

99  
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO COMPUTARIZADO DE LA DISPOSICION  
TRIDIMENSIONAL DE LA CROMATINA COMPACTA EN  
NUCLEOS INTERFASICOS DE LINFOCITOS

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

*BIOLOGO*

PRESENTA:

*GABRIEL LOPEZ VELAZQUEZ.*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

SEPTIEMBRE DE 1993



## **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.

# I N D I C E

<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
<b>II.1 EL ESTUDIO DE LAS CELULAS .....</b>	<b>3</b>
<b>II.2 EL NUCLEO CELULAR INTERFASICO .....</b>	<b>9</b>
<b>II.3 LA CROMATINA .....</b>	<b>14</b>
<b>II.4 ESTUDIO DE LA DISPOSICION         DE LA CROMATINA EN INTERFASE .....</b>	<b>21</b>
<b>II.5 PROCESAMIENTO DIGITAL         DE IMAGENES .....</b>	<b>29</b>
<b>II.5.1 CONCEPTOS BASICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>II.5.2 RECONSTRUCCION Y                 ANALISIS EN 3D .....</b>	<b>36</b>
<b>III. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>III.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>37</b>
<b>III.2 ADQUISICION Y PROCESAMIENTO         DE IMAGENES 2D .....</b>	<b>38</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>V. DISCUSION .....</b>	<b>70</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>86</b>

## CAPITULO I

### RESUMEN

Se trabajó a partir de muestras de bazo de rata (*Rattus norvegicus*), fijadas en glutaraldehído al 2.5% y contrastadas con ácido fosfotúngstico (PTA) para poner de manifiesto la cromatina, incluidas después en resina epóxica y obteniéndose cortes seriados de los bloques. A partir de estos cortes se obtuvieron las imágenes en negativo de 14 linfocitos, las cuales fueron digitalizadas usando una tarjeta digitalizadora MVP 1024 (Matrox) y el sistema Imagenia 5000 de Biocom con rutinas específicas para este trabajo. Con las imágenes digitales se elaboró una representación numérica de las distribuciones de la cromatina compacta mediante elementos de volumen (voxeles), sobre los cuales se realizaron procesos de morfometría en tres dimensiones. Las distribuciones fueron visualizadas y cuantificadas utilizando el sistema de Reconstrucción y Análisis Tridimensional desarrollado en el CIUNAM, cuyo empleo demostró que las técnicas de Procesamiento Digital de Imágenes pueden ser una herramienta poderosa para el estudio de la arquitectura de los núcleos celulares.

Los métodos utilizados permitieron obtener información invariante a rotaciones, desplazamientos y parcialmente invariante a deformaciones de los núcleos, obteniendo los

siguientes resultados para los núcleos interfásicos de los linfocitos estudiados: Los núcleos contienen de 1 a 3 nucleolos. La cromatina compacta ocupa un 63% del volumen nuclear. Mediante procesos de erosión limitada, se obtuvieron un promedio de 22 grumos aislados de cromatina compacta por núcleo. En la mayoría de los casos (92%), el total de grumos por núcleo y el total de grumos en contacto con la envoltura nuclear era muy similar. El factor de forma de la cromatina compacta total ( $0.8 \pm 0.01$ ) demuestra un alto grado de conservación en la distribución de la misma.

Se elaboraron mapas de la superficie nuclear en los que se observó que la disposición de los poros nucleares esta preferencialmente hacia los bordes de las áreas de cada grumo y sobre el área de contacto con la membrana nuclear de los cuerpos de gran tamaño, principalmente en los que contienen al organizador nucleolar (NOR).

En conclusión, el trabajo demostró que los métodos empleados (uso de sistema de computo y técnicas de procesamiento digital de imágenes) ayudaron a realizar estudios sobre la reconstrucción tridimensional de la cromatina mucho más rápidos y precisos que los realizados con métodos manuales, aunado a ésto se pudo manejar una gran cantidad de datos y realizar el estudio sobre la totalidad de la cromatina compacta y no de manera parcial como se había venido realizando en trabajos anteriores a éste.

## CAPITULO II

### INTRODUCCION

#### II.1 EL ESTUDIO DE LAS CELULAS

Al igual que los estudios realizados por Darwin, hoy en día el observar a los seres vivos nos permite distinguir la inmensa variedad de formas que produjo la evolución. Hay aproximadamente cuatro millones de especies descritas, entre bacterias, protozoarios, hongos, vegetales y animales, cuyas características morfofisiológicas y de conducta son distintas. No obstante, ahora se sabe que el estudio de la vida puede abordarse desde un punto de vista unificador, el cual pertenece al campo de la biología celular y molecular (en De Robertis y De Robertis , 1986).

El conocimiento que ahora tenemos acerca de los seres vivos, sobre todo a nivel celular, se debe a una serie de aportaciones y descubrimientos en el ámbito de las técnicas de estudio, las que se refinan día con día produciendo información cada vez mejor de la organización celular. Por ello, los límites de nuestro conocimiento no están dados completamente por la complejidad del sistema que es analizado,

sino que influye en gran medida el alcance y eficacia de nuestros métodos de estudio.

Así, nos encontramos con el problema que representa el estudio de las células, ya que son entidades pequeñas y complejas (una célula típica animal mide entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ ), que a pesar del avance metodológico, resulta difícil dilucidar cómo funcionan sus diversos componentes (en Alberts et al., 1983; Lehninger, 1970).

No fué sino hasta la segunda mitad del siglo XVII que, con el advenimiento del microscopio compuesto, se empezó a indagar sobre el antes desconocido mundo de la vida microscópica. La capacidad del ojo humano para diferenciar dos puntos adyacentes (poder de resolución) es de aproximadamente 0.1mm (100  $\mu\text{m}$ ), a diferencia del microscopio compuesto que alcanza una resolución de 0.2  $\mu\text{m}$ . Fué en el año de 1655 y gracias al uso de éste aparato que un físico y matemático británico de nombre Robert Hooke, forjó el concepto de célula (del griego *kitos*, célula y del latín *cella* espacio vacío), mientras realizaba observaciones sobre las pequeñas cavidades en que estaba regularmente dividido el corcho (en De Robertis y De Robertis, 1986; Cronquist, 1986).

Para 1674 Leeuwenhoek informaba sobre su descubrimiento de los protozoarios y nueve años más tarde sería el primero en observar bacterias.

En 1835, los alemanes Matthias Schleiden (botánico) y Theodor Schwann (zoólogo) comparaban sus observaciones sobre tejidos animales y vegetales con las de otros muchos investigadores y llegaban a la conclusión de que todos los organismos estaban formados por células, desarrollando así la idea principal de la que hoy se conoce como teoría celular (en Alberts et al., 1983; De Robertis y De Robertis, 1986; Cronquist, 1986).

Sin embargo, la mayoría de las células presentaba dificultades adicionales para su estudio, ya que su contenido no impide el paso de los rayos de luz, haciéndolas parecer transparentes en el microscopio óptico. Fué a principios del siglo XIX cuando se observó que algunos colorantes utilizados para teñir telas, también surtían efecto en tejidos biológicos y que muy comunmente mostraban preferencia por determinados componentes de la célula (en Alberts et al., 1983).

Resuelto el problema de la transparencia de las estructuras celulares, surgió la duda de si los métodos de fijación y coloración no creaban artefactos inexistentes en la célula intacta. Muchas técnicas fueron cuestionadas, sobre todo a raíz de las investigaciones hechas por Fisher y Hardy, que en 1899 demostraron que, por medio de la acción de ciertos fijadores sobre coloides artificiales, se podían obtener algunas de las estructuras normalmente vistas en células fijadas o teñidas. Por eso fué que se inició la búsqueda de

colorantes vitales (sustancias que no producen grandes cambios a la célula), y Erlich en 1881 ideó por primera vez la coloración vital con azul de metileno. Posteriormente, Michaelis obtuvo la tinción vital del condrioma y poco después la amplió y mejoró a la forma como se sigue haciendo hoy en día (en Gaviño et al., 1975). En nuestros días, una gran variedad de colorantes cuya efectividad y especificidad ha sido fuertemente sustentada, se encuentran a disposición del citólogo.

Ahora bien, la mayoría de las muestras biológicas tienen que fijarse antes de ser teñidas, ya que la fijación impide la autólisis de la célula y la hace permeable a los colorantes. Entre los primeros métodos empleados se cuentan la inmersión de las muestras en ácidos o disolventes orgánicos, como el metanol, mientras que los métodos actuales utilizan aldehídos tales como formaldehído y glutaraldehído, los cuales forman enlaces covalentes con los grupos amino terminales de las proteínas y por lo tanto, unen moléculas adyacentes (en Alberts et al., 1983). Debido a que muchos de los especímenes biológicos son demasiado gruesos para observarse directamente al microscopio, estos deben ser seccionados con anterioridad. Esto involucra también la resistencia mecánica de la muestra, que muchas veces es muy débil, por lo que antes de ser seccionada se somete a un proceso de inclusión, en el que se utilizan por lo general ceras líquidas (como parafina) o resinas plásticas, que penetran y rodean toda la muestra.

Este medio de inclusión se endurece o polimeriza para formar un bloque duro que se puede cortar utilizando un microtomo. El grosor de los cortes obtenidos para microscopía óptica es de entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  (en Alberts et al., 1983).

El conocimiento de la organización celular se vio ampliamente beneficiado con el refinamiento y avance en las técnicas de estudio por microscopía óptica, pero la estructura fina de la célula, y más aún, la de sus componentes, estaba aún oculta debido a las limitantes del poder de resolución que hasta el momento se obtenía. Este poder de resolución está íntimamente relacionado con la longitud de onda de la radiación que se utiliza (tal como lo describe la ecuación de Abbé) (en Bozzola y Russell, 1992). De esta manera, en 1926 Bush, apoyado en los estudios de De Broglie sobre la naturaleza corpuscular y ondulatoria de un haz electrónico, experimenta con modelos teóricos en busca de lentes propicios para haces electrónicos. Más adelante, en 1932, el sueño de diseñar un microscopio electrónico fue alcanzado por Knoll y Ruska, que utilizaron lentes electromagnéticos para cumplir su cometido. En 1934, Ruska mejora su diseño agregando un lente condensador y obteniendo por vez primera un mayor poder de resolución que el microscopio de luz (en Bozzola y Russell, 1992). Los microscopios electrónicos fueron perfeccionándose más aún hasta llegar a los modelos comerciales de hoy en día, alcanzando un poder de resolución de aproximadamente 1 nm (en Alberts et al., 1983), y teniendo una serie de aditamentos

que van desde una cámara fotográfica de 35 mm hasta un sistema computarizado para el análisis y registro de las imágenes.

Junto con la implementación del microscopio electrónico, las técnicas para el procesamiento de los ejemplares biológicos también se han ido modificando y aumentando. Así, por ejemplo, en microscopía electrónica se usan medios de inclusión como resinas epóxicas, contrastantes como el tetraóxido de osmio (compuestos de alto peso molecular que dispersan los electrones), ultramicrotomos para generar cortes ultrafinos de entre 50 y 100 nm de espesor (Peachey, 1958), etc., que junto con los avances en las técnicas citoquímicas han proporcionado una nueva visión de la célula, permitiéndonos indagar en la ultraestructura de sus componentes y comprender mejor el funcionamiento de esta maquinaria tan impresionante que representa a la vida.

## II.2 EL NUCLEO CELULAR INTERFASICO

Como se mencionó en la sección anterior, los avances en los métodos de estudio de la biología han permitido tener un mayor conocimiento tanto de los seres procariontes como de los eucariontes. En el presente trabajo se tratará específicamente con los de tipo eucariótico (entre los que se cuentan las células que conforman a todos los organismos superiores, como por ejemplo, los mamíferos), y muy especialmente refiriéndonos al organelo celular que da la pauta para la gran división en dos grupos de los organismos vivos: el núcleo celular.

La clasificación de los seres vivos ha sido siempre un tema de discusión entre los hombres de ciencia. Desde los tiempos de Aristóteles, solía dividirse en tan solo dos reinos, el animal y el vegetal. Desde mediados del siglo XIX muchos científicos dedicados a la sistemática observaron que había otros organismos que diferían de las plantas y los animales (actualmente la clasificación en 5 reinos propuesta por Whittaker en 1959 es la más aceptada) (en Margulis y Schwartz, 1985).

En 1937, el biólogo marino francés Edouard Chatton, publicó un artículo sugiriendo el término procarionte (del griego *pro*, antes; y *karion*, núcleo) para describir a las

bacterias y algas cianofitas, y el término eucariótico (del griego eu, verdadero) para las células de plantas y animales (en Margulis y Schwartz, 1985). Al parecer, esta diferencia entre organismos con y sin núcleo celular es la mayor discontinuidad evolutiva que pueda existir entre los seres vivos.

La compartimentalización es una de las principales características de las células eucariotes y que además las diferencia de las procariontes. Esta característica se manifiesta en la posesión de subestructuras celulares llamadas organelos, que permiten la separación en tiempo y espacio de las actividades metabólicas de la célula. De entre estos organelos, el núcleo celular ha sido de gran interés para los citólogos, ya que su función está íntimamente relacionada con los procesos hereditarios.

En 1831 Robert Brown describe la existencia de un pequeño "glóbulo" dentro de las células, de material relativamente denso y al cual denominó núcleo (en Asimov, 1985). Los grandes avances dentro de la biología celular y molecular de nuestros días han demostrado que el núcleo celular tiene como una de sus principales funciones, el separar los procesos de duplicación y transcripción del ADN (ácido desoxiribonucleico), de la traducción del ARNm (ácido ribonucleico mensajero), la cual se realiza en el citoplasma. Esta separación de eventos permite a las células nucleadas

procesar las moléculas de ARN antes de ser traducidas en proteínas, y de esta manera tener un mayor control en la producción de las mismas. Esto no sucede en células procariontes y los tres procesos antes mencionados se realizan casi simultáneamente (en Alberts et al., 1983).

Gracias a la microscopía electrónica, se ha logrado dilucidar la ultraestructura del núcleo celular y la relación de sus componentes con los procesos que en él se efectúan. De esta manera se pueden distinguir los siguientes componentes en el núcleo celular interfásico:

**ENVOLTURA NUCLEAR.** Está constituida por dos membranas bilipídicas: una interna y otra externa que se continúa con el retículo endoplásmico. Entre las dos existe un espacio intermembranal de entre 10 a 15 nm (Newport y Forbes, 1987). La envoltura nuclear es continua y sólo se ve interrumpida por los poros nucleares que permiten el paso selectivo de sustancias a través de ellos. Los poros están formados por un complejo proteico de forma octagonal que es rodeado por estructuras circulares llamadas anillos (Green, 1982). El diámetro de estos poros es de aproximadamente 80 nm, pero al parecer el diámetro funcional es de tan solo 9 nm (Newport y Forbes, 1986; Avers, 1987). La superficie que ocupan los poros en mamíferos es de aproximadamente el 10% del área total, mientras que en células vegetales y protozoarios llegan a ocupar hasta el 36% (en De Robertis y De Robertis, 1986). Al

parecer, el número de poros está relacionado con la actividad transcripcional de la célula (30 millones por núcleo para el ovocito de *Xenopus* y 300 en los eritrocitos maduros) (en De Robertis y De Robertis, 1986). Unida a la membrana interna, se encuentra la lámina nuclear o lámina fibrosa, que está constituida por tres diferentes polipéptidos (láminas A, B, y C) que se unen con otras proteínas de la membrana y con la cromatina. Al parecer, la función de las láminas es de organizar los complejos de poros y mantener la cromatina "inactiva" en la periferia y alejada de la cromatina activa (Newport y Forbes, 1987).

**NUCLEOPLASMA.** Representa la mayor parte del volumen nuclear y se encuentra entre la cromatina compacta o heterocromatina, por lo que contiene a la cromatina laxa o eucromatina y algunos componentes ribonucleoproteicos; contiene también agua y diversas moléculas solubles.

**CROMATINA COMPACTA O HETEROCROMATINA.** Es el ADN en un estado de compactación característico de los cromosomas en interfase. Se dispone en su mayoría en contacto con la membrana nuclear interna y rodeando al o los nucleolos (Comings, 1968).

**NUCLEOLO.** En él se empaqueta el ARNr (ARN ribosómico) recién sintetizado junto con proteínas ribosómicas para formar los ribosomas. El nucleolo contiene porciones de ADN que codifican para ARNr y a estos bucles de ADN se les llama organizador

nucleolar (Fakan y Puvion, 1980).

PARTICULAS RIBONUCLEOPROTEICAS. Están representadas por: a) las fibras pericromatinianas con un diámetro entre 30 y 50 Å pero en muchos casos alcanzan hasta 200 Å, se localizan hacia la periferia de la cromatina compacta (Monneron y Bernhard, 1969) y al parecer corresponden al primer transcrito de ARN (Fakan y Puvion, 1980); b) los gránulos pericromatinianos que, miden entre 400 y 450 Å, presentan un halo claro de aproximadamente 250 Å de grosor (Monneron y Bernhard, 1969). Al parecer estas partículas corresponden al ARNm maduro, de tal manera que algunas fibras pericromatinianas pasan a formar estos gránulos; c) los gránulos intercromatinianos con diámetro promedio de 200 a 250 Å, que se localizan entre áreas de cromatina compacta (Monneron y Bernhard, 1969), agrupados en vertebrados y dispersos en invertebrados, que parecen tener relación con el metabolismo del ARN (Fakan y Puvion, 1980), y d) cuerpos espiralados, son elementos intercromatínicos de 400 a 600 Å de grosor, los cuales se desconoce su función (Monneron y Bernhard, 1969).

### II.3 LA CROMATINA

Alrededor del año 1880, el biólogo alemán Walter Flemming realizaba estudios con células vivas de la epidermis de salamandra y observó las transformaciones que sufre el núcleo durante la división celular, determinando así la sucesión de los pasos de la mitosis. Al mismo tiempo ratificó sus observaciones de células vivas con preparaciones fijas, pudiendo identificar hasta que punto las estructuras observadas eran resultado de la técnica utilizada (Nason, 1985). Gracias a estas investigaciones observó que el núcleo presentaba un componente que tomaba tinte de los entonces denominados colorantes nucleares, al cual llamó cromatina (Asimov, 1985). En 1888, Whilhem von Waldeyer dió al filamento de cromatina el nombre de cromosoma (cuerpo coloreado) (en Avers, 1987; en De Robertis y De Robertis, 1986).

En 1924, R. Feulgen y H. Rossenbeck, describieron un método para comprobar la presencia de ácido desoxirribonucleico; con lo que se pudo ir conociendo más sobre la composición química de la célula, de tal manera que actualmente se designa con el término cromatina al material Feulgen positivo que es posible observar durante la interfase (en De Robertis y De Robertis, 1986).

En 1928, las investigaciones de Heitz lo llevan a distinguir dos tipos de cromatina, ambos de reacción positiva

a la técnica de Feulgen. Al primer tipo le llamó heterocromatina o cromatina compacta (cromatina compactada en interfase), describiéndola como la parte del cromosoma que se compacta después de la telofase y se reconoce como cromocentro en el núcleo interfásico. El segundo tipo denominado eucromatina o cromatina laxa descrita como las partes del cromosoma que se desenredan y se hacen invisibles en la telofase (en Alberts et al., 1983).

La autorradiografía de células incubadas en presencia de precursores radiactivos de ARN, muestra que la mayor parte de la síntesis de éste se realiza en las zonas de cromatina laxa, no quedando marcada la cromatina compacta (en Alberts et al., 1983). Estos resultados contrastan con el hecho de que los núcleos presentan una gran cantidad de cromatina compacta; ciertas células como los timocitos de becerro, eritrocitos de vertebrados inferiores y espermatozoos, contienen entre 90 y 100% de cromatina compacta (Ris, 1969).

Brown en 1966 distingue dentro de la cromatina compacta o heterocromatina dos formas distintas: La heterocromatina facultativa y la heterocromatina constitutiva. La primera, forma una zona compacta en uno de los miembros de un par cromosómico (corpúsculo de Barr en hembras de mamíferos). La segunda corresponde a la que se localiza en la región de los centrómeros y telómeros o formando zonas definidas en ambos miembros del par cromosómico, en todas las

células de un individuo y en todos los individuos de una misma especie (en De Robertis y De Robertis, 1986).

Cabe señalar la diferencia que existe entre el término cromatina y cromosoma, que si bien son componentes del núcleo celular constituidos por el mismo material, (ADN, proteínas histonas y no histonas y ARN), no son sino diferentes estados de compactación o plegamiento de las fibras de ADN. Así suele referirse a los cromosomas como el material genético formando cuerpos individuales solo distinguibles durante la división celular. En el núcleo interfásico, estos cromosomas se encuentran desenrollados e hidratados y dejan de ser distinguibles individualmente (Ris, 1969).

En 1944, gracias a los trabajos de Avery, Mc Lead y Mc Carty, se descubre que el material genético corresponde en realidad a los ácidos nucleicos, pero no fué aceptado totalmente hasta que en 1952 Alfred Hershey y Martha Chase utilizaron isótopos radiactivos para marcar las proteínas y el ADN del fago T<sub>2</sub> cuando infectaban cepas de *Escherichia coli*, ratificando así los estudios de Avery y colaboradores (Avers, 1987).

James Watson y Francis Crick proponen en 1953 un modelo molecular del ADN, articulando un gran número de conocimientos acumulados previamente, permitiendo así estudiar los mecanismos genéticos a nivel molecular.

La microscopía electrónica ha sido utilizada intensivamente para este tipo de estudios, pero aún así, los cortes finos que se analizan han contribuido poco al conocimiento de la organización de la cromatina en el núcleo interfásico, a diferencia de lo que se ha obtenido mediante los procedimientos en extendidos del material nuclear en combinación con estudios bioquímicos y ultraestructurales (Comings, 1972).

Gracias a estos estudios se ha logrado determinar que la longitud del ADN es mucho mayor que la estructura en la cual está contenido (el núcleo). Utilizando métodos de digestión enzimática a diferentes tiempos se han logrado identificar los distintos grados de empaquetamiento:

a) El nucleosoma.- Puede considerarse como el primer plegamiento de la doble hélice. Esta unidad repetitiva de la cromatina se observa al microscopio electrónico como partículas esféricas de 10 nm que en conjunto dan la apariencia de collar de cuentas. En 1974, Roger Kornberg propuso un modelo del nucleosoma en el que se considera como una estructura aplanada en forma de disco que constituye la unidad fundamental de empaquetamiento. Tiene 10 nm de diámetro por 5.7 nm de altura y se encuentran unidos entre sí por un filamento de ADN. Cada nucleosoma posee un núcleo ('core') y un espaciador ('linker'). El núcleo tiene una longitud de aproximadamente 140 pb (pares de bases), mientras que el espaciador es de longitud variable, pero en promedio tiene 60

pb, por lo que en su conjunto el nucleosoma reúne 200 pb en total (en Alberts et al., 1983; Mirzabekov, 1981; Felsenfeld, 1978). En el interior del nucleosoma se localiza un octámero de proteínas de carácter básico llamadas en conjunto histonas, de las cuales se encuentra un par de cada uno de los siguientes tipos: H2A, H2B, H3 y H4. El ADN se enrolla en este núcleo dándole aproximadamente dos vueltas (en Alberts et al., 1983).

b) Fibras de 30 nm.- Con el nucleosoma existe una condensación del ADN de entre 5 a 7 veces, pero es mil veces menor de la existente en un cromosoma metafásico (en De Robertis y De Robertis, 1986). Cuando la técnica de degradación utilizada no elimina la histona H1, los nucleosomas se mantienen unidos y se observan al microscopio electrónico como fibras de 30 nm de grosor. Esta estructura es estabilizada por interacciones entre moléculas H1 en nucleosomas adyacentes (Avers, 1987). Se han propuesto diferentes modelos para describir esta estructura. El modelo solenoidal es uno de ellos y está compuesto por superestructuras helicoidales en donde las moléculas de H1 están en el orificio central de la estructura. Otro modelo propone la disposición hexagonal de los nucleosomas, donde se requiere una molécula de H1 por cada vuelta (en Alberts et al., 1983).

c) Dominios en forma de Bucle.- Con las fibras de 30

nm el ADN se pliega unas 40 veces, pero debe ser plegado 100 veces más para alcanzar el grado de compactación de un cromosoma metafásico (en Alberts et al., 1983). Se piensa que la existencia de este nivel de compactación se debe a proteínas no histonas que se unen al ADN reconociendo ciertas secuencias para formar el cuello de cada bucle. Los bucles tienen longitudes que van desde 20,000 a 80,000 pb (dispuestas a su vez en fibras de 30 nm). En este grado de compactación el ADN tendría un empaquetamiento en longitud de unos 100  $\mu$ m (en Alberts et al., 1983). La cromatina está formada por muchos de estos dominios.

d) Condensación de Dominios.- Cada cromátida de cada cromosoma está organizado en una serie de dominios en forma de bucle muy plegados que proceden de un eje central. Se cree que el bandeado de los cromosomas representa diversas maneras de empaquetamiento regional del ADN mediante diversas formas de plegado de los bucles (en Alberts et al., 1983; en De Robertis y De Robertis, 1986).

Los estudios que sobre la estructura de la cromatina se han logrado, nos lleva a intuir la gran importancia que representa la forma específica de asociación entre ADN, histonas y proteínas no histonas; ya que esto puede ser uno de los factores principales en la regulación de la actividad transcripcional y de duplicación en un tipo celular específico (Fasman y Cowman 1978, Ris, 1969).

En lo que respecta al arreglo que adopta la cromatina en núcleos interfásicos, se suele mencionar que la cromatina compacta se encuentra por lo común en la zona adyacente a la membrana nuclear interna y rodeando al o los nucleolos (en Alberts et al., 1983, en De Robertis y De Robertis, 1986).

## II.4 ESTUDIO DE LA DISPOSICION DE LA CROMATINA EN

### INTERFASE

El simple hecho de observar diversas células sugiere una disposición diferente para la cromatina compacta en los núcleos interfásicos, pudiendo de esta forma discriminar entre diferentes tipos celulares en plantas y animales. Sin embargo, la disposición que toma la cromatina en esta fase del ciclo celular y su relación con el orden de los cromosomas en metafase aún no se ha demostrado objetivamente (Bennet, 1984). Así, desde inicios del presente siglo, citólogos clásicos como Strasburger, Syques, Gates, Tahara, Stomps, Nemec, Overton, Muller, Lawrence y Watkins, relizaron estudios en cortes de células, notificando que se encontraba una tendencia de los cromosomas homólogos a asociarse unos con otros (Avivi y Feldman, 1980).

No obstante, la idea de la existencia de una disposición ordenada de los cromosomas en interfase, es manifestada desde el siglo pasado por Rabl (1885), quien propone un modelo para su arreglo en el que estos se encuentran polarizados; con los centrómeros en uno de los polos y los telómeros dispuestos meridionalmente hacia el polo opuesto, con los cromosomas homólogos yuxtapuestos y con múltiples uniones a la membrana nuclear. Este modelo conocido como modelo de Rabl, ha sido apoyado por muchos otros autores que en sus trabajos han obtenido resultados similares

(Hadlaczy et al., 1986; Hochstrasser et al., 1986; Bourgeois et al., 1985; Lavala y Sharma, 1985).

Los estudios en preparaciones a las que se les practicó compresión o squash, determinaron que las distancias entre los cromosomas metafásicos en plantas como el trigo, no tenían un comportamiento azaroso. También se comprueba la tendencia de los cromosomas homólogos a estar en posiciones adyacentes gracias a los estudios de la relación de translocaciones en células expuestas a radiaciones (Avivi y Feldman, 1980; Comings, 1968).

Estudios con microscopía electrónica llevaron a Wollam a demostrar que los cromosomas en paquiteno de espermatoцитos, tenían uniones claras de sus extremos con la membrana nuclear. De igual manera Yotsuyanag observa una estrecha relación del ADN mitocondrial con la membrana de la misma. Se postula que la relación de los cromosomas con la membrana nuclear se conserva tanto en la interfase como en la división celular y que este puede ser uno de los factores que proporcionan orden a los cromosomas durante todo el ciclo celular (Comings, 1968). Los cromosomas en interfase se unen a la membrana nuclear en su parte interna, interaccionando con las proteínas de la lámina fibrosa (en Alberts et al., 1983); las regiones de los cromosomas que se unen a la membrana son específicas, tales como centrómeros y telómeros (Avivi y Feldman, 1980).

El seguimiento de la posición del cromosoma X inactivo en hembras de mamíferos, muestra que éste se encuentra ubicado ya sea en la periferia del núcleo o asociado al nucleolo (Comings, 1968). Estas observaciones sugieren que el corpúsculo de Barr se localiza en diferentes posiciones en núcleos de diferentes tipos celulares del mismo organismo, pero que la posición es definida para un mismo tipo celular (Bourgeois et al., 1985; Brachet and Osawa, 1961).

Utilizando las técnicas de bandeo con Giemsa o bandeo C en núcleos interfásicos, se ha logrado demostrar una cierta orientación de los cromosomas en células vegetales (Evans y Filion, 1982; Stack et al., 1977).

Las técnicas de hibridación *in situ*, se han utilizado para determinar la posición de las regiones del organizador nucleolar en la interfase (Wachtler et al., 1986). De la misma forma se ha demostrado que secuencias específicas de ADN tienden a localizarse en determinadas regiones de los cromosomas en eucariontes (Schertham et al., 1987). También se han realizado estudios de la disposición del ADN altamente repetitivo en plantas (Appels, et al., 1978).

Los estudios con digestiones parciales y totales de las proteínas histonas en núcleos interfásicos, demostraron que aún sin las histonas la cromatina tiende a adoptar una disposición característica, lo cual hace pensar que estas

proteínas juegan un papel secundario en la organización gruesa de la cromatina, siendo de mayor importancia las uniones a la membrana nuclear, las proteínas no histonas y las secuencias que conforman al ADN (Brasch y Setterfield, 1974).

La inmunolocalización ha sido uno de los métodos que ultimamente se han utilizado con mayor frecuencia para el estudio de la disposición de los cromosomas en interfase. De esta forma Hadlaczký y col. demuestran la asociación de cromosomas homólogos y una configuración muy parecida a la sugerida por Rabl; utilizando anticuerpos anticentrómeros e inmunofluorescencia indirecta en células de rata canguro y conejillo de indias (Hadlaczký et al., 1986). Utilizando métodos semejantes de inmunolocalización con anticuerpos anticentrómeros y trabajando con linfocitos humanos en cultivo, Weimer y col. reportaron que los centrómeros se disponen de una manera alejada de una disposición al azar durante todo el primer ciclo celular y que durante G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> estos tienden a localizarse en posiciones periféricas formando pequeños grupos en los que raramente hay más de cuatro centrómeros (Weimer et al., 1992).

Todos estos trabajos indican la existencia de un arreglo no azaroso de la cromatina de núcleos interfásicos, pero no lo pueden describir ya que estudian una mínima parte de la cromatina existente. Además se necesita un método que permita el estudio de la cromatina en núcleos intactos; por lo

que la reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados es uno de los métodos que se sugieren para abordar este problema (Esquivel, 1988; Hadlaczy et al., 1986).

A partir de micrografías electrónicas, Murray y Davies reconstruyeron la cromatina de 6 núcleos interfásicos de eritrocitos de *Triturus cristatus*. Para realizar los modelos tridimensionales utilizaron métodos manuales basados en el uso de placas de poliuretano. A partir de estos trabajos obtienen una serie de áreas en la superficie externa de los núcleos que se encuentran delimitadas por los complejos de los poros nucleares. Se postula que estas áreas representan la unión de los cromosomas interfásicos a la membrana nuclear, ya que se encuentran un promedio de  $25 \pm 1.4$  sitios de este tipo (el número cromosómico de la especie es de  $2n = 24$ ) (Murray y Davies, 1979).

Este tipo de estudios se veían limitados por dificultades técnicas tales como la falta de un método de contraste preferencial para la cromatina que fuera compatible con la técnica de cortes seriados (Esquivel, 1988). De esta manera Esquivel y col. diseñaron un nuevo método para contrastar la cromatina basado en el uso de ac. fosfotúngstico (Esquivel et al., 1987) que tiene como referencia diseños anteriores (Vázquez-Nin et al., 1973). En éste trabajo se utilizaron cortes seriados de núcleos interfásicos de hepatocitos de rata que se fotografiaron al microscopio

electrónico y mediante métodos manuales se construyeron modelos a escala; logrando demostrar una disposición ordenada de la cromatina compacta en un subespacio nuclear de 8 cortes de la zona meridional de los núcleos que contenía un nucleolo central y al menos un nucleolo lateral. En esta zona se lograron distinguir entre 8 y 9 grumos que persistían en cada uno de los núcleos analizados (Esquivel et al., 1989). En este trabajo también se incursionó en el uso de métodos computarizados para el estudio de los núcleos interfásicos realizando algunos cálculos morfométricos como volumen, superficie, y centros de gravedad de la cromatina, así como la relación que guardaba la posición de ciertos grumos de importancia biológica entre sí (como los que rodeaban a los nucleolos) (Esquivel, 1988).

Los métodos asistidos por computadora para la reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados, se han venido utilizando cada vez más como una herramienta que facilita la creación de modelos tridimensionales que antes se realizaban manualmente; de esta forma el software (es decir, todos los programas con que trabaja un sistema de cómputo) y el hardware (es decir, la parte física del sistema de cómputo) aplicable a este tipo de trabajos se ha ido incrementando cada vez más (Geraud et al., 1988; Young et al., 1987).

Con el uso de métodos computacionales se han analizado series de cortes de núcleos con microscopio electrónico

(Geraud et al., 1988) y algunos otros con microscopio confocal (Montag et al., 1989; Hochstrasser et al., 1986). Estos métodos facilitan el manejo de una gran cantidad de datos, posibilitando el estudio en un número adecuado de núcleos completos (no subespacios) y realizar estudios morfométricos que den una mejor idea de la disposición de la cromatina compacta en interfase.

No obstante, el material utilizado para estos fines suele ser demasiado costoso (estaciones de trabajo con computadores gráficos, computadoras especialmente diseñadas para estos fines, etc.) y el software es tan complicado que los laboratorios de investigación deben adaptarse a los requerimientos del sistema y no lo contrario. De esta forma, surge la imperante necesidad de diseñar y poner a prueba un sistema computacional que se adapte al estudio de la disposición de la cromatina de núcleos interfásicos, basado en las modernas técnicas de procesamiento de imágenes digitales, y utilizando además material accesible para cualquier laboratorio de investigación, como lo son las computadoras personales.

El presente trabajo representa un esfuerzo interdisciplinario que se avoca principalmente hacia la puesta a prueba de las técnicas de procesamiento de imágenes y el empleo de un sistema diseñado en el CIUNAM (Centro de

Instrumentos, U.N.A.M.) para el análisis y reconstrucción tridimensional de la cromatina compacta de núcleos interfásicos a partir de imágenes digitales.

## II.5 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES

### II.5.1 CONCEPTOS BASICOS:

El Procesamiento Digital de Imágenes tiene por objeto adquirir, procesar y analizar imágenes digitales mediante una computadora. El procesamiento puede consistir en mejorar la apariencia visual de una imagen, para facilitar su interpretación y análisis cualitativo o bien para permitir la cuantificación de características relevantes para la comprensión del fenómeno en estudio. En este sentido, es un instrumento de análisis en las ciencias experimentales (Russ,1990).

El hecho de que aproximadamente un 75% de la información adquirida por el hombre sea de tipo visual (Wahl,1987) y que un 60% de los impulsos sensoriales que recibe el cerebro provienen del sentido de la vista (Russ, J., 1990), son algunos de los factores que alientan a la búsqueda de nuevos métodos para el análisis de las imágenes, incluyendo por lo tanto el uso de un instrumento tan versátil como lo es la computadora. Hoy en día podemos verificar cuan importantes son las imágenes, analizando las estrategias que son empleadas por los medios de comunicación y retomando la

frase que versa: "Una imagen dice más que mil palabras".

Al hablar de una imagen podemos referirnos a ella como una función bidimensional de intensidad luminosa  $f(x,y)$ , donde  $x,y$  denotan coordenadas espaciales y el valor de  $f$  en cualquier punto  $(x,y)$  es proporcional a la intensidad luminosa en ese punto (González, 1987).

Una imagen digital es como la descrita en el párrafo anterior, sólo que en ésta, las coordenadas espaciales y la intensidad luminosa han sido discretizadas. Esta imagen puede considerarse como una matriz en la que cada valor  $x,y$  identifica un punto en la imagen (que es el elemento más sencillo de la imagen digital). Los elementos de esta matriz son llamados elementos de imagen o píxeles (González, 1987), y cada uno de estos puntos tiene un valor asociado que se denomina "escala de niveles de gris". El número de píxeles está en proporción directa con la resolución con que se trabaja (el número de puntos que conforman la pantalla del monitor; como ejemplo se puede mencionar la resolución de algunos monitores que dan 512 x 512 píxeles).

Un paso muy importante en el procesamiento de imágenes lo constituye la captura de las mismas y para ello el hombre a construido aparatos conocidos como sensores remotos (el ojo puede considerarse un sensor remoto natural) entre los que se

cuentan los fotodetectores, los fotomultiplicadores, cámaras de televisión, etc. En estos sensores encontramos dos subsistemas básicos: a) el de formación de imágenes y b) el sensor de registro de imágenes.

El primero es por lo general un sistema óptico que selecciona un subconjunto de la escena (la escena en este caso, la definimos como un plano o superficie de la imagen considerando todos los objetos que se encuentran en éste) y lo proyecta sobre una región plana de área finita.

En la siguiente etapa interviene el segundo subsistema, midiendo la radiación que incide en cada punto del sensor y la cual es asociada a los respectivos elementos de imagen o píxeles.

Después de que las imágenes digitales han sido sometidas a una serie de procesos que nos ayudan a resaltar las propiedades de las mismas, sigue una etapa de análisis en la que se extraen las características que nos auxilian a identificar los objetos de los cuales se conforman estas imágenes. Uno de los procesos que se aplica a las imágenes digitales es el de su conversión a imágenes binarias, que no es otra cosa que representar los objetos de la imagen (por ejemplo) en blanco y el resto que no forma parte de ella, en negro.

Dentro del análisis, se usa el término segmentación para referirse a una serie de técnicas que permiten aislar los objetos de interés de una imagen, con lo que los cálculos morfométricos y de clasificación se hacen posibles. La morfología es el estudio de la forma y la estructura geométrica. A pesar de este proceso hay ocasiones en que la complejidad estructural de los elementos de la imagen no nos permiten distinguir por separado sus componentes. Por esta razón las imágenes binarias pueden ser sometidas a una serie de "filtros morfológicos" (Russ, 1990) que tienen como fin la separación de la imagen en sus componentes que guarden las relaciones más importantes y consistentes.

De entre los filtros utilizados, la erosión y la dilatación se consideran los básicos y a partir de los cuales se forman otros como son la cerradura, apertura y esqueletización (Russ, 1990). El sistema utilizado para este trabajo, cuenta con los dos principales; la erosión, que consiste en examinar cada uno de los elementos de la imagen, binaria y cambiarlo de blanco a negro si cualquiera de sus vecinos es negro. Esto se puede aplicar tanto en dos como en tres dimensiones. Con este proceso se eliminan pequeños objetos que se podrían considerar como ruido y también pequeños puentes que unen a lo que pudieran ser dos objetos separados. La dilatación viene a ser el proceso inverso a la erosión y consiste en analizar cada elemento de la imagen sustituyendo de negro a blanco si al menos uno de sus vecinos

es blanco. Estos dos procesos aplicados uno tras otro nos permite distinguir aproximadamente la disposición de las partes, sin que la imagen inicial se vea afectada ostensiblemente.

## II.5.2 RECONSTRUCCION Y ANALISIS EN 3D

En el caso de la presentación de información en imágenes tridimensionales (3D), se trabaja comunmente con imágenes seriadas, como sucede en el presente estudio donde se trabajó con imágenes provenientes de cortes seriados fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión, donde la información del brillo en cada punto del plano de la imagen es organizada en voxeles. Estos son elementos de volumen en el mismo sentido que los pixeles son elementos de imagen, esto es, los voxeles son unidades tridimensionales de medición (Russ, J., 1990), por lo que en el despliegue también se muestra el volumen de los objetos (Russ, 1990; Geraud, 1988).

De manera ideal, los voxeles podrían considerarse como pequeños cubos con las mismas dimensiones en profundidad y lados, pero en la práctica esto rara vez se da y ellos representan regiones prismáticas cuyos lados son de distinta medida, dependiendo del fenómeno en cuestión, del número de cortes, del campo visual de la cámara, y de la técnica utilizada para la obtención de las imágenes.

Después de que las imágenes de cortes seriados han sido procesadas, éstas son puestas una sobre otra secuencialmente formando un escenario tridimensional, con el que se elabora una representación numérica de las

distribuciones de los objetos por medio de voxeles, sobre los que se pueden realizar procesos de morfometría. Además esto hace que el despliegue 3D de las estructuras sea más fácil de interpretar que a través de los cortes individuales en 2D (bidimensionales). Normalmente cada voxel tiene asociado algún valor que le confiere una propiedad específica, como por ejemplo densidad, color, composición, etc.(Russ, J., 1990). Así, la profundidad se representa por el grado de contraste y/o luminosidad con que es pintado cada voxel, esto es, se maneja un gradiente de combinaciones entre el color de cada objeto y el color del fondo. De esta manera, cuando se genera el despliegue, se empieza por los voxeles que están más lejanos con respecto al punto de vista, así el nivel de gris o el color de cada voxel es más intenso mientras más se aleja del punto de inicio del despliegue "Depth cueing"(Foley, 1990). Esto permite al observador tener idea de la profundidad de la imagen en cuestión.

En esencia, el despliegue 3D permite al observador tomar decisiones en el reconocimiento de patrones que en ocasiones no es posible discernir del análisis de los parámetros morfométricos.

## II.6 OBJETIVOS

**GENERAL:** Obtener información acerca de la disposición 3D de la cromatina compacta en linfocitos de rata.

**PARTICULAR:** Adquisición de imágenes de cortes seriados de microscopio electrónico para su posterior tratamiento con técnicas de procesamiento digital de imágenes (PDI).

**PARTICULAR:** Utilizar el sistema de análisis y reconstrucción 3D diseñado en el CIUNAM para el estudio de la disposición tridimensional de la cromatina compacta en linfocitos de rata.

## CAPITULO III

### M A T E R I A L Y M E T O D O

#### III.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con núcleos interfásicos de linfocitos de rata, extraídos de la pulpa blanca del bazo. Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% y se sometieron a tinción con ácido fosfotúngstico para contrastar la cromatina (Esquivel et al., 1987). Después fueron incluidos en una resina epóxica (Glycidether 100, Merck) y se realizaron cortes seriados en un ultramicrotomo Reichert Ultracut. Las imágenes de los cortes seriados de 14 linfocitos fueron fotografiadas en un Microscopio Electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10 a 12,500 aumentos y 80 Kv. Algunas de las fotos fueron tomadas en placas fotográficas para microscopía electrónica y otras en rollo de película fotográfica de 35 mm, obteniéndose un promedio de aproximadamente 60 cortes por núcleo.

Esta parte del trabajo fué realizada por la bióloga Ernestina Ubaldo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM y mi participación en esta fase fué solo de apoyo y aprendizaje y sobre todo intercambiando ideas para el buen curso del trabajo global.

### III.2 ADQUISICION Y PROCESAMIENTO DE IMAGENES 2D

A partir de las imágenes fotografiadas en el microscopio electrónico, se procedió a la adquisición o captura de las mismas en el laboratorio de Procesamiento Digital de Imágenes del Centro de Instrumentos de la UNAM (CIUNAM). Para realizar esta tarea se utilizó el siguiente equipo (Fig. 3.1):

#### Computadora DELL System 310

- Microprocesador 80386, 20 MHz.
- Coprocesador matemático 80387.
- Memoria RAM 4 MB.
- Disco duro con 100 MB.
- Monitor DELL VGA Color Plus.
- Mouse Serial de Microsoft.

#### Monitor RGB (formato de video americano estándar)

- Monitor Nec II Multisync.

#### Tarjeta Digitalizadora

- Tarjeta MVP-AT de MATROX Electronic Systems.
- Con 1 MB de memoria configurada en cuatro memorias de 512x512x8 bits (para manejar y

desplegar hasta cuatro imágenes).

- Maneja 256 niveles de gris.

Cámara de video tipo CCD HR - 750, con un lente tipo Zoom y montada en un soporte que permitía subirla o bajarla para su mejor enfoque. En la base del soporte se colocó un negatoscopio que se utilizaba como fuente de luz para observar las imágenes de la película de 35 mm o de las placas fotográficas.

#### Programas

- Se utilizó el sistema IMAGENIA 5000, BIOCUM-UNAM (Usisima, 1992) y rutinas desarrolladas específicamente para este trabajo e integradas al sistema.

Este sistema está integrado en módulos, cada uno de los cuales contiene funciones comunes que realizan operaciones semejantes.

- Sistema Operativo MS-DOS ver. 3.3

El equipo fué utilizado en línea, tal y como se muestra en la figura 2.1. Los negativos eran colocados sobre el negatoscopio y se procedía a enfocar la imagen, esta podía verse en la pantalla del monitor RGB. Se debía enfocar con una

imagen intermedia de la serie, ya que ésta sería la mayor de todas y era necesario ajustarla al tamaño de la pantalla.

#### CALIBRACION

Cuando la imagen se hallaba en foco y a un aumento propicio, se realizaba una calibración del sistema (cálculo de la equivalencia de las medidas en pantalla con las medidas del negativo) para los posteriores cálculos en el aumento de la imagen. Esta calibración era guardada en un archivo de nombre *paramcou.par*, que contenía la información del número de píxeles que correspondían a la magnitud que le fué señalada y las unidades que se le asignaron. Para relizar esta tarea se colocaba una reglilla sobre el negatoscopio (después de haber enfocado la imagen); ésta se podía ver en el monitor y con el cursor se escogía una longitud  $x$ , se registraba la magnitud correspondiente y las unidades en que estaba expresado (milímetros en este caso). Esta operación era realizada cada vez que el equipo era movido o cuando se cambiaba de rollo de 35 mm a placa fotográfica y viceversa. Este archivo también era grabado con las imágenes del núcleo en cuestión.

#### ADQUISICION

Estando calibrado el sistema, se daba inicio a la sesión de captura de imágenes. Se empezaba con la primera imagen de la serie, la cual debía centrarse en la pantalla ya que se tenía que tomar en cuenta el aumento radial en tamaño

de las subsecuentes imágenes. Entonces se aplicaba el mando @Crom1 (rutina específica para el trabajo e incorporada al sistema IMAGENIA 5000), que guardaba la imagen (ya como imagen digital) en memoria y aplicaba los primeros procesos. Estos, consistían esencialmente en la optimización y normalización de los niveles de gris, filtrando también el ruido de fondo.

#### SEGMENTACION Y CORRECCIONES

Después de los procesos mencionados, se pasaba al aislamiento de las estructuras de interés, en nuestro caso, se separaba el núcleo del resto del citoplasma y de otras células que pudieran haber quedado incluidas en la imagen digital. Esta operación se realizaba manualmente con el trazado del contorno exterior del núcleo. El núcleo, con la cromatina en su interior, estaba así finalmente aislado y el siguiente paso era realizar una segmentación basada en un umbral de intensidad (nivel de gris) que era escogido por el investigador. Este umbral indica hasta dónde se iba a considerar que abarcaban las estructuras de interés (cromatina compacta) y qué estructuras quedaban exentas de la imagen final. Esta operación se tenía que realizar debido a que la técnica de tinción preferencial con PTA no solo contrasta la cromatina compacta, sino que también la cromatina laxa llega a tomar algo de contraste, pero éste tiene una frecuencia muy parecida al ruido de fondo, por lo cual no se puede diferenciar eficientemente por métodos automáticos.

El resultado es la imagen del núcleo con los límites de la cromatina compacta contorneados de color rojo delimitándola así del resto de la imagen que se tomaría como espacio vacío en los siguientes procesos.

Estos contornos (que en adelante representarían las estructuras a ser procesadas) podían aún ser modificados si fuese necesario. Tal necesidad se presentaba muy a menudo, ya que a pesar de estar trabajando con fotografías de muy alto contraste, persistían algunos defectos que impedían el contorno de la cromatina tal y como el observador estimaba era el correcto, esto debido a que el umbral operaba de igual manera sobre toda la imagen y ésta presentaba zonas en las que el contraste no había sido muy bueno y en otras zonas se contrastaba demasiado el ruido de fondo, dando efectos falsos de unión o separación de estructuras. Así, también existen funciones de unión y separación de contornos en el sistema, con lo que se corregían lo más posible estos defectos.

Un problema que es frecuente de ser encontrado en las imágenes, es el de las basuras sobrepuestas en las muestras al momento de ser fotografiadas. Para esto también existen funciones que permiten el aislamiento de zonas específicas y su posterior asignación a un nivel de gris. De esta forma para desaparecer una estructura de color claro, se le aislaba y después se rellenaba de color negro (0 en la escala de grises). Por el contrario, si la estructura que está de más es

de color oscuro, se le aísla y se le asigna el color blanco (255 en la escala de grises). Esto por supuesto, se realizaba sólo en las ocasiones en que en verdad estas basuras impedían el obtener resultados satisfactorios (cuando una basura de color claro estaba en el espacio intercromatiniano o cuando una basura de color oscuro estaba sobre la cromatina).

Cuando la imagen tiene las correcciones pertinentes es grabada, ya sea en disco duro o en disco flexible para posteriores procesos complementarios al análisis. Estas quedan como un banco de imágenes al que se puede recurrir en cualquier momento.

#### ALINEACION DE LOS CORTES

Las imágenes iniciales del microscopio electrónico no conservan su posición sobre el eje original de orientación del núcleo, ya que al momento de tomar la foto, esta se desvía tanto en X e Y como rotacionalmente. Por ende, al iniciar la captura de la segunda imagen de la serie, se inicia otro proceso denominado alineación, el cual se realiza manualmente por el investigador, tomando puntos de referencia para lograr al máximo que las estructuras presentes en la imagen conserven su conformación original y de esta forma poder, posteriormente identificar cuerpos conexos. Para desempeñar esta tarea, el mando @Crom1 permite que en la pantalla del monitor RGB aparezcan simultáneamente la imagen que está por ser adquirida superpuesta al contorno de la imagen anterior. Así, el

negativo era acomodado hasta obtener la orientación que a juicio del investigador era la original con respecto a la anterior.

En el momento en que se ha llegado a la alineación deseada, se repiten los mismos pasos que para la primera de las imágenes y así sucesivamente hasta finalizar con la serie (en ocasiones ésta era de hasta 64 cortes).

#### BINARIZACION DE IMAGENES :

Esta etapa consistió en una serie de procesos que tienen como fin obtener una imagen en la que se considera como parte de ella lo que está en blanco y como fondo lo que está en negro; todo a partir de las imágenes que ya tenían los procesos descritos en los párrafos anteriores. También se aplicaron procesos tendientes a dilucidar mejor la estructura de la cromatina en el análisis tridimensional.

SEPARACION DE LA CROMATINA ADOSADA A LA MEMBRANA NUCLEAR: Este proceso fué necesario debido a que un análisis preliminar dejó ver que la cromatina era un continuo dentro del núcleo a la luz del análisis computarizado. Por consiguiente se recurrió al hecho de que en las imágenes bidimensionales se podían distinguir grumos de cromatina que parecían tener

cierta independencia del resto de la cromatina, pero que se le unía por medio de una zona de cromatina periférica muy constante y que solo se veía interrumpida por los complejos de los poros nucleares. Basándonos en esto, se hizo una separación manual de esta zona en la imagen digital. Cabe señalar que esta operación se hizo de manera un tanto subjetiva pero basada en el análisis preliminar de todas las imágenes para tener una idea del grosor de esta zona de cromatina periférica.

Valiéndonos de algunas de las funciones generales de los módulos de trabajo del sistema IMAGENIA, se procedió a marcar con una línea en la región adyacente a la cromatina periférica de aquellos grumos que a juicio del investigador estaban separados del resto de la cromatina.

#### MARCAJE DE POROS

Con base en los trabajos de reconstrucción tridimensional realizados por Murray y Davies (Murray y Davies, 1979), se procedió al marcaje de los poros nucleares para un posterior análisis de su distribución en la superficie nuclear y la relación que guardaban con los grumos de cromatina.

Nuevamente se recurrió a las funciones de los módulos del sistema IMAGENIA, específicamente a la de utilerías en la

cual fueron integradas una serie de funciones específicas para el trabajo. Entre estas funciones específicas se encontraba el marcado de poros. Este se realizaba manualmente marcando un punto de color gris (nivel de gris 64) en el lugar donde el investigador determinaba que se encontraba un poro nuclear. Este proceso requirió de el uso de las cuatro imágenes que se podían guardar en memoria y desplegar una enseguida de otra para comparar series sucesivas de cuatro imágenes del núcleo en cuestión y de esta forma determinar en cuál de ellas iría marcado el poro. Cada poro celular se distingue en las imágenes como un orificio que se abre paso hacia el interior del núcleo por entre la cromatina, por lo que presenta también una zona parecida a un cono conforme se acerca al interior del núcleo. En ocasiones el orificio que comunica al cono con el exterior (el poro nuclear en sí) se pierde en el espesor del corte, por lo que el poro se marcaba en la región del cono más cercana a la periferia del núcleo.

Esta tarea fué laboriosa ya que también se requirió de la elaboración de un pequeño esquema hecho a mano para cada corte debido a que el despliegue de las cuatro imágenes ayudaba tan solo a determinar la zona a ser marcada pero en el momento de hacer el marcaje ya no se podía recurrir a éstas para verificar; en este momento era cuando se usaban los esquemas en los que se indicaba el lugar de la imagen donde iba la marca.

## BINARIZACION

Cuando a todas las imágenes se les había realizado los procesos anteriormente descritos, seguía el proceso de binarización como tal. En éste se escogían las zonas de la imagen caracterizadas ya como fondo, cromatina adosada a la membrana nuclear y los grumos de cromatina separada, asignándoles su valor correspondiente en escala de gris, siendo estos 0 (negro), 128 (gris) y 254 (blanco) respectivamente. A pesar de que estas imágenes no eran binarias propiamente (ver definición de imágenes binarias en el capítulo II), estas eran trabajadas como tales, tomando el color blanco como parte de la imagen y el resto como fondo, aunque se seguían conservando los otros valores de gris (cromatina adosada y poros) para ser recuperados posteriormente (Márquez, comunicación personal).

Después de esto se utilizaba una función de borrado de los gráficos (contornos y líneas de separación), lo cual permitía tener ya una imagen binaria que es el tipo de imagen con la que se trabaja la mayoría de las operaciones de procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones (Russ, 1990).

## REDUCCION DE LAS IMAGENES

Desde un principio las imágenes digitales sobre las que se han realizado los anteriores procesos tienen una resolución de 512 x 480 pixeles (resolución de la pantalla completa del monitor). Para poder manejar el núcleo entero en la memoria, las imágenes son reducidas a una cuarta parte (128 x 120) auxiliados por el sistema y mediante un proceso denominado amalgamado de mosaicos (Russ, 1990), el cual preserva detalles morfológicos que el simple promedio o la decimación alteran (Márquez et al., 1991). De esta forma las imágenes de 128 x 120 son acomodadas secuencialmente en grupos de 16 cortes por pantalla hasta completar la serie (Fig. 3.2).

### III.3 PROCESAMIENTO Y ANALISIS 3D

La siguiente etapa del trabajo fué realizada en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM y el equipo utilizado fué el siguiente (Fig. 3.2):

#### Computadora INTELEC

- Microprocesador 80386, 33 MHz.
- Disco duro de 120 MB.
- Memoria RAM de 16 MB.
- Monitor Supercom S-VGA.

Cámara de video tipo CCD -FX300

Videograbadora SLV-595HF Sony.

Monitor a color PVM-1390 Sony.

#### Programas

- Sistema para el procesamiento, análisis y despliegue de imágenes 3D desarrollado por Jorge Márquez Flores en el CIUNAM (Márquez, en preparación).
- Sistema Operativo MS-DOS Ver. 5.0

El sistema para el procesamiento, análisis y despliegue de imágenes 3D, consta de dos subsistemas:

a) WSEG3D.- Parte del sistema en el que se encuentran las funciones de procesamiento y análisis de las imágenes, consideradas ya como escenarios tridimensionales. Este sistema cuenta con tres menús (listados) de opciones de procesamiento y análisis, así como con otras opciones que permiten optimizar el trabajo aprovechando el equipo disponible.

b) WVOX3.- Parte del sistema en el que se encuentran las funciones correspondientes al despliegue en 3D y permite hacer una serie de análisis visuales directamente sobre las estructuras reconstruidas en 3D. Con este sistema se puede trabajar el despliegue de imágenes con baja y alta resolución. También se cuenta con una variante a este sistema que es el WSEG3S, este contiene en esencia las mismas funciones que su versión análoga excepto que aquí se reconstruyen estereo imágenes; por lo que es propicio para analizar con mayor detalle la relación espacial entre cuerpos distintos o un mismo cuerpo con respecto a un punto de vista.

## ANALISIS MORFOMETRICO Y PREPARACION PARA EL DESPLIEGUE EN 3D

En esta primera etapa se trabajó con las imágenes de los núcleos en secuencias de 16 cortes por pantalla tal y como fueron procesadas en el CIUNAM. Así, el sistema WSEG3D permite observar la serie completa del núcleo desplegando una tras otra y en el orden requerido, las secuencias de 16 cortes mencionadas. De este despliegue se pueden hacer análisis cualitativos al observar uno tras otro los cortes que conforman al núcleo entero. También se pueden observar cortes realizados sobre el escenario tridimensional obteniendo así vistas en los ejes X e Y además de los ya conocidos cortes en Z.

Para poder realizar los cálculos morfométricos pertinentes al trabajo, se tenía primero que desarrollar un nuevo conjunto de procesos a estas imágenes. Para aplicar estos procesos se realizó la siguiente metodología:

### ALINEACION POR CENTRO DE MASA

En un principio todas las imágenes de todos los núcleos fueron grabadas en el disco duro para tener un acceso

más rápido y eficiente a ellas. Después cada uno de los núcleos tenía que ser sometido a una nueva alineación. En ésta, el sistema calculaba el centro de masa de cada uno de los cortes y lo alineaba con respecto a él. Esto se hizo desde un principio para todos los núcleos ya que cuando se realizaba este proceso, los núcleos eran grabados en esta nueva posición y ya no se tenía que repetir el proceso cada vez que se iniciara una nueva sesión de trabajo. Esta alineación sólo es con respecto a los ejes X e Y, por lo que la alineación manual no puede ser olvidada ya que con ella se realiza la alineación gruesa y sobre todo la alineación rotacional que hasta el momento no puede hacerse automáticamente.

## EROSION

El total de los cortes pertenecientes a cada núcleo fueron sometidos a un proceso de erosión en 3D (opción E6), el cual removía un máximo de cuatro voxeles de grosor, permitiendo así quitar los pequeños puentes que comunicaban a los grumos de cromatina. Antes se hicieron pruebas con otros tipos de erosiones pero con base en el análisis de cada uno de estos procesos, se llegó a la conclusión de que la utilizada al último era la más conveniente debido a las limitaciones que se presentaban con los demás tipos de erosión, ya que algunas removían demasiado material y otras por el contrario lo hacían de forma insuficiente.

Con este proceso, por vez primera se podían observar grumos aislados de cromatina. Estos grumos eran los que presentaban la cromatina que tenía las uniones más consistentes de la masa total de cromatina, esto es, aquellos que a pesar de la erosión no se separaban en más componentes (Fig. 3.4).

#### SEGMENTACION Y ETIQUETADO

El siguiente paso consistía en caracterizar a cada grumo de cromatina aislado mediante una segmentación y etiquetado automáticos. Con esta función el sistema hacía un reconocimiento de los cuerpos conexos existentes en el núcleo y les iba asignando un color conforme los localizaba (Fig. 3.4). En un principio este proceso se hacía manualmente, de manera que el investigador escogía uno por uno los cuerpos que se iban etiquetando en el orden que era escogido. Este proceso fué optimizado hasta contar con la opción automatizada y el método manual quedó solo como opcional dentro el sistema.

#### RECUPERACION DE LA CROMATINA EROSIONADA

En el proceso de erosión, la información de la cromatina que fué erosionada no se pierde, por lo que un siguiente paso era la recuperación ésta. Con este proceso se podían observar las imágenes con los cuerpos etiquetados formando una especie de ejes centrales dentro de los grumos de

cromatina y permitiendo estimar la cantidad de material que había sido removido.

#### ETIQUETAR CROMATINA ADOSADA A PERIFERICA

Con este título fué designado el proceso que recuperaba la cromatina adosada a la membrana nuclear que en un principio fué separada y que hasta el momento impedía realizar todos los procesos antes mencionados. Esta función le asignaba el valor de 255 (blanco) al que anteriormente era de 128 (gris). Estos procesos de recuperación iban encaminados a realizar los cálculos morfométricos sobre la masa total de cromatina.

#### DILATAION CONDICIONADA

Con este proceso el valor de la etiqueta de cada cuerpo (color) iba extendiéndose sobre la cromatina recuperada, respetando los territorios de cada grumo. Este proceso se guiaba por jerarquías de tamaño de los cuerpos; así, un cuerpo de mayores dimensiones invadía más cromatina que uno de menor tamaño. Cuando dos cuerpos llegaban a tocarse en alguna zona, este proceso se detenía, de manera que no se sobreponían en ningún momento dos o más cuerpos. El número de dilataciones a realizar, también fué designado con base en la experiencia y para este trabajo se determinó que cuatro dilataciones eran suficientes para no causar efectos

contrarios a los deseados. A pesar de que el número de dilataciones escogido era el más eficiente, la mayoría de las veces llegaban a quedar pequeñas zonas sin rellenar, pero para las cuales otra dilatación era excesiva. Por esta razón se aplicó otro proceso (Merge) que rellenaba esos pequeños espacios que sobraban, asignándoles la etiqueta del cuerpo predominante que colindara con ellos.

Al final de estos procesos la cromatina se observaba en su totalidad y dividida en regiones de distinto color cada una (Fig. 3.5).

#### CALIBRACION

Para poder realizar los cálculos morfométricos se tenía que calibrar las medidas de los voxels en X, Y y Z. Estas medidas eran obtenidas en base al aumento dado por el microscópio electrónico por el aumento final de la pantalla del monitor cuando la imagen era digitalizada (en este punto se recurría al archivo de calibración `paramcou.par` para cada núcleo). De esta forma se podían obtener las magnitudes de X pero un factor de corrección tenía que ser aplicado para obtener la magnitud de Y debido a que ésta sufría deformación debido a la pantalla del monitor. La magnitud de Z se calculó en base a la lectura que daba el ultramicrotomo al realizar los cortes (73 nm).

## MORFOMETRIA

El sistema permite obtener una serie de parámetros morfométricos de manera automática, ahorrando al investigador todo el trabajo que se realizaba comunmente auxiliado de la estereología cuantitativa.

Entre las mediciones más utiles se encuentran:

- Volumen total del núcleo.
- Volumen total de cromatina.
- Número de cuerpos individualizados.
- Volumen de cada uno de los cuerpos de cromatina.
- Superficie.
- Factores de forma (estimación de la irregularidad de los cuerpos).
- Esfericidad.
- Distancia de los centros de masa de cada cuerpo al centro de masa global.

## MAPAS DE LA SUPERFICIE NUCLEAR

Como ya se mencionó, uno de los procesos que se realizaron sobre los cortes de los núcleos fué el marcaje de poros, por lo que en esta etapa es donde fueron aprovechados junto con los demás procesos realizados. Para cada núcleo se

hizo una representación a manera de mapa cartográfico de la superficie nuclear en la que se observaban los diferentes dominios de cada grumo de cromatina en diferente color y la distribuciones de los poros nucleares. En estas imágenes se procedió a contar de los cuerpos que tenían contacto con la membrana nuclear y a comparar las áreas de contacto de los grumos de cromatina con la distribución de los poros nucleares.

#### RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL DE LA CROMATINA

Esta etapa del trabajo se realizó con el sistema denominado WVOX3, que lleva a cabo la reconstrucción y despliegue de las imágenes 3D.

Las imágenes segmentadas y etiquetadas de las series de cortes de cada núcleo son empleadas en esta parte del proceso para ser desplegadas en pantalla por medio de elementos de volumen o voxeles. De esta forma se puede observar el avance de la reconstrucción de los núcleos desde el primer corte hasta el último de la serie. El sistema permite generar diferentes puntos de vista, con lo que se podía analizar varias posiciones para después ser comparadas con las de otros núcleos. La reconstrucción completa de un punto de vista para cada núcleo se lleva entre 15 a 20 minutos.

Entre las opciones más utilizadas se encuentra el poder elegir los cuerpos a ser reconstruidos. De esta manera se empezó por analizar los cuerpos de mayor volumen o de importancia biológica como son los cuerpos que contienen al organizador nucleolar (NOR), es decir, la hebra de ADN que codifica para el RNA ribosomal.

También se hizo uso de "ventanas" que permitían generar cortes a través de los núcleos y distinguir así la conformación interna de los cuerpos de cromatina.

Para poder realizar comparaciones entre todos los núcleos se procedió a el análisis de los cuerpos que contenían al NOR observándolos en imágenes 4D (la cuarta dimensión se refiere a la intervención del tiempo), que desplegaban a los cuerpos en diferentes puntos de vista que al ser generados sucesivamente daban la impresión de rotación. Debido a falta de espacio en memoria (cada rotación ocupaba un promedio de 15 MB en disco), se implantó una nueva metodología en la que se grababa del monitor las rotaciones de cada cuerpo utilizando una cámara CCD, una videograbadora y un monitor en línea. Después de haber grabado las rotaciones de los cuerpos de cada núcleo en una cinta de video, estos podían ser comparados uno tras otro.

Debido a que el sistema no proporciona aún funciones estrictamente de comparación, esta tarea queda asignada a la vista del investigador, siendo uno de los pasos más importantes el familiarizarse con las reconstrucciones tridimensionales desplegadas en computadora para poderlas entender y llevar a buen término las comparaciones.

## CAPITULO IV

### R E S U L T A D O S

#### **Análisis cualitativo de las imágenes bidimensionales (2D):**

De las numerosas observaciones hechas sobre los cortes seriados de los 14 linfocitos procesados, se puede decir que la cromatina compacta de los mismos se presenta como una masa continua dentro del núcleo interfásico y que sólo se ve interrumpida por los complejos de los poros nucleares, disponiéndose, de manera general, hacia la periferia del núcleo y rodeando a los nucleolos, los cuales se encuentran hacia la parte central (Fig. 4.1). El número de nucleolos para los núcleos interfásicos de linfocitos de rata estudiados en este trabajo fué de uno a tres (tabla 1). De esta forma la cromatina compacta deja un espacio central en el que se encuentran las partículas ribonucleoproteicas y la cromatina laxa.

Fig. 4.1 Serie de 16 cortes en imágenes binarias después del filtrado de ruido de fondo. Se puede observar como la cromatina se dispone hacia la periferia del núcleo y rodeando al nucleolo (NC).

## Estudio preliminar sobre la disposición tridimensional de la cromatina compacta:

Antes de aplicar los procesos de erosión y dilatación que nos ayudaron a estudiar los grumos de mayor conectividad de la cromatina, se hizo una primera reconstrucción tridimensional a partir de las imágenes binarias, las cuales habían sido sometidas únicamente al filtrado del ruido de fondo y a la separación de estructuras sin interés para el trabajo (citoplasma y otras células por ejemplo) (Fig. 4.1) Se pretendía de esta forma encontrar grumos separados de cromatina, lo cual no fué posible ya que con esta reconstrucción se observó que la cromatina tenía múltiples uniones que la hacían aparecer como un solo gran acúmulo sin componentes separados. El mismo sistema detectaba un solo cuerpo en el análisis morfométrico y en ocasiones uno o dos grumos muy pequeños, que finalmente se vió que eran debido a la persistencia de ruido de fondo y que más adelante fueron eliminados. Esta reconstrucción presentó muchas dificultades para su estudio y para posibles interpretaciones en cuanto a su arquitectura, ya que el aspecto de la superficie del núcleo lo hacía verse como una gran masa de forma esferoidal y el análisis del interior del núcleo era imposible debido a que toda la cromatina tenía un mismo color y las estructuras se estorbaban unas a otras, por lo que era demasiado difícil distinguir la forma de la cromatina en el interior del núcleo. De este estudio preliminar se pudo verificar la continuidad de

la cromatina adosada a la parte interna de la membrana nuclear y como ésta conectaba a todos los grumos entre sí.

Los resultados cuantitativos que se pudieron obtener de estas imágenes fueron el volumen nuclear y el volumen del total de la cromatina compacta (tabla 1).

NUCLEO	VOLUMEN TOTAL $\mu^3$	VOLUMEN DE CROMATINA $\mu^3$	FACTOR DE FORMA	NO. DE CUERPOS	UNIONES A MEMBRANA	NO. DE NUCLEOS	CUERPOS < 0.1 $\mu^3$	CUERPOS < 0.05 $\mu^3$
A	44.46	27.54	0.898	19	19	1	1	1
N	38.68	22.70	0.912	30	27	2	5	3
O	35.91	22.90	0.914	22	19	1	3	1
P	35.69	20.64	0.875	28	28	1	4	2
Q	36.34	22.17	0.906	27	24	2	2	1
R	37.38	22.35	0.900	20	20	3	0	0
S	32.76	20.59	0.923	20	18	1	1	0
T	37.16	22.53	0.915	25	22	2	3	3
U	35.31	23.66	0.949	19	16	1	4	3
V	35.55	22.85	0.810	27	20	2	10	7
W	28.01	21.15	0.840	18	18	1	1	0
X	20.06	14.44	0.772	16	16	1	2	1
Y	27.50	18.28	0.832	15	15	1	1	1
Z	25.65	15.20	0.827	26	24	2	3	3
X	33.60	21.21	0.876	22	20	1	2.8	1.8
S	6.03	3.26	0.04	4	3.9	0.6	2.4	1.8

Tabla 1: morfometría de la cromatina compacta de núcleos interfásicos de linfocitos.

### Separación de la cromatina adosada a la membrana nuclear:

Después de determinar que la cromatina adosada a la membrana nuclear se presentaba como una región de un grosor más o menos constante y que unía a todos los grumos, se

procedió a hacer un proceso de separación de ésta, tratando así de encontrar grumos separados que nos pudieran dar un indicio de su relación con los cromosomas metafásicos. Cabe aclarar en este punto que los procesos de erosión que se aplicaron después no pudieron ser aplicados antes de la remoción de la cromatina adosada a la membrana nuclear debido a que estos procesos reducen a los cuerpos existentes rebajando de igual manera todos sus contornos, tanto internos como externos, por lo que aún cuando erosionaran esta zona que impedía el estudio que deseabamos, también se llevarían gran parte de la cromatina interna y el resultado sería el mismo grumo único pero de menores dimensiones o en su defecto, cuando terminara de erosionar la capa de la cromatina adosada a la membrana nuclear, también habría terminado con el resto de la cromatina interna.

Debido a estas observaciones se procedió a separar la capa de cromatina mencionada y posteriormente se practicó una nueva reconstrucción tridimensional de la cromatina interna restante.

Desafortunadamente, el resultado fué el mismo, por lo que la reconstrucción presentaba un solo grumo conteniendo toda la masa de cromatina compacta y presentando las mismas dificultades para su estudio que en la reconstrucción analizada con anterioridad. De aquí se pudo observar que la cromatina compacta presenta una gran cantidad de regiones de

unión entre sus componentes aparte de la mencionada con la cromatina periférica.

**Erosión, segmentación, etiquetado y dilatación de la cromatina compacta:**

Se realizaron numerosas observaciones de las imágenes binarias de las series de cortes que conformaban a cada uno de los núcleos de linfocitos procesados, incluso se tomaron impresiones de estas series con una impresora laser, para de esta manera analizar con más detalle la cromatina y buscar un método que nos ayudará a encontrar grumos separados que pudieran ser analizados por separado como ya se explicó. De estos análisis destacó el hecho de que el observador podía ir haciendo separaciones entre la cromatina, las cuales dejaban cuerpos separados entre sí. Estas separaciones incluían la remoción de la cromatina periférica y algunos puentes internos que unían los componentes de la cromatina. Por esta razón se aplicó el proceso de erosión aunado a la separación de la cromatina periférica, lo cual dió como resultado la tan anhelada separación de la cromatina en varios componentes. La segmentación y el etiquetado permitió analizarlos como cuerpos individuales y diferentes unos con otros. Por último, con el proceso de dilatación se recuperó toda la cromatina que se había quitado con anterioridad (adósada a la membrana nuclear y erosionada) permitiendo así realizar los estudios morfométricos sin perder las dimensiones originales de la

cromatina.

Gracias a estos procesos se pudieron obtener datos acerca de la morfometría de la cromatina y los grumos que se individualizaron, los cuales fueron un promedio de  $22 \pm 4$  (DS) grumos de cromatina para cada núcleo, con un límite superior de 30 y 15 como límite inferior (tabla 1).

**Mapas de la superficie nuclear y disposición de los poros nucleares:**

Del proceso de marcaje de poros y el análisis de los mapas de la superficie nuclear, se observó que la disposición de los poros tiende a ser preferentemente hacia la periferia de los dominios o acúmulos de cromatina y sobre la superficie de algunos cuerpos de gran tamaño, como los que contienen al nucleolo (ver fig. 4.2).

**Estudio morfométrico de la cromatina y los cuerpos individualizados:**

Estos resultados se muestran en las tablas 1 y 2, de los que cabe señalar lo siguiente:

La cromatina compacta de estos núcleos ocupa en promedio el 63% del volumen nuclear (gráfica 1).

El factor de forma, que es la relación entre la superficie de cada cuerpo y el volumen que ocupa, nos da una idea de la irregularidad de la forma que adopta la cromatina y para cada núcleo nos permitió hacer comparaciones del parecido que tienen en cuanto a la disposición que adopta la cromatina. El factor de forma para una esfera perfecta es de 1 y éste va disminuyendo mientras aumenta la superficie. De esta manera se encontró que el factor de forma para la cromatina compacta total es en promedio de  $0.876 \pm 0.04$ . Este valor está calculado a partir del factor de forma promedio, que es el más cercano al real ya que las técnicas de procesamiento digital de imágenes (PDI) sólo nos permitieron obtener un valor por encima y otro por debajo del real (gráfica 2).

El número de grumos individualizados que presentaron uniones a la membrana nuclear fué en promedio de  $20 \pm 3.9$ . Esto fué encontrado gracias al análisis de los mapas de la superficie nuclear.

**Análisis morfométrico de cuerpos individualizados entre los que destacan los de relevancia biológica como los que contienen al organizador nucleolar (NOR):**

Se pudo notar que en los núcleos se individualizaban, después de la erosión, un número elevado de cuerpos de volumen relativamente pequeño en comparación a los cuerpos de mayor volumen.

Del estudio de las características morfológicas de grumos individualizados de relevancia biológica (cuerpos conteniendo al NOR), se observó que éstos se encontraban siempre entre los de mayor volumen ocupando en promedio el 39% del volumen de la cromatina compacta de cada núcleo (gráfica 3). La morfometría de estos cuerpos se presenta en la tabla 2.

NUCLEO	VOL. ( $\mu\text{m}^3$ ) CROMATINA PERINUCLEOLAR	FACTOR DE FORMA	CaK-CM  ( $\mu\text{m}$ )	NO. DE NUCLEOS
A	10.48	0.10	1.1	1
H	12.80	0.09	3.3	2
O	8.57	0.11	0.3	1
P	5.21	0.14	0.4	1
Q	8.11	0.11	0.7	2
R	11.91	0.10	0.6	3
S	5.16	0.16	0.7	1
T	3.90			2
U	3.94	0.21	0.9	1
V	15.10			2
W	12.13	0.13	0.5	1
X	10.41	0.11	0.3	1
Y	4.33	0.12	0.8	1
Z	3.01			2
X	8.21	0.13	0.89	
DS	3.8	0.03	0.86	

Tabla 2: morfometría y distancia del centro de masa de cada cuerpo al centro de masa global ( $|CaK-CM|$ ) de la cromatina perinucleolar.  
Nota: los cuerpos en los que no se muestra todos los datos es debido a que la cromatina perinucleolar se separó en dos cuerpos.

### Estudio de la rotación de las imágenes tridimensionales de cuerpos de relevancia biológica:

Del estudio de las imágenes 4D (imágenes en las que interviene el tiempo como una dimensión más) de los grumos que contenían al NOR, se pudo encontrar que algunos presentaban similitudes, aunque demasiado intrincadas para el observador. En general el cuerpo que contenía algún nucleolo solía ser de los de mayor volumen, presentando en general una forma que se extiende de uno a otro de los extremos del núcleo, presentando al menos dos porciones de contacto con la envoltura nuclear y proyecciones hacia el centro del núcleo. Esto también se pudo verificar analizando los cortes uno tras otro en series de

tres, tanto en los cortes en Z iniciales (vistas originales de los cortes físicos) como en las imágenes virtuales de los cortes X e Y generados de novo utilizando el sistema de análisis. En general, la distancia del centro de masa de cada uno de estos cuerpos al centro de masa global del núcleo, fue de los más pequeños en comparación al resto de los grumos individualizados (tabla 2).

## CAPITULO V

### D I S C U S I O N

Son muchos los estudios que se han realizado para tratar de dilucidar la disposición que adopta la cromatina de núcleos interfásicos, así como la relación que mantiene con los cromosomas metafásicos. Comings (1968) presenta una extensa revisión de estos trabajos y discute las razones que fundamentan la existencia de un orden en el núcleo interfásico

El estudio de la disposición tridimensional de la cromatina durante la interfase, es de gran importancia ya que representa a los cromosomas parcialmente descondesados (en Esquivel, 1988). Por otra parte se puede argumentar que al estudiar la disposición tridimensional de la cromatina compacta (objetivo de este trabajo), estamos analizando indirectamente la disposición de las zonas en las que queda distribuida las fibras pericromatinianas, por ende, se estudia también la actividad transcripcional de la célula, aunque para ello se necesita un trabajo más extenso que relacione de manera inequívoca ambos puntos. Este trabajo nos lleva a

pensar que se podrían crear microambientes en los que se esté propiciando el acercamiento de moléculas necesarias para efectuar reacciones esenciales y específicas del tipo celular en cuestión. Tal idea podría verse apoyada por las aseveraciones de algunos autores en las que señalan que las porciones del genoma donde la cromatina está menos condensada en la interfase son más accesibles a la maquinaria de transcripción y síntesis de ADN, por lo que estas regiones son las que se replican primero (en Alberts et al., 1983).

El problema que se había tenido para la interpretación de los resultados obtenidos en trabajos anteriores sobre este tema fué atribuido a que las técnicas utilizadas dañaban al núcleo (por ejemplo técnicas en las que se practicaba compresión o squash) o que la cromatina compacta era analizada sólo parcialmente localizando algunas zonas específicas en el núcleo interfásico (como la inmunolocalización con anticuerpos anticentrómeros) . Por esta razón Esquivel y colaboradores en 1988 realizaron estudios de la disposición de la cromatina compacta de hepatocitos de rata mediante reconstrucción tridimensional, obteniendo evidencias de la existencia de patrones de repetitividad para estos núcleos. No obstante que encontraron estos patrones restringiéndose a una región limitada del núcleo situada en la porción ecuatorial del mismo, el estudio fué en un principio realizado sobre toda la cromatina y gracias al empleo de los métodos de reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados, se pudo observar

la cromatina en una disposición bastante parecida a la que guarda en los núcleos intactos.

Este tipo de estudios se enfrentan a dos problemas principales: a) el trabajar con toda la cromatina compacta de un núcleo y después tratar de comparar ésta con la de otros núcleos implica el manejo de una gran cantidad de datos y b) que el movimiento nuclear, esto es, el desplazamiento de los dominios de cromatina incluyendo al nucleolo (De Boni y Mintz, 1986), puede ser una de las causas de la variación en la estructura nuclear, aunque estos desplazamientos no destruyan el patrón general de organización.

Tomando en cuenta estos impedimentos, algunos autores han recomendado que la mejor forma de abordar un estudio de tal envergadura es utilizando métodos computarizados en los que se pueda hacer uso de una gran capacidad de memoria y tener acceso a diferentes vistas de los núcleos tal y como si se tuviera un modelo físico entre manos (Russ, 1990; Esquivel et al., 1989; Montag et al., 1989; Geraud et al., 1988; Hochstrasser et al., 1986). De ahí que el presente trabajo se enfocara en la puesta a prueba de un sistema computarizado de reconstrucción y análisis tridimensional de la cromatina compacta de núcleos interfásicos que además se fué elaborando a la par del procesamiento del material biológico y las imágenes de cortes seriados de los núcleos en microscopía electrónica.

**Material biológico:** el hecho de haber utilizado linfocitos de la pulpa blanca de bazo de ratas criadas en condiciones controladas, es debido a que se buscó obtener la mayor uniformidad en cuanto a los núcleos que se iban a analizar, tanto morfológica como fisiológicamente. Así, los linfocitos que se eligieron fueron aquellos de menor tamaño, con escaso citoplasma y de núcleos esferoidales con gran cantidad de cromatina compacta, todas ellas características de células quiescentes que tienen un alto porcentaje de posibilidades de encontrarse en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular.

Con respecto a la metodología empleada, hay algunos puntos en los que se debe poner énfasis para su mejor comprensión:

**Reducción por amalgado de mosaicos (Russ, 1990):** Este método descrito con anterioridad fué adaptado a los requerimientos de nuestro trabajo y presentó esencialmente dos ventajas. La primera está relacionada con la cantidad de memoria ocupada para cada imagen, ya que al inicio del procesamiento, la imagen inicial de cada corte era almacenada teniendo una resolución de 512 x 480 pixeles y ocupando al rededor de 1.2 MB de memoria por cada cinco de estas imágenes almacenadas. Al realizar la reducción, las imágenes pasan a tener una resolución de 128 x 120 pixeles posibilitando de esta manera acomodar las imágenes de hasta 16 cortes por pantalla, dando como resultado el poder almacenar un núcleo

entero ocupando menos de 1.2 MB de memoria.

La segunda ventaja está relacionada con el análisis cualitativo de las series ya que agrupados los cortes de 16 en 16 proporcionaban una mejor apreciación de la continuidad de los grumos de cromatina a través de los cortes.

**Marcaje de poros nucleares:** Este proceso representa el poner una marca en las zonas de la periferia del núcleo donde la cromatina se veía interrumpida, ésto debido a que con la técnica de contraste con PTA no se distingue el complejo del poro sino solamente el cono que se forma hacia el interior del núcleo, por lo que cabe señalar que sólo se trató de hacer una estimación lo más cercana posible a la realidad en cuanto las técnicas usadas nos lo permitieron. A pesar de que se procuraba marcar el poro en el corte donde éste estaba más próximo a la envoltura nuclear (como se describió en el capítulo 3), es muy posible que el número de poros marcados sea mayor al número real existente en el núcleo. Esto se debió a que en ocasiones había poros muy cercanos entre sí y no era posible distinguir donde iniciaba uno y donde terminaba el otro, además de que en el transcurso del trabajo se decidió que era mejor sobrestimar en el marcaje para no omitir ninguno de los poros que pudiera ser necesario para el entendimiento de la disposición general de éstos.

Al hablar de esta disposición en los resultados se

menciona que tienden a estar hacia la periferia de los grumos de cromatina individualizados y sobre grumos de gran tamaño como los que contienen al nucleolo. La primera de estas aseveraciones no solo se basa en el análisis de los mapas de la superficie nuclear sino también en el hecho de que al estar realizando el marcaje se pudo observar que las marcas eran puestas muchas de las ocasiones en zonas donde el grosor de la cromatina en la imagen del corte era muy delgado y se encontraba separando dos grumos de mayor grosor contiguos. Se hace hincapié en este punto ya que los mapas de la superficie nuclear en ocasiones no mostraban muy evidentemente esta disposición hacia los límites de los grumos con contacto a la membrana nuclear ya que el efecto que crea la técnica de dilatación condicionada es en ocasiones el que el territorio de un grumo individualizado invada el territorio de otro adyacente de menor jerarquía.

Separación de la cromatina adosada a la membrana nuclear: Esta separación fué necesaria debido a las limitantes de los procesos de erosión (Márquez, comunicación personal) y a la búsqueda de grumos individualizados que nos pudieran dar idea de la relación de éstos con los cromosomas metafásicos. No obstante los procesos de recuperación de la cromatina adosada a la membrana y la cromatina erosionada nos permitió realizar los cálculos morfométricos sobre la masa completa de la cromatina compacta y no perder ningún dato al respecto, acercándonos de esta forma lo más posible a los datos que se

obtendrían para los núcleos intactos.

**Erosión:** Como ya se explicó, se recurrió a esta técnica para poder individualizar grumos de cromatina. A pesar de esto se debe hacer notar que con ello se crearon separaciones no existentes como tal en la cromatina intacta y que pueden o no corresponder a los límites reales de los cromosomas en interfase. Por otra parte lo que nos están indicando los resultados obtenidos después de la erosión es que existen acumulaciones de cromatina que están unidas entre ellas por medio de puentes de cromatina muy delgados (menores a 4 voxeles, aproximadamente  $0.8 \mu\text{m}^3$ ) los cuales fueron disueltos por la erosión.

**Etiquetado:** Al hablar de asignar una etiqueta a cada cúmulo individualizado se hace referencia al efecto de asignar un color diferente a cada uno de estos cúmulos para que puedan ser identificados por separado ya sea visualmente o empleando el sistema de análisis automático. Aquí es oportuno señalar que el color de cada cúmulo es asignado sin tomar en cuenta sus atributos morfológicos con respecto a los demás cúmulos individualizados ya que el sistema asigna los colores conforme va localizando los cúmulos por lo que este proceso varía dependiendo de la orientación del núcleo.

**Dilatación condicionada:** Esta técnica se utilizó principalmente para poder realizar los cálculos morfométricos

tomando en cuenta toda la cromatina (recuérdese los procesos de erosión y separación antes descritos). Como ya se explicó, existe la incertidumbre de saber si los grumos después de dilatarse sobre la cromatina no segmentada ni etiquetada conservan los límites originales que presentarían en el núcleo intacto, ya que el criterio que sigue el crecimiento de los cuerpos es de acuerdo a la jerarquía de cada uno de ellos en cuanto a tamaño se refiere. Por esta razón este procedimiento sólo permite obtener cúmulos de tamaño y forma que dependen de las características de cada uno y de su relación entre todos.

Para la interpretación de los resultados se deben tomar en cuenta las conclusiones a las que han llegado algunos autores estudiando a la cromatina. Por otra parte también es necesario entender la forma en que trabaja el sistema de análisis para verificar la validez de los datos que nos proporcionó.

**Volumen nuclear y volumen de cromatina:** Estos resultados son parecidos para todos los núcleos aunque también los valores extremos llaman la atención por la diferencia que guardan (ver tabla 1 y gráfica 1). Todos los parámetros que fueron calculados con el sistema de análisis estuvieron siempre calibrados desde un principio tomando en cuenta el aumento de las estructuras en cuestión desde que fueron fotografiadas al microscopio electrónico hasta que terminaron como imágenes digitales procesadas. Algunos de los parámetros

como diámetros y volúmenes nucleares esenciales para el resto de los cálculos subsecuentes, fueron corroborados con mediciones de núcleos del mismo tipo al microscopio óptico utilizando un lente ocular graduado. Así se logró verificar que las mediciones hechas con el sistema computarizado coincidían con las mediciones en el microscopio óptico utilizando una reglilla de medición y una lente optovar.

**Cúmulos o cuerpos individualizados mediante procesos de erosión:** A pesar de todos los inconvenientes que puedan surgir por el uso de estas técnicas, es de llamar la atención el hecho de que se hallan separado un promedio de 22 cuerpos por núcleo, lo cual se acerca mucho al número haploide de cromosomas de la especie. La especie con que se trabajó fue *Rattus norvegicus* con número cromosómico  $2n = 42$  (Ayala y Kiger, 1984). La desviación estandar (ver tabla 1) puede sugerir que el método es inespecífico, pero también se puede observar que en muchos de los casos en que el número de cuerpos individualizados era muy alto, se presentaban alrededor de 4 cuerpos aproximadamente de volumen demasiado pequeño, lo cual podría estar haciendo que la dispersión de nuestros datos se elevara. Por otra parte la formación de este tipo de cuerpos de poco volumen puede ser debido a que a pesar del gran esfuerzo realizado para obtener la mejor alineación posible de los cortes, éstos aún hayan estado desfasados en algunas regiones, creando así salientes que pertenecen a un cuerpo grande pero que la erosión los separó por la débil

unión que existía entre ellos. No obstante cabe señalar que nuestros resultados pueden sugerir que existieran conexiones entre los cromosomas en la interfase y que tales uniones no han podido ser demostradas hasta el momento debido a los métodos de estudio utilizados. Es postulado por muchos autores que existen asociaciones intercromosómicas que probablemente han emergido desde en núcleo interfásico (Paulson, 1982).

La interpretación a este número de cuerpos individualizados ha sido mencionada desde los tiempos en que Rabl postuló un modelo para el arreglo de los cromosomas en interfase, en el que decía que los cromosomas homólogos se encontraban adyacentes y estrechamente relacionados en la interfase. Muchos otros autores como Avivi y Feldman, Comings, Bennet, Murray y Davies, etc., empleando metodologías distintas han apoyado esta hipótesis y la explican diciendo que de esta manera se asegura que el intercambio entre homólogos y la exacta repartición del material genético a la progenie sea lo más efectiva posible (Comings, 1968; Murray y Davies, 1979; Avivi y Feldman, 1980; Bennet, 1984).

**Cromatina perinucleolar:** tal como se vió en los resultados, los núcleos de los linfocitos estudiados presentaron de 1 a 3 nucleolos y la cromatina circundante a ellos se individualizó mostrando características distintivas con respecto al resto de los cúmulos separados. A pesar de tener más de un nucleolo, en la mayoría de los núcleos toda la

cromatina perinucleolar tenía fuertes uniones que la hicieron aparecer como un solo cuerpo. Únicamente en tres ocasiones se encontraron núcleos con más de un nucleolo y que la cromatina perinucleolar de cada uno de los nucleolos se individualizó como dos cuerpos separados (ver tabla 2). Una más de las características de estos cúmulos de cromatina perinucleolar fué el hecho de que se presentaran siempre como uno de los cuerpos de mayor volumen del núcleo. Estas características distinguen a estos cuerpos de los demás y los asemejan entre sí, por lo que vienen a corroborar la idea de que este grumo de cromatina en especial es de relevancia biológica y que puede servir como punto de referencia para analizar el resto de la cromatina (Esquivel, 1988). Existe también una hipótesis que dice que todos los cromosomas que poseen ADN satélite se encuentran agrupados rodeando al nucleolo, por lo que si el cariotipo de una especie presenta un número determinado de estos cromosomas, cada uno y sin excepción estarán en torno al nucleolo durante la interfase y probablemente muy cercanos unos con otros (en Alberts et al., 1983). Esta podría ser la razón por la cual el cúmulo de cromatina que contiene al nucleolo siempre se presentó como los de mayor volumen. Tomando en cuenta esto, podría ser válido un estudio posterior como es propuesto por Bennet (1982) en donde dice que si se supiera el volumen relativo de cada cromosoma sería fácil de identificar en la interfase.

### Interpretación de los mapas de la superficie nuclear:

En estos mapas se encuentran representadas las áreas de contacto que existen con la membrana nuclear de cada uno de los cúmulos de cromatina individualizados así como la disposición de los poros nucleares.

Existen dos inconvenientes para la interpretación de estos mapas: a) los puntos que se encuentran localizados hacia los polos del núcleo se deforman aumentando su tamaño como sucede en cualquier mapa cartográfico de la tierra y b) el sistema no proporciona aún algún medio para alinear a todos los núcleos sobre un mismo eje que permita hacer comparaciones en cuanto a la posición relativa de cada grumo para cada núcleo. Sin embargo utilizando este tipo de representación de la superficie nuclear logramos corroborar las observaciones de otros autores que indican que los cromosomas en interfase siempre tienen al menos una zona de contacto con la membrana nuclear, lo cual se considera como uno de los factores más importantes que dan orden a la cromatina del núcleo interfásico (Comings, 1968; Murray y Davies, 1979). Utilizando este método se pudo verificar que la mayoría de los grumos individualizados de cada núcleo tienen por lo menos una zona de contacto con la membrana nuclear (ver tabla 1), fenómeno que pudiera estar poniendo de manifiesto la importancia de esta unión con la membrana nuclear para dar un orden a la cromatina compacta de estos núcleos.

En cuanto a la disposición de los poros nucleares hacia los límites de los grumos individualizados y sobre cuerpos de gran volumen, principalmente en los que contienen al nucleolo, estas observaciones hacen destacar la importancia de los poros en el intercambio de moléculas entre el núcleo y el citoplasma (ARN) y viceversa (proteínas). La ausencia de poros sobre los grumos de cromatina compacta señalan la poca o nula actividad transcripcional de los mismos, pero al observar al grumo que contiene al nucleolo, se puede deducir que en él se lleva a cabo una gran actividad de intercambio con el citoplasma. Esto parece lógico si tomamos en cuenta que en el nucleolo se encuentra el organizador nucleolar y es también donde se ensamblan las subunidades de los ribosomas.

**Factores de forma:** Como ya se ha mencionado, el factor de forma es un parámetro que refleja la irregularidad de los cuerpos tridimensionales ya que es una estimación de la relación que existe entre la superficie y el volumen (Russ, 1990). El sistema de análisis proporcionó dos diferentes resultados al calcular el factor de forma. El primero nos daba un valor por debajo del real y el segundo un valor superior al real. Debido a esto, se reportó el factor de forma real sacando el promedio entre los dos valores mencionados. Se llegó a tomar esta decisión haciendo primero los cálculos para obtener el factor de forma de una esfera normal y de una esfera en imagen digital (el factor de forma para una esfera es de 1).

Al comparar el factor de forma de la cromatina compacta de cada núcleo se pudo observar una gran constancia en cuanto a los valores obtenidos (tabla 1 y gráfica 2), por lo que se puede deducir que la cromatina de los núcleos en cuestión tiene un orden no azaroso ya que todos presentan una misma forma (refiriéndonos con ésto a la irregularidad que presenta en su forma de acuerdo a la relación superficie-volumen) pero al parecer varían en cuanto a la orientación.

Con base en todos los resultados expuestos se puede argumentar que la cromatina de estos núcleos no se encuentra ordenada al azar y que posiblemente el hecho de que las células se extrajeron de un tejido que no tiene polaridad pudiera causar que los núcleos no adoptaran una misma posición, de tal manera que esta falta de orientación puede ser el factor esencial por el cual no es posible captar fácilmente el patrón de orden que sigue la cromatina. Tomando en cuenta tal hipótesis podría ser factible encontrar con mayor facilidad y de una forma más obvia los patrones de orden que guarda la cromatina de núcleos interfásicos en células de tejidos en los que se ha demostrado que hay una polarización hacia un lumen o hacia algún capilar como en el caso de los epitelios. No obstante, los efectos del movimiento nuclear que al parecer no dependen de si un tejido está orientado o no, y al cual algunos autores proponen atribuirle funciones de desplazamientos de acúmulos de cromatina transcripcionalmente activa hacia zonas con mayor densidad de poros nucleares,

puede ocultar los patrones de orden incluso en tejidos que tienden a tener una polaridad como los mencionados anteriormente. Así, la manera más factible de encontrar estos patrones de repetitividad en diferentes núcleos es teniendo un sistema como el utilizado en nuestro trabajo pero que contara con una mayor capacidad de memoria virtual (memoria RAM) y una mayor velocidad para el desarrollo de operaciones, como es el caso de las estaciones de trabajo. Contando con este material se podrían hacer comparaciones de varios núcleos girándolos hasta encontrar el punto en el que más coinciden y a partir de ésto hacer comparaciones de acúmulos individuales de cromatina tomando en cuenta también la posición con respecto al núcleo entero.

Por otra parte también se podrían combinar los métodos utilizados en este trabajo con métodos como la inmunolocalización que han sido extensamente empleados para los mismos fines. Así se podría plantear el estudio de la disposición de las regiones centroméricas en un tipo celular en el que ya se individualizaron cúmulos de cromatina tal y como se realizó en el presente trabajo, relacionando de esta forma cúmulos directamente con cromosomas haciendo la reconstrucción tridimensional de ambos elementos (cromatina y centrómeros). Un estudio aún más fino se podría realizar llevando a cabo la reconstrucción 3D de la cromatina en conjunto con la marcas obtenidas con hibridación *in situ* para la localización de regiones específicas de algun(os) cromosoma(s) e incluso seguirlos a través del ciclo celular.

## CAPITULO VI

### C O N C L U S I O N E S

La utilización de métodos computarizados en conjunto con las técnicas de procesamiento digital de imágenes permiten obtener resultados con significancia biológica y corroboran los resultados obtenidos utilizando otras técnicas de estudio como la inmunocitoquímica, además de ser mucho más rápidos y exactos que los métodos manuales de reconstrucción tridimensional.

El sistema de procesamiento y análisis tridimensional desarrollado en el CIUNAM demostró ser una herramienta de gran valor para el estudio de la arquitectura de los núcleos interfásicos y permitió manejar una gran cantidad de datos analizando la cromatina compacta en su totalidad y no de manera parcial como se había hecho con anterioridad.

La cromatina compacta de los núcleos interfásicos de los linfocitos estudiados muestra evidencias que sugieren que su disposición no es al azar ya que presenta características que la asemejan en todos los núcleos y se comprobó que tiene la misma forma en general.



Figura 3.1 Equipo utilizado en el laboratorio de PDI del CIUNAM para la adquisición y procesamiento de imágenes.

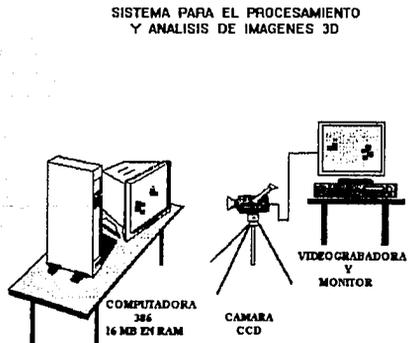
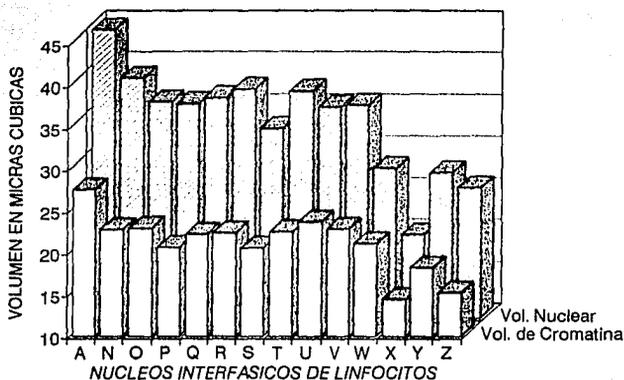


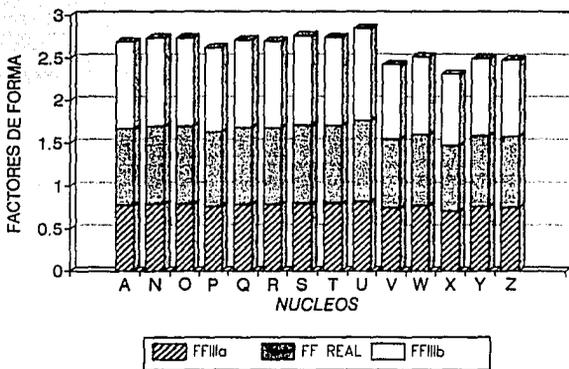
Fig. 3.3 Equipo utilizado para el procesamiento y análisis de imágenes 3D.

## VOLUMEN DE NUCLEOS Y CROMATINA



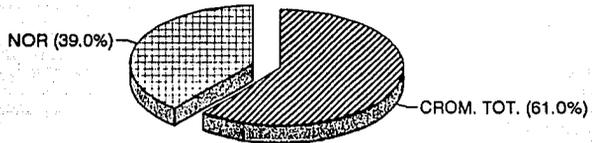
Gráfica 1: Comparación entre el volumen nuclear y el volumen total de cromatina compacta para cada núcleo estudiado.

## FACTOR DE FORMA CROMATINA COMPACTA



Gráfica 2: Factor de forma de la cromatina compacta total de cada núcleo. Este parámetro es una estimación de la relación superficie-volumen.

## CROMATINA PERINUCLEOLAR Y CROMATINA TOTAL



**Gráfica 3:** Comparación entre el porcentaje promedio de volumen ocupado por el cúmulo de cromatina perinucleolar en relación con el porcentaje ocupado por el resto de los cúmulos de cromatina en todos los núcleos estudiados.

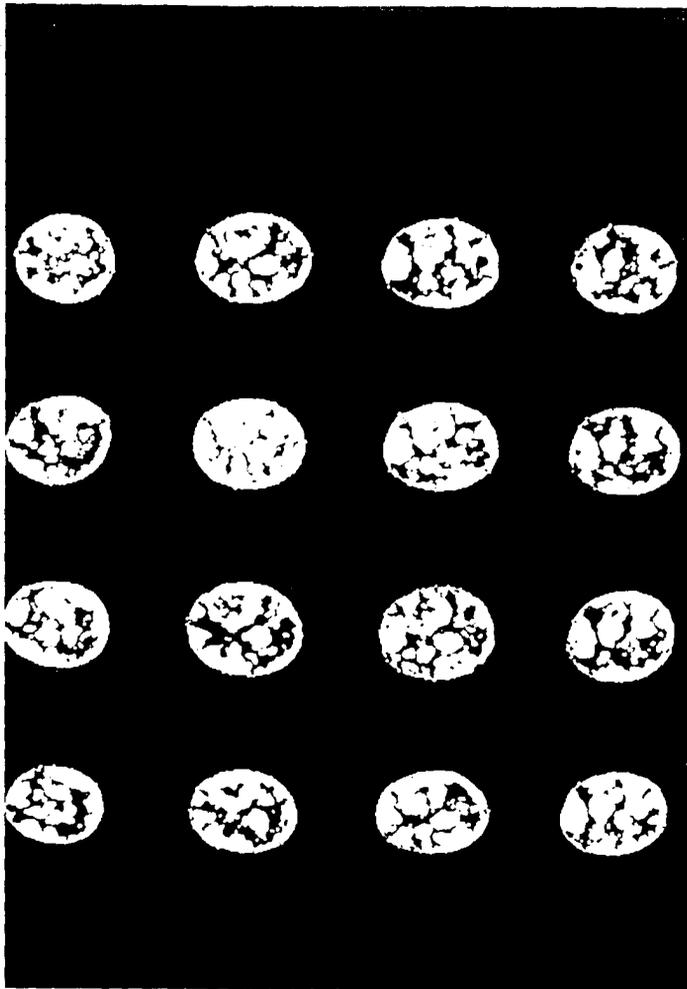


Fig. 3.2 : Imágenes procesadas a una resolución de 128 x 120 píxeles, en secuencia de 16 cortes

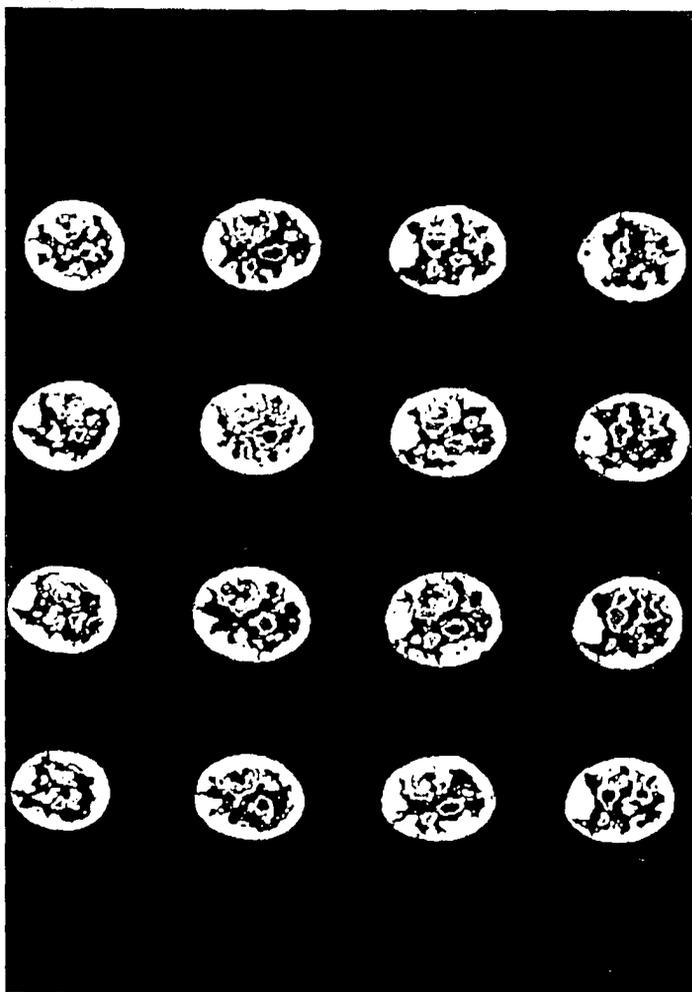


Fig. 3.4 : Secuencia de 16 cortes después del proceso de erosión y etiquetado de cuerpos.



Fig. 3.5: Grupos de cromatina individualizados mediante etiquetado de cuerpos conexos..

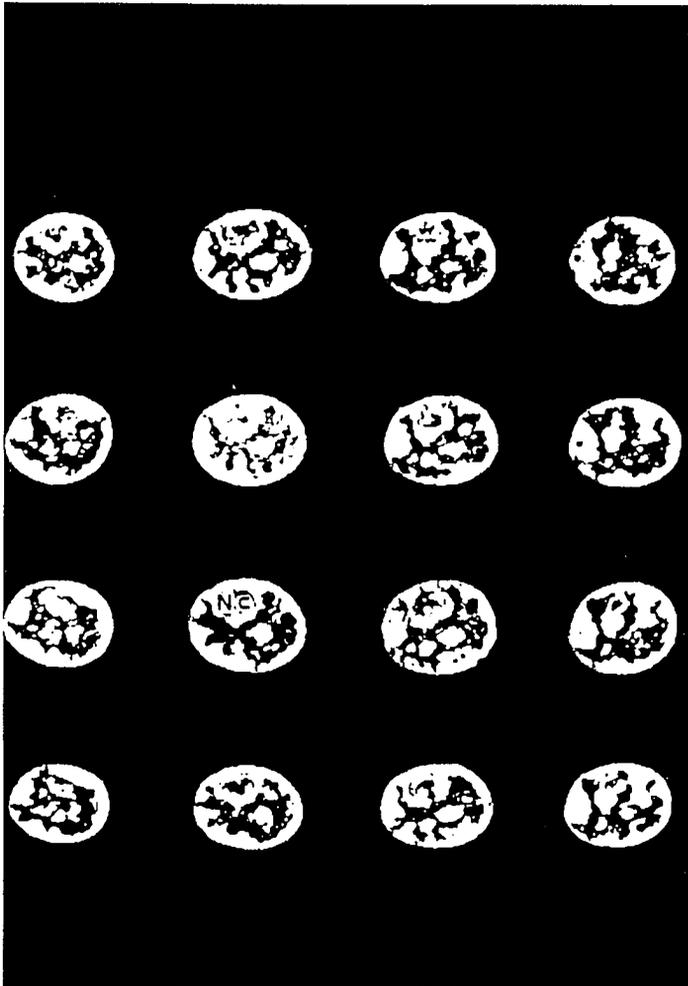


Fig. 4.1: Serie de 16 cortes en imágenes binarias después del filtrado de ruido de fondo. Se puede observar como la cromatina se dispone hacia la periferia del núcleo y rodeando al nucleolo (NC).



## BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. and D., Watson. 1983, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, New York, E.U. pp. 149-655.
- Appels, R.; Driscoll, C. and W. Peacock. 1978. Heterochromatin and Highly Repeated Sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 70:67-89.
- Asimov, I. 1985, Introducción a la Ciencia. II. Ciencias Biológicas segunda edición, Ed. Orbis, México 837 pp.
- Avers, Ch. J. 1987. Biología Celular, segunda edición, ed. Iberoamérica, México, 532 pp.
- Avivi, A., and M., Feldman. 1980. Arrangement of Chromosomes in the Interphase Nucleus. *Hum. Genet.* 55:281-295.
- Ayala, J.F. y A.J. Kiger. 1984. Genética Moderna, OMEGA S.A., España, pp. 9.
- Bennet, M.D. 1982. Nucleotypic basis of spatial ordering of chromosomes in eukariotes and implications of the order for genoma evolution and fenotypic variation. In: *Genoma Evolution*, Douer, G.A. and R.B. Flavell (Eds.), Academic Press, EUA, pp. 239-261.
- Bennet, M.D. 1984. Nuclear Architecture and its manipulation. From: *Gene manipulation in Plant Improvement*, Ed. Gustafson Plants, Publishing Corp. pp 469-502
- Bourgeois, C. A., Laquierre, F., Hemon, D., Hubert, H., y M. Bouteille. 1985. New Data on the *situ* position of inactive X Chromosome in the Interfase Nucleus. *A.J. Genet.* 69:122-129.
- Bozzola, J. and D. Russell. 1992. Electron Microscopy. Jones and Bartlett Publishers, E.U.A., pp. 2-11.
- Brachet, J. and S., Osawa. 1961. The Cell, Tomo II, In: Brachet, J. and E., Mirsky (ed.). *The Interphase Nucleus*. Academic Press. E.U.A. pp. 677-761.
- Brasch, K. and G., Setterfield. 1974. Structural Organization of Chromosomes in Interphase Nuclei. *Exp. Cell Res.* 83:175-185.
- Comings, D.E. 1968. The Rationale for an Ordered Arrangement of Chromatin in the Interphase Nucleus, *Amer. J. Genet.* 20:440-460.
- Comings, D. E. 1972. The Structure and Function of Chromatin. *Adv. Hum. Genet.* V.3, pp 237-431.

- Cronquist, A. 1986. Introducción a la Botánica, segunda edición, ed. Continental, México, pp. 34-80.
- De Boni, U. and Mintz, H.A. 1986. Curvilinear, Three-Dimensional Motion of Chromatin Domain and Nucleoli in Neuronal Interphase Nuclei. *Science* 234:863-866.
- De Robertis, E.D.P. y E.M.F. De Robertis. 1986, Biología Celular y Molecular, ed. El Ateneo, México, pp. 1-23; 62-87; 308-360.
- Esquivel, C.; Rovira, P.; Echeverría, O. and G.H. Vázquez Nin. 1987. A simple Staining Method for Chromatin Compatible with Serial Sectioning. *Ultramicroscopy*. 21:103-110.
- Esquivel, C. 1988. Estudio de la Disposición de la Cromatina en núcleos interfásicos de Hepatocitos. Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias, UNAM.
- Esquivel, C.; Vázquez Nin, G.H. and O. Echeverría. 1989. Evidence of Repetitive Patterns of Chromatin Distribution in Cell Nuclei of Rat Liver. *Acta Anatomica*. 136:94-98.
- Evans, K.J. and W.G. Filion. 1982. The Distribution of Chromatin in the Interphase Nucleus of *Zebryna pendula*. *Can. J. Gen Cytol.* 24:583-591.
- Fakan S. and E. Puvion. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65, 255-300.
- Fasman, D.G. and M.K., Cowman. 1978. The Cell Nucleus: Chromatin Part B, In: Bush H. (Ed.), Interpretation of Chromatin Structure by Circular Dichroism Analysis, Academic Press, E.U.A., pp. 56-93.
- Felsenfeld, G. 1978. Chromatin. *Nature* 271:115
- Figueroa R.H. 1989. Un Sistema en Procesamiento Digital de Imágenes y Reconocimiento de Patrones, Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias, UNAM. 172 pp.
- Foley, J., van Dam, A., Steven, F., and J. Hughes, 1990. COMPUTER GRAPHICS: Principles and Practice, second edition, Addison-Wesley Publishing, E.U.A., 1174 pp.
- Gaviño, D.L.T., Juárez, L. y T., Figueroa. 1975, Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo, ed. LIMUSA, México, pp.49.
- Geraud, G., Soyer, A. and Epelboin, Y., 1988. Three-dimensional computer reconstructions from serial sections of cell nuclei. *Biol. Cell.* 62, 111-117.

- González, R. and P., Wintz, 1987. Digital Image Processing, 2nd edition, Addison-Wesley pub., Mass. E.U.A., pp 140-201.
- Green, N. 1982, The Nuclear Pore. A Biological grommet?, Nature 297, pp. 287.
- Hadlaczky, G.Y., Went, M., and N.R., Ringertz. 1986. Direct Evidence for the Non Random Localization of Mammalian Chromosomes in the Interphase Nucleus. Exp. Cell. Res. 167:1-15.
- Hochstrasser, M.; Mathog, D.; Gruenbaum, Y.; Saumweber, H. and J.W. Sedat. 1986. Spatial Organization of Chromosomes in the Salivary Gland Nuclei of *Drosophila melanogaster*. J. Cell Biol. 102:112-123.
- Lavala U.C. and A.K., Sharma. 1985. Arrangement of the Interphase Chromosomes in the Nucleus. The Journal of Heredity 76:395-396.
- Lehninger, L.A. 1970. Biochemistry. Worth Publishers. E.U.A., pp. 629-768.
- Margulis, L. y V. Schwartz. 1985. CINCO REINOS: Una guía ilustrada de los phyla de la vida en la tierra. Ed. Labor, México, pp. 2-17.
- Márquez, F.J.; Corkidi, B.G.; Ubaldo, E. y G., Vázquez Nin. 1991. Reconstrucción Tridimensional de Secuencias de Cortes de Cromatina en Núcleos Interfásicos. Memorias del IV Simposio Interno de Instrumentación del CIUNAM, pp. 50-54.
- Márquez, F.J. Sistema para el Procesamiento, Análisis y Despliegue de Imágenes 3D. Tesis de Maestría. Fac. de Ingeniería, UNAM. en preparación.
- Mirzabekov, A. 1981. Nucleosome Structure. TIBS 6:240
- Murray, A.B. and H.G., Davies. 1979. Three-Dimensional Reconstruction of the Chromatin Bodies in the Nuclei of Mature Erythrocytes from the Newt *Triturus cristatus*: The Number of Nuclear Envelope-Attachment Sites. J. Cell Sci. 35:59-66.
- Monneron A. and W. Bernhard. 1969. Fine Structural Organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res. 27, 266-288.
- Nason, A. 1985. Biología. ed. LIMUSA, México, pp. 49-79.
- Newport, J. and Forbes. 1987, The Nucleus: Structure, Function and Dynamics. Ann. Rev. Biochem. 56, pp. 535.
- Paulson, J.R. 1982. Isolation of Chromosomes clusters from metaphase arrested HeLa cells. Chromosoma (Berl.)85: 571-581.

- Peachey, L.D. 1958, Thin Sections. I. A Study of Section Thickness and Physical Distortion Produced during Microtomy, J. Biophysic. and Biochem. Cytol. Vol. 4, No. 3, pp. 233-242.
- Ris, H. 1969. Handbook of Molecular Cytology. In: Neuberger A. and E.L., Tatum (Eds.) The Molecular Organization of Chromosomes, North-Holland Publishing Company, Netherlands, pp. 221-250.
- Russ, J., 1990. Computer-Assisted Microscopy; The Measurement and Analysis of Images, Plenum Press, N.Y. E.U.A., pp 377-408, 439-450.
- Schertham, H., Arnason U., and A., Lima de Faria. 1987. The Chromosome field theory tested in muntjac species by DNA cloning and hybridization. Hereditas 107: 175-184.
- Stack, S.M., Brown, D.B. and W.C. Dewey. 1977. Visualization of Interphase Chromosomes, J. Cell Sci. 26:281-299.
- Usisima, B., 1992. Analisis Morfométrico del Endotelio Corneal Humano por Procesamiento Digital de Imágenes, tesis de licenciatura, UNAM, Fac. de Ingeniería, México, pp 15-19.
- Vázquez Nin, G.H.; Chávez, B. and C., Tomás Martín. 1973. A Preferential Staining Method for Chromatin in Electron Microscopy. J. Microscopie 16:243-246.
- Wachtler, F., Hopman, A., Wiegant, J. and H.G., Schwarzacher. 1986. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in the interphase nuclei. Exp. Cell Res. 43: 436-447.
- Wahl F.M. 1987. Digital Image Signal Processing, Springer Verlag, E.U.A., 183pp.
- Weimer, R.; Haaf, T.; Krüger, J.; Poot, M. and M., Schmid. 1992. Characterization of Centromere Arrangements and Test for Random Distribution in G0, G1, S, G2, G1, and Early S' phase in Human Lymphocytes. Hum. Genet 88:673-682.