

00322

172



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Visualización de cromosomas
postmitóticos en *Allium cepa* mediante la
incorporación de bromodeoxiuridina”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

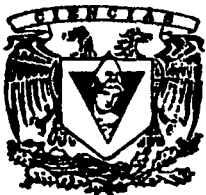
RODRIGO ROJAS AVALOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. GUADALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

2003



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1.A



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

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

NOMBRE: Rodrigo Rojas

Avalos

FECHA: 7/noviembre/2003

FIRMA: Rodrigo

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Visualización de cromosomas postmitóticos en Allium cepa mediante la incorporación de bromodeoxiuridina realizado por Rojas Avalos Rodrigo con número de cuenta 09338558-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Co-director

Propietario Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente Dra. Clara Esquivel Huesca

Suplente M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

Olga Margarita Echeverría Martínez
Guadalupe Trinidad Zavala Padilla
Luis Felipe Jiménez García
Clara Esquivel Huesca
Guadalupe Vidal Gaona

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

1. B

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Dedicatoria

A mis padres – Rosa y Gabriel- a quienes amo profundamente.

A Rosa María, mi jefa, por su ejemplo de fortaleza y disciplina, madre amorosa y digna, trabajadora incansable.

A Gabriel, mi pa, por su esfuerzo de toda la vida, hombre increíblemente amoroso con sus hijos, creativo y crítico, por que sepa que lo admiro profundamente.

A Alonso Rojas, mi hermano, compañero de aficiones, apoyo mío en cualquier hora, mi amigo.

A Flor, amantísima, por su apoyo en todo momento, mujer de gran fortaleza, carácter delicioso.

A mi tía Lilia, por su ejemplo, madre soltera, trabajadora, de una generosidad inigualable.

A mis primos Ana Laura y Fernando, mis primos preferidos, ejemplos de tesón y persistencia.

A mi abue Luchi, cariñosa y estricta, mi primer ejemplo.

Agradecimientos

Lista por demás incompleta, terrible necesidad del orden. Deseo que sepas que si te extraña el recorrer estas líneas sin hallarte, se debe no a una calculada omisión cuando a una miopía del recuerdo.

A Florencia, mi Flor, por sus muecas, su aroma, esa ternura de la cual soy ávida víctima. Por su mirar mas que sus ojos. Por tantas lágrimas. Por la confianza en mi aun cuando yo mismo no la tenía. Por los besos, su fortaleza de carácter y terquedad, por que es ella y nadie mas, por su unicidad y profundas imperfecciones. Por las peleas, gritos y reconciliaciones. Por que yo se que me ama. Por que espero que ella sepa que la amo. Por esos trozos de vida pasada que comienzo a llamar nuestra historia. Por despertar a su lado. Por nuestra vida futura.

A esa hidra multicéfala, de cabezas cambiantes, multicolores, envolvente de mi pequeño mundo. Menguante de cabello, profundamente orgulloso y perceptivo, Diego. Bióloga y poeta, Maripili. Gran amigo a pesar de su exiguo tamaño, lector de mundos fantásticos, bailarín excéntrico, Arturo. Actual clon de Nino, gracias por una historia bien contada, y un cálido abrazo, Rick. A la China por su gracia y por la devoción a su novio, por regresar con Flor ese diecinueve de octubre dos años atrás, al Chino por su sensibilidad, gracia histriónica y microojitos, a la Pirri, por su injusto aislamiento, a Noemicha, por ser mi primera amiga de la carrera, por su lealtad, su incomparable nobleza, su salto consciente de los límites, a Chayito, la del labio tembloroso, por su dualidad de mujer sumisa y dura, a Sugela, por esa aparente ortodoxia, por que aborreces las películas mexicanas viejas, por las eternas discusiones y por que me obliga a demostrarle que puedo ser una dócil rata de laboratorio, a Carlitos, por sus grandes chistes, al negro de César, por los golpes y su intento de regresar, a Pato por su confianza, por que confío, por su dulzura. A la Anchi por despeinarme, por la lluvia compartida, por subirse a mi espalda, por su nobleza y lealtad con sus amigos. Al Tripa, por su sentimiento paternal para conmigo, su fortaleza, por las pláticas en Nizanda, al Godo debido a que hace un mes me llamo hermano, por que medio muerto llego a las rodillas del Izta, por su enorme sonrisa, por su amor a la familia, a Isra por su generoso ejemplo, por que ocupó el silencio y el siempre ingrato lenguaje hablado para erigirse como uno de los seres humanos a los que mas admiro, a Donita por su fortaleza, a su dulzura y terquedad. A Yiya por su sensibilidad. A Nino, por sus golpes, su ternura de niño, por su cariño a Noemi, a Karina, Gabriela e Itzel, con quienes poco he compartido.

A Rebe por su amistad, fortaleza y buenos gustos.

A mi suegrita Delfina, y el resto de esa extraña y bella familia de enanas con voces de mastodontes, de Bruths, Claudias, Yanelis, Vicentes y Migueles, y demás esposos, esposas y chamacos y chamacas al por mayor, doy gracias por haberme aceptado.

A Martha Brito, por haber saltado conquistada por la tierra española, por los negocios juntos, por su nobleza y visión.

A Maribel y sus padres, por los años juntos, el apoyo y la neurosis.

A Víctor Aguirre, por esa fuerza que tan bien esconde su alma de niño, por las pláticas y la confianza.

A Víctor Hugo, por el apoyo, por llevarme a Nizanda y por el trabajo de las jaulitas.

A Oscar Salvatore, por burlarse tan gratamente cuando me mordió la *Portidium*.

A Carmina y Claudia, por las pláticas, la confianza y el cinismo.

A Larisa, por compartir el buen cine, por que lamento que aún no estalle Don Goyo.

A Lencho, instructor de montañismo, amigo, estatua admirable; lejana y cercana de bella fortaleza de carácter.

A Carlos y Sebas de los rayas, por su cercanía, por el mezcal prometido, y esas bestias jarochas a la fecha desconocidas.

Mi gratitud a Rafael, Adriana y Elaine, amigos de la preparatoria, por sus consejos e interés y su incansable búsqueda por conservar la cercanía.

A Andrés Montoya, a su hermana Xenia y su madre Mercedes, preciosa familia, conocida desde la infancia.

A Bartolino, Claudia, Chato, Avi, Liz y Pati de Nizanda por su apoyo, por los jugos de fútbol y los recorridos iguaneros.

A Claudia Sánchez y JoseLuis Villarruel, por esa amistad intergeneracional tan genuina.

A Abraham, Roberto, Beto tornillo y Citali por las pláticas, los golpes y la confianza.

Mi absoluto agradecimiento a Lupe, por su ayuda enorme en la consecución de esta tesis; simplemente no habría podido hacerse sin ella. A su ejemplo cotidiano, muestra de un infatigable compromiso con su trabajo. Amiga y codirectora de tesis.

Mi agradecimiento a la Dra. Olga Echeverría, directora de tesis y al Dr. Gerardo Vázquez por apoyarme y soportarme durante toda la realización de la investigación, por sus consejos tanto en lo académico como personal.

Al Dr. Luis Felipe y la Dra. Lourdes Segura por su guía con las técnicas.

Al resto de los miembros del Laboratorio de Microscopía Electrónica: Rosario, Ernestina y Silvia, por la confianza así como la desconfianza.

Al Urko, por los juegos y su increíble inteligencia y delicadeza. A Rena, Niza, Flor, Ro, Anita y Ares por afilar sus uñas en mi piel y sus dientes en mi carne.

A Ivancho, por las excusas en el Izta, por su cara roja y su gran sonrisa.

A Toño, mucho más que un maestro de hidropónia y electrónica. Hombre ingenioso y cabal, a Rosa, mi competidora.

A su hijo Cristian, por la ayuda escaneando imágenes.

Índice

| | |
|--------------------|----|
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 11 |
| Hipótesis | 11 |
| Material y métodos | 12 |
| Resultados | 16 |
| Discusión | 32 |
| Conclusiones | 36 |
| Bibliografía | 37 |

Abreviaturas

| | |
|------|---|
| BrdU | 5-bromo-2'-deoxiuridina |
| CldU | 5-cloro-2'-deoxiuridina |
| IdU | 5-iodo-2'-deoxiuridina |
| dUTP | 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato |
| HU | Hidroxiurea |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| NGS | Suero normal de cabra |
| BSA | Albumina de suero de bovino |
| GAM | Cabra anti-ratón |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| ISH | Hibridación <i>in situ</i> |
| FISH | Hibridación <i>in situ</i> fluorescente |

Introducción

Uno de los organelos mejor conocidos aunque paradójicamente menos entendidos es el núcleo celular (Lamond y cols., 1998). Varias de sus actividades y componentes se encuentran concentrados en sitios discretos (Wansink y cols., 1993); sin embargo, previo a indagar el significado funcional de tal compartimentalización, es necesario investigar sobre la distribución espacial de los componentes implicados (Visser y cols., 2000).

A la fecha aun no somos capaces de entender o predecir la regulación génica basados en la sola secuencia de ADN (se cree que existen factores epigenéticos que influyen en tal regulación). La comprensión de la activación e inactivación controlada de genes en un gran número de tipos celulares, para producir un organismo multicelular complejo, permanece como uno de los grandes problemas de las ciencias biológicas. Para abordar dicho problema no sólo debemos atender la secuencia de bases en el genoma sino indagar cual es su organización en diversos tipos celulares, así como la relación que guarda con factores que intervienen en su metabolismo (transcripción y replicación) y lo que es más importante, cómo éstas afectan la regulación de los genes (Edelmann y cols., 2001).

Estructura y dinámica nuclear

Se ha determinado que en eucariontes, la actividad de los genes se relaciona estrechamente con la organización de la cromatina. De hecho, en el núcleo, funciones tales como la replicación, transcripción, procesamiento de ARN y reparación del ADN se encuentran organizados en compartimientos discretos (Bártová y cols., 2002).

La evidencia señala a la organización espacial del núcleo y sus cambios conformacionales como los principales factores en la regulación de genes individuales y programas de expresión génica (Nagl, 1985; Parada y cols., 2002), tal visión representa cuando menos una gran simplificación; Bártová y cols. (2002) no encontraron una correlación entre la modificación en la posición relativa de algunos genes y cambios en su expresión. Más aún, concluyó que durante los procesos de diferenciación celular y carcinogénesis, la regulación de la actividad génica puede ser mediada por heterocromatina y que al menos la diferenciación celular puede estar relacionada con la diferenciación nuclear, acompañada por la condensación de cromatina.

En el núcleo interfásico, el material genético de un cromosoma no se encuentra arreglado en forma desordenada, mas bien, ocupa una fracción finita del volumen nuclear, conocida como territorio cromosómico (Visser y cols, 2000). Cuenta además con una localización no azarosa y consistente entre células del mismo tipo (O'keefe y cols, 1992). El término territorio cromosómico fue creado para reflejar la naturaleza física distintiva de los cromosomas en el núcleo interfásico y con frecuencia se emplea como sinónimo de dominio cromosómico. Un territorio cromosómico se haya separado en mayor o menor grado de otros territorios por una red tridimensional de canales.

Aunque los cromosomas pueden ser distinguidos como entidades individuales durante la mitosis, éstos se decondensan durante la telofase y en interfase se vuelve difícil distinguirlos individualmente. Solo recientes avances en microscopía permiten su visualización cotidiana en interfase (tarea que se mostraba elusiva debido a su naturaleza altamente condensada). Sin embargo, análisis mediante la técnica de hibridación *in situ*, no muestran un solapamiento entre cromosomas adyacentes, parecen ocupar territorios definidos de formas irregulares (Ferreira y cols., 1997), esta compartimentalización, es establecida unas horas después de la mitosis y se mantiene durante la interfase (Sadoni y cols., 1999). Los territorios cromosómicos se anclan a la envoltura nuclear, a través de la lámina (Haaf y cols., 1991) y probablemente la matriz nuclear (Parada y cols., 2002). El grado de separación entre dos territorios cromosómicos adyacentes y la posibilidad de entremezclado de su ADN, abren la interesante posibilidad a interacciones cromosoma a cromosoma.

El aspecto funcional asociado al compartimiento tridimensional de los canales intercromosómicos y la superficie de los territorios cromosómicos, está constituido por la expresión de los genes, el procesamiento de ARN mensajero y la exportación de sus productos (Cremer y cols., 1993), a su vez los extremos de este compartimento se encuentran conectados al citoplasma a través de los complejos de poro nuclear (Kurz y cols., 1996). Funcionalmente, el conjunto puede ser visto como un eficiente sistema de producción y transporte de ARN mensajero.

Según este modelo, los genes transcripcionalmente activos se encuentran en la interfase entre los territorios cromosómicos y los canales intercromosómicos, donde son accesibles a factores regulatorios y componentes de la maquinaria de transcripción, mientras que genes para los

cuales se requiere una represión permanente, se encuentran secuestrados al interior del territorio (Kurz y cols., 1996), volviéndose inaccesibles a los factores de transcripción (Cremer y cols., 1993). Éste es el llamado Modelo de Dominio Intercromosómico (MDI).

Algunos resultados que apoyan a este modelo han mostrado que el ARN naciente y recientemente sintetizado, se encuentra preferencialmente distribuido en el espacio intercromatiniano en contacto con los territorios cromosómicos (Verschure y cols., 1999). Por ejemplo, se encontró en fibroblastos humanos, que las proteínas involucradas en la transcripción y el procesamiento de ARN, se hallaban excluidas de dominios de cromatina condensada (Verschure y cols., 2002) y que los loci activos se encontraban preferentemente en la superficie o cerca de ésta en los dominios de cromatina compacta (Verschure y cols., 1999).

No obstante, observaciones más recientes y de mayor resolución basadas en marcado de histonas con la proteína verde de fusión y en BrdU - microscopía electrónica, indican que los sitios de transcripción activa se encuentran dispersos en todo el volumen del territorio y no limitados a la superficie (Kosak y cols., 2002; Mahy y cols., 2002; Parada y cols., 2002), genes expresados constitutivamente o de manera restringida pueden ser transcritos desde el interior de los territorios cromosómicos. Los territorios cromosómicos, no representan por tanto una barrera de inaccesibilidad a la maquinaria de transcripción, se conciben actualmente como atravesados por una extensa red interna de canales que aumentan el área superficial y permiten el acceso de los factores de transcripción y procesamiento de mensajeros (Cremer y cols., 2001; Visser y cols., 2000). Este modelo ha sido denominado Modelo de Compartimiento Intercromatiniano (MCI).

Existen aún desacuerdos sobre la realidad del sustrato estructural del proceso de transcripción, a tal grado que Abranches y cols. (1998) hacen notar la falta de investigaciones para esclarecer esta controversia. Además, debido a que estas observaciones están limitadas sólo a un pequeño conjunto de secuencias genómicas, se requieren estudios adicionales para determinar las implicaciones funcionales de ésta compartimentalización en la regulación de los genes (Verschure y cols., 1999).

La posición de los territorios cromosómicos dentro del núcleo sigue un patrón no azaroso, aunque recientes estudios abren la posibilidad a una distribución relativa o incluso a una

ausencia de patrón en su distribución. Uno de los primeros modelos del establecimiento de la posición de los cromosomas mostraba que los cromosomas ocupan distintos espacios dentro del núcleo interfásico y que la orientación centrómero-telómero establecida durante la anafase mitótica (Parada y cols., 2002) se mantenía a través de todo el ciclo celular. Esta hipótesis es conocida actualmente como configuración Rabl (Rabl, 1885). La configuración Rabl ha podido ser demostrada en algunos sistemas biológicos, incluidos núcleos politénicos de *Drosophila*, *Trypanosoma*, levaduras y algunas plantas.

Recientemente se ha encontrado que existe un arreglo radial dependiente de la densidad de genes: los cromosomas con la mayor densidad de genes se sitúan al interior del núcleo, mientras que los de menor densidad lo hacen hacia la periferia (Parada y cols., 2002) o del tamaño de los cromosomas (Sun y cols., 2000) en células humanas (Boyle, 2001) y células de primates superiores (Tanabe y cols., 2002b).

En general no existe una asociación espacial evidente entre cromosomas homólogos de células somáticas (Comings, 1980; Ferreira y cols., 1997). Sin embargo, Fransz y cols. (2002) encontraron una asociación entre cromosomas homólogos en *A. thaliana*, mientras que Matzke y cols. (2001) determinaron que en el tabaco estas asociaciones están implicadas en interacciones alélicas y es en *Drosophila*, donde la asociación de homólogos somáticos parece ser un fenómeno general.

El arreglo particular que guardan los distintos dominios nucleares ha sido extensivamente investigado. Se ha determinado que es dependiente de factores tan variados como: especie y línea celular (Minguez y cols., 1993; Jaunin y cols., 1998; Fransz y cols., 2002; Abranches y cols., 1998; Cerda y cols., 1999; Garagna y cols., 2001; Berciano y cols., 2002), grado de diferenciación y variaciones en la actividad celular (Cremer y cols., 2001; Berciano y cols., 2002) y fase del ciclo celular considerada (Lucas y cols., 2002; Vourc'h y cols., 1993, Visser y cols., 1998).

Una vez determinado un cierto arreglo en la posición de los cromosomas, su movilidad en el núcleo está limitada por varios factores, el más obvio es el gran volumen ocupado por cada cromosoma en el volumen limitado del núcleo (Parada y cols., 2002), lo cuál, se especula, parece ser dependiente de la línea celular, ya que se han podido observar movimientos a gran

escala en neuronas durante la diferenciación y en células interfásicas de *Drosophila* (Cremer y cols., 2001), pero no en otras especies o líneas celulares.

Finalmente, uno de los dominios más característicos y especializados del núcleo es el nucleolo. Sitio de síntesis de ARN ribosomal y biogénesis de ribosomas (Ghosh y cols., 1998), cuenta con cierta estructura interna: centros fibrilares y componentes fibrilar denso y granular (Yano y cols., 1995). Su tamaño y cantidad se haya asociado a la actividad metabólica (Vázquez y cols., 1986).

Cromatina

La forma y tamaño del núcleo está determinada esencialmente por el contenido de ADN y la actividad transcripcional global (Berciano y cols., 2002). Sin embargo, el ADN no se encuentra en estado lineal, más bien forma un complejo con histonas y otras proteínas. Este complejo es llamado cromatina y representa el material genético de los eucariontes en el ámbito funcional y estructural (Nelson y cols., 1992). El entrecruzamiento de las fibras de cromatina durante la interfase permite la existencia de estructuras terciarias, cuaternarias y pentarnarias.

Existen diferentes clasificaciones de la cromatina, dependiendo del nivel de observación. Con respecto al núcleo completo, la cromatina interfásica esta dispuesta en forma de asas, dominios y territorios ocupados por cromosomas individuales. Si se considera su estructura, existen dos tipos de organización: la eucromatina y la heterocromatina. La primera es también llamada cromatina laxa, la heterocromatina se define citológicamente como aquella cromatina que permanece condensada a lo largo del ciclo celular, excepto durante su replicación (Haaf y cols., 1991).

La cromatina se compartimentaliza en el núcleo interfásico de acuerdo al momento de su replicación; Ferreira y cols. (1997), encontraron que el ADN de replicación temprana y con alta densidad de genes (banda R en el cromosoma mitótico) se localiza preferencialmente al interior del núcleo y el de replicación tardía y de baja densidad de genes (banda G) en las periferias de núcleo y nucleolo (Lamond y cols., 1998; Taslerova y cols., 2003; Zink y cols., 2003).

Se piensa también que el arreglo espacial de la cromatina, tiene relación con algunas funciones celulares tales como progresión del ciclo celular y diferenciación. Durante la interfase, la

estructura nuclear y en particular la ultraestructura se caracterizan por variaciones significativas en la proporción de cromatina laxa y cromatina compacta (Mazzoti y cols., 1998).

Métodos de estudio de la estructura nuclear

La investigación de la distribución y organización topológica del ADN en el núcleo requiere métodos citoquímicos que permitan su detección *in situ* con gran especificidad y altas resolución y sensibilidad (Thiry, 1995). Hasta hace relativamente poco, dichas investigaciones estaban limitadas al uso de técnicas tradicionales (Sigma, 2003) poseedoras sin embargo, de importantes limitaciones.

La autorradiografía de alta resolución permite la detección de ADN mediante la incorporación de timidina tritiada. Sin embargo, este método requiere largos periodos de exposición y el poder de resolución está limitado por el diámetro del cristal de haluro y a la técnica de revelado empleada (Fakan y cols., 1974 en Jaunin y cols. 1998; Tamatani y cols., 1995).

El uso de 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) conjugado con biotina (dUTP-biotina) y técnicas inmunológicas de detección de biotina, permitió minimizar estos inconvenientes; sin embargo, sólo células permeabilizadas incorporan este marcador, lo cual puede generar alteraciones en la estructura celular (Jaunin y cols., 1998).

Los procedimientos de hibridación *in situ* (ISH y FISH) permiten visualizar cromosomas completos, pero el procesamiento relativamente agresivo de las muestras propicia una considerable pérdida de la estructura nuclear fina y por ende, impide hacer un análisis detallado de la organización nuclear al microscopio electrónico (Manuelidis, 1985).

Debido a ello se ha incrementado el uso de deoxiuridinas halogenadas como marcadores celulares, principalmente la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), aunque también la 5-iodo-2'-deoxiuridina (IdU) y la 5-cloro-2'-deoxiuridina (CldU), nucleótidos sintéticos todos ellos. Estas moléculas pueden atravesar la membrana plasmática sin necesidad de una permeabilización previa y se incorporan reemplazando parcialmente a la timidina durante la replicación (Haaf, 1996). El desarrollo en 1982 de anticuerpos monoclonales contra BrdU ha representado un avance significativo en los estudios de cinética celular (Thiry, 1995).

Esta técnica no se haya exenta de problemas: la BrdU incorporada en el ADN, puede ser detectada sólo en cadena sencilla (Haaf, 1996; Sigma, 2003), por lo que se hace necesaria una desnaturalización previa del ADN para exponer los epítomos necesarios a los anticuerpos; es posible que este tratamiento pueda provocar una modificación de la morfología celular y alteraciones en procesos de crecimiento y diferenciación (Thiry, 1995). Más aun, en dosis altas, la BrdU se ha empleado como mutágeno en investigación genética. Aten y cols. (1994) observaron sin embargo, que a bajas concentraciones ($\approx 5\mu\text{M}$) la BrdU no afecta el ciclo celular y más aun, se ha demostrado que la morfología nuclear (inclusive la ultraestructura) y el porcentaje de células marcadas con esta técnica muestran una buena correlación con los obtenidos por autoradiografía con timidina tritiada (Tamatani y cols., 1995).

El empleo de análogos sintéticos de la timidina en investigaciones sobre el ciclo celular, ha seguido una profunda diversificación, tanto en los sistemas biológicos estudiados, el nivel de observación (microscopía electrónica, confocal o de fluorescencia) o la proporción marcada del genoma (uno o varios cromosomas completos, partes de cromosomas, ADN recién sintetizado), abarcando tanto aspectos estructurales, funcionales o una mezcla de ambos. Ésta metodología se ha empleado con éxito en numerosos estudios, por ejemplo: replicación (Visser y cols., 1998; Zink y cols., 1999; Jaunin y cols., 2000; Lengronne y cols., 2001), relación matriz nuclear – territorios cromosómicos (Ma y cols., 1999), territorios cromosómicos de diversas especies (Ferreira y cols., 1997; Ghosh y cols., 1998; Mazzotti y cols., 1998; Visser y cols., 1999, Visser y cols., 2000), replicación y transcripción en interfase (Sadoni y cols., 1999).

Adicionalmente se ha ocupado la BrdU en investigaciones sobre evolución (Tanabe y cols., 2002).

Dependiendo de las condiciones experimentales, es posible marcar elementos del genoma tan diferentes como: la fracción de células en fase S, la cromatina de replicación temprana o tardía o la distribución de fibras de ADN individuales en el núcleo (Lengronne y cols., 2001). Por ejemplo al administrar la BrdU durante un tiempo determinado (denominado pulso) y retirarla después por otro lapso (llamado sobrevida), es posible visualizar regiones de replicación temprana o tardía.

Con una incubación hasta de 10 minutos en BrdU, esta metodología permite identificar células en fase S, empleando análisis citométricos es posible determinar el porcentaje de células en proliferación y hacer una evaluación cuantitativa del número de células en las diversas fases del ciclo celular (Samaniego y cols., 2002; ICN, 2002).

Un tiempo de marcado de entre 10-20 minutos, permite visualizar cromatina nascente. Haciendo una incubación durante 5 minutos con BrdU, seguida de otra en un medio libre de BrdU durante varias horas, la marca esencialmente representa ADN recién sintetizado.

Al sincronizar el ciclo celular del cultivo, mientras que la BrdU se administra durante el periodo de la fase S completa, seguida por varios ciclos celulares en ausencia de BrdU, la marca representa cromosomas completos y ocasionalmente, una fracción de territorio cromosómico debida a un evento de intercambio de cromátidas hermanas (Cremer y cols., 2001), fenómeno que no se produce de manera estocástica (López y cols., 1996). La segregación azarosa por mitosis de cromátidas marcadas y no marcadas, resulta en núcleos que exhiben territorios parcialmente marcados, lo que corresponde a una sola cromátida marcada (Zink y cols., 1998).

Una ventaja adicional del marcado con análogos de la timidina es que permite determinar si los territorios cromosómicos son mutuamente excluyentes o si existe un grado de entremezclado (Visser y cols., 1999).

Resulta importante en este punto considerar algunas características de la replicación que afectan la distribución de la BrdU en el núcleo. La replicación es semiconservativa, es decir, cada cadena de ADN actúa como molde para la síntesis de una nueva cadena, se producirán por tanto, dos cadenas de ADN cada una con una hebra vieja y una nueva, esto tiene dos implicaciones importantes para la distribución de la marca de BrdU en los cromosomas: la marca será progresivamente diluida por subsecuentes replicaciones en ausencia de BrdU y, la marca corresponderá solo a una hebra completa de un cromosoma. Los cromosomas no son replicados estocásticamente sino de acuerdo a un programa espacio-temporal (Lengronne y cols., 2001).

Aunque existe una gran variedad de estudios sobre estructura nuclear en sistemas animales, se ha hecho relativamente poco al respecto en plantas; matriz nuclear (Samaniego y cols., 2001), matriz nuclear y replicación en *Allium cepa* (Samaniego y cols., 2002), visualización de

cromosomas en *Arabidopsis thaliana* (Lysak y cols., 2001), estructura de matriz nuclear (Minguez y cols., 1993; Samaniego y cols., 2001).

Allium

El género *Allium* junto a sus parientes más cercanos ha sido adscrito recientemente a la familia *Alliaceae*, perteneciente a la clase *Liliopsida* (monocotiledóneas, Takhtajan y cols., 1997), su distribución abarca gran parte del hemisferio norte: Europa, Norteamérica y Asia, en climas secos a moderadamente húmedos. El género incluye plantas perennes con órganos subterráneos de almacenamiento (de forma, tamaño y color variables), muchas de ellas tienen gran importancia comercial como plantas de ornato y alimento (Fritsch y cols., 2002). En particular, muchas variedades de *Allium cepa* son cultivadas en todo el mundo.

Allium cepa es una especie diploide que cuenta con 8 cromosomas ($2n = 16$), y aunque la poliploidía es rara en la especie, se ha publicado la ocurrencia ocasional de bulbos tetraploides. Sus cromosomas son metacéntricos y submetacéntricos y difieren ligeramente en longitud, sólo el pequeño par de cromosomas satélite es subtelocéntrico (subacrocentrico), muestra apareamiento bivalente o multivalente durante la meiosis. *Allium cepa* posee uno de los mayores genomas entre todas las plantas cultivadas estudiadas: 17.9 pg o 15290×10^6 pb por genoma haploide (contenido 1C), 6, 16 y 107 veces más grande que *Zea mays* (maíz), *Lycopersicon esculentum* (jitomate) y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (Havey, 2002; Samaniego y cols., 2001). Ello le confiere dos ventajas como organismo modelo: el tamaño relativamente grande de sus cromosomas facilita las observaciones y su reducido número simplifica los experimentos.

La porción comprendida entre 0.5 y 1.5 mm de las puntas de la raíz de *Allium cepa*, comprende una subpoblación de células en proliferación activa (70% del total), éstas pueden ser diferenciadas de células no proliferativas por su menor tamaño (Samaniego y cols., 2002). El ciclo mitótico de esta especie (a 23°C), es de 17 horas aproximadamente, con una fase S de 10 horas (Yeoman y cols., 1976), dependiente sin embargo de la variedad de *Allium cepa* considerada (Samaniego, com. pers., 2002).

La estructura de la cromatina en esta especie es conocida desde hace mucho, mediante el microscopio electrónico, se observan regiones densas de heterocromatina separadas por fibras largas de cromatina. Esta distribución corresponde al llamado núcleo interfásico reticulado (Lafontaine y cols., 1969). El patrón reticulado se mantiene durante toda la interfase y es una característica de la especie.

Objetivos

- Visualizar cromosomas individuales en núcleos interfásicos de raíz de *Allium cepa*.
- Contribuir al conocimiento de la arquitectura nuclear de *Allium cepa*.

Hipótesis

- Si se incuban las raíces de un bulbo de *Allium cepa* en una solución de BrdU, ésta se incorporará en el ADN de las células en fase S del ciclo celular.
- La progresión a través de subsecuentes ciclos mitóticos de células que han incorporado BrdU, producirá la segregación al azar de la marca entre las células hijas.

Material y métodos

Material vegetal

Los bulbos de *Allium cepa* utilizados en los experimentos se obtuvieron en establecimientos comerciales locales. La producción de raíces a partir de estos bulbos se realizó eliminando por corte la capa de tejido muerto en la base del rizoma, dicha zona fue sumergida en agua de la llave por un lapso de 72 horas a 25 °C.

Sincronización y marcado del cultivo

Las raíces de al menos 20 mm de longitud se incubaron en una solución recién preparada al 0.75 mM de HU (ICN) en agua de la llave durante 14 horas (Samaniego y cols., 2002), después de lo cual el exceso de HU fue lavado tres veces con agua de la llave durante 30 minutos en total. El siguiente paso consistió en la incubación de las raíces en 30 ml de solución 10 μ M de BrdU (ICN) en agua de la llave durante 24 horas, seguido por tres lavados en agua de la llave por un total de 30 minutos y un tiempo de sobrevida (también en agua de la llave) según el diseño experimental mostrado en la tabla 1.

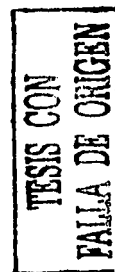
Tabla 1. Diseño experimental para cada grupo. Se muestran los tiempos de incubación en HU, BrdU y sobrevida. Todos los tiempos se dan en horas.

| Grupo | HU ¹ | BrdU ² | Sobrevida ³ |
|--------------------|-----------------|-------------------|------------------------|
| Experimental 0 h | 14 | 24 | 0 |
| Experimental 24 h | 14 | 24 | 24 |
| Experimental 48 h | 14 | 24 | 48 |
| Experimental 72 h | 14 | 24 | 72 |
| Experimental 96 h | 14 | 24 | 96 |
| Experimental 120 h | 14 | 24 | 120 |
| Control tipo 1 | 14 | 0 | 0, 24, 48, 72, 96, 120 |

¹ Concentración = 0.75 mM

² Concentración = 10 μ M

³ En agua de la llave



Se realizaron dos tipos de controles (1 y 2) para cada tiempo de sobrevida (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas). Los dos controles fueron sometidos a los mismos tratamientos de sincronización, marcado e inmunofluorescencia (ver adelante) que los grupos experimentales, las diferencias consisten en que el control tipo 1 no fue incubado en BrdU (para establecer la especificidad de la reacción entre la BrdU incorporada en la cromatina y el anticuerpo primario) y el control tipo 2 que no fue incubado en el anticuerpo primario (lo que permitió determinar si el anticuerpo secundario se unía específicamente a éste).

Fijación

Los segmentos de raíz (2 mm de longitud desde la punta de la cofia) fueron fijados con paraformaldehído al 4 % en PEM (50 mM PIPES, 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA, pH = 7.0), a 4 °C en la oscuridad por 50 minutos. A este paso siguieron tres lavados en PEM a 4 °C de 15 minutos cada uno, después los trozos fueron tratados con una solución de digestión (2 % celulasa, 1 % pectinasa, 0.5 % macerozima, 4 % manitol, en PEM) durante 50 minutos a 37 °C y se lavaron tres veces con PEM durante 15 minutos, a 25 °C.

Posteriormente las muestras fueron homogenizadas al presionarlas repetidamente contra el fondo de un tubo eppendorf (Eppendorf) de 0.5 ml utilizando un palillo de madera con punta roma, se agitaron en un vortex durante 10 segundos y se aplicaron 60 µl de esta suspensión en un portaobjetos tratado previamente con poli-L-lisina (Sigma). La gota secó después de 60 minutos a 37°C. Los preparaciones fueron almacenadas a 4 °C hasta que fueron usadas (hasta 3 meses).

Inmunofluorescencia

Cada muestra se hidrató durante 10 minutos con PBS, a 25 °C. El ADN fue desnaturalizado mediante el uso de una solución 1 N de HCl a 60 °C durante 10 minutos, a lo que siguieron dos lavados de 5 minutos con PBS a 25 °C, la membrana plasmática se permeó con Triton X-100 al 0.1 % en PBS durante 30 minutos a 25 °C, los epítomos inespecíficos fueron bloqueados con NGS al 10 % en PBS por 10 minutos a 25 °C.

Cada portaobjetos fue incubado por 24 horas a 25 °C en una solución 1:20 de anticuerpo anti-BrdU (hecho en ratón, Dako) en solución PBS-BSA-Tween (BSA 1 %, Tween-20 0.1 % en PBS), en la oscuridad. Se lavaron las muestras en una solución de Tween-20 0.1 % en PBS, durante 30 segundos a 25 °C y posteriormente en PBS durante 15 minutos a 25 °C. Se incubaron las muestras en un anticuerpo secundario (hecho en cabra contra ratón), acoplado a FITC (Sigma) a una concentración de 1:50 en PBS, seguido por dos lavados en PBS de 10 minutos (a 25 °C). El ADN total fue teñido con DAPI (0.5 µg/ml en PBS) por 3 minutos y lavado con PBS por 10 minutos a 25°C.

Finalmente las muestras se montaron con medio para fluorescencia (Dako) y fueron cubiertas con cubreobjetos del número 1 y selladas con barniz de uñas de secado rápido.

Microscopía

Las observaciones de fluorescencia fueron realizadas con un microscopio Zeiss (Alemania) con objetivos Zeiss Neofluar (16 X y 63 X) y Zeiss Planapo (100 X). El filtro de excitación para fluoresceína fue un 530-585 nm y para DAPI de 395-440 nm. Se fotografió con película Sensia 400 (Fujichrome) para diapositivas.

Las cortes ópticos se obtuvieron mediante un sistema confocal láser MCR 1024 (Bio-Rad), equipado con una fuente de Kr / Ar acoplado a un microscopio invertido TMD 300 (Nikon) dotado con un objetivo 1.3 NA de inmersión (100 X). La adquisición de las imágenes y el ajuste de las escalas fue logrado mediante el paquete Comos (versión 7.0, Bio.Rad).

Todas las imágenes fueron adquiridas utilizando 3 % de la potencia del láser y la misma sensibilidad del fotomultiplicador. El grosor de los cortes confocales fue de 0.5 µm para todas las muestras.

Procesamiento de imágenes

Las imágenes de microscopía de fluorescencia se digitalizaron mediante un sistema de escaneo, el retoque posterior se realizó con el programa Paint Shop Pro (versión 7.0, Jasc

Software) y consistió en la modificación de los siguientes parámetros: aumento de contraste, brillo y valor gamma, así como el recorte de las imágenes digitales.

En el caso de los cortes confocales, parte del procesamiento se realizó con el programa Confocal Assistant (versión 4.02, Todd Clark), consistente en la reconstrucción tridimensional de los núcleos y la fusión de los cortes ópticos individuales.

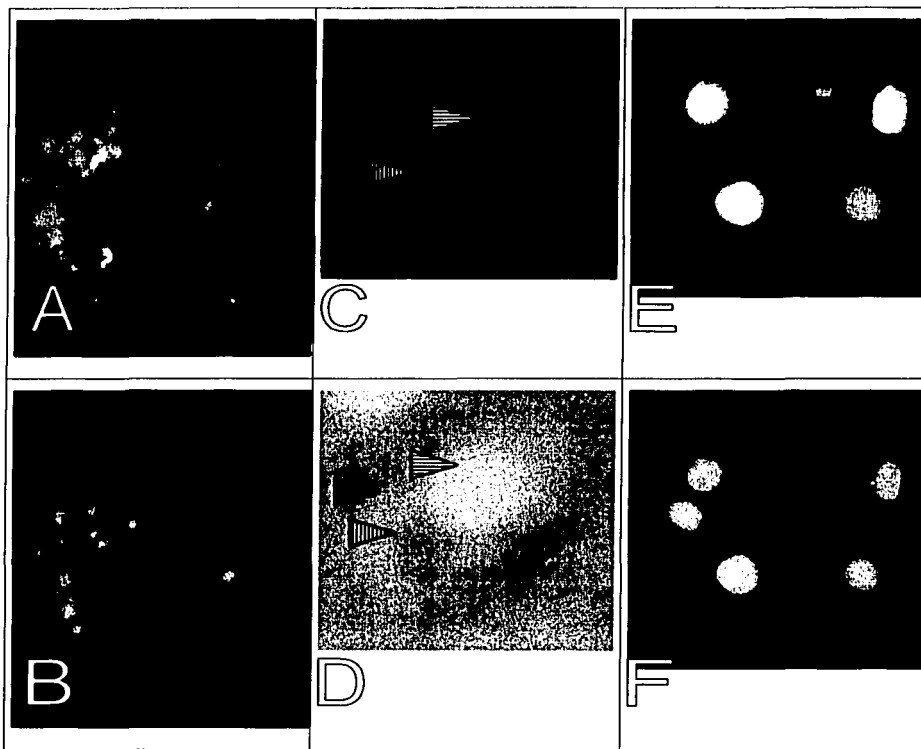
Los cortes confocales individuales se procesaron con el programa Paint Shop Pro. Como en el caso anterior, se empleó exclusivamente para aumentar contraste, brillo y valores gamma.

Resultados

La marca es específica

Una vez irradiado por el rango de longitudes de onda que correspondían a FITC (530-585 nm), se pudo determinar la existencia de dos tipos distintos de emisión (fluorescencia). La llamada autofluorescencia proviene de diversos materiales biológicos y fijadores como el paraformaldehído (Segura, com. pers., 2002) y no se relaciona con la fluorescencia propia del FITC. Ambas pueden ser diferenciadas por la menor intensidad y tono más oscuro de la autofluorescencia respecto a la fluorescencia de FITC (en adelante llamada marca), mucho más intensa y de un tono más claro (figura 1).

La eliminación de la incubación en BrdU, seguida por un tiempo cualquiera de sobrevida y un procedimiento de inmunofluorescencia completo (control tipo 1, figura 1, recuadro A) produjo células en las que la autofluorescencia provenía tanto del citoplasma, la membrana plasmática y el núcleo. En particular éstos últimos no tenían estructura interna (no era visible el nucleolo) y en los tiempos más largos de sobrevida, no existía la mezcla de áreas marcadas y no marcadas en el mismo núcleo producto de la segregación.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Ausencia de marca en los grupos control. A y B corresponden al control tipo 1, C y D a control tipo 2. E y F pertenecen al grupo experimental con 24 horas de sobrevida para comparación. **A**; micrografía de núcleos de *Allium cepa*; sin incubación en BrdU. Nótese que la fluorescencia proviene de igual manera del citoplasma y núcleo y que éste último, no tiene estructura interna ni se muestra ningún nucleolo. **B**; micrografía de distribución del DAPI de la muestra A. **C**; célula marcada por 24 horas con BrdU, seguido de 24 horas de sobrevida y una inmunodetección en la cual se omitió el anticuerpo primario (anti-BrdU). No hay diferencia entre la autofluorescencia del citoplasma (flecha negra) y el núcleo (flecha con líneas horizontales), la vacuola (flecha con líneas verticales), tiene una autofluorescencia casi nula. El núcleo además, no muestra nucleolos o estructura interna. **D**; tinción de DAPI correspondiente a C. **E**; Micrografía de núcleos marcados durante 24 horas con BrdU y sin sobrevida. **F**; Tinción con DAPI de los núcleos en E.

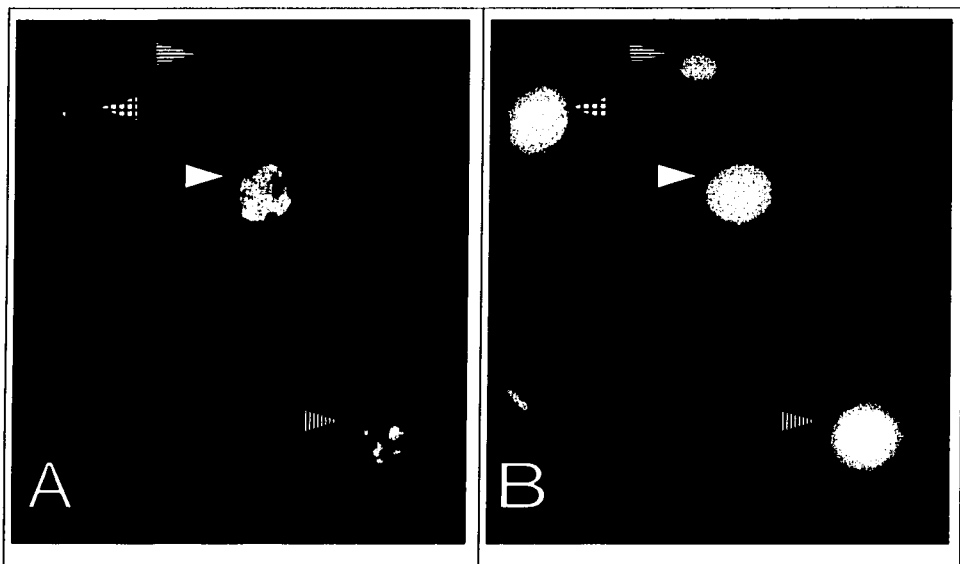
Los resultados del control tipo 2 (incubación en BrdU por 24 horas e inmunofluorescencia omitiendo sólo el anticuerpo primario anti-BrdU), muestran células sin marca específica (reconocida por tono e intensidad).

La autofluorescencia proviene de igual manera del citoplasma, membrana plasmática y núcleo (figura 1, recuadro C). La ausencia de autofluorescencia en la vacuola demuestra que proviene esencialmente del material biológico y no del soporte de vidrio o medio de montaje.

Para comparar, el recuadro E figura 1 muestra la marca detectada en el grupo experimental sin sobrevida, es de notar la mayor intensidad y la diferencia con el tono de ambos grupos control, adicionalmente se reconoce la localización de los nucleolos y la marca se distribuye en todo el núcleo debido a que no presentaron ciclos celulares adicionales que pudieran segregarla.

La población celular es heterogénea

Se encontró que la población celular correspondiente a un grupo experimental dado (es decir, una raíz sometida a los mismos tratamientos de sincronización con HU, marcado con BrdU y sobrevida), variaba en la cantidad de marca en el núcleo. Estas diferencias se ejemplifican en la figura 2, en una misma población puede haber células con la mayor parte del núcleo marcado, células con solo una pequeña proporción de su núcleo marcado y células en las que no exista marca alguna.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Heterogeneidad de la marca. **A**; micrografía de núcleos marcados durante 24 horas con BrdU y con una sobrevida de 96 horas. Nótese que a pesar de estar sujetas al mismo tratamiento de marcado y sincronización con HU, la segregación de la marca produjo diferentes patrones, desde núcleos con marca en casi toda su cromatina (flecha blanca), núcleo en el que se comienzan a producir cúmulos (flecha con líneas verticales), núcleo con marca mínima y parches aislados (flecha con cuadrícula) y núcleos sin marca (flecha con líneas horizontales). **B**; Tinción de DAPI de los núcleos en A. Las flechas como en A.

Estas diferencias son más notorias en los tiempos largos de sobrevida y viceversa; en los tiempos mas cortos de sobrevida (0, 24 y 48 horas), la proporción del núcleo marcado es prácticamente igual en todas las células que si replicaron su ADN durante la incubación con BrdU.

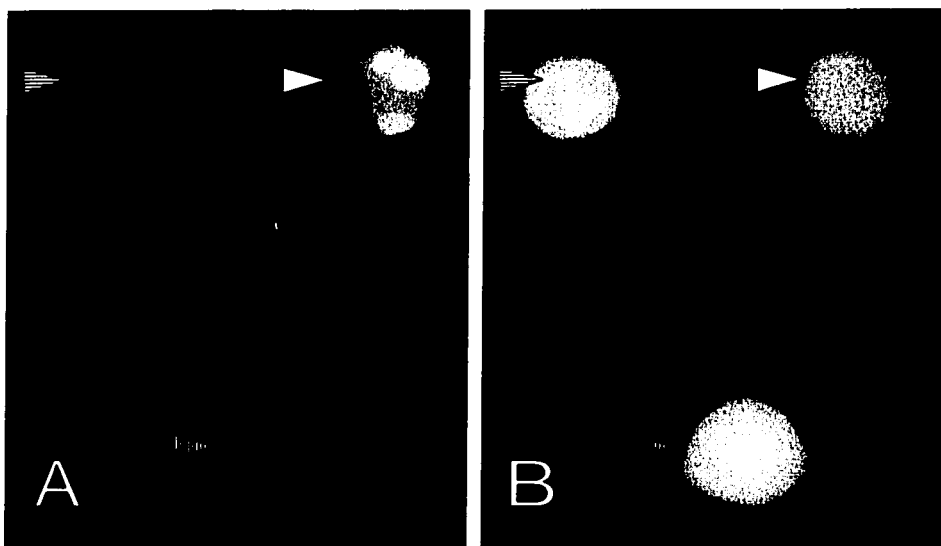


Figura 3. Heterogeneidad de la marca. **A**; micrografía de FITC de núcleos marcados durante 24 horas con BrdU y con una sobrevida de 120 horas. **B**; micrografía de la tinción con DAPI de los núcleos en A. Las flechas muestran diferentes patrones de marca: pocas áreas con diferente proporción de marca (flechas blanca y con líneas verticales) o marca nula (flecha con líneas horizontales).

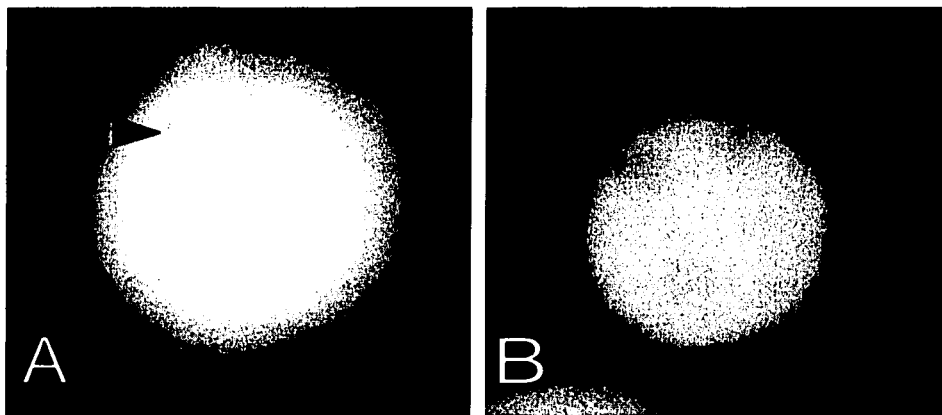
La sobrevida de las raíces produce la segregación de la marca

La proporción de cromatina marcada en cada uno de los grupos experimentales disminuyó conforme aumentó el tiempo de sobrevida. En cada grupo experimental, la presencia de nucleolos (negativos con DAPI) fue una constante. La segregación de la marca en cada grupo experimental, muestra una reducción paulatina de áreas de cromatina marcada conforme aumenta el tiempo de sobrevida, estas áreas (mostradas como volúmenes de tamaño variable mediante el uso de microscopía confocal) se encontraban distribuidas por lo general hacia la periferia del núcleo.

Grupo experimental sin sobrevida (0 h)

El diseño experimental de este grupo experimental (0 horas), consistió en la sincronización con HU, seguida por una incubación de 24 horas en BrdU para marcar el ADN recién sintetizado, seguida inmediatamente por el procedimiento de inmunofluorescencia.

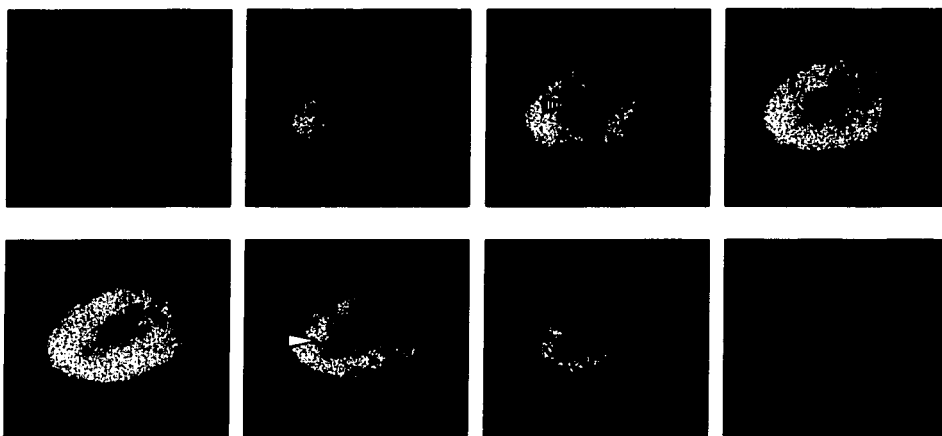
La microscopía de fluorescencia mostró que la ausencia de un tiempo de sobrevida, produjo núcleos marcados en la totalidad de la cromatina a excepción de los nucleolos (figura 4). La distribución de BrdU en la totalidad del núcleo, corresponde exactamente a la distribución total de cromatina teñida mediante DAPI (figura 4, B)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Núcleo interfásico de *Allium cepa* sin sobrevida. **A**; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada con BrdU. La flecha muestra la presencia negativa de FITC en un nucleolo. **B**; micrografía de fluorescencia con la distribución de DAPI. La flecha apunta a un nucleolo, sin tinción.

Los cortes ópticos obtenidos con microscopía confocal permiten observar que la marca en este grupo experimental se distribuía en todo el volumen del núcleo y no sólo en la superficie o en subvolúmenes internos (figura 5). La marca esta ausente de los nucleolos.

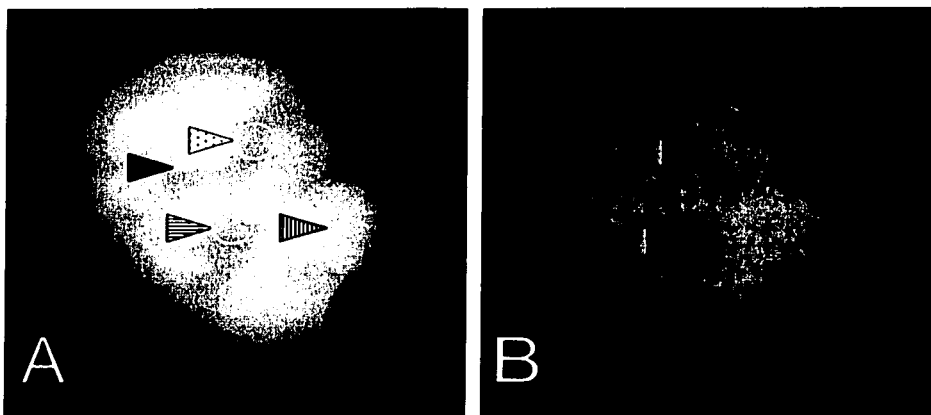


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Cortes confocales subsecuentes que muestran la distribución de cromatina en un núcleo marcado de *Allium cepa* sin sobrevida. Nótese la desaparición progresiva de un nucleolo (flecha con líneas verticales) y la aparición paulatina de otro (flecha blanca). La separación entre cortes es de 1.5 μm .

Grupo experimental con 24 horas de sobrevida

Después de 24 horas de sobrevida (correspondiente aproximadamente a 1.5 ciclos celulares), la segregación de la marca es notoria. Observada por microscopía de fluorescencia (figura 6), ésta se circunscribe a áreas de cromatina de tamaño y forma variables, separados por áreas no marcadas (sintetizadas en ausencia de BrdU). La aparente marca positiva en uno de los nucleolos de esta figura, es debida a cúmulos de cromatina dispuestos arriba o debajo de éste.



TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Figura 6. Núcleo interfásico de *Allium cepa* después de 24 horas de sobrevida. **A**; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada con BrdU. Las flechas muestran la aparición de áreas de cromatina carentes de marca (flecha negra) y áreas marcadas positivamente (flecha con líneas verticales) debido a la segregación de la marca durante subsecuentes ciclos celulares. **B**; micrografía de fluorescencia de la distribución de DAPI. Las flechas apuntan a los nucleolos teñidos negativamente. El área del nucleolo inferior en B, corresponde totalmente al área sin marca en A (flecha con líneas horizontales). Mientras que el nucleolo superior en B, corresponde solo parcialmente al área en A (circulo flecha con puntos), esto es debido a volúmenes de cromatina marcada encima o debajo del nucleolo en A.

Como en el grupo experimental sin sobrevida, los cortes confocales (figura 7) permiten determinar el que las áreas observadas mediante microscopía de fluorescencia corresponden realmente a volúmenes de cromatina marcada de tamaño variable y forma irregular que se extienden no sólo en la periferia sino al interior del núcleo. No es posible establecer con este tiempo de sobrevida territorios cromosómicos individuales.

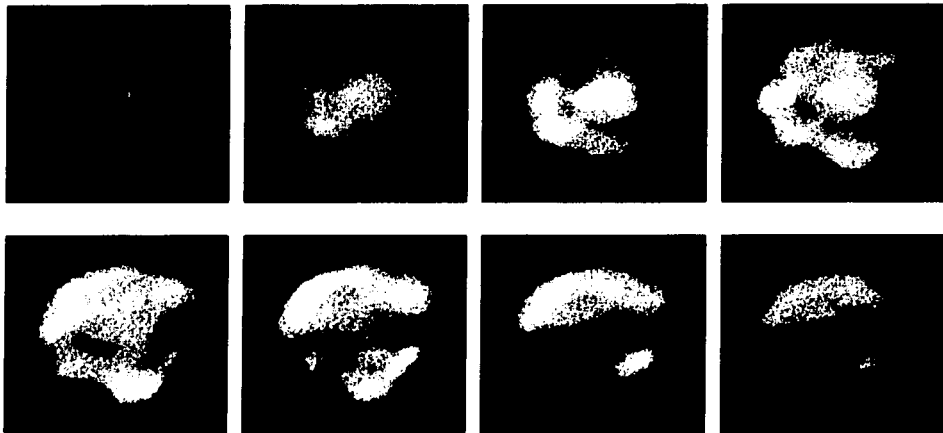


Figura 7. Cortes confocales subsecuentes que muestran la distribución de cromatina en un núcleo marcado de *Allium cepa* después de 24 horas de sobrevida. Nótese la diferenciación de áreas de cromatina marcadas y no marcadas en las subsecuentes secciones. La separación entre cortes es de 1.5 μm .

Grupo experimental con 48 horas de sobrevida

A las 48 horas de sobrevida (figura 8), la segregación por aproximadamente 2.8 ciclos celulares produjo una disminución en la cantidad de cromatina marcada respecto a lo observado en el grupo experimental con 24 horas. Las áreas de cromatina no marcada aumentaron y los cúmulos de cromatina comenzaron a individualizarse.

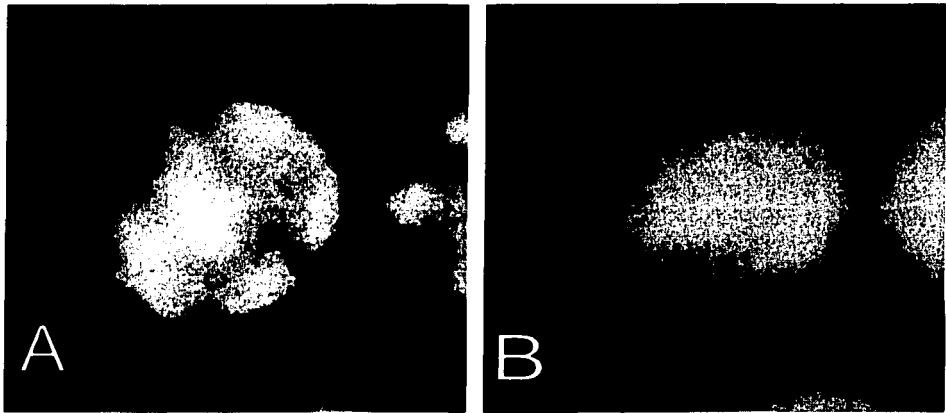
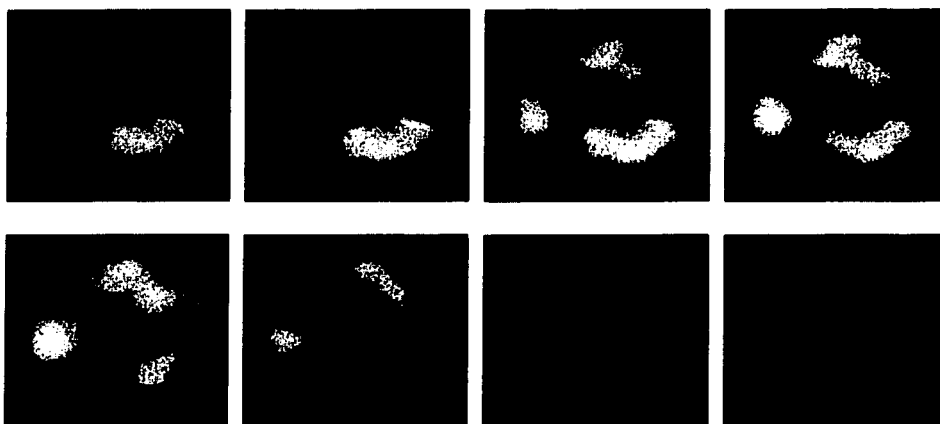


Figura 8. Núcleo interfásico de *Allium cepa* después de 48 horas de sobrevida. **A**; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada. Nótese la separación de las áreas de cromatina marcada y no marcada, debido a la segregación durante algunos ciclos celulares. **B**; micrografía de fluorescencia de la distribución de DAPI del mismo núcleo.

La microscopía confocal de núcleos con 48 horas (figura 9) muestra como en el caso anterior (sobrevida de 24 horas), que los volúmenes de cromatina marcada se encuentran en general localizados hacia la periferia del núcleo y se extienden a través de todo el interior nuclear.

Con este tiempo de sobrevida, los cúmulos de cromatina comienzan a individualizarse, en general son de forma irregular, ligeramente alargados y distribuidos junto a la envoltura nuclear. Generalmente se hallan separados entre si por áreas de cromatina de forma irregular y mucho más alargada.

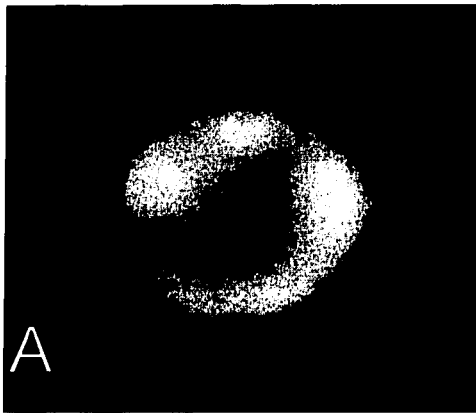


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Cortes confocales de la distribución de cromatina en un núcleo marcado de *Allium cepa* después con 48 horas de sobrevida. Nótese la segregación creciente de la cromatina marcada, respecto al tratamiento de 24 horas de sobrevida. La separación entre cortes es de 1.5 μm .

Grupo experimental con 72 horas de sobrevida

En este grupo experimental fue notoria una disminución de la proporción de cromatina marcada respecto al tratamiento de 48 horas debido a la segregación adicional. Es constante además el desplazamiento de la marca hacia la periferia del núcleo (figura 10).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Núcleo interfásico de *Allium cepa* después de 72 horas de sobrevida. A; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada.

La marca se localiza en la periferia del núcleo y son notorios ya los cúmulos individuales. Los cortes ópticos (figura 11), como en todos los casos anteriores, demuestran que estos cúmulos corresponden a volúmenes marcados al interior del núcleo.

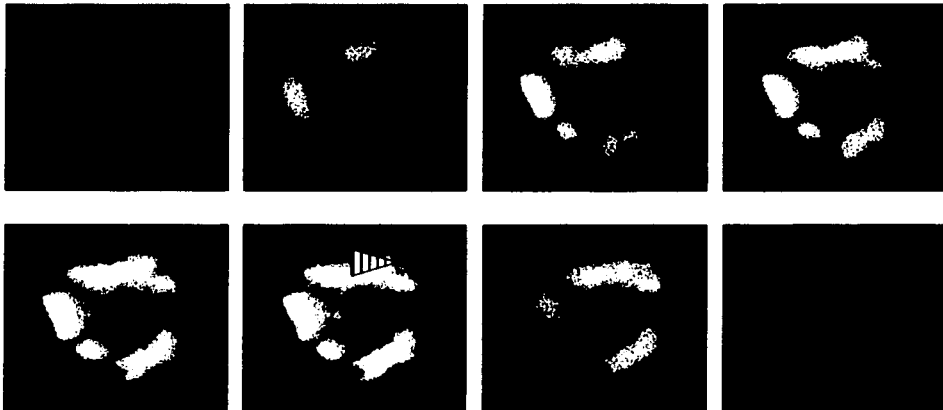
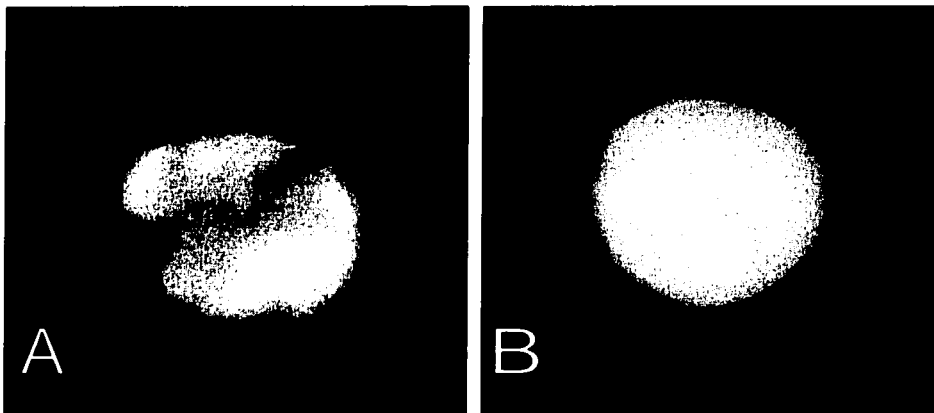


Figura 11. Cortes confocales de la distribución de cromatina marcada con BrdU en un núcleo de *Allium cepa* con 72 horas de sobrevida. Separación entre cortes es de 1.5 μm . La flecha apunta a una fibra de cromatina emanando del cúmulo principal.

Grupo experimental con 96 horas de sobrevida

Con una sobrevida de 96 horas, la cantidad de cromatina que resta marcada es inferior a la que muestra el tratamiento de 72 horas y las áreas no marcadas aumentaron.

La micrografía de la figura 12, muestra la mayor individualización de los cúmulos de cromatina marcados, la forma general es redondeada e irregular, y se extienden.

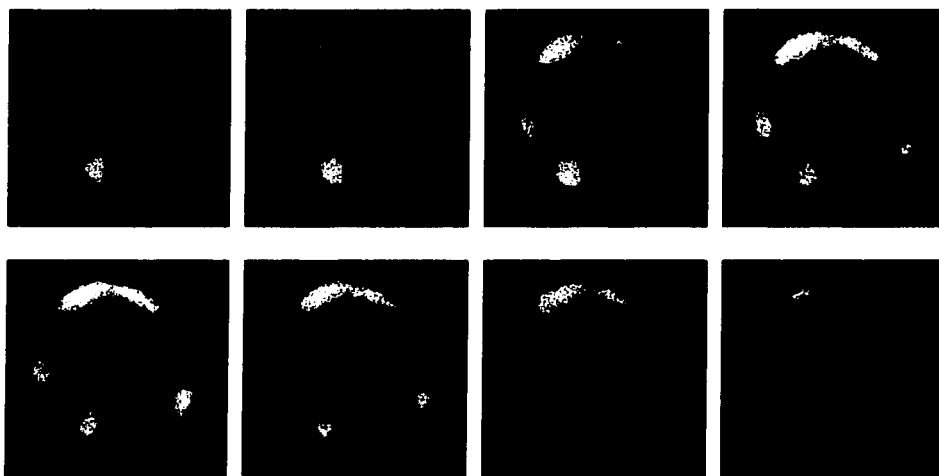


TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Figura 12. Núcleo de *Allium cepa* después de 96 horas de sobrevida. **A**; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada. **B**; micrografía de fluorescencia de la distribución de DAPI del mismo núcleo.

Al igual que en los tratamientos anteriores, los cortes confocales demostraron que la marca se distribuía en el interior del núcleo (figura 13), en cúmulos de tamaño y forma variable, por lo general localizados hacia la periferia del organelo.

Se muestra además una disminución de la cantidad de cúmulos marcados, lo cual corresponde a una segregación mayor por los ciclos celulares adicionales.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Cortes confocales de la distribución de cromatina marcada con BrdU en un núcleo de *Allium cepa* después de 96 horas de sobrevida. La separación entre cortes es de 1.5 μm .

Grupo experimental con 120 horas de sobrevida

Con una sobrevida de 120 horas, la mayoría de las células han pasado por al menos 7 ciclos celulares, lo que ha provocado que la marca sea segregada a sólo uno o dos cúmulos marcados (vistos como áreas en las micrografías de microscopía de fluorescencia o inferidos como volúmenes de marca sólida a partir del análisis de los cortes ópticos de la microscopía confocal)..

El núcleo de la figura 14, muestra dos cúmulos marcados (aunque sugerido por su forma, el más extenso de los dos no puede ser resuelto como dos cúmulos separados por las limitaciones de este tipo de microscopía).

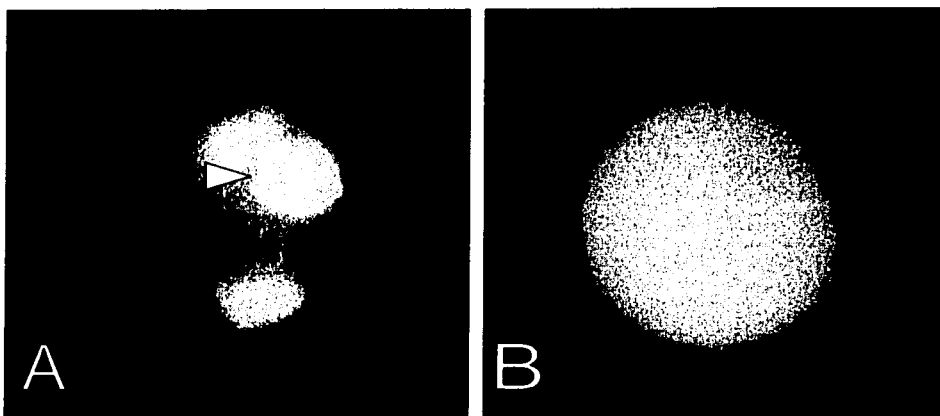


Figura 14. Núcleo interfásico de *Allium cepa* después de 120 horas de sobrevida. **A**; micrografía de fluorescencia de la distribución de cromatina marcada. La flecha blanca apunta a un área de cromatina marcada correspondiente a un territorio cromosómico. **B**; micrografía de fluorescencia de la distribución de DAPI del núcleo en A.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

La serie de imágenes confocales mostrada en la figura 15, muestran la mayor individualización de un volumen de cromatina, comparada con las 96 horas de sobrevida. La segregación en este punto ha producido sólo un volumen marcado en este núcleo en particular, aunque fueron vistos núcleos con dos o tres.

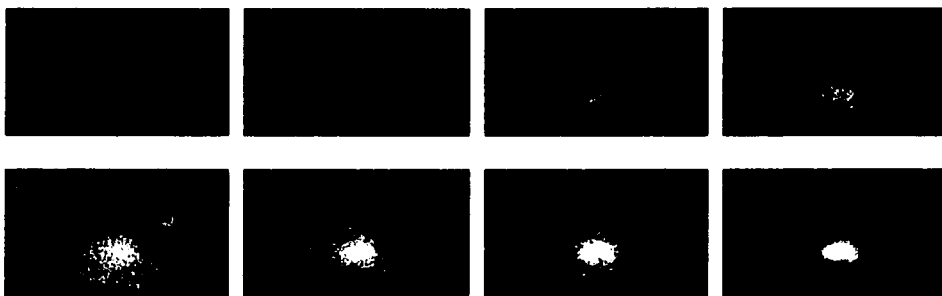


Figura 15. Cortes confocales subsecuentes de un núcleo interfásico de *Allium cepa* con una sobrevida de 120 horas. La segregación ha producido solo dos territorios cromosómicos marcados en este núcleo. La separación entre cortes es de 1 μ m.

Discusión

La marca es específica

La ausencia de marca en el control tipo 1 (los cuales no fueron incubados en BrdU), demuestra la especificidad de la reacción entre el anticuerpo anti-BrdU y el BrdU incorporado en la cromatina; debido a que no existen los epítomos de BrdU en la cromatina, el anticuerpo anti-BrdU no puede fijarse en ésta y es arrastrado con los lavados posteriores.

Por otro lado, la falta de marca encontrada en los núcleos de control tipo 2 (en los que fue omitido el anticuerpo anti-BrdU) demuestra que la reacción entre los anticuerpos secundario y primarios (anti-BrdU), fue específica; el anticuerpo secundario no pudo fijarse a la cromatina debido a la omisión del anti-BrdU.

La autofluorescencia encontrada en ambos controles, proveniente de citoplasma, núcleo, membrana plasmática y restos de pared celular, es normal en material biológico, especialmente aquellos fijados con aldehídos (Segura, com. pers., 2002). El hecho de que inclusive el nucleolo la presentara indica un origen distinto a la fluorescencia proveniente de FITC (que no marca el nucleolo).

La conjunción de éstos resultados, demuestra la especificidad del procedimiento de inmunofluorescencia.

La segregación de la marca observada conforme aumentaba la sobrevida, es una prueba de la incorporación específica y de la ausencia de difusión de la BrdU en la cromatina. Adicionalmente representa una confirmación de que la BrdU no tiene efectos adversos sobre el ciclo celular a bajas concentraciones (Aten y cols., 1994).

La observación de fibras de cromatina marcadas con BrdU (Lengronne y cols., 2001), pudo ser realizada en algunos cortes ópticos del grupo experimental de 72 horas. En estos pudieron verse fibras de cromatina emanando de cúmulos, lo que confirma la buena resolución de la microscopía confocal. El conocido patrón reticulado en los núcleos de *Allium cepa*, observados con el microscopio electrónico (Lafontaine y cols., 1969), no pudo ser visto en este trabajo, debido a varios factores, el más importante es la menor resolución de las microscopías

confocal y de fluorescencia comparada con la obtenida con microscopía electrónica. Adicionalmente, la tinción en los cortes para microscopía electrónica es fundamentalmente superficial (Thiry, 1995), mientras que tanto en microscopía confocal como de fluorescencia, la superposición de los numerosos cúmulos y fibras de cromatina en todo el volumen de los cortes confocales (0.5 μm) o del núcleo (5 μm), evita la visualización del característico patrón reticulado.

La población celular es heterogénea

Debido a la naturaleza altamente especializada de las raíces y a la dinámica y anatomía particularmente compleja de la punta de éstas, la población de células obtenidas de una raíz es heterogénea en lo que respecta a la sincronización de los ciclos celulares y a la incorporación y segregación de la marca de BrdU.

Es por tanto posible dividir en dos tipos a la población celular de una raíz en particular, tomando como base la proporción de cromatina marcada: núcleos de células que no presentan marca y núcleos que presentan alguna proporción de su cromatina marcada.

El primer tipo, los núcleos sin marca pueden provenir de células que no estaban sincronizadas en la fase S de la mitosis durante la administración del pulso de BrdU y por tanto no incorporaron alguna cantidad de ésta en su ADN (la HU hace que esta posibilidad corresponda únicamente a células no proliferativas, en proceso de diferenciación y que afortunadamente pueden ser identificadas por su mayor tamaño, Samaniego y cols., 2002) o núcleos que han perdido completamente la marca a través de varios ciclos mitóticos (esto sólo es factible en los tiempos más largos de sobrevida).

Los núcleos del segundo tipo (que presentan marca en un grupo experimental particular) muestran una variación considerable en la proporción de cromatina marcada. Si se considera que el cultivo era sincrónico al inicio del pulso de BrdU, las diferentes proporciones de marca, se interpretan como provenientes de células con ciclos celulares de diferente duración o por una repartición no equitativa de la marca durante la mitosis. Este último caso ha sido observado en células de hamster en cultivo, en la que después de un determinado tiempo de sobrevida, se observó un rango de 0 a 8 cromosomas marcados con un promedio de 3 (Jaunin y cols., 2002)

La sobrevida de las raíces produce la segregación de la marca

Del total de células en un segmento de raíz de *Allium cepa* sin tratamiento de sincronización, aproximadamente un 70% se encuentra en proliferación activa, y de ellas, sólo una fracción se encuentra en la misma fase del ciclo celular en un momento dado.

La incubación de las raíces en HU provoca bloqueo de la mitosis al inicio de la fase S (Samaniego y cols., 2002) y si cubre aproximadamente un ciclo celular, una acumulación de células en dicha fase. El cultivo es por tanto sincronizado. Su incubación subsecuente en BrdU durante una fase S, provoca la incorporación de esta última en el ADN, por competencia con las moléculas de timidina durante la replicación. En estas condiciones, cada cromosoma se encuentra marcado en toda su longitud y solo en una de las dos hebras de ADN por moléculas de BrdU (Cremer y cols., 2001).

Las raíces (cuyos núcleos se encontraban marcados en su totalidad con BrdU) fueron entonces sometidas a una incubación adicional en agua de la llave por 24, 48, 72, 96 y 120 horas (sobrevida). La progresión a través de varios ciclos celulares en ausencia de BrdU, genera una segregación azarosa de la marca entre las células hijas de cada mitosis (Visser y cols., 1999). La variación en la proporción de marca, es un reflejo de este proceso.

Los tiempos de sobrevida reflejaron la progresiva segregación de la marca. La BrdU encontrada en la totalidad del volumen nuclear en el grupo experimental sin sobrevida, demuestra que la totalidad de los cromosomas fueron marcados por el pulso de BrdU y que la ausencia de ciclos celulares posteriores a la incubación en ésta, al no permitirse la síntesis de nuevo ADN conteniendo solo timidina, evita la segregación de la marca.

A las 24 horas de sobrevida, la marca se encontró concentrada en grandes volúmenes de cromatina separados entre sí por volúmenes no marcados de forma irregular y alargada, la sobrevida permitió a las células pasar por aproximadamente 1.5 ciclos celulares (correspondiente a 2 fases S), en los que se segregó la marca. No es posible aún diferenciar cúmulos individuales debido a la gran cantidad de marca..

Los grupos experimentales de 48, 72 y 96 horas muestran una disminución progresiva de la cantidad de marca correspondiente a la mayor cantidad de ciclos celulares en estos grupos. La

disposición periférica de los volúmenes marcados, concuerda con observaciones previas de su asociación con elementos de la lámina nuclear. A partir de 72 horas de sobrevida, es posible determinar cúmulos individuales mediante microscopía confocal.

La mayor segregación de la marca se encontró en el grupo experimental de 120 horas de sobrevida. Con aproximadamente 7 ciclos celulares, las células muestran cúmulos individualizados, redondeados y localizados usualmente en la periferia del núcleo. Existen dos posibles interpretaciones de estos cúmulos: ya sea que representen territorios cromosómicos parciales, debido al conocido fenómeno de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH, López y cols., 1996; Zink y cols., 1998), por demás difícil de cuantificar y determinar mediante esta técnica o que correspondan a territorios cromosómicos completos.

La primera posibilidad parece lejana debido a la forma regular y que no existe un límite abrupto en el cúmulo marcado (Visser y cols., 2000). La segunda parece corresponder más a la realidad, ya que el hecho de que el pulso de BrdU haya sido realizado durante 2 fases S, hace que todos los cromosomas hayan sido marcados, la ulterior segregación sólo separa cromosomas completos, no partes de éstos.

Conclusiones

Esta técnica permite visualizar territorios cromosómicos completos correspondientes a un cromosoma.

La heterogeneidad celular de la raíz de *Allium cepa* limita su uso en experimentos de marcado de cromosomas.

La heterogeneidad celular podría ser disminuida tomando muestras de regiones localizadas de la raíz que incluyan solo unas pocas etapas de maduración de las células.

Alternativamente se recomienda el uso de cultivos celulares animales o aún suspensiones de protoplastos aislados de *Allium* para limitar la heterogeneidad celular.

Es necesario seguir investigando sobre las características celulares de *Allium cepa* para afinar su uso como sistema experimental.

Bibliografia

- Abranches, R., Beven, A., Aragón-Alcaide, L., Shaw, P., 1998, Transcription sites are not correlated with chromosome territories in wheat nuclei, *Journal of Cell Biology*, 143(1): 5-12.
- Aten, J.A., Stap, J., Hoebe, R., Bakker, P.J.M., 1994, Application and detection of IdUrd and CldUrd as two independent cell-cycle markers, *Methods in Cell Biology*, 41: 317-326.
- Bártová, E., Kozubek, S., Jirsová, P., Kozubek, M., Gajová, H., Lukášová, E., Skalníková, M., Gánová, A., Koutná, I., Hausmann, M., 2002, Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells, *Journal of Structural Biology*, 139: 76-89.
- Berciano, M., Villagrà, N., Pena E., Navascués, J., Casafont, I., Lafarga, M., 2002, Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons, *Microscopy Research and Technique*, 56: 132-142.
- Boyle, S., 2001 The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Human Molecular Genetics*, 10: 211–219
- Cerda, M., Berrios, S., Fernández, R., Garagna, S., Redi, C., 1999, Organisation of complex domains in somatic mouse cells, *Biology of the Cell*, 91: 55-65
- Comings, D. E., 1980, Arrangement of chromatin in the nucleus, *Human Genetics*, 53: 131-143.
- Cremer, T., Cremer, C., 2001, Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nature Reviews*, 2:292-301
- Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietel, S., Rinke, B., Schrock, E., Speicher, M., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P., Scherthan, H., Ried, T., Cremer, C., Lichter, P., 1993, Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 58: 777-792.
- Edelmann, P., Bornfleth, H., Zink, D., Cremer, T., Cremer, C., 2001, Morphology and dynamics of chromosome territories in living cells, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1551:M29-M40
- Fakan S., Hancock R., 1974, Localization of newly synthesized DNA in a mammalian cell as visualized by high resolution autoradiography, *Experimental Cell Research*, 83: 95-102.

- Ferreira J., y Carmo-Fonseca, M., 1997, Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order, *Journal of Cell Science*, 110: 889-897.
- Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C., Lamond, A., 1997, Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories, *Journal of Cell Biology*, 139(7):1597-1610
- Franz, P., Hans, J., Lysak, M., Ruffini, M., Schubert, I., 2002, Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22):14584-14589
- Fritsch, R.M., Friesen, N., 2002, Evolution, domestication and taxonomy, en: *Allium crop science: recent advances*, Rabinowitch (comp.), CAB International, 5, 15 pp.
- Garagna, S., Zuccotti, M., Thornhill, A., Fernandez, R., Berrios, S., Capana, E., Redi, C., 2001, Alteration of nuclear architecture in male ger cells of chromosomally derived subfertile mice, *Journal of Cell Science*, 114(24):4429-4434
- Ghosh, S., Paweletz, N., 1998, Detection of intranucleolar chromatin using an ultrastructural immunolabelling technique, *Cell Biology International*, 22(9/10): 609-614.
- Haaf, T., 1996, High-resolution analysis of DNA replication in released chromatin fibers containing 5-bromodeoxyuridine, *Biotechniques*, 21:1050-1054.
- Haaf, T., y Schmid, M., 1991, Chromosome topology in mammalian interphase nuclei, *Experimental Cell Research*, 192: 325-332.
- Havey, M., 2002, Genome organization in *Allium*, en: *Allium crop science: recent advances*, Rabinowitch (comp.), CAB International, 61-63 pp.
- Jackson, D., Bassim, A., Errington, R., Cook, P., 1993, Visualization of focal sites of transcription within human nuclei, *EMBO Journal*, 12(3): 1059-1065.
- Jaunin, F., Visser, A., Cmarko, D., Aten, J., Y Fakan S., 1998, A new immunocytochemical technique for ultrastructural analysis of DNA replication in proliferating cells after application of two halogenated deoxyuridines, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46(10): 1203-1209.

- Jaunin, F., Visser, A. Cmarko, D., Aten, J., Fakan, S., 2000, Fine structural *in situ* analysis of nascent DNA movement following DNA replication, *Experimental Cell Research*, 260: 313-323.
- Jiménez, L., Merchant, H., 2003, *Biología celular y molecular*, Pearson Education, México, 14 pp.
- Kozubek, S., Lukášová, E., Marecková A., Skalníková, M., Kozubek, M., Bártová, E., Kroha, V., Krahulková, E., Slotová, J., 1999, The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has an determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias, *Chromosoma*, 108:426-435.
- Kurz, A., S. Lampel, J.E. Nickolenko, J. Bradl, A. Benner, R.M. Zirbel, T. Cremer, y Lichter, P., 1996, Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories, *Journal of Cell Biology*, 135:1195–1205.
- Kosak, S., Groudine, M., 2002, The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription, *Developmental Cell*, 2(6): 690-692
- Lafontaine, J. G., Lord, A., 1969, Organization of nuclear structures in mitotic cells, en: *Handbook of molecular cytology* (Lima-de-Faria, ed.), North-Holland Publishing Company, Nueva York, 382 pp.
- Lamond, A., Earnshaw, W., 1998, Structure and function in the nucleus, *Science*, 280: 547-552.
- Lengronne, A., Pasero, P., Bensimn, A., Schowob, E., 2001, Monitoring S phase progression globally and locally usin BrdU incorporation in *TK⁺* yeast strains, *Nucleic Acid Research*, 29(7): 1433-1442.
- López, G., Márquez, J., Ubaldo, E., Corkidi, G., Echeverria, O., Vázquez, G., 1996, Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nucleus of G₀ rat lymphocytes, *Histochemistry and Cellular Biology* 105:153-161.
- Lucas, J., Cervantes, E., 2002, Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase, *International Journal of Radiation Biology*, 78(6): 449-455.

- Lysak, M., Fransz, P., Ali, H., Schubert, I., 2001, Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 28(6): 689-697.
- Ma, H., Siegel, A., Berezney, R., 1999, Association of chromosome territories with the nuclear matrix: disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins, *Journal of Cell Biology*, 146(3): 531-541.
- Mahy, N., Perry, P., Gilchrist, S., Baldock, R., Bickmore, W., 2002, Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories, *Journal of Cell Biology*, 157(4): 579-589.
- Manuelidis, L., 1985, Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization, *Human Genetics*, 71(4): 288-93.
- Matzke, M., Mette, M. F., Jakowitsch, J., Kanno, T., Moscone, E. A., van der Winden, J., Matzke, A. J., 2001, A test for transvection in plants: DNA pairing may lead to transactivation or silencing of complex heteroalleles in tobacco, *Genetics*, 158(1): 451-461.
- Mazzotti, G., Gobbi, P., Manzoli, L., Falconi, M., 1998, Nuclear morphology during the S phase, *Microscopy Research and technique*, 40: 418-431.
- Minguéz, A., Moreno, D.S., 1993, Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells, *Journal of Cell Science*, 106: 431-439
- Nagl, W., 1985, Chromatin organization and the control of gene activity, *International Review of Cytology*, 94: 21-56.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 1992, *Principios de bioquímica de Lehninger*, 3ª ed., Worth Publishers, 806 pp.
- O'Keefe, R., Henderson, S., Spector, D., 1992, Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific α -satellite DNA sequences, *Journal of Cell Biology*, 116(5): 1095-1110.
- Parada, L., Misteli, T., 2002, Chromosome positioning in the interphase nucleus, *Trends in Cell Biology*, 12(9):435-432
- Rabl, C., 1885, Über zellteilung, *Morphol Jahrb*, 10-214-330.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, G., Cremer, T., Turner, B., Zink, D., 1999, Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments, *Journal of Cell Biology*, 146(6):1211-1226
- Samaniego, R., de la Torre, C., Moreno, S., 2002, Dynamics of replication foci and nuclear matrix during S phase in *Allium cepa* L. cells, *Planta*, 215:195-204.
- Samaniego, R., Wendou, Y., Meier, I., Moreno, S., 2001, Characterisation and high-resolution distribution of a matrix attachment region-binding protein (MFP1) in proliferating cells of onion, *Planta*, 212:535-546.
- Sun, H., Shen, J., Yokota, H., 2000, Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei, *Biophysical Journal*, 79:184-190.
- Takhtajan, A., 1997, *Diversity and classification of flowering plants*, Columbia University Press, Nueva York, 643 pp.
- Tamatani, R., Tanaguchi, Y., Kawarai, Y., 1995, Ultrastructural study of proliferating cells with an improved immunocytochemical detection of DNA-incorporated bromodeoxyuridine, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 43(1): 21-29
- Tanabe, H., Habermann, F., Solovei, I., Cremer, M., Cremer, T., 2002a, Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications, *Mutation Research*, 504: 37-45
- Tanabe, H., Müller, S., Neusser, M., von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C., Cremer, T., 2002b, Evolutionary conservation of chromosome territories arrangements in cell nuclei from higher primates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7):4424-4429
- Taslerová, R., Kosubek, S., Lucášová, E., Jirsová P., Bartová, E., Kosubek, M., 2003, Arrangement of chromosome 11 and 22 territories, EWSR1 and FLI1 genes, and other genetic elements of these chromosomes in human lymphocytes and Ewing sarcoma, *Human Genetics*, 112:143-155.
- Thiry, M., 1995, *Ultrastructural detection of nucleic acids by immunocytochemistry: Visualization of nucleic acids*, CRC Press, Estados Unidos, 111-113, 116, 118 pp.

- Vázquez, G. H., Echeverría, O. M., Zavala, G., Jiménez, L. F., González, M. A., Parra, R., 1986, Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells, *Acta Anatomica*, 126: 141-146.
- Verschure, P., van der Kraan, I., Enserink, J., Moné, M. Manders, E., van Driel, R., 2002, Large-scale chromatin organization and the localization of proteins involved in gene expression in human cells, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(10):1303-1312.
- Verschure, P., van der Kraan, I., Manders, E., van Driel, R., 1999, Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories, *Journal of Cell Biology*, 1(4): 13-24.
- Visser, A., Eils, R., Jauch, A., Little, G., Bakker, P. J. M., Cremer, T. Aten, J. A., 1998, Spatial distributions of early and late replicating chromatin in interphase chromosome territories, *Experimental Cell Research*, 243:398-407
- Visser, A., Jaunin, F. Fakan, S. Aten, J., 2000, High resolution analysis of interphase chromosome domains, *Journal of Cell Science*, 113: 2585-2593.
- Visser, A., Aten, J., 1999, Chromosome as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei, *Journal of Cell Science*, 112:3353-3360
- Vourc'h, C., Taruscio, D. Boyle, A., Ward, D., 1993, Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes, *Experimental Cell Research*, 205: 142-151.
- Wansink, D., Schul, W., Kraan, I., Steensel, B., van Driel, R., Jong L., 1993, Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA Polymerase II in domains scattered throughout the nucleus, *Journal of cell biology*, 122(2): 283-293.
- Yano, H., Sato, S., 1995, Cytochemical localization of intranucleolar DNA and RNA in *Allium cepa* root-tip cells, *Journal of Electron Microscopy*, 44(5): 337-343.
- Yeoman, M., Aitchison, P., 1976, Cell division in higher plants, Academic Press, Nueva York, 120-121 pp.
- Zink, D., Bornfleth, H., Visser, A., Cremer, C., Cremer, T., 1999, Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories, *Experimental Cell Research*, 247: 176-188.

- Zink, D., Cremer, T., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M., Ansorge, W., Stelzer, E., 1998, Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo, *Human Genetics*, 102: 241-251.
- Zink, D., Sadoni, N., Stelzer, E., 2003, Visualizing chromatin and chromosomes in living cells, *Methods*, 29: 42-50.

Otros recursos

- ICN, hoja técnica anti-bromodeoxiuridina (cat. 11200), 2002.
- Sigma, hoja técnica antibromodeoxiuridina (B-2531), <http://www.sigmaaldrich.com/>, 2003.