

00341

1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**LOCALIZACIÓN DEL ADN EN
NUCLEOS DE NEUROBLASTOS DE
MÉDULA ESPINAL DE EMBRIÓN DE
POLLO**

298738

T E S I S A
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE :

**ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA APLICADA A LAS
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A :

MA. LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ



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.

Dedico este trabajo a mi familia: Luis y Eddy, porque son lo más importante para mí y mi mayor apoyo.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia a los doctores Olga Echeverría y Hebert Vázquez, por haberme aceptado en su laboratorio y por todo su apoyo tanto académico como moral.

A la Especialista en M. E. Silvia Juárez, por toda su ayuda y enseñanza, además de su amistad.

A los revisores de este trabajo: Dr. Luis Felipe Jiménez y Dra. Guadalupe Zavala, a quien además agradezco sus valiosas aportaciones y observaciones durante el desarrollo del presente.

A mis compañeros de laboratorio: Ernestina, Alberto, Pablo y la Dra. Rosario, porque de alguna forma me ayudaron a integrarme al grupo y a desarrollar algunas técnicas.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	6
MATERIAL Y METODO	6
PROCESAMIENTO DE EMBRIONES	7
FIJACIÓN E INCLUSIÓN	8
CORTE	10
CONTRASTES	11
ACETATO DE URANILO-CITRATO	12
DE PLOMO	14
INMUNOLocalización	16
AMINA DE OSMIO	17
EDTA	17
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	26
BIBLIOGRAFÍA	28

RESUMEN

Se estudió la distribución del ADN en el nucleolo de neuroblastos de médula espinal de embriones de pollo de 4 días de incubación, utilizando la técnica de tinción general acetato de uranilo- citrato de plomo y métodos citoquímicos para ADN y ARN (amina de osmio y EDTA), así como la técnica de inmunolocalización para ADN con anticuerpos específicos acoplados con micelas de oro de 12 nm de diámetro. Los núcleos de estos neuroblastos, son de un gran volumen con respecto al citoplasma, conteniendo uno o más nucleolos, que en general presenta una morfología reticulada y ocasionalmente en forma anular, en los que los centros fibrilares son claramente identificables, ya que son grandes y bien definidos, con su parte central alejada del componente fibrilar denso. El ADN rodea los centros fibrilares encontrándose principalmente en el componente fibrilar denso del nucleolo.

INTRODUCCION

En el núcleo interfásico los nucleolos son fácilmente identificables con el microscopio de luz como cuerpos densos, con un diámetro aproximado de 0.5-3.0 μm . Las células diploides usualmente tienen un nucleolo grande o dos o más de tamaño pequeño, y algunas veces el volumen total de estos pequeños nucleolos en una célula de un tejido determinado es igual al volumen de un solo nucleolo de una célula vecina. Esto indica que el volumen nucleolar total en una célula es regulado de esta forma. El volumen nucleolar es usualmente mayor en células que están activas en la síntesis de proteínas que en las inactivas (1).

El nucleolo puede definirse como la expresión morfológica de la transcripción del ARN prerribosómico por los organizadores nucleolares (o sus copias) y de la maduración posterior de ese ARN hasta convertirse en los ARNr. Por eso, el nucleolo es mucho más visible en los momentos de mayor síntesis de ribosomas, y cuando no hay transcripción se dispersa, como ocurre durante la mitosis. En el nucleolo, se llevan a cabo tres diferentes procesos: transcripción específica de los genes ribosomales por la ARN polimerasa I, procesamiento de los transcriptos primarios por partículas RNPs nucleolares específicas y ensambles de las partículas prerribosomales (2, 3).

En los nucleolos se distinguen los siguientes componentes ultraestructurales: centros fibrilares: muy evidentes en algunos nucleolos, donde puede haber varios centros fibrilares y de densidad inferior a la de las partes granular y fibrilar. Consiste en finas fibrillas de 7-9 nm. Contiene ADN y algo de ARN. Debido al contenido en ADN, se ha considerado que los centros fibrilares corresponden a organizadores nucleolares en fase activa o de transcripción. Otros autores le atribuyen función de almacén de reservas proteicas para la síntesis ribosómica. Los centros fibrilares, contienen genes de ARNr en forma de cromatina parcialmente condensada (4). Otros componentes del nucleolo son el componente fibrilar denso que rodea los centros fibrilares y la región granular la cual rodea al componente fibrilar denso. Esta región granular consiste en masas de partículas prerribosómicas en las últimas etapas de maduración. El nucleolo contiene muchas proteínas no ribosómicas y moléculas de ARN. Algunas de esas moléculas forman un esqueleto nucleolar fibroso, que probablemente está unido a las láminas nucleares. Hasta el momento, la naturaleza y las funciones del esqueleto nucleolar no están bien definidas (4).

El comportamiento del nucleolo es muy diferente según se consideren células interfásicas o mitóticas. En la interfase no se observan grandes cambios en el nucleolo: suele aumentar su volumen y hay tendencia a la fusión de nucleolos, lo que ocurre cuando dos organizadores nucleolares se sitúan próximos. Durante la división celular, el nucleolo muestra una serie de cambios que determinan un tipo de conducta nucleolar: el ciclo mitótico típico del nucleolo. Este consiste fundamentalmente en tres procesos (10):

- *Desorganización profásica*: Es un proceso en el que el nucleolo presenta las siguientes características: disminución de tamaño, forma irregular (polilobulada o estrellada), disminución de la afinidad tintórea y aparición de pequeñas masas de material nucleolar libres entre los cromosomas profásicos (10).

- *Transporte metafásico y anafásico*: En esta etapa el nucleolo ha perdido su individualidad. Sus constituyentes se han dispersado por el núcleo profásico y terminan incorporándose a los cromosomas metafásicos (10).

- *Reorganización telofásica*: En la primera mitad de la telofase aparecen cuerpos laminares entre los cordones cromosómicos en vías de descondensación. Al mismo tiempo, se observan cuerpos más esféricos, resultado de la aglomeración y fusión de los más pequeños. Estos cuerpos presentan todas las características morfológicas y reactivas propias del nucleolo interfásico, denominándose cuerpos prenucleolares (10).

Avanzada la telofase, los cuerpos prenucleolares se hacen mayores y comienzan a formar un nucleolo interfásico, por coalescencia y fusión con el NOR (10).

El ciclo nucleolar aparece ligeramente retrasado en sus fases morfológicas respecto al ciclo cromosómico. La desorganización profásica comienza después de iniciada la profase y termina después de iniciada la prometafase. La reorganización telofásica comienza después de iniciada la telofase y termina después de iniciada la interfase (10).

Transcripción en el nucleolo.

En los ribosomas de eucariontes se encuentran presentes 4 tipos de ARNr: un ARN de 18S en la subunidad menor, y tres ARN de 28S, 5,8S y 5S en la subunidad mayor. Sin embargo, la mayoría de los ARN del nucleolo son ARN de 45S en la parte fibrilar y 32S en la granular. Los ARNr de la subunidad ribosómica mayor se localizan en menor cantidad en la parte fibrilar, mientras que apenas se encuentra ARNr de la subunidad ribosómica menor dentro del nucleolo. Esto indica que el ARNr es sintetizado a partir de un precursor que por maduración y dará lugar a los ARNr (10). La unidad de transcripción del ARN precursor del ARNr corresponde a un gen de copias múltiples, que forma el organizador nucleolar. Cada unidad de transcripción nucleolar consiste en dos segmentos de ADN, uno mudo (no se transcribe) y otro que se transcribe. En este último se ven unas protuberancias en la cadena de ADN, constituidos por la ARN polimerasa I, de cada uno de los cuales parte una cadena de ARN asociada a proteínas. La cadena transcrita de ARN se dispone perpendicularmente a la cadena de ADN y su longitud aumenta conforme se llega al final del ADN que se transcribe, porque, a medida que la ARN polimerasa I va recorriendo el gen, copia la cadena de ADN y añade al ARN los nucleótidos complementarios del ADN copiado. De esta manera, todas las cadenas de ARN que forman son iguales, aunque hasta el final del gen no están completas. Una vez completas constituyen el ARN prerribosómico, que es el primer transcrito y que dará lugar a tres de los ARNr. -La parte muda del gen delimita el final de la transcripción (10). Al finalizar un gen se encuentra un espaciador y comienza otra copia idéntica del mismo gen, y así puede haber hasta 800 copias. En cada una de ellas hay unas 100 ARN polimerasas que trabajan en cadena. Por tanto, en un momento dado, pueden estar formándose a la vez 80.000 moléculas idénticas de ARN. Puede decirse, por tanto, que el origen del ARNr (excepto el ARNr de 5S) está en un único gen y repetitivo. Esta multiplicidad de copias responde a una gran necesidad de síntesis de ribosomas en poco tiempo. Por eso, el organizador nucleolar puede fabricar multitud de copias cuando no basta él solo para producir el suficiente ARNr.(10).

ARNs ribosómicos.

Todos los ARN originados en el nucleolo provienen del transcrito primario de 45S, que debe sufrir un procesamiento. El ARN de 45S se transcribe en unos pocos minutos en relación con los organizadores nucleolares. Se transcribiría en el centro fibrilar, de donde pasaría inmediatamente a formar las fibrillas ribonucleoproteicas que constituyen la parte fibrilar del nucleolo. Este ARN de 45S se encuentra asociado a diversas proteínas, nucleolina y RNPs, formando partículas de 80S. Estas proteínas son importadas del citoplasma. En las partículas de 80S se encuentra también incluido otro tipo de ARN de 5S, de origen no nucleolar; pues no se hibrida con el ADN del organizador nucleolar. En su síntesis interviene la ARN polimerasa III, que también sintetiza el ARNt (10).

Las partículas ribonucleoproteicas de ARN de 45S permanecen unos 15 minutos en la parte fibrilar del nucleolo. A continuación, este ARN va a sufrir una serie de cambios. Principalmente, metilación activa en las ribosas, pérdida de bases no metiladas y ruptura de la hebra, para dar lugar a los otros tipos de ARN mencionados. Las proteínas sufren también algunos cambios. Lo primero que ocurre es que el ARN de 45S pierde parte de la cadena y se transforma en ARN de 41S. Parte de este ARN de 41S va a transformarse en ARN de 20S y, finalmente, en ARN de 18S. Este último y sus proteínas forman partículas de 40S que constituyen las subunidades ribosómicas menores, las cuales emigran al citoplasma. Todo este proceso es muy rápido y apenas puede detectarse ARN de 20S y de 18S en el nucleolo. Parte del ARN de 41S va a transformarse en ARN de 32S, que permanecerá durante unos 40 minutos en la parte granular del nucleolo, formando partículas ribonucleoproteicas de 65S. En estas partículas está el ARN de 5S. Seguidamente, este ARN de 32S se transforma en un ARN de 28S y otro de 5,8S que permanece unido a él. Ambos, junto con sus proteínas asociadas y el ARN de 5S, forman partículas ribonucleoproteicas de 60S. Estas partículas están durante unos 30 minutos en el nucleolo y forman las subunidades mayores de los ribosomas. Después emigran al citoplasma. En los procesos madurativos mencionados no sólo hay cambios en el ARN: se producen también cambios en las proteínas asociadas, pero no hay cambios fuera del núcleo (10).

Así, al finalizar los procesos de maduración del ARNr se obtienen las subunidades ribosómicas de 60S y 40S terminadas y libres en nucleolo. Los diferentes tipos de ARN (18S, 28S, 5,8S y 5S) sólo son transportados al citoplasma bajo la forma de subunidades ribosómicas maduras. En el citoplasma se ensamblan ambas subunidades en presencia de ARNm y los factores de iniciación, formando los ribosomas funcionales y comenzando la síntesis de proteínas (10)

El nucleolo ha sido intensamente investigado a través de la historia; a nivel de microscopía electrónica, Vázquez-Nin y colaboradores (6), visualizaron al nucleolo como un compartimiento no limitado por membrana cuyas características morfométricas debían depender, hasta cierto punto, del balance entre la síntesis de pre-ARNr y la migración de los ARNr maduros hacia el citoplasma. Jiménez-García et al. (7), localizaron ADN ribosomal (ADNr) en nucleolos de hígado de rata, encontrando que el ADNr se encuentra en alta cantidad en el componente fibrilar denso de esas células. Olga Bassy et al. (8), sustentan que los nucleolos de plantas tienen una gran dinámica morfológica y organización funcional dividida entre los centros fibrilares (CFs) y el componente fibrilar denso (CFD),

los cuales están asociados con la transcripción y procesamiento de ARN ribosomal (ARNr), y los componentes granulares (CG) representan un almacén de partículas preribosomales.

Los embriones de pollo, son un material óptimo para el estudio del nucleolo, ya que de acuerdo con Zavala (9), las células matrices de la capa endimaria en las primeras etapas de incubación, presentan núcleos elípticos, cromatina de configuración semicompacta y laxa predominantemente, poca cromatina compacta, nucleolos muy grandes y múltiples, lo que permite una observación clara en cuanto a la distribución de ADN en el nucleolo, utilizando técnicas especializadas para microscopía electrónica.

Tomando en cuenta que los centros fibrilares presentes en los nucleolos de embriones de pollo de 4 días de incubación, son grandes y bien definidos, el presente trabajo pretende proporcionar datos claros sobre la distribución del ADN en células animales, utilizando diferentes técnicas para microscopía electrónica.

OBJETIVO.

Identificar la distribución de ADN en nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo, utilizando métodos de tinción general (acetato de uranilo-citrato de plomo), preferencial (EDTA y amina de osmio) y específica (inmunolocalización con anti-ADN).

MATERIAL Y METODO.

Para identificar la distribución de ADN en los nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo se estudiaron 21 embriones de 4 días de incubación, incluyéndolos en forma individual en resinas epoxica (Epon) y acrílica (Lowicryl). Para conocer el grado de conservación del tejido, los núcleos de los neuroblastos y los nucleolos se realizaron cortes montados en rejillas y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo, procesados de varias formas como se indica en la tabla 1.

FIJACIÓN	INCLUSIÓN
Paraformaldehido 2% Glutaraldehido 0.5%	Lowicryl
Paraformaldehido 2%	Lowicryl
Paraformaldehido 4%	Lowicryl
Paraformaldehido 2% Glutaraldehido 1%	Lowicryl
Paraformaldehido 2% Glutaraldehido 1%	Epon

TABLA 1. TIPO DE FIJACIONES E INCLUSIONES UTILIZADAS.

los cuales están asociados con la transcripción y procesamiento de ARN ribosomal (ARNr), y los componentes granulares (CG) representan un almacén de partículas preribosomales.

Los embriones de pollo, son un material óptimo para el estudio del nucleolo, ya que de acuerdo con Zavala (9), las células matrices de la capa endimaria en las primeras etapas de incubación, presentan núcleos elípticos, cromatina de configuración semicompacta y laxa predominantemente, poca cromatina compacta, nucleolos muy grandes y múltiples, lo que permite una observación clara en cuanto a la distribución de ADN en el nucleolo, utilizando técnicas especializadas para microscopía electrónica.

Tomando en cuenta que los centros fibrilares presentes en los nucleolos de embriones de pollo de 4 días de incubación, son grandes y bien definidos, el presente trabajo pretende proporcionar datos claros sobre la distribución del ADN en células animales, utilizando diferentes técnicas para microscopía electrónica.

OBJETIVO.

Identificar la distribución de ADN en nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo, utilizando métodos de tinción general (acetato de uranilo-citrato de plomo), preferencial (EDTA y amina de osmio) y específica (immunolocalización con anti-ADN).

MATERIAL Y METODO.

Para identificar la distribución de ADN en los nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo se estudiaron 21 embriones de 4 días de incubación, incluyéndolos en forma individual en resinas epoxica (Epon) y acrílica (Lowicryl). Para conocer el grado de conservación del tejido, los núcleos de los neuroblastos y los nucleolos se realizaron cortes montados en rejillas y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo, procesados de varias formas como se indica en la tabla 1.

FIJACIÓN	INCLUSIÓN
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 0.5%	Lowicryl
Paraformaldehído 2%	Lowicryl
Paraformaldehído 4%	Lowicryl
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 1%	Lowicryl
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 1%	Epon

TABLA 1. TIPO DE FIJACIONES E INCLUSIONES UTILIZADAS.

los cuales están asociados con la transcripción y procesamiento de ARN ribosomal (ARNr), y los componentes granulares (CG) representan un almacén de partículas preribosomales.

Los embriones de pollo, son un material óptimo para el estudio del nucleolo, ya que de acuerdo con Zavala (9), las células matrices de la capa endodérmica en las primeras etapas de incubación, presentan núcleos elípticos, cromatina de configuración semicompacta y laxa predominantemente, poca cromatina compacta, nucleolos muy grandes y múltiples, lo que permite una observación clara en cuanto a la distribución de ADN en el nucleolo, utilizando técnicas especializadas para microscopía electrónica.

Tomando en cuenta que los centros fibrilares presentes en los nucleolos de embriones de pollo de 4 días de incubación, son grandes y bien definidos, el presente trabajo pretende proporcionar datos claros sobre la distribución del ADN en células animales, utilizando diferentes técnicas para microscopía electrónica.

OBJETIVO.

Identificar la distribución de ADN en nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo, utilizando métodos de tinción general (acetato de uranilo-citrato de plomo), preferencial (EDTA y amina de osmio) y específica (inmunolocalización con anti-ADN).

MATERIAL Y METODO.

Para identificar la distribución de ADN en los nucleolos de fibroblastos de embrión de pollo se estudiaron 21 embriones de 4 días de incubación, incluyéndolos en forma individual en resinas epoxica (Epon) y acrílica (Lowicryl). Para conocer el grado de conservación del tejido, los núcleos de los neuroblastos y los nucleolos se realizaron cortes montados en rejillas y contrastados con acetato de uranilo-citrato de plomo, procesados de varias formas como se indica en la tabla 1.

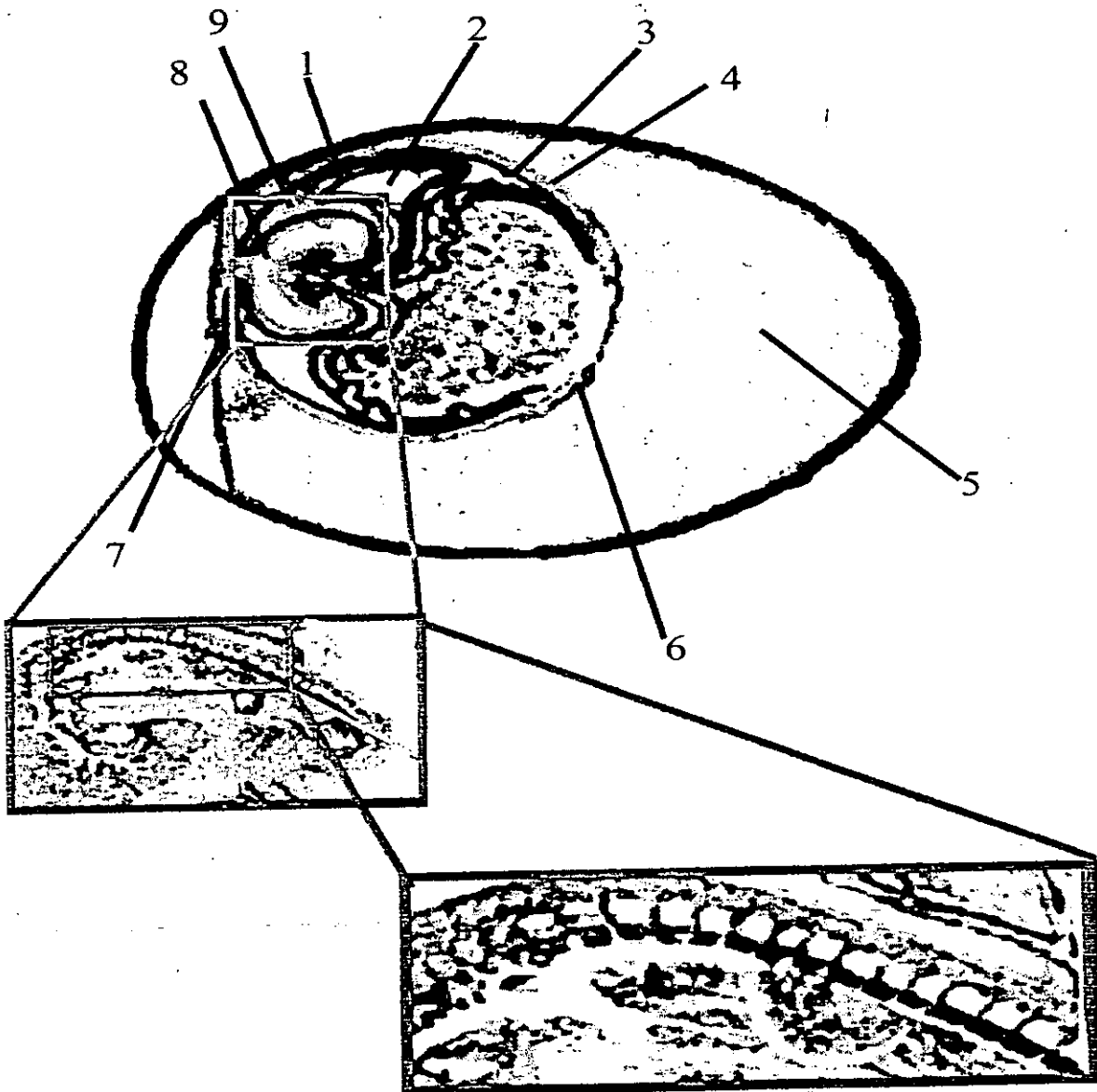
FIJACIÓN	INCLUSIÓN
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 0.5%	Lowicryl
Paraformaldehído 2%	Lowicryl
Paraformaldehído 4%	Lowicryl
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 1%	Lowicryl
Paraformaldehído 2% Glutaraldehído 1%	Epon

TABLA 1. TIPO DE FIJACIONES E INCLUSIONES UTILIZADAS.

PROCESAMIENTO DE EMBRIONES.

Extracción de embriones. Se hace un orificio en el cascarón del huevo por la parte más ancha (sitio en el que se localiza la cámara de aire), se retira la membrana y se saca el embrión completo. El embrión es colocado sobre cera de dentista que debe contener un volumen pequeño del fijador a utilizar, ya que la fijación debe iniciar lo más pronto posible y mientras se realiza la disección de la muestra.

Durante la disección, se selecciona el tubo neural, retirando todo aquello que no forme parte de la muestra como son las secciones cefálica, caudal, ventral y dorsal del embrión.



- 1.- ALANTOIDES
- 2.- CAVIDAD ALANTOIDEA
- 3.- SOMATOPLEURA
- 4.- SACO VITELINO
- 5.- ALBÚMINA

- 6.- MEMBRANA VITELINA
- 7.- CORION
- 8.- EMBRIÓN
- 9.- CAVIDAD AMNIOTICA

FIJACIÓN E INCLUSIÓN

Se utilizan diferentes tipos de fijación utilizando mezclas de fijadores en diferentes concentraciones y dos tipos de inclusiones, siguiendo los siguientes protocolos:

PROCESO PARA INCLUSIÓN EN LOWICRYL

Paraformaldehido 2% Paraformaldehido 2% Paraformaldehido 2% Paraformaldehido 4%
+
Glutaraldehido 1% Glutaraldehido 0.5%
En amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2

Durante 1.5 horas



Lavado en amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2
3 lavados de 10 minutos cada uno



Deshidratación

Metanol 30% durante 5 min a 4°C
Metanol 50% durante 5 min a 4°C
Metanol 70% durante 5 min a -20°C
Metanol 90% durante 30 min a -20°C



Pre-inclusión

Methanol 90% + Lowicryl en proporción 1:1
durante 60 minutos a -20°C
Methanol 90% + Lowicryl en proporción 1:2
durante 60 minutos a -20°C



Inclusión

Lowicryl durante 60 minutos a -20°C.
Incluir en cápsulas de gelatina.
Polimerizar a -20°C en una cámara de
luz ultravioleta

PROCESO PARA INCLUSIÓN EN EPÓN

Paraformaldehido 2%
+
Glutaraldehido 1%
En amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2



Durante 1.5 horas



Lavado en amortiguador de fosfatos 0.16 M. pH 7.2
3 lavados de 10 minutos cada uno



Deshidratación

Etanol 60% durante 10 minutos
Etanol 70% durante 10 minutos
Etanol 80% durante 10 minutos
Etanol 96% durante 10 minutos
Etanol absoluto 2 cambios
de 20 Minutos cada uno



Oxido de propileno 2 cambios
de 15 minutos cada uno



Pre-inclusión

Oxido de propileno + Epon en proporción 1:1
durante 24 horas

Oxido de propileno + Epon en proporción 1:2
durante 24 horas

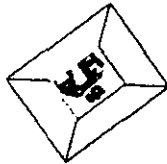


Inclusión

Incluir en bloques.
Polimerizar a 60°C durante 24 horas

CORTE

Una vez polimerizadas las muestras incluidas en las diferentes resinas (epon y Lowicryl) se empieza a realizar una serie de cortes semifinos, los cuales se montan en portaobjetos de vidrio y se contrastan con azul de toluidina con el fin de explorar todos los bloques con las muestras, para identificar el tejido y reconocer el tubo neural y a su vez localizar las astas anteriores. Una vez identificadas las estructuras necesarias, se retallan los bloques delimitando el área de la cara a únicamente las astas anteriores, esto permite obtener la cara más pequeña posible y de esta forma lograr cortes de buena calidad.



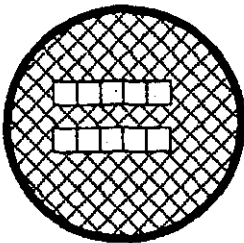
BLOQUE CON UNA CARA MUY PEQUEÑA CONTENIENDO ÚNICAMENTE LAS ASTAS ANTERIORES

CORTES SEMI FINOS.

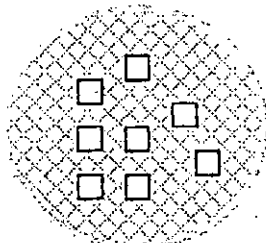
Los cortes semi-finos con espesor de aproximadamente $\frac{1}{2}$ micra hasta 90 nm se montan en portaobjetos de vidrio, para ubicar las zonas de interés observándolos en el microscopio óptico.

CORTES ULTRAFINOS

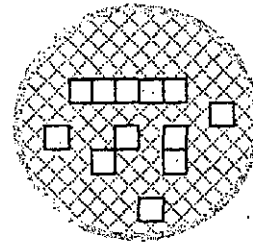
Los cortes ultra finos (espesor de 60-90 nm) se montan en rejillas de cobre, níquel u oro, dependiendo del contraste o el tipo de reacción que se vaya a realizar. Las dos primeras están cubiertas por una membrana plástica (formvar), para permitir el acomodo y adherencia de los cortes. Las rejillas de oro no cuentan con membrana, ya que los cortes montados en este tipo de rejillas se utilizan para el contraste de amina de osmio en el cual se utiliza HCl o ácido acético (depende del tipo de resina) y éstos disuelven el formvar. Los cortes de las rejillas de cobre su pueden utilizar para otras tinciones como son uranilo-plomo y EDTA; para la inmunolocalización es indispensable utilizar las de níquel.



REJILLA DE COBRE



REJILLA DE ORO



REJILLA DE NÍQUEL

CONTRASTES

AZUL DE TOLUIDINA

Contraste utilizado para microscopia óptica, para ubicar las zonas de interés y utilizando cortes semifinos, montados en portaobjetos de vidrio.

Recoger los cortes con una asa de cobre
y colocarlos en el portaobjetos



Colocar el portaobjetos en una parrilla de calentamiento,
con la finalidad de que los cortes se adhieran.



Poner una gota de Azul de toluidina y nuevamente se pone a calentar
(hasta la formación de una aureola esmeralda en la gota del colorante)



Enjuagar con agua desionizada y secar con calor



Observar al microscopio óptico

ACETATO DE URANILO-CITRATO DE PLOMO

El contraste con acetato de uranilo (2-4%)-citrato de plomo(0.4%), se utiliza para los cortes ultrafinos como un colorante inespecífico, técnica utilizada para microscopia electrónica. Antecede al proceso la centrifugación de los tubos contenedores de los reactivos por 10 minutos a 800 rpm aproximadamente, para evitar cualquier tipo de precipitado en las muestras. Se deben preparar cámaras húmedas libres de polvo, aire, CO₂ y de luz. Para el acetato de uranilo se prepara una cámara poniendo un algodón húmedo en una caja de Petri, se pone un trozo de parafilm adherido al fondo en el cual se colocan las gotas del colorante para flotar las rejillas y se cubre con una tapa metálica para evitar la entrada de luz. Para el citrato de plomo se coloca un algodón húmedo, unas 6 lentejas de hidróxido de sodio (las lentejas de NaOH y el agua, atrapan el CO₂ y en ausencia de este, no se forman precipitados de plomo, las lentejas deben ser pocas, ya que de otra forma provoca la formación de cristales de plomo que contaminan los cortes de las rejillas) y el parafilm en el fondo cubriéndola con la tapa de la misma caja para evitar tanto el polvo como el CO₂.

Recoger los cortes en las rejillas de cobre para microscopio electrónico
con ayuda de unas pinzas de relojero



Colocar las rejillas en una caja de petri
con papel filtro en el fondo



Acetato de U r a n i l o

Con una pipeta Pasteur tomar una cantidad muy pequeña de uranilo
y se colocan dos gotas en el parafilm de la cámara húmeda
y obscura (proceso que debe llevarse a cabo lo más rápido posible)



Flotar la rejilla sobre la segunda gota y se deja durante
5 minutos para las muestras incluidas en Lowicryl
y 20 para las incluidas en Epon



Lavar con agua desionizada por goteo
y secar con papel filtro. Dejar secar.



Citrato de P l o m o

Con una pipeta Pasteur con punta larga, se toma una pequeña
cantidad del tubo contenedor y se corta la punta a la pipeta,

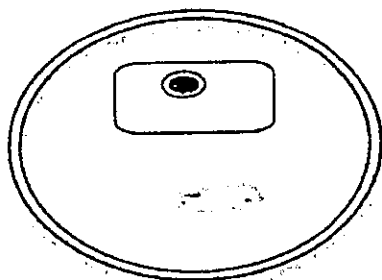
ya que el tubo presenta una capa oleosa que impide el contacto del aire con el reactivo y la punta queda impregnada del mismo.
Colocar dos gotas del reactivo sobre el parafilm e inmediatamente flotar las rejillas y cubrir todo. Para los cortes de Lowicryl, se flotan durante 3 minutos y para Epon 10.



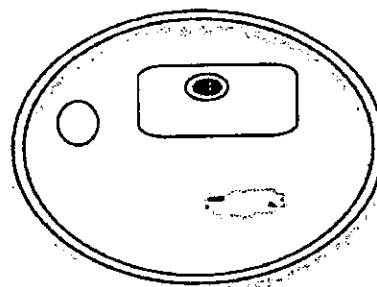
Enjuagar con agua desionizada y secar.



Observar al Microscopio Electrónico



CAMARA DE CONTRASTE PARA ACETATO DE URANILO, CON UN ALGODÓN HÚMEDO Y LAS GOTAS DEL REACTIVO EN QUE FLOTA LA REJILLA SOBRE PARAFILM



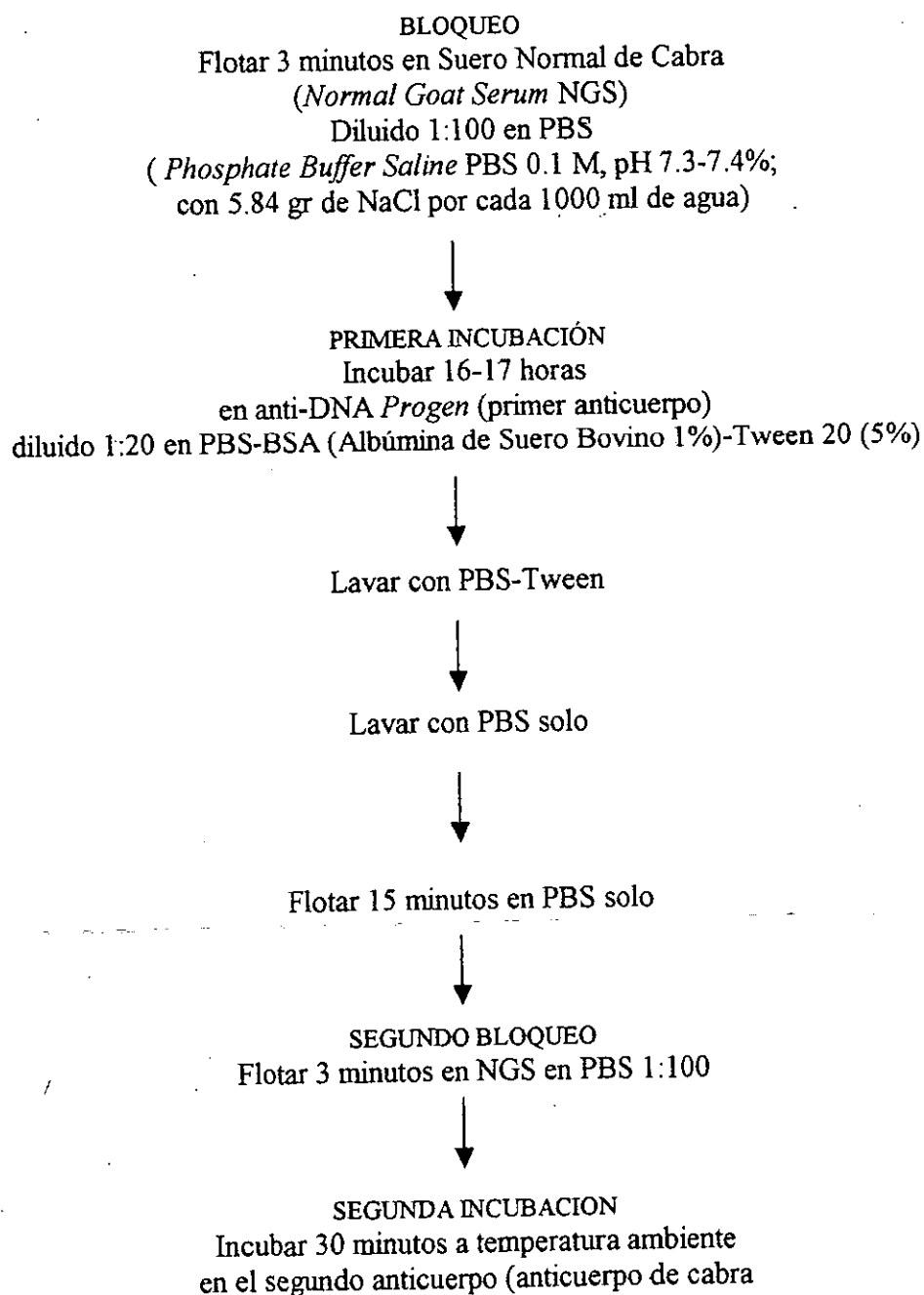
CAMARA DE CONTRASTE PARA CITRATO DE PLOMO, CON UN ALGODÓN HÚMEDO, LENTEJAS DE NaOH Y LAS GOTAS DEL REACTIVO EN QUE FLOTA LA REJILLA SOBRE PARAFILM

INMUNOLOCALIZACIÓN

Para este procedimiento se prepara una cámara húmeda. En una caja pequeña de plástico, se ponen varias capas de papel humedecido y sobre éste se coloca una plataforma en donde se adhiere un parafilm o una cera de dentista en donde se van a colocar las gotas de los diferentes reactivos y se tapa.

Durante este procedimiento, se debe cuidar que las rejillas nunca se sequen. Se quita el exceso de los reactivos con papel filtro y se introducen inmediatamente en el siguiente.

El procedimiento se realiza de ésta forma:



desarrollado contra IgM de ratón, acoplado a micelas de oro de 12 nm de diámetro) diluido 2:20 en PBS.
Centrifugar antes de poner las gotas.



Lavar con PBS por goteo.
Lavar con PBS por flotación 5 min.



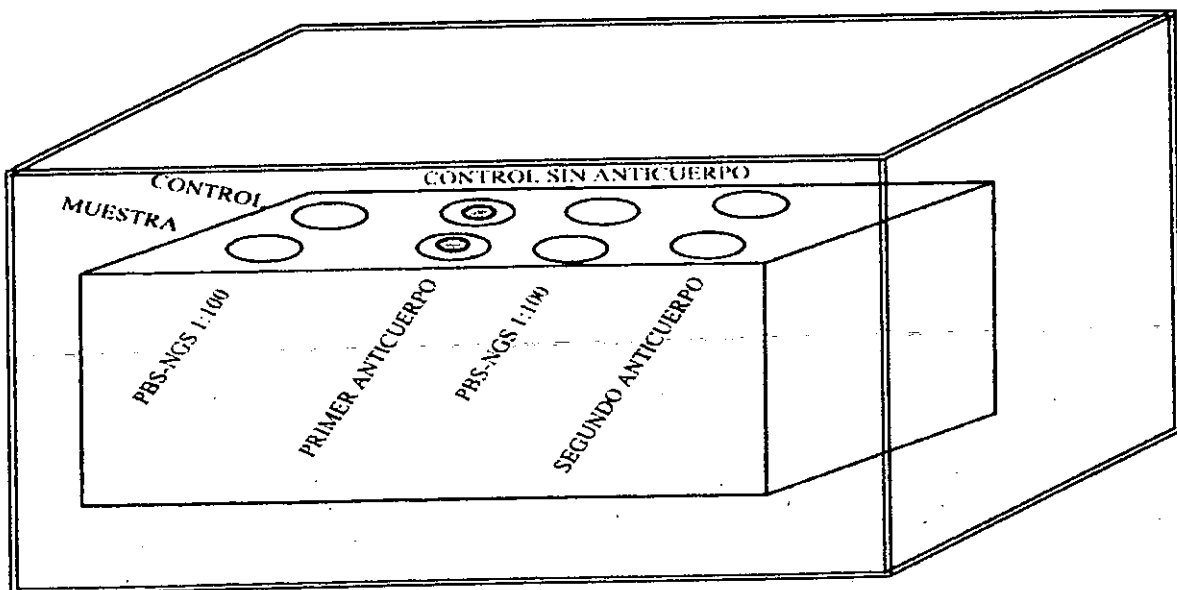
Lavar con agua desionizada y flotar 15 minutos en agua desionizada



Dejar secar medio día antes de contrastar suavemente con uranilo-plomo



Contrastar con uranilo 5 minutos-plomo 3 minutos



CAMARA PARA INMUNOLocalización

AMINA DE OSMIO

Esta técnica se puede utilizar para muestras fijadas con aldehídos, pero no cuando se han post-fijado con tetraóxido de osmio. Se pueden utilizar muestras incluidas en epon o acrílico. Los cortes deben ser montados en rejillas de oro sin membrana de formvar. La técnica de Cogliati y Gautier (23), modificada por Vázquez-Nin y colaboradores (5), sustituyendo el uso de SO_2 comprimido por metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y proponiendo la hidrólisis con ácido acético.

HIDROLISIS

Flotar las rejillas de oro sobre ácido clorhídrico 5 N a temperatura ambiente por 30-45 minutos



Enjuagar abundantemente con agua desionizada varias veces



TINCIÓN

Teñir los cortes por flotación en la solución de tinción de amina de osmio β en ácido acético o en HCl (dependiendo de la resina) a 37°C durante 45 minutos y 30 minutos a temperatura ambiente

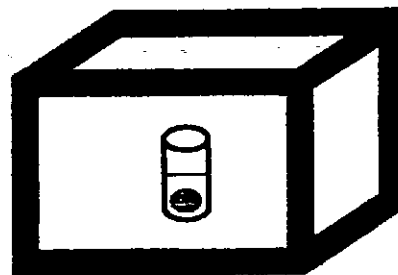


Enjuagar abundantemente varias veces en agua desionizada. Dejar secar y observar.

Es importante que el proceso de tinción se lleve a cabo en total oscuridad, por lo que se utilizan alícuotas de 20 microlitros en tubos ependorfs cubiertos con papel aluminio dentro de una caja oscura.



HIDROLISIS CON HCl 5N.
DE OSMIO EN UNA



TINCIÓN CON AMINA
CAMARA TOTALMENTE OSCURA

TINCION CON EDTA

La técnica de tinción con ácido etilendiamino-tetra-acético al 0.2 M (EDTA), puede realizarse sobre cortes incluidos en epon o Lowicryl. Es importante que los cortes sean de diferentes espesores, ya que esto proporciona una mayor posibilidad de éxito de la técnica, debido a que si no resulta en un corte grueso es posible que en un delgado si, o viceversa.

Flotar las rejillas sobre acetato de uranilo (3-5%) por 2 min.



Enjuagar en agua desionizada y secar



Flotar las rejillas en EDTA (0.2 M) durante 7 minutos en una cámara húmeda.



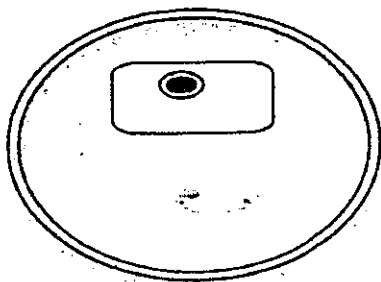
Enjuagar en agua desionizada y dejar secar



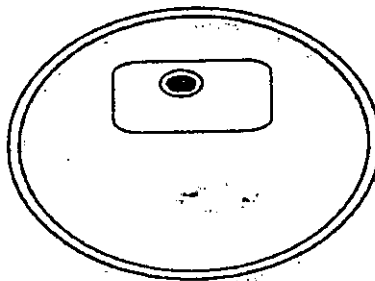
Flotar las rejillas en citrato de plomo (0.3-0.5%) durante 1 minuto



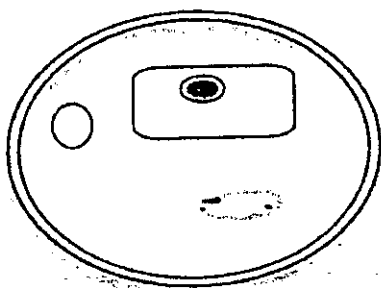
Enjuagar en agua desionizada, secar y observar.



CAMARA DE CONTRASTE PARA ACETATO DE URANILO,
CON UN ALGODÓN HÚMEDO Y LAS GOTAS DEL REACTIVO EN QUE FLOTA LA REJILLA SOBRE PARAFILM



CAMARA DE CONTRASTE PARA EDTA,
CON UN ALGODÓN HÚMEDO Y LAS GOTAS DEL REACTIVO EN QUE FLOTA LA REJILLA SOBRE PARAFILM



CAMARA DE CONTRASTE PARA CITRATO
DE PLOMO, CON UN ALGODÓN HÚMEDO,
LENTEJAS
DE NaOH Y LAS GOTAS DEL REACTIVO
EN QUE FLOTA LA REJILLA SOBRE
PARAFILM

RESULTADOS

La técnica utilizada para tinción general, proporcionó imágenes que permitieron identificar el tamaño y la forma general de los neuroblastos, los cuales regularmente presentan una morfología reticulada y en ocasiones anular, observándose que los núcleos de estas células, tienen un área muy grande en relación al citoplasma (figura 1). La figura 2 muestra un neuroblasto con más de un nucleolo, los cuales son redondeados y uno de ellos presenta un centro fibrilar heterogéneo (parte inferior de la imagen), con un centro de cromatina condensada, en ellos los centros fibrilares se encuentran definidos y de gran tamaño. De igual forma, en las figuras 3 y 4 se pueden observar nucleolos con forma reticulada de gran volumen, los cuales han proporcionado información clara de los componentes del mismo como son: los centros fibrilares (CF) rodeados por el componente fibrilar denso (CFD).

Las técnicas especializadas, han permitido observar claramente la distribución de los diferentes componentes de los núcleos, como son las ribonucleoproteínas con la tinción preferencial con EDTA; la cromatina por medio de la técnica de amina de osmio, modificada por Vázquez-Nin y colaboradores (5) e inmunolocalización con anti-ADN.

El alto contenido de ARN en el nucleolo, ha permitido una clara imagen de los mismos con la técnica de EDTA, ya que se evidencia el nucleolo, y permite detectar las fibras de ribonucleoproteínas y la perfecta delimitación de los centros fibrilares (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el granular (CG) (figura 5 y 6).

Las figuras 7 y 8 ilustran la tinción de neuroblastos con amina de osmio. Sugieren una distribución del ADN rodeando los centros fibrilares, mostrando una mayor distribución en el límite del centro fibrilar. De igual manera, se puede ver que la cantidad de cromatina en el nucleolo es muy reducida. Estas imágenes muestran cromatina en el CFD y muy poca en el CF. En estas imágenes, no se observa teñido el componente granular, ya que esta técnica nos permite observar únicamente ADN, mostrando una imagen negativa de todos aquellos componentes que contiene ARN.

Finalmente, para conocer la distribución específica de ADN, se utilizó la técnica de inmunolocalización. La marca se acumula en los componentes fibrilares densos y en los centros fibrilares. Se observa muy poca marca en el CF, ya que hay poco ADN (figuras 9, 10 y 11). Estas figuras muestran los nucleolos reticulados, en donde la distribución de la marca se encuentra en el CFD, siendo nula en el CG y sólo algunas marcas sobre el CF.

Figura 1. Neuroblasto de embrión de pollo de 4 días de incubación. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F), componente granular (G), citoplasma (c). Ur-Pb. 18400 X. Esta imagen nos permite observar el aspecto nucleolonemal de los nucleolos en los neuroblastos y el gran tamaño que poseen éstos núcleos con respecto al citoplasma.

Figura 2. Neuroblasto de embrión de pollo de 4 días de incubación. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F), componente granular (G). Ur-Pb. 37500 X. Imagen que muestra más de un nucleolo en un neuroblasto. Los componentes del nucleolo son muy evidentes y los centros fibrilares grandes y definidos, además de presentar una forma anular y uno de los nucleolos heterogéneo, en donde se observa claramente un centro de cromatina compacta en el centro fibrilar.

Figuras 3y 4. Neuroblastos de embrión de pollo de 4 días de incubación, en donde se observa un nucleolo con morfología reticulada, así como sus diferentes componentes claramente definidos. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F). Ur-Pb. Fig. 3, 37500 X; fig. 4 25000 X Las flechas indican los centros fibrilares rodeados de material denso.

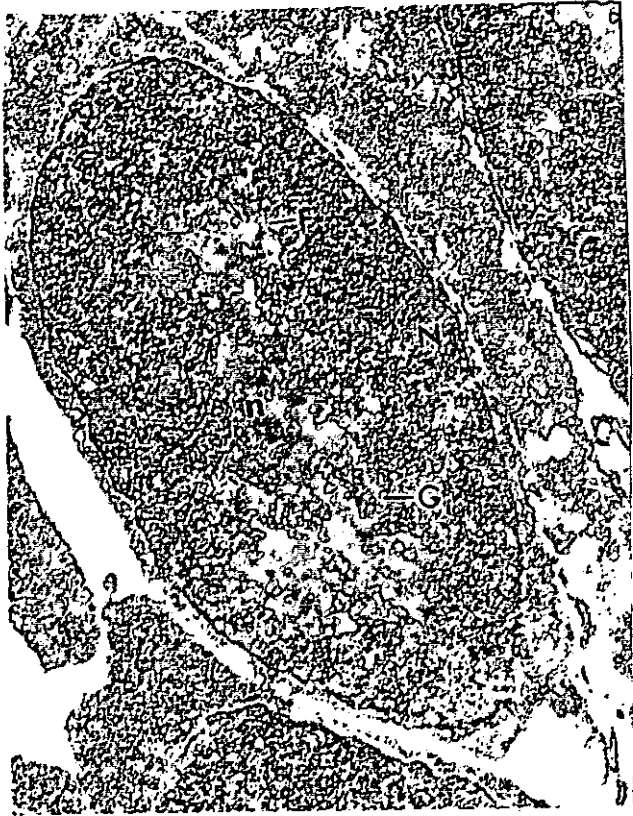


FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURAS 3 Y 4

Figuras 5 y 6 . Neuroblastos de embrión de pollo de 4 días de incubación. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F), componente granular (G). EDTA. Fig. 5, 60000 X; fig. 6, 44000 X. Imagen que evidencia al nucleolo e incluso se pueden observar las fibras de ribonucleoproteínas. Esta tinción preferencial para ARN, permite observar claramente la forma reticulada de los nucleolos, el componente granular distribuido hacia las partes contiguas del componente fibrilar denso.

Figuras 7 y 8. Neuroblastos de embrión de pollo de 4 días de incubación. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F). Amina de osmio. 50000 X. Se observa distribución de cromatina en el CFD y muy poca en el CF, mostrando una silueta traslucida al haz de electrones de los nucleolos, ya que en éstos no hay tinción, debido a la ausencia de ADN.

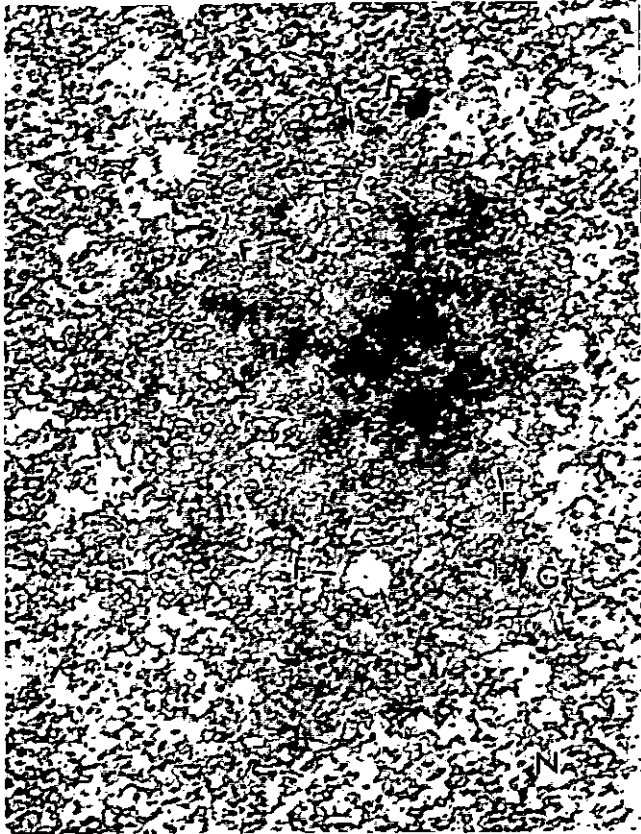


FIGURA 5

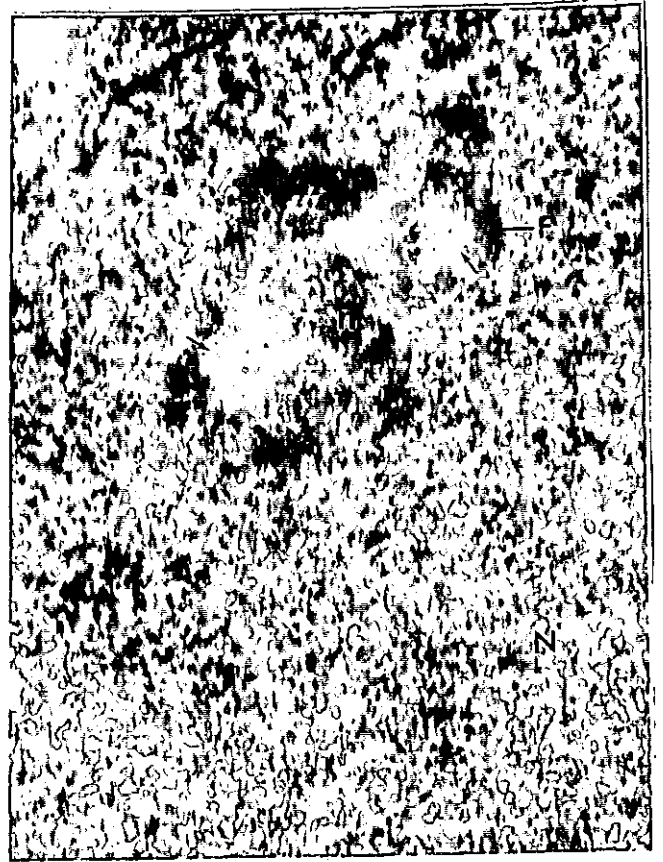


FIGURA 6

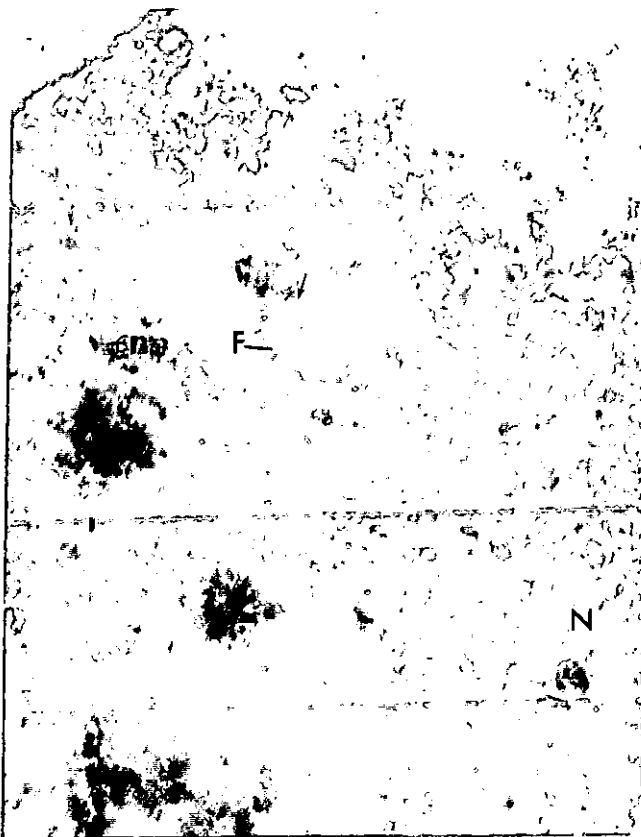


FIGURA 7

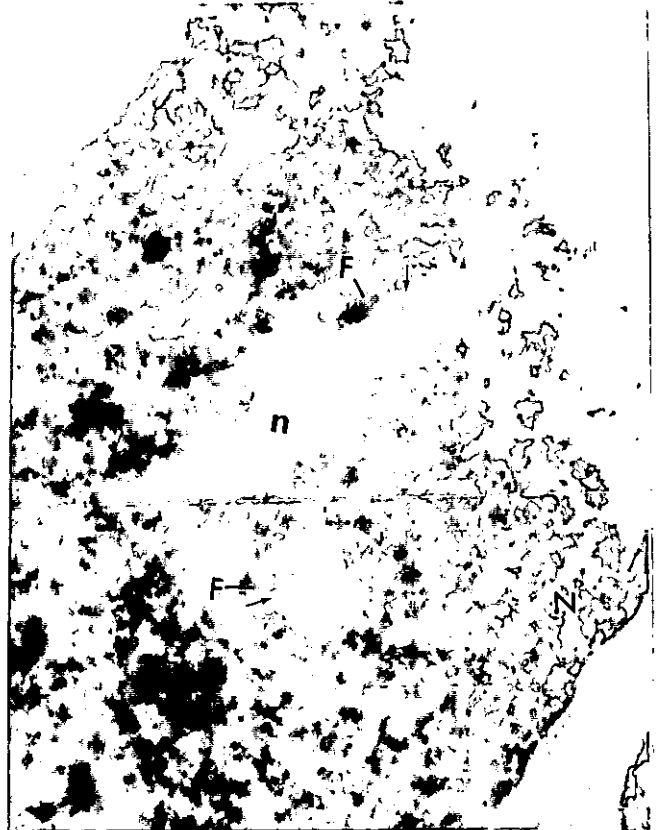


FIGURA 8

Figuras 9,10 y 11. Nucleolos de neuroblastos de embrión de pollo de 4 días de incubación. Núcleo (N), nucleolo (n), centro fibrilar (→), componente fibrilar denso (F). Inmunolocalización con anticuerpo acoplado a micelas de oro de 12 nm de diámetro. Fig.9 62500 X, fig. 10 55000 X, fig. 11 52500 X. Imagen que permite observar diferentes nucleolos con forma reticulada,, con centros fibrilares claramente identificables en donde la marca se reconoce en los CFDs y escasa marca en los CFs.

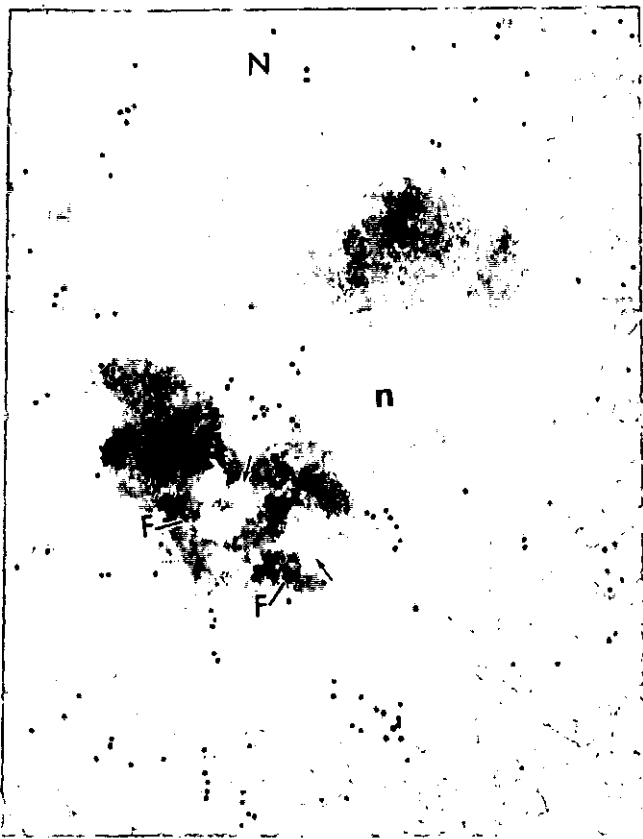


FIGURA 9

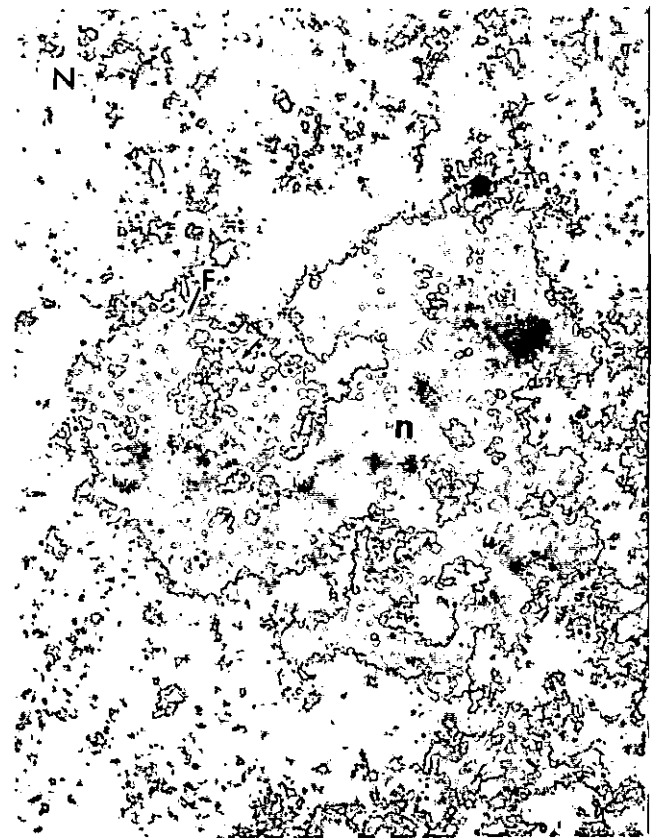


FIGURA 10

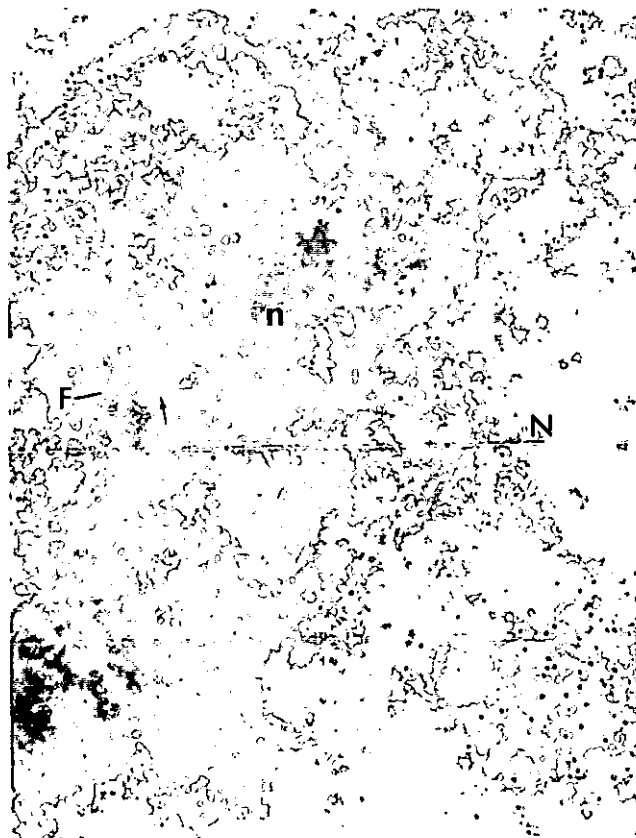


FIGURA 11

DISCUSIÓN

En 1984 Scheer y Rose (12), detectaron la ARN polimerasa I sobre centros fibrilares de células de hígado de rata, por medio de una inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica. Esta observación ha sido seguida por muchas publicaciones de detección de ADN en el nucleolo como los realizados por Bassy y colaboradores (8) quienes desarrollaron la técnica de hibridación *in situ* en nucleolos de plantas, la hibridación de ADN muestra la presencia de ADN_r en la cromatina compacta y laxa localizada en el interior y en la periferia de los FCs y en asociación con la cromatina nucleolar. Martín y colaboradores (11), encontraron que en células de cebolla, el ADN se localizaba esencialmente en los CFs y en el CFD que los rodeaba. Otro trabajo recientemente publicado por Medina y otros (13), indica que los CFs son los mayores sitios de acumulación de ADN_r, y los sitios en donde los complejos de transcripción y ensamblaje se llevan a cabo, indicando que la transcripción de los genes que codifican para el ARN_r ocurre en puntos discretos de la zona de transición entre los CFs y el CFD. Mineur (18) y colaboradores han investigado la localización precisa de ADN en el nucleolo de células meristemáticas de *Zea mays* y *Pisum sativum*, encontrando un evidente marcado sobre el CFD de nucleolos activados. En nucleolo no activados no hay un marcado significativo en los CFDs, en los CFs hay una marca significativa. El CG nunca se marcó significativamente. Estos resultados indican que el ADN presente en el CFD de nucleolos activados es retirado de esta estructura durante la activación y empieza a incorporarse a los CFs. Beven y cols. (25) estudiaron nucleolos de raíz de guisantes y encontraron la distribución de ADN a través del CFD, rodeando los CFs. Los trabajos citados anteriormente, han sido realizados en células vegetales y a pesar de ello, los resultados mencionados discrepan unos con otros, sin embargo, algunos concuerdan con las observaciones logradas en el presente trabajo, en donde la inmunolocalización para ADN, ha permitido identificar la distribución de los granos de oro en el CFD y algunos en la periferia del CF, entre el límite de ambos. También es importante notar que el CG, no presenta marcado.

En cuanto a las células animales, se han hecho varias investigaciones con respecto a la localización de ADN en el nucleolo, por ejemplo, Thiry y su grupo han realizado numerosos trabajos bajo la misma línea; en su trabajo de 1988 (14), utilizando la técnica de inmunolocalización para ADN, encontraron que en el nucleolo, la marca es particularmente concentrada sobre la cromatina perinucleolar y sobre las prolongaciones intranucleolares, las cuales penetran al cuerpo nucleolar y a menudo terminan en los CFs, por lo que las partículas de oro se encontraron en los CFs, preferencialmente hacia la región periférica. Los resultados que obtuvieron sugieren que el ADN contenido en los genes ADN_r se localizan en los CFs, con una preferencia por las regiones periféricas. Los autores indican que este hallazgo sugiere que la transcripción de los genes ADN_r debe ocurrir dentro de los confines del centro fibrilar. En trabajos anteriores del mismo autor, los resultados obtenidos son concordantes con los ya mencionados (15, 16, 17) en donde los marcadores que utiliza para identificar al ADN se encuentran en la periferia de los centros fibrilares. Mais y Ulrich (26), en *Xenopus oocytes*, encontraron que el ADN_r se distribuía en el CFD y en alguna medida en el CG, pero no en los CFs. Hozák y su grupo localizaron la distribución de ADN_r en células de Sertoli y en espermatogonias A de humano, utilizando una hibridación *in situ* para el ADN, identificándolo en diferentes zonas del CFD, las partículas

de oro son visibles en las diferentes zonas de CFD, alrededor del CF, con poca marca en la periferia del CF. En el presente trabajo, la inmunolocalización realizada a los cortes de médula espinal de embrión de pollo de 4 días de incubación, indican la presencia de ADN rodeando los centros fibrilares y no dentro de los mismos, concordando con los resultados antes citados. pareciendo ser una generalidad de los nucleolos animales y en algunos publicados para vegetales, resultado que conjuntamente con la técnica de tinción específica para ADN con amina de osmio, cuyas imágenes (figs. 7 y 8) indican claramente la presencia de cromatina compacta rodeando a los centros fibrilares y mostrando una imagen negativa del resto del nucleolo, manifestando una silueta clara del mismo.

En lo que respecta al ARN del nucleolo, se han realizado innumerables estudios, explorando todos los eventos que se llevan a cabo dentro y fuera del nucleolo (19, 20, 21, 22). Olmedilla y colaboradores (24), estudiaron la distribución del ARNr en el nucleolo de células de diferentes plantas, utilizando la hibridación *in situ* y la técnica de tinción de EDTA, encontrando en el nucleolo en el CFD y CG, apoyando la hipótesis que la transcripción puede empezar en la periferia de los CFs, aunque no pueden excluir la posibilidad de que el CFD, también tenga un papel importante en este proceso; ellos también encontraron FCs homogéneos pequeños y numerosos y conteniendo fibras de cromatina descondensada así como FCs heterogéneos grandes y menos numerosos, conteniendo un centro de cromatina condensada. Cabe mencionar que aunque en este trabajo, se utilizaron células animales, también fue posible encontrar un centro fibrilar heterogéneo con centro de cromatina condensada (figura 2). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran una clara presencia de ARN en el nucleolo y su abundancia con respecto a la cromatina presente.

Aunque algunos autores Thiry y Goessens (27), han descrito la presencia de ADN en los Fcs, nuestros resultados apoyan otras evidencias ya mencionadas, en donde el ADN se encuentra en el CFD. Aunque aún existe discrepancia entre los autores, se ha logrado un consenso en cuanto a que la localización de los genes ADNr intranucleolares ocurre en el componente fibrilar, ya sea componente fibrilar denso o centros fibrilares (28).

Los resultados que hemos obtenido, nos han permitido observar que estos neuroblastos de pollo, tienen núcleos muy grandes y esto permite una clara identificación del o los nucleolos (los cuales en general presentan una forma reticulada y en algunos casos, presenta una morfología redondeada), según sea el caso, de igual forma, hemos podido localizar e identificar claramente los centros fibrilares presentes en los nucleolos, así como la distribución de ADN, la cual, por medio de la inmunolocalización, se encontró que existe una mayor marca en el CFD más que en el propio centro fibrilar, reforzando este resultado con las tinciones de amina de osmio, que indican claramente una distribución de la cromatina alrededor del CF.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) SADAVA, D. E. 1992. Cell Biology Organelle, Structure and function. Ed. Jones and Bartlett Publishers. U. S. A. 698 p.
- 2) HOZÁK P., COOK, P. R., SCHÖFER C., MOSGÖLLER W., WACHTLER F. 1994. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells, *J. Cell Sci.* 107:639-648.
- 3) SHAW P. J., JORDAN E. G. 1995. The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev.* 11:93-121.
- 4) SMITH, C. A. y E. J. WOOD. 1997. Biología Celular. Ed. Addison-Wesley. Iberoamericana, S. A. 367 p.
- 5) VAZQUEZ-NIN, G. H., M. BIGGIOGERA, O. M. ECHEVERRÍA. 1995. Activation of osmium ammine by SO₂-generatin chemicals for EM.Feulgen-type staining of DNA. *Eur. J. Histochem.* 39:101-106.
- 6) VAZQUEZ-NIN, G. H., L. F. JIMÉNEZ-GARCÍA Y O. M. ECHEVERRÍA. 1993. "Relaciones entre morfología y funciones nucleolares. Estudio de hibridación *in situ* y morfometría", en *Progresos en Biología Celular*. Becerra, J, J. M. Pérez-Figares, P. Fernández-Llebrez, eds. Págs. 135-138. Universidad de Málaga.
- 7) JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F., M. DE L. SEGURA, R. L. OCHS, O. M. ECHEVERRÍA, G. H. VAZQUEZ-NIN, H. BUSCH. 1993. Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.* 207:220-225.
- 8) BASSY, O. , L. F. JIMÉNEZ-GARCÍA, O. M. ECHEVERRÍA, G. H. VÁZQUEZ-NIN, S. MORENO. 2000. High resolution detection of rRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by *in situ* hybridization. *Biol. Cell.* 92:59-70.
- 9) ZAVALA P. G. T. 1995. Análisis ultraestructural de partículas ribonucleoproteicas (RNP) durante la diferenciación de tejidos derivados de las principales capas embrionarias. *Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.*
- 10) UNIVERSIDAD MIGUEL HDEZ. 1998. Programa de Biología Celular de la Fac. Cienc. Exp. Campus de Elche. Depto. De histología. España. <http://webvision.umh.es/docencia/biocelular/temas/nucleolo.html>
- 11) MARTIN, M., S. M. DIAZ DE LA ESPIN, F. JAVIER M. 1989. Immunolocalización of DNA at nucleolar structural components in onion cells. *Chromosoma.* 98(5):368-77.
- 12) SCHEER R., K. M. ROSE. 1984. Localization of RNA polymerase-I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1431-35.

- 13) MEDINA, F. J., A. CERDIDO, G. DE CARCER. 2000. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur. J. Histochem.* 44(2):117-31
- 14) THIRY M., U. SCHEER, G. GOESSENS. 1988. Localization of DNA within Ehrlich tumour cell nucleoli by immunoelectron microscopy. *Biol. Cell.* 63(1):27-34 .
- 15) THIRY M., 1992. Ultrastructural detection of DNA within the nucleolus by sensitive molecular immunocytochemistry. *Exp. Cell. Res.* 200(1):135-44
- 16) THIRY M., D. PLOTON, M. MENAGER, G. GOESSENS. 1993. Ultrastructural distribution of DNA within the nucleolus of various animal cell lines or tissues revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Cell Tissue Res.* 271(1):33-45
- 17) THIRY M. 1993. Ultrastructural distribution of DNA and RNA within the nucleolus of human Sertoli cells as seen by molecular immunocytochemistry. *J. Cell Sci.* 105:33-9
- 18) MINEUR P., A. JENNANE, M. THIRY, R. DELTOUR, G. GOESSENS. 1998. Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by a cold stress. *J. Struct. Biol.* 123(3):199-210
- 19) TULIA, M. S., J. GÉBRANE-YOUNES, J. DE MEY, J. B. SIBARITA, D. HERNÁNDEZ-VERDUN. 2001. Nucleolar Assembly of the rRNA Processing Machinery in Living Cells. *J. Cell Biol.* 153(5):1097-1110.
- 20) ZAVALA, G., G. H. VAZQUEZ-NIN. 2000. Analysis of nuclear ribonucleoproteic structures during notochordal cell differentiation and maturation in chick embryos. *Anat. Rec.* 259(2):113-123.
- 21) THIRY M. T. CHEUTIN, M.F. O'DONOHUE, H. KAPLAN, D. PLOTON. 2000. Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *RNA* 6(12):1760-61.
- 22) RASKA I., M. DUNDR, K. KOBERNA, I. MELCAK, M. C. RISUEÑO, I. TOROK. 1995. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J. Struct. Biol.* 114(1):1-22.
- 23) COGLIATI R., A. GAUTIER. 1973. Mise en évidence de l'AND et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif "de type Schiff". *C. R. Acad. Sci.* 276, 3041-3044.
- 24) OLMEDILLA, A. , P. S. TESTILLANO, O. VICENTE, M. DELSENY, M. C. RISUEÑO. 1993. Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli . RNA/RNA *in situ* hybridization, autoradiography and cytochemistry. *J. Cell Sci.* 106:1333-1346.

- 25) BEVEN, A. F., R. LEE, M. RAZAZ, D. J. LEADER, J. W. S. BRONS, P. J. SHAW. 1996. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J. Cell. Sci.* 109:1241-1251.
- 26) MAIS, C., U. SCHEER. 2000. Molecular architecture of the amplified nucleoli of *Xenopus oocytes*. *J. Cell. Sci.* 114:709-718.
- 27) THIRY M., G. GOESSENS. 1992. Location of DNA within the nucleolus of rat oocytes during the early stages of follicular growth. *Int. J. Dev. Biol.* 36(1):139-42.
- 28) SEGURA, V. M. L. 1996. Disección Molecular del Nucleolo *in situ*. Visualización de ácidos nucleicos nucleolares por hibridación *in situ* fluorescente y ultraestructural. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM.