



74  
2oj

# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudio Ultraestructural Citoquímico  
y Autorradiográfico del Núcleo Celular  
de Dinoflagelados”.

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

GABRIELA GONZALEZ CERON



México, D. F

1988



## **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 está 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.

## INDICE.

PROLOGO	*****	1
INTRODUCCION	*****	2
OBJETIVOS	*****	12
MATERIAL Y METODO	*****	13
RESULTADOS	*****	20
DISCUSION	*****	39
CONCLUSIONES	*****	44
BIBLIOGRAFIA	*****	45

## PROLOGO.

Debido a las numerosas características nucleares poco usuales que presentan los **Dinoflagelados**, son organismos de gran interes tanto para los especialistas del grupo como para los biólogos celulares; así como también por la discusión que ha surgido a partir de que Dodge propuso el termino Mesokaryota para separar los dinoflagelados de los organismos procariontes y eucariontes.

Por estas razones la introducción del presente trabajo menciona brevemente algunas características nucleares de eucariontes comparadas con los procariontes y las características nucleares que se conocen de los dinoflagelados y su ciclo celular.

Se estudió el núcleo celular interfásico de **Dinoflagelados** endosimbiontes de anémonas, utilizando diferentes técnicas preferenciales de microscopía electrónica.

Los resultados muestran en el núcleo de los dinoflagelados, 7 tipos de partículas ribonucleoproteicas, que son digeridas con RNAsa. Cromatina laxa en forma de fibras que parten del cromosoma hacia el nucleoplasma. En la cromatina laxa se lleva a cabo la transcripción, en donde se incorpora la uridina tritida. Los cromosomas no son totalmente digeridos con las enzimas pronasa - DNAsa.

Las características de los dinoflagelados son más parecidas a los eucariontes, por lo que se apoya la idea de que son eucariontes verdaderos, un grupo que se separó de las otras líneas protoctistas muy temprano en la evolución de los eucariontes, antes que el tipo de núcleo, incluyendo a las histonas, y el plan mitótico de plantas y animales hubiera aparecido.

## INTRODUCCION.

El núcleo celular de eucariontes presenta una envoltura nuclear (doble membrana) con poros, que desaparece en una etapa del ciclo celular. El ácido desoxiribonucleico (DNA) es muy largo y contiene muchas regiones no codificantes, se encuentra unido a proteínas básicas histonas que lo compactan en nucleosomas y posteriormente organizado en forma de cromatina. El ácido ribonucleico (RNA) recién sintetizado en el núcleo, forma complejos de RNA - proteína empaquetado y condensado en las llamadas partículas ribonucleoproteicas (RNPs), a partir de estas se lleva a cabo el procesamiento y transporte de RNA hacia el citoplasma donde se sintetizan las proteínas (Herzog et al., 1984; Alberts et al., 1986).

Las partículas ribonucleoproteicas son:

**Gránulos Pericromatinianos GPC.** Se localizan cercanos a conglomerados de cromatina compacta y son corpúsculos individuales de 30 a 50 nanómetros de diámetro, presentan un centro denso a los electrones formado por fibras de entre 1 y 3 nm de grosor y un halo claro alrededor, de aproximadamente 25 nm de diámetro (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin et al., 1983). Funcionan almacenando y/o transportando intranuclearmente el RNA mensajero o premensajero (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

**Fibras Pericromatinianas FPC.** Son estructuras ribonucleoproteicas de 3 a 5 nm de grosor y hasta 120 nm de largo (Monneron y Bernhard, 1969). Representan el sustrato morfológico donde se localiza el RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) recién sintetizado (Fakan et al., 1976; Puvion y Moyne, 1978).

Fibras Intercromatinianas FIC. Representan el sustrato morfológico de los hnRNAs libres en el nucleoplasma o de migración al citoplasma (Puvion y Moyne, 1978).

Gránulos Intercromatinianos GIC. Estructuras granulares de 20 a 50 nm de diámetro que se encuentran unidas por fibrillas delgadas y forman cúmulos de tamaño variable en el espacio intercromatiniano (Monneron y Bernhard, 1969). Contienen RNA ribosomal y gran cantidad de RNAs intranucleares de pequeño tamaño (UsnRNAs) (Puvion et al., 1984; Jiménez, 1985).

Cuerpos Espiralados CE. Son estructuras de 0.5  $\mu$ m de diámetro, enrolladas sobre un eje, localizados en el espacio intercromatiniano, aun no se conoce su papel citofisiológico (Monneron y Bernhard, 1969).

El nucleolo consta de varios componentes estructurales y funcionales. los principales son:

Los Centros Fibrilares que son áreas poco densas a los electrones, poseen DNA ribosomal, RNA polimerasa I y las proteínas B23 y C23.

Los Componentes Fibrilares Densos, representan la forma transcripcionalmente activa del nucleolo.

Los Componentes Granulares constan de partículas de 15 a 20 nm de diámetro, compuestas de RNA pre-ribosomal.

La Región del Organizador Nucleolar representa el sitio donde se localizan los genes DNA ribosomal, y es a partir de él que se forma nuevamente el nucleolo después de telofase (Jiménez, 1985).

Los eucariontes presentan un ciclo celular que se divide en: fase  $G_1$ , fase S en donde se realiza la síntesis de DNA, fase  $G_2$  y fase M de división celular.

lar realizada por mitosis (o meiosis) en donde intervienen estructuras como cinetocoro y huso mitótico (Herzog et al., 1984; Alberts et al., 1986).

Los procariontes no tienen un núcleo bien definido ni membrana nuclear, no tienen gran cantidad de DNA repetitivo, no tienen histonas ni nucleosomas, por lo que el DNA se encuentra organizado en forma circular en el citoplasma, el RNA y proteínas son sintetizados en el mismo compartimento (el citoplasma). No tienen nucleolo. Presentan una síntesis continua de DNA. La división celular es por fisión binaria (Herzog et al., 1984; Alberts et al., 1986).

#### D i n o f l a g e l a d o s .

Los dinoflagelados poseen numerosas características nucleares poco usuales; presentan una envoltura nuclear (doble membrana) con poros, que permanece intacta durante todo el ciclo celular. Rizzo y colaboradores (en Spector, 1984) detectaron más bien una cantidad grande de ácido desoxiribonucleico (DNA) por núcleo haploide, de 2.2 a 200 picogramos (pg) por núcleo. El DNA se encuentra en forma de cromosomas condensados permanentemente durante todo el ciclo celular. El genoma de dinoflagelados parece estar más relacionado al patrón eucariótico típico (Allen et al., 1975). Un aspecto de la organización peculiar del aparato genético de dinoflagelados, el cual es distinto a algún otro eucariote y parecido sólo a algunos bacteriofagos, es el hallazgo de que la timina (T) del DNA es substancialmente reemplazada por 5-hidroximetiluracilo (HOMU), la adenina substituida por N<sup>6</sup>-metiladenina y la citosina substituida por 5-metilcitosina (Rae, 1976; Rae y Steele, 1978; Spector, 1984). Estas bases modifici

cadras no están distribuidas al azar en el DNA, Galleron (1984) propone que la modificación de timina a 5-hidroximetiluracilo (HOMU) es catalizado por una en zima que actúa en un sitio particular de la base timina en el DNA después de haber sido sintetizado. Rae y Steele (1978) presentaron evidencias de que la base HOMU en dinoflagelados no es directamente responsable de la estructura atípica de sus cromosomas, el HOMU en el DNA es incompatible con funciones nucleares importantes en otros eucariontes, y por lo tanto creen que el HOMU en el DNA de dinoflagelados representa un vestigio neutral de un mecanismo que operó en los primeros tiempos.

Una de las mayores diferencias bioquímicas entre los cromosomas de dinoflagelados y de eucariontes típicos es que los cromosomas de dinoflagelados es tán desprovistos de proteínas básicas como las histonas. Las fibras de cromatina dispersa de varios dinoflagelados se han observado como fibras lisas de diá metro uniforme, sin el arreglo nucleosomal encontrado en eucariontes superiores (Hamkalo y Rattner, 1977; Bobansky et al., 1979; Herzog y Soyer, 1981; Rizzo y Burghardt, 1982 a). Las fibras de cromatina dispersa en dinoflagelados miden entre 5.6 y 6.8 nm (nanómetros) de diámetro, en contraste con las fibras de cromatina de eucariontes típicos que miden de 25 a 35 nm de diámetro en la forma condensada y en la forma descondensada alrededor de 10 nm (Spector, 1984).

Varios investigadores (Rizzo y Noodén, 1974 a; Rizzo y Noodén, 1974 b; Rizzo y Cox, 1977; Herzog y Soyer, 1981; Rizzo, 1981; Rizzo, 1982; Rizzo y Burghardt, 1982 a; Rizzo et al., 1982 b; Rizzo y Morris, 1984; entre otros) con diferentes metodologías y dinoflagelados han estudiado las proteínas básicas del DNA de estos organismos, encontrando las proteínas básicas semejantes a las

histonas ("histonelike"), una de ellas con una movilidad ligeramente menor que la histona H<sub>4</sub>, con un peso molecular aproximadamente de 13,000; otra proteína básica ("histonelike") con una movilidad ligeramente mayor que la histona H<sub>4</sub> con un peso molecular de 10,000 y otra de 12,000. Jin-Yan (1984) experimentando con las proteínas básicas ("histonelike") sugiere haber encontrado una estructura semejante al nucleosoma ("nucleosomelike") que puede representar el nucleosoma primitivo.

Algunos investigadores (Kearns y Sigee, 1979; Kearns y Sigee, 1980; Sigee y Kearns, 1981; Sigee, 1982) han estudiado la composición elemental del núcleo y cromosomas de dinoflagelados utilizando microanálisis con rayos X; con estos estudios han detectado altos niveles de elementos como calcio, hierro, níquel, cobre y zinc en la cromatina. Mínimas cantidades de algunos de estos elementos se han encontrado en otros eucariontes, y han mostrado ser un componente esencial de la cromatina en estructura y función del DNA (Spector, 1984). Kearns y Sigee con los estudios anteriores sugieren que estos elementos pueden ser una parte estructural importante del cromosoma de dinoflagelados, tomando el lugar de las histonas que normalmente se unen a la carga negativa del grupo fosfato de las moléculas del DNA; mencionan que los metales se encuentran en un estado dinámico y no están simplemente como entidades estructurales estáticas; sugieren la posibilidad de que la condensación cromosomal permanente puede estar relacionada a una interacción metaloproteína-DNA. Herzog y Soyer (1983) concluyen que los cationes Ca<sup>2+</sup> (calcio) y Mg<sup>2+</sup> (magnesio) juegan un importante papel en la estabilización del condensado permanente de los cromosomas de dinoflagelados.

La ultraestructura de los cromosomas de dinoflagelados ha sido estudiada por investigadores quienes proponen varios modelos de arreglo, algunos como:

cromosomas consistiendo de hélice de segundo orden de Grassé; modelos de serpiente enrollada de Giesbrecht; modelo de arreglo regular de ocho figuras de Haapala (en Spector, 1984); modelo de hemihélice en forma de cromosomas politénicos (Haapala y Soyer, 1974 a; Haapala y Soyer, 1974 b; Haapala y Soyer, 1974 c; Haapala y Soyer, 1974 d); modelo de doble hélice (Oakley y Dodge, 1979; Livolant y Bouligand, 1980); modelo de compactación de nucleofilamentos organizados en 6 niveles en forma de hélice que son empaquetados a su vez en una doble hélice formando los cromosomas (Herzog y Soyer, 1983; Herzog et al., 1984). Otro modelo más complicado consiste de una estructura condensada con bandas periódicas a un eje longitudinal del cromosoma, cada banda está compuesta de subunidades fibrilares y granulares, es decir, un modelo compuesto con fibras centrales, hélice interna, hélice externa, gránulos y fibras conectoras (Spector y Triemer, 1981 b).

Si el DNA está arreglado en una estructura altamente ordenada, los mecanismos para este empaquetamiento son aún desconocidos; es evidente que se necesitan más datos para un modelo definitivo de la organización de éstos cromosomas poco usuales (Spector, 1984).

Soyer (1981) detectó la presencia de cables enrollados espiralmente de 20-45 nm en el nucleoplasma del dinoflagelado Porocentrum micans preparado por criofractura. Estos cables fueron encontrados en contacto o en estrecha proximidad con los cromosomas y fueron frecuentemente agrupados en pequeños paquetes. El cable está compuesto de varios filamentos enrollados en espiral midiendo de 5-6 nm de diámetro, y han mostrado resistencia a la digestión con las enzimas ribonucleasa (RNAsa) y desoxiribonucleasa (DNAsa). Propuso que esta compleja

subestructura nuclear puede jugar un papel en la conservación de la estructura nuclear y el movimiento cromosomal durante la mitosis.

Spector y Triemer (1981 b) observaron una banda de material granular denso que sirve de base a la envoltura nuclear, mide de 40-120 nm de ancho y está ausente en regiones de poros nucleares; debajo de este material granular hay una banda de microfilamentos de 6.5 nm de diámetro, apareciendo en grupos hasta de 15 microfilamentos; aunque estas estructuras han sido asignadas como microfilamentos, no son hasta ahora útiles los datos bioquímicos que se tienen para cerciorarse si contienen o no actina; creen que los filamentos funcionan en la ciclosis nuclear, un estado en la meiosis en donde ocurre la rotación del contenido nuclear, que puede estar asociado con parejas de cromosomas.

Los dinoflagelados contienen ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) que no es igual a ninguno de los grupos procariontes o eucariontes estudiados; Rae (1970) detectó la presencia de una molécula de rRNA 38 S que aparentemente da origen a las moléculas de rRNA 16 S y 27 S. Gressel y colaboradores (en Spector, 1984) determinaron el peso molecular del rRNA pesado 28 S y ligero 18 S del dinoflagelado Peridinium cinctum f. westii, siendo este de  $1.23 \times 10^6$  y  $0.7 \times 10^6$ ; el rRNA pesado está por debajo del rango reportado para eucariontes  $1.3 \times 10^6$  -  $1.7 \times 10^6$ . Hinnebusch y colaboradores (en Spector, 1984) determinaron una secuencia parcial de nucleótidos del rRNA 5 S y 5.8 S del dinoflagelado Crypthecodinium cohnii; la secuencia del rRNA 5 S mostró mayor semejanza (75 %) con la del rRNA 5 S de animales superiores, y menor homología (menos de 60 %) respecto al rRNA 5 S de procariontes. El rRNA 5 S de dinoflagelados carece al igual que otros eucariontes de 3 regiones que están altamente conservadas en

moléculas de procariontes. Reddy y colaboradores (en Spector, 1984) detectaron moléculas de RNA pequeño nuclear o de pequeño tamaño (snRNA) U<sub>1</sub> - U<sub>6</sub>, parecidos a los encontrados en eucariontes superiores.

Los dinoflagelados tienen un nucleolo prominente que permanece condensado durante todo el ciclo celular, incluso en la mitosis; posee regiones fibrilar y granular (los gránulos de aproximadamente 25 nm de diámetro) similar al encontrado en eucariontes superiores, así como también un prominente cromosoma organizador nucleolar (NOR), extendido en la porción interna del nucleolo, se cree representa la región de transcripción activa del DNA ribosomal (Rae, 1970; Livolant y Bouligand, 1978; Spector y Triemer, 1981 b; Spector, 1984).

Se han descrito dinoflagelados con 2 núcleos distintos morfológicamente, uno de ellos con las características de dinoflagelados y el otro con características típicas de eucariontes superiores; en el cual se encontraron las proteínas histónicas, que se creía eran del mismo organismo (Dodge, 1971; Tomas et al., 1973 a; Rizzo y Cox, 1977; Rizzo, 1981) pero Tomas y Cox (1973 b) y Jeffrey y Vesk (1976) demuestran la presencia de una doble membrana que rodea el núcleo eucariontico típico y cloroplastos, por lo que sugieren una relación simbiótica entre el dinoflagelado y otra alga unicelular.

### C i c l o   C e l u l a r .

En dinoflagelados la presencia o ausencia de un ciclo celular ha sido estudiado por varios investigadores con diferentes especies y metodologías como marcado autorradiográfico, sincronización del crecimiento celular, inhibidores

de la síntesis del DNA, entre otras; dichos estudios demostraron que en algunos organismos hay síntesis de DNA continua, proceso similar a los procariontes; en otros se presenta un período discreto de la síntesis de DNA, correspondiendo a la fase S del ciclo celular en otros eucariontes, además una posible caracterización de la fase G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y fase mitótica (Spector et al., 1981 a; Spector, 1984); y en otros dinoflagelados se presenta un periodo máximo de síntesis de DNA durante la interfase (similar a la fase S) y nivel bajo de síntesis continua en todo el ciclo celular, distinguiéndose también la fase G<sub>2</sub>, mitosis y la fase G<sub>1</sub> la cual fué extremadamente corta (Galleron y Durrand, 1979).

La mitosis de diferentes especies de dinoflagelados también ha sido estudiada por varios investigadores (Soyer, 1972; Pickett-Heaps, 1974; Ris, 1975; Cachon y Cachon, 1977; Spector y Triemer, 1981 b; Fritz y Triemer, 1983; entre otros). Distintos factores caracterizan la mitosis de dinoflagelados, la mayoría de ellos desarrolla un huso extranuclear con un sistema de canales cilíndricos. En algunos organismos se ha encontrado una banda de filamentos adyacente a la envoltura nuclear en la periferia del nucleoplasma, que desaparece durante la mitosis, y se sugiere que puede representar la base estructural para la formación de los canales (Spector y Triemer, 1981 b). Los canales contienen microtúbulos y ocasionalmente pequeños organelos como ribosomas, retículo endoplásmico y mitocondrias transversas al núcleo. El nucleoplasma permanece aislado del citoplasma y de los otros componentes del huso por la envoltura nuclear que persiste en toda la fase de la mitosis, y demás fases del ciclo celular. El aparato de Golgi se divide tempranamente en la mitosis y se mueve hacia los extre

mos opuestos del núcleo, y las regiones en forma de arco están colocadas comúnmente en los extremos de los canales citoplásmicos en ambos polos del huso (Fritz y Triemer, 1983; Spector, 1984). Los microtúbulos se encuentran en paquetes en el exterior del núcleo previo al desarrollo de los canales, penetrando al núcleo como un proceso mitótico rodeados por la envoltura nuclear. Los microtúbulos tienen una posición paralela a los canales cilíndricos, así como también hay paquetes de microtúbulos accesorios perpendiculares al plano de división nuclear (Soyer, 1975; Soyer, 1978; Fritz y Triemer, 1983; Spector, 1984). Existe una conexión entre los microtúbulos del canal y la envoltura nuclear inmediatamente adyacente al sitio de unión o anclaje de cromosomas en el lado nuclear del canal, en este punto los microtúbulos terminan en una estructura cónica, que se conecta a un material denso de 25 X 75 nm en la envoltura nuclear; esta estructura semejante al cinetocoro ("kinetochore like") se cree funciona conectando los microtúbulos en el lado citoplásmico de la envoltura nuclear con los cromosomas en el lado nuclear (Oakley, 1975; Fritz y Triemer, 1983; Spector, 1984). Una estructura semejante al cinetocoro ("kinetochore like") un poco diferente es el formado por material fibrilar denso situado en el poro nuclear, compuesto de 2 capas densas separadas por un espacio menos denso; considerada como una reminiscencia del cinetocoro de eucariontes superiores (Cachon y Cachon, 1977). En Syndinium los centriolos (cuerpos basales) consisten en una invaginación en forma de copa de la envoltura nuclear, que parece estar involucrada en la mitosis (Spector, 1984). Las cromátidas se separan longitudinalmente de un extremo del cromosoma produciendo una forma de "Y" y una de "V" (Oakley,

1975; Spector y Treimer, 1981b; Spector, 1984). Probablemente juegan un papel importante los microtúbulos del huso que están asociados con los cromosomas y las estructuras similares al cinetocoro ("kinetochore like") en el movimiento de los cromosomas en la mitosis, pero falta información de estos aspectos dinámicos. La constricción de la envoltura nuclear persistente forma los núcleos hijos. El dinoflagelado Oxyrhis marina es el único que presenta huso intranuclear (Spector, 1984).

Por las características poco usuales, principalmente del núcleo y de la cromatina, los dinoflagelados han sido estudiados por varios investigadores; sin embargo aun falta algunas cosas por saber acerca de estos organismos. La morfología de las estructuras ribonucleoproteicas del nucleoplasma de estos protoctistas no han sido estudiadas hasta ahora. Las partículas ribonucleoproteicas intranucleares visibles con el microscopio electrónico pueden suministrar indicaciones sobre la transcripción y los procesos postranscripcionales. Por lo tanto los objetivos de este trabajo son:

#### **OBJETIVOS .**

- 1.- Estudiar las ribonucleoproteínas (RNPs) y la cromatina de un tipo de dinoflagelados endosimbiontes de anémonas, utilizando técnicas especiales de contraste y digestiones enzimáticas con pronasa, ribonucleasa (RNAsa), y desoxiribonucleasa (DNAsa).
- 2.- Detectar la topografía de la transcripción, utilizando microscopía electrónica y autorradiografía ultraestructural cuantitativa.

## MATERIAL Y METODO.

### Material Biológico.

Se utilizaron Dinoflagelados (Familia Zooxanthellaceae. Loeblich III) endosimbiontes de Anémonas (Orden Zoanthidea) las cuales fueron colectadas a unos 100 metros aproximadamente mar adentro de la Isla Sacrificios en Veracruz. Se transportaron al laboratorio en una cubeta con agua de mar, haciéndose cambios de ésta cada 2 ó 3 horas durante el trayecto.

### Marcado del Acido Ribonucleico.

Para marcar el ácido ribonucleico (RNA) recién sintetizado se colocaron las anémonas con los dinoflagelados vivos en una solución que contenía 0.4 ml (mililitros) de agua de mar filtrada y 0.1 ml de uridina tritiada a una concentración de 300  $\mu$ Ci/ml. Se incubaron durante 30 minutos y se enjuagaron con agua de mar filtrada para quitar el exceso de precursor marcado, posteriormente fueron procesados para microscopía electrónica.

### Procesamiento para Microscopía Electrónica.

Los dinoflagelados endosimbiontes de anémonas fueron fijados durante 2 ho

ras con glutaraldehído al 2.5 % (Sabatini et al., 1963) en agua de mar filtrada, seguido de un enjuague con agua de mar filtrada. A continuación se separaron las muestras en tres grupos:

Las muestras del grupo 1 se postfijaron con tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) durante 1 hora. Después de ser enjuagadas con agua de mar filtrada fueron deshidratadas en alcoholes etílicos graduales (a partir del 70 %) de 15 a 20 minutos cada uno y tres cambios de óxido de propileno 20 minutos. Posteriormente fueron preincluidos en una solución 1:1 de óxido de propileno y una resina epóxica; para luego ser incluidos en la resina epóxica sola, polimerizando a  $60^{\circ} C$  por un día.

En las muestras del grupo 2 se omitió la postfijación y se siguió el procedimiento anteriormente descrito.

Las muestras del grupo 3 fueron deshidratadas en soluciones de glicolmetacrilato (GMA) graduales (a partir del 70 %) 15 minutos cada uno, posteriormente pasadas a una solución de inclusión no polimerizada un día a  $4^{\circ} C$  para después preincluir las en el prepolímero por 24 horas a  $4^{\circ} C$ , y por último se incluyeron colocándolas en cápsulas con prepolímero nuevo en una lámpara de luz ultravioleta durante un día para su polimerización.

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo MT 2 Sorvall.

Se llevaron a cabo diferentes técnicas de contraste:

Los cortes de las muestras del grupo 1 se contrastaron con la técnica general; 20 minutos de acetato de uranilo y 10 minutos de citrato de plomo.

Los cortes de las muestras del grupo 2 se contrastaron con la técnica pre

ferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) de Bernhard (1969); 3 minutos de acetato de uranilo, 18 minutos de EDTA (ácido etilendiaminotetracético, agente quelante) a pH 7 y 2 minutos de citrato de plomo.

Los cortes de las muestras del grupo 3 se contrastaron con la técnica preferencial para cromatina de Vázquez-Nin (et al., 1973); 30 minutos de ácido fosfotúngstico (PTA) preparado al 3 % en ácido clorhídrico (HCl) 1 N (Normal), ajustando el pH a 2.7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N.

Se observó y fotografió en un microscopio electrónico EM 9 y EM 10 Zeiss a 60 y 80 kilovoltios.

Las micrografías electrónicas fueron analizadas, caracterizando las estructuras observables, se midieron con una lupa graduada, haciendo las conversiones necesarias, tomando en cuenta los aumentos, para obtener la medida en nanómetros (nm), metiendo los datos a una computadora Franklin ACE 1200 para evaluar los datos con métodos estadísticos como: media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar, valor de "T de Student", con un programa realizado por el Dr. Vázquez-Nin.

#### A u t o r r a d i o g r a f í a .

La autorradiografía se basó en el método de Bouteille (1976) con algunas modificaciones.

Cortes semifinos (2  $\mu$ m aproximadamente) de dinoflagelados marcados con uridina tritiada se montaron en portaobjetos para observarse en microscopía óptica. Se preparó la emulsión fotográfica Ilford L4 en un cuarto oscuro, dilu-

yendo una parte de emulsión en 3 partes de agua bidestilada, en baño maría a 40 - 45° C agitando constantemente, se resguardó de la luz el frasco y se colocó en el refrigerador a 4° C, después de 24 horas la emulsión se sacó del refrigerador, y una vez a temperatura ambiente, en la obscuridad y en ambiente húmedo se puso en baño maría hasta alcanzar los 40 - 45° C. Los cortes semifinos montados en portaobjetos fueron sumergidos en la emulsión fotográfica y puestos a escurrir para que se formara la capa de emulsión, después se colocaron en una caja oscura provista de silicagel envuelto en gasa para mantener un ambiente seco. Las cajas oscuras fueron envueltas para resguardarlas de la luz, selladas, etiquetadas y guardadas en el refrigerador a 4° C, durante 2 meses de exposición.

Después del tiempo necesario de exposición, las preparaciones se procesaron fotográficamente usando revelador D19, se tiñeron en una caja Coplin con azul de toluidina en baño maría a 40° C. Se observaron y fotografiaron con un fotomicroscopio equipado con el sistema óptico de campo claro.

Para microscopía electrónica se usaron cortes ultrafinos (90 nm de grosor aproximadamente) de dinoflagelados marcados con uridina tritiada montados en rejillas. En un cuarto con luz roja las rejillas con los cortes ultrafinos hacia arriba se colocaron en un soporte especial; una asa de platino sostenida por unas pinzas se sumergió en la emulsión fotográfica Ilford L4 (preparada como anteriormente se explicó) unos segundos, después se colocó en posición vertical para que se formara la monocapa útil para cubrir las rejillas depositando el asa sobre el soporte donde está la rejilla. Las rejillas fueron pegadas en un portaobjetos con cinta adhesiva doble y estos a su vez puestos en una ca

ja oscura al resguardo de la luz, selladas y etiquetadas, se guardaron en el refrigerador a 4<sup>o</sup> C, durante 6 meses de exposición.

Después del tiempo necesario de exposición, las preparaciones se revelaron con el método del baño de oro. En el cuarto oscuro se colocaron cristalizadores con las soluciones en baño maría a una temperatura de 18<sup>o</sup> C, realizando los siguientes pasos:

- a) Baño de oro 5 minutos.
- b) Lavado brevemente con agua bidestilada 20 segundos.
- c) Revelado 2 minutos con fenidón.
- d) Fijación unos instantes 10 - 20 segundos.
- e) Fijador definitivo 7 minutos.
- f) 3 enjuagues con agua bidestilada, seguido de un lavado ligero con agua corriente por 30 minutos, pasando posteriormente a agua bidestilada y luego secado de las rejillas en la estufa a 37<sup>o</sup> C.

Las preparaciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, se observaron y fotografiaron en el microscopio electrónico EM 9 Zeiss.

#### C u a n t i f i c a c i ó n .

Para cuantificar los resultados de la autorradiografía se tomó en cuenta el grosor del corte, la emulsión fotográfica, el aumento final de la micrografía electrónica y el ángulo de absorvancia de radiación. Se delimitaron 4 zonas: citoplasma, cromosomas, pericromatina y núcleo (fig. 1). Se contaron la

cantidad de grános de plata que tenía cada zona; con ayuda de un programa realizado por el Dr. Vázquez-Nin, una computadora Franklin ACE 1200 y una tableta digitalizadora Apple, se determinó la densidad de grános de plata en cada zona y los datos fueron evaluados con métodos estadísticos como: media ( $\bar{X}$ ), desviación estandar, y valor de "T de Student".

### D i g e s t i ó n   E n z i m á t i c a .

Para llevar a cabo las digestiones enzimáticas (acorde a Leduc et al., 1963) los cortes ultrafinos de glicolmetacrilato (GMA, muestras del grupo 3) se colocaron y manejaron en anillos de Marinozzi, los cuales se pusieron en cajas petri en las siguientes condiciones:

- A) Pronasa 0.01 % en buffer tris-HCl 0.01 M (Molar) ajustado a pH7 por 10 minutos.
- B) RNAsa 0.1 % en buffer tris-HCl 0.01 M ajustado a pH 7 y cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 0.02 M durante 8 horas.
- C) DNAsa 500 Ui/ml (unidades internacionales/mililitro) en  $MgCl_2$  0.01 M y NaCl (cloruro de sodio) 0.15 M por 12 horas.
- D) Pronasa 15 minutos seguido de DNAsa por 12 horas con las condiciones anteriores.

Los controles de cada uno de los tratamientos fueron puestos en las mismas condiciones exceptuando las enzimas, solo para comprobar los efectos de las enzimas.

Los controles y las digestiones enzimáticas fueron colocados en una estufa a 37° C durante el tiempo de tratamiento, después se enjuagaron los cortes, se montaron en rejillas contrastando con acetato de uranilo y citrato de plomo, por último se observó y fotografió en el microscopio electrónico EM 9 y EM 10 de Zeiss.

## RESULTADOS.

### T é c n i c a s   d e   c o n t r a s t e .

Las micrografías electrónicas del núcleo celular interfásico de los Dino flagelagos endosimbiontes de anémonas contrastados con la técnica general ponen de manifiesto las siguientes estructuras:

Envoltura nuclear electron densa (doble membrana) con poros, semejante a la de los eucariontes superiores.

En todo el nucleoplasma se observa una malla o red poco densa a los electrones en donde están dispuestas las demás estructuras.

Cromatina en forma de cromosomas interfásicos compactos ya descritos por varios autores (Oakley y Dodge, 1979; Livolant y Bouligand, 1980; Spector et al., 1981 a; Spector y Triemer, 1981 b; Herzog y Soyer, 1983; Herzog et al., 1984; entre otros), en donde se observa una especie de bandeo, formado por fibras y gránulos; en algunas ocasiones la disposición se asemeja a una pluma de ave.

Nucleolo de aspecto homogéneo, no se distinguen bien los componentes característicos de eucariontes superiores. Su posición dentro del núcleo puede ser central o excéntrico, siendo esta última la más común.

Las partículas ribonucleoproteicas son en forma de gránulos generalmente circulares, aunque pueden presentarse en forma un poco alargada, encontradas en todo el nucleoplasma (fig. 2).

En las micrografías electrónicas del núcleo de **Dinoflagelados** contrastados con la técnica de Bernhard se observan las partículas ribonucleoproteicas densas a los electrones en forma de gránulos generalmente circulares en el nucleoplasma, caracterizadas en 7 tipos:

Gránulos chicos aislados (CA), encontrados al azar sin otra estructura cerca aproximadamente de 5 nm a su alrededor.

Gránulos chicos agrupados (CG), varios gránulos sin una disposición específica, en una pequeña área dependiendo del número de gránulos de que esté compuesto.

Gránulos chicos alineados (Cl), 3 ó más gránulos encontrados en el nucleoplasma en disposición lineal.

Gránulos con halo (H), gránulos chicos con un halo claro de 3.73 nm de diámetro a su alrededor.

Gránulos grandes aislados (GA), gránulos grandes con distribución al azar, sin alguna otra estructura cerca aproximadamente de 12 nm a su alrededor.

Gránulos grandes agrupados (GG), gránulos grandes distribuidos en una pequeña área dependiendo del número de gránulos de que esté compuesto, sin una disposición específica.

Gránulos grandes alineados (Gl), 3 ó más gránulos en disposición lineal.

También se observan los cromosomas blanqueados por la acción quelante del EDTA (fig. 3).

Una vez caracterizadas estas partículas ribonucleoprotéicas, se midieron dando como resultado los datos de la siguiente tabla e histograma de tamaño en nanómetros contra partículas descritas (pag. 22 y 23):

Tabla I Partículas Ribonucleoproteicas.

	CA	CG	CI	H	GA	GG	GI
Tamaño $\bar{x}$ nm	5.03	5.14	5.14	5.57	11.99	11.91	10.35
Desviación estandar	1.58	2.22	1.69	1.65	3.20	3.48	2.75
N	88	136	278	90	74	45	148
GI					T=3.7469 P≈0.001		
GG							T=2.7509 0.01>P>0.005
GA	T=17.015 P<0.001					T=0.1203 P>0.5	
H	T=2.2262 P≈0.025						
CI		T=9X10 <sup>-3</sup> P>0.5					T=21.0685 P<0.001
CG	T=0.4052 P>0.5					T=12.275 P<0.001	
CA			T=0.5336 P>0.5				

N= número de observaciones.

T= valor de "T de Student".

P= probabilidad.

Tabla I Partículas Ribonucleoproteicas.

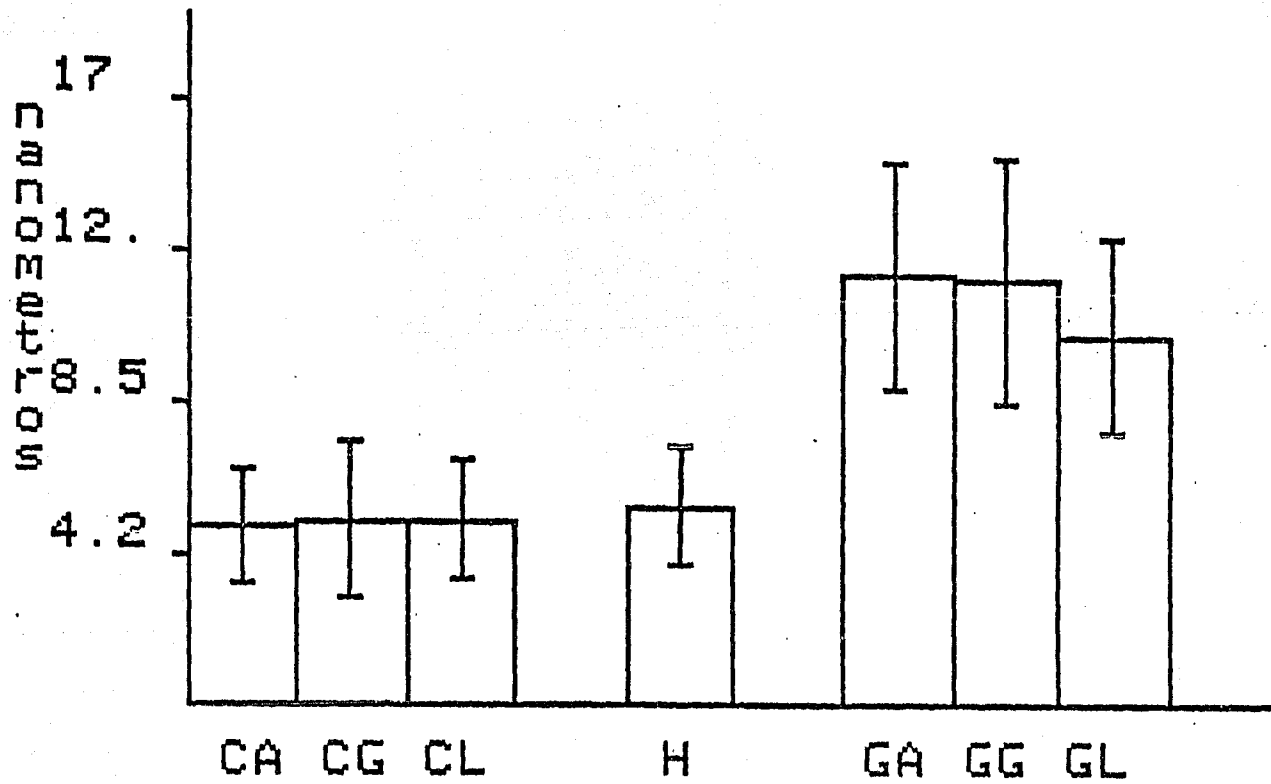
	CA	CG	Cl	H	GA	GG	Gl
Tamaño $\bar{X}$ nm	5.03	5.14	5.14	5.57	11.99	11.91	10.35
Desviación estandar	1.58	2.22	1.69	1.65	3.20	3.48	2.75
N	88	136	278	90	74	45	148
Gl					T=3.7469 P=0.001		
GG							T=2.7509 0.01>P>0.005
GA	T=17.015 P<0.001					T=0.1203 P>0.5	
H	T=2.2262 P=0.025						
Cl		T=9X10 <sup>-3</sup> P>0.5					T=21.0685 P<0.001
CG	T=0.4052 P>0.5					T=12.275 P<0.001	
CA			T=0.5336 P>0.5				

N= número de observaciones.

T= valor de "T de Student".

P= probabilidad.

# DIAMETROS de GRANULOS RNP



Con estos datos nos damos cuenta que hay 2 tipos de tamaños de gránulos a los que se les llamó grandes y chicos, en donde hay diferencias significativas, pero dentro de cada uno de estos se dividen en aislados, alineados, agrupados, (los chicos con halo) en donde no hay diferencias significativas en cuanto al tamaño, pero en cuanto a la forma de arreglo y disposición sí hay diferencia por lo que se caracterizaron los 7 diferentes tipos de partículas ribonucleoproteicas.

En las micrografías electrónicas del núcleo de **Dinoflagelados** contrastados con la técnica de Vázquez-Nin, se observa la cromatina en forma de cromosomas compactos y también se distingue la cromatina laxa. Con esta metodología se demuestra que durante la interfase parten fibras de cromatina extendida de los cromosomas compactos hacia el nucleoplasma sobrelapandose con las fibras de cromatina extendida de los cromosomas vecinos. El nucleolo se sigue viendo de estructura homogénea (fig. 4).

#### A u t o r r a d i o g r a f í a .

Las fotografías de la autorradiografía para microscopía óptica sirvieron para comprobar que los **Dinoflagelados** habían incorporado uridina tritiada, principalmente en el núcleo, lo cual fué un buen indicio para continuar los estudios autorradiográficos.

En los estudios de autorradiografía para microscopía electrónica se obtuvieron los datos de la siguiente tabla, así como también la gráfica de densidad de marcado en las zonas delimitadas (pag. 25 y 26):

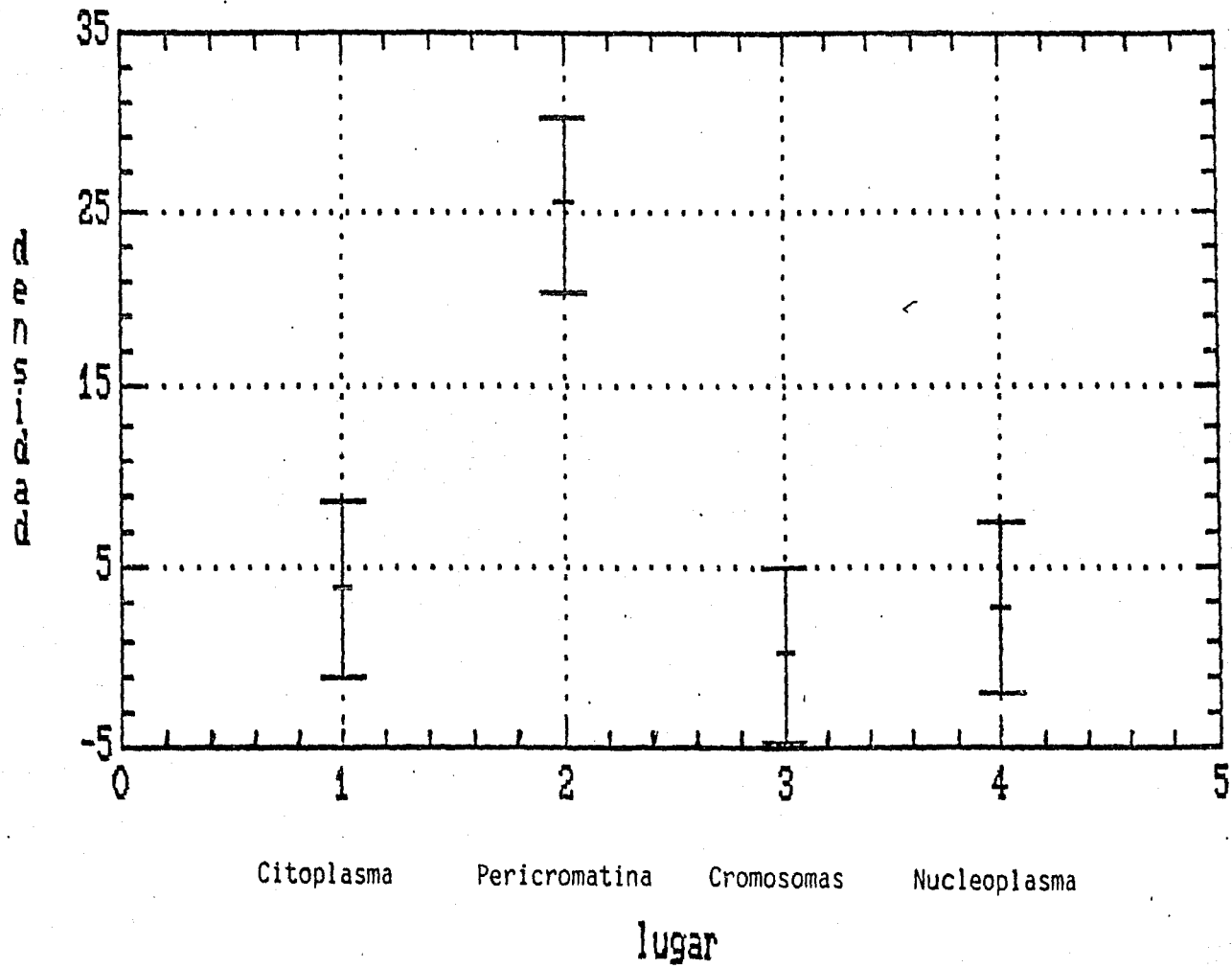
Tabla II Densidad de Marcado.

	1	2	3	4
	Citoplasma	Pericromatina	Cromosomas	Nucleoplasma
Densidad de granos de Plata $\bar{x}$	3.86	25.37	0.19	2.88
Desviación estandar	1.31	12.28	0.24	2.8
Citoplasma		T=3.2106 0.005>P>0.001	T=9.15097 P<0.001	
Pericromatina			T=3.76506 0.005>P>0.001	
Cromosomas				T=3.16832 P≈0.005
Nucleoplasma	T=1.06179 0.4>P>0.2	T=3.33764 0.005>P>0.001		

T = valor de "T de Student".

P = probabilidad.

# DENSIDAD DE MARCADO



Estos resultados de autorradiografía ultraestructural cuantitativa pusieron de manifiesto que la zona adyacente a los cromosomas delimitada como zona pericromatiniana incorpora uridina tritiada 9 veces más que el resto del nucleoplasma, 133 veces más que el centro del cromosoma y 7 veces más que el citoplasma en la media hora de marcado (fig. 5).

#### D i g e s t i o n e s   E n z i m á t i c a s .

En cuanto a las digestiones enzimáticas se observó lo siguiente:

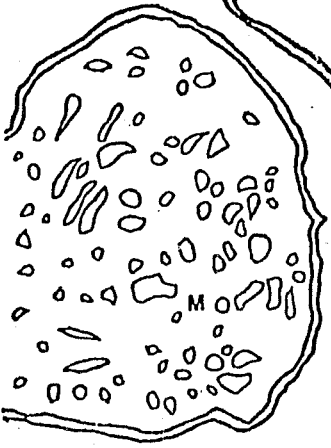
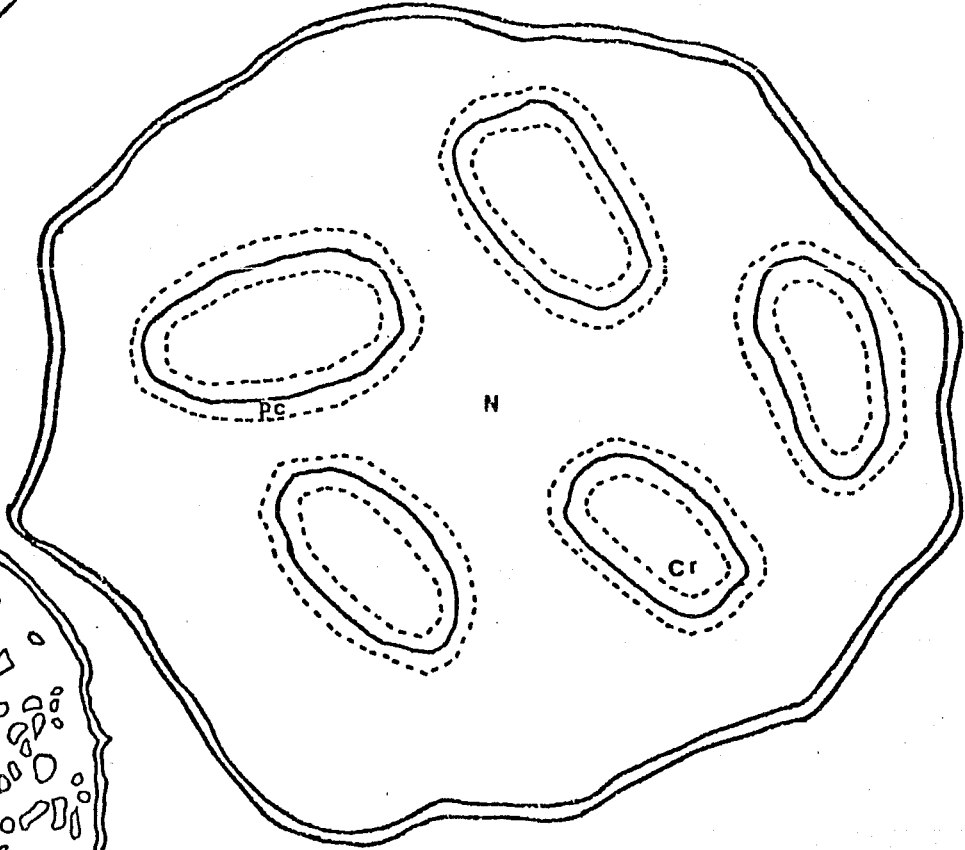
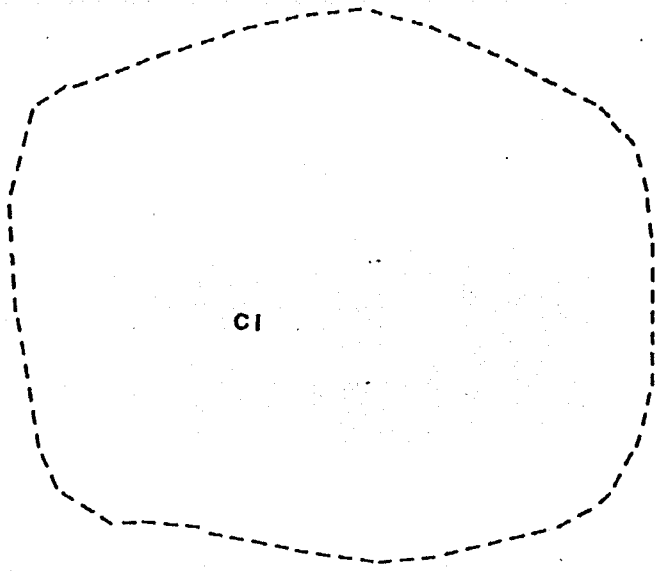
Con pronasa no hay un cambio aparente, observándose las micrografías electrónicas con las estructuras descritas en la técnica general; la envoltura nuclear, la malla o red en todo el nucleoplasma, las partículas ribonucleoproteicas granulares, los cromosomas con el bandeo fibro-granular y el nucleolo de aspecto homogéneo (fig. 6).

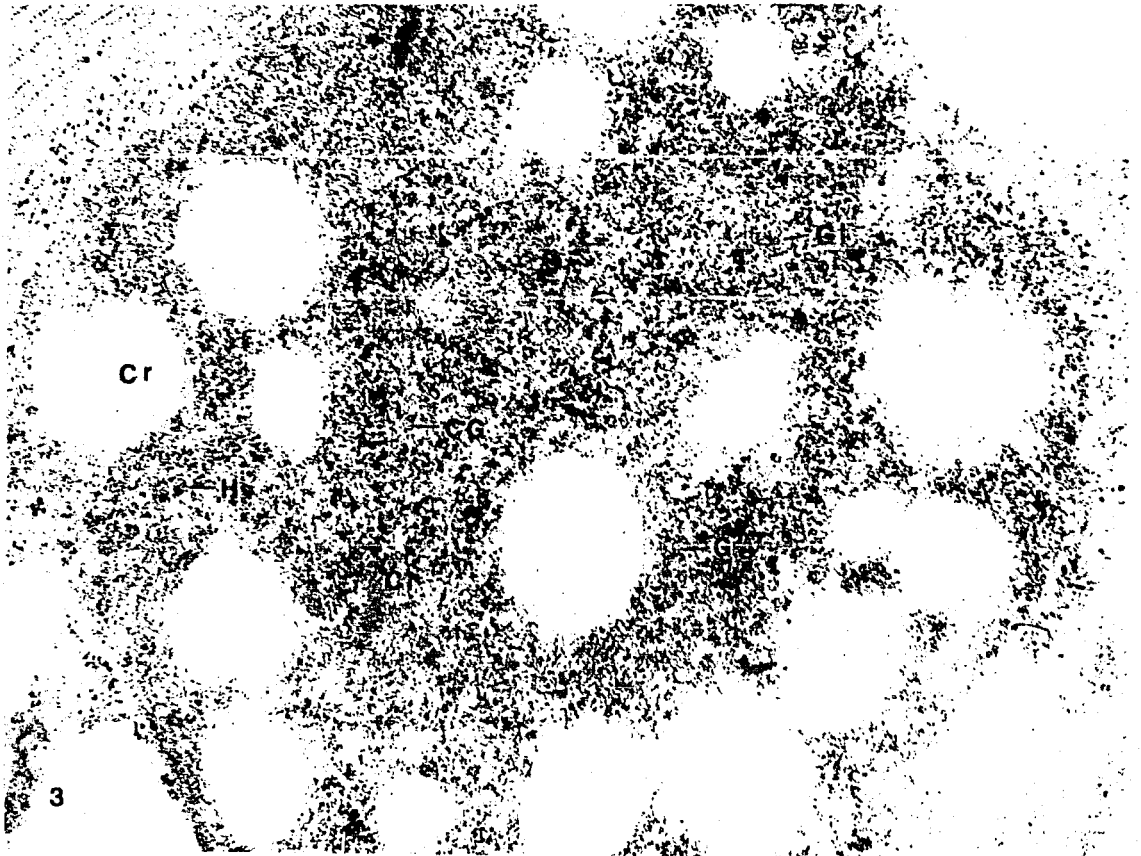
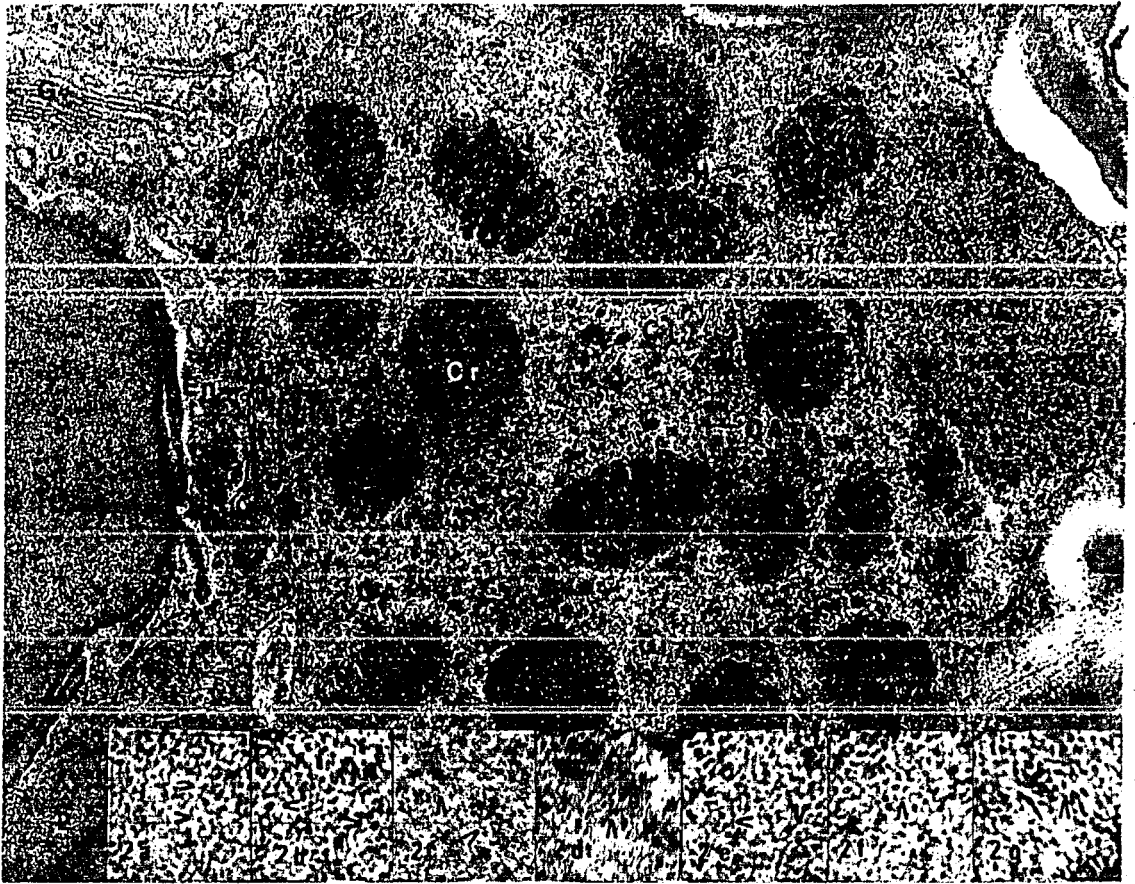
Como se sabe el medio de inclusión GMA es hidrofílico y debido a esto el tiempo de incubación (8 horas) en las soluciones (en agua) y el calor  $37^{\circ}$  C tuvieron algún efecto destructivo, a pesar de esto se observó el efecto de la digestión de la RNAsa. El aspecto granular del nucleolo, cromosomas y nucleoplasma desaparece. Los cromosomas pierden su aspecto bandeo fibro-granular, en su periferia se observan fibras, una especie de deshilachado que parte de los cromosomas y se extiende hacia el nucleoplasma. En todo el nucleoplasma se encuentra la malla o red poco densa a los electrones, pero no se encuentran las partículas ribonucleoproteicas granulares descritas anteriormente (fig. 7).

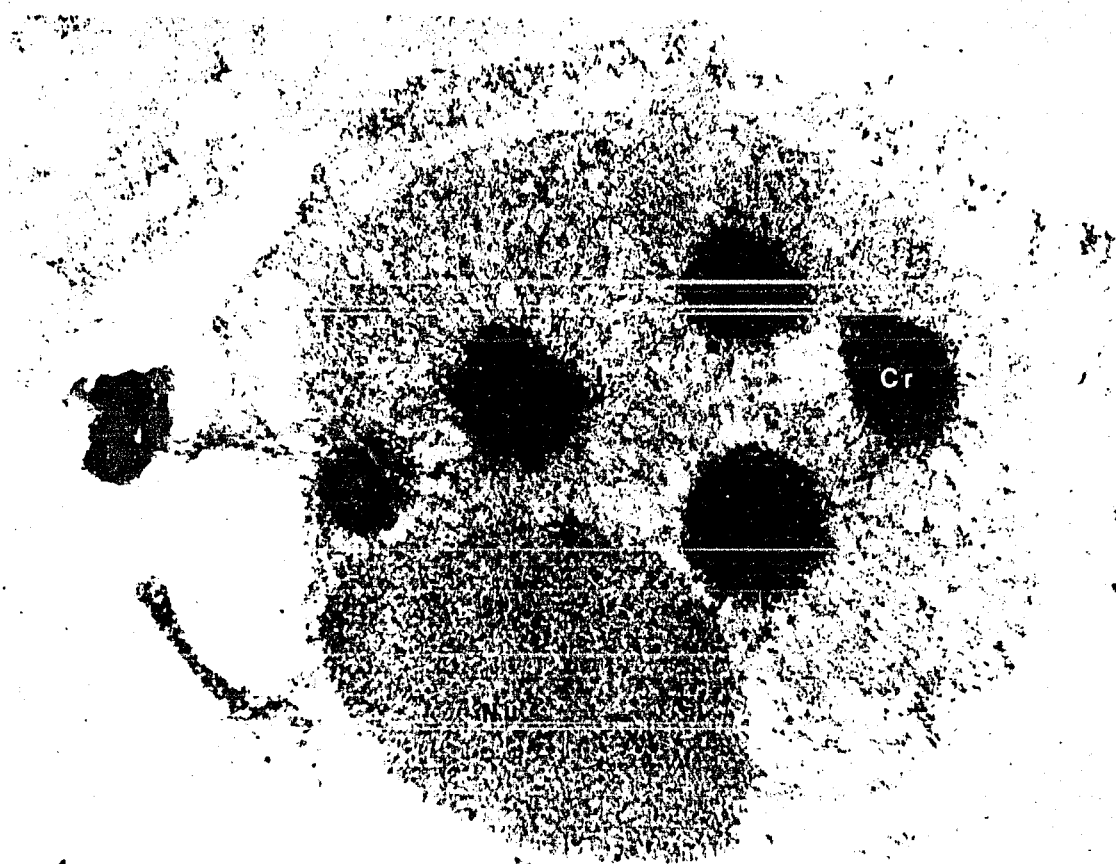
La digestión con DNAsa no fué buena incluso en los núcleos de la anémona, por lo que no se analizaron.

En la prueba enzimática pronasa-DNAsa se logra visualizar la estructura descrita como malla o red en todo el nucleoplasma, con las partículas ribonucleoproteicas dispuestas en ella. Los cromosomas no son totalmente digeridos con las enzimas, se reducen de tamaño, pierden su estructura característica y se desprenden de su lugar en el nucleoplasma (fig. 8). Un buen control de esta prueba son los núcleos de la anémona que presentan una total digestión de la cromatina en donde se observa el espacio blanqueado que deja cerca de la membrana nuclear (fig. 9).

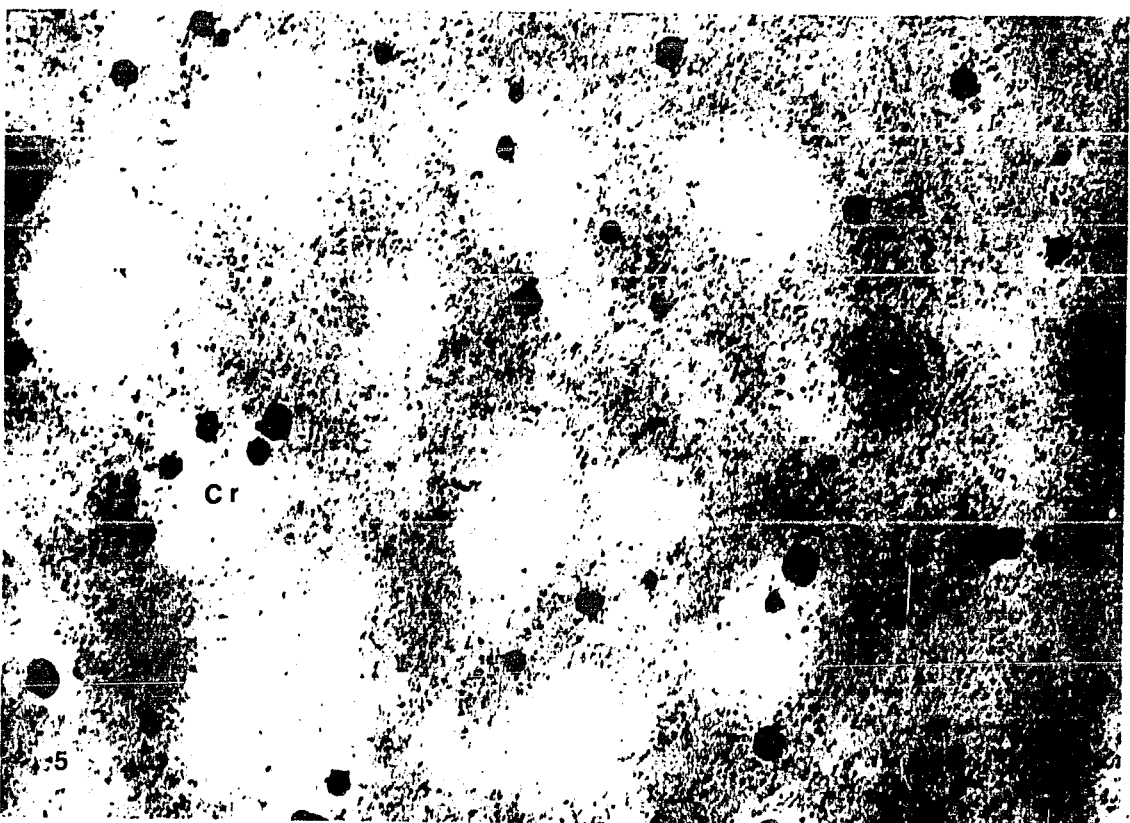
Los controles fueron sólo para comprobar los efectos de las enzimas, por lo que no se muestran en el trabajo.



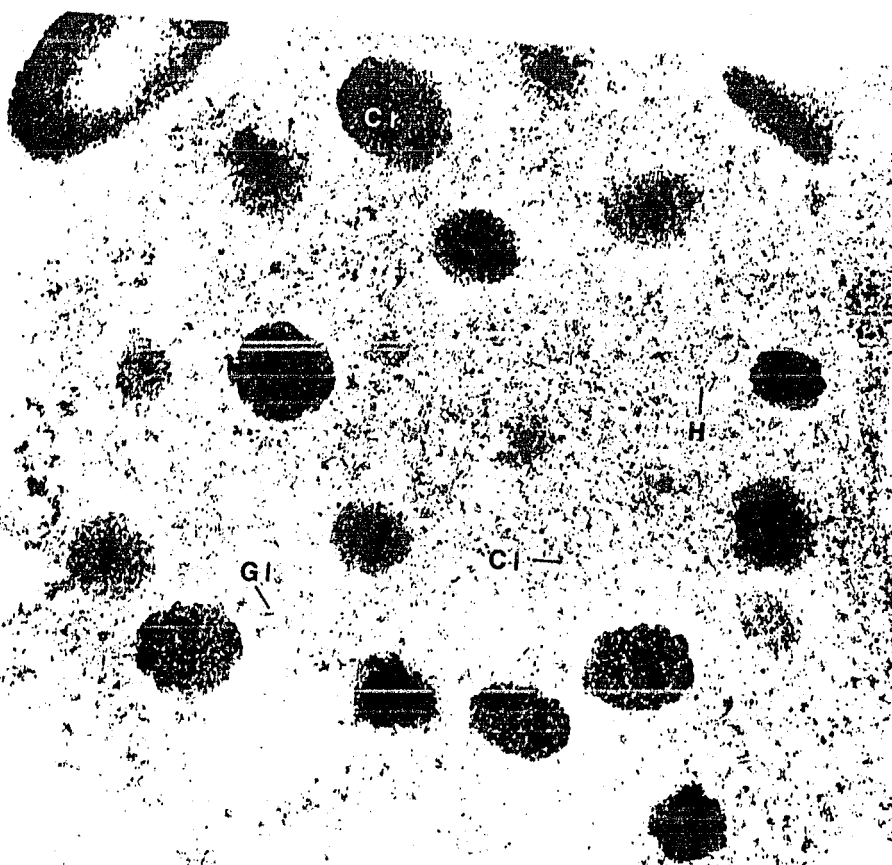




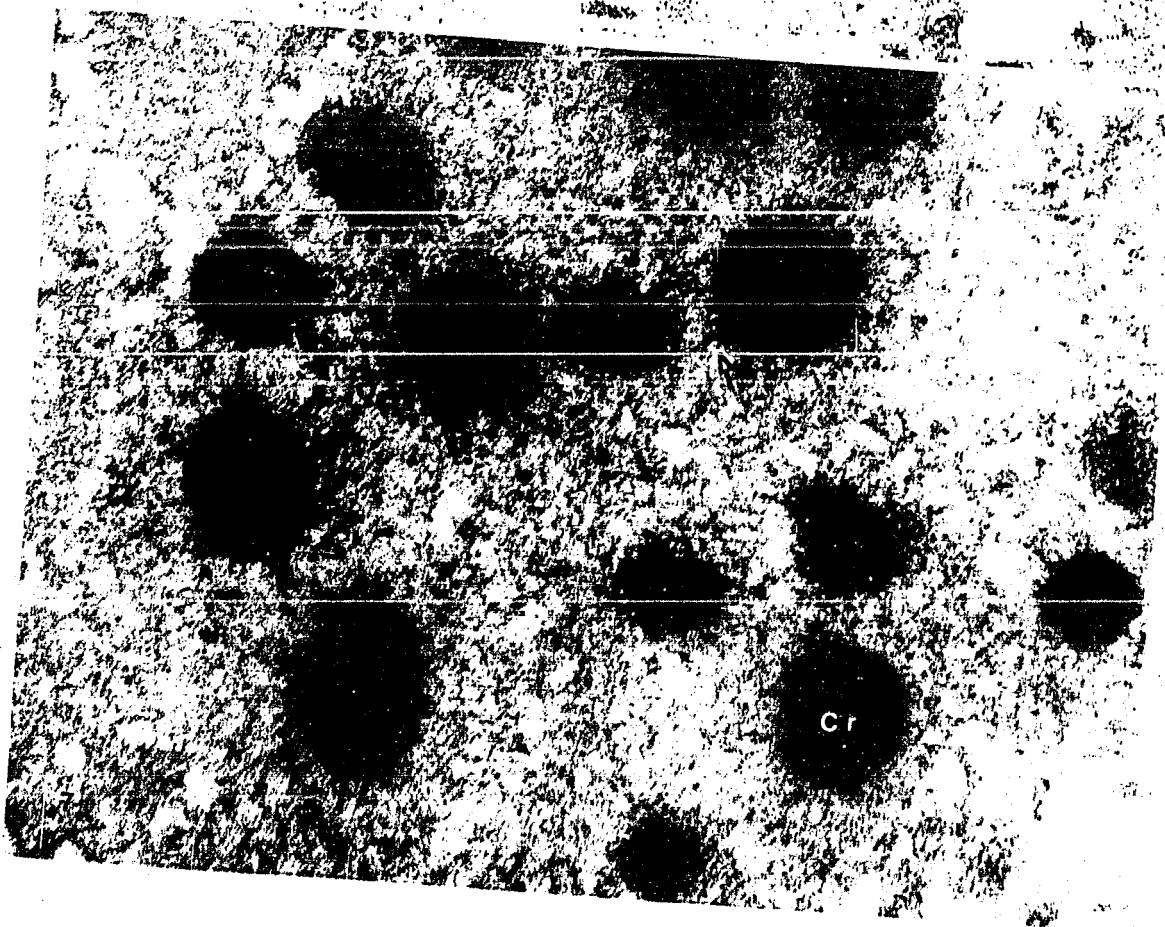
4

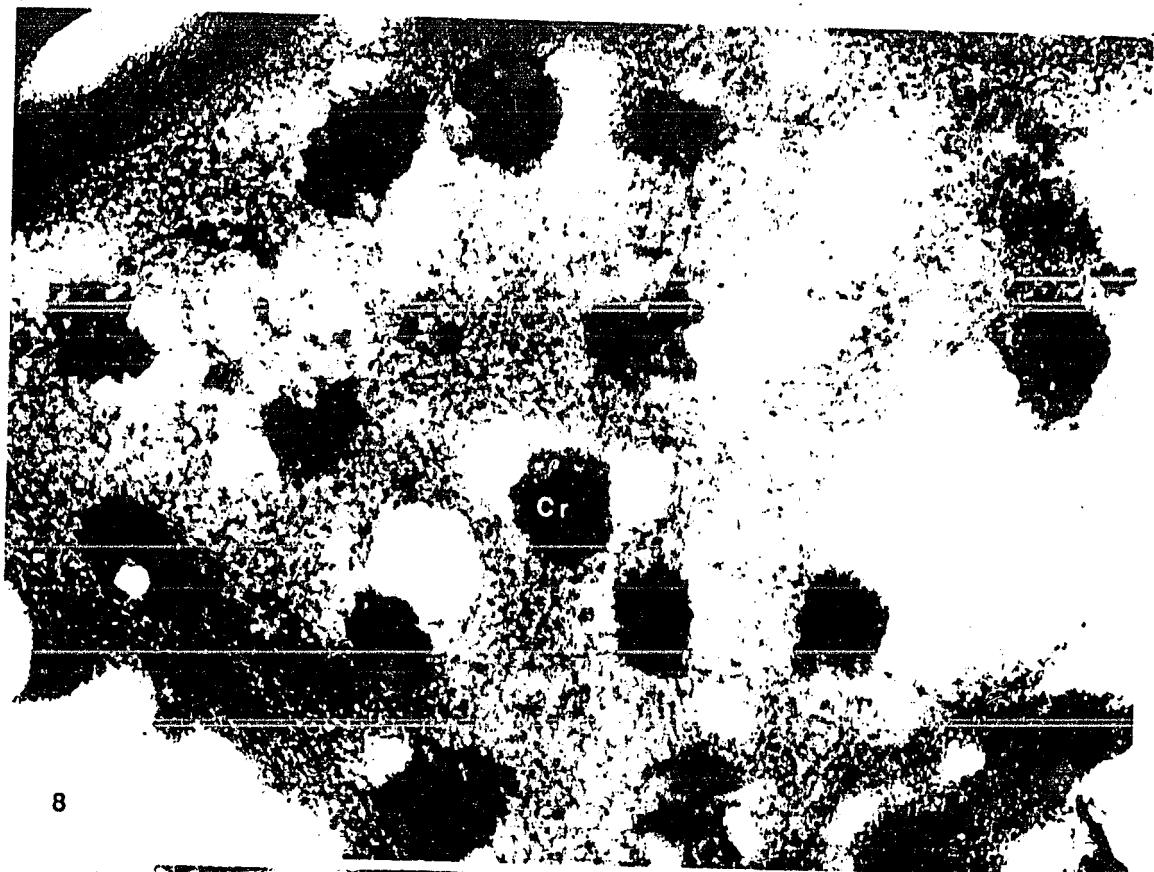


5

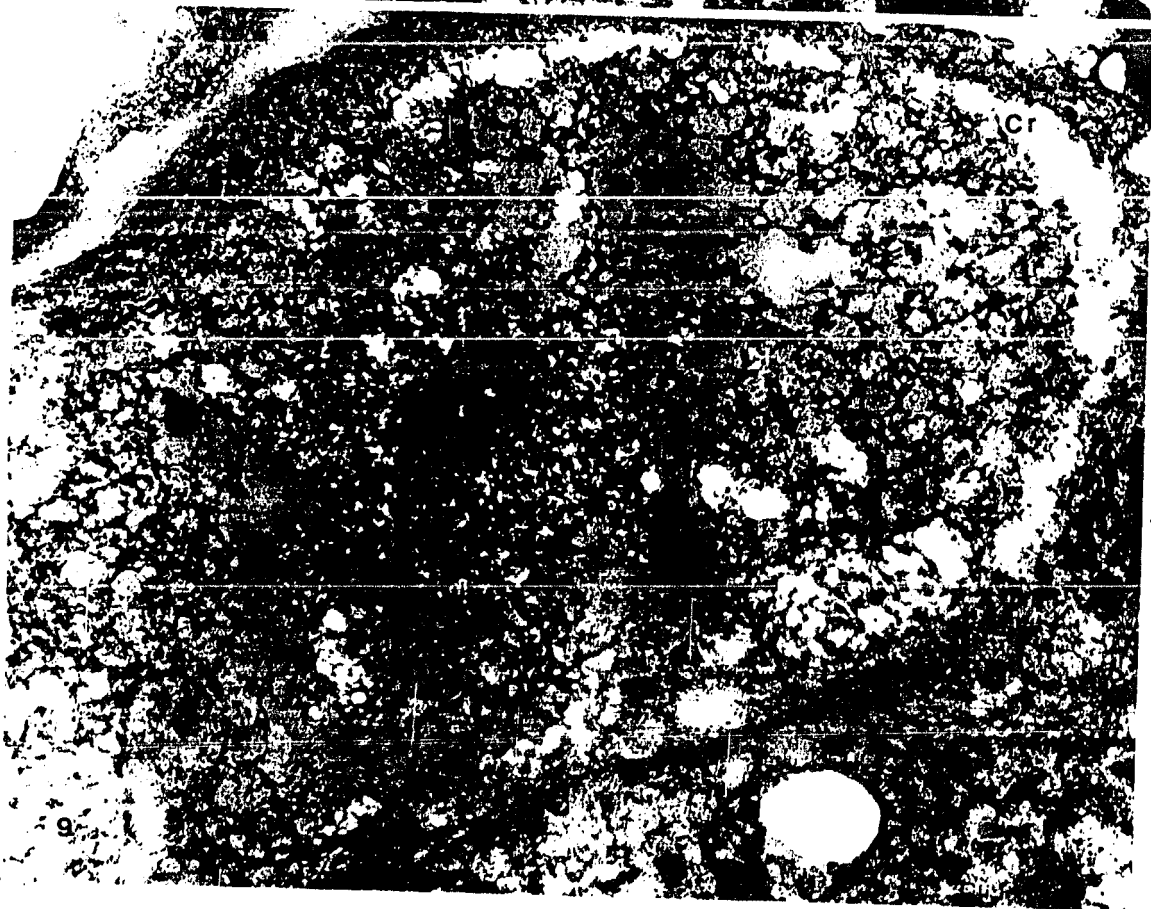


6





8



9

## DISCUSION.

Los componentes de naturaleza ribonucleoproteica del núcleo celular interfásico en eucariontes superiores han sido estudiados y bien caracterizados, como el nucleolo y las ribonucleoproteínas (RNPs) del nucleoplasma que son: fibras pericromatinianas, fibras intercromatinianas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos y cuerpos espiralados; intervienen en los procesos postranscripcionales (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin y Bernhard, 1971; Fakan et al., 1976; Puvion y Moyne, 1978; Vázquez-Nin et al., 1983; Jiménez, 1985).

En dinoflagelados no habian sido caracterizadas hasta ahora las ribonu-cleoproteínas del nucleoplasma; en este trabajo se encontraron 7 tipos de partículas comprobando que son ribonucleoproteínas por que se contrastan con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas, y son digeridas con RNAsa. El tamaño de estas RNPs es muy pequeño, incluso las partículas más grandes (gránulos grandes aislados) de 11.99 nanómetros, aun más pequeñas que los gránulos intercromatinianos de 20 - 50 nanómetros, componentes más pequeños en eucariontes superiores. El RNA ribosomal de dinoflagelados encontrado es también más pequeño en cuanto al coeficiente de sedimentación (S) y en cuanto al peso molecular (Rae, 1970; Spector, 1984).

Es evidente que las partículas ribonucleoproteicas del nucleoplasma de Dinoflagelados difieren en morfología y tamaño con las descritas en mamíferos y en otros animales y plantas, así como en algunos protoctistas (Elizundia, 1985;

Elizundia et al., 1985; Jiménez, 1985; Jiménez et al., en prensa).

Por las características poco usuales de la cromatina de dinoflagelados se ha estudiado por varios investigadores (Rizzo y Noodén, 1974a; Rizzo y Noodén, 1974 b; Allen et al., 1975; Soyer, 1975; Spector et al., 1981 a; entre otros); sin embargo, a pesar de que se habla de la cromatina laxa, no se había comprobado su presencia, lo cual se realizó en este trabajo con la técnica de Vázquez-Nin, en donde se observa la cromatina laxa formada por fibras que parten del cromosoma (cromatina compacta) hacia el nucleoplasma y en ocasiones se sobrelapan con las fibras del cromosoma vecino.

En cuanto a la detección de la topografía de la transcripción utilizando autorradiografía ultraestructural cuantitativa en este trabajo, se observa que se lleva a cabo en la zona adyacente a los cromosomas delimitada como zona pericromatiniana en donde se encuentran las fibras de cromatina extendida evidenciadas con la técnica del PTA, por lo que se sugiere que esta cromatina laxa es la cromatina activa, que está sintetizando RNA. Sigee (1984) utilizando el dinoflagelado *Porocentrum micans* y adenina tritiada, encuentra resultados similares.

La topografía de la transcripción en dinoflagelados es similar a la de eucariontes superiores, que se localiza en el borde de la cromatina compacta en donde se encuentran las fibras pericromatinianas (Fakan et al., 1976; Puvion y Moyne, 1978).

En las digestiones enzimáticas con RNAsa los cromosomas pierden su aspecto bandeado fibro-granular y en su periferia se observan fibras; la presencia

de estas fibras se debe a que los gránulos del nucleoplasma (RNPs) que se digrierón dejaron al descubierto las fibras de cromatina laxa observadas con el PTA y enmascaradas con otras técnicas. Los cambios estructurales de los cromosomas pueden deberse a que se estén desdoblado, perdiendo su compactación y por lo tanto se este "deshilachando" y desaparezca el bandeo, es decir, que en los cromosomas estén involucradas moléculas de RNA estructural, probablemente estabilizando el mayor nivel de organización de los cromosomas, mencionado por Soyer y Haapala (1974), y por Soyer y Herzog (1985).

Los cromosomas no son totalmente digeridos con las enzimas pronasa-DNAsa probablemente debido a que su compactación es muy fuerte, por medio de las proteínas básicas semejantes a las histonas ("histone like"), el RNA estructural, la interacción metaloproteína-DNA, o alguna otra proteína que hace que la parte interna del cromosoma sea inaccesible a las enzimas. Soyer y Herzog (1985) tuvieron resultados similares: el DNA cromosomal fué solo parcialmente digerido por DNAsa 1 y endonucleasa micrococcal.

Dodge (1965, en Spector, 1984) propuso el termino Mesokariota para estos organismos, sugiriendo que los dinoflagelados son intermediarios entre eucariotes y procariontes, por el hecho de que varios aspectos de su organización nuclear se parece a los procariontes, como son las siguientes características:

Carecer de histonas; carecer de nucleosomas; tener cromosomas unidos a membranas; ausencia de un huso mitotico típico; síntesis continua de DNA; el arreglo de la cromatina visto en microscopía electrónica como espiral arqueado similar al DNA circular encontrado en bacterias; y condensado permanente de los

cromosomas durante todo el ciclo celular.

Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que los dinoflagelados no son un intermediario evolutivo entre procariontes y eucariontes; se han detectado proteínas básicas semejantes a las histonas ("histone like") (Rizzo y Noodén, 1974a; Rizzo y Noodén, 1974b; Rizzo y Cox, 1977; Rizzo, 1981; Rizzo, 1982; Rizzo y Burghardt, 1982a; Rizzo et al., 1982b; Rizzo y Morris, 1984; entre otros); se ha observado un período discreto de síntesis de DNA similar a la fase S de eucariontes superiores (Galleron y Durrand, 1979; Spector et al., 1981a); se han propuesto varios modelos para explicar el arreglo de la cromatina, que no es precisamente similar al de bacterias (Haapala y Soyer, 1974a; Haapala y Soyer, 1974b; Haapala y Soyer, 1974c; Haapala y Soyer, 1974d; Oakley y Dodge, 1979; Livolant y Bouligand, 1980; Herzog y Soyer, 1983; Herzog et al., 1984; Spector y Triemer, 1981b); se ha caracterizado un huso extranuclear, con canales, microtúbulos, estructuras semejantes a cinetocoros ("kinetochorelike") (Soyer, 1972; Pickett-Heaps, 1974; Oakley, 1975; Ris, 1975; Soyer, 1975; Soyer, 1978; Cachon y Cachon, 1977; Spector y Triemer, 1981b; Fritz y Triemer, 1983; entre otros).

Rifas y Giménez-Martín (1986) encuentran en un Heteroptero un complejo de membranas alrededor de cromosomas meióticos en diacinesis. Relacionan la membrana con el punto de anclaje de los microtúbulos del huso permitiendo así la segregación meiótica de los bivalentes en organismos que carecen de placas del cinetocoro; similar a los dinoflagelados.

La ausencia de algunas características típicas de eucariontes, en los di

noflagelados se cree que son debidas a una pérdida secundaria. Sin embargo, es muy difícil que puedan desaparecer las histonas por pérdida secundaria, que se encuentran presentes en todos los demás eucariontes.

Los resultados de este trabajo indican que este grupo difiere de las plantas y animales en características altamente conservadas en ambos grupos como organismos eucariontes, a su vez difieren de otros protocistas en la disposición de la cromatina en interfase y en los tipos de partículas ribonucleoproteicas. Por lo que se sugiere que los **Dinoflagelados** no son un intermediario evolutivo entre procariontes y eucariontes, sino un grupo que se separó de las otras líneas de protocistas muy temprano en la evolución de los eucariontes; antes que el tipo de núcleo, incluyendo a las histonas, y el plan mitótico de plantas y animales hubiera aparecido.

## CONCLUSIONES.

Por primera vez son descritas las partículas ribonucleoproteicas del nucleoplasma de los **Dinoflagelados** estudiados, siendo estas de 7 tipos: gránulos chicos aislados de 5.03 nanómetros, gránulos chicos agrupados de 5.14 nanómetros, gránulos chicos alineados de 5.14 nm, gránulos chicos de 5.57 nm con un halo claro de 3.73 nm a su alrededor, gránulos grandes aislados de 11.99 nm, gránulos grandes agrupados de 11.91 nm y gránulos grandes alineados de 10.35 nm de diámetro; son digeridas con RNasa, diferentes en morfología y tamaño a las descritas en otros eucariontes.

La cromatina laxa formada por fibras que se extienden del cromosoma hacia el nucleoplasma y en ocasiones se sobrelapan con las fibras del cromosoma vecino, es la cromatina activa, en donde se lleva a cabo la transcripción, por lo que hubo una mayor incorporación de uridina tritiada.

Los cromosomas no son totalmente digeridos con las enzimas pronasa-DNasa.

Las características de los **Dinoflagelados** son más parecidas a los eucariontes, por lo que se apoya la idea de que son eucariontes verdaderos, un grupo que se separó de las otras líneas de protoctistas muy temprano en la evolución de los eucariontes, antes que el tipo de núcleo, incluyendo a las histonas, y el plan mitótico de plantas y animales hubiera aparecido.

## BIBLIOGRAFIA.

- ▣ Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. D. (1986). **Biología Molecular de la Celula.** ED. Omega S.A. Barcelona, España. 21, 440, 656.
- ▣ Allen, J. R; Roberts, T. M; Loeblich, A. R. III; Klotz, L. C. (1975). Characterization of the DNA from the dinoflagellate Crypthecodinium cohnii and implications for nuclear organization. **Cell.** 6: 161 - 169.
- ▣ Bernhard, W. (1969). A new procedure for electron microscopical cytology. **J. Ultrastruct. Res.** 27: 250 - 265.
- ▣ Bodansky, S; Mintz, L. B; Holmes, D. S. (1979). The mesokaryote Gyrodinium cohnii lacks nucleosomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 88: 1329 - 1336.
- ▣ Boutille, M. (1976). The "LIGOP" method for routine ultrastructural autoradiography. **J. Microscopie Biol. Cell.** 27: 121 - 127.
- ▣ Cachon, J; Cachon, M. (1977). Observations on the mitosis and on the chromosome evolution during the lifecycle of Oodinium, a parasitic dinoflagellate. **Chromosoma.** 60: 237 - 251.
- ▣ Dodge, J. D. (1971). A dinoflagellate with both a mesocaryotic and eucaryotic nucleus. I. Fine structure of the nuclei. **Protoplasma.** 73: 145 - 157.

- ▣ Elizundia, A. J. M. (1985). **Ultraestructura del núcleo celular interfásico de algunos taxa del reino protista. Aspectos evolutivos.** Tesis de Licenciatura. Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 85.
- ▣ Elizundia, A. J. M; Jiménez, G. L. F; López, Z. B. (1985). **Evolución del núcleo celular en interfase (Aspectos ultraestructurales).** Memorias del III Simposio Ciencias. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 179 - 188.
- ▣ Fakan, S; Puvion, E; Spohr, G. (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. **Exptl. Cell. Res.** 99: 155 - 164.
- ▣ Fritz, L; Triemer, R. E. (1983). An ultrastructural study of mitosis in a marine dinoflagellate: Prorocentrum minimum. **J. Protozool.** 30 (2): 437 - 444.
- ▣ Galleron, C; Durrand, A. M. (1979). Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate Amphidinium carterae. **Protoplasma.** 100: 155 - 165.
- ▣ Galleron, C. (1984). The fifth base: a natural feature of dinoflagellate DNA. **Origins of Life.** 13: 195 - 203.
- ▣ Haapala, O. K; Soyer, M. O. (1974a). Size of circular chromatids and amounts of haploid DNA in the dinoflagellates Gyrodinium cohnii and Prorocentrum micans. **Hereditas.** 76: 83 - 90.
- ▣ Haapala, O. K; Soyer, M. O. (1974b). Absence of longitudinal differentiation of dinoflagellate (Prorocentrum micans) chromosomes. **Hereditas.** 78: 141 - 145.

- ⌘ Haapala, O. K; Soyer, M. O. (1974c). Electron microscopy of whole-mounted chromosomes of the dinoflagellate Gyrodinium cohnii. **Hereditas**. 78: 146 - 150.
- ⌘ Haapala, O. K; Soyer, M. O. (1974d). Effect of alkali-urea treatment on dinoflagellate chromosomes. **Hereditas**. 78: 295 - 298.
- ⌘ Hamkalo, B. A; Rattner, J. B. (1977). The structure of a mesokaryote chromosome. **Chromosoma**. 60: 39 - 47.
- ⌘ Herzog, M; Soyer, M. O. (1981). Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species Prorocentrum micans E. **Eur. J. Cell. Biol.** 23: 295 - 302.
- ⌘ Herzog, M; Soyer, M. O. (1983). The native structure of dinoflagellate chromosomes and their stabilization by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  cations. **Eur. J. Cell. Biol.** 30: 33 - 41.
- ⌘ Herzog, M; Boletzky, S. V; Soyer, M. O. (1984). Ultrastructural and biochemical nuclear aspects of eukaryote classification: independent evolution of the dinoflagellates as a sister group of the actual eukaryotes? **Origins of Life**. 13: 205 - 215.
- ⌘ Jeffrey, S. W; Vesik, M. (1976). Further evidence for a membrane-bound endosymbiont within the dinoflagellate Peridinium foliaceum. **J. Phycol.** 12: 450 - 455.
- ⌘ Jiménez, G. L. F. (1985). **Evolución nuclear en animales. Enfoque ultraestructural**

tural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del periodo interfásico. Tesis de Maestría. Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 76.

- ▣ Jiménez, G. L. F; Elizundia, A. J. M; López, Z. A. M; Zavala, P. G; Echeverría, O. M; Vázquez-Nin, G. H. Comparative study of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocist. **BioSystems**. En Prensa.
- ▣ Jing-Yan, L. (1984). Studies on dinoflagellate chromosomal basic protein. **BioSystems**. 16: 217 - 225.
- ▣ Kearns, L. P; Sigeo, D. C. (1979). High levels of transition metals in dinoflagellate chromosomes. **Experientia**. 35: 1332 - 1334.
- ▣ Kearns, L. P; Sigeo, D. C. (1980). The occurrence of period IV elements in dinoflagellate chromatin: An X-ray microanalytical study. **J. Cell. Sci.** 46: 113 - 127.
- ▣ Leduc, E. H; Marinozzi, V; Bernhard, W. (1963). The use of water-soluble glycolmethacrylate in ultrastructural cytochemistry. **J. Roy. Microsc. Soc.** 81: 119 - 130.
- ▣ Livolant, F; Bouligand, Y. (1978). New observations on the twisted arrangement of dinoflagellate chromosomes. **Chromosoma**. 68: 21 - 44.
- ▣ Livolant, F; Bouligand, Y. (1980). Doble helical arrangement of spread dinoflagellate chromosomes. **Chromosoma**. 80: 97 - 118.

- ▣ Monneron, A; Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the inter-phase nucleus in some mammalian cells. **J. Ultrastruct. Res.** 27: 266 - 288.
- ▣ Oakley, B. R. (1975). Mitosis in the dinoflagellate Amphidinium carterae. **BioSystems.** 7: 305.
- ▣ Oakley, B. R; Dodge, J. D. (1979). Evidence for a Double-helically coiled toroidal chromonema in the dinoflagellate chromosome. **Chromosoma.** 70: 277 - 291.
- ▣ Pickett-Heaps, J. (1974). The evolution of mitosis and the eukaryotic condition. **BioSystems.** 6: 37 - 48.
- ▣ Puvion, E; Moyne, G. (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. **Exptl. Cell. Res.** 115: 78 - 88.
- ▣ Puvion, E; Viron, A; Xu, F. X. (1984). High Resolution Autorradiographical Detection of RNA in the Intercromatin Granules of DRB-treated cells. **Exptl. Cell. Res.** 152: 357 - 367.
- ▣ Rae, P. M. M. (1970). The nature and processing of ribosomal ribonucleic acid in a dinoflagellate. **J. Cell. Biol.** 46: 106 - 113.
- ▣ Rae, P. M. M. (1976). Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: A natural feature of the Pyrrophyta (Dinoflagellates). **Science.** 194: 1062 - 1064.
- ▣ Rae, P. M. M; Steele, R. E. (1978). Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: An examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. **BioSystems.** 10: 37 - 53.

- ⌘ Rifas, J. S; Giménez-Martín, G. (1986). Ultrastructure of the kinetochore in Graphosoma italicum (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**. 136: 142 - 148.
- ⌘ Ris, H. (1975). Primitive mitotic mechanisms. **BioSystems**. 7: 298 - 304.
- ⌘ Rizzo, P. J; Noodén, L. D. (1974a). Isolation and parcial characterization of dinoflagellate chromatin. **Biochim. Biophys. Acta**. 349: 402 - 414.
- ⌘ Rizzo, P. J; Noodén, L. D. (1974b). Partial characterization of dinoflagellate chromosomal proteins. **Biochim. Biophys. Acta**. 349: 415 - 427.
- ⌘ Rizzo, P. J; Cox, E. R. (1977). Histone occurrence in chromatin from Peridinium balticum, a binucleate Dinoflagellate. **Science**. 198: 1258 - 1260.
- ⌘ Rizzo, P. J. (1981). Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates. **BioSystems**. 14: 433 - 443.
- ⌘ Rizzo, P. J. (1982). Analysis of histones from the endosymbiont nucleus of a binucleate dinoflagellate. **J. Protozool**. 29 (1): 98 - 103.
- ⌘ Rizzo, P. J; Burghardt, R. C. (1982a). Histone-like protein and chromatin structure in the wall-less dinoflagellate Gymnodinium nelsoni. **BioSystems**. 15: 27 - 34.
- ⌘ Rizzo, P. J; Jones, M; Ray, S. M. (1982b). Isolation and properties of isolated nuclei from the Florida red tide dinoflagellate Gymnodinium breve (Davis). **J. Protozool**. 29 (2): 217 - 222.

- ⌘ Rizzo, P. J; Morris, R. L. (1984). Some properties of the histone-like protein from Crypthecodinium cohnii (HCC). **BioSystems**. 16: 211 - 216.
- ⌘ Sabatini, D. D. M. D; Bensch, K. M. D; Barnett, R. J. M. D. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **Cell. Biol.** 17: 19 - 58.
- ⌘ Sigee, D. C; Kearns, L. P. (1981). Levels of dinoflagellate chromosome-bound metals in conditions of low external ion availability: An X-ray microanalytical study. **Tissue & Cell**. 13 (3): 441 - 451.
- ⌘ Sigee, D. C. (1982). Localised uptake of <sup>63</sup>nickel into dinoflagellate chromosomes: An autoradiographic study. **Protoplasma**. 110: 112 - 120.
- ⌘ Sigee, D. C. (1984). Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. **BioSystems**. 16: 203 - 210.
- ⌘ Soyer, M. O. (1972). Les ultrastructures nucléaires de la Noctiluque (Dinoflagellé libre) au cours de la sporogénèse. **Chromosoma**. 39: 419 - 441.
- ⌘ Soyer, M. O; Haapala, O. K. (1974). Structural changes of dinoflagellate chromosomes by pronase and ribonuclease. **Chromosoma**. 47: 179 - 192.
- ⌘ Soyer, M. O. (1975). Chromosomic division and organization in some dinoflagellates. **BioSystems**. 7: 306 - 307.
- ⌘ Soyer, M. O. (1978). Are chromosomal axil structures and microtubular systems phylogenetic markers in the dinoflagellates? **BioSystems**. 10: 55 - 58.

- ⌘ Soyer, M. O. (1981). Presence of intranuclear microcables in a primitive dinoflagellate protist: morphological description and discussion of their possible evolutionary significance. *BioSystems*. 14: 299 - 304.
- ⌘ Soyer, M. O; Herzog, M. (1985). The native structure of dinoflagellate chromosomes. Involvement of structural RNA. *Eur. J. Cell. Biol.* 36: 334 - 342.
- ⌘ Spector, D. L; Vasconcelos, A. C; Triemer, R. E. (1981a). DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma*. 105: 185 - 194.
- ⌘ Spector, D. L; Triemer, R. E. (1981b). Chromosome structure and mitosis in the dinoflagellates: An ultrastructural approach to an evolutionary problem. *BioSystems*. 14: 289 - 298.
- ⌘ Spector, D. L. (1984). *Dinoflagellates*. Ac. Press. New York. 533.
- ⌘ Tomas, R. N; Cox, E. R; Steidinger, K. A. (1973a). Peridinium balticum (Levanter) Lemmermann, an unusual dinoflagellate with a mesocaryotic and an eucaryotic nucleus. *J. Phycol.* 9: 91 - 98.
- ⌘ Tomas, R. N; Cox, E. R. (1973b). Observations on the symbiosis of Peridinium balticum and its intracellular alga. I. Ultrastructure. *J. Phycol.* 9: 304 - 323.
- ⌘ Vázquez-Nin, G. H; Bernhard, W. (1971). Comparative ultrastructural study of pericromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36: 842 - 859.

- ⌘ Vázquez-Nin, G. H; Chávez, B; Tomas-Martin, M. C. (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. **J. Microscopie.** 16: 243 - 246.
- ⌘ Vázquez-Nin, G. H; Echeverría, O. M; Jiménez, G. L. F. (1983). **Los gránulos pericromatinianos, partículas relacionadas con la expresión genética en eucariontes.** Memorias del Primer Simposio Ciencias. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México. 85 - 95.