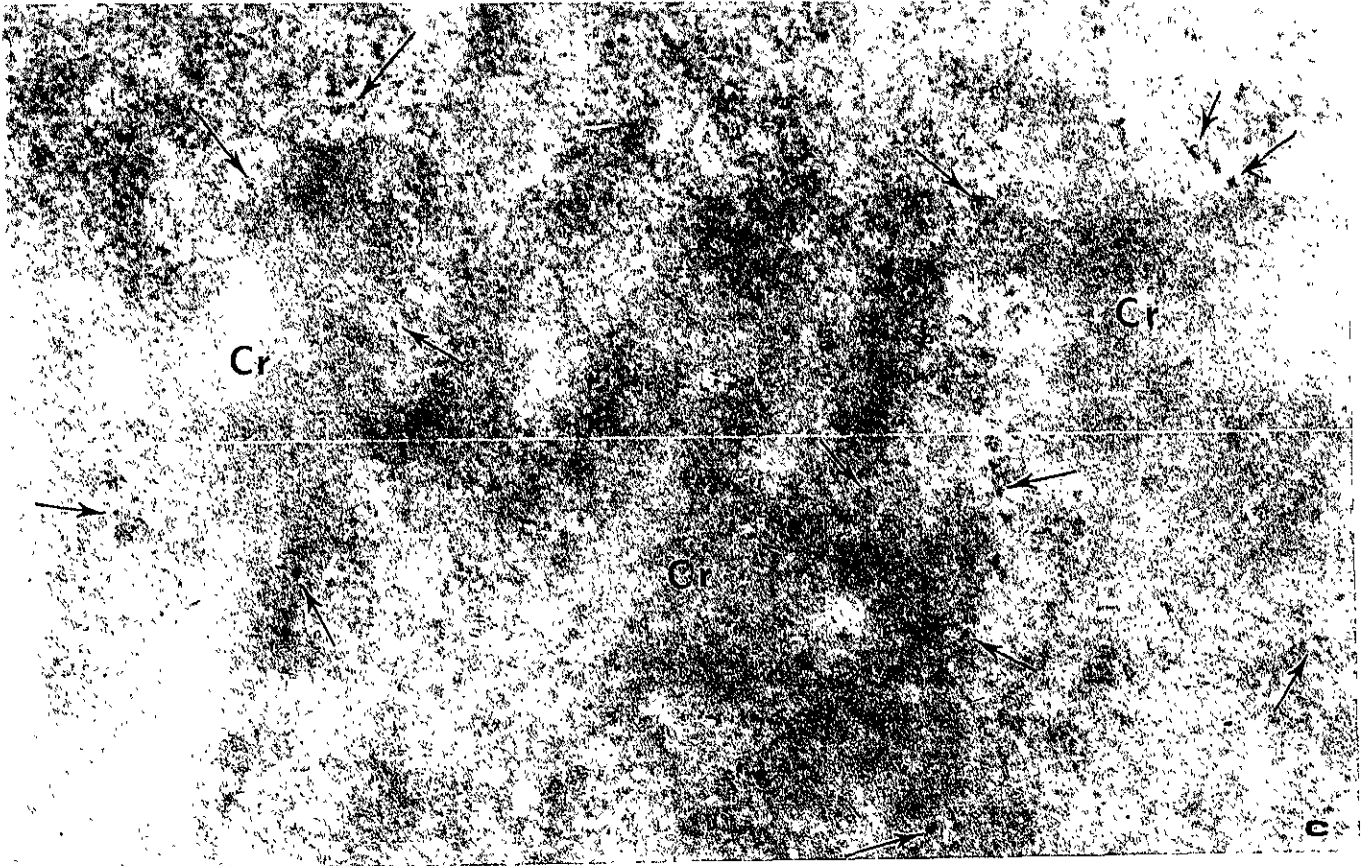


FIGURA 7c,d.- Células de jitomate (c) y cebolla (d) en metafase . Contraste con oxinitrato de bismuto. Cuando los cromosomas (Cr) se han alineado en el eje del huso, algunos gránulos intercromatinianos (flechas) se encuentran asociados a la periferia de los cromosomas c.- 100 000X, d.- 80 000X.

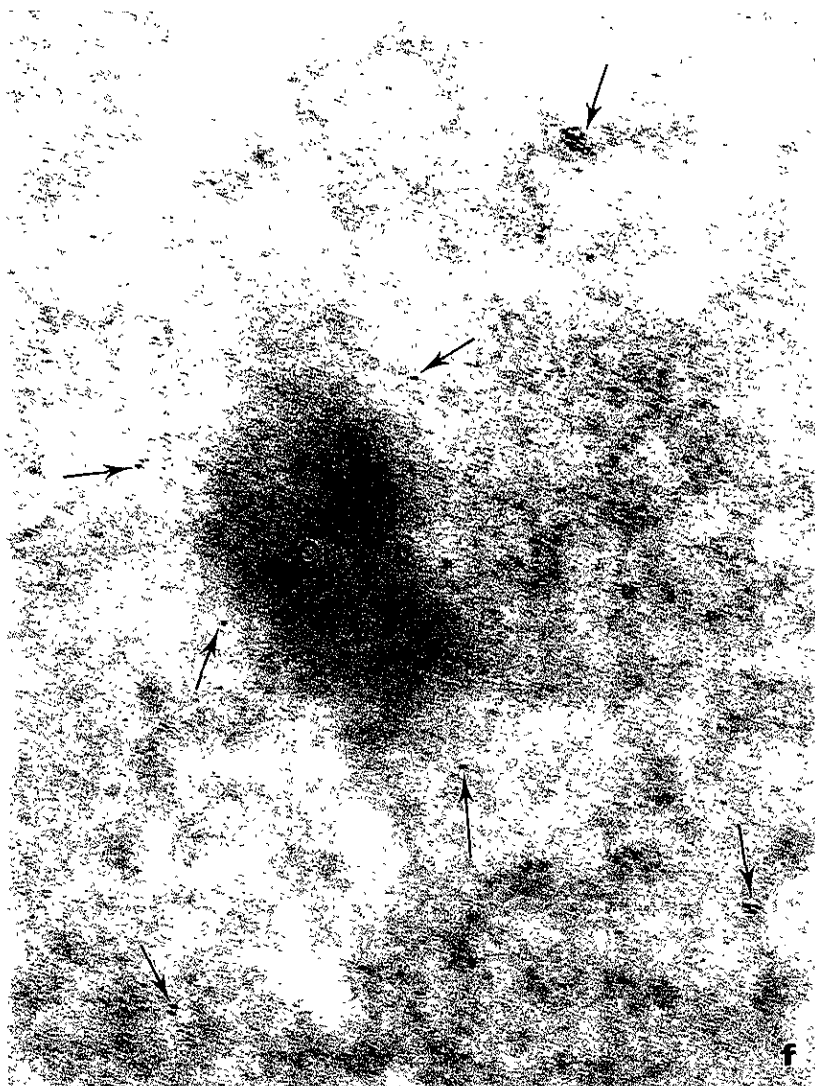
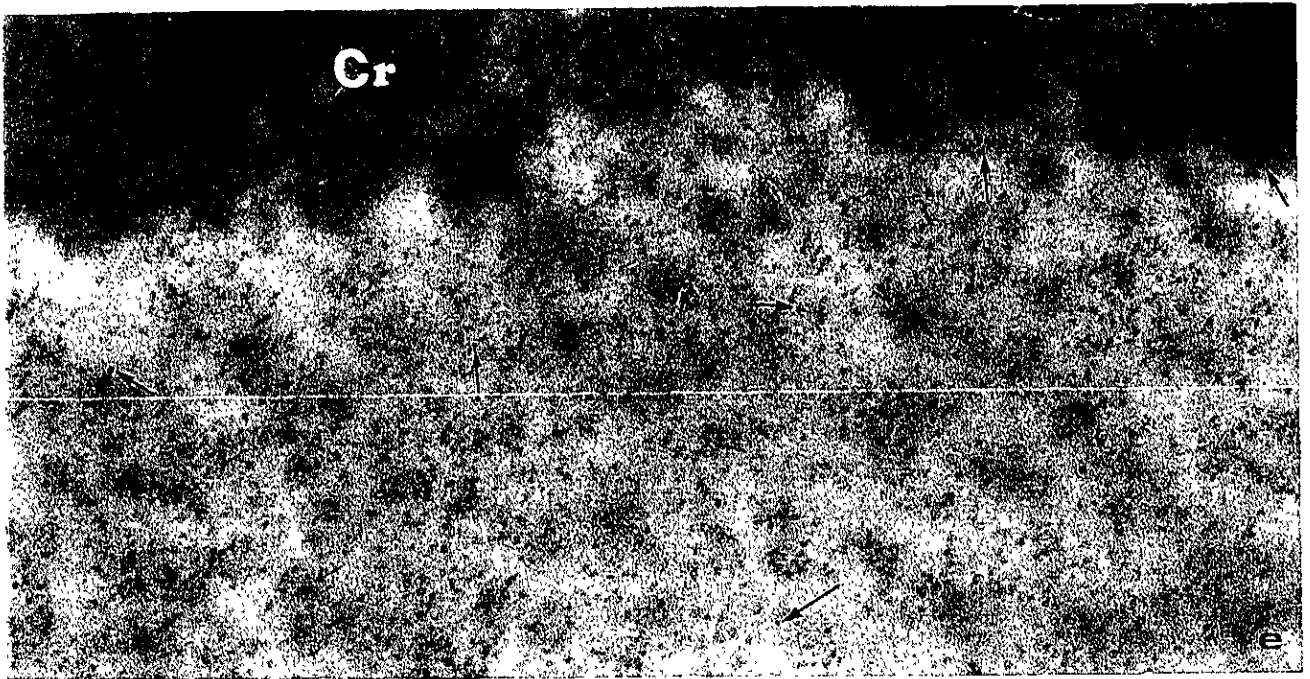


FIG.7e,f.- Cromosomas (Cr) de cebolla (e) y jitomate (f) en anafase. Contraste con oxinitrato de bismuto. Los cromosomas se han desplazado hacia los polos, algunos gránulos intercromatinianos (flechas) se encuentran asociados a los cromosomas. e.- 80 000X, f.- 80 000X

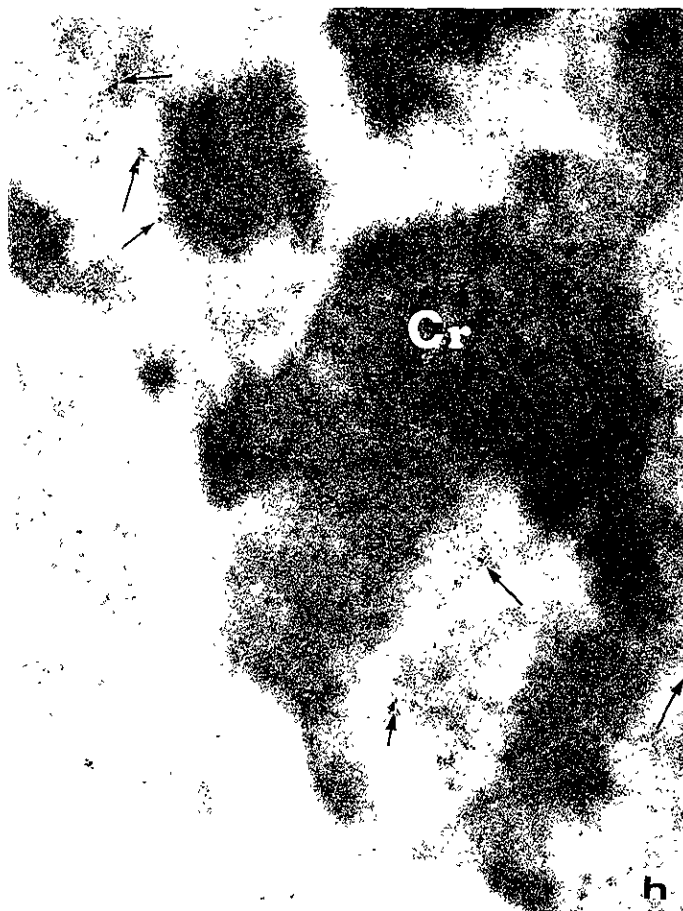
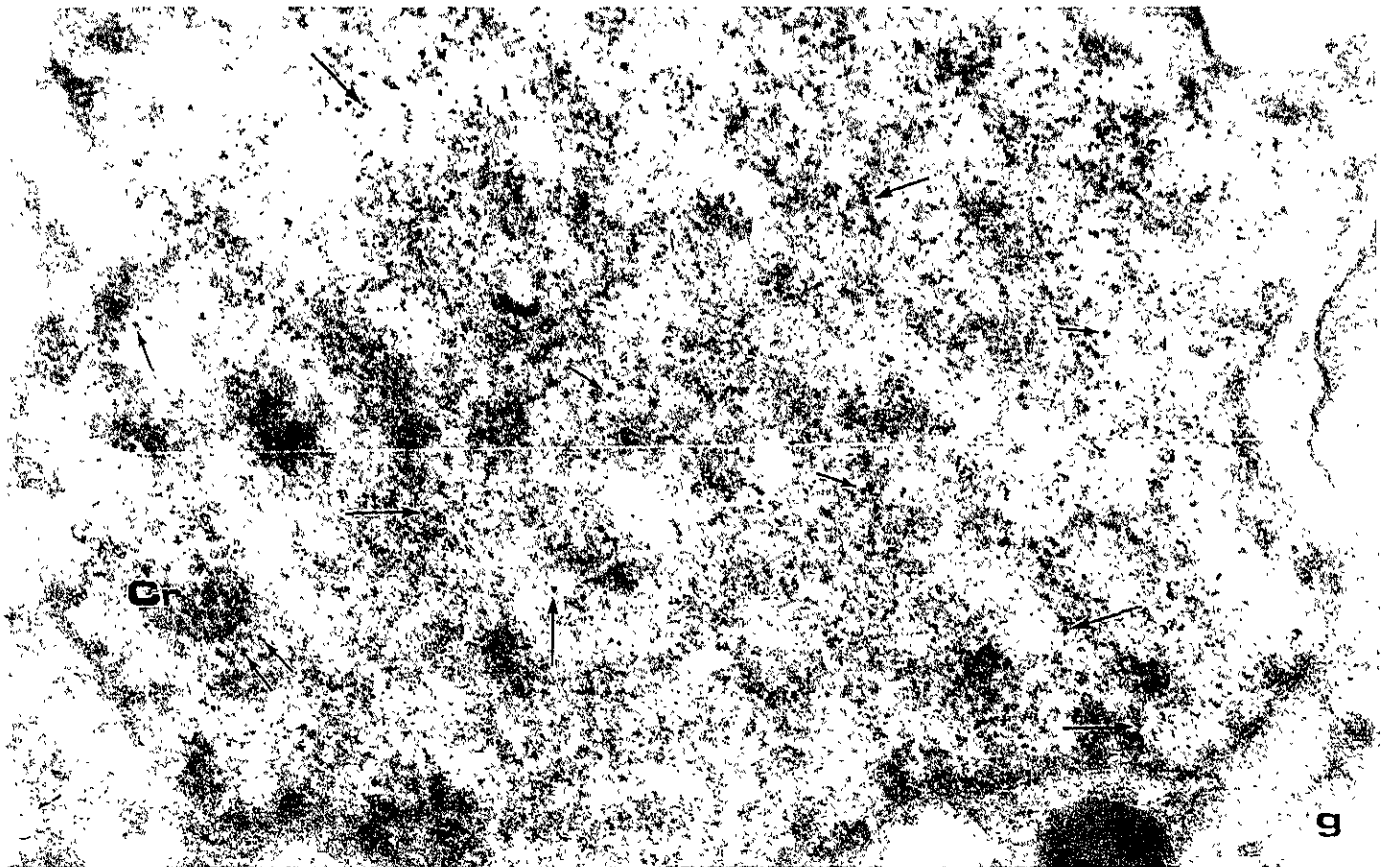


FIGURA 7g,h.- Células de jitomate (g) y cebolla (h) en telofase. Contraste con oxinitrato de bismuto. Cuando la placa de división se está formando y los cromosomas se han empezado a descompactar, una parte de los gránulos intercromatinianos (flechas) se encuentra asociado a la cromatina (Cr). g.-32500X , h.- 80 000X.

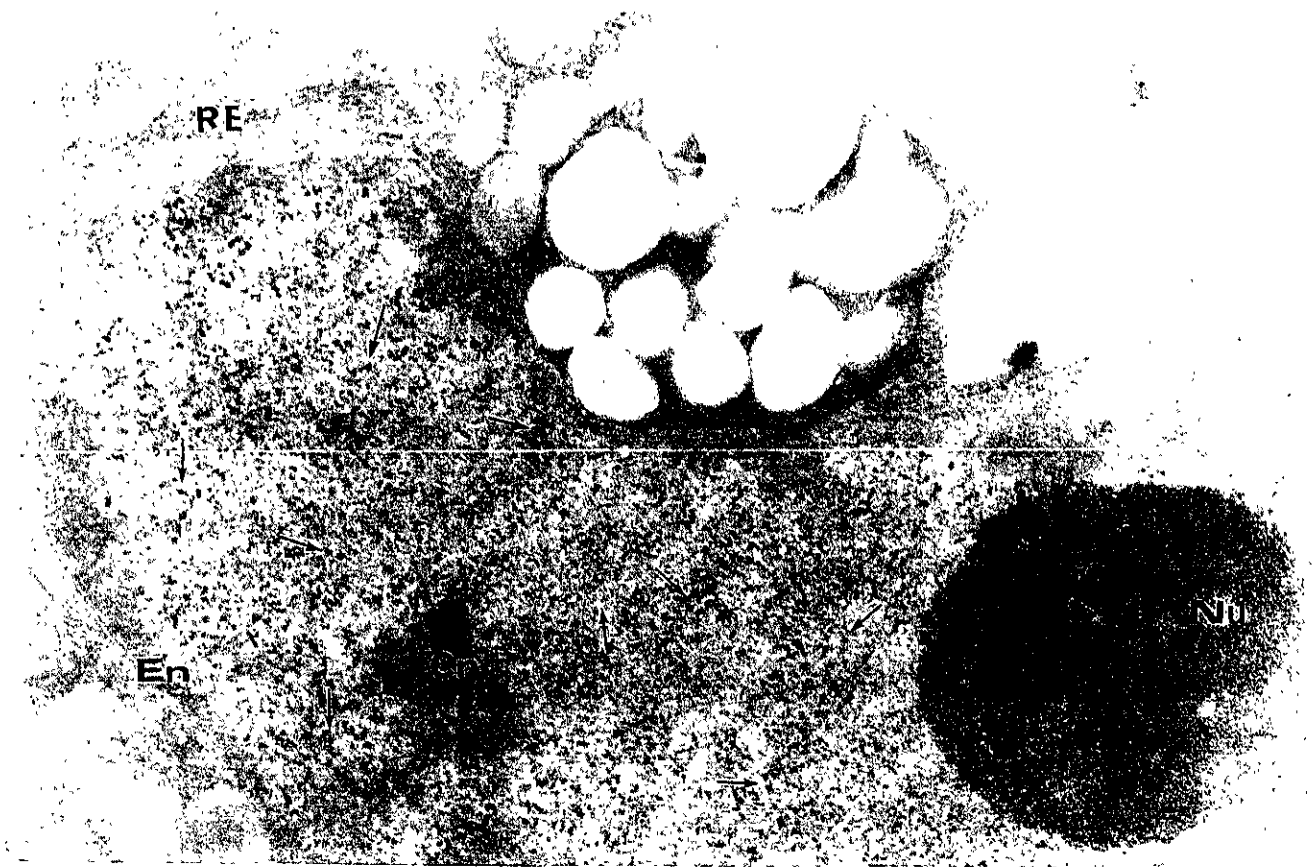


FIGURA-8.- Célula de jitomate en fase G1. Contraste de oxinitrato de bismuto para GICs. Se puede apreciar un incremento de los gránulos intercromatinianos (flechas) en el nucleoplasma de las células hijas. Nucleolo (Nu), cromatina (Cr), envoltura nuclear (En), retículo endoplásmico (RE) 27 500 X .

IX.- DISCUSION

Los resultados observados en células en estado quiescente de embriones de jitomate concuerdan con lo reportado por otros autores, los componentes fibrilares y granulares ribonucleoproteicos que se presentan en el nucleoplasma de estos núcleos son también abundantes en células quiescentes de embriones de maíz (Deltour y col 1979 citado por Deltour 1985). Se ha sugerido que estos componentes pueden ser estructuras de almacén de ARNs-m de larga vida. Estas estructuras de naturaleza ribonucleoproteica decrecen rápidamente durante el inicio de la germinación como se observa en los núcleos de células activas de jitomate, lo cual sugiere su rápida movilización (Deltour y col 1979 citado por Deltour 1985). El almacenamiento de los ARNs-m de larga vida debe ser necesarios para la formación temprana de nuevos polisomas citoplásmicos. Las características de los nucleolos de estas células son semejantes a las especies de *Oryza sativa* (Bechtel y Pomeranz 1978) y maíz (Deltour y col 1979 citado por Deltour 1985), la apariencia del nucleolo es una estructura fibrilar prominente con pocos componentes granulares dispersos en ella. En otras especies como *Phaseolus lunatus* (Klein y Ben Shaul 1966) y *Medicago sativa* (Singh 1977) el nucleolo parece estar formado por un componente fibrilar abundante. Con el inicio de la germinación el nucleolo adquiere la típica estructura de las células activas, formando zonas de centros fibrilares, centros fibrilares densos y zonas granulares. Estas diferencias significativas en la morfología y procesos fisiológicos que ocurren en las células en estado quiescente y en las células en germinación es el resultado de la expresión de genes después de la rehidratación de las semillas (Comai y Harada 1990).

En los núcleos de células activas su morfología cambia y puede observarse la organización y distribución de la cromatina, presentándose un arreglo de tipo cromocéntrico en los núcleos en interfase de las células meristemáticas de raíz de jitomate, no siendo así en los núcleos de los meristemas de la raíz de cebolla que muestran un núcleo de tipo reticulado, en ambos núcleos se ha demostrado por medio de técnicas citoquímicas e inmunofluorescencia que en los primeros se encuentra menor cantidad de ADN que los núcleos reticulados. Ambos han sido caracterizados a nivel ultraestructural

en interfase por algunos investigadores. Moreno Díaz de la Espina y colaboradores (1992) describieron a nivel ultraestructural y citoquímica el núcleo en interfase de *Lycopersicon esculentum*. En este trabajo se destaca la presencia de los componentes ribonucleoproteicos así como la distribución de la cromatina perinuclear, perinucleolar, y la presencia de cuerpos nucleares. Sin embargo, en este estudio no se reportan los hallazgos que nosotros observamos como es la inclusión de cromatina intranucleolar (fig 4a-b), esto se hizo evidente por medio de la técnica de contraste preferencial para cromatina. Otra estructura que no se ha descrito en esta especie es la presencia ocasional de cuerpos anulares que fueron negativos al contraste de ácido fosfotúngstico (para cromatina) (fig 3a). Este tipo de estructuras son poco frecuentes y por tanto se conoce poco sobre ellos. En cuanto a su constitución química y función, estas se han reportado en los núcleos de células de *Lacandonia schismatica*, y se demostró por medio de estudios citoquímicos e inmunolocalización que su parte externa se marca densamente por anti-snRNPs mAbs, pero no reacciona con la técnica de contraste regresivo para RNPs; así mismo se demostró que esta región de los cuerpos anulares contiene abundantes proteínas asociadas con los snARNs. La parte central de esta estructura es positiva al EDTA, pero se marca escasamente con Y12. Todos estos hallazgos sugieren que estos ARNs que constituyen a los cuerpos anillados no corresponden necesariamente a estos snARNs (Agredano-Moreno, 1994, Jiménez-García, 1992). También se ha reportado que las estructuras en forma de anillo son cuerpos esféricos con una cavidad llena de fibras. Recientemente se han descrito estructuras muy similares en hígado de gallos estimulados con hormonas (Ochs, 1995). El papel fisiológico de estas estructuras anilladas no es clara.

Los estudios citoquímicos realizados en plantas hasta el momento han demostrado que la organización general de las ribonucleoproteínas nucleoplásmicas *in situ* es muy similar a los encontrados en células animales y en especies de plantas con núcleos reticulados (Luck y Lafontaine 1980) y cromocéntricas (Moreno Díaz de la Espina y col 1992). Sin embargo, se ha reportado un patrón de distribución diferente para los gránulos intercromatinianos en plantas, estos se encuentran dispersos en el nucleoplasma y formando pequeños cúmulos (Medina y col 1989, Moreno Díaz de la Espina y col 1991).

Se ha estudiado la presencia de los GICs durante la interfase en cultivos celulares y en diferentes tejidos de animales y plantas en condiciones normales y experimentales, determinándose su variación, comportamiento y distribución dependiendo de la actividad celular. Para conocer su función y su participación en la actividad transcripcional del núcleo se han utilizado varias técnicas que demuestran y apoyan la idea que los GICs son el sitio de almacén y/o ensamble de snARNs y de snRNPs así como factores esenciales de "splicing" como el SC35. Se ha sugerido que la formación de GICs y cuerpos espiralados así como su interacción con los snRNPs, se regula diferencialmente a través del ciclo celular (Ferreira y col 1994).

La distribución de los gránulos intercromatinianos durante la mitosis se ha estudiado en diferentes tipos de células animales así como en líneas celulares humanas, y con diversas técnicas de contraste como son plata amoniaca, contraste preferencial para ribonucleoproteínas (Thiry 1995) y oxinitrato de bismuto (Krzyowska-Gruca 1985), estos estudios han permitido ver su distribución hacia el citoplasma y su posible desintegración en este. Lo descrito hasta el momento sobre los GICs en células animales hace pensar que cada célula hija tiene que generar sus propios gránulos intercromatinianos, después de que ha terminado la mitosis. Sin embargo, en otro estudio realizado por Gautier y colaboradores en 1992 utilizando criométodos para microscopía electrónica en líneas celulares humanas, observan en la periferia de los cromosomas estructuras granulares semejantes a los GICs en tamaño y forma. En nuestro estudio se demostró que al menos con la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas durante la mitosis en estas especies no se pueden identificar a los GICs (fig 5), como sucede en las células animales, posiblemente debido a que la mayoría de los GICs en plantas se encuentran dispersos en el nucleoplasma. Al desintegrarse la membrana nuclear permite que otras proteínas nucleares y nucleolares así como ribonucleoproteínas invadan estas zonas junto con los ribosomas lo que hace más difícil la localización de los GICs, como se muestra en la figura 5. El grupo de proteínas que rodea a cada uno de los cromosomas durante la mitosis constituye lo que se ha llamado placa pericromosómica (Gautier y col. 1992, Hernández-Verdum D. 1992).

Una de las características de los GICs es que se encuentran constituidos por proteínas fosforiladas esto fue demostrado en radículas de células meristemáticas de cebolla, por medio de microanálisis por rayos X (Moreno Díaz de la Espina y col 1993). La técnica de oxinitrato de bismuto utilizada en este trabajo reacciona principalmente con las proteínas fosforiladas de los GICs lo que hace más fácil conocer su distribución y comportamiento en las diferentes fases de la mitosis. Nuestros resultados presentados en este trabajo nos indican que al menos en *Lycopersicon esculentum* y *Allium cepa* la distribución de los GICs durante la mitosis sigue un patrón diferente a lo sugerido en células animales. En nuestro caso durante las diferentes fases de la mitosis una fracción de los GICs permanecen adosados a los cromosomas, observándose un incremento de estos a final de telofase. En células animales el comportamiento y distribución de los GICs es diferente, al desaparecer la membrana nuclear los GICs son observados en el citoplasma en donde se desintegran. Es posible que esta diferencia entre ambos tipos de células se deba a la organización de los GICs en el nucleoplasma, en las células animales se encuentran formando cúmulos de gránulos unidos entre si por finas fibras y en plantas la mayor parte de ellos se localizan dispersos.

Estas observaciones nos hacen sugerir que al menos en estas dos especies la fracción de GICs que se encuentran adosados a los cromosomas son heredados de la célula madre a las células hijas, lo que podría implicar su utilización durante los primeros eventos del procesamiento del pre-mARN en células que inician la etapa de G1.

X.- REFERENCIAS

- Aebi VJ., Cohn LB. And Gerace L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate type filaments. **Nature** 323:560-64.
- Agredano-Moreno L., Jiménez-García LF., Echeverría O., Martínez E., Ramos C. and Vázquez-Nin HG. (1994). Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. **Biol Cell** 82: 177-184.
- Agutter P. and Prochnow D. (1994). Nucleocytoplasmic transport. **Biochem J** 300:609-618.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. Molecular Biology of the Cell Third De. Garland Publishing, Inc. New York London 1994.
- Anderson GJ., Bach M., Luhrmann R. and Begger JD. (1989). Conservation between yeast and man of a protein associated with U5 small nuclear ribonucleoprotein **Nature** 342:819-821.
- Andrade LEC., Tan EM. and Chan EKL. (1993). Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cycle and during cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:1947-1951.
- Ault J. and Nicklas B. (1989). Tension microtubule rearrangements and the proper distribution of chromosomes in mitosis. **Chromosoma (Berl.)** 98: 33-39.
- Bachelierie J.P. Puvion E. and Zalta JP. (1975). Ultrastructural organization of chromatin-RNA-protein complex isolated from mammalian cell nuclei. **Eur J Biochem** 58: 327-337.
- Bajer A. (1968). Fine structure studies on phragmoplast and cell plate formation **Chromosoma** 24: 383-417.
- Bajer AS. (1987). Substructure of the kinetochore and reorganization of kinetochore microtubules during early prometaphase in haemathus endosperm. **Eur J Cell Biol** 43:23-34.
- Beams H. and Kesser R. (1976). Citokinesis a comparative study of cytoplasmic division in animal cell. **Am Sci** 64: 279-290.
- Benavente R., Rase KM., Reimer G., Hugle-Dorr B. and Scheer U. (1987). Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polimerase I in mitotic cell. **J Cell Biol** 105:1483-1491.
- Berezney R. and Coffey DS. (1977). Nuclear matrix isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. **J Cell Biol** 73: 616-637.

- Blaczo R. and Brinkley B. (1987). Tubulin interaction with kinetochore proteins analysis by *in vitro* assembly and chemical cross linking. **J Cell Biol** 105:855-862.
- Brinkley JP. and Stubblefield E. Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and meiosis. In Adv. Cell Biol. Prescott, D.M., Goldsrein, L. and McConkey. E. (Eds) 1:119-135 (1970).
- Busch, H. Ed.(1983). **The cell nucleus. Nuclear particles. Vol.I.** Ac. Press New York.
- Holt DG., Claudette MS., Alayne S., Roberts H., Larry Gerace, and Gerald WH. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. **J Cell Biol** 104:1157-1164.
- Cande W. (1986). Reactivation of mitosis *in vitro*. **TIBS** 11: 447-449.
- Carmona-Fonseca, M., Pepperkok,R., Sproat, B., Ansorge,W.,Swanson, M. and Lamond, A.I. (1991). *In vivo* detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cell. **EMBO J** 10:1863-1873.
- Carmona-Fonseca, M. , Peperko, R. Carvalho, M.T. and Lamond, A. I. (1992) Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. **J Cell Biol** 117:1-14.
- Clevenger C.V and Epstein A.L. (1984). Identification of a nuclear protein component of interchromatin granules using a monoclonal antibody and immunogold electron microscopy. **Exp Cell Res** 151:194-207.
- Chrystopher W. and Akey C.W. (1989). Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy . **J Cell Biol** 109:955-70.
- Comai L. and Harada JJ. (1990).Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. **Proc Natl Acad Sci** 87:2671-2674.
- Daskal Y., komarony L. and Busch H. (1980). Isolation and partial characterization of perichromatin granules . **Exp Cell Res** 126:39-46.
- De Robertis y De Roberts (1981). *Biología Celular y Molecular*, El Ateneo, México.
- Deltou R. (1985) Nuclear Activation during early germination of the plant embryo . *Print in Great Britain, The Company of Biologists Limited* pp.43-83.
- Derenzini M., Novello F. and Pession-Brizzi A. (1978). Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural visualization of transcription at the cellular and molecular level. **Biol Cell** 39:113-116.

- Dyson RD. Principios de Biología Celular , Fondo Educativo Interamericano ,S.A., México 1977.
- Earnshaw W., Halligan B., Cooke C., Heck M. and Luu L. (1985). Topoisomerase II is an structural component of mitotic chromosome scaffolds. **J Cell Biol 100:1706-1715.**
- Earnshaw WC. (1991). When is a centromere not a kinetochore . **J Cell Sc 99:1-4.**
- Echeverría O.M., Pagán-Santini R. and G.H. Vázquez-Nin (1991). Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. **Biol Cell 72:223-229.**
- Echeverría M., Penon P. and Delseny M. (1994). Plant ribosomal DNA external spacer binding factors: a novel proteins binds specifically to a sequence close to the primary pre-rRNA processing site. **Mol Gen Genet 243:442-452.**
- Enright CA., Maxwell ES., and Sollner-Webb B. (1996). 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14,E3,U17, and U3 . **RNA. 2:1094-1099.**
- Fakan S. and Odartchenko N. (1980). Ultrastructural organization of cell nucleus in early Mouse Embryos. **Biol Cell 37:211-218.**
- Fakan S. (1986). Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus. **Methods Achiev Exp Pathol 2:105-140.**
- Fakan S. Leser G. and Martin T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoprotein as visualized by immunocytochemistry in thin sections. **J Cell Biol 98: 358-363.**
- Fakan S. and Bernhard W. (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. **Expl Cell Res 67: 129-141.**
- Fakan S. (1978). High resolution autoradiography studies on chromatin function: In the cell nucleus vol 5 (de H. Bush),pp.3-54. Academic Press, New York, San francisco, London.
- Fakan S. and Nobis P. (1978). Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of sincronized CHO cells. **Exp Cell Res 113:327-337.**
- Fakan S.,Puvion E. and Spohr G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolate rat hepatocytes. **Exp Cell Res 99:155-164.**
- Felsenfeld G (1978). Cromatin. **Nature 271:115-125.**
- Ferrera AJ.,Carmo-Fonseca M. and Lamond YA. (1994). Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and Assembly of daughter cell nuclei. **J Cell Biol 126(1):11-23.**

- Finlay DR., Meier E., Bradley P., Loe H. and Douglass JF. (1991). A complex of nuclear pore proteins required for pore function . **J Cell Biol** 114:169-183.
- Frendirick SE., Mangan EM, Carey BJ. and GruberJP. (1992). Intermediate filament antigens of 60 and 55 Kda in the nuclear matrix of plants: Their detection and localization . **Exp Cell Res** 199: 213-222.
- Gauter T., Masson C., Quintana C., Arnoult J. and Hernandez-Verdun D. (1992). The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. An in situ study using cryomethods in electron microscopy . **Chromosoma** 101(8):502-510.
- Geraci and Burke (1988). Functional organization of the nuclear envelope. **Rev Cell Biol** 4:335-74.
- Geraci L., Ottaviano Y. and Kondor-Koch C. (1982). Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. **J Cell Biol** 95:826-837.
- Geraci L. and Blobel G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. **Cell** 19:277-86.
- Gerbi AS. (1997). The nucleolus: then and now. **Chromosoma**. 105:385-387.
- Goessens G. (1984). nucleolar structure. **Int Rev Cytol** 87: 107-158.
- González- Fernández A. , Giménez.Martín G. and De la Torre C. (1971). The duration of the interphase period at different temperatures in root tip cells . **Cytologie** 3: 367-371.
- Granboulan N. and Bernhard W. (1961). Cytochimie ultrastructurales exploration des structures nucleaires par digestion enzymatique. **C.R. Soc Biol Ses** 155:1767-1779.
- Grandin N. and Charbonneau M. (1991) Cyclin of intracellular free calcium and intracellular pH in *Xenopus* embryos: a possible role in the control of the cell cycle **J Cell Sci** 99: 5-11.
- Gu Y, Rosenblatt J. and Morgan OD. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Rhr160 and Tyr15. **EMBO J** 11:3995-4005
- Hadjiolov AA. (1985). The nucleolus and the ribosome biogenesis pp 1-268 Wien, New-Yorks:Springer-Verlag
- Helslop-Harrison JS. and Bennett MD. (1990). Nuclear architecture in plants. **Trend in Genetic** 6 :401-407.
- Hernández G. División Celular : Mitosis. Memorias del curso Procesos Celulares. Fac. de Med. Vet. y Zoot., U.N.A. M. (1984).

- Hernandez-Verdum D. (1992). The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. An in situ study using cryomethods in electron microscopy **Chromosoma** 101(8): 502-510.
- Hernandez-Verdum D. and Gautier T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. **BioEssays** 16 : 179-185.
- Hohmann P., Tobey R. and Garley L.(1976). Phosphorylation of distinct Region of H1 Histone. **J Biol Chem** 251:3685-3692.
- Howles. MC. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). **Excerptts on Human Reproduction N°2 : 173-177.**
- Hugle , Hazan R., Sheer U. and Franke WW. (1985a). Localization of ribosomal protein S1 in the granular components of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis. **J Cell Biol** 100: 873-886.
- Jarmolowski A.,Boelen CW., Izaurrealde E.and Mattaj WI. (1994). Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors . **J Cell Biol** 124:627-635.
- Jiménez-García LF. , Agredano-Moreno LT., Segura Valdez MD, Margarita Echeverría O, Esteban Martínez, Clara Hilda Ramos and Gerardo Hebert Vázquez-Nin (1992). The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: triridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. **Biol Cell** 75: 101-110.
- Jiménez-García L.F. and David L. Spector (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. **Cell** 73: 47-59.
- Kandels-Lewis S. and Séraphin B (1993). Involvement of U6 snRNA in 5'splice site selection. **Science** 263:2035-2039.
- Kelly P. and Trewauces The cell division cycle in plants Edited by J.A. Bryant, D. Francis. Cambridge, Gran Bretaña, (1985).
- Kelly JT., Nurse P. and Forsburg LS, (1993). Coupling DNA replication to the cell cycle. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LVIII
- Klein S. & Ben-Shaul Y. (1966). Changes in cell fine structure of lima bean axe during early germination can. **J Bot** 44:331-347.
- Krohn G. and Benavente R. (1986). The nuclear lamins. **Experimental cell Research** 162:1-10
- Krzyzowsk-Gruca S., Ewa Kukczycka and Anna Zborek (1985). Cytochemical study on the localization of interchromatin granules during the cell division. **Acta Histochem** 76:49-55.

- Kurnberg RD. and Klug A. (1991). The nucleosome . **Sci Am** 244:52-64.
- Lamond AI. and Earnshaw WC. (1998). Structure and function in the nucleus. **Science** 280:547-553.
- Lebel J. and Raymond Y. (1987). Lamina A,B and C share an epitope with the common domain of intermediate filament proteins . **Exp Cell Res** 169:560-565.
- Leser G. Fakan and Martin T.E. (1989). Ultrastructural distribution of ribonucleoprotein complexes during mitosis. snRNP antigens are contained in mitotic granules clusters . **Eur J Cell Biol** 50,375-389.
- Locke M. and Hui P. (1977). Bismuth staining for light and electron microscopy. **Tissue & Cell** 9(2): 347-371.
- López-Sáez JF. ,Giménez-Martín G. and González-Fernández A. (1966). Duration of the cell cycle and its dependence on temperature. **Zeitschrift für Zellforschung** 75: 591-600
- Luck B.T. and J.G. Lafontaine (1980). An ultracytochemical study of nucleolar organization in meristematic plant cells (*Allium porrum*) . **J Cell Sci** 43:37-58.
- Luck B.T. and Lafontaine J.G. (1982). An ultracytochemical study of nuclear bodies in meristematic plant cell (*Cicer arietinum*) . **Can J Bot** 60:611-619.
- Martin R., Busch W., Herrman R.G. and Wanner G. (1996). Changes in chromosomal ultrastructure during the cell cycle. **Chromosome Research** 4:288-294.
- Manuelidis (1990) . A view of interphase chromosome . **Science** 250:1533-40.
- Mazia D. La División de las Células . Primera Edición. Compañía Editorial Continental, S.A., (1975).
- Medira AM., Moreno Díaz de la Espina S., Marta Martín and Fernandes-Gomez ME. (1989). Intermitotic granules in plant nuclei. **Biol Cell** 67:331-339.
- Mintz P., Patterson DS., Neuwald FA., Spahr CS. And Spector DL.(1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granules clusters. **EMBO J** 18:4308-4320.
- McIntosh RJ. and Koonce MP. (1989). Mitosis. **Science** 246: 622-628.
- Monneron A. and Bernhard W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. **J Ultrastruct Res** 27:266-228.

- Moreno Díaz de la Espina S., Sánchez Pina, MC. Risucño, FJ. Medina and ME. Fernandez Gómez (1980). The role of plant coiled bodies in nuclear RNA metabolism. **Electron Microscopy Vol 2: 240-241.**
- Moreno Díaz de la Espina S., Mínguez A., GH. Vázquez-Nin and OM. Echeverría (1992). Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. **Chromosoma 101:311-321.**
- Moreno Díaz de la Espina S., Y. Barthelémy and MA. Cerezuela (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., Asunción Medina, Ana Mínguez and Encarnación Fernández-Gómez (1993). Detection by bismuth of highly phosphorylated nucleo-proteins in plants. determination of its specificity by X-ray microanalysis, SDS-PAGE and immunological Analysis . **Biol Cell 77: 297-306.**
- Moyné G., Nash RE. and Puvion E. (1977). Pericromatin granules in Isolated Hepatocytes Treated with Cortisol and Cytoheximide **Biol Cel: 30:5-16.**
- Murray A. and Kirschner M.(1989). Dominoes and clocks : The union of two views of the cell cycle **Science 246: 614-621.**
- Newport J. and Spann T. (1987). Dissassembly of the nucleos in mitotic extracts: Membrane vesiculation, lamin disassembly and cromosome condensarion are independent processes . **Cell 48: 219-230.**
- Newport JW. and Forbes DJ. (1987). The nucleus: Structure, function an dynamics. **Rev Biochem 56: 535.565.**
- Newport JW., Katherine L. Wilson, and William G. Dunphy (1990). A Lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. **J Cell Biol 111:2247-59.**
- Nicke son JA. and Penman S. (1992). Localization of nuclear matrix core filamente protein at interphase and mitosis .**Cell Biology International Reports vol.16(8):811-825.**
- Novello F., Brizzi PA. and Massimo Derenzini (1978). Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural pattern. **Exp Cell Res 112:443-451**
- Nurse P.(1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature 344:503-508.**
- Nyman U., Hallman H., Hadlaczky C., Pettersson Y., Sharp G., and Ringertz NR. (1986). Intranucleolar localization of snRNP antigens. **J Cell Biol 102:137-144.**

- Ochs RL., Stein WT. Jr, Andrade CEL., Dwight Gallos S., Chan HLE, Eng M. Tan and Klaus Braschs (1995). Formation of nuclear bodies in hepatocytes of estrogen-treated Roosters. **Mol Biol Cell 6: 345-356.**
- Paine PL., Leonard C., Moore and Horowitz B. (1975). Nuclear envelope permeability. **Nature 254:109-114.**
- Peter S. (1990). In vitro Disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. **Cell 61:591-602.**
- Petrov P. and Bernhard W. (1971). Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of interphase nucleus. **J Ultrastruct Res 35: 386-402.**
- Powell RD., Halsey MR., Spector DL., Kaurin SL., McCann J. and Hainfeld JF. (1997). A covalent fluorescent-gold immunoprobe: Simultaneous detection of a pre-mRNA splicing by light and electron microscopy. **J Histochemistry & Cytochemistry 45(7):947-956.**
- Prescott D. Reproduction of eucariotic cells (1976). **Academic Press, New York.**
- Puvion-Dutilleul F., Bachellerie JP. and Puvion E. (1991). Nucleolar organization of HeLa cells as studied by *in situ* hybridization. **Chromosoma 100: 395-409.**
- Puvion E. and Moyne C. 1981. *In situ* RNA structures. **In the cell Nucleus (Vol 8)** (Busch, H. ed), pp.99-115. Academic Press. New York, San Francisco, London.
- Puvion E. Viron A., Assens C., Leduc EH. and Jeanteur Ph. (1984a). Immunocytochemical identification nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cell. **J Ultrastruct Res 87: 180-189.**
- Puvion E. and Moyne G. (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. **Exptl. Cell Res.,115:79-88.**
- Ratan R. and Shelanski M. (1986). Calcium and the regulation of mitotic events. **TIBS 11: 456.459.**
- Raska Y., Andrade IF., Ochs RL., Chan EKL., Chang, CM., Roos G. and Tan EM (1991). Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. **Exp Cell Res 195:27-37.**
- Raven EE. *Biología de las plantas.* (1991). Ed Reverté, S.A. Barcelona pp. 15-17.

- Reichelt R.A., Holzenburg E.L., Buhles Jr, Jarnik M., Engel A. and Aebi A. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. **J Cell Biol** 110:883-94.
- Rivera-León R. and Gerbi A.S. (1997). delocation of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplet early pre-rRNAs. **Chromosoma** 105:506-514.
- Rosenblatt J., Gu Y. and Morgan OD. (1992) .Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. **Proc Natl Acad Sci** 89:2824-2828.
- Santella L. (1998). The role of calcium in the cell cycle: Facts and hypotheses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 244:317-324.
- Sharp PA (1987). Splicing of messenger RNA precursors. **Science** 235:766-771.
- Singh AP. (1977). Fine structure of the dominant embryo of *Medicago sativa* . **Am J Biol** 64:1008-1022.
- Somerville J. 1986. Nucleolar structure and ribosome biogenesis. **Trends Biochem Sci** 11: 438-442.
- Spector D.L., Schier WH. and Buch H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of SnRNPs. **Biol Cell** 49:1-10.
- Spector D.L., Lark,G. and Huang, S. (1992). Differences in snRNP localization between transfected and nontransfected cell . **Mol Biol Cell** 3: 551-569 .
- Spector D.L., Fu, X.D. and Maniatis T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. **EMBO J** 10:3467-3481.
- Spector D.L. (1990). Higher order nuclear organization: Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 147-151.
- Steitz A.J., and Tycowski TK. (1995). Small RNA Chaperones for ribosome biogenesis. **Science** 270:1626-1627.
- Stuurman N., Lutzein de Jong and Roel van Driel (1992). Nuclear Frameworks: Concepts and operational definition. **Cell Biol International Report** 16 N°8.
- Swift H. (1959). Studies on nuclear fine structure Brook-haven Symp **Biol** 12: 134-152.
- Swift H (1963). Cytochemical studies on nuclear fine structure. **Exp Cell Res** 9:54-67.
- Steitz JA. and Tycowski KT.(1995). Small RNA chaperones for ribosome biogenesis. **Science** 270: 1626-1627.

- Tang KT., Tang CH-C., Chao J-Y. and Wu W-CH. (1994). Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA): spindle association, nuclear targeting and differential subcellular localization of various NuMA isoforms. **J Cell Sci** 107:1389-1402.
- Thiry M. (1995). Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. **Eur J Cell Biol** 68:14-24.
- Thibodeau A. and Vincent M. (1991). Monoclonal antibody CC-3 recognizes phosphoproteins in interphase and mitotic cells. **Experimental Cell Research** 195:145-153.
- Tolosa S. and Ochoa V. *Morfología Veterinaria. Histología y Embriología General*. Editor. J. Tolosa Sánchez, México, D.F. 1984.
- van Driel B., Humbel B. and de Jong L. (1991). The nucleus: A Black Box Being opened. **J Cell Biochem** 47:311-316.
- Vázquez-Nin GH and Bernhard W (1971). Comparative ultrastructural study of pericromatin and Balbian ring granules. **J Ultrastruct Res** 36: 842-860.
- Vázquez-Nin GH., Chávez B. and Tomas-Martin C. (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. **J Microscopie** 16:243-246.
- Vázquez-Nin GH., Echeverría O., Molina E. and J. Fragoso (1978). Effects of ovariectomy and Estradiol Injection on the Nuclear Structures of Endometrial Epithelial Cell. **Acta Anat.** 102:308-318.
- Vázquez-Nin GH., Echeverría O. and Pedron (1979). Effects of Stradiol on Ribonucleoprotein Constituents of the Nucleus of Cultured Endometrial Epithelial Cells. **Biol Cell** 35:221-228.
- Vázquez-Nin GH., Echeverría O.M. Fakan S., Lesser G. and TE. Martin (1990). Immunoelectron microscope localization of SnRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. **Chromosoma** 99:44-51.
- Vázquez-Nin GH., Ortega-Rangel JA., Echeverría OM., Parra MR. and LF. Jiménez-García (1983). Changes in the nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin deposition during neuronal differentiation and maturation. **Biol Cell** 48:17-24.
- Vázquez-Nin GH, Abolhassani-Dadras S., Echeverría MO., Boutinard Rouelle-Rossier V. von Schack ML. and Fakan S. (1997). Electron spectroscopic imaging analyses of the distribution of phosphorus in Balbiani ring granules and in the surrounding nucleoplasm. **Chromosoma** 105:360-368.

- Visa N., Puvion-Dutilleul F., Bachellerie JP. and Puvion E. (1993b). Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs determined by electron microscope in situ hybridisation. *Exp Cell Res* 208:1934.
- Warner JR. (1990). The nucleolus and ribosome formation *Curr.Opinion Cell Biol* 2: 521-527.
- Wasef M.(1979)- A Cytochemical study of interchromatin granules. *J Ultrastr Res* 69:121-133.
- Weisbrod S. (1982). Active chromatin. *Nature* 297:289-295.
- Wolfe SL. *Biology of the Cell*. Wodsworth Pub. Ca. A Division of Wodsworth Inc., Belmont, California 1980.
- Wozniak WR., Bartnik E. and Blobel G. (1989). Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* 108:2083-2092.
- Yoshida T., Katsuta K., Takanari H. and Izutsu K. (1990). Association of a cytoplasmic dynein-like proteins recognizable by anti-Map1 c with the mammalian mitotic spindle. *Cell Biol* 14: 189-198.
- Zavala G., Aguilar X., Jiménez-García LF., Echeverría OM., and Vázquez-Nin G. (1992) Changes in the ribonucleoprotein constituents of muscle cell in the chick embryo. *Biol Cell* 76:159-165.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA