

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

11 00377

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS GRÁNULOS DE *LACANDONIA*
DURANTE LA MITOSIS POR MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

TESIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

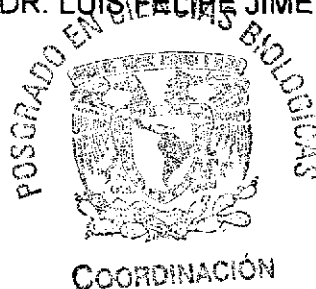
P R E S E N T A

BIÓLOGA THELMA FALCÓN BÁRCENAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FERRER JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2002





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Envío a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impresa
el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Thelma Falcón

Bárceñas

FECHA: 22 Noviembre 2002

FIRMA:

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de octubre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Falcón Bárceñas Thelma**, con número de cuenta 501004075, y número de expediente 0, con la tesis titulada: **"Estudio de los gránulos de Lacandonia durante la mitosis por microscopía electrónica de transmisión (MET)."**, bajo la dirección de la **Dr. Luis Felipe Jiménez García**.

Presidente:	Dra. Rosario Rodríguez Amaiz
Vocal:	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Secretario:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Abraham Rubluo Islas
Suplente:	M. en C. Jaime Jiménez Ramírez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de noviembre de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

A MI ESPOSO, RAFAEL
*por su amor, apoyo
y comprensión*

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MI SUEGRA Y CUÑADOS

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Luis Felipe Jiménez García por aceptar ser director de tesis, por su paciencia, apoyo incondicional, conocimientos, dedicación, ayuda, amistad y confianza depositada para la realización de este trabajo.

También agradezco especialmente a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz y al Dr. Abraham Rubluo Islas por aceptar ser parte del comité tutorial, compartir sus conocimientos y por las sugerencias y observaciones realizadas a lo largo de este trabajo de investigación.

Y a los miembros del jurado:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

M. en C. Jaime Jiménez Ramírez

que revisaron y enriquecieron con sus sugerencias y conocimientos la presente tesis.

Agradezco especialmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de estudiar un posgrado en esta Institución.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM por el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo y la obtención del grado de
Maestra en Ciencia Biológicas
(Biología Experimental)

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por haberme apoyado y otorgado la licencia para realizar estudios de posgrado en la Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Agradezco al Sindicato Unico de Trabajadores de la Industria Nuclear (SUTIN) por su apoyo incondicional, así como a todos mis amigos y compañeros de trabajo que me impulsaron y estimularon en todo momento.

A mis maestros de la Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) por todo lo que me enseñaron durante el tiempo que realice mis estudios.

Al M. en C. Marco Antonio González Jiménez agradezco muy especialmente su amistad, apoyo incondicional, técnico-académico, sus conocimientos, enseñanzas y comentarios hechos durante la elaboración de este trabajo.

Agradezco también su amistad, comentarios, ayuda y apoyo brindado por mis amigos y compañeros de laboratorio:

Reyna, Albina, Perla, Nancy, Ernestina,

Lourdes Agredano, María de Lourdes,

Gabriel, Juan, Yolanda, Silvia,

Florencia y Gabriela.

Gracias

INDICE

	Página
1 RESUMEN Y ABSTRACT	1
2 ABREVIATURAS	3
3 INTRODUCCIÓN	4
4 ANTECEDENTES	7
4.1 <i>Lacandonia schismatica</i>	7
4.2 Núcleo	9
4.2.1 Componentes fosfolípidicos	10
4.2.2 Componentes proteícos	11
4.2.3 Componentes desoxirribonucleoproteícos	13
4.2.4 Componentes ribonucleoproteícos	15
4.3 Biología Celular de <i>Lacandonia schismatica</i>	24
4.4 Núcleo Interfásico de <i>Lacandonia schismatica</i>	25
4.4.1 Gránulos de <i>Lacandonia</i>	26
4.5 Ciclo Celular	27
4.5.1 Mitosis	33
4.5.1.1 Profase	34
4.5.1.2 Prometafase	34
4.5.1.3 Metafase	34
4.5.1.4 Anafase	35
4.5.1.5 Telofase	35
5 HIPÓTESIS	36
6 OBJETIVOS	36
6.1 General	
6.2 Específico	
7 METODOLOGÍA	37
7.1 Descripción general de la zona de colecta	37
7.1.1 Reserva de la Biosfera Montes Azules	37
7.2 Técnica Experimental	38
7.2.1 Microscopía Óptica	38
7.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	40
7.3 Procesamiento de muestras para observar los gránulos de <i>Lacandonia</i> en el MET	43
8 RESULTADOS	46
9 DISCUSIÓN	60
10 CONCLUSIÓN	63
11 BIBLIOGRAFIA	65
12 RELACION DE FIGURAS	74

1 RESUMEN

El núcleo es un organelo compartimentalizado formado por nucléolo, cromatina compacta y laxa, cuerpos espiralados, cuerpos nucleares, gránulos pericromatinianos e intercromatinianos y fibras pericromatinianas. En mamíferos se establece la presencia de un patrón estructural muy conservado entre los eucariontes. En plantas es reticulado y cromocéntrico. Recientemente en *Lacandonia schismatica* se describió una estructura ribonucleoproteica denominada gránulos de *Lacandonia* de 32 nm de diámetro distribuidos en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano similares a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani, contienen proteínas SR y Poly(A)⁺RNA, son bismuto negativas, sensibles a la digestión con pronasa-RNAasa y se cree que participan en el procesamiento del pre-mRNA. En este trabajo empleando la técnica para Microscopía Electrónica de Transmisión, se analizaron en las células de los ovarios de *Lacandonia schismatica*, la distribución de los gránulos de *Lacandonia* en células interfásicas y mitóticas, y se analizó si éstos son heredados de la célula madre a las células hijas durante la mitosis. Se utilizaron botones florales en preantesis y flores maduras de *Lacandonia schismatica* las cuales se incluyeron en resina epóxica y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. En núcleos interfásicos se observan numerosos gránulos de *Lacandonia* rodeando a la cromatina compacta así como en el espacio intercromatiniano. En las fases de la mitosis: profase, prometafase, metafase y anafase, la cantidad de gránulos disminuye considerablemente. En estas fases los gránulos de *Lacandonia* se asocian a la periferia de los cromosomas y algunos se distribuyen en la región intercromatiniana. Sin embargo, durante la telofase y la etapa G1 el número de gránulos de *Lacandonia* se incrementa considerablemente, observándose también en el espacio intercromatiniano de las células hijas. Los resultados obtenidos indican que una pequeña fracción de los gránulos de *Lacandonia* es heredada de la célula madre a las células hijas, sugiriéndonos que tienen ARN de vida media corta y que están involucrados en las primeras etapas de procesamiento del pre-mRNA y la expresión génica en las células que inician la etapa G1.

ABSTRACT

The nucleus is a compartmentalized organelle composed of nucleoli, compact and dense chromatin, Cajal and other nuclear bodies, perichromatin and interchromatin granules and perichromatin fibers. In mammals, this pattern is conserved through evolution. In plants, however, two nuclear types are present depending on chromatin condensation: the chromocentric and the reticulated type. Recently, a 32 nm in diameter nuclear ribonucleoprotein particle was described in the plant *Lacandonia schismatica*, which is associated to reticulated chromatin in both the perichromatin and interchromatin spaces. This nuclear structure is similar to perichromatin and Balbiani ring granules, which contain SR proteins and Poly(A)⁺RNA. They are also negative for bismuth staining, they are sensitive to pronase-RNAase digestion and it is believed that they participate in some steps of pre-mRNA. In order to see whether these particles are inherited from mother cell to daughter cells, the distribution of *Lacandonia* granules during mitosis was studied by transmission electron microscopy in cells of the ovaries of *L. schismatica*. Buds and flowers were processed for standard transmission electron microscopy. In interphase nuclei, *Lacandonia* granules are observed surrounding the compact chromatin and in the interchromatin space. During prophase, prometaphase, metaphase and anaphase, the number of granules decreased considerably. Some granules are associated to the periphery of chromatin and in the surrounding spaces. However, during telophase and G₁, the number of granules increase significantly, and they are also present in the interchromatin space of daughter cells. These results indicate that only a small fraction, if any, of *Lacandonia* granules are inherited from mother cell to daughter cells, further suggesting that they contain short half-life RNA probably involved in first steps of pre-mRNA processing in cells entering G₁.

2 ABREVIATURAS

<i>ADN, DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ADP</i>	Adenosindifosfato
<i>ARN, RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>Cdc</i>	Ciclo de división celular
<i>Cdk</i>	Ciclina dependiente de cinasas
<i>Clb</i>	Ciclina tipo B
<i>Cln</i>	Ciclinas
<i>CNP</i>	Complejo de poro nuclear
<i>CRO</i>	Complejo de reconocimiento del origen
<i>DNAasa</i>	Enzima
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EN</i>	Envoltura Nuclear
<i>FC</i>	Fibras Pericromatinianas
<i>G0</i>	Fase G0 periodo de quiescencia de la célula
<i>G1</i>	Fase G1 (Gap=intervalo)
<i>G2</i>	Fase G2 (Gap=intervalo)
<i>GIC</i>	Gránulos Intercromatinianos
<i>GPC</i>	Gránulos Pericromatinianos
<i>H1, H2A, H2B, H3 y H4</i>	Histonas
<i>hnRNP</i>	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
<i>M</i>	Fase M (Mitosis)
<i>MET</i>	Microscopio Electrónico de Transmisión
<i>MF</i>	Microfilamentos
<i>mRNA, mARN</i>	Ácido ribonucleico mensajero
<i>MT</i>	Microtúbulos
<i>NOC</i>	Cromosoma organizador del nucleolo
<i>NOR</i>	Región organizadora nucleolar
<i>Post-Re</i>	Complejo post-replicativo
<i>pre-Re</i>	Complejo pre-replicativo
<i>RDB</i>	Diaminoribofuronosilbencimidazol
<i>RNAasa</i>	Enzima
<i>RNP</i>	Ribonucleoproteínas
<i>S</i>	Fase S (síntesis)
<i>SC-35</i>	Proteínas
<i>snRNP</i>	Ribonucleoproteínas pequeños nucleolares
<i>SR</i>	Proteínas con residuos Serina-Arginina
<i>SRA</i>	Secuencia de Replicación Autónoma
<i>Start</i>	Inicio del ciclo celular
<i>tRNA, tARN</i>	Ácido ribonucleico de transferencia

3 INTRODUCCIÓN

Los avances en la microscopía óptica y la aplicación de la microscopía electrónica han permitido examinar con gran detalle las estructuras de las células. Estos estudios han mostrado que las células eucariontes están rodeadas por una membrana limitante, y que tienen un interior dividido en un sistema de compartimientos rodeados por membranas, especializados en funciones bioquímicas específicas. Destacando el núcleo celular el cual contiene el material genético y es el responsable de controlar las actividades celulares (Alberts y col., 1994, 1999). En las últimas décadas del siglo XX y durante el tiempo transcurrido de siglo XXI diversos estudios sobre la ultraestructura y organización del núcleo interfásico han evidenciado que es un organelo compartimentalizado constituido por nucléolo, cuerpos espiralados, cuerpos nucleares, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos los cuales integran cúmulos, fibras pericromatinianas que se unen a los cúmulos de gránulos intercromatinianos formando las speckles o motas, cromatina laxa y compacta. En el núcleo de las células animales se ha observado que la cromatina presenta una distribución articulada, característica bien conservada entre los eucariontes. No obstante, aunque las células vegetales son eucariontes se han notado diferencias en el núcleo ya que la distribución de la cromatina es reticulada y cromocéntrica.

Jiménez-García y col. en 1992 describieron en los núcleos interfásicos de *Lacandonia schismatica*, angiosperma monocotiledónea, saprofita, endémica de la selva Lacandona perteneciente a una familia, género y especie nuevos del orden triuridales, descubierta por Esteban Martínez en 1985 (Martínez y Ramos 1989), y cuya característica única entre cuatro millones de especies es la inversión espacial de sus órganos reproductores, el androceo (estambres) al centro rodeado por el gineceo (carpelos) en las flores; unas estructuras ribonucleoproteicas EDTA positivas de 32 nm de diámetro denominadas gránulos de *Lacandonia* las cuales se distribuyen en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano, similares a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani en los núcleos de células de mamíferos y glándulas salivales de insectos, respectivamente (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), estudios citoquímicos e inmunocitoquímicos

revelan que los gránulos de *Lacandonia* contienen proteínas SR y Poly(A)⁺RNA, son bismuto negativas, sensibles a la digestión con pronasa seguida de RNAasa (Agredano-Moreno y col., 1994, Agredano-Moreno, 1996), y se piensa que participan en la maduración del pre-mRNA.

En los núcleos de esta planta hay usualmente dos nucléolos esféricos y compactos que muestran componentes típicos tales como: centros fibrilares, componente fibrilar denso, componente granular y los centros fibrilares heterogéneos (Risueño y Medina, 1986), también se asocian a centrómeros o pueden estar asociados a cariosomas (cuerpos nucleares laxos y esféricos) (Agredano-Moreno, 1996). Las fibras pericromatinianas son RNP, EDTA positivas (Monneron y Benhard, 1969), que contienen hnRNA recién sintetizado (Bachelierie y col., 1975; Fakan y col., 1976), se localizan en la periferia de la heterocromatina estrechamente asociadas con los gránulos de *Lacandonia* formando un arreglo fibrogranular. Son la contraparte del evento de transcripción y del principio del evento postranscripcional, fenómeno relacionado con la manifestación del fenotipo, pudiendo ser un proceso universal de todos los eucariontes. Los gránulos pericromatinianos son rara vez observados y los gránulos intercromatinianos típicos no han sido evidenciados (Jiménez-García y col., 1992).

La transmisión de la información genética de padres a hijos constituye uno de los procesos celulares más controlados y de mayor relevancia para la reproducción celular. El conocimiento desde los años 1950 de que el material genético es el ácido desoxirribonucleico (ADN) y la elucidación de su estructura, llevó a preguntarse acerca de su replicación y transmisión de la célula madre a las células hijas. La célula se reproduce duplicando y repartiendo sus componentes para constituir dos células hijas a través del ciclo celular que es el conjunto de procesos donde intervienen las ciclinas, aunque los detalles de este celular en eucariontes varían entre los organismos, los puntos esenciales son comunes.

En los últimos años el ciclo celular ha sufrido cambios significativos: en el pasado los investigadores, utilizando únicamente el microscopio óptico lo dividieron en dos periodos: mitosis de elevada actividad y movimiento de los componentes subcelulares, en el que los cromosomas se condensan haciéndose visibles al microscopio óptico y que finaliza con la segregación y división en dos células y la interfase que comprende la mayor parte del ciclo celular por transcurrir entre dos mitosis y en el que al microscopio óptico solo se observa el

incremento en el tamaño celular. Ahora sabemos que la interfase no es un periodo de "reposo" sino que gran actividad, donde se lleva a cabo una secuencia ordenada y complicada de elaborados preparativos para la división celular, conocidos en su globalidad como crecimiento que incluye la síntesis de nuevos organelos celulares y la mayor parte de las proteínas así como la replicación del ADN durante la fase S (Síntesis). La fase G1 (Gap) es el intervalo que transcurre entre el final de la mitosis (profase, prometafase, metafase, anafase y telofase), del ciclo anterior y el comienzo de la síntesis de ADN. La fase G2 es el intervalo entre el final de la fase S y la mitosis. Las fases G1 y G2 proporcionan tiempo adicional para el crecimiento. Durante la fase G1 la célula analiza las condiciones ambientales y si son favorables y contando con el tamaño mínimo comenzará el proceso irreversible de la división celular pasando al proceso de Inicio (Start). Si las condiciones no son favorables la célula entra en un periodo de quiescencia, denominado G0 en el que puede permanecer mucho tiempo, en este periodo la célula es sensible a diferenciación en organismos pluricelulares, o de inicio de procesos sexuales en organismos unicelulares. Si las condiciones vuelven a ser favorables, la célula es capaz de iniciar ciclos de división. En la fase G2 la célula analiza si se ha completado correctamente la fase S y decide entre permitir el paso a mitosis, o esperar a que se realicen las reparaciones necesarias.

4 ANTECEDENTES

4.1 *Lacandonia schismatica* Martínez y Ramos (1989)



En la espesura de la Selva Lacandona fue descubierta en 1985 una planta única entre las plantas con flor, debido a la posición invertida de los órganos reproductores la cual fue denominada como *Lacandonia schismatica* (Figura 1), posteriormente descrita en 1989 (Martínez y Ramos, 1989).

De acuerdo a la clasificación taxonómica de Cronquist (1981) su ubicación es la siguiente:

División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Alismatidae
Orden:	Triuridales
Familia:	Lacandoniaceae
Género:	<i>Lacandonia</i>
Epíteto específico:	<i>schismatica</i>

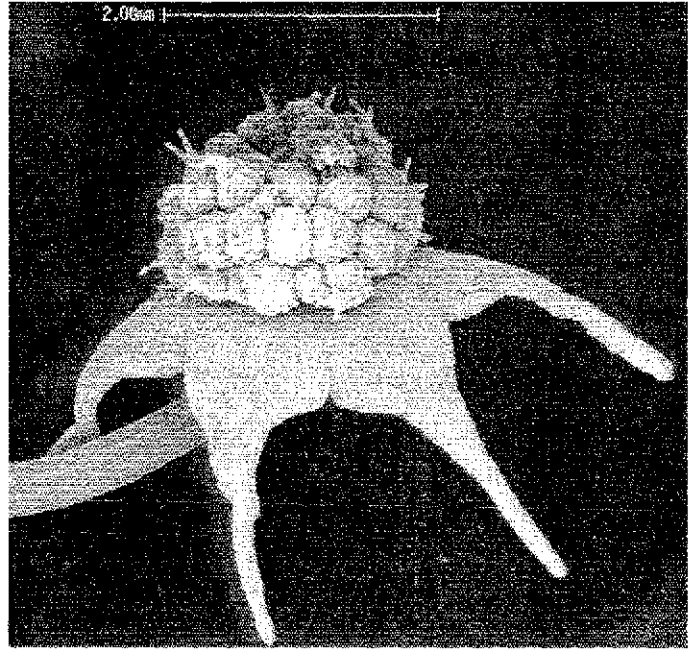


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido a 19.8x de la flor madura en vista lateral. Realizada por Bárbara Ambrose y Francisco Vergara, 2000, UNAM (Luna Córnea, 21/22 2001)

Se han encontrado hasta ahora en sólo dos localidades de la Selva Lacandona (Martínez y Ramos, 1989; Martínez y col., 1994; Reyes-García y Sousa 1995). Las poblaciones descubiertas de la nueva familia Lacandoneaceae del orden Triuridales se ubican en la reserva de la Biosfera Montes Azules, Municipio de Ocosingo, Crucero Corozal a 170 Km al sureste de Palenque, camino a Boca Lacantum, sobre la carretera fronteriza del Sur, Chiapas, México (Martínez y Ramos, 1989), en donde Esteban Martínez examinó con mayor detenimiento las condiciones del hábitat de la enigmática, endémica y rara planta (Diario Oficial, 1994), percatándose que un factor importante es la humedad la cual desempeña un papel fundamental para su aparición o de lo contrario solo crece bajo la hojarasca donde se

conserva la mayor cantidad de agua. Otro factor importante para su desarrollo es la poca cantidad de luz que penetra a través de los árboles hasta el sotobosque permitiendo que la temperatura se mantenga constante, entre 19°C y 26°C a lo largo de todo el año. Esta planta monocotiledónea de aproximadamente 9 cm de altura de coloración blanca casi transparente que carece de hojas y pigmentos, no realiza fotosíntesis, florece todo el año si las condiciones de humedad son adecuadas siendo muy abundante en los meses de noviembre y diciembre después de la lluvia (Martínez y Ramos, 1989). Por su hábito saprofita se alimenta de organismos en proceso de descomposición por lo que para asimilar los nutrientes requiere de la ayuda de un hongo el cual se encuentra formando con su raíz una micorriza vesículo-arbuscular (Palacios-Mayorga y Pérez-Silva, 1993).

Lacandonia schismatica pertenece a una familia, género y especie nuevos para la ciencia (Martínez y Ramos, 1989). Es afín a *Triuridales Gardner* (Maas y Rübsamen, 1986) pero se diferencia por la inversión espacial de sus órganos reproductores, el androceo en el centro de la flor rodeado por el gineceo apocárpico que consta de 60-80 carpelos papilosos y la dehiscencia introrsa de las anteras (Márquez-Guzmán y col., 1989), distribución única entre las angiospermas (Martínez y Ramos, 1989; Márquez-Guzmán y col., 1989).

El verticilio más externo está constituido por seis tépalos papilosos. El androceo está formado por tres o cuatro estambres con anteras biloculares las que se desarrollan y maduran antes que los carpelos y persisten, sin caerse después que los frutos se han dispersado, los granos de polen maduros poseen tres células (Márquez-Guzmán y col. 1989), su germinación se lleva a cabo dentro de la antera teniendo un sistema de polinización cleistogámico (Márquez-Guzmán y col., 1993) que da como resultado la falta de variabilidad genética (Vázquez-Santana y col., 1998; Coello y col., 1993), que puede ser explicada por el sistema de reproducción autogámica que presenta (Márquez-Guzmán y col., 1993).

En el gineceo la orientación de los carpelos es variable por lo que no tiene el estilo orientado hacia los estambres. Cada carpelo contiene un solo óvulo sésil, basal, anátropo y bitégmico con tegumento biestratificado, el fruto indehiscente con epidermis de células globosas en anthesis (Márquez-Guzmán y col., 1989). El saco embrionario de *L. schismatica* es diferente al de otras angiospermas (Vázquez-Santana y col., 1998).

Estudios sobre su anatomía reproductora han permitido describir un nuevo tipo de fecundación para *Lacandonia schismatica* en el cual, antes de la antesis, los granos de polen germinan dentro de la antera indehisciente, los tubos polínicos crecen entre las células del receptáculo y después se dirigen hacia los óvulos, de tal modo que uno de ellos entra al saco embrionario por el micrópilo a través de una de las sinérgidas presentando la doble fecundación. Una vez efectuado dicho proceso la flor abre (Márquez-Guzmán y col., 1993).

La inversión espacial de los verticilios sexuales y el hecho de que los individuos de esta especie conforman una población muy pequeña, localizada dentro de una área muy restringida de la Selva Lacandona en Chiapas, República Mexicana, son dos características de *Lacandonia schismatica* que explican que esta especie tal vez se originó por un proceso macroevolutivo de acuerdo a modelos propuestos para otros organismos (Grant, 1985; Stevens, 1991). Según Davidse y Martínez (1990), *Lacandonia schismatica* quizá se originó por una macromutación del gen o genes que controlan la morfogénesis floral en una pequeña población de un Triuridaceaeo ancestral y en donde seguramente está implicada una mutación que modifica el control de la diferenciación primordial de pistilos y estambres.

Esta planta ha sido de gran interés debido a la inversión de los verticilios sexuales y a su posible origen macroevolutivo. Se conocen varios aspectos de su biología. Por ejemplo estudios citogenéticos han determinado que tiene 9 cromosomas en el complemento haploide (Davidse y Martínez, 1990); el complemento diploide esta conformado por cuatro pares de cromosomas grandes y cinco pares de cromosomas pequeños.

4.2 Núcleo

El núcleo celular de eucariontes es un organelo esférico, conspicuo que mide aproximadamente 5 μm de diámetro formado de complejos multimacromoleculares (Raska y col., 1990, 1992) (Figura 2). La mayoría de los estudios realizados sobre la ultraestructura de los núcleos interfásicos se han enfocado principalmente a los núcleos de mamíferos (Monneron y Bernhard, 1969) lo que ha hecho posible establecer la presencia de un patrón estructural muy conservado en eucariontes. Sin embargo, existen algunas diferencias entre

los núcleos de células animales y de células vegetales con relación a la disposición de la cromatina y de las partículas ribonucleoproteicas (Jiménez García y col., 1989a). Los estudios realizados sobre los núcleos interfásicos en plantas se enfocan principalmente a los que tienen patrón reticulado. De acuerdo a su composición molecular y ultraestructural el núcleo interfásico consta de diferentes componentes que pueden ser agrupados en cuatro categorías:

4.2.1 Componentes fosfolípidicos

Envoltura nuclear (EN)

La envoltura nuclear que es una doble membrana fosfolípídica concéntrica separada por un espacio intermembranoso o perinuclear de 10 a 50 nm que se continua con el lumen del retículo endoplásmico. La EN separa al material genético del citoplasma que lo rodea siendo la característica más importante que distingue a los eucariontes de los procariontes ya que se considera como un punto de referencia en la evolución biológica. Su aparición permitió la separación de la transcripción de la traducción en los organismos eucariontes, puesto que en los procariontes ambos procesos se llevan a cabo simultáneamente (Figura 2). En los organismos eucariontes la transcripción se realiza dentro del núcleo y la traducción en el citoplasma, existiendo una

separación tanto espacial como temporal de ambos procesos. Los transcritos de RNA en el núcleo forman complejos con proteínas dando lugar a partículas ribonucleoproteicas (RNP) que sufren el proceso de ensamble ("splicing") o eliminación de intrones, que es un paso

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

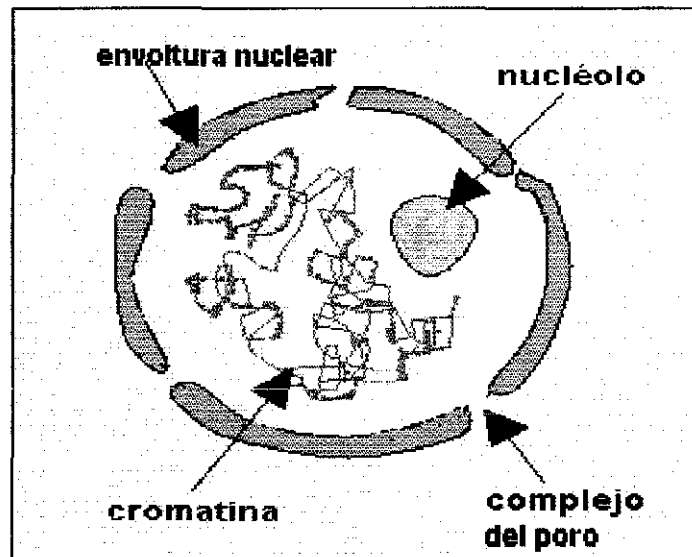


Figura 2. Estructura del núcleo en interfase. Envoltura nuclear, formada por dos membranas concéntricas perforadas por poros nucleares. Nucleoplasma, medio interno del núcleo donde se encuentran el resto de los componentes nucleares. Nucléolo, o nucléolos, masas densas y esféricas. Cromatina, constituida por ADN y proteínas, durante la división se organiza en cromosomas.

intermedio importante en la transferencia de información genética. Las dos membranas de la EN se unen en diferentes sitios formando un poro circular (complejo de proteínas o complejo de poro nuclear), constituyendo la unión entre el citoplasma y el núcleo. La membrana nuclear externa se continúa con el retículo endoplásmico rugoso, siendo ambos funcionalmente similares, también se observan ribosomas. La superficie nucleoplásmica de la membrana nuclear interna se encuentra revestida por una red fibrilar densa, denominada lámina nuclear la cual da apoyo estructural a la EN y anclaje de las fibras de cromatina.

4.2.2 Componentes proteícos

Complejo de poro nuclear (CPN)

El aislamiento del contenido nuclear en células eucariontes significa que las células requieren de sitios en la membrana nuclear que medien los cambios de material entre el núcleo y el citoplasma. Esos sitios son los denominados complejos de poros nucleares (CPNs) debido a que son unos complejos moleculares constituidos por 100 a 200 polipéptidos llamados nucleoporinas con un peso de 125 MDa en vertebrados (Riechelt y col., 1990) y simetría ortogonal. La densidad de CPNs varía en las diferentes células, por ejemplo, en eritrocito inactivo de ave de 2 a 4 por μm^2 ; en levaduras se han observado aproximadamente entre 100 y 200; en células de mamíferos miles y en el núcleo gigante del ovocito de anfibios aproximadamente 50 millones (Karp, 1996). Todo transporte entre el núcleo y el citoplasma es a través del CPN, pequeñas moléculas (20-40kDa) pasan por el CPN rápidamente (miles/poro/segundo) por difusión pasiva y para moléculas más grandes existen mecanismos de señalización que son dependientes de la temperatura. La importación nuclear incluye proteínas nucleares, proteínas ribosómicas y snRNPs maduras mientras que la exportación nuclear incluye mRNAs, tRNAs, snRNAs y pre-ribosomas (Allen y col., 2000)

Lámina nuclear

La cara nucleoplásmica de la membrana nuclear interna se encuentra adherida e interconectada a los complejos de poro la lámina nuclear (Scheer y col., 1976). Las fibrillas de la lámina nuclear tienen aproximadamente 10 nm de diámetro que se unen a receptores

asociados con la membrana nuclear interna (Gerace y Burke, 1988; Nigg, 1992). Está formada por proteínas denominadas láminas, las cuales son similares a algunos de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Asimismo está involucrada en la organización-reorganización de la envoltura nuclear antes y después de la mitosis (Burke y Gerace, 1986; Smith y Wood, 1998) debido a fosforilación y desfosforilación (igual que los filamentos intermedios) de una cinasa.

Es difícil observarla en un núcleo intacto utilizando microscopía electrónica, debido a que normalmente queda enmascarada por la cromatina periférica. La lámina nuclear está compuesta por uno a tres polipéptidos principales llamados láminas A, B y C. Las láminas A y C son homólogas a los filamentos intermedios del citoesqueleto y probablemente comparten un antepasado evolutivo común. La B, aunque relacionada inmunológicamente con A y C y por tanto comparte algunas características comunes, es distinta de ellas. Su función en la formación de la lámina nuclear no es clara aún. La lamina nuclear está estrechamente asociada a la membrana nuclear interna. Hay pruebas que indican que la lámina B tiene una función especializada de unión a la membrana.

Matriz nuclear

La matriz nuclear consiste en la lámina nuclear, de una extensa matriz fibrogranular y la estructural nuclear residual. La matriz nuclear es el componente estructural del núcleo que permanece insoluble después de tratamientos secuenciales con detergentes no iónicos, nucleasas y amortiguadores de alta y baja fuerza iónica (Verheijen y col., 1988). Fue aislada por primera vez en 1974 por Berezney y Coffey, a partir de células de hígado de rata (Agredano-Moreno, 1996). Después de dicho tratamiento la matriz nuclear o material residual mantiene la forma del núcleo que consiste de la envoltura nuclear, lámina nuclear, complejo de poro, restos nucleolares, ribonucleoproteínas (gránulos intercromatinianos) y una red fibrogranular que se extiende desde el nucleolo hasta la envoltura nuclear (Berezney y Coffey, 1977; Kaufman y col., 1981; Berezney y Joen, 1995; Agredano-Moreno, 1996). Se cree que participa en varias funciones nucleares básicas. Así se piensa que en los núcleos interfásicos la cromatina está ordenada en bucles unidos a la matriz. Al parecer

cada bucle representa una unidad de replicación del ADN y de transcripción discreta (Cook, 1989), contiene solo un gen, con sus reguladores de la expresión génica y del procesamiento del RNA (Carmo-Fonseca y col., 1991). Durante la división celular, la matriz nuclear se desensambla y la cromatina se agrupa alrededor de los componentes de la matriz (Agradano-Moreno, 1996).

4.2.3 Componentes desoxirribonucleoprotéicos

Cromatina

En los núcleos interfásicos, la cromatina está presente ya sea como heterocromatina, que se tiñe densamente y es genéticamente inerte, replicándose tarde durante la fase S del ciclo celular, o como eucromatina, más difusa, que comprende aquellos genes que la célula necesita transcribir activamente, los llamados genes de "mantenimiento", que producen moléculas ARN, se piensa que se replica al inicio de la fase S.

La cromatina es un complejo nucleoprotéico formado por el ADN y proteínas histónicas y no histónicas que se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico o por electroforesis (Wolffe, 1995). Todas las células eucariontes contienen cinco tipos de histonas, llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4 cuyas secuencias están sumamente conservadas entre las especies. Ellas son sometidas a muchas modificaciones post-traduccionales, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación (Karp, 1996). Estas modificaciones alteran su tamaño, carga y afinidad hacia el ADN. La magnitud de estas modificaciones varía durante el ciclo celular, para llegar a un máximo durante la fase S, cuando ocurre la duplicación del contenido de ADN del núcleo.

Los núcleos generalmente tienen de 3 a 25 μm de diámetro, aunque el tamaño y la forma varían entre los organismos, los núcleos más grandes están asociados con mayor cantidad de cromatina. El pequeño volumen del núcleo puede albergar a moléculas de ADN muy largas (Figura 3). Por ejemplo, la longitud total del ADN en una célula humana es de aproximadamente un metro. Esto equivale a empaquetar una cuerda de 300 Km en una caja con un volumen de 0.25 m^3 .

Este empaquetamiento solo puede lograrse mediante un intrincado plegamiento del ADN, en el que las histonas juegan un papel decisivo ya que debe realizarse de manera que permita la replicación y la expresión del genoma.

La cromatina está hecha de unidades estructurales repetidas llamadas nucleosomas. Cada uno consiste de un tramo de ADN de alrededor de 200 pares de bases de largo y un octámero de dos ejemplares de cada una de las histonas. Las cuales forman una estructura central de aproximadamente $11 \times 11 \times 5.5$ nm, con cerca de 140 pares de bases del ADN enrollados alrededor originando una hélice levógira. El resto del ADN conecta a los nucleosomas en forma de una cadena flexible y articulada, como un collar de perlas (Karp, 1996). Una molécula de histona H1 se localiza en el sitio donde el ADN entra y sale del núcleo proteico central, cerrando dos vueltas completas de ADN alrededor del octámero de histonas (Alberts, 1999). *In vivo*, la fibra de cromatina aparece como una cadena lineal de nucleosomas densamente empaquetado constituyendo un filamento de 10 a 11

nm de diámetro. El siguiente nivel de plegamiento es la fibra de cromatina, con diámetro de 25 a 30 nm, que parece integrarse mediante un enrollamiento continuo de la fibra de 10 a 11 nm, dando lugar a un "solenioide", con 6 a 7 nucleosomas por vuelta (Alberts, 1994). El solenoide a su vez se acomoda en bucles de hasta 250 a 400 nm de largo. Estos bucles parecen estar anclados a la lámina nuclear. Se estima que los bucles contienen de 10 000 a 180 000 pb, con una medida de alrededor de 63 000 pb por bucle. Los bucles de este tamaño contendrán cerca de 315 nucleosomas, con seis nucleosomas por vuelta del solenoide. Las células humanas que contienen ADN de alrededor

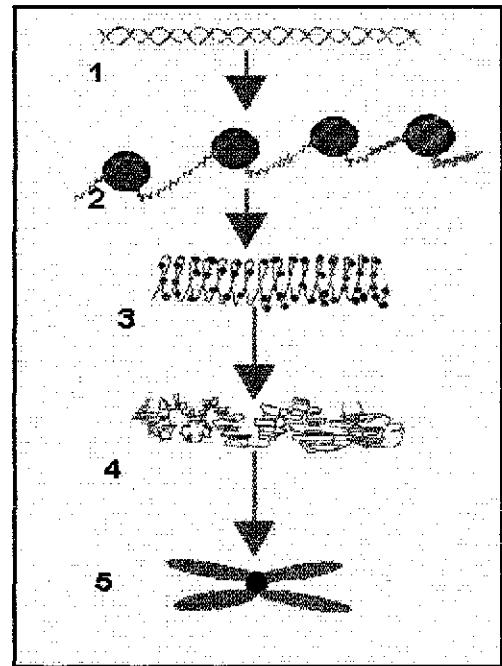


Figura 3. Secuencia que va desde el ADN hasta el cromosoma. 1 molécula de ADN. 2 vemos el ADN unido a proteínas globulares, conformando una estructura denominada "collar de perlas", constituido por la repetición de unas unidades que son los "nucleosomas". 3 "solenioide", estructura de orden superior. 4 aumento del empaquetamiento, integrando "bucles". 5 cromosoma, grado de mayor espiralización y compactación de la cromatina.

de un metro de largo, tendrán cerca de 50 000 bucles por núcleo. Se desconoce la forma en que las proteínas no histónicas se asocian con las fibras de 10 a 11 y de 25 a 30 nm de diámetro, y tampoco se les han asignado papeles funcionales definitivos. Se cree que tienen funciones biológicas en la transcripción y en la replicación del ADN, y papeles estructurales en el armazón del cromosoma (Figura 3).

4.2.4 Componentes ribonucleoproteicos.

Nucleolo

El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento del ARN preribosómico (pre-rARN) y del ensamblado de ribosomas (Scheer y Benavente, 1990). Las RNPs extranucleolares, parecen estar relacionadas con el metabolismo del ARN premensajero (pre-mARN) (Fakan y Puvion, 1980)

El núcleo controla la síntesis de proteínas en el citoplasma enviando mensajeros moleculares. El ARN mensajero (ARNm) se sintetiza de acuerdo con las instrucciones contenidas en el ADN y abandona el núcleo a través de los poros. Una vez en el citoplasma, el ARNm se acopla a los ribosomas y codifica la estructura primaria de una proteína específica. Cada nucleolo es producido por una región organizadora del nucleolo (NOR), restringida a un sitio en el cromosoma organizador del nucleolo (NOC). Todas las células eucariontes contienen al menos uno de tales sitios en al menos un cromosoma, sin embargo, como muchas veces los nucleolos se unen, su número presente no siempre es igual al de NOC. Los nucleolos constan de tres regiones principales: centros fibrilares que contienen genes de rRNA en forma de cromatina parcialmente condensada, están rodeados por un componente fibrilar denso, que a su vez está rodeado por una región granular, que consiste en masa de partículas ribosómicas en las últimas etapas de maduración. El nucleolo contiene muchas proteínas no ribosómicas y moléculas de ARN, algunas de estas forman un esqueleto nuclear fibroso, que probablemente está unido a las laminas nucleares.

Fibras pericromatinianas (FC).

Al finalizar la década de los años 60, Monneron y Benhard realizaron experimentos en diferentes tejidos, empleando la técnica de tinción preferencial EDTA desarrollada por Benhard en 1969 la cual revela la estructura de RNP, al observar las células de los diferentes tejidos encontraron en todas ellas la presencia de un componente RNP nuclear nuevo el cual denominaron fibras pericromatinianas (FC), cuyo diámetro varía entre 3 a 5 nm, se forman y localizan en la periferia de la cromatina compacta. Con estudios bioquímicos y autoradiografía se observó que por lo menos una parte de ellas migran hacia el espacio intercromatiniano (Fakan y col., 1976; Puvion y Moyne, 1978), su ARN sufre procesamiento de maduración durante ese periodo y algunas pueden estar entremezcladas con gránulos pericromatinianos, en etapa de transición de fibras a gránulos y en algunos casos enrolladas irregularmente.

Las FC están presentes en los núcleos de las células de animales, plantas y hongos, su frecuencia en el núcleo refleja la tasa de síntesis de hnRNP en los diferentes sistemas celulares (Fakan y Odartchenko, 1980). Por ejemplo, estudios realizados en hepatocitos de rata adrenalectomizadas e inmediatamente inyectadas con cortisona reportaron que la densidad de las FC aumentó rápidamente después de la administración de la hormona, similarmente su densidad decreció después de tratar a las ratas con α amanitina, que actúa como inhibidor de la RNA polimerasa II (Vázquez-Nin y col., 1978).

Las FP se contrastan instantáneamente con uridina tritiada, simbolizando la contraparte morfológica de los transcritos nacientes de las moléculas de pre-mRNA (Bachelierie y col., 1975; Fakan y col., 1976). Estudios autoradiográficos con uridina tritiada mostraron que la síntesis de ARN en el núcleo se asocia con la cromatina difusa adyacente a la periferia de la cromatina compacta lo que se conoce como región pericromatiniana (Bouteille y col., 1974).

Para conocer la organización de factores de splicing en el núcleo celular se elaboraron estudios de microscopía electrónica empleando anticuerpos anti-snRNPs y anti SC35 los cuales muestran que estos factores esenciales de splicing son componentes de las FC (Spector y col., 1983; Spector 1990, Spector y col., 1991). Sin embargo Fakan y col. (1984) ya habían realizando trabajos de inmunología empleando anticuerpos anti-Sm humano y

anticuerpos monoclonales anti-SM de ratón, marcándolos con granos de oro observaron que se asocian a los GIC y a FC, concluyendo que las fibras contienen snRNP y antígeno hnRNP. Trabajos inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos mono y policlonales anti-snRNP y anti-hnRNP para localizar snRNPs y hnRNPs *in situ* en núcleos de células animales, han sugerido que ellos corresponden a FC extendidas y que probablemente son los sitios de procesamiento del pre-mRNA. En años recientes se propuso que los snRNPs localizados en los cúmulos de GIC se desplazan a los sitios de transcripción activa, es decir, a las FC para que se lleve a cabo el proceso de splicing de los transcritos de pre-mRNA nacientes (Jiménez-García y Spector, 1993). Pero se ha demostrado que muchos de los elementos que son necesarios para el splicing están presentes dentro o asociados con cúmulos de GIC y FC incluyendo proteínas de hnRNP, snRNP, U1 y U2 snRNA, los factores de splicing no-snRNP, SC35, SF2 y ARN recién sintetizado que se detectaron por la incorporación de uridina después de pulsos cortos Poli (A)^{*}RNA y específico pre-mRNA organizados en un patrón de mosaico confirmando que este patrón es un complejo multimolecular que está directamente involucrado en el splicing del pre-mRNA. Puvion y Puvion-Dutilleul (1996) afirman que el splicing es un proceso cotranscripcional, pero se ha demostrado que tal procesamiento del pre-mRNA es un evento postranscripcional. La asociación cercana entre el ARN transcrito, transcripción y factores de splicing del pre-mRNA sugieren que esos eventos en el núcleo celular son tanto temporales como espaciales y que el splicing se lleva cabo en el spliceosoma. Hibridación *in situ* para ácidos nucleicos en secciones ultrafinas de especímenes embebidos en resinas confirman la presencia de U1 y U2, snRNA así como poli(A)^{*} RNA en las FC (Fakan, 1994). Jones y col., (1980), realizando estudios bioquímicos sugieren que los hnRNP después de ser sintetizados se unen a las proteínas 30S RNP y propone que la presencia de éstas participan en el procesamiento temprano de hnRNP. Haciendo diversos trabajos bioquímicos, autoradiográficos y citoquímicos Puvion y Bernhard (1975) confirmaron que las FC son estructuras hnRNA del RNA extranucleolares recién sintetizadas. Experimentos de extracción demostraron que las FC son más sensibles a la RNAasa con lo que se demuestra que las fibras son ricas en ARN. En experimentos de cortes ultrafinos congelados las FC se observan como una población heterogénea de

diámetro irregular que en sección longitudinal exhiben partículas de irregular tamaño y forma alargada, percibiéndose dentro o fuera del borde de la cromatina condensada (Fakan, 1994). Se observó un incremento notable en la densidad de las FC durante el curso de la embriogénesis de mamíferos (Fakan y Odartchenko, 1980), con fibras recién formadas que rodean a la periferia de la cromatina compacta donde se lleva a cabo la síntesis del hnRNA en el embrión. Otros trabajos mostraron el decremento de las FC utilizando inhibidores de la síntesis de mRNA análogos de adenosina como la diaminoribofuranosilbencimidazol (RDB). Experimentos autorradiográficos de alta resolución mostraron marcado rápido de ARN asociado con FC en la cromatina activa aislada (Bachelierie y col., 1975). Así como en cultivo primario de hepatocitos, ambos bajo condiciones normales, y después de la suspensión de suero se propicia un decremento en las FC reapareciendo concomitantemente con la síntesis de hnRNA en la periferia de la cromatina compacta después del estímulo con el tratamiento de cortisol. Fakan (1994) concluye que las FC *in situ* son las estructuras que representan los nacientes RNP extranucleolares y los sitios más probables de splicing del pre-mRNA. Desde que fueron descritas por Monneron y Bernhard, ellos sugirieron una relación de las FC con la síntesis de ARN extranucleolar.

Gránulos Intercromatinianos (GIC).

Los GIC son componentes nucleoplásmicos que se observan como cúmulos de partículas irregulares localizados en el espacio intercromatiniano de todas las células animales, tienen un diámetro promedio de 20 a 25 nm y están unidos entre sí por fibras de 9-10 nm (Puvion y Moyne, 1981). Estos cúmulos fueron descritos por Swift en 1963 con tinción convencional para microscopía electrónica de acetato de uranilo-citrato de plomo. Monneron y Bernhard en 1969 sugieren su naturaleza ribonucleoproteica. Los cúmulos de GIC presentan importantes funciones en el metabolismo del pre-mRNA, son débilmente marcados con uridina [H^3], contienen pequeñas cantidades de hnRNP, no son considerados como los mejores sitios de transcripción e hibridaciones *in situ*, con poli (dT) revelaron una débil señal en algunos cúmulos sugiriendo la presencia de poli (A)*RNA. Los GIC muestran gran acumulación de todos los factores de splicing que han sido reportados tales como antígenos

snRNP y la proteína SC-35, así como U1 y U2 snRNA. Observaciones por microscopía electrónica en células débilmente marcadas con uridina tritiada e inmunomarcadas para los antígenos de snRNPs, los sitios de síntesis extranucleolar no coinciden con las áreas nucleares enriquecidas con snRNP las cuales corresponden a los cúmulos de GIC. La reacción de anticuerpos anti-snRNP con GIC puede ser la fuente del patrón moteado "speckles" que corresponden a dos componentes ribonucleoproteicos: FC y GIC comúnmente observados en estudios de inmunofluorescencia, lo que demuestra la presencia de factores de splicing (snRNP y SC35) en estas estructuras y la relación que tienen con la maduración del pre-mRNA. El término "speckles" es usado específicamente para denotar a los GIC relacionándolos a cúmulos de snRNP y no a los que abarcan patrones punteados que incluyen difusas marcas nucleoplásmicas y cuerpos espiralados (Lamond y Earnshaw, 1998).

Los GIC speckles son estructuras nucleares genuinas que pueden ser visualizadas directamente en el microscopio electrónico. Las speckles se dispersan cuando las células entran en mitosis pero los snRNPs y los factores proteicos de splicing se rehacen como estructuras semejantes a speckles durante la telofase, antes de ser importados a células hijas (Spector y Smith, 1986). Así, las speckles del snRNP pueden observarse en la ausencia de ADN y transcripción. El RNAm transcrito de algunos genes es enriquecido cerca de speckles sugiriendo un posible papel en la transcripción o maduración del ARNm. Sin embargo las speckles no son los mejores sitios de transcripción. Las speckles no incorporan uridina tritiada o trifosfato de bromouridina durante experimentos de pulso de marcado y faltan de ADN perceptible, pero contienen poli(A)⁺ RNA perceptible con poli(dT) o sondas poli(U) oligonucleotidas (Carter y col., 1991). En los núcleos de plantas los GIC están comúnmente dispersos pero pueden formar cúmulos (Vázquez-Nin y col., 1986). Los GIC dispersos son similares a los encontrados en células animales, los cuales se han observado en Psilofita y Antofita; monocotiledóneas y dicotiledóneas (Jiménez-García y col., 1989b). En núcleo de células del parénquima de *C. pentadactylon*, los GIC están acumulados en pequeños grupos e intermezclados con delgadas fibras que contienen RNP, ellos son marcados por mAb K121, mostrando que los GIC de plantas no-sólo son morfológicamente similares a los de células animales, sino que también contienen snRNA. En núcleos con cromatina reticulada

y no reticulada su organización ultraestructural y funcional es muy similar en ambos tipos y homóloga en núcleos de células animales, excepto en la distribución topológica de los GIC que no forman grandes cúmulos en plantas difiriendo de los núcleos de células animales (Fakan y Puvion, 1980; Medina y col., 1989).

Además los GIC se han encontrado en los núcleos no reticulados de las células meristematicas del tomate. Un estudio realizado para observar la distribución de RNP nucleares fue hecho en secciones delgadas de tejido hepático de ratón y rata incluidas en Lowicryl K4M, usando preadsorción de anticuerpos e incubación con oro coloidal para la proteína A, anticuerpo anti snRNP determinantes de las especies nucleoplásmicas snRNP que contienen U1, U2, U4, U5 y U6 RNAs y anti Sm humano. Se determinó que ambos anticuerpos marcan los cúmulos de GIC. Encontrar snRNPs (U1, U2, U4, U5 y U6) dentro de cúmulos de GIC sugiere un papel en el almacenamiento. Aunque el marcado con uridina [^3H] fue bajo en cúmulos de GIC (Fakan y Bernhard, 1973). Puvion y Puvion-Dutilleul (1996) proponen que los cúmulos de GIC así como los cuerpos espiralados pueden estar involucrados en eventos pre y/o post-splicing tales como la maduración final del snRNP y el ensamble del spliceosoma. También encontraron que los GIC están asociados con estructuras fibrilares de tamaño y forma variable que pueden llamarse "zonas asociadas a los gránulos pericromatinianos", su sensibilidad a la digestión con proteasas y sobre todo al hecho que ellos contienen U1, pero no U2 snRNA. Puvion y Puvion-Dutilleul en 1996, sugieren que estas zonas pueden corresponder a sitios de maduración final y/o almacenaje de partículas U1 snRNP antes de su ensamble al spliceosoma maduro. Los GIC contienen proteínas fosforiladas y ARN (Buchwalow y Unger, 1977; Wasseff, 1979). Son componentes insolubles del núcleo ya que no se extraen con tratamientos de una sola enzima (RNAsa o pronasa) pero si se manejan tratamientos sucesivos con RNAsa y pronasa, se observa una reducción considerable en la cantidad y tamaño de los gránulos (Monneron y Bernhard, 1969) y aparecen en preparaciones de matrices nucleares sin cambio en su morfología (Berezney y Coffey, 1977). Algunos investigadores propusieron que los GIC representaban ribosomas nucleares en proceso de formación durante su transferencia del núcleo al citoplasma, otros en cambio consideran que podrían contener la subunidad 28s. Subsecuentemente los GIC sólo son el

componente nucleoplasmático reconocido claramente dentro de la llamada red de "la matriz nuclear interna" (Berezney y Coffey, 1977; Miller y col., 1978).

Gránulos pericromatinianos (GPC).

La fina estructura de los constituyentes ribonucleoprotéicos nucleares fue claramente definida por Monneron y Bernhard en 1969 y después analizados en detalle por diferentes métodos para conocer su morfología, citoquímica, bioquímica y fisiología. Los gránulos pericromatinianos (GPC) son estructuras ribonucleoprotéicas nucleares descritos por primera vez en núcleos de mamífero por Watson en 1962, quien los detalló como cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro rodeados por una halo claro de 25 nm, estas estructuras generalmente se localizan en el borde de la cromatina compacta (Monneron y Bernhard, 1969) y menos frecuentes en los espacios intercromatinianos en núcleos moderadamente descompactados, pero si la dispersión es más extensa esos gránulos no son identificados. Con las técnicas habituales de microscopía electrónica se observa un centro denso a los electrones formado por fibras de 1 y 3 nm de grosor, enrolladas irregularmente y embebidas en una matriz difusa. Los GPC no son atacados por la DNAsa y resisten la digestión con RNAsa, pero la extracción secuencial con pronasa y RNAsa decrece su contraste o los destruye completamente (Monneron y Bernhard, 1969), lo que sugiere su composición de RNP, ARN y no de ADN. Se piensa que los GPC son un transporte y/o forman parte del almacenaje de ARN mensajeros. Muchos estudios se han realizado en plantas, animales, hongos y protistas para determinar el significado citofisiológico de los GPC, los cuales constituyen parte de los núcleos de estas células con algunas variantes. Vázquez-Nin y col. (1991) hicieron estudios en tejidos uterinos de ratas normales en estro y con ratas ovariectomizadas a las cuales, inyectaron una solución salina y estradiol 17 β a diferentes tiempos, para localizar y cuantificar los cambios del receptor estradiol usando métodos de inmunolocalización con oro por microscopía electrónica, anticuerpos policlonales contra una secuencia de aminoácidos que se une al ADN y un anticuerpo monoclonal contra hnRNP y un anticuerpo anti ADN. Concluyeron que las partículas de oro no coincidieron con los numerosos gránulos pericromatinianos presentes en los tres tipos (endometrio: epitelio

superficial y fibroblasto; y músculo del miometrio) en las células estudiadas (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976). Trabajos realizados por Vázquez-Nin y col. (1989, 1994) en núcleo descondensado de células del sistema nervioso central de rata, usando microscopía inmunoelectrónica; anticuerpos para hnRNP, snRNP y ADN observaron que los gránulos pericromatinianos parcialmente descondensados son raramente marcados con anticuerpos anti snRNA o snRNA; el 60% están marcados en su periferia con anti-hnRNP y el 14% muestra granos de oro en la periferia y en su interior. El anticuerpo monoclonal anti-Sm ocasionalmente los marca pero cuando esto ocurre, los granos de oro son localizados en su periferia, las polipartículas marcadas son continuas con la estructura fibrilar interna de los GPC. Los GPC siguiendo su dispersión *in situ* son frecuentemente más marcados con anticuerpos anti-hnRNP que con anticuerpos anti-snRNP sugiriendo que estos componentes nucleares pueden contener spliced pre-mRNA. Por medio de estudios morfológicos y morfométricos, usando métodos de separación de la cromatina demostraron que algunos gránulos resisten a la dispersión, localizándose no al azar en las fibras de hnRNP nacientes. Algunos gránulos se asocian a la base de los bucles (loops) en regiones de la unidad transcripcional donde existe una reducción de las fibras de RNP. Todo esto sugiere que los gránulos más estables están relacionados con el corte (splicing) el cual ocurre cotranscripcionalmente. Las células no tratadas con los anticuerpos anti U-snRNP no marcan los GPC, excepto ocasionalmente en su periferia. Los gránulos de Balbiani presentes en los núcleos con cromosomas politénicos de las células de las glándulas salivales de *Chironomus thummi* son el equivalente de los gránulos pericromatinianos (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971) éste es un buen modelo para su estudio debido a la abundancia en los núcleos de los anillos de Balbiani. Experimentos sobre la distribución de los snRNPs en los núcleos de las glándulas salivales de *Chironomus thummi* sugieren que los GPC contienen ARN mensajero maduro (mARN) libre de intrones (Vázquez-Nin y col. 1990, 1999). Otros estudios como la inmunolocalización de las proteínas U1snRNP y epitopes Sn demostró que los gránulos del anillo de Balbiani que exhiben morfología y características citoquímicos similares a los GPC se marcan solo cuando se encuentran cerca o dentro de regiones transcripcionalmente activas (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996). En diversos estudios se han observado

variaciones en el número de GPC cuando ocurren diferentes modificaciones del metabolismo celular (Daskal Y. 1981; Fakan y Puvion, 1980; Vázquez-Nin y col. 1979, 1983). Vázquez-Nin y col. (1979) y Echeverría y col. (1980) analizaron y establecieron la función de los GPC. Los estudios realizados por el primer grupo de investigadores establece el efecto del estradiol en las estructuras ribonucleoproteicas en los núcleos de las células en cultivo del epitelio endometrial y el segundo estudió el cambio durante el ciclo estral en los núcleos de las células endometriales de la rata. Los resultados obtenidos para los GPC en el primer trabajo fueron observados en células endometriales en cultivo de ratas ovariectomizadas las cuales se colocaron en un medio sin estradiol y posteriormente en un medio con estradiol 17β , después el cultivo fue fijado de 5 a 60 min. Se realizó una autoradiografía en las células marcadas con 5-H-uridina, después de tres meses el autoradiograma fue tratado con y sin oro y después fue contrastado con EDTA. El efecto del estradiol es notablemente rápido ya que los GPC disminuyen después de 15 minutos de la incorporación de la hormona, el número por unidad de área es de 51%, 30 minutos después es de 39%, todavía bajo comparado con el testigo, incrementándose nuevamente después de una hora al 68%. Respecto al segundo trabajo se empleó el cortisol para estimular la transcripción en hepatocitos tanto *in vivo* como *in vitro*, también fue estudiado el efecto del estradiol en los eventos transcripcionales y postrcripcionales en células del epitelio endometrial. Se seleccionaron adultos jóvenes de ratas con ciclos típicos de 4 días, se fijaron bajo anestesia por perfusión a través del ventrículo izquierdo, las muestras de hígado y epitelio fueron embebidas en Epon o glicol metacrilato sin posfijación y contrastadas con uranilo-EDTA-plomo. Demostrando que la frecuencia de GPC es mínima en proestro y se incrementa durante la disminución de los niveles de estrógeno en plasma, estos resultados están de acuerdo con observaciones previas demostrando que el volumen nucleolar se incrementa, el estradiol induce el aumento de transcripción y la cantidad de GPC se incrementa cuando la concentración de estradiol es baja y decrecen rápidamente cuando suben los niveles de hormona (Vázquez-Nin y col. 1978). En trabajos realizados por Jiménez-García y col. (1989b), en los que estimaron las variaciones evolutivas de la estructura nuclear en animales, plantas, hongos y protistas con microscopía electrónica y marcado preferencial de ribonucleoproteínas; especímenes de los

diferentes reinos fueron seleccionados para estudiar el núcleo interfásico de sus células. Se mostró que en animales no hay diferencias significativas en el diámetro de los GPC entre los phyla estudiados. El tamaño de los GPC en plantas es variable, GPC grandes fueron encontrados en células grandes, a menudo se presentan en pares, son abundantes en algunas Pteridofitas y en una dicotiledónea (*Taraxacum officinale*). En *Psilotum*, hay gránulos dentro de grupos de cromatina compacta que parecen GPC en su diámetro, en su halo claro y en su reacción a tratamientos de uranilo-EDTA-plomo. Los GPC frecuentemente localizados en hongos están rodeados por halo claro son similares a los de plantas y animales. En protistas se observan gránulos esféricos rodeados por un halo claro de tamaño y forma diferente a los GPC de plantas y animales, no están restringidos al espacio adyacente de la cromatina compacta, en *Euglena gracilis* no existen GPC o partículas similares (Moyne y col. 1975). En *Volvox*, los GPC son esféricos rodeados por un halo claro, dispersos en el espacio nuclear sin tendencia para acumularse en los límites de la cromatina compacta, pero son abundantes en la periferia del núcleo.

4.3 Biología Celular de *Lacandonia schismatica*

Jiménez-García y col. en 1998, describieron por primera vez la biología celular de *L. schismatica* (Figura 4) observando la presencia de un núcleo voluminoso con cromatina reticulada asociada a gránulos ribonucleoproteicos abundantes, dos nucléolos, vacuolas grandes, capa delgada de citoplasma que recorre la pared celular y rodea al núcleo, mitocondrias alargadas o redondas (ADN mitocondrial y ribosomas

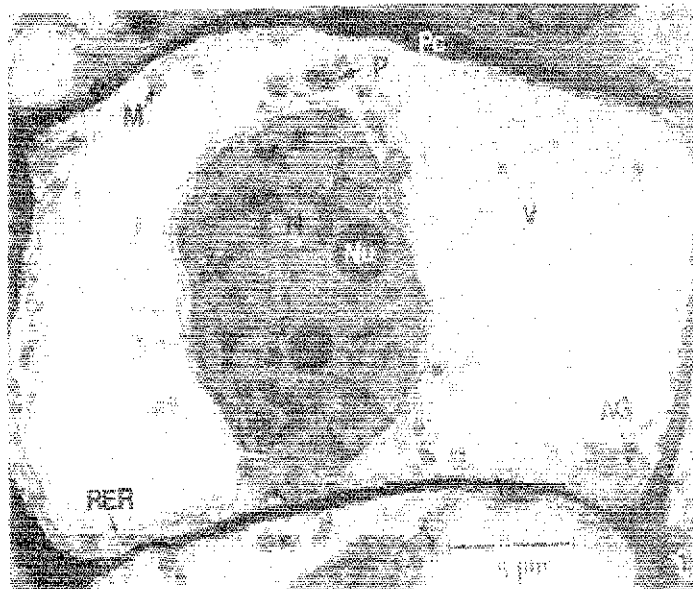


Figura 4. Micrografía electrónica de una célula de los tegumentos de *L. schismatica*. A bajos aumentos se observa la presencia de un núcleo reticulado grande (N) que generalmente presenta dos nucléolos (Nu) y cuerpos anulares (flecha). En el citoplasma predomina una o dos vacuolas grandes (V), mitocondrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER), plastos (P) y aparatos de Golgi pequeños (AG) (Jiménez-García y col 1998)

intramitocondriales o mitoribosomas), 1 a 3 ó 4 o más Aparatos de Golgi asociados a gran número de vesículas con 3 a 7 cisternas, retículo endoplásmico rugoso conspicuo, ribosomas libres o asociados a membranas de 13 a 15 nm de diámetro, plastos sin tilacoides con apariencia de reloj de arena o audífonos con inclusiones osmiofílicas y ausencia de actividad fotosintética.

4.4 Núcleo interfásico de *Lacandonia schismatica*

La estructura del núcleo interfásico de *L. schismatica* es de tipo reticulado. En él se advierten diferentes estructuras características de muchas especies de plantas, animales y hongos como son la lamina nuclear, la envoltura nuclear externa e interna, grandes cúmulos de gránulos de 30 nm de diámetro de naturaleza ribonucleoproteica, no descritos previamente entre los eucariontes (Jiménez García y col. 1992), que ocupan el espacio intercromatiniano y pericromatiniano, las fibras pericromatinianas cuya presencia es universal (Jiménez-García y col. 1989a), núcleos compactos, cuerpos nucleolares, centrómeros en el retículo de cromatina y cuerpos espiralados. Sin embargo rara vez los gránulos pericromatinianos son vistos en este núcleo y los gránulos intercromatinianos típicos no se observan en esta especie. Los gránulos de *Lacandonia* descritos por primera vez en esta planta son abundantes en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano de los núcleos de esta especie, los cuales son una característica exclusiva de los miembros del orden Triuridales que no han sido reconocidos antes en ninguna otra especie animal ni vegetal (Jiménez-García y col. 1992). También en los núcleos de esta especie es común encontrar estructuras tipo complejo sinaptonémico y anulares (presentes en otras especies saprófitas). Al ser teñidos los núcleos de *L. schismatica* con azul de toluidina, la cromatina se muestra como un retículo en el nucleoplasma, el cual al teñirse con la reacción de Feulgen específica para ADN, demuestra que los núcleos de esta especie son reticulados. Observaciones al microscopio electrónico de transmisión de preparaciones contrastadas con acetato de uranilo-citrato de plomo y empleando la técnica de ácido fosfotungstico preferencial para ADN lo corroboran. Aunque filamentos de cromatina son vistos emerger del borde de la heterocromatina, ellas están ausentes en las regiones donde los cúmulos de

gránulos RNP son vistos. Pedazos de cromatina intranucleolar también son comúnmente advertidos en esta especie, cromatina semicompacta en conformación mas relajada se extienden como hebras delgadas hacia la región pericromatiniana, generando grandes cadenas en el espacio intercromatiniano (Jiménez-García y col., 1992). Los centrómeros se observan frecuentemente a lo largo de la cromatina compacta en estrecha asociación con los nucleolos, integrando zonas de mayor o menor densidad electrónica, siendo similares a los de otras plantas.

En los núcleos de *L. schismatica* hay usualmente dos nucleolos esféricos y compactos que muestran componentes característicos de los nucleolos típicos, tales como: los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, el componente granular y los centros fibrilares heterogéneos (Risueño y Medina, 1986). Los nucleolos se han observado asociados a centrómeros y pueden estar agrupados a cariosomas, estos últimos son cuerpos nucleares laxos y esféricos (Agredano-Moreno, 1996). Las fibras pericromatinianas son RNP que contienen las estructuras compuestas de hnRNA recién sintetizados y las proteínas relacionadas (Bachellrie y col. 1975; Fakan y col. 1976), se localizan en el borde de la heterocromatina en estrecha asociación con los gránulos de *Lacandonia* formando un arreglo fibrogranular. Son componentes nucleares EDTA positivas (Monneron y Benhard, 1969) lo que indica su naturaleza ribonucleoproteica. Estas estructuras son la contraparte del evento transcripción y del principio del evento postranscripcional, fenómeno relacionado con la primera manifestación del fenotipo, que puede ser un proceso universal presente en todos los eucariontes (Jiménez-García y col. 1992).

Los gránulos pericromatinianos (GPC) rara vez son observados y los gránulos intercromatinianos (GIC) típicos no han sido descritos en *L. schismatica* (Jiménez-García y col. 1992).

4.4.1 Gránulos de *Lacandonia* (GL)

Los gránulos de *Lacandonia* fueron descritos por Jiménez-García y col. en 1992 como estructuras ribonucleoproteicas (positivos a la técnica de EDTA) intranucleares de 32 nm de diámetro, localizados en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano, entremezclados

con las fibras intercromatinianas y pericromatinianas. Por su contenido molecular y su estructura son similares a los gránulos pericromatinianos (GPCs) y a los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y col. 1994), que son RNPs de los núcleos de células de mamíferos y células de las glándulas salivales de insectos (cromosomas politénicos de *Chironomus thummi*) (Vázquez-Nin y Bernhard 1971, Vázquez-Nin y col. 1990), respectivamente. Se propone que contienen mRNA. A diferencia de los gránulos pericromatinianos no presentan el halo claro característico de estos últimos (Jiménez-García y col. 1992). Son muy abundantes durante el desarrollo floral, contienen proteínas SR, relacionadas con la maduración del mRNA (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000). Se piensa que ellos participan en el metabolismo del mRNA en el núcleo.

A diferencia de los gránulos intercromatinianos de plantas, en donde se encuentran dispersos, los gránulos de *Lacandonia* forman cúmulos. Además los estudios citoquímicos e inmunocitoquímicos indican que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras diferentes a los GIC debido a las siguientes características: a) son bismuto negativas, b) no contienen snRNPs, c) son relativamente sensibles a la digestión con RNAsa pero muy sensibles al pretratamiento con pronasa seguido de la extracción con RNAsa y d) tienen un tamaño intermedio y una distribución espacial entre gránulos intercromatinianos y pericromatinianos de núcleos de células de mamíferos. Estas características indican la similitud entre los gránulos de *Lacandonia*, los GPC y los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y col., 1994).

4.5 Ciclo celular

En 1839, Schleiden y Schwann propusieron la Teoría Celular estableciendo que cada organismo se componía de una o más células y que cada nueva célula sólo podía provenir de la división de alguna célula preexistente. Desde el comienzo del siglo XX se sabe que en cada célula, los cromosomas portan la información genética. El conocimiento desde los años 1950 de que el material genético es el ADN y la elucidación de su estructura, llevó a preguntarse acerca de su replicación. Hacia 1970 se conocía la composición básica de las células y entonces comenzaron a abordarse interrogantes sobre los detalles moleculares de los

procesos individuales de la vida celular. Las células se reproducen duplicando, replicando y repartiendo sus componentes para constituir dos células hijas. El ciclo celular es el conjunto de procesos que van desde el momento en que la célula toma la decisión de dividirse hasta que origina dos células nuevas (Murray y Hunt, 1993). Es por tanto la base de la proliferación celular. Se ha tomado como modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para elucidar los conocimientos que se tienen en cuanto a la regulación de la replicación en las células eucariontes (Schwob y Nasmyth, 1993). Aunque los detalles de cada ciclo celular eucarionte varían entre los organismos, los puntos esenciales son comunes. En un ciclo celular general, para producir dos células hijas idénticas, el ADN se replica, se segrega y finalmente la célula original se divide para dar lugar a dos células nuevas independientes, cada una con una dotación genética idéntica a la de su hermana. Los ciclos celulares de la mayoría de las células también comprenden procesos que conducen a la duplicación y división de su masa y sus organelos citoplasmáticos. Por lo tanto es una combinación compleja de procesos citoplasmáticos y nucleares coordinados entre sí (Dutta y Bell, 1997).

Debido al conocimiento alcanzado en los últimos años la organización del ciclo celular se ha esclarecido (Figura 5). Anteriormente los científicos, utilizando únicamente el microscopio óptico dividieron el ciclo celular en dos periodos. Uno, de elevada actividad de reorganización y movimiento de los

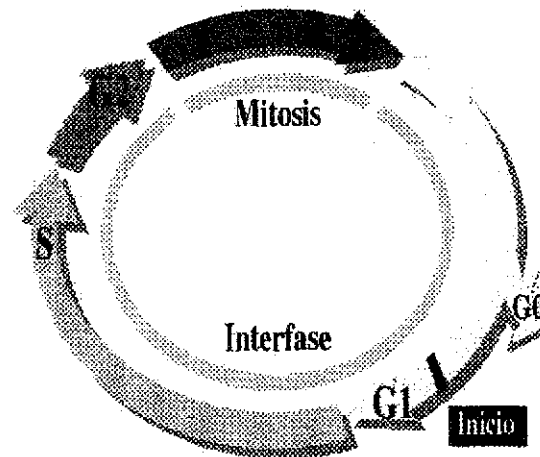


Figura 5. Organización del ciclo celular

componentes subcelulares, denominado mitosis, en el que los cromosomas se condensan haciéndose visibles al microscopio óptico y que finaliza con los procesos de segregación y división celular. Y un segundo que comprende la mayor parte del ciclo celular, denominado interfase por transcurrir entre dos mitosis y en el que al microscopio óptico no se observa proceso activo alguno salvo el incremento en el tamaño celular. Ahora sabemos que la interfase no es un periodo de reposo sino que de gran actividad, durante el cual se llevan a

cabo en una secuencia ordenada, complicados y elaborados preparativos para la división celular. Efectivamente, durante la interfase y de forma continua tienen lugar acontecimientos conocidos en su globalidad como crecimiento y que incluyen la síntesis de nuevos orgánulos celulares y la mayor parte de las proteínas celulares. Además, comprende procesos (Figura 5) que ocurren de forma discontinua, como la replicación del ADN durante el periodo conocido como fase S -de Síntesis-. El intervalo que transcurre entre el final de la mitosis del ciclo anterior y el comienzo de la síntesis de ADN se conoce como fase G1 del inglés *Gap* (G="gap", intervalo) y el intervalo entre el fin de la fase S y la mitosis, fase G2. Las fases G1 y G2 proporcionan tiempo adicional para el crecimiento. Durante G1 la célula considera si las condiciones ambientales son adecuadas para comenzar el proceso irreversible de la división celular, siempre que cuente con el tamaño mínimo para ello. En el caso de que la situación sea favorable, toma la decisión de atravesar el punto de Inicio (*Start*) que compromete irreversiblemente el comienzo del ciclo celular. Si las condiciones ambientales no son adecuadas para la entrada en el ciclo, la célula permanece en un periodo de quiescencia, denominado G0, en el que puede permanecer largo tiempo. Además, desde este estadio de G0 la célula es sensible a señales de diferenciación, en el caso de organismos pluricelulares, o de inicio de procesos sexuales, en el caso de organismos unicelulares. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, la célula puede volver a iniciar ciclos de división. En la fase G2 la célula analiza si ha completado correctamente la fase S y decide entre permitir el paso a mitosis, o en su caso, esperar para que se realicen las reparaciones necesarias (Stein y col. 1998). La mayor parte de los estudios del ciclo celular en eucariontes se han llevado a cabo empleando como modelo las levaduras *S. cerevisiae* conocida como la levadura del pan, de la cerveza y levadura de gemación por su característico estilo de división. Son organismos muy adecuados por que tienen tiempos de generación cortos (90 minutos comparado con las 24 horas que dura el ciclo de las células animales) y su genoma es aproximadamente 100 veces menos complejo que el de una célula de mamífero, pero mantiene el mismo tipo de organización del ciclo celular que los eucariontes multicelulares. Este organismo es fácil de manipular genéticamente, siendo posible aislar mutaciones en genes que controlan procesos celulares básicos, clonar los genes

idénticos por esas mutaciones y realizar delecciones de genes específicos, cabe mencionar que actualmente se conocen los aproximadamente 16 millones de pares de nucleótidos que constituyen la secuencia completa de su genoma. El conocimiento actual del ciclo celular en levaduras viene de la búsqueda sistemática de mutaciones en genes que codifican para componentes de la maquinaria del ciclo celular realizada por Hartwell y col. en 1970 en *Saccharomyces cerevisiae* y Nurse y col. en *Schizosaccharomyces pombe* conocida también como levadura de fisión- en 1976. Basándose en que la división celular es esencial para la proliferación de estos organismos, aislaron mutaciones que afectan al ciclo celular como mutaciones condicionales: inactivan un producto génico en unas condiciones pero no en otras. Las más comunes son las mutaciones termosensibles en las que el producto del gen mutado funciona de modo normal a una temperatura, la temperatura permitida, pero no a otra, llamada restrictiva. En la mayoría de los casos, las mutaciones termosensibles son permisivas a 20-25°C y restrictivas a 35-37°C. De entre todos los mutantes termosensibles obtenidos se seleccionaron aquellos que afectaban a un gen del control del ciclo celular y que se diferenciaban del resto porque todas las células de una población que portan esa mutación se paran en el mismo punto del ciclo celular cuando se incuban a la temperatura restrictiva. A estas mutaciones, y por extrapolación a los genes a los que afectan se les llama *cdc* -Ciclo de División Celular-. Estos estudios han permitido identificar una familia de proteínas quinasas dependientes de ciclina, -*Cyclin Dependent Kinases, Cdk*- que incluyen a *Cdc28* de *S. cerevisiae*, y a su homólogo en *S. pombe* *cdc2*, las cuales tienen un papel central en los procesos claves del ciclo celular: la entrada en ciclo, la síntesis de ADN y la regulación de la mitosis (Figura 6). Estas quinasas son las subunidades catalíticas de un complejo que incluye también una subunidad reguladora, denominada ciclina, necesaria para la función del complejo al determinar la localización o la especificidad de sustrato de la cinasa. Esta asociación de subunidad catalítica y reguladora define las funciones de la cinasa a lo largo del ciclo (King y col. 1996). En *S. cerevisiae* existen al menos 9 ciclinas que se asocian a *Cdc28*. Por su estructura se dividen en dos familias: ciclinas *Cln* -de Ciclina - que incluyen a *Cln1*, *Cln2* y *Cln3*, que se necesitan para el paso de la célula por el punto de Inicio presente en *G1*, y las ciclinas *Clb* - de Ciclina tipo b - que incluyen a las seis restantes, *Clb1*-

la capacidad de las células haploides de pararse en G1 como respuesta a las feromonas sexuales, lo que proporciona el carácter de irreversibilidad a la entrada en el ciclo celular. Los complejos Cdc28/Ciclinas Clb activan el inicio de la replicación, regulan la formación de los husos mitóticos y la división nuclear y el crecimiento isométrico de la yema en G2 y M. En los últimos años se han encontrado también homólogos a estas cinasas en todos los eucariontes en los que se han buscado, y que incluyen desde el nematodo *Caenorhabditis elegans*, a la mosca *Drosophila melanogaster*, a mamíferos como el ratón y el hombre y plantas como *Arabidopsis thaliana*, indicando que el sistema de control del ciclo celular es general en todos los eucariontes y validando a las levaduras como modelos de estudio (Dahmann y col., 1995).

Existen dispositivos bioquímicos dentro del sistema de control central que ponen en marcha un proceso que inicia la fase S. ¿Cómo se inicia? Diversos estudios sobre los mecanismos de replicación del material genético y de su regulación han ido aportando conocimientos sobre la descripción de diversos factores necesarios para su inicio y control. El Modelo del Replicón, propuesto para la bacteria *Escherichia coli* -*E. coli*- (Jacob y col., 1963) advierte a existencia de secuencias de ADN desde donde se inicia la replicación. Posteriormente estas secuencias fueron identificadas en *S. cerevisiae* y son conocidas como Secuencias de Replicación Autónoma (SRA), las cuales coinciden con los orígenes de replicación. Los cromosomas de eucariontes son muy largos para ser replicados a partir de un solo punto como ocurre en procariontes, por lo que tienen varios orígenes de replicación. Los trabajos de Bell y col. en 1993 describieron el Complejo de Reconocimiento del Origen (CRO) que es un complejo de 6 proteínas que reconocen los orígenes de replicación. Aunque estas proteínas son necesarias y esenciales para la viabilidad celular, no son suficientes, para iniciar la replicación del ADN. Otras proteínas iniciadoras se han ido descubriendo gradualmente, del tipo de Cdc6 (Sánchez y col., 1999), las seis de la familia Mcm, la cinasa Cdc7 - y su ciclina Dbf4 - y Cdc45. Sin embargo las proteínas CRO permanecen unidas a los orígenes de replicación durante todo el ciclo celular, pero el resto de las proteínas iniciadoras constituyen o no parte del complejo dependiendo de la fase del ciclo, definiendo así un estado post-replicativo del origen presente durante las fases S, G2 y M (sólo

permanecen unidas a los orígenes las proteínas CRO) y un estado pre-replicativo durante G1 (con el resto de las proteínas iniciadoras formando parte del complejo). El inicio de la replicación del material genético marca la transición entre el estado de complejo pre-replicativo (pre-RC) a complejo post-replicativo (post-RC).

4.5.1 Mitosis

El nombre mitosis se empleó por primera vez en el decenio de 1870 para describir los cromosomas filiformes que se observan en la célula antes de dividirse en dos. Es un proceso de división nuclear en donde el citoesqueleto tiene un papel fundamental en la cual los cromosomas replicados se separan físicamente con gran precisión formando dos nuevos núcleos, cada uno adquiere un número y una copia fiel de cromosomas idénticos al de sus progenitores, y en la citocinesis durante la partición de una célula en dos. Ambos procesos son llevados a cabo por elementos del citoesqueleto, existiendo diferencias importantes entre células animales y de plantas (Raven y col., 2000). Esta división celular implica el reparto equitativo de los materiales celulares entre las dos células hijas. Por tanto, la mitosis es un mecanismo que permite a la célula distribuir en las mismas cantidades los materiales duplicados y replicados durante la interfase y se acompaña de la citocinesis. Por lo tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para crecimiento, conservación y reparación de un organismo. Más que en cualquier otra etapa del ciclo celular, la mitosis es el momento donde la célula dedica toda su energía para separar a los cromosomas replicados. Dando como resultado, la reducción de la mayor parte de las actividades metabólicas de la célula, incluyendo la transcripción y la traducción, así como la respuesta de la célula a los estímulos externos. Las célula vegetal no sufre cambios dramáticos de forma durante los procesos de mitosis y citocinesis. En la interfase existen arreglos de los microtúbulos y los microfilamentos que participan en la orientación y expansión celular que se encuentran rodeando a la célula en la región cortical (adyacente a la membrana plasmática). También existe arreglo de los MT que radian del núcleo hacia el citoplasma y que participan junto con los MF en distintos fenómenos de motilidad celular intracitoplásmica. Las plantas no tienen centrosomas y tampoco centriolos, la estructura del

huso mitótico consiste de cientos de microtúbulos y de proteínas que se asocian a éstos (Segura, 2001).

La mitosis se divide en cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, cada una caracterizada por una serie particular de acontecimientos. Las cuales forman parte de un proceso continuo.

4.5.1.1 Profase

Los cromosomas replicados cada uno de ellos está constituido por dos cromátidas hermanas estrechamente relacionadas entre sí, se condensan y fuera del núcleo se empieza a formar el huso mitótico entre los dos centrosomas que se han replicado y separado (Alberts, 1999). En plantas los "husos mitóticos de la profase" se organizan y pasan alrededor del núcleo, los MT y los MF se juntan hasta formar "la banda de la preprofase". Esta banda marca el sitio donde ocurrirá la próxima división celular (Segura, 2001).

4.5.1.2 Prometafase

En células animales la envoltura nuclear se fragmenta a través de vesicularización de las membranas nucleares, se desensambla la lámina y el complejo del poro, permitiendo que los microtúbulos del huso se unan a los cromosomas mediante sus cinetocoros y experimentan un desplazamiento activo (Karp, 1996). En células vegetales desaparece la banda de la preprofase, la envoltura nuclear se rompe, maduran los cinetocoros de los cromosomas, los husos mitóticos capturan los cromosomas que se van hacia el huso del ecuador. Se empiezan a organizar husos mitóticos polares, que difieren en la organización de los husos mitóticos de los centrosomas en animales (Segura, 2001).

4.5.1.3 Metafase

Los cromosomas se alinean en el ecuador del huso, en la parte media entre los dos polos del huso. Los microtúbulos cinetocóricos emparejados de cada cromosoma se unen a los polos opuestos del huso (Alberts, 1994). En células vegetales se forma completamente el huso mitótico y la placa ecuatorial. Aparentemente constituidos por varios polos mitóticos que

corresponden con el número de cromosomas. Esto por el momento es una especulación, basada en las tinciones por inmunofluorescencia con antitubulina (Segura, 2001).

4.5.1.4 Anafase

El par de cromátidas se separan sincrónicamente, formando dos cromosomas hijos y cada uno de ellos es arrastrado lentamente hacia los polos opuestos del huso. El desplazamiento es el resultado de dos procesos independientes mediados por diferentes partes del huso mitótico. Estos procesos son las llamadas anafase A y anafase B y ocurren más o menos simultáneamente. En la anafase A los microtúbulos cinetocóricos se acortan por despolimerización, de forma que los cromosomas que están unidos a ellos se desplazan hacia los polos correspondientes. En la anafase B los propios polos del huso se separan uno del otro, contribuyendo todavía más a la segregación de los grupos de cromosomas (Karp, 1996).

4.5.1.5 Telofase

Los dos conjuntos de cromosomas hijos llegan a los polos del huso. Se reconstruye una nueva envoltura nuclear alrededor de cada conjunto completando la formación de dos núcleos, se descondensan los cromosomas marcando el final de la mitosis. La citocinesis en las células animales ocurre cuando, el citoplasma se divide en dos mediante un anillo contráctil de actina y miosina, el cual estrangula la célula originando dos células hijas idénticas, cada una de ellas con un núcleo. Los organelos citocinéticos en las plantas son el fragmoplasto integrado por microtúbulos de actina y la placa celular formada de la fusión de vesículas originarias del aparato de Golgi que viajan a través de los MT y que serán las membranas plasmáticas de las células hijas. Las vesículas contienen polisacáridos, precursores de celulosa y pectina, que se encuentran orientadas perpendicularmente para dar origen la pared celular (Segura, 2001). Por otra parte también se acumulan MF, miosina, MT y algunos tipos de cinesinas, como la TKRP125, que fue la primera proteína tipo cinesina aislada de fragmoplasto de tabaco. Posteriormente los MT corticales y los MF corticales regresan a su posición submembranal (Smith y Wood, 1998).

5 HIPÓTESIS

Si los gránulos de *Lacandonia* son importantes para el metabolismo del mRNA en las primeras etapas de actividad después de la división celular, entonces estas estructuras y su contenido serán heredadas de la célula madre a las células hijas y su distribución espacial se observará durante la mitosis.

6 OBJETIVOS

6.1 General

Conocer si los gránulos de *Lacandonia* se heredan de la célula madre a las células hijas.

6.2 Específico

Estudiar la distribución espacial de los gránulos de *Lacandonia* en las diferentes etapas de la mitosis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

5 HIPÓTESIS

Si los gránulos de *Lacandonia* son importantes para el metabolismo del mRNA en las primeras etapas de actividad después de la división celular, entonces estas estructuras y su contenido serán heredadas de la célula madre a las células hijas y su distribución espacial se observará durante la mitosis.

6 OBJETIVOS

6.1 General

Conocer si los gránulos de *Lacandonia* se heredan de la célula madre a las células hijas.

6.2 Específico

Estudiar la distribución espacial de los gránulos de *Lacandonia* en las diferentes etapas de la mitosis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

7 METODOLOGÍA

7.1 Descripción general de la zona de colecta

7.1.1 Reserva de la Biosfera Montes Azules

México es uno de los cinco países del mundo más ricos en biodiversidad desde ecosistemas hasta variedades genéticas, destacando la selva Lacandona la cual se localiza en el estado de Chiapas a 16°05'-17°45' N y 90°45'-91°45' W entre los ríos Usumacinta, las Perlas y Lacantún. Es una región que ocupa un área de 6000 Km² con una altitud entre 80-1750 m y reservas de 4122 Km² con altitud entre 80-1400 m. Aproximadamente una quinta parte de la Selva Lacandona comprende la reserva de la Biosfera Montes Azules localizada entre 16°06'-16°49' N y 90°30' W abarcando 3312 Km² (Figura 7) la que incluye la sección central-sur del bosque con las lagunas Ocotál, Lacanjá y Miramar (79Km²). Existe un área adyacente de 663 Km² al noreste que incluye la reserva de la Biosfera Lacantún (619 Km²) y el Monumento Cultural Bonampak (44 Km²). El 70% de la vegetación y la mayor parte de tipos de vegetación y climas se encuentra en la reserva de la Biosfera Montes Azules. El clima es cálido y húmedo, con temperatura anual arriba de los 22°C y en los meses más fríos promediando sobre 18°C. La precipitación media anual es por encima de 2500 mm, con un verano lluvioso que experimenta monzones. Se ha estimado que hay 4000 especies de plantas vasculares en la Selva Lacandona. Sin embargo a través de investigaciones realizadas en esta región la Universidad Nacional Autónoma de México ha logrado obtener nuevas colecciones aunque es urgente realizar estudios para reconocer especies amenazadas incluyendo las cicadas *Ceratozamia matudae*, *Dioon merolae* y *Zamia splendens*. De acuerdo con Rzedowski (1978), se han registrado en la reserva más de 500 especies de plantas vasculares. De ellas al menos 23 se encuentran bajo el riesgo de amenaza, endémicas o en peligro de extinción, entre las que destaca la *Lacandonia schismatica*, especie recientemente descrita cuyo descubrimiento motivó la creación de una nueva familia botánica. Los tipos de vegetación presentes en la reserva son:

Selva alta perennifolia, selva mediana perennifolia de canacoite (*Bravasia integerrima*, bosque de pino encino, bosque mesófilo de montaña, bosque ripario, jimbales, sabanas y

manchones con vegetación secundaria de la selva alta perennifolia donde se practica la agricultura nómada, sobre todo de maíz. También se encuentran formaciones topográficas elevadas donde se mezclan las diferentes comunidades vegetales, como la selva mediana subperennifolia, selva baja caducifolia, pinares encinares, sabanas y sibales (Miranda, 1952).

7.2 Técnica Experimental

7.2.1 Microscopía Óptica

El primer instrumento de detección con que cuenta el ser humano es su propio aparato visual. El ojo humano es un instrumento óptico muy complejo, con resolución de aproximadamente 0.1 mm (objetos separados por distancias menores no se pueden distinguir a simple vista). Si es necesario observar objetos con resolución menor a milímetros o hasta centésimas de milímetros se tiene que recurrir a instrumentos ópticos que nos ayuden. Por ejemplo un microscopio óptico es un instrumento que fue inventado en 1590 por Zacharias Janssen Y Hans y perfeccionado en 1674 por Antón Van Leewenhoek, que se sirve de la luz visible (la longitud de onda de la luz visible es en promedio 4000 Angstroms; $1\text{Å}=1\times 10^{-10}\text{m}$), para crear una imagen aumentada del objeto (Castillo-Hernández, 1999). Todo este descubrimiento y el desarrollo del mismo abrieron el paso al surgimiento de la citología.

El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden incrementar un objeto por encima de las 2.000 veces. Hay diversos microscopios ópticos para funciones especiales por ejemplo: microscopio estereoscópico, microscopio de luz ultravioleta, microscopio petrográfico o de polarización, microscopio en campo oscuro, microscopio de fase (microscopio de interferencia y el microscopio de interferencia diferencial), microscopio de campo cercano, entre otros.

7.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Dentro de los microscopios electrónicos tenemos el de barrido y el de transmisión. La ventaja de los microscopios electrónicos frente a los ópticos radica en que la longitud de onda del haz de luz es aproximadamente $1/200$, lo cual aumenta la resolución. En los microscopios electrónicos, la longitud de onda de los electrones depende del voltaje de aceleración, así que para un voltaje típico de 100 KV, es de 0.0038 nm (García-Bórquez, 1983).

En el microscopio electrónico de transmisión (MET), la óptica es muy similar al óptico pero se diferencia en que usa un haz de electrones en vez de un haz de luz visible. Los electrones acelerados atraviesan una muestra delgada por una de sus caras, dándonos una imagen formada por los electrones que emergen por la cara contraria. Las principales partes que lo constituyen son: a) la óptica electrónica, generalmente llamada "la columna" por ser habitualmente cilíndrica y vertical; b) el sistema de vacío que mantiene una presión muy baja en el interior de la columna; c) sistemas de enfriamiento; d) corrientes de alimentación y sus controles, y e) dispositivos de registro de la imagen (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

En la columna se llevan a cabo diferentes procesos para generar una imagen:

- Una fuente, un filamento de tungsteno calentado que emite electrones (cátodo)
- Un ánodo, hacia el cual son atraídos los electrones
- Una diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo, dando un voltaje de aceleración entre 20.000 y 200.000 voltios a los electrones, que crea el haz
- Los tres incisos anteriores forman el cañón electrónico, sin olvidar el alto voltaje formando la lente electrostática.
- Un haz de electrones que pasa por una serie de lentes electromagnéticas (electroimanes) que tienen las mismas funciones que las lentes de vidrio de un microscopio óptico. Los electrones recorren dentro del resto de la columna una trayectoria helicoidal

- El condensador forma el haz y modifica el diámetro del haz que incide en el plano del espécimen a irradiar.
- El haz que atraviesa la muestra se coloca en foco y se aumenta por medio de un objetivo y se incrementa aun más con una o más lentes proyectoras.
- La imagen final se visualiza sobre una pantalla fluorescente de sulfuro de zinc. Las porciones de la muestra que han sido atravesadas por los electrones aparecen brillantes, las porciones que absorbieron o esparcieron los electrones por su densidad inherente o debido al agregado de metales pesados durante la preparación del espécimen aparecen oscuras.
- Un sistema que graba o despliega las imágenes donde se coloca una placa fotográfica o un detector de video por encima o por debajo de la pantalla del visor, con la finalidad de obtener un registro permanente de la imagen sobre la pantalla.

La preparación de muestras se lleva a cabo en la misma forma que la del microscopio óptico pero requiere de métodos más finos. Sin embargo la restricción que tienen las preparaciones es que en cada paso se trabaja con especímenes de magnitud 3-4 órdenes menores o más finos que los utilizados para el microscopio óptico.

Debido a la gran resolución que tiene el MET, la calidad de la fijación, es decir el grado de preservación de la estructura subcelular debe ser la mejor posible.

La preparación de rutina de los especímenes para la microscopia electrónica de transmisión (MET), comienza con la fijación de piezas de tejido no mayores de 1 mm³ con glutaraldehído y/o formaldehído la cual conserva la estructura fina de las células (ultraestructura), seguida de un lavado con un amortiguador y de una postfijación con tetróxido de osmio. Estas sustancias se emplean disueltas en soluciones acuosas amortiguadoras isotónicas a pH 7.3. El aldehído reacciona con los ácidos nucleicos, los aminoácidos de las proteínas y en menor porción con los lípidos y glúcidos. Las soluciones amortiguadoras tienen la función de no producir fuerzas osmóticas a través de las membranas biológicas y evitar las alteraciones debidas a cambios bruscos de pH. La postfijación da más estabilidad a las preparaciones; las membranas se vuelven muy permeables, lo que impide los daños por cambios osmóticos durante los tratamientos

subsecuentes. Además el tetraóxido de osmio actúa como agente de contraste uniéndose a proteínas, ácidos nucleicos y principalmente a los lípidos polares de las membranas.

Una vez estabilizada la estructura y en menor medida la composición de las muestras, se debe quitar el agua por medio de la deshidratación que se realiza con líquidos que se mezclan con el agua celular y al aumentar su concentración la desplazan, hasta sustituirla totalmente. En general se emplea el etanol o la acetona a diferentes porcentajes. La deshidratación es una condición necesaria para que el material biológico sea penetrado por una sustancia que endurezca lo suficiente para obtener un corte delgado y translúcido al haz electrónico. Por lo que la muestra tiene que ser incluida, lo cual consiste en embeber la muestra en un monómero de alguna sustancia plástica (resinas epóxicas, poliéstericas o acrílicas) que pueda polimerizarse en condiciones compatibles con la conservación de las estructuras finas de las células y adquiera la dureza necesaria para ser cortadas en secciones entre 50 nm y 150 nm (0.50-0.15 μm) de espesor debido al limitado poder de penetración de los electrones, los cortes se realizan por medio de ultramicrotomos especialmente diseñados, que usan cuchillas de vidrio o de diamante (Bozzola y Russell, 1998). Estos cortes son muy finos para poder ser manipulados; por lo que se les hace flotar desde el filo de la cuchilla, en la superficie de una bandeja llena de líquido, se recuperan y generalmente se colocan en rejillas de malla de cobre de 3 mm de diámetro recubiertas por plástico. Estas rejillas tienen 50-400 orificios por pulgada o hendiduras especiales para cortes seriados. Para observar al MET los corte montados en las rejillas es necesario teñirlos o contrastarlos con compuestos químicos de elevado número atómico tales como iones de metales pesados, los cuales se unen a los tejidos durante la fijación o la deshidratación o al sumergir las rejillas con los cortes en soluciones de tales iones. El tetraóxido de osmio que se emplea de rutina en la fijación se une a los componentes fosfolipídicos de las membranas, lo cual agrega densidad a la membrana. A menudo se adiciona nitrato de uranilo a las soluciones alcohólicas usadas en la deshidratación, con el fin de añadir densidad a los componentes de las uniones celulares y a otros sitios. La inmersión secuencial en soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo se emplea rutinariamente para teñir los cortes. Estos compuestos se unen a las proteínas y a los

ácidos nucleicos de las células aun cuando estén incluidas en resinas epóxicas, poliéstericas o acrílicas. Por lo tanto los agentes colorantes o contrastantes deben penetrar por las mayas de polimerización del medio de inclusión sin reaccionar con él. Existen otros métodos especiales de preparación de la muestra para MET. Por ejemplo: congelación-fractura, histoquímica, inmunocitoquímica, autorradiografía, hibridación *in situ* (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

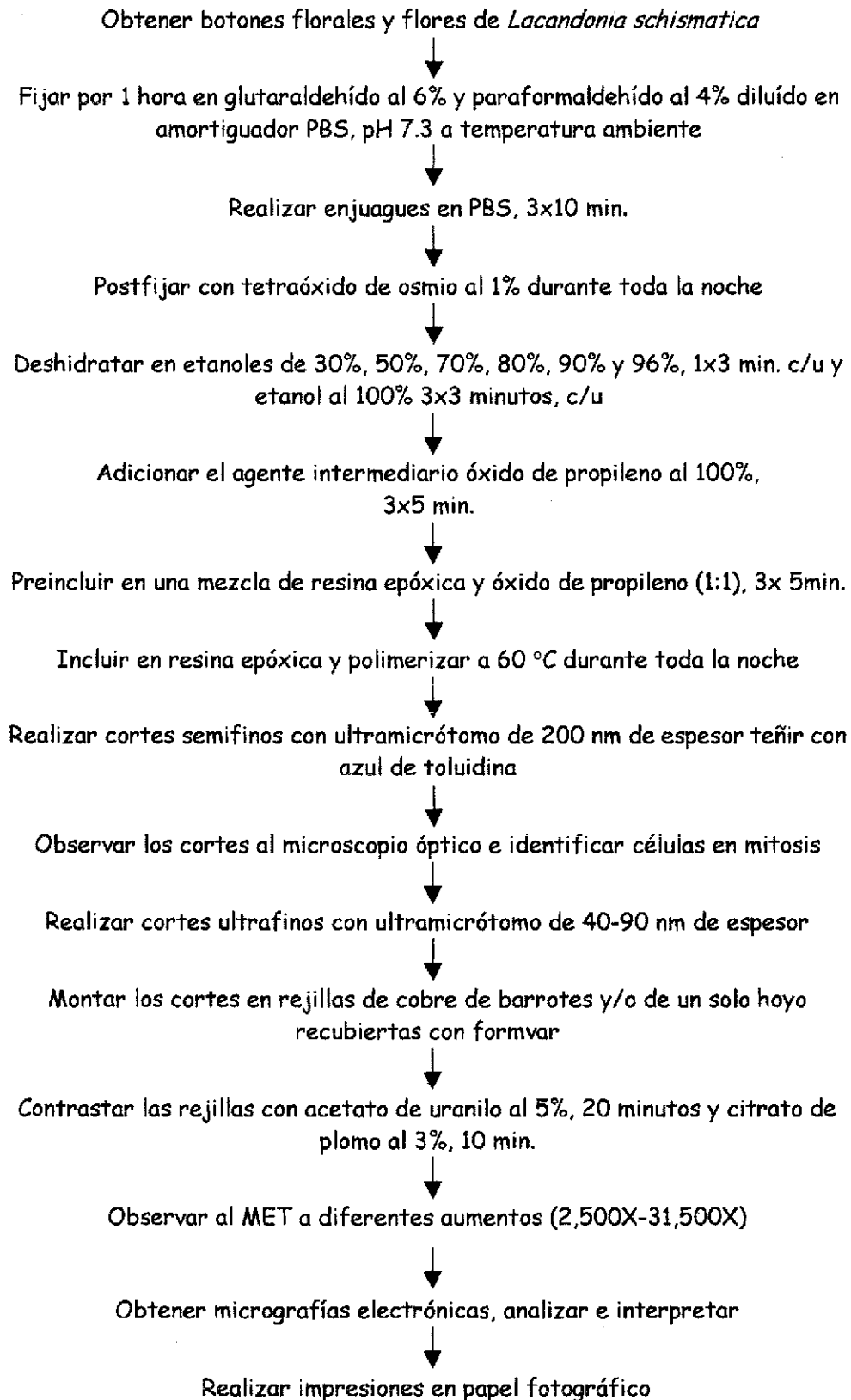
7.3 Procesamiento de muestras para observar los gránulos de *Lacandonia* en el MET.

Las flores y botones florales de *Lacandonia schismatica* donados por el Biólogo Esteban Martínez y por investigadores del Instituto de Ecología de la UNAM fueron cortados longitudinalmente para obtener muestras de aproximadamente 3 mm de diámetro las cuales se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4%, diluido en un amortiguador de PBS a pH 7.3 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres enjuagues de 10 minutos cada uno con el mismo amortiguador para proseguir con una postfijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% durante toda la noche. Subsiguientemente las muestras se deshidrataron con etanoles graduales a 30, 50, 70, 80, 90, 96 y 100% durante tres minutos cada uno, excepto en el absoluto en el cual se hicieron tres cambios de 3 minutos. A continuación las muestras de flores y botones florales se colocaron en óxido de propileno al 100%, en el cual se realizaron tres cambios de 5 minutos cada uno. Posteriormente las muestras se preincluyeron durante toda la noche (≈ 12 horas) a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de resina epóxica y óxido de propileno. Finalmente los botones florales y las flores se incluyeron en resina epóxica pura y se polimerizaron a $60^\circ C$ durante 24 horas. De los bloques obtenidos se realizaron cortes semifinos de 90 a 200 nm de espesor en un ultramicrotomo, los cuales se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio de luz para localizar las células en alguna fase de la división mitótica. A continuación se delimitó la área de interés y se procedió a realizar cortes ultrafinos de 40 a 90 nm de espesor en el ultramicrotomo, los cuales se montaron en una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro y 200 mesh recubierta con formvar. Estas

preparaciones se flotaron durante 20 minutos en acetato de uranilo al 5%, a continuación se lavaron por 2 minutos con un goteo continuo de agua bidestilada para flotarlos 10 minutos en citrato de plomo al 0.3%, por ultimo se lavaron nuevamente 2 minutos con un goteo continuo de agua bidestilada y se secaron cuidadosamente con un papel filtro. Procediendo a su observación al microscopio electrónico de transmisión entre 2000X y 31500X de aumento.

De cada una de estas preparaciones observadas se tomaron micrografías electrónicas para su posterior revelado, análisis e interpretación (Ver Diagrama de flujo).

Diagrama de flujo



8 RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las observaciones realizadas a través de microscopía óptica y electrónica de transmisión de los cortes semifinos y ultrafinos entre 40 a 200 nm de espesor, embebidos en resina epóxica, teñidos con azul de toluidina y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo de las flores y botones florales de *Lacandonia schismatica* que presentan células con núcleos interfásicos y células en las diferentes etapas de la mitosis son los siguientes:

Corte semifino del botón floral en preantesis de *Lacandonia schismatica* observado por microscopía óptica (Figura 8) se aprecia la distribución de las diferentes estructuras florales; el tépalo en la parte externa del corte el cual envuelve a los múltiples ovarios papilosos y estos a su vez están rodeando a la antera en cuyo interior se observan abundantes granos de polen. Usando aceite de inmersión en el corte semifino del ovario de *Lacandonia schismatica* (Figura 9) se nota que está constituido en su parte interna por el saco embrionario rodeado por dos filas de células del tegumento en el cual se distinguen diversas células en interfase y una célula en mitosis apreciándose claramente los cromosomas profásicos.

Las células teñidos con azul de toluidina de *Lacandonia schismatica* vistas a través del microscopio óptico (Figura 10) en las distintas etapas del ciclo celular, donde se aprecian células interfásicas (Figura 10a) con núcleos con cromatina compacta reticulada y uno o dos nucleolos fuertemente teñidos y células en las diferentes fases mitóticas tales como: Profase (Figura 10b) donde los cromosomas replicados constituidos por dos cromátidas se condensan, se distingue el nucleolo pequeño y compacto fuertemente teñido, fuera del núcleo se constituye el huso mitótico que se organiza y pasa a su alrededor, los microtúbulos y los microfilamentos se unen para formar la banda de la preprofase la cual marca el sitio donde ocurrirá la próxima división celular. En prometafase (Figura 10c) los cromosomas se aprecian como cordones fuertemente teñidos, los cinetocoros cromosómicos maduran, desaparece la banda de la preprofase, la envoltura nuclear se rompe y los husos mitóticos capturan a los cromosomas dirigiéndolos hacia el ecuador celular y se empiezan a organizar husos mitóticos polares. En metafase (Figura 10d) los cromosomas con ayuda del huso se alinean en el eje del

ecuador de la célula donde los microtúbulos cinetocóricos emparejados de cada cromosoma se unen a los polos opuestos del huso integrándose completamente el huso mitótico y el huso o placa ecuatorial y el núcleo-citoplasma se torna claro. Durante la anafase (Figura 10e) el par de cromátidas se separan sincrónicamente en dos cromosomas hijos los cuales migran lentamente hacia los polos opuestos del huso. En tanto que en la telofase (Figura 10f) los dos conjuntos de cromosomas hijos llegan a los polos del huso y se construye o ensambla una nueva envoltura nuclear alrededor de cada conjunto organizándose dos núcleos hijos y los cromosomas se descompactan dando por terminada la etapa del ciclo celular denominada mitosis. Simultáneamente se lleva a cabo la citocinesis que consta de la formación del fragmoplasto constituido por microtúbulos de actina y la placa celular integrada de la fusión de vesículas originarias del aparato de Golgi que viajan a través de los microtúbulos las cuales dan origen a la membrana plasmática de las células hijas, estas también contienen polisacáridos precursores de celulosa y pectina orientados perpendicularmente para producir la pared célula. En la etapa G1 (Figura 10g) del ciclo celular se distingue a la cromatina de los núcleos de las células con tendencia a adquirir la estructura reticulada característica peculiar de los núcleos de las células interfásicas de *Lacandonia schismatica* y los nucleolos se observan conspicuos, grandes y fuertemente teñidos, durante esta etapa de intervalo entre el final de la mitosis del ciclo anterior y el comienzo de la síntesis de ADN se da el crecimiento celular y se considera si las condiciones ambientales son favorables para iniciar el proceso de la división celular.

Los núcleos de las células interfásicas de los botones florales en preantesis de *Lacandonia schismatica* contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados por microscopia electrónica de transmisión (Figura 11), se caracterizan por la gran cantidad de gránulos de *Lacandonia* en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano que miden aproximadamente 32 nm de diámetro siendo más grandes que los ribosomas, la cromatina compacta forma grandes cúmulos con una distribución reticulada la cual se contrastan con esta técnica como cúmulos oscuros en el núcleo, el nucleolo por lo general dos en *Lacandonia schismatica* se diferencia del resto de las estructuras debido a que es grande, conspicuo, compacto y se contrasta fuertemente. Al igual que en las células animales el núcleo se

encuentra delimitado por la envoltura nuclear la cual separa y transporta a los componentes nucleares del o al citoplasma, en esta micrografía se aprecian diversos organelos celulares tales como: mitocondrias, ribosomas y vacuolas.

En los cortes observados por microscopía electrónica de transmisión de las células en etapa mitótica de *Lacandonia schismatica* se aprecia que en profase (Figura 12) los gránulos de *Lacandonia* se presentan en menor cantidad comparados con los observados en las células interfásicas, estos se encuentran distribuidos en el espacio intercromosómico de los cromosomas replicados cercanos a las cromátidas hermanas, ellos son mucho más grandes que los ribosomas. Durante las prometáfase (Figura 13) los gránulos de *Lacandonia* han disminuido considerablemente y solamente se observan algunos en la periferia de los cromosomas y en el espacio intercromosómico o en el núcleo-citoplasma al igual que los ribosomas. En las células metafásicas (Figura 14) los cromosomas apareados se localizan alineados en el eje del ecuador de la célula entre los dos polos del huso y los gránulos de *Lacandonia* y los ribosomas son muy escasos y solamente se observan y distribuyen en la periferia de los cromosomas. Durante la anafase (Figura 15) las cromátidas se separan con ayuda del huso formando dos cromosomas hijos que se desplazan hacia los polos opuestos del huso y los gránulos de *Lacandonia* son muy escasos al igual que los ribosomas aunque estos se pueden observar en la periferia de los cromosomas y en el espacio intercromosómico solitarios originando pequeños cúmulos de gránulos. En la telofase (Figura 16) los cromosomas se descodensan y la cromatina adquiere su conformación y distribución reticulada dentro de núcleo, como ya se ha reconstruido la envoltura nuclear los componentes nucleares se encuentran separados de los componentes citoplasmáticos por lo que los gránulos de *Lacandonia* al ser un componente nuclear se observa en gran cantidad en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano los cuales están listos para llevar a cabo sus funciones que se piensa están relacionadas con la maduración de ARNm el cual saldrá del núcleo para llevar a cabo el proceso de traducción, como se sabe en la mitosis todos los procesos transcripcionales y postranscripcionales son interrumpidos en casi su totalidad ya que las células invierten toda su energía en el proceso de división celular para originar dos células hijas idénticas. Al igual que en la telofase en la etapa G₁ (Figura 17) del ciclo celular se observa un incremento significativo comparado con los de las fases anteriores

en la cantidad de gránulos de *Lacandonia* localizándose tanto en el espacio intercromatiniano como en la periferia de la cromatina compacta de las células hijas, el nucleolo de las células hijas es muy grande y conspicuo, los ribosomas se distribuyen en el citoplasma celular. Se observa que estas estructuras y organelos se contrasta fuertemente con la técnica para microscopia electrónica de transmisión de acetato de uranilo y citrato de plomo.

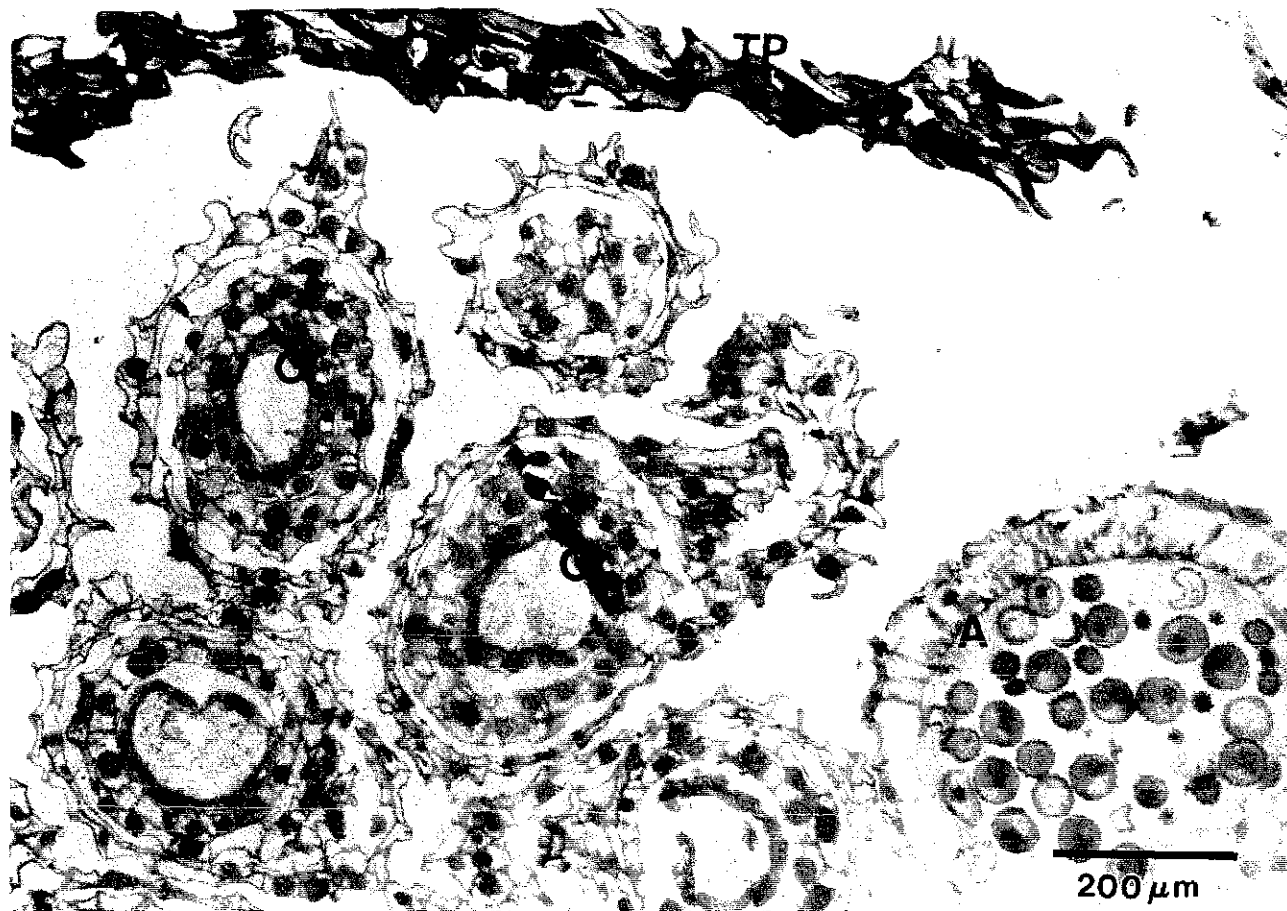


Figura 8. Micrografía óptica de los botones florales en preantesis de *Lacandonia schismatica*. Teñidos con azul de toluidina donde se aprecian los ovarios (O) y la antera (A), rodeados por el tépalo (TP). 60X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

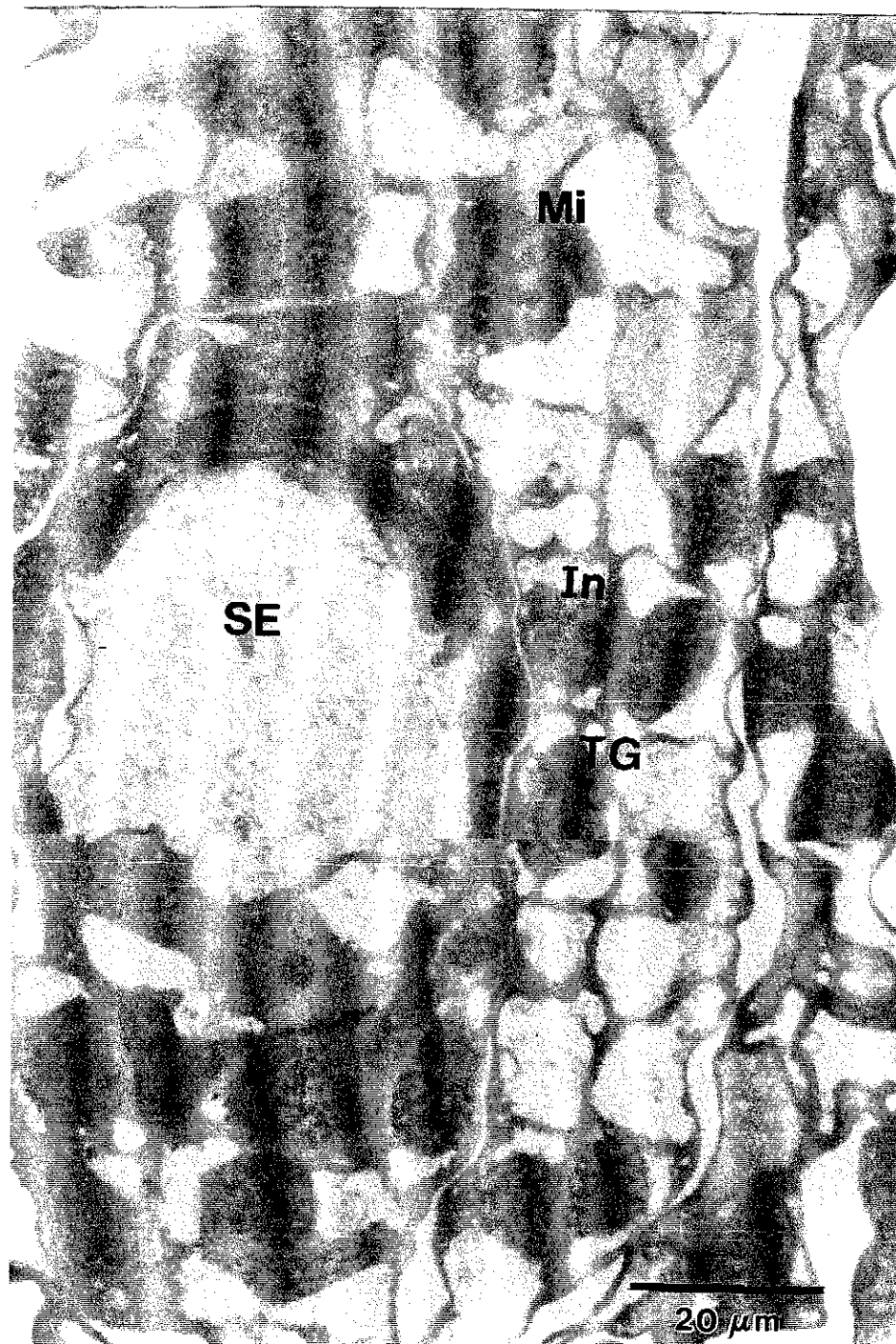


Figura 9. Micrografía óptica del ovario de *Lacandonia schismatica*, teñido con azul de toluidina. Obsérvese las dos filas de células del tegumento (TG), que rodean al saco embrionario (SE). También se aprecian diversas células en interfase (In) y una células en fase mitótica (Mi).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 10. Serie de micrografías ópticas del ovario de *Lacandonia schismatica*. Donde se aprecian, a) células en interfase (I); b) Profase (P), obsérvese el nucléolo (flecha) compacto y pequeño; c) Prometafase (PM), los cromosomas se han compactado y se aprecian como cordones; d) Metafase (M), los cromosomas se encuentran alineados en el eje del ecuador de la célula y el nucleocitoplasma se torna claro; e) Anafase (A), en esta fase los cromosomas se están separando y dirigiendo hacia los polos; f) Telofase (T) se ha formado el fragmoplasto y la placa nuclear, la envoltura nuclear se hacen visibles y las células hijas se separan; g) G1 proporciona tiempo adicional para el crecimiento de la célula, aquí se considera si las condiciones ambientales son adecuadas para comenzar el proceso irreversible de la división celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 11. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de *Lacandonia schismatica* en interfase. Contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se aprecia el nucléolo (n), cromatina compacta (C), mitocondrias (m), abundantes gránulos de *Lacandonia* (flecha larga), ribosomas (flecha corta).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 12. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de *Lacandonia schismatica* en profase. Los cromosomas (C) se empiezan a compactar, la envoltura nuclear se desensambla, Los gránulos de Lacandonia (flecha larga) se distribuyen en el espacio intercromatiniano disminuyendo la cantidad. Los ribosomas (flecha corta) se observan de tamaño más pequeño comparado con los gránulos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

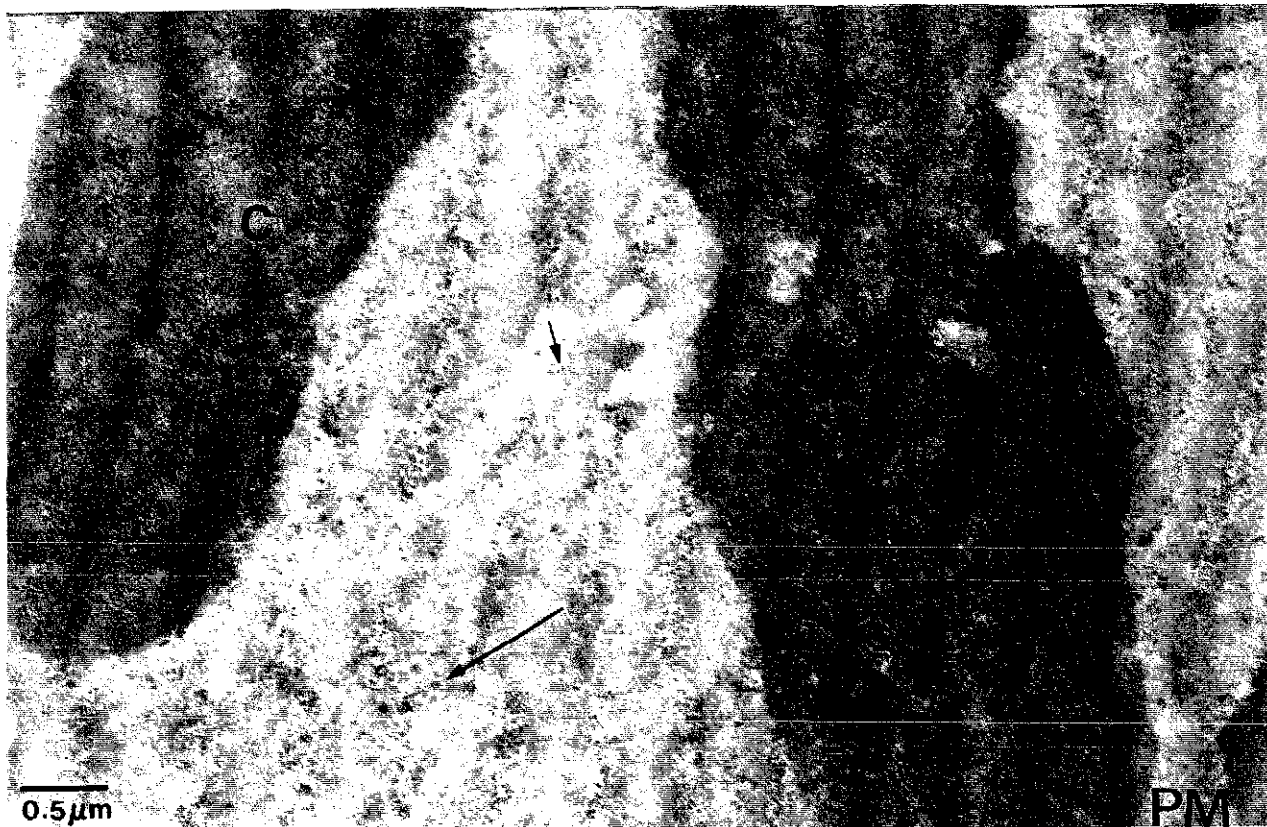


Figura 13. Cromosomas (C) de una célula en prometafase, se aprecian como los gránulos de Lacandonia (flecha larga) han disminuido y solo están distribuidos en la periferia de los cromosomas y en el espacio intercromosómico, ribosoma (flecha corta) son mucho más pequeños que los gránulos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

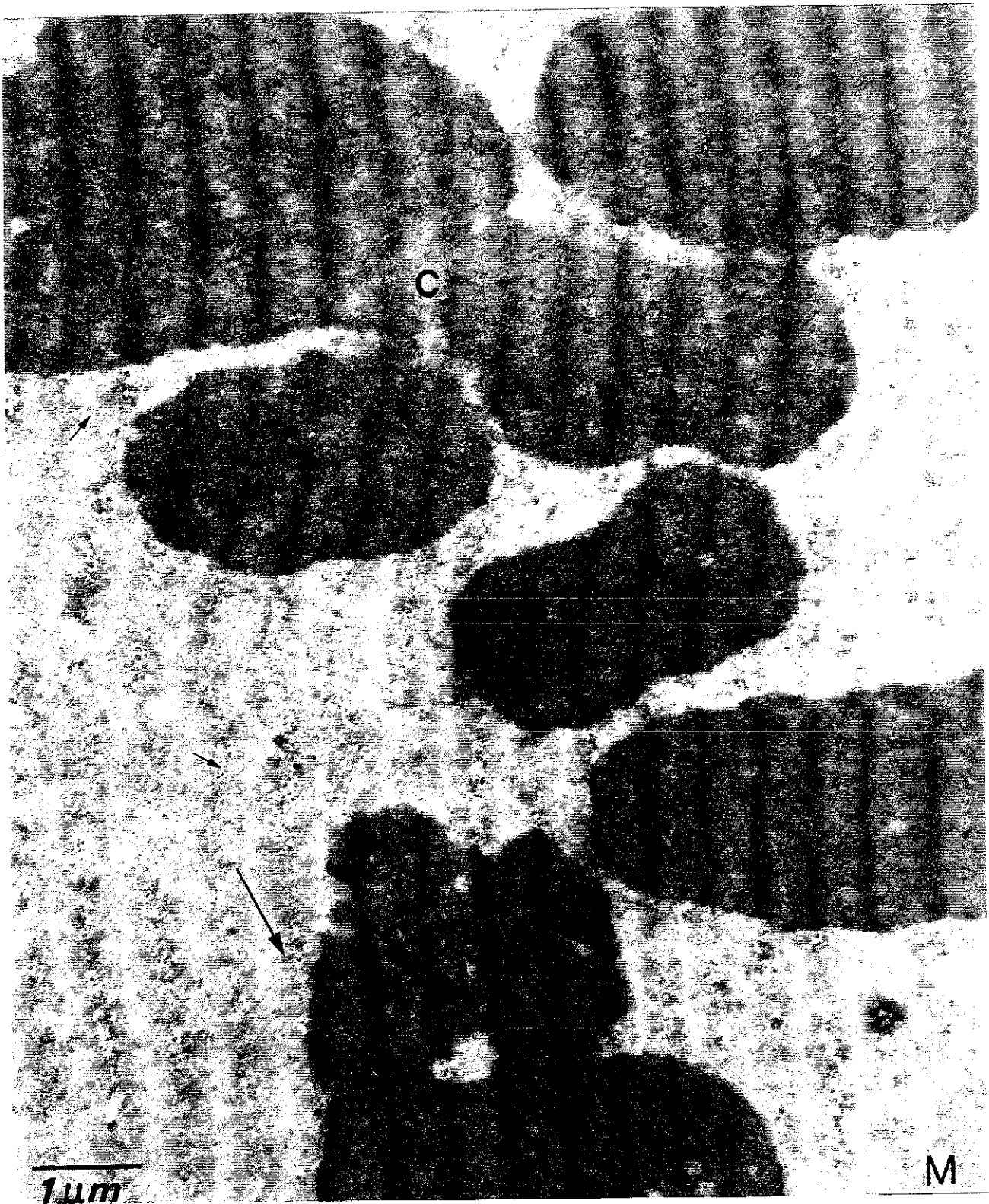


Figura 14. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula metafásica de *Lacandonia schismatica*. Los cromosomas C, se localizan en eje del ecuador de la célula. Obsérvese la distribución y tamaño de los gránulos de *Lacandonia* (flecha larga) y el tamaño de los ribosomas (flecha corta).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 15. Micrografía Electrónica de una célula de *Lacandonia schismatica* en anafase. Contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cromosomas *C*, se están desplazando hacia los polos. Algunos gránulos de *Lacandonia* se observan en la periferia de los cromosomas (flecha larga), comparados con los ribosomas (flecha corta) su tamaño es mayor.

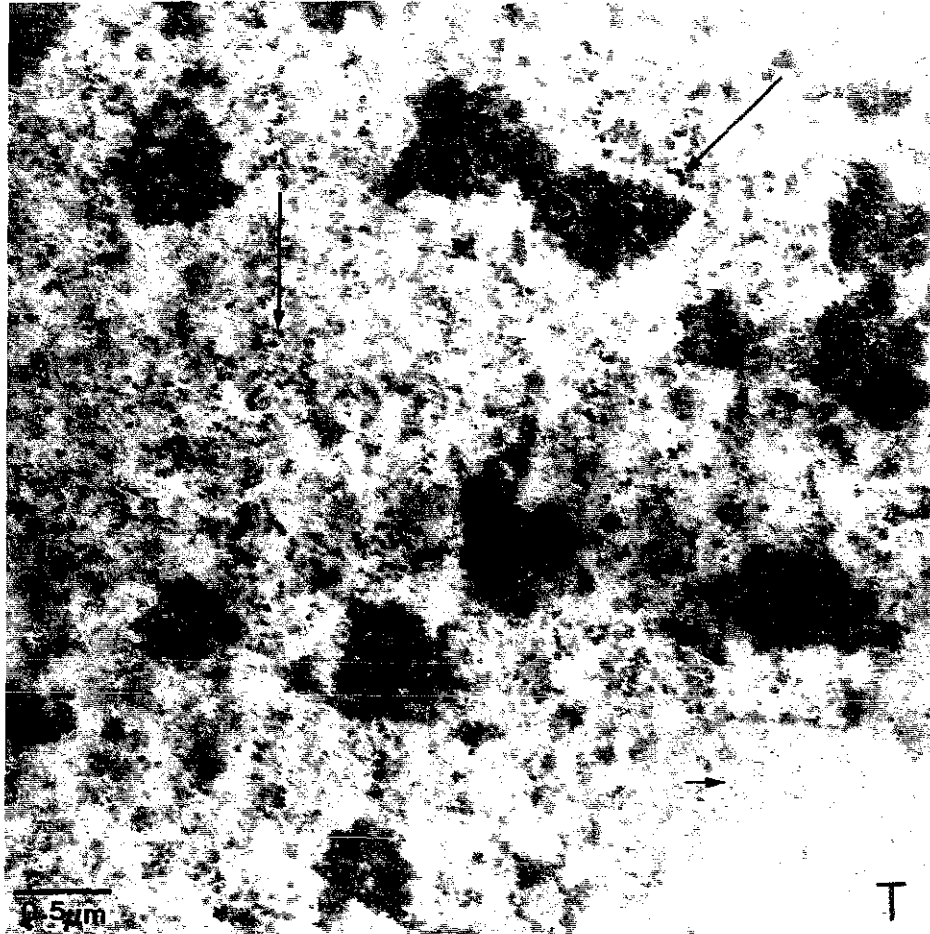


Figura 16. Célula de *Lacandonia schismatica* en telofase. El fragmoplasto y la placa celular forman la pared célula y la membrana celular respectivamente, siendo en esta etapa claramente visibles. Los cromosomas (C), se empiezan a descompactar y los gránulos de *Lacandonia* (flecha larga) se observan en mayor cantidad. Distribuyéndose en la periferia de la cromatina y en el espacio intercromatiniano de las células hijas antes de separarse y los ribosomas (flecha corta) se observan en el citoplasma.

INSTITUTO VENEZOLANO
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CAROLINA DE ORIGEN

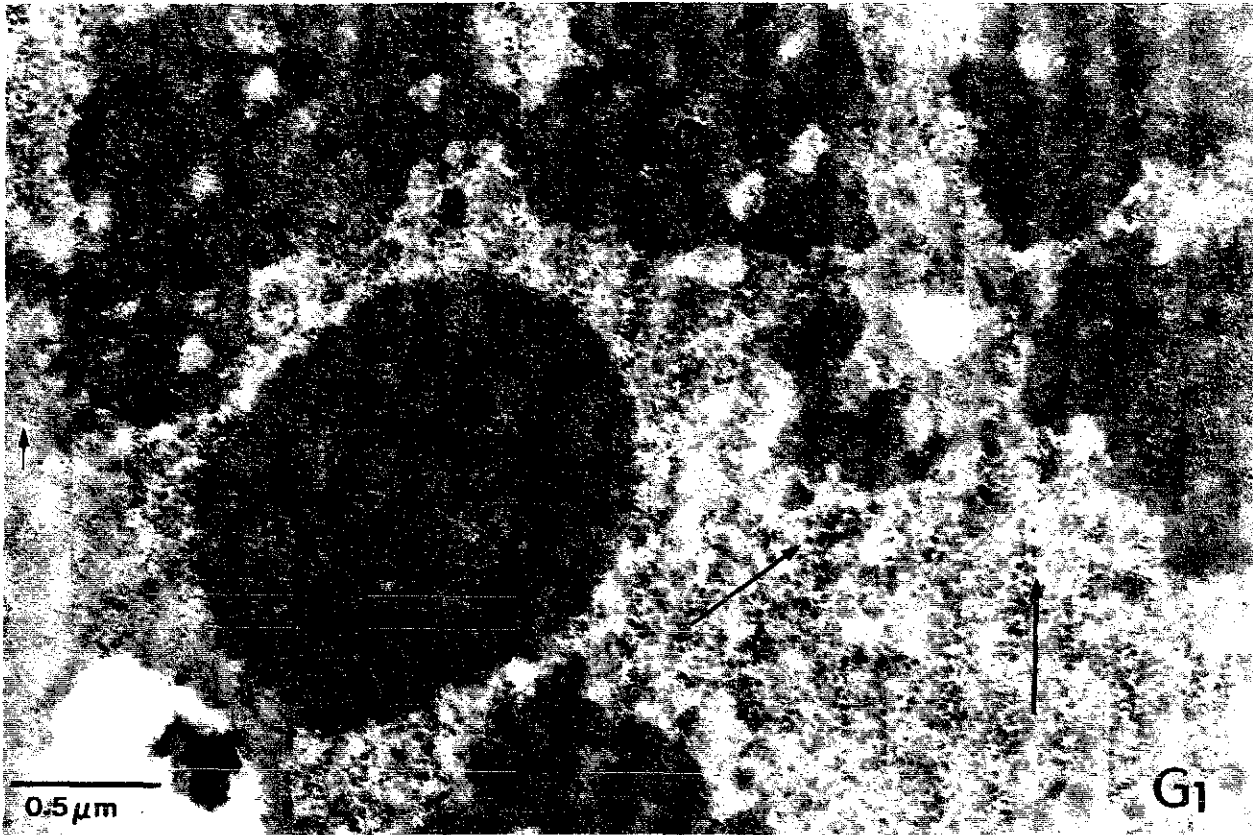


Figura 17. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de *Lacandonia schismatica* en fase G1. Se observa un incremento en el número de gránulos de *Lacandonia* (flecha larga), tanto en el espacio intercromatiniano como en la periferia de la cromatina compacta (nucleoplasma), de las células hijas. Los ribosomas (flecha corta) se distribuyen en el citoplasma. El nucléolo (n) es más conspicuo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado la distribución de una ribonucleoproteína nuclear denominada gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García y col., 1992), durante la mitosis en células del tegumento de los ovarios de la planta *Lacandonia schismatica*, por medio de microscopía electrónica de transmisión. Los resultados indican que la cantidad de estas partículas disminuye en la célula conforme avanza la mitosis y aumenta durante la telofase. Como se sabe durante la mitosis la actividad transcripcional decrece drásticamente hasta estar ausente, es razonable asumir que los gránulos sean producto de esa actividad, porque se reduce su número. Concomitantemente, su número aumenta notoriamente al reinicio de la actividad transcripcional durante la etapa de telofase y continúa en la fase G1. Recientemente se ha considerado que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras nucleares equivalentes a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y col., 1994, 2000). Estas estructuras parecen jugar un papel en el almacenamiento y/o transporte de ARNm, como producto del enrollamiento de las fibras pericromatinianas. En efecto, el número de gránulos aumenta cuando la expresión génica se incrementa pero no hay un transporte inmediato al citoplasma, pues se ha propuesto que su cantidad está en equilibrio entre la síntesis y la salida al citoplasma. Estos fenómenos han sido observados en células sometidas a la acción hormonal, por un lado y a células involucradas en la expresión de proteínas abundantes durante la formación del capullo en los dípteros (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). En células del útero de ratas castradas el número de gránulos aumenta en tanto que la reactivación de la expresión por la acción de hormonas, lo disminuye pues el ARNm ha sido transportado rápidamente al citoplasma. En los núcleos de las células de los anillos de Balbiani, en los puffs de los cromosomas politénicos del IV estadio larvario de *Chironomus thummi*, durante las etapas previas a la formación del capullo, el número de gránulos aumenta y disminuye durante la formación del mismo, indicando el transporte de los ARNMs almacenados en etapas críticas de la actividad celular. Asimismo, previamente se ha observado que los gránulos de *Lacandonia* también incrementan en número en etapas de preantesis y disminuyen en etapas de postantesis durante el desarrollo de la flor en

Lacandonia schismatica (Agredano-Moreno y col., 1994). En este trabajo, estudiamos por primera vez el comportamiento de este tipo de partículas durante la mitosis. Por la abundancia de los gránulos de *Lacandonia* y lo escaso de los GPC así como la dificultad de estudiar los gránulos de Balbiani durante la mitosis de células con cromosomas politénicos, esta investigación se ha facilitado. Debido a la labilidad de los gránulos de *Lacandonia* por su contenido de ARN, se tuvo especial cuidado de seleccionar aquellas figuras de mitosis contiguas a células interfásicas en las que los gránulos de *Lacandonia* fueran particularmente abundantes, para descartar defectos debidos al procesamiento del material. Debe apreciarse también que, si bien la cantidad de gránulos disminuye drásticamente durante la mitosis, es posible detectar la presencia de algunos de ellos cercanos a los cromosomas, individuales o formando cúmulos muy pequeños en el espacio núcleo-citoplásmico. Estos datos sugieren que tal vez algunos de estos gránulos se heredan de una célula madre a las hijas. El contenido de los mismos podría representar un ARN parcialmente procesado que reinicia su actividad de maduración durante el nuevo ciclo celular. Probablemente también se trate de ARN maduro que represente una sub-población de gránulos cuya función debe ser determinada.

Respecto del significado genético de estos resultados, es posible sugerir que el contenido de los gránulos no se hereda de la célula madre a las células hijas y por lo tanto no es esencial para el reinicio de la expresión génica, como ocurre con los factores de procesamiento del ARNm y del ARNr. Por ejemplo, durante la mitosis, los elementos de maduración de los pre-ARNr se dispersan alrededor de los cromosomas y se reagrupan a partir de esas regiones en cuerpos prenucleolares durante la etapa de la nucleogénesis en la telófase, fusionándose a las regiones del organizador nucleolar al activarse la transcripción. Esto ha sido interpretado como la herencia de material requerido para el procesamiento del ARN recién sintetizado. Una situación similar ha sido descrita para los factores de procesamiento del pre-ARNm con el monitoreo de las spleckles, que se dispersan en el citoplasma y se reagrupan al final de la telófase. La ausencia de gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis parece representar una situación diferente, que sugiere la carencia de elementos del procesamiento del ARN en estas partículas y refuerza la idea de que contienen ARN de vida media más corta que no tiene una duración de un ciclo celular al siguiente. Los resultados del presente trabajo corroboran la

idea de que los gránulos de *Lacandonia* son partículas ribonucleoproteicas intranucleares que contienen ARN cuya vida media es más corta que un ciclo celular, similar a lo que ocurre con los gránulos pericromatinianos y los gránulos de los anillos de Balbiani. Por ello, parecen estar involucrados en el almacén y/o transporte de ARNm en los núcleos de *Lacandonia schismatica*. Esta posible función parecería ser más general en la naturaleza, debido a que resultados recientes indican la presencia de estas estructuras nucleares en otras plantas como *Ginkgo biloba*, además de su presencia en *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*. El comportamiento de los gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis en otras plantas permitirá conocer si este comportamiento es general o depende de las especies. Además, el conocimiento sobre el contenido molecular de estos gránulos a través de su aislamiento aportaría nuevos conocimientos sobre su función.

10 CONCLUSIÓN

Debido la abundancia de gránulos de *Lacandonia* y a lo escaso de los GPC, en los núcleos de las células del tegumento de los ovarios de la planta *Lacandonia schismatica*, se estudió por primera vez el comportamiento de los gránulos durante la fase M (mitosis) del ciclo celular. El cual nos indicó que estas partículas disminuyen en la célula en las etapas de profase, prometafase, metafase y anafase aumentando durante la telofase. Puesto que la actividad transcripcional o síntesis de ARN y la síntesis de proteínas tienen un drástico descenso durante la mitosis hasta ser casi ausente, es razonable asumir que los gránulos de *Lacandonia* son producto de esa actividad ya que disminuye la cantidad. Coincidiendo con el aumento notorio en la cantidad al reinicio de la actividad transcripcional durante la telofase y continúa en la fase G1 del ciclo celular.

Sin embargo es posible observar la presencia de algunos de ellos individuales o formando cúmulos muy pequeños cercanos a los cromosomas y en el espacio núcleo-citoplásmico de la célula en las diferentes etapas de la mitosis. Sugiriendo que tal vez algunos gránulos de *Lacandonia* se heredan de la célula madre a las células hijas.

Por su contenido molecular podría ser un ARN parcialmente procesado que reinicia su actividad de maduración durante el nuevo ciclo celular o probablemente se trate de ARN maduro que representa una subpoblación de gránulos de *Lacandonia* cuya función debe ser determinada.

La ausencia de gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis sugiere la carencia de elementos del procesamiento del ARN en esta partícula, reforzando la idea que son partículas ribonucleoproteicas intranucleares que contienen ARN de vida media más corta que no tiene duración de un ciclo celular al siguiente, lo cual es similar a lo que ocurre con los gránulos pericromatinianos y los gránulos de los anillos de Balbiani. Por lo que, parecen estar involucrados en el almacén y/o transporte de ARNm en los núcleos de *Lacandonia schismatica*.

Respecto al significado genético, se sugiere que el contenido de los gránulos de *Lacandonia* no se hereda (aunque algunos que se encuentran en la periferia de los cromosomas son heredados) de la célula madre a las células hijas y por lo tanto no son esenciales para el reinicio de la expresión génica, como ocurre con los factores de procesamiento del ARNm y del ARNr, aunque la cantidad de gránulos aumenta cuando la expresión génica se incrementa. El comportamiento de los gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis en otras especies vegetales permitirá conocer si este comportamiento es general o depende de las especies. Además, el conocimiento sobre el contenido molecular de estos gránulos a través de su aislamiento aportaría nuevos conocimientos sobre su función.

11 BIBLIOGRAFÍA

Agredano-Moreno L.T., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Ramos C.H., Martínez E. y Vázquez-Nin G.H., (1994), Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*, Biol. Cell 82:177-184

Agredano-Moreno L.T., (1996), Caracterización inmunocitoquímica del núcleo interfásico de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales), Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular) UNAM

Agredano-Moreno L.T. y Jiménez-García L.F., (2000), New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granule. Biol. Cell 92:71-78

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P., (1994), Biología Molecular de la Célula, 2a. Edición, Ediciones Omega, Barcelona

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P., (1999), Introducción a la biología celular, Ediciones Omega, Barcelona.

Allen T. D., Cronshaw J.M., Bagley S., Kiseleva E. y Goldberg M. W., (2000), The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. J. Cell Sci. 113:1651-1659

Bachelierie J.P., Puvion E. y Zalta J.P., (1975), Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. J. Microsc. 126:77-85

Bell S P., Kobayashi R. y Stillman B., (1993), Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. Science 262: 1844-1849

Berezney R. y Coffey, D.S., (1974), Identifcation of a nuclear protein matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:1410-1417

Berezney R. y Coffey D.S., (1977), Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73:616-637

Berezney R. y Joen W.K., (1995), Nuclear matrix, structural and functional organization, Academic Press

Bernhard W., (1969), A new procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27:250-256

- Bouteille M., Laval M. y Dupuy-Coin A.M., (1974), Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. *The Cell Nucleus* (ed. H. Busch), Academic Press, New York Vol. 1:3-71
- Bozzola J.J. y Russell L.D., (1998), *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. 670p
- Buchwalow I.B. y Unger E., (1977), Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.* 106:139-150
- Burke B. y Gerace L., (1986), A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44:639-652
- Carmo-Fonseca M., Pepperkok R., Sproat B.S., Ansorge W., Swanson M. y Lamond A.I., (1991), *In vivo* detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *EMBO J.* 10:1863-1873
- Carter K.C., Taneja K.L. y Lawrence J.B., (1991), Discrete nuclear domains of poly(A) and their relationships to the functional organization of the nucleus. *J. Cell Biol.* 115:1191-1202
- Castillo-Hernández N.E., (1999), Caracterización microestructural de las fases intermetálicas obtenidas con Cu, Ni y Al. Tesis de Maestría en Ciencias (Ciencia de Materiales) ESFM-IPN.
- Coello G., Escalante A. y Soberón J., (1993), Lack of genetics variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) in its only known locality, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 80:898-901
- Cook P.R., (1989), The nucleoskeleton and the topology of transcription *Eur. J. Biochem.* 185:487-501
- Cronquist A., (1981), *An integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York
- Dahmann C., Diffley J.F.X. y Nasmyth K.A., (1995), S-phase-promoting cyclin dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5:1257-1269
- Daskal Y., (1981), Perichromatin granules. *The Cell Nucleus*, Vol. VIII, H. Bush (ed.) (Academic Press, New York), pp.117-137
- Davidse G. y Martínez E., (1990), The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Syst. Bot.* 15:635-637

Diario Oficial de la Federación (Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos) Tomo CDLXXXVIII, México, Núm. 10, 1994

Dutta, A. y Bell S. P., (1997), Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:293-332

Echeverría O.M., Zavala G., Benitez A. y Vázquez-Nin G.H., (1980), Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat, *Biol. Cellulaire* 39:139-142

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

Fakan S., Puvion E. y Spohr G., (1976), Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99:155-164

Fakan S. y Odartchenko N., (1980), Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos, *Biol. Cellulaire* 37:211-218

Fakan S. y Puvion E., (1980), The ultrastructural localization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65:255-299

Fakan S., Leser G. y Martin T., (1984), Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections, *The J. Cell Biol.* 98:358-363

Fakan S., (1994), Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. *Trens in Cell Biol.* 4:86-90

García-Bórquez A., (1983), Estudios de microscopía electrónica de transmisión sobre el comportamiento de precipitados en aceros estabilizados con Ti y Nb. Tesis de Maestría. Pág. 12-21

Gerace L. y Burke B., (1988), Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:335-374

Grant V., (1985), *The evolutionary process.* Columbia University Press, New York

Hartwell, L.H., Culotti, J. y Reid, B., (1970), Genetic control of cell division in yeast, I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 66:352-359

Jacob F., Brenner S. y Cuzin F., (1963), On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:383-387

- Jiménez-García L.F., Elizundia J.M., López-Zamorano B., Maciel A., Zavala G., Echeverría O.M. y Vázquez-Nin G.H., (1989a), Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists. *BioSystems* 22:103-116
- Jiménez-García L.F., Rothblum L.I., Busch H. y Ochs R.L., (1989b), Nucleologenesis: Use of non-isotopic *in situ* hibridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol. Cell* 65:239-246
- Jiménez-García L.F., Agredano Moreno L.T., Segura Valdez M.L., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H. y Vázquez-Nin G.H., (1992), The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle., *Biol. Cell* 75:101-110
- Jiménez-García L.F. y Spector D.L., (1993), *In vivo* evidence that transcription and pre-mRNA splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73:47-60
- Jiménez-García L.F., Reynoso R.R., Fragoso S.R., Agredano-Moreno L.T., Segura V.M.L., González M.S., Ramos C.H. y Martínez E., (1998), Biología Celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 62:5-14
- Jones R.F., Okamura C.S. y Martin T.E., (1980), Immunofluorescent localization of the proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* 86:235-243
- Karp Gerald, (1996), *Biología Celular y Molecular*, Edit. McGraw-Hill Interamericana
- Kaufman S.H., Coffey D.S. y Shaper J.H., (1981), Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* 132:105-123
- King R.W., Deshaies, R.J., Peters J.M. y Kirschner M.W., (1996), How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652-1659
- Lamond A. I. y Earnshaw, W. C., (1998), Structure and Function in the Nucleus, *Science* 280:547-553
- Luna Córnea, (2001), Publicación Cuatrimestral, Editada por el Centro de la imagen, CNCA, México. Número doble 21/22:198-207
- Maas P.J.M. y Rübsamen T., (1986), Triuridaceae. *Flora Neotropica* 40:1-55
- Márquez-Guzmán J., Engleman E.M., Martínez-Mena A., Martínez E. y Ramos C.H., (1989), Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 76:124-127

- Márquez-Guzmán J., Vázquez-Santana S., Engleman E.M., Martínez-Mena A. y Martínez E., (1993), Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* ((Lacandoniaceae). Ann. Mo Bot. Gard. 80:891-897
- Martínez E. y Ramos C.H., (1989), Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. Ann. Mo. Bot. Gard. 76:128-135
- Martínez E., Ramos C.H. y Chiang F., (1994), Lista florística de la Lacandonia, Chiapas. Bol. Soc. Bot. Méx. 54:99-177
- Medina M.A., Moreno-Díaz de la Espina S. y Fernández-Gómez M.E., (1989), Interchromatin granules in plant nuclei. Biol. Cell. 67:331-339
- Miller T.E., Huang C.Y. y Pogo A.O., (1978), Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA. J. Cell Biol. 76:675-691
- Miranda F., (1952), La vegetación de Chiapas. Ediciones del Gobierno del Estado Tuxtla Gutiérrez, 2 Vols.
- Monneron A. y Bernhard W., (1969), Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Struct. Res. 27:266-288
- Moyne G., Bertaux O. y Puvion E., (1975), The nucleus of *Euglena* I. An Ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis*. J. Ultrastruct. Res. 52:362-376
- Murray A. y Hunt T., (1993), The Cell Cycle an Introduction. Oxford University Press
- Nigg E.A., (1992), Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. Nature 386:779-787
- Nurse P., Thuriaux P. y Nasmyth K., (1976), Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Gen. Genet.
- Palacios-Mayorga S. y Pérez-Silva E., (1993), Endotrophic mycorrhiza in *Lacandonia schismatica*, Lacandoniaceae a new saprophytic angiospermae family. Rev. Latin-Amer. Microbiol. 35:65-69
- Puvion E. y Bernhard W., (1975), Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy. J. Cell Biol. 67:200-214
- Puvion E. y Moyne G., (1978), Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteínas. Exp. Cell Res. 115:79-88

- Puvion E. y Moyne G., (1981), *In situ* localization of RNA structures. In: The Cell Nucleus (Bush H, Ed), Academic Press, New York. Vol. 8:59-115
- Puvión E. y Puvion-Dutilleul F., (1996), Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229:217-225
- Raska I., Ochs R.L. y Salamin-Michel L., (1990), Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microsc. Rev.* 3:301-353
- Raska I., Dundr M. y Koberna K., (1992), Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biol. Internat. Reports* 16:771-789
- Raven P.H., Evert R.F. y Eichhorn S.E., (2000), *Biology of Plants*, Sixth edition, W.H. Freeman, Worth publishers. pp. 155-168
- Reyes-García A. y Sousa S.M., (1995), Una nueva localidad para la familia Lacandoniaceae y nuevos registros para la Reserva de Montes Azules, Chiapas, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 57:117-119
- Riechelt R., Holzenburg A., Buhle E.J., Jarnik M., Engel A. y Aebi U., (1990), Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex of distinct pore complex component. *J. Cell Biol.* 110:883-894
- Risueño M.C. y Medina F.J., (1986), *The Nucleolar structure in plants cells.* Cell Biol. Rev. Vol 7, Springer, Basque Country University
- Rzedowski J., (1978), *Vegetación de México con la parte correspondiente a la vegetación litoral marina a cargo de Laura Huerta M.* Editorial Limusa, México, Pág. 432
- Sánchez M., Calzada A. y Bueno A., (1999), The Cdc6 protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The J. Biol. Chem.* 274:9092-9097
- Scheer U., Kartenbeck J., Trendelenburg M.F., Stadler J. y Franke W.W., (1976), Experimental desintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connections fibrils. *J. Cell Biol.* 69:1-18
- Scheer U. y Benavente R., (1990), Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssays.* 12:14-21
- Schwob E. y Nasmyth K., (1993), *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7:1160-1175

- Segura M.N., (2001), El citoesqueleto en plantas durante la mitosis y la citocinesis. Avances y Perspectivas. Vol. 20:389-394
- Smith C.A. y Wood E.J., (1998), *Biología Celular*. Addison Wesley Longman
- Spector D.L., Schrier W.H. y Busch H., (1983), Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell* 49:1-10
- Spector D.L. y Smith H.C., (1986), Redistribution of U-snRNPs during mitosis. *Exp. Cell Res.* 163:87-94
- Spector D.L., (1990), Higher order nuclear organization: three dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proceedings of the National Acad. Sci. USA.* 87:147-151
- Spector D.L., Fu X.D. y Maniatis T., (1991), Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10:3467-3481
- Stein G.S., Baserga R., Giordano A. y Denhardt D.T., (1998), *The molecular basis of cell cycle and growth control*. WILEY-LISS. 389p.
- Stevens P.F., (1991), *Lacandonia schismatica*. A challenge to some recent theories of floral morphogenesis? *Flowering News.* 12:32-33
- Stryer L., (1995), *Bioquímica*, Cuarta Edición Tomo II, Editorial Reverté, S.A., Capítulo 37
- Swift H., (1963), Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exp. Cell Res., Suppl.* 9:54-57
- Vázquez-Nin G.H. y Bernhard W., (1971), Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruc. Res.* 36:842-460
- Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M., (1976), Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocyte. *Acta Anat.* 96:218-231
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Molina E. y Fragoso J., (1978), Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat.* 102:308-318
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M. y Pedron J., (1979), Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell* 35:221-228

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M. y Jiménez-García L.F., (1983), Los gránulos pericromatianos, partículas relacionadas con la expresión genética en eucariontes. Memorias del Primer Simposio-Ciencia, Fac. de Ciencias, UNAM, México.

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Zavala G., Jiménez-García L.F., González M.A. y Parra R., (1986), Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anat.* 126:141-146

Vázquez-Nin G.H., Ortiz A., Lopez A. y Echeverría O.M., (1989), Electrón microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and their relation to perichromatin granules. *Biol. Cell* 65:133-138

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

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Traish A.M., Wotiz H.H. y Martin T.E., (1991), Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on pre-mRNA containing constituents of rat uterine cell nuclei. *Exp. Cell Res.* 192:396-404

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Martin T.E., Lührmann R. y Fakan S., (1994), Immunocytochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein fibrils in cells of the central nervous system of the rat. *Eur. J. Cell Biol.* 65:291-297

Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M., (1996), The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40:7-16

Vázquez-Nin G.H., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Guzmán A., Coeto-Barona G. y Nava-Ruiz C., (1999), Correlation of the frequency of perichromatin granules with the RNA content of the interchromatin region of uterine cells in normal and ovariectomized rats. A high resolution *in situ* hybridization and stereological study. *Biol. Cell* 91:299-304

Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M., (2000), Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fac. de Ciencias UNAM y Fondo de Cultura Económica. México. 170 p.

Vázquez-Santana S., Engleman M.E., Martínez-Mena A. y Márquez-Guzmán J., (1998), Ovule and seed development of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Am. J. Bot.* 85:299-304

Verheijen R., Van Venrooij W. y Ramaekers F., (1988), The nuclear matrix: structure and composition. *J. Cell Sci.* 90:11-36

Wasseff M., (1979), A cytochemical study of interchromatin granules. J. Ultrastruct. Res. 69:121-133

Watson M.L., (1962), Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. J. Cell Biol. 13:162-167

Wolffe A., (1995), Chromatin, structure and function, Academic Press, 2a, Edition

Ciberografía

<http://www.semanart.gob.mx> 18-Septiembre-2002

http://www.semanart.gob.mx/regions/selva_lacandona/index.shtml 18-Septiembre-2002

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrográfica electrónica de barrido a 19.8x de la flor madura en vista lateral. Realizada por Bárbara Ambrose y Francisco Vergara, 2000, UNAM	7
Figura 2. Estructura del núcleo en interfase. Envoltura nuclear, formada por dos membranas concéntricas perforadas por poros nucleares. Nucleoplasma, medio interno del núcleo donde se encuentran el resto de los componentes nucleares. Nucléolo, o nucléolos, masas densas y esféricas. Cromatina, constituida por ADN y proteínas, durante la división se organiza en cromosomas.	10
Figura 3. Secuencia que va desde el ADN hasta el cromosoma. 1 molécula de ADN. 2 vemos el ADN unido a proteínas globulares, formando una estructura denominada "collar de perlas", formado por la repetición de unas unidades que son los "nucleosomas". 3 "solenoides", estructura de orden superior. 4 aumento del empaquetamiento, formando "bucles". 5 cromosoma, grado de mayor espiralización y compactación de la cromatina	14
Figura 4. Micrografía electrónica de una célula de los tegumentos de <i>L. schismatica</i> . A bajos aumentos se observa la presencia de un núcleo reticulado grande (N) que generalmente presenta dos nucleolos (Nu) y cuerpos anulares (flecha). En el citoplasma predomina una o dos vacuolas grandes (V), mitocondrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER), plastos (P) y aparatos de Golgi pequeños (AG) (Jiménez-García y col. 1998)	24
Figura 5. Organización del ciclo celular	28
Figura 6. El círculo exterior negro representa las fases del ciclo celular. El círculo interno representa los cambios en las proteínas que se limitaron a un origen de repetición típico durante el ciclo celular. El rojo indica que el origen está limitado por el complejo pre-replicativo (CRO), más las proteínas adicionales. El amarillo indica el estado post-replicativo, cuando solo CRO la unión es perceptible. Proteínas en un ovalo sólido son parte de un complejo de multiproteínas. Proteínas adjuntadas en un ovalo discontinuo son degradadas por proteólisis. Las puntas de flecha indican el estímulo, los rectángulos sólidos pequeños indican la inhibición. Las líneas gruesas indican procesos importantes o fundamentales para la repetición dentro del ciclo celular.	31
Figura 7. Mapa de la localización de la reserva de la Biosfera Montes Azules, Chiapas, Estados Unidos Mexicanos.	39

	Página
Figura 8. Micrografía óptica de los botones florales en preantesis de <i>Lacandonia schismatica</i> . Teñidos con azul de toluidina donde se aprecian los ovarios (O) y la antera (A), rodeados por el tepalo (TP). 60X	50
Figura 9. Micrografía óptica del ovario de <i>Lacandonia schismatica</i> , teñido con azul de toluidina. Obsérvese las dos filas de células del tegumento (TG), que rodean al saco embrionario (SE). También se aprecian diversas células en interfase (In) y una células en fase mitótica (Mi).	51
Figura 10. Serie de micrografías ópticas del ovario de <i>Lacandonia schismatica</i> . Donde se aprecian, a) células en interfase (I); b) Profase (P), obsérvese el nucléolo (flecha) compacto y pequeño; c) Prometafase (PM), los cromosomas se han compactado y se aprecian como cordones; d) Metafase (M), los cromosomas se encuentran alineados en el eje del ecuador de la célula y el nucleocitoplasma se torna claro; e) Anafase (A), en esta fase los cromosomas se están separando y dirigiendo hacia los polos; f) Telofase (T) se ha formado el fragmoplasto y la placa nuclear, la envoltura nuclear se hacen visibles y las células hijas se separan; g) G1 proporciona tiempo adicional para el crecimiento de la célula, aquí se considera si las condiciones ambientales son adecuadas para comenzar el proceso irreversible de la división celular.	52
Figura 11. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de <i>Lacandonia schismatica</i> en interfase. Contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se aprecia el nucléolo (n), cromatina compacta (C), mitocondrias (m), abundantes gránulos de <i>Lacandonia</i> (flecha larga), ribosomas (flecha corta).	53
Figura 12. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de <i>Lacandonia schismatica</i> en profase. Los cromosomas (C) se empiezan a compactar, la envoltura nuclear se desensambla, Los gránulos de <i>Lacandonia</i> (flecha larga) se distribuyen en el espacio intercromatiniano disminuyendo la cantidad. Los ribosomas (flecha corta) se observan de tamaño más pequeño comparado con los gránulos.	54
Figura 13. Cromosomas (C) de una célula en prometafase, se aprecian como los gránulos de <i>Lacandonia</i> (flecha larga) han disminuido y solo están distribuidos en la periferia de los cromosomas y en el espacio intercromosómico, ribosoma (flecha corta) son mucho más pequeños que los gránulos.	55
Figura 14. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula metafásica de <i>Lacandonia schismatica</i> . Los cromosomas C, se localizan en eje del ecuador de la célula. Obsérvese la distribución y tamaño de los gránulos de <i>Lacandonia</i> (flecha larga) y el tamaño de los ribosomas (flecha corta).	56

Página

- Figura 15. Micrografía Electrónica de una célula de *Lacandonia schismatica* en anafase. Contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cromosomas C, se están desplazando hacia los polos. Algunos gránulos de *Lacandonia* se observan en la periferia de los cromosomas (flecha larga), comparados con los ribosomas (flecha corta) su tamaño es mayor. 57
- Figura 16. Célula de *Lacandonia schismatica* en telofase. El fragmoplasto y la placa celular forman la pared célula y la membrana celular respectivamente, siendo en esta etapa claramente visibles. Los cromosomas (C), se empiezan a descompactar y los gránulos de *Lacandonia* (flecha larga) se observan en mayor cantidad. Distribuyéndose en la periferia de la cromatina y en el espacio intercromatiniano de las células hijas antes de separarse y los ribosomas (flecha corta) se observan en el citoplasma. 58
- Figura 17. Micrografía Electrónica de Transmisión de una célula de *Lacandonia schismatica* en fase G1. Se observa un incremento en el número de gránulos de *Lacandonia* (flecha larga), tanto en el espacio intercromatiniano como en la periferia de la cromatina compacta (nucleoplasma), de las células hijas. Los ribosomas (flecha corta) se distribuyen en el citoplasma. El nucléolo (n) es más conspicuo. 59