



00377
15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Ciencias

ESTUDIO DEL NÚCLEO DE LAS ANGIOSPERMAS
Illicium floridanum y *Pelargonium hortorum*
POR MICROSCOPIA DE LUZ, ELECTÓNICA
Y DE FUERZA ATÓMICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

AIDA GABRIELA GUZMÁN LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2003.

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACION

Ciudad Universitaria, D.F. a 22 de noviembre de 2002.

Aida Gabriela Guzmán López

No. de cuenta: 81180471

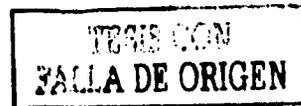
No. de expediente: 3971274

PRESENTE.

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 18 de noviembre de 2002, aprobó el Jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del Posgrado en Ciencias Biológicas, integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Vocal: Dr. Omar Homero Pantoja Ayala
Secretario: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente: Dra. María de Lourdes Segura Valdés
Suplente: M. en C. Jaime Jiménez Ramírez

Sin más por el momento, me despido.



Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

C. e. p. Miembros del Jurado
C. e. p. Expediente del Alumno

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

NOMBRE: Aida Gabriela Guzmán López

FECHA: 9 Abril 2003

FIRMA: Aida G. Guzmán L.

B

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Luis Felipe Jiménez García y con apoyo de una beca de CONACYT (proyecto 28002N).

Comité Tutorial

Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dr. Omar Homero Pantoja Arroyo
Dra. María de Lourdes Segura Valdes

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Las plantas con flores	9
Hipótesis	15
Objetivo	15
Material y métodos	16
Material biológico	16
Microscopía de luz y fuerza atómica	17
Microscopía electrónica	18
Inmunolocalización	18
Resultados	23
Microscopía de luz	23
Microscopía electrónica	24
Microscopía de fuerza atómica	25
Discusión	32
Conclusiones	36
Referencias	37

D

Resumen

El núcleo celular presenta dominios macromoleculares relacionados con la expresión génica. En plantas hay dos tipos de núcleos el reticulado y el cromocéntrico, dependiendo del arreglo de la cromatina compacta. Además, existen partículas ribonucleoproteicas (RNP) asociadas como los gránulos de Lacandonia, descritos para la planta *Lacandonia schismatica*. Estudios recientes sugieren la presencia de estas partículas asociadas a la cromatina reticulada en varios grupos de plantas. En este trabajo se estudió el tipo de cromatina y las RNP asociadas por medio de microscopía de luz, electrónica y de fuerza atómica en las especies de angiospermas *Illicium floridanum* y *Pelargonium hortorum*. Los resultados indican que en *I. floridanum* la cromatina es reticulada y en *P. hortorum* es cromocéntrica. Sin embargo, los gránulos de Lacandonia se presentan en las dos especies. Estos datos sugieren que la presencia de gránulos antecede al origen de las angiospermas

Introducción

En los eucariontes, los ácidos nucleicos se encuentran delimitados por una doble membrana, dentro del territorio nuclear. Las diversas actividades de los ácidos nucleicos como la replicación y la transcripción se realizan dentro de estos confines. La organización de este material puede estar estructurado dependiendo de su estado de actividad o inactividad (Lewin, 2001).

Los estados condensados de los ácidos nucleicos se debe a su unión a proteínas básicas. Las cargas positivas de estas proteínas neutralizan las cargas negativas de los ácidos nucleicos, por lo que se forman complejos desoxi o ribonucleoproteicos como resultado de las interacciones de las proteínas con el ácido desoxirribonucleico (DNA) o el ácido ribonucleico (RNA) (Lewin, 2001).

El DNA que ocupa áreas compactas dentro del núcleo es denominado cromatina en el estado del ciclo celular conocido como interfase (Lewin, 2001). Por consiguiente el DNA se mantiene en un compartimento separado del citoplasma, que es en donde se producen la mayoría de las reacciones metabólicas de la célula (Alberts y col., 1994).

El núcleo de todas las células en interfase, posee los mismos componentes básicos. Sin embargo, no tienen igual aspecto en todas ellas (Cormarck, 1988). El núcleo es el organelo más grande, por lo que se puede observar fácilmente al microscopio óptico a bajos aumentos. Las células con núcleo realizan todas las funciones propias de los seres vivos: se nutren, respiran, crecen, se reproducen, etc.

El núcleo puede ser dividido en dos componentes principales: la envoltura nuclear y el interior, llamado nucleoplasma. Dentro del nucleoplasma, el nucléolo es algunas veces considerado como una entidad independiente (Raska y col., 1990).

La envoltura nuclear separa espacialmente al nucleoplasma del citoplasma, debido a que es una estructura formada por una doble membrana que juega un papel en la regulación de los intercambios núcleo-citoplasma de moléculas y de complejos macromoleculares. Así mismo, es el posible sitio de anclaje para la cromatina en la interfase. La envoltura nuclear está formada por una membrana externa, que se continúa con el retículo endoplásmico rugoso y una membrana interna, que es adyacente a la lamina nuclear y a la cromatina. Las membranas externa e interna se fusionan en varios lugares, formando los poros nucleares. Estos poros están constituidos por complejos macromoleculares llamados complejos del poro, los que controlan el paso de moléculas en el núcleo (Spector, 1993).

El término nucleoplasma se refiere a la parte interna del núcleo celular, en donde el nucleolo está cercano a las áreas de cromatina condensada y otras dos regiones morfológicamente diferenciables: el área pericromatiniana que consiste en regiones que rodean a la cromatina condensada y el espacio intercromatiniano (Raska y col., 1990). Además, el interior nuclear está compuesto de una matriz, que es un complejo de varias proteínas características, aún no del todo definidas (Jiménez-García y Segura- Valdez, 1993).

El nucléolo es una región altamente especializada del núcleo, en donde se realizan la transcripción de los genes ribosómicos, la formación de partículas prerribosómicas y el procesamiento del RNA pre-ribosómico. El nucléolo no está rodeado por una membrana, pero en este sitio se encuentran localizadas discretas regiones funcionales (Raska y col., 1990; Spector, 1993; Vázquez-Nin y Echeverría, 1995).

Con ayuda del microscopio electrónico de transmisión y usando la técnica de contraste de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas, han sido definidas las siguientes partículas en el interior del núcleo: los gránulos intercromatinianos (GI), las fibras pericromatinianas (FP), dos tipos de cuerpos nucleares: un cuerpo

nuclear simple (CNS) y los cuerpos espiralados y los gránulos pericromatinianos (GP) en diversos tipos celulares de mamíferos (Monneron y Bernhard, 1969). Estas estructuras de naturaleza ribonucleoproteica describen un patrón constante de distribución dentro del núcleo y son vistas con un denso contraste, en comparación con la cromatina que se observa con un bajo contraste (Monneron y Bernhard, 1969) (ver Figura 1).

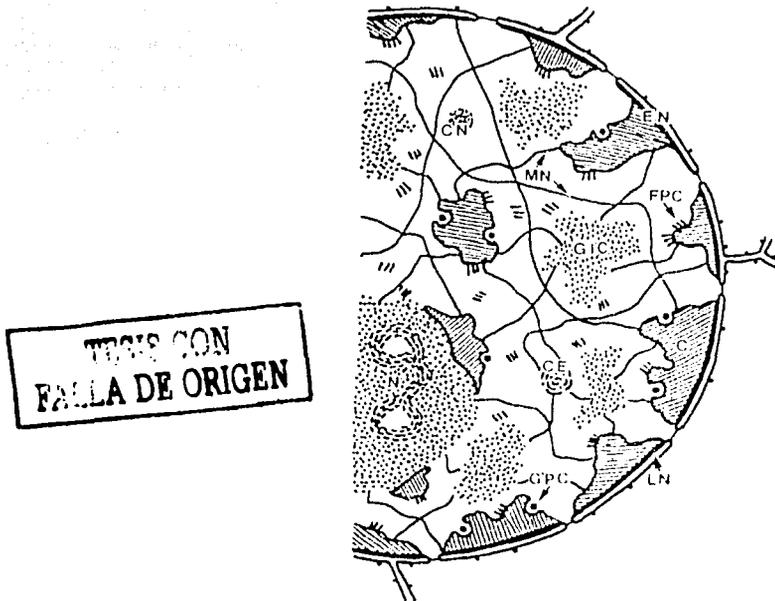


Figura 1 Organización ultraestructural del núcleo celular en interfase. Se pueden localizar los principales componentes. EN, envoltura nuclear; LN, lámina nuclear; MN, matriz nuclear; C, cromatina; N, nucléolo; CN, cuerpos nucleares; CE, cuerpos espiralados; GPC, gránulos pericromatinianos; GIC, granulos intercromatinianos; FPC, fibras pericromatinianas. (Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993).

Los gránulos intercromatinianos (GIC) son de 10 a 20 nm de diámetro aproximadamente. Están presentes en grupos en la región intercromatiniana. Parecen ser estructuras relacionadas con el almacén y/o ensamblado de proteínas y RNAs involucrados en el procesamiento postranscripcional de pre-mRNA. Además, los GIC incorporaron uridina tritiada lentamente, lo que indica que contienen ARN más bien estable y de poco recambio (Spector, 1993; Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993). Estas estructuras contienen factores de splicing que aparentemente responden a la transcripción por algún mecanismo de reclutamiento que los dirige a las FPC (Jiménez-García y Spector, 1993).

Las fibras pericromatinianas (FPC) están compuestas por filamentos enrollados de 3 a 5 nm de diámetro. La descripción de estos componentes fue lograda por la utilización del contraste de Bernhard, que representa estructuras que contienen pre-RNA preferencialmente. Las FPC pueden aparecer como una mezcla heterogénea de estructuras teñidas en la región pericromatiniana del núcleo celular. Sin embargo, acorde con la definición morfológica, las FPC están situadas en la pericromatina y en el espacio intercromatiniano. Por medio de estudios citoquímicos se ha establecido que las FPC son elementos estructurales que contienen pre-RNA transcrito fuera del nucléolo (Vázquez-Nin y Echeverría, 1995). Estas fibras son el sustrato morfológico de la transcripción, pues incorporan uridina tritiada rápidamente; su presencia es inducida por hormonas que activan la transcripción y contienen, además, proteínas relacionadas con la maduración del pre-mRNA.

Los cuerpos espiralados son cuerpos de agregados de fibrillas y gránulos con un diámetro de 30 a 60 nm aproximadamente. El tamaño más grande es de menos de un micrómetro, se encuentran altamente contrastados después de la utilización de la técnica de Bernhard, lo que demuestra que están formados por partículas ribonucleoproteicas (Raska y col., 1990). Los cuerpos espiralados contienen material relacionado con el metabolismo tanto del pre-rRNA, como del

pre-mRNA (Jiménez-García y Spector 1993), como el U3SnRNA (Jiménez-García y col., 1994).

Los gránulos pericromatinianos (GPC) se encuentran en las regiones pericromatinianas, su tamaño puede ser entre 35 y 50 nm y están rodeados por un halo claro. De acuerdo a varias extracciones enzimáticas y químicas, los GPC están compuestos por ribonucleoproteínas (RNP) y están formados de filamentos enrollados. Pueden ser encontrados como gránulos solos o en grupos, en este último caso ocurre frecuentemente después de la alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos. Estos gránulos pueden tener un origen pericromatiniano o nucleoplásmico. Algunos estudios citoquímicos indican que estos gránulos pueden servir como partículas de transporte y/o almacenamiento de RNA mensajero maduro que es transcrito a partir de algunos genes específicos (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

La organización del núcleo en interfase en plantas se ha descrito que varía dentro de los diferentes grupos (Lafontaine y Lord, 1974) y posee un patrón estructural similar al de los animales. Esto ha sugerido que las principales variaciones en las estructuras nucleares es una característica más antigua a la adquisición de los cloroplastos por los ancestros de las plantas y una vez adquiridos los patrones nucleares, estos patrones se han conservado a través del tiempo (Jiménez-García y col., 1989).

Diversos aspectos estructurales y ultraestructurales nucleares en plantas están relacionados con los diferentes patrones de la organización de la cromatina (Moreno Díaz de la Espina y col., 1992).

En las plantas se pueden presentar dos tipos de núcleos: el cromocéntrico y el reticulado, dependiendo del arreglo de la cromatina. Además, se ha observado que la organización ultraestructural es muy similar en ambos tipos de núcleos, excepto por la distribución topológica de los gránulos intercromatinianos que no

forman grandes grupos en plantas como en los núcleos de células animales (Moreno Díaz de la Espina y col., 1992).

El núcleo cromocéntrico como el de *Lycopersicon esculentum* (dicotiledónea) presenta grumos densos de cromatina o cromocentros que se asocian frecuentemente a la envoltura nuclear y en algunas ocasiones a estructuras semejantes a centrómeros. El nucléolo se encuentra localizado centralmente dentro del núcleo y en algunas ocasiones parece estar anclado a la envoltura nuclear por la cromatina asociada al nucléolo que es muy evidente y se distingue como parches densos que contactan con el organizador nucleolar. Con la técnica contraste de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas se observan abundantes estructuras ribonucleoproteicas como gránulos y fibras en las regiones inter y pericromatinianas. (Moreno Díaz de la Espina y col. 1992).

Lo gránulos pericromatinianos en el núcleo cromocéntrico pueden presentarse aislados o en pequeños grupos en la periferia de la cromatina compacta y los gránulos intercromatinianos se distribuyen a lo largo de la región intercromatiniana asociada con fibras delgadas aparentemente formando una red (Moreno Díaz de la Espina y col. 1992)

El núcleo reticulado se presenta en la mayoría de los grupos de plantas (Jiménez-García y col., 1989). Ultraestructuralmente muestra cuatro dominios, la envoltura nuclear, el nucléolo, áreas de cromatina condensada y la región intercromatiniana (Moreno Díaz de la Espina y col.1991).

Las áreas de cromatina condensada en el núcleo reticulado presentan masas de cromatina en forma de hebra que reciben el nombre de cromocentros, estos se tiñen fuertemente, se encuentran suspendidos en el nucleoplasma y se asocian a la envoltura nuclear o con el nucléolo formando una intrincada red (Lafontaine y Lord, 1974).

La región intercromatiniana presenta una alta concentración de componentes granulares y fibrilares. Algunos de los componentes granulares pueden ser gránulos pericromatinianos e intercromatinianos (Díaz de la Espina, 1991).

Descripciones del núcleo celular de *Lacandonia schismatica* determinan que es del tipo reticulado, presenta fibras pericromatinianas, no se aprecian gránulos pericromatinianos e intercromatinianos. Ocasionalmente se distinguen centrómeros a lo largo de la cromatina compacta. Además, se encontraron estructuras anulares y complejos sinaptonémicos (Jiménez-García y col., 1992).

El núcleo de *L. schismatica* presenta abundantes grupos de gránulos de alrededor de 32 nm de diámetro en el espacio pericromatiniano e intercromatiniano. Estos gránulos son evidentes con la técnica de contraste de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas, a los cuales se les denominó gránulos de Lacandonia (GL) (Jiménez-García y col., 1992) Estos se pueden encontrar aislados o en grupos, dependiendo del tejido observado (Agredano-Moreno y col., 1994). Junto a estos gránulos hay fibras pericromatinianas que se encuentran al borde de la cromatina compacta en unión con GL formando un medio fibrogranular (Jiménez-García y col. 1992)

Diversos estudios sobre lo GL mencionan que estos se pueden localizar en los extremos de masas de cromatina en donde se localizan en los sitios de reensamblaje de unidades de transcripción. Los GL al ser tratados con RNAsa desaparecen y cuando se contrastan con la técnica de oxinitrato de bismuto no son evidentes. Además, cuando se utiliza la inmunolocalización para sn-URNP solo se observa marca en la periferia de estos gránulos y cuando se localiza DNA se marcan las fibras que interconectan a los GL, por lo que estas evidencias muestran que están relacionados con los gránulos pericromatinianos y con los gránulos de Balbiani de los cromosomas politénicos (Agredano-Moreno y col., 1994).

Estudios recientes sobre los GL en los periodos de floración de *L. schismatica* demuestran que los GL son más abundantes en el periodo de pre-antesis y disminuyen en el periodo pos-antesis. Utilizando la técnica de inmunolocalización para proteínas SR, estas se detectaron en ciertas regiones de las fibras que interconectan a los GL y algunas sobre estos gránulos. Con la técnica de hibridación *in situ* con poly (A)+RNA y usando DNA genómico como sonda para localizar RNA, se detectó marca en el área no cromatiniana incluyendo a un gran número de GL y en fibras asociadas. Estos datos proporcionan nueva evidencia para relacionar a los GL con los gránulos pericromatinianos y gránulos de Balbiani (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000).

LAS PLANTAS CON FLORES

Las plantas con flores o angiospermas son de gran importancia ecológica debido a que definen a los diferentes habitats existentes en el planeta. La diversidad de las angiospermas es de alrededor de 300,000 especies vivientes clasificadas en alrededor de 350 familias (Crepet, 1998). El origen y relación de las angiospermas se encuentra en medio de uno de los misterios evolutivos más persistentes (Kenrick, 1999).

Desde hace más de 100 años los botánicos han buscado las diferentes relaciones entre las angiospermas y el resto de las plantas superiores, lo que ha favorecido el estudio de los diversos grupos de plantas para llenar el vacío en el conocimiento del reino de las plantas. Además, han aparecido dudas alrededor de las angiospermas debido al descubrimiento de restos fósiles de tipos florales y de distintos taxa que datan de hace 90 millones de años, causando cambios en el pensamiento sobre el origen de las angiospermas. Los cambios comprenden el intervalo de conocimiento de la radiación de las angiospermas o alternativamente se sugiere un grupo muy antiguo todavía no detectado que pudo dar origen a este grupo de plantas (Crepet, 1998).

La revisión de las relaciones filogenéticas en plantas con flores es una empresa difícil, debido al tamaño, diversidad del grupo y particularmente, a su rápida diversificación durante el inicio del Cretácico (hace 130-90 millones de años). Las angiospermas difieren considerablemente del grupo evolutivo más cercano, las gimnospermas, creando un problema adicional de base del árbol familiar (Kenrick, 1999; Qiu y col., 1999). Se piensa con base en los diferentes datos que la división entre las angiospermas y las gimnospermas ocurrió mucho más tempranamente que lo corrientemente propuesto, posiblemente al final del Carbonífero, 290 millones de años atrás (Kenrick, 1999).

Estudios morfológicos de las angiospermas que toman en cuenta diferentes datos las consideran como un grupo monofilético "Anthophyta" . Esto se basa en relación con dos grupos de plantas que presentan estructuras reproductoras parecidas a flores, las Gnetales y las extintas Bennettitales (Crepet, 1998).

Estudios moleculares mediante el análisis de secuencias de diferentes genes, han deducido que las Gnetales están más relacionadas con las gimnospermas que con las angiospermas. En relación con diversos análisis que toman en cuenta las características morfológicas, secuencia de ácidos nucleicos y datos filogenéticos, se tiene la hipótesis de un grupo ancestral que posiblemente esté representado en la subclase Magnoliidae, que probablemente tenga flores muy pequeñas y simples (Crepet, 1998; Qui 1999).

Trabajos de sistemática molecular en angiospermas que incluyen algunos de los más grandes análisis filogenéticos intentados para cualquier grupo de organismos, confirmaron la existencia de un grupo mayor (eudicotiledoneas) que tienen la característica de presentar polen de tipo triaperturado e incluye muchas dicotiledóneas. La gran organización de la división entre dicotiledóneas y monocotiledóneas se basa principalmente en la embriología (número de semillas y hojas) morfología de la hoja (tipo de venación) y organización floral (número de partes). Se ha planteado que varias de las subclases tradicionales reconocidas

como Dilleniidae y Hamamelidae no se deben considerar como grupos naturales (Kenrick, 1999).

Como los brazos principales del árbol filogenético de las angiospermas hay una fuerte evidencia de un grupo falso llamado dicotiledonia magnoliid, un pequeño grupo (únicamente alrededor del 3% de la diversidad de especies vivientes), que incluye formas familiares como liliáceas acuáticas (Nymphaeales) pimientos verdaderos (Piperales), magnolias y otras diversas familias como las Winteraceae, Chloranthaceae y Lauraceae. Debido a esto el patrón exacto de los brazos de las líneas basales ha permanecido obscura (Kenrick, 1999) (ver figura 2).

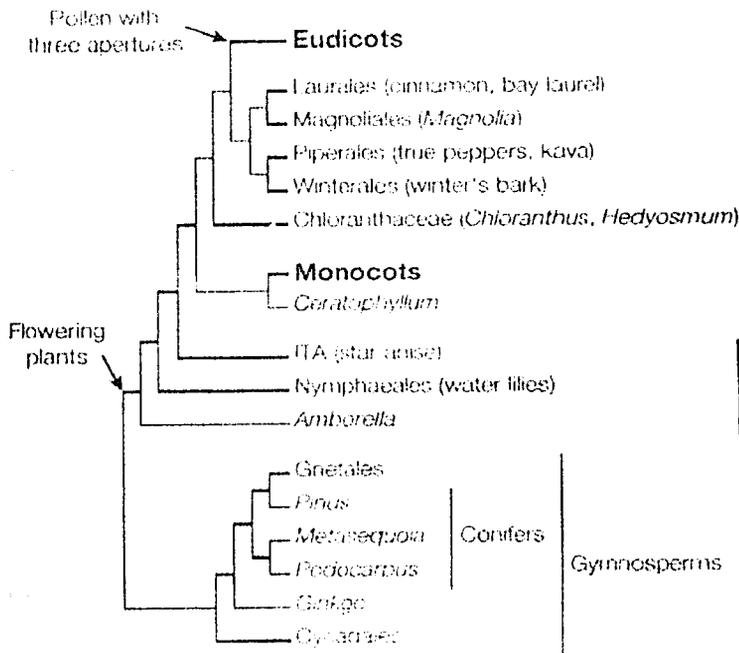


Figura 2. Árbol filogenético que muestra la relación de los principales grupos de plantas con flores y las Gimnospermas (Kenrick, 1999).

Los análisis de la secuencia de los genes de los fitocromos PHYA y PHYC de 26 especies de angiospermas mostraron que *Amborella* se encuentra en la base filogenética de las angiospermas y el resto son grupos hermanos. Estos resultados sugieren que las primeras angiospermas probablemente fueron plantas leñosas y que en algún momento pudieron cambiar su morfología a plantas herbáceas o arbusto, lo que pudo ocasionar una mayor radiación de las angiospermas (Matheus y Donoghue, 1999).

Otros estudios sobre las relaciones entre angiospermas con base en las secuencias de los genes *rbcL*, *atrB* y 18s rDNA de 190 especies y tres grupos externos mostró un incremento en la resolución del árbol filogenético, obteniendo que en las primeras ramas de las angiospermas se encuentra *Amborella*, *Nymphaeaceae*, *Autrabaleya*, *Illicium* y *Schisandra*. Estas se relacionan con las monocotiledóneas al mismo nivel, además, se puede reconocer otro grupo, las eudicotiledóneas (Soltis y col, 1999) (ver figura 3 y 4). Las eudicotiledóneas se caracterizan principalmente por su tipo de polen triaperturado (Kenrick 1999).

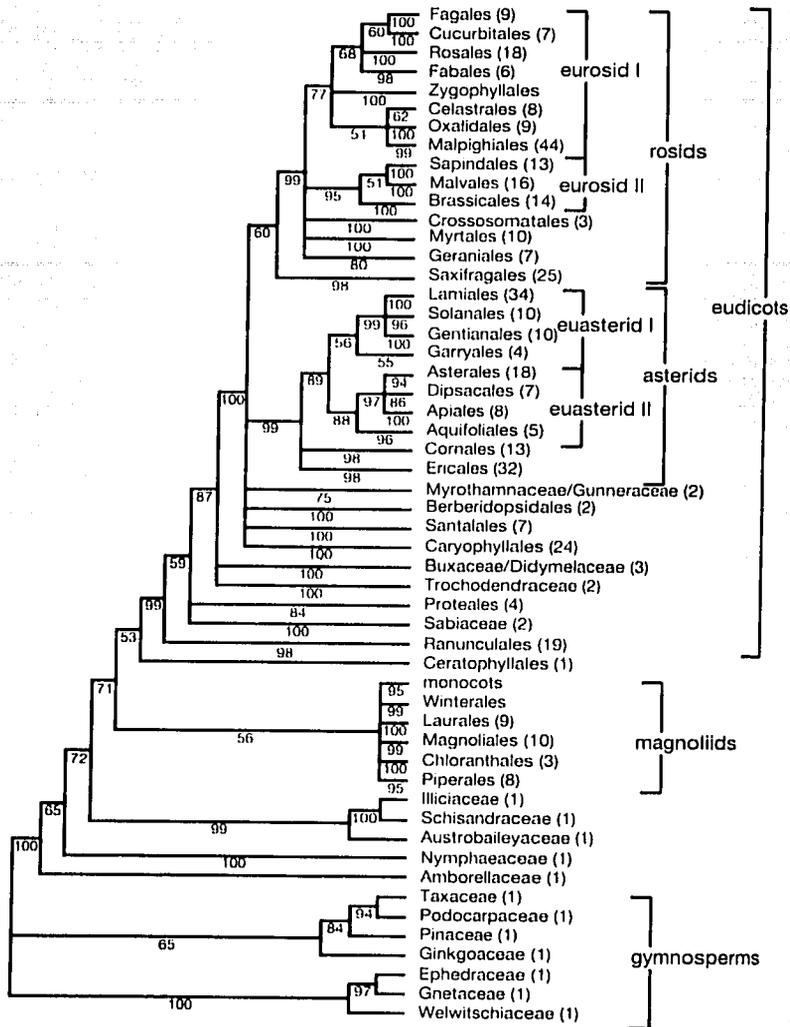


Figure 1 Summary of phylogenetic relationships for eudicots, magnoliids, and gymnosperms.

Figura 3. Relación filogenética de los diferentes grupos de angiospermas, inferida mediante el análisis de tres RNAs ribosómicos (Soltis y col., 1999).

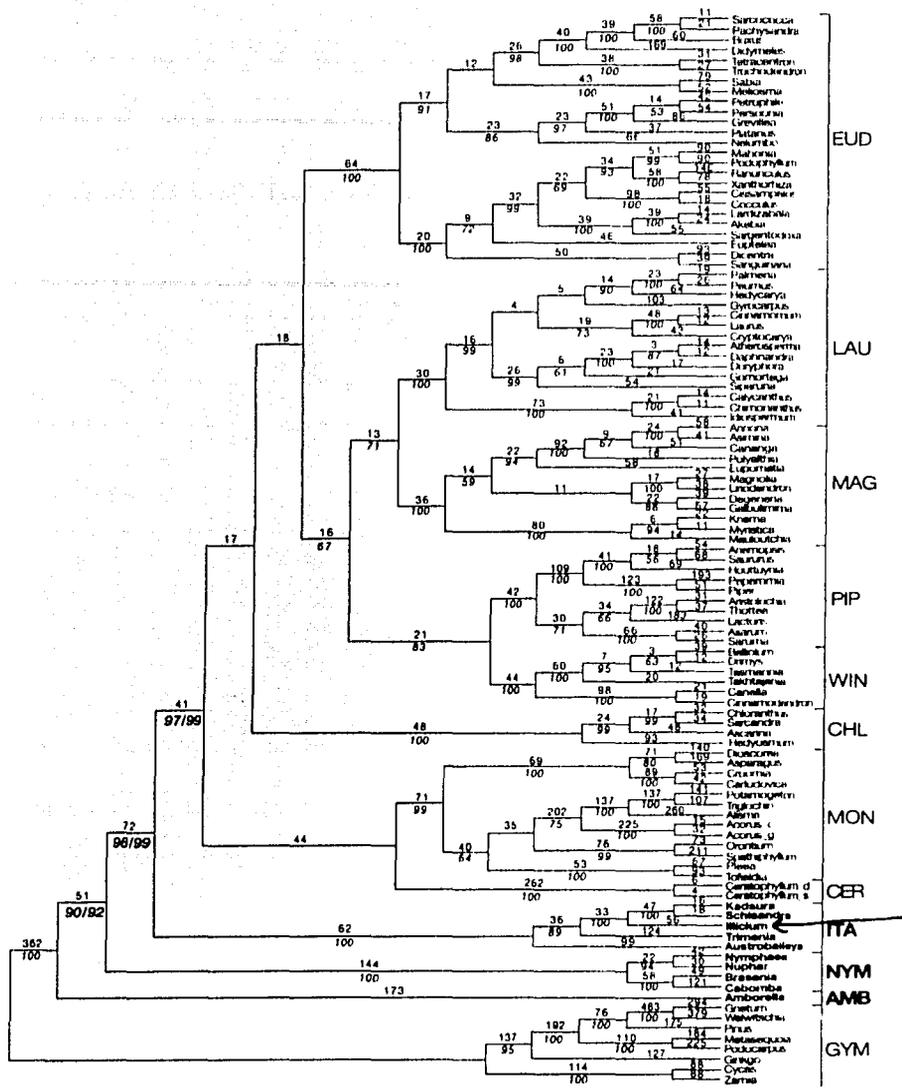


Figura 4 . Relación filogenética de los diferentes grupos de angiospermas, inferida mediante el análisis de la secuencia de DNA de cinco genes. (Qui y col., 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Si en plantas muy antiguas con núcleos reticulados se encuentran presentes los gránulos de Lacandonia, entonces, en plantas con núcleos cromocéntricos que son más modernas se pueden observar este tipo de partículas.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar con microscopía de luz, electrónica y de fuerza atómica la estructura del núcleo celular de dos especies de angiospermas (*Pelargonium hortorum* e *Illicium florindanum*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer el tipo de arreglo de la cromatina del núcleo celular de las especies *Pelargonium hortorum* e *Illicium florindanum*, mediante el empleo de las técnicas de DAPI e inmunolocalización para microscopía electrónica

Describir el tipo de ribonucleoproteínas presentes en los núcleos de las especies *Pelargonium hortorum* e *Illicium florindanum*

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Se colectaron ejemplares de *Pelargonium hortorum* y de *Illicium florindanum*. De las regiones de los meristemos apicales se tomaron las hojas más jóvenes, las cuales se cortaron en pequeños fragmentos de alrededor de 1 mm³. De los fragmentos, unos se tomaron para ser fijados en paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos a un pH de 7.2, otros fragmentos se fijaron en glutaraldehído al 6 % disuelto en amortiguador de fosfatos a un pH de 7.2, se fijaron durante toda la noche (ver figura 5).

Los fragmentos fijados en paraformaldehído se lavaron con amortiguador de fosfatos, se deshidrataron en alcohol metílico en las siguientes concentraciones, 30%, 50%, y 70% durante 5 minutos; los dos primeros alcoholes se encontraban a una temperatura de 4°C y el tercero a -20°C. Se continuó con alcohol al 90% durante 30 minutos a una temperatura de -20°C. Se infiltraron inicialmente con una solución 1:1 y 1:2 de resina Lowicryl K4M y alcohol metílico al 90% durante una hora respectivamente a -20°C, se siguió infiltrando con resina pura, un cambio de 1 hora y otro con resina pura que se dejó durante la noche, todo esto a una temperatura de -20°C. Los fragmentos se incluyeron en cápsulas de grenetina y se polimerizaron dentro de una cámara de luz ultravioleta a 4°C por 48 horas. Se obtuvieron bloques, de los cuales se realizaron cortes semifinos para ser observados con microscopía de luz de campo claro, microscopía de fluorescencia y para microscopía de fuerza atómica. De estos bloques también se obtuvieron cortes finos para realizar la técnica de inmulo-localización ultraestructural (ver figura 5).

Los fragmentos fijados en glutaraldehído se lavaron en amortiguador de fosfatos, unos fragmentos fueron postfijados con tetraóxido de osmio al 1% durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron en amortiguador de fosfatos. Al

termino de este proceso los fragmentos postfijados y sin postfijar se deshidrataron en alcohol etílico a las siguientes concentraciones: 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, dos cambios de 10 minutos cada uno; después se colocaron en un agente intermediario, el óxido de propileno, dos cambios de 10 minutos cada uno. Se continuó con la pre-inclusión en una mezcla de epon-óxido de propileno 1:1 toda la noche. Al día siguiente se incluyeron en moldes de plástico con epon puro polimerizando a 60°C en una estufa. Se obtuvieron bloques los cuales fueron tallados para realizar cortes semifinos de 1 μ m de grosor, se montaron en porta objetos, se tiñeron con azul de Toluidina, para ser observados con el microscopio de luz con la finalidad de seleccionar una zona que presentara la mayor cantidad de núcleos; se realizó un tallado más pequeño del bloque para obtener cortes finos de un color dorado-plateado que corresponden a un grosor de 120- a 60 nm, para ser observados en el microscopio electrónico de transmisión.

Microscopía de Luz y Microscopía de Fuerza Atómica

De los cortes semifinos obtenidos unos fueron colocados en portaobjetos los cuales se adhirieron por medio de calor y se tiñeron con azul de Toluidina al 1% para ser observados con el microscopio de luz y se tomaron fotografías. Otros cortes se colocaron en portaobjetos, se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI (4,6-Diamidino-2-fenilindol dicloruro), se observaron con un microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron (ver figura 6).

Se realizaron cortes semifinos se colocaron en porta objetos y se tiñeron con azul de Toluidina al 1%, se observaron con el microscopio de fuerza atómica registrándose la imagen de forma digital.

Microscopía Electrónica

Se realizaron cortes finos del material que fue postfijado, se montaron en rejillas de cobre cubiertas con una membrana plástica (formvar), se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observaron con el microscopio electrónico de transmisión, se seleccionaron las mejores zonas del material y se fotografiaron los núcleos.

Del material que no fue postfijado también se obtuvieron cortes finos los cuales se contrastaron mediante la técnica de contraste preferencial Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas, en donde se realiza un contraste de acetato de uranilo seguido de un proceso quelante con EDTA y terminando con un contraste de citrato de plomo (ver figura 7).

Inmunolocalización

Se obtuvieron corte finos de color gris y se montaron en rejillas de oro cubiertas con una membrana plástica (formvar). Los cortes adheridos a las rejillas se pusieron a flotar en una solución de TBS dentro de una cámara húmeda durante 1 hora; después se cambiaron a una solución que contenía el anticuerpo primario (α -DNA o α -proteínas SR) diluido en amortiguador de fosfatos en una razón de 1:10 durante toda la noche a una temperatura de 4°C. A continuación se lavaron en TBS por 15 minutos; se continuó colocando los cortes adheridos a las rejillas en las solución que contenía el anticuerpo secundario que estaba acoplado a partículas de oro de 18 nm diluido en amortiguador de fosfatos en una razón de 1:20 durante una hora. Al termino de este proceso se lavaron en TBS durante 15 minutos y agua bidestilada de 3 a 5 cambios de 10 minutos cada uno, se dejaron secar y se contrastaron en acetato de uranilo durante 5 minutos (ver figura 8).

FIGURA 5 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

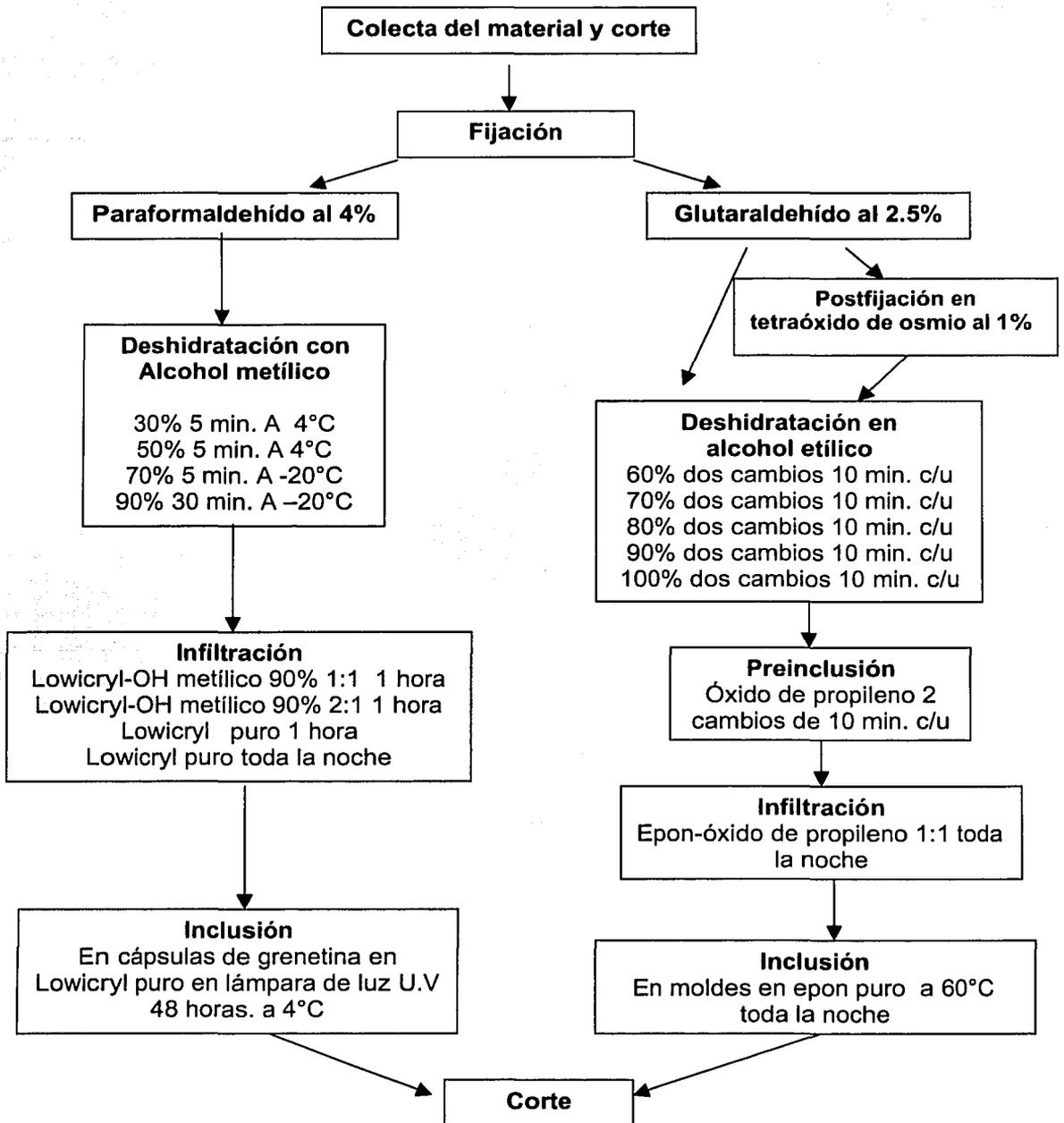


FIGURA 6 MICROSCOPIA DE LUZ Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

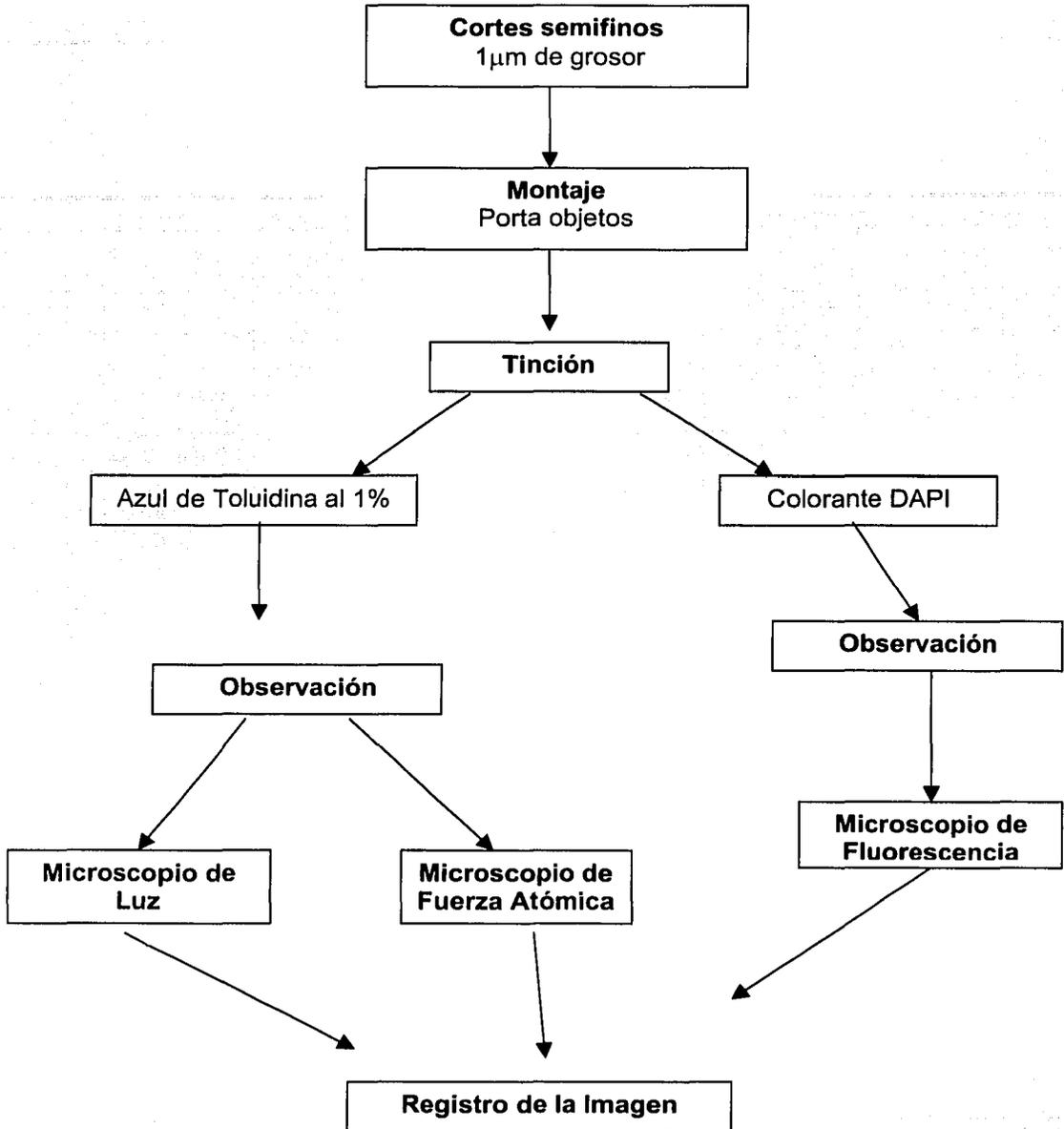


FIGURA 7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

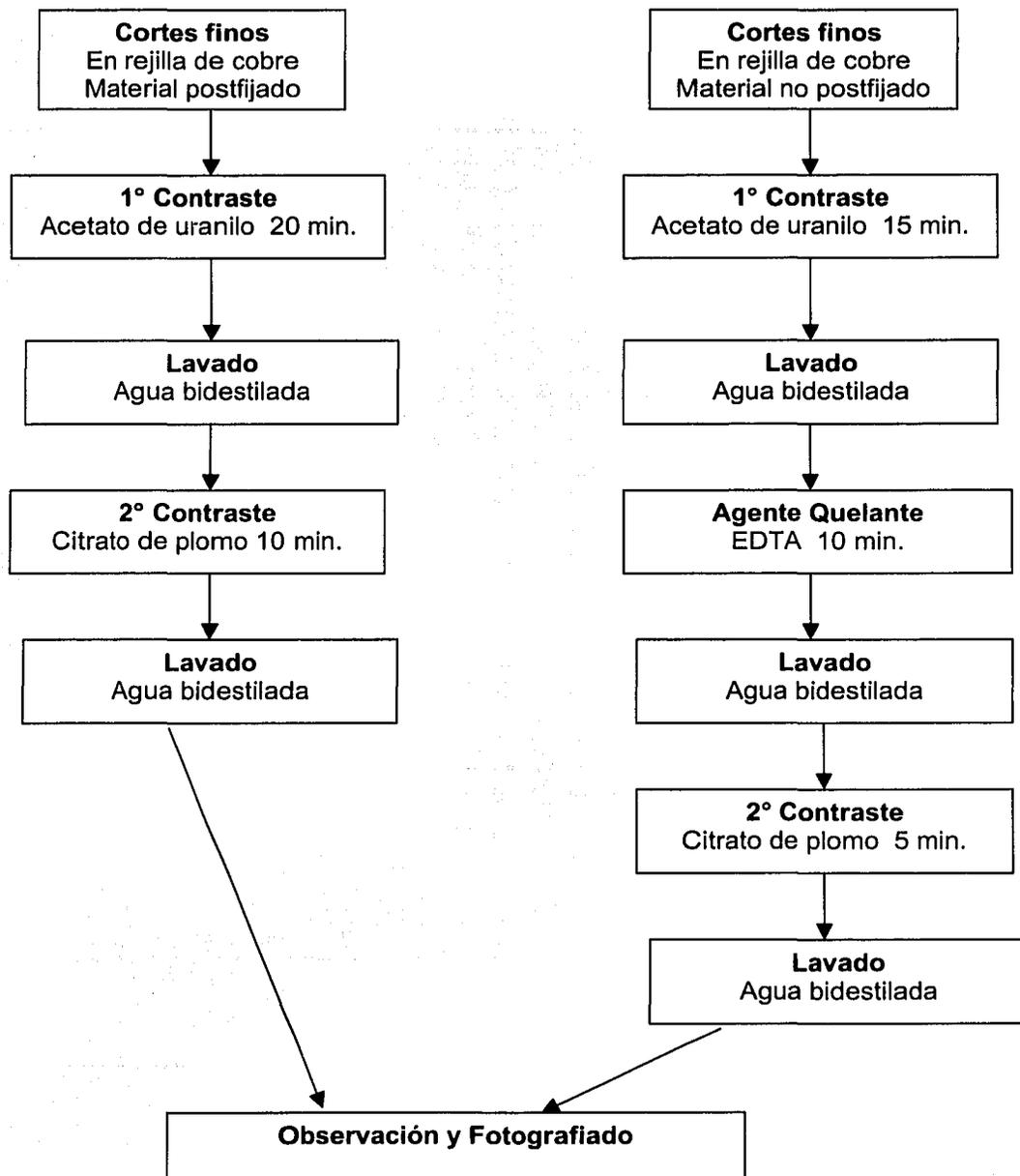
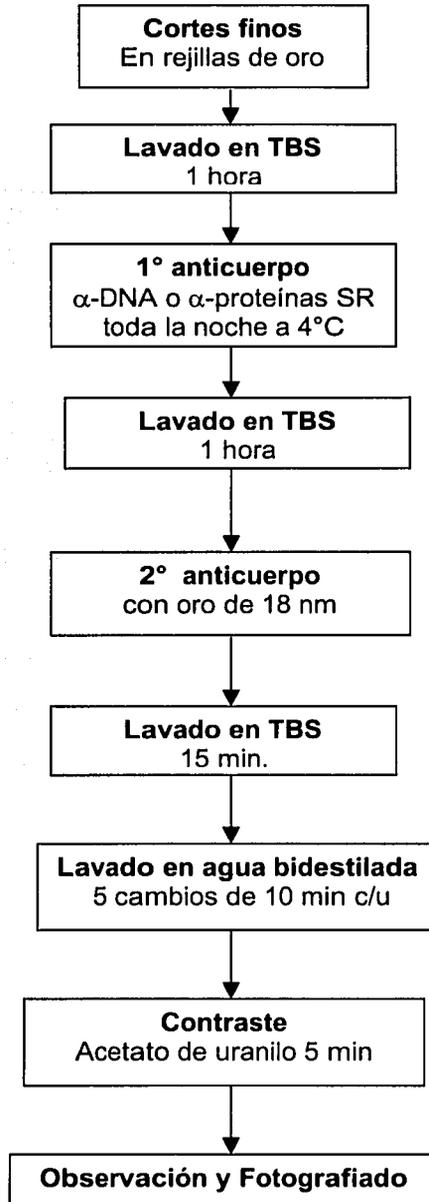


FIGURA 8 INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL



Resultados

Microscopía de Luz

Se revisaron una serie de 5 cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de *I. florindanum*, se observó que los núcleos son de forma esférica, presentan cromatina compacta de coloración intensa con una disposición reticular; además, se evidenciaron de uno a dos nucléolos por núcleo y estos se tiñeron fuertemente (ver figura 9 A). Con respecto a los cortes semifinos de *I. florindanum* teñidos con el colorante fluorescente DAPI se observó una serie de 5 cortes en que la cromatina en el núcleo presenta una disposición reticular de color azul brillante y lo que corresponde al espacio intercromatiniano de color azul más oscuro, el nucléolo se nota de color amarillo y está hacia la periferia del núcleo (ver figura 9 B).

En relación a los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de *P. hortorum*, se revisaron una serie de 5 cortes, los núcleos celulares son de forma esférica y el arreglo de la cromatina es en pequeños grumos que se pueden localizar adosados a la membrana nuclear o algunos se encuentran dispersos en el nucleoplasma, el nucléolo se tiñe intensamente y es muy prominente (ver figura 9 C). De los cortes teñidos con el colorante DAPI, se puede observar el arreglo de la cromatina en forma de grumos de color brillante adosados a la membrana nuclear y unos grumos distribuidos en el nucleoplasma el espacio intercromatiniano se observa de color más oscuro dentro del núcleo, el nucléolo no es muy evidente pero se presenta de forma esférica de color amarillento muy tenue y es de gran tamaño (ver figura 9 D).

Microscopía electrónica

En el núcleo de *I. florindanum* se presenta la cromatina compacta que se nota como fibras gruesas que se distribuyen por el núcleo de forma reticular y parte de las fibras se adosan a la membrana nuclear, en el espacio intercromatiniano se distribuyen grupos de gránulos de Lacandonia y fibras pericromatinianas (ver figura 10 A).

En el núcleo de *P. hortorum* es notable la presencia de grumos de cromatina compacta adosados a la membrana nuclear y distribuidos por el interior del núcleo. El nucleolo se observa de manera prominente en comparación con los grumos de cromatina, además se observa un cuerpo asociado al nucleolo y esté esta formado por cromatina. En el espacio intercromatiniano se distingue material de forma irregular y pequeños grupos de gránulos de Lacandonia (ver figura 10 B).

Con el empleo de la técnica de inmulocalización para DNA se observa en los núcleos de *I. florindanum* que el sitio de localización de la marca de oro esta presente en las zona en donde se encuentra la cromatina compacta ya sea en forma de fibras gruesas o cúmulos de diferentes tamaños. El nucleolo también muestra marca y en el espacio intercromatiniano no se nota marca de oro (ver figura 11 A). En los núcleos de *P. hortorum* se observa la marca de oro en las zonas en donde se presenta cromatina compacta en grumos de diferentes dimensiones, en el nucléolo también se evidencia la marca (ver figura 11 B).

Mediante la técnica de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas en el núcleo de *I. florindanum* la cromatina compacta se encuentra formando fibras gruesas de color claro. En el espacio intercromatiniano se localizan gran cantidad de cúmulos de gránulos de Lacandonia que son evidentes ya que son estructuras de color oscuro (ver figura 12 A). En el núcleo de *P. hortorum* la cromatina

compacta se ve de color claro y los gránulos de Lacandonia están formando pequeños grupos distribuidos por el espacio intercromatiniano (ver figura 12 B).

Con la inmunolocalización para proteínas SR en los núcleos de *I. hortorum* y *P. hortorum* la marca con oro se observa en el espacio intercromatiniano y alrededor de los gránulos de Lacandonia, no se encuentra marca sobre la cromatina compacta (ver figura 13 A y B).

Microscopia de fuerza atómica

El núcleo de *I. hortorum* presenta forma esférica, la cromatina compacta se presenta en forma de fibras gruesas que se distribuyen a manera de red fina por todo el núcleo; el nucléolo es evidente de tamaño pequeño y se encuentra cercano a la membrana nuclear (ver figura 14 A). El núcleo de *P. hortorum* presenta grumos de cromatina en su mayoría adosados a la membrana nuclear y algunos distribuidos por el núcleo, el nucléolo es de gran tamaño y se localiza hacia uno de los extremos del núcleo (ver figura 14 b).

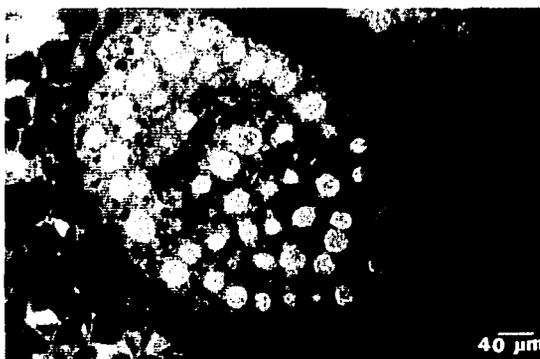
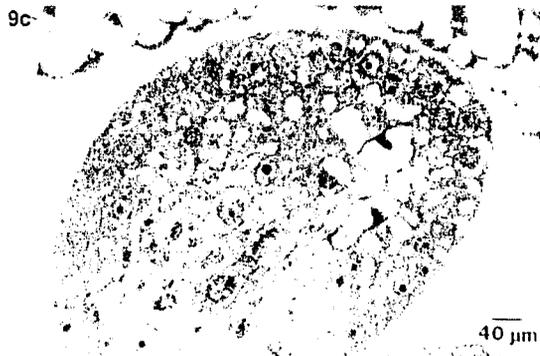
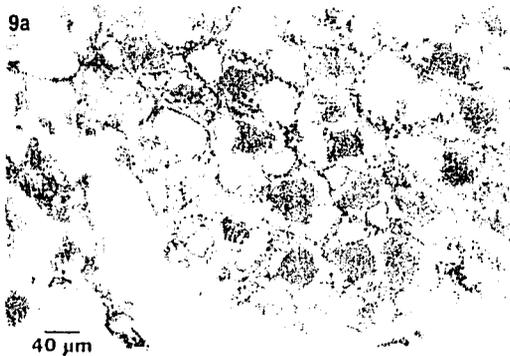


Fig. 9a Corte semifino de *I. floridanum*, teñido con azul de Toloidina. El núcleo celular presenta un arreglo reticulado de la cromatina y 1 o 2 nucleolos prominentes.

Fig. 9b Corte semifino de *I. floridanum* observado con microscopía de fluorescencia. La cromatina del núcleo presenta una disposición reticulada de color azul brillante debido a la utilización del colorante DAPI que se une específicamente al DNA.

Fig. 9c Corte semifino de *P. hortorum*, teñido con azul de Toloidina. El núcleo celular es tipo cromocéntrico. El nucleolo es prominente y se tiñe fuertemente.

Fig. 9d Corte semifino de *P. hortorum* observado con microscopía de fluorescencia. El núcleo celular es de tipo cromocéntrico. Se distingue la cromatina adosada a la membrana nuclear de color azul brillante debido al colorante DAPI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TECNO CON
FALLA DE ORIGEN

10a

10b



Fig. 10a Imagen a microscopía electrónica del núcleo de *I. floridanum*. La cromatina compacta (C), tiene un arreglo reticular en el espacio intercromatiniano se encuentran distribuidos grupos de gránulos de Lacandonia (flechas). En el citoplasma se pueden observar ribosomas (cabecita de flecha). Urani o-plomo.

Fig. 10b Imagen de *P. hirtorum*, se aprecia grupos de cromatina compacta (C), adosada a la membrana nuclear, un nucleolo muy prominente (N), grupos pequeños de gránulos de Lacandonia (flechas) y un cuerpo asociado al nucleolo (Nbi. Urani o-plomo).

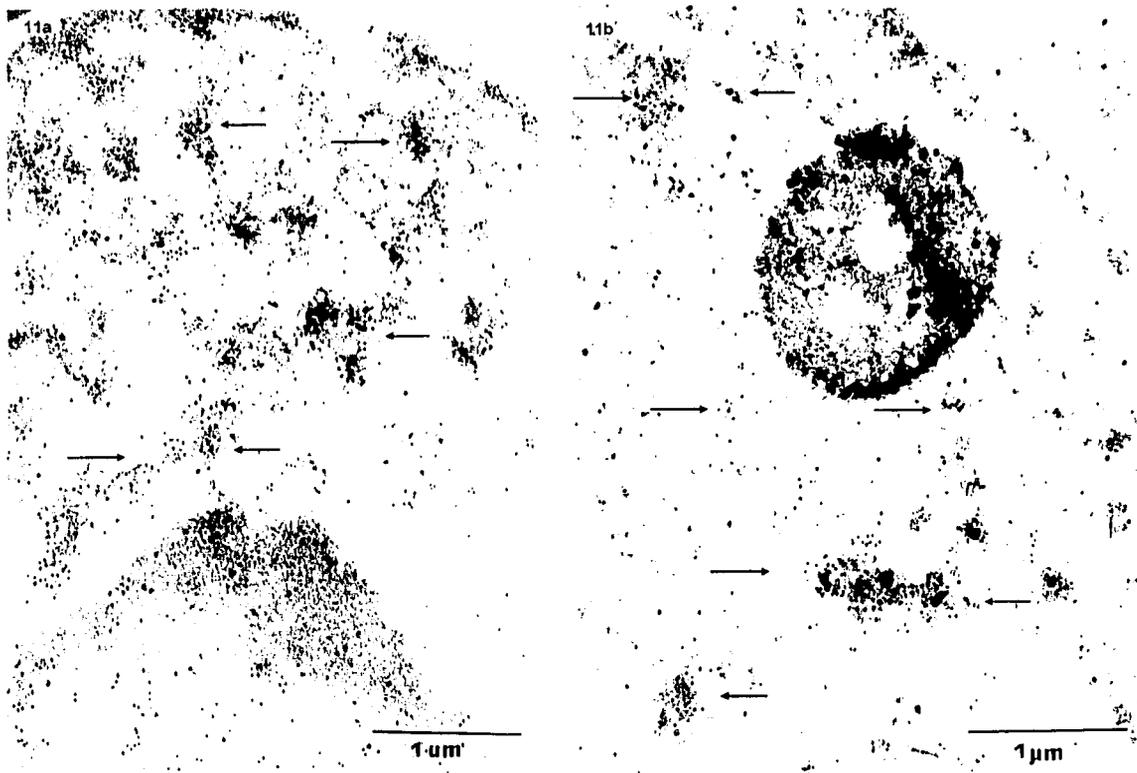


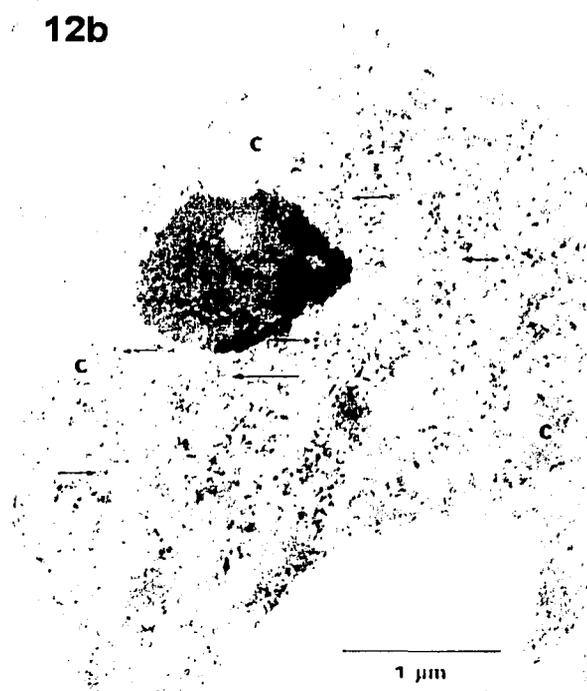
Fig. 11a Imagen del núcleo de *J. florindanum*, utilizando la técnica de inmunolocalización para DNA. Los sitios en donde se marca fuertemente, es la zona de cromatina compacta que se presenta como hebras gruesas o cúmulos (flechas).

Fig. 11b Imagen del núcleo de *P. hortorum*, utilizando la técnica de inmunolocalización para DNA. En donde se observan grumos de cromatina compacta que se encuentran fuertemente marcadas (flechas).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12a

12b



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 12a Imagen del núcleo de *I. florindanum* se distingue la cromatina de color claro (C), formando una fina red y en el espacio intercromatiniano se puede distinguir grupos de gránulos de *Lacandonia* (flechas). Técnica de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas.

Fig. 12b Imagen del núcleo de *P. hortorum* se observan grumos de cromatina compacta adosada a la membrana nuclear de color claro (C), el nucleolo fuertemente contrastado y en el espacio intercromatiniano pequeños grupos de gránulos de *Lacandonia* (flechas). Técnica de Bernhard para estructuras ribonucleoproteicas.

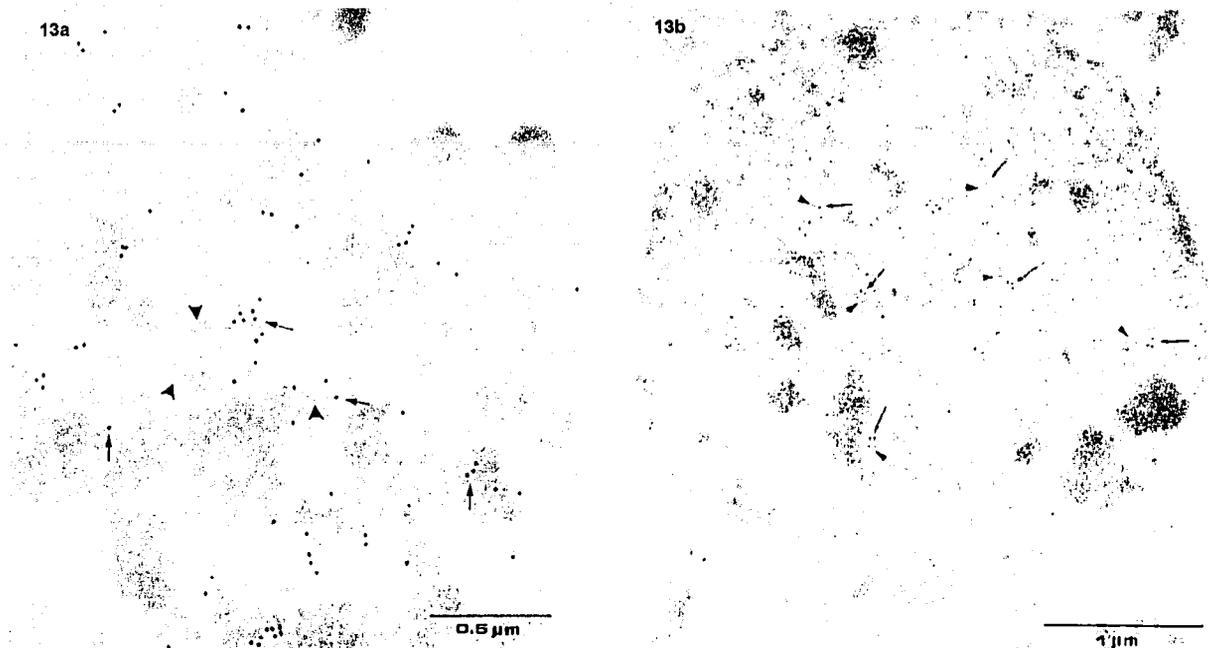


Fig. 13a Imagen del núcleo de *L. floridanum* en donde se observa el espacio intercromatiniano con grupos de gránulos de *Lacandonia* (cabeza de flechas), que se encuentran con marcas de oro que localizan proteínas SR (flechas) las marcas se encuentran alrededor de los gránulos

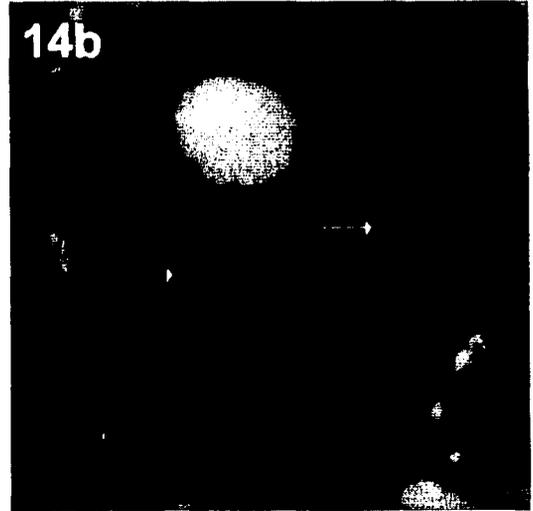
Fig. 13b Imagen del núcleo de *P. hertzeri* en donde se observa grumos de cromatina compacta adosada a la membrana nuclear (C) y en el espacio intercromatiniano pequeños grupos de gránulos de *Lacandonia* (cabeza de flecha), los cuales se encuentran rodeados por granos de oro que localizan proteínas SR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



26.7 μm 0



16.9 μm 0

Fig 14 Imagen de microscopía de fuerza atómica de *I. florindanum* (A) y de *P. hortorum* (B). La cromatina en *I. florindanum* es reticulada (flecha) y en *P. hortorum* es cromocéntrica (flecha). nucleolo (N) y cloroplastos (cl).

DISCUSIÓN

Estudio con microcopia de luz y microscopia electrónica han descrito que la organización de la cromatina en el núcleo celular en interfase en las plantas varía dentro de los diferentes grupos (Lafontaine 1974), por lo que se describe que puede ser de dos formas, el núcleo reticulado y núcleo cromocéntrico o no reticulado (Díaz de la Espina, 1992). El núcleo reticulado presenta un arreglo en su cromatina en forma de masas compactas formando una retícula (Lafontaine, 1974; Lafontaine y col. 1979). Este tipo de arreglo no está presente en los animales (Jiménez-García y Segura-Váldez, 1993). El núcleo cromocéntrico presenta grumos de cromatina asociados a la membrana nuclear parecido al que se presenta en los núcleos de las células animales (Días de la Espina, 1992). Por lo que las similitudes entre los animales y las plantas sugieren que la principal variación en la estructura nuclear es más antigua que la adquisición de los cloroplastos por los ancestros de las plantas verdes y que una vez adquirido el patrón nuclear, este se ha conservado altamente en la evolución (Jiménez-García y col., 1989). Además estas observaciones sugieren que la variabilidad morfológica de la estructura nuclear debe estar reflejando variación en los procesos moleculares que ocurren en los componentes del núcleo (Jiménez-García y Segura-Váldez, 1993).

I. florindanum es una angiosperma que se encuentra en la base del árbol filogenético de estas plantas, presenta un núcleo reticulado, en tanto que *P. hortorum*, que es una angiosperma dicotiledónea presenta un núcleo cromocéntrico, lo que sugiere que el grupo de las angiospermas pueden presentar los dos tipos de núcleos.

El análisis de cortes semifinos con el microscopio de fuerza atómica de *I. florindanum* y de *P. hortorum* ha permitido distinguir el arreglo de la cromatina de sus núcleos y corroboran que el núcleo de *I. florindanum* tiene un arreglo de la cromatina reticulado y el de *P. hortorum* presenta un arreglo cromocéntrico.

Además se observó que en los espacios intercromatinianos del núcleo de estas dos angiospermas presentan una estructura granular. Sin embargo, la resolución de la imagen no permitió distinguir la presencia real de estructuras parecidas a los diferentes gránulos ribonucleoprotéicos como son los gránulos de Lacandonia.

Observaciones de cortes semifinos con el microscopio de fuerza atómica de *L. schismatica* han permitido la visualización del núcleo celular con el arreglo característico de la cromatina en forma reticulada (Jiménez-García y Fregoso-Soriano, 2000). La cromatina aparece como una estructura masiva que confiere una textura gruesa a la sección a grandes aumentos, los espacios intercromatinianos aparecen como áreas negras. Además se pueden identificar algunas estructuras que contribuyen a proporcionar rugosidad a la sección. Algunas de estas estructuras fueron observadas en el nucleoplasma, estas partículas pueden ser componentes de la cromatina o más comúnmente partículas ribonucleoproteicas (Jiménez-García y Fregoso-Soriano, 2000).

En el espacio intercromatiniano y pericromatiniano del núcleo celular en plantas se ha descrito la presencia de estructuras ribonucleoproteicas como son gránulos pericromatinianos e intercromatinianos que no forman grandes grupos en comparación con los encontrados en células animales (Jiménez-García y col., 1989, Díaz de la Espina, 1992). Realizando observaciones del núcleo de *L. schismatica* y de *Triuris alata* (Triuridales), se describió la presencia de un nuevo tipo de estructura ribonucleoproteica en el espacio intercromatiniano a la cual se les denominó gránulos de Lacandonia que presentaban la característica de que son contrastados con la técnica de EDTA para ribonucleoproteinas, tienen un diámetro de 32 nm y están inmersos en un medio fibroso (Jiménez-García y col., 1992).

En las observaciones con el microscopio electrónico con la técnica de contraste de uranilo-plomo y la técnica de EDTA para ribonucleoproteína de los núcleos de *I. florindanum* y *P. hortorum* se pudieron detectar grupos de gránulos

de Lacandonia, lo que sugiere que sean estructuras que estén presentes en los núcleos celulares de diferentes grupos de plantas.

Los gránulos de Lacandonia son estructuras que se consideran relacionadas con los gránulos de Balbiani y con los gránulos pericromatinianos por las características histoquímicas e inmunocitoquímicas. Los criterios de evaluación para verificar si estas estructuras están relacionadas, son: su contrastate con la técnica de EDTA para ribonucleoproteínas; detección de la presencia de proteínas SR mediante inmunolocalización en donde se marcan intensamente las fibras que interconectan a los gránulos de Lacandonia. Otras pruebas que relacionan a los gránulos de Lacandonia con los gránulos de Balbiani es su marcaje por hibridación *in situ* con un oligonucleótido poli-(A)⁺RNA. Además se observó una variación de los gránulos de Lacandonia, en los procesos de pre-antesis y post-antesis, por lo que tienen un comportamiento similar a los gránulos pericromatinianos en las células endometriales causadas por la variación de la concentración de la hormona β -estradiol (Agredano-Moreno, 1994). Si se toman en cuenta las variaciones ultraestructurales de las partículas ribonucleopreicas que se presentan en algunos grupos de plantas, esto puede servir como un sistema para reforzar y establecer diferentes relaciones filogenéticas de ciertos grupos (Jiménez-García y Segura-Váldez, 1993).

De las diferentes pruebas de evaluación que se realizaron para corroborar que los gránulos observados en *I. florindanum* y *P. hortorum*, son gránulos de Lacandonia, fue que se observaron fuertemente contrastados con la técnica de EDTA para ribonucleoproteínas, estos se encontraban formando pequeños grupos en el espacio intercromatiniano y cuando se realizó la técnica de inmunolocalización para proteínas SR, se marcaron la fibras que interconectan a los gránulos y alrededor de los gránulos. Resultados que indican que estas estructuras corresponden a gránulos de Lacandonia.

Se debe de mencionar que posiblemente la aparición del núcleo celular fue concomitante con el aumento de la diversidad biológica y con el desarrollo de nuevos mecanismos de control de la expresión genética, como la maduración postranscripcional del ARN premensajero (pre-mRNA), que ocurre en estructuras ribonucleoproteicas intranucleares bien definidas cuando se observan con el microscopio electrónico. Estudios recientes muestran que gran parte de los eucariontes actuales presentan RNPs similares, lo que sugiere que hay unidad en los procesos iniciales de control postranscripcional (Jiménez-García y Segura-Váldez, 1993).

CONCLUSIONES

1. El núcleo celular interfásico de *Illicium florindanum* es reticulado y el espacio intercromatiniano contiene gránulos de Lacandonia.
2. El núcleo celular de *Pelargonium hortorum* es cromocéntrico y contiene gránulos de Lacandonia.
3. El núcleo celular de *Illicium florindanum* y *Pelargonium hortorum* cuando son observados con el Microscopio de Fuerza atómica presentan una estructura granular, que es similar a lo observado con el microscopio de luz y el microscopio electrónico
4. Los núcleos que se pueden observar en las angiospermas pueden ser del tipo reticulado o cromocéntrico.

REFERENCIAS

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

Agredano-Moreno L.T., Jiménez-García L.F., New evidence that *Lacandonia* granules are estructurally related to perichromatin and Babiani ring granules. Biol. of Cell. 92: 71-78. 2000.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Molecular Biology of the Cell. 3a. ed. Garland Publishing, Inc. Nueva York. 1994.

Crepet W.L. The Abominable Mystery. Science. 282: 1653-1654. 1998.

Cormark D. Histología de Ham. 9ª ed. Harla, México. 1988.

Jiménez-García L.F., Elizundia J.M., López-Zamorano B., Maciel A., Zavala G., Echeverría O.M., Vázquez-Nin G.H. Implications for evolution of nuclear structures of animal, plants, fungi and prototists. Bio Systems. 22:103-116. 1989.

Jiménez-García L. F., Agedano-Moreno L.T., Segura-Váldez M. L., Echeverría O. M., Martínez E., Ramos C. H., Vázquez-Nin G. H., The structural of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals s non-typical extranuclear particle. Biol. Cell. 75: 101-110. 1992.

Jiménez-García L. F., Segura-Valdez M. L. El origen y la evolución del núcleo celular. Un enfoque ultraestructural de la evolución del procesamiento postranscricional del ARN mensajero. Tópicos de Biología Evolutiva. Diversidad y Adaptación. Editores Juan Núñez Farfán y Carlo Cordero. Centro de Ecología UNAM. 155-174.1993.

Jiménez-García L. F., Spector D. L. In vivo evidence that transcription and premRNA processing are coordinated by a recuitin mechanism. *Cell*. 73: 47-59.1993 .

Jiménez-García L.F., Fragoso-Soriano R. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *J Struc Biol.* 192: 218-222. 2000.

Jiménez-García L. F., Segura- Valdez M. L., Ochs R. L., Rothblum L. I., Hannan R., Spector D. L. Nucléogenesis: U3SnRNA-containig prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell*. 5:955-966. 1994.

Kenrick P. The famili tree flowers. *Nature*. 402, 358-359. 1999.

Lafontaine J. G., Lord A. An ultrastructural and radio-autographic study of the evolution of the interphase nucleus in plant meristematic cells (*Allium porrum*). *J Cell Sci*. 14: 263-287. 1974.

Lafontaine J.G., Luck B.T., Dontigny. A cytochemical and radioautographic study of the ultrustrak organitation of puff-lile fibrillar structures inplant interphse nuclei (*Allium cepa*). *J Cell Sci*. 39: 13-27. 1979.

Lewin B. Genes VII. Ed Marbán.España. 2001.

Mathews S., Donoghue. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes. *Science*. 286(544) 1999.

Monneron A., Bernhard W. Fine structure of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruc. Res*. 27: 266. 1969.

Moreno Díaz de la Espina S., Barthelley I., Cerezueta M. A. Isolation and structural characterization of residual nuclear matrix in plant cell system. *Cromosoma*. 100: 110-117. 1991.

Moreno Díaz de la Espina S., Minguez A., Vázquez-Nin G.H., Echeverría O. M. Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. *Cromosoma*. 101: 311-321. 1992.

Qiu Y., Lee J., Bernasconi-Quadroni F., Soltis D.E., Soltis P. S., Zanis M., Zimmer E.A., Chen Z., Savolainen V., Chase M. W. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature*. 402: 404-407. 1999.

Raska I., Ochs R., Salamin-Michel L. Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microsc. 3*: 301-353. 1990.

Soltis P. S., Soltis D. E., Chase M. W., Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature*. 402: 402-403. 1999.

Spector D. Macromolecular domains within the cell nucleus: *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 265-315. 1993.

Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M. El núcleo celular interfásico. Edit. Las Prensas de Ciencias. México. 1995.

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