



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis Tridimensional de los
Gránulos de *Lacandonia* en Núcleo
Celular de *Ginkgo biloba*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

CARLOS GAONA LÓPEZ

TUTOR:

Dr. LUÍS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Análisis Tridimensional de los Gránulos de Lacandonia en Núcleo Celular de *Ginkgo biloba*"

realizado por **Gaona López Carlos**, con número de cuenta **097201294** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario M. en C. Jaime Jiménez Ramírez

Tutor(a)
Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Suplente Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 5 de noviembre del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Xavier y Clemencia; y a mis hermanos Xavier y Anabel y en general a todos los miembros de mi familia, por haberme apoyado

Agradezco al proyecto DGAPA-UNAM IN-206307 por haber financiado este proyecto de investigación.

Quiero expresar mi agradecimiento:

A mi director de Tesis, Dr. Luís Felipe Jiménez García por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo, en el laboratorio de Microscopia Electrónica.

A la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno quien me asesoró en la realización de todo el trabajo, y me enseñó todo lo que sé de microscopia electrónica.

A la M. en C. Ernestina Ubaldo que me asesoró en la obtención de mis cortes ultrafinos contrastados por la técnica de EDTA.

A mis amigos del laboratorio Reyna, Sarahí.

A mis amigos de la Facultad Ana Laura, Guillermo, Iris, Emmanuel, Paco, Alberto, Daniela, Hugo, Celia.

Índice
Resumen
Introducción
Núcleo Celular Interfasico
Nucléolo
Cromatina
Cuerpos Nucleares y Partículas Ribonucleoproteicas (no nucleolares)
Fibras Pericromatinianas
Gránulos Pericromatinianos
Gránulos intercromatinianos
Cuerpos de Cajal
Polipartículas
Gránulos de *Lacandonia*
Ginkgo biloba
Diagnosia
Clasificación
Núcleo Interfasico de *Ginkgo biloba*
Objetivos
Objetivo General
Objetivo Particular
Metodología
Obtención de las muestras
Procesamiento de las muestras
Preparación de las muestras para su observación
Resultados
Discusión
Conclusiones
Referencias

Índice

1.1	Resumen.....	1
1.2	Introducción.....	2
1.2.1	Núcleo Celular Interfásico	2
1.2.2	El Nucléolo	3
1.2.3	Cromatina.....	5
1.2.4	Cuerpos Nucleares y Partículas Ribonucleoproteicas (no nucleolares).....	7
1.2.4.1	Fibras Pericromatinianas (FC)	8
1.2.4.2	Gránulos Pericromatinianos (GPC).....	9
1.2.4.3	Gránulos Intercromatinianos (GIC), speckles.....	11
1.2.4.4	Cuerpos de Cajal (CB).....	12
1.2.4.5	Polipartículas.....	14
1.2.4.6	Gránulos de <i>Lacandonia</i>	14
1.2.5	<i>Ginkgo biloba</i>	17
1.2.5.1	Diagnosís	17
1.2.5.2	Clasificación	19
1.2.5.3	Núcleo Interfásico de <i>Ginkgo biloba</i>	20
1.3	Objetivos	21
1.3.1	Objetivos Generales.....	21
1.3.2	Objetivos Particulares	21
1.4	Metodología.....	22
1.4.1	Obtención de las Muestras.....	22
1.4.2	Procesamiento de las Muestras	22
1.4.3	Preparación de las Muestras para su Observación.....	23
1.5	Resultados	27
1.6	Discusión.....	37
1.7	Conclusión.....	38
1.8	Referencias	39

1.1 Resumen

El núcleo es el organelo más conspicuo dentro de cualquier célula eucarionte y es una estructura altamente compartimentalizada. Dentro del núcleo se pueden delimitar claramente varias zonas o dominios, cada uno de los cuales cumple con una función citofisiológica específica. Por ejemplo, en el nucleoplasma los cromosomas están ordenados dentro de lo que se conoce como el “territorio de los cromosomas”, en donde los genes activos se encuentran ubicados en la periferia de los manchones de heterocromatina. Otro dominio claramente visto es el nucléolo, cuya principal función, aunque no la única, es la formación de las distintas subunidades ribosómicas; dentro del núcleo se encuentran también varias partículas ribonucleoproteicas (RNPs). Entre ellas están; las fibras pericromatinianas, los gránulos intercromatinianos, los gránulos pericromatinianos y otras más como los cuerpos de Cajal, las polipartículas y los gránulos de *Lacandonia*.

Los gránulos de *Lacandonia* se presentan en el núcleo de las plantas *Lacandonia schismatica*, *Triuris brevistylis* y *Ginkgo biloba*. Contienen proteínas SR y RNA poliadenilado, tienen un diámetro aproximado de 32 nm y se encuentran en un ambiente fibroso. El objetivo de este trabajo es conocer la relación entre las fibras y los gránulos de *Lacandonia*.

Para el presente estudio se tomaron muestras de las yemas axilares de *Ginkgo biloba* y se procesaron de la siguiente manera; se cortaron fragmentos pequeños de las yemas y se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (pH. 7.2). Posteriormente la mayor parte de las muestras fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% hasta el día siguiente; luego ambos tipos de muestras fueron deshidratadas gradualmente en una serie de gradientes de etanol y se incluyeron en resina epóxica. Posteriormente se obtuvieron cortes de 60 o 70 nm de espesor y se usaron dos técnicas de contraste; para las muestras que no fueron postfijadas se usó la técnica de Bernhard para RNPs; mientras que para las muestras con tetraóxido de osmio se usó la técnica convencional para Microscopía Electrónica de Transmisión de acetato de uranio y citrato de plomo, de ambas muestras se obtuvieron micrografías que fueron analizadas.

Los resultados indican que los gránulos de *Lacandonia* se conectan con las fibras circundantes formando una compleja red de fibras y gránulos. De hecho, los gránulos parecen formarse del enrollamiento de las fibras, a la vez se aprecian distintos estadios en la maduración de los gránulos, teniendo su origen en el interior de los racimos de gránulos, y ubicando a las partículas maduras al borde de dichos racimos o inclusive libres sin estar asociadas a fibras o demás gránulos.

1.1 Introducción

1.1.1 Núcleo Celular Interfásico

Las células eucariontes, por definición y en contra parte de las células procariontes, tienen un núcleo (Eu = verdadero y caryon = núcleo). El núcleo almacena la mayor parte del DNA de la célula, el cual está encerrado por una doble membrana. Se puede decir que el núcleo almacena el patrimonio genético de la célula. Su envoltura lo protege en contra del estrés ambiental, asegurando su reparación, así como su duplicación y transcripción, pero la membrana no es continua a lo largo del núcleo, sino que es interrumpida en lo que se conoce como poros nucleares (complejos macromoleculares), los cuales regulan la entrada y salida de sustancias entre el citoplasma y el nucleoplasma. La membrana externa del núcleo es continua con el retículo endoplásmico rugoso y en ocasiones, al igual que este, tiene adheridos ribosomas; la membrana interna contiene proteínas específicas que la unen a la lámina nuclear la cual le da soporte a todo el núcleo. Al espacio que hay entre la membrana interna y externa del núcleo se le llama espacio perinuclear el cual es contiguo con el lumen del retículo endoplásmico (Ver: Spector, D. L., 1993; Dundr, M., Misteli T., 2001; Alberts, B., *et al.*, 2002).

En contraste a los compartimentos que existen en el citoplasma, en el núcleo interfásico, las membranas no delimitan los compartimentos nucleares, a los cuales se les conoce mejor con el nombre de dominios. No obstante, tras décadas de estudios minuciosos, algunos dominios nucleares han sido morfológicamente y algunos incluso han sido funcionalmente caracterizados (Ver: Spector, D. L., 2001; Dundr, M., Misteli T., 2001).

El mejor ejemplo de esto es el nucléolo, el cual es el responsable de la síntesis del rRNA así como del ensamble de las subunidades ribosómicas. Dicha

relación entre la estructura del nucléolo y su función ha sido relativamente bien estudiada y comprendida. Existen otros dominios dentro del núcleo algunos de los cuales han sido morfológicamente caracterizados, pero sus funciones son parcialmente comprendidas y en algunos otros casos su función es todavía desconocida. Entre estos están una variedad de cuerpos nucleares, que son caracterizados por la presencia de proteínas específicas, pero su papel en la función nuclear permanece todavía sin descubrirse (Ver: Spector, D. L. 2001; Alberts, B., *et al.* 2002).

1.1.2 El Nucléolo

El dominio nuclear más claro y prominente a observar dentro de cualquier célula eucarionte, es el nucléolo, el cual observado a través del Microscopio Electrónico de Transmisión muestra tres diferentes regiones, las cuales reflejan el proceso vectorial de biogénesis de los ribosomas: la primera región comprende unas estructuras pequeñas y ligeramente contrastadas llamadas, **centros fibrilares** (FC); las cuales a su vez están rodeadas por áreas de material densamente contrastado llamado, **componente fibrilar denso** (DFC); el cual esta a su vez cubierto por una región que contiene muchas partículas, llamada el **componente granular** (GC). En el nucléolo de una planta típica; el DFC no esta tan densamente contrastado como su contraparte animal, además, de que en plantas ocupa una mayor fracción del volumen del nucléolo (superior al 70%). En algunas plantas el nucléolo muestra una región prominente ubicada en el centro, llamada cavidad nucleolar, además también presenta lo que se conoce como la cromatina nucleolar condensada. El nucléolo en plantas en general es muy regular en su organización, siendo normalmente casi esférico (Ver: Spector, D. L., 1993; Dunder, M., Misteli T., 2001; Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004).

El centro fibrilar contiene rDNA, RNA polimerasa I, y factores asociados a la transcripción; la transcripción del rDNA ocurre en los **FCs**, principalmente en la

periferia de dichas estructuras y el pre-rRNA transcrito es modificado en el **DFC** en un proceso cotranscripcional. El rRNA transcrito es procesado en el **DFC** por medio de la adición de aproximadamente 115 2'-O-metil ribosas y la conversión de 95 uridinas en pseudouridinas, aunque algunos pasos del procesamiento también pueden ocurrir en el **GC**, junto con el ensamble del rRNA dentro de las subunidades ribosómicas, de hecho las partículas que conforman el CG son partículas pre-ribosómicas en diferentes etapas de maduración así como de las tres distintas subunidades grandes y pequeñas que conforman los ribosomas eucariontes (Ver: Spector, D. L., 1993; Lamond I. A., Earnshaw C. W., 1998; Alberts, B., *et al.* 2002).

En pocas palabras la principal función del nucléolo es la transcripción y procesamiento del rRNA y el ensamble de las subunidades ribosómicas 28S, 18S, y 5.8S características de las células eucariontes. La formación del nucléolo es dependiente de la transcripción así como del ciclo celular; en la mayoría de las células eucariontes el nucléolo entero se disgrega durante la mitosis y vuelve a formarse en la telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), ya que el nucléolo es una estructura dinámica que se forma en respuesta a los requerimientos para la síntesis de nuevos ribosomas (Ver: Lamond A. I., Earnshaw, W. C., 1998; Agredano-Moreno, L. T., 1991).

El nucléolo es altamente dinámico. Hay un enorme flujo de proteínas y complejos de RNA dentro y fuera del nucléolo, y la estructura nucleolar interna es en si misma dinámica. Un aspecto particularmente intrigante dentro de la dinámica nucleolar de las plantas, es cuando la cavidad nucleolar vacía su contenido dentro del nucléoplasma, ya que no se sabe bien que acumula en dicha cavidad. Sin embargo se piensa que la cavidad nucleolar podría contener complejos de RNPs, aunque se han detectado RNAs pequeños nucleares (snRNAs, small nuclear RNAs) así como RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs, small nucleolar RNAs) (Ver: Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004).

1.1.3 Cromatina

La cromatina es un complejo desoxiribonucleoproteico, formado de DNA y proteínas; estas últimas a su vez se dividen en dos tipos: histonas y proteínas no histónicas. Existen cinco tipos de histonas con base en la abundancia de dos aminoácidos en particular, lisina y arginina. A las histonas con alto contenido de lisina se les denomina H1; las histonas con poca lisina H2A; las histonas moderadamente ricas en lisina H2B; y las histonas ricas en arginina H3 y H4. Estas proteínas tienen la peculiaridad de ser las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución entre los seres vivos (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002).

La cromatina de las células eucariontes se divide en dos grandes grupos, heterocromatina y eucromatina, esta clasificación esta basada en el estado de condensación de la misma, durante la interfase (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004).

La heterocromatina es el tipo de cromatina más condensada en el núcleo interfásico y es por lo tanto transcripcionalmente inactiva. Estando normalmente localizada formando bandas alrededor de la periferia del núcleo y rodeando al nucléolo, además, se encuentra formando parches a lo largo del nucleoplasma. La heterocromatina o cromatina compacta a su vez es dividida en constitutiva y facultativa (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004).

La heterocromatina constitutiva es rica en secuencias altamente repetidas (por ejemplo secuencias de DNA satélite) las cuales están ordenadas en tandem y en mamíferos llegan a representar hasta el 10 % del total del genoma. La función de este tipo de cromatina en la célula en interfase es aun desconocida, incluye a los telómeros y centrómeros del cromosoma que no expresan su DNA. (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

La heterocromatina facultativa consiste en cromatina potencialmente activa; es decir contiene regiones del cromosoma que pueden estar activas, en estado laxo, en algunos tipos celulares; e inactivas, compactadas en otros tipos celulares, dentro del mismo organismo, a diferencia de la heterocromatina constitutiva cuyas regiones están siempre compactadas en todas las células del organismo. La heterocromatina facultativa contiene información sobre todos aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento. Teniendo como principal ejemplo en las hembras de los mamíferos al corpúsculo de Barr, el cual resulta de la inactivación total y azarosa de uno de los dos cromosomas X. (Ver: Spector, D. L., 1993; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

La cantidad de heterocromatina presente en el núcleo varía de acuerdo a que tan activa sea la célula transcripcionalmente hablando; por ejemplo, poca heterocromatina está presente en células cancerígenas las cuales son transcripcionalmente activas, mientras que el núcleo de células inactivas; por ejemplo un espermatozoide, esta prácticamente lleno de cromatina condensada (Ver: Spector, D. L., 1993; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

El otro tipo de cromatina, la eucromatina o cromatina laxa, se encuentra distribuida formando asas en la periferia de los cúmulos de heterocromatina, dichas asas se prolongan dentro del núcleoplasma, hacia el espacio intercromatiniano. Con esta disposición hace que la región que rodea a los cúmulos de heterocromatina sea donde radica la transcripción más activa, de acuerdo a los experimentos realizados por Fakan y Bernhard, en 1971, mediante autorradiografía ultraestructural, después de un marcado con uridina tritiada, se demostró que la síntesis de RNA se realiza en la cromatina laxa. Además, de que aquí se encuentran algunas partículas ribonucleoproteicas, las cuales están asociadas directamente con la transcripción, y procesamientos post-transcripcionales. Aproximadamente el 10 % de la cromatina que es transcripcionalmente activa está siempre en su forma laxa, eucromatina,

comprendiendo aquellos genes que la célula necesita transcribir activamente, los llamados genes de mantenimiento (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Spector, D. L., 1993).

En plantas, la heterocromatina puede distribuirse en dos formas diferentes, la cromocéntrica y la reticulada. La cromocéntrica es la más frecuente en las dicotiledóneas, mientras que la reticulada es característica de las monocotiledóneas, criptógamas (entre ellas *Ginkgo biloba*), briofitas y algas clorofitas (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Echeverría, O. *et al.*, 1999).

1.1.1 Cuerpos Nucleares y Partículas Ribonucleoproteicas (no nucleolares)

El núcleo de las células eucariontes es un compartimiento celular en el cual se lleva a cabo un número de procesos biológicos, tal como la replicación y reparación del DNA, la expresión génica a través de la transcripción y el splicing, así como la modificación y degradación de algunas proteínas. Sin embargo, la variedad de materiales biológicos dentro del núcleo no está distribuido aleatoriamente. Por ejemplo, en la interfase cada cromosoma ocupa un territorio distinto y particular, sugiriendo que dicha organización juega un papel regulatorio en la expresión génica de los cromosomas. Además, existen regiones bien definidas como el nucléolo, y diferentes tipos de cuerpos nucleares identificados a través del uso de herramientas citológicas e inmunohistoquímicas (Ver: Fakan, S. 2004; Hozák, P., Fakan S., 2006).

El rango de tamaño de dichos cuerpos nucleares va desde la décima parte de un micrómetro hasta varios micrómetros; y cada tipo puede ser fácilmente identificado inmunológicamente con anticuerpos contra proteínas características y específicas de cada cuerpo nuclear; u otros factores como los RNAs pequeños nucleares, (snRNAs) (Ver: Spector, D. L. 1990).

En el presente trabajo únicamente se analizará un tipo de partículas nucleares, llamadas **Gránulos de Lacandonia** y que al igual que otras estructuras constituyen partículas ribonucleoproteicas. En general éstas y otras estructuras fueron caracterizadas cuando la citoquímica ultraestructural permitió la localización de los complejos de RNA y proteínas de tamaño menor a la décima parte de un micrómetro. El uso de un procedimiento preferencial para la tinción de ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), hidrólisis enzimáticas y extracciones químicas, permitió la clara demostración de la naturaleza ribonucleoproteica de varios componentes nucleares externos al nucléolo (Monneron y Bernhard, 1969). Entre ellas están: las fibras pericromatinianas, los gránulos

pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados. Posteriormente se encontraron otras estructuras nucleares que probablemente también contengan RNA, los cuerpos nucleares, y se identificaron las polipartículas, que son componentes RNP no nucleolares previamente descritos por procedimientos bioquímicos (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

1.1.1.1 Fibras Pericromatinianas (FC)

Estas fibras fueron descritas por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969 con la técnica de tinción preferencial de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; $C_{10}H_{16}N_2O_8$) para ribonucleoproteínas. Se encuentran ubicadas en los bordes de los distintos grumos de cromatina compacta, región llamada pericromatiniana, de ahí su nombre. En 1989 Jiménez-García y colaboradores demuestran su presencia universal en animales, plantas y hongos. Tienen un diámetro de 3 a 5 nm y pueden prolongarse hasta el espacio intercromatiniano y suelen estar en ocasiones entremezcladas con los gránulos pericromatinianos (en: Jiménez, G. *et al.*, 2003; Agredano-Moreno, L. T. 1991; Monneron, A., Bernhard, W. 1969).

Dichas fibras pericromatinianas no son estructuras rígidas, por el contrario se les ha visto por medio de estudios bioquímicos y autorradiografía migrar hacia el espacio intercromatiniano, en dicho proceso el RNA que las constituye sufre un proceso de maduración. Se encuentran muchas veces asociadas con los gránulos pericromatinianos. (en: Falcón, B., T. 2006; Jiménez, G. *et al.*, 2003).

Experimentos hechos por Fakan y colaboradores en 1975, demostraron que incorporan uridina tritiada inmediatamente, por lo cual las asociaron con los transcritos nacientes de hnRNA (RNA heterogéneo nuclear), además, de su idónea ubicación, cerca de la cromatina laxa o transcripcionalmente activa. Por lo que la cantidad de fibras pericromatinianas dentro del núcleo es un reflejo de la tasa de síntesis de pre-mRNA, como lo demuestran experimentos hechos por Fakan y Bernhard, en los cuales, se trabajó con hepatocitos de ratas a las

cuales se les había extirpado la glándula adrenal, y dividido en dos grupos; al primero se le inyectó cortisol con lo que al analizar los núcleos de dichas células se encontró que la cantidad de FC variaba enormemente en comparación con el segundo grupo, al que no le habían administrado cortisol; con esto dedujeron que ahí se encontraba la RNA polimerasa II (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

1.1.1.2 Gránulos Pericromatinianos (GPC)

Los gránulos pericromatinianos son estructuras ribonucleoproteicas, puesto que son EDTA positivas, descritas por vez primera por Watson en 1962, son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro, procedentes del enrollamiento de las FPCs y rodeados por un halo claro de 25 nm que los hace fáciles de distinguir en las micrografías electrónicas; generalmente están ubicados en el borde de los grumos de cromatina compacta, pero también se les puede ver en la región intercromatiniana, aunque de una manera escasa. Hay evidencias de que los gránulos pericromatinianos almacenan y transportan mRNA, hacia el citoplasma para ser traducidos a proteínas; comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas hechas por Vázquez-Nin y colaboradores en 1978 han demostrado que los GPC son estructuras prácticamente idénticas a los gránulos de los anillos de Balbiani, por eso se dedujo que ambos gránulos cumplían la misma función (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Monneron, A., Bernhard, W. 1969).

Los experimentos que ayudaron a dilucidar el papel citofisiológico de los GPC fueron de dos tipos; el primero utiliza factores físicos o químicos que alteran el metabolismo del RNA y el segundo emplea hormonas en los organismos para inducir variaciones reversibles en el metabolismo del RNA (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

Una serie de experimentos hechos por el Doctor Vázquez-Nin y colaboradores en 1978 consistió en ovariectomizar ratas, a las cuales después, se les dividió en dos grupos, a uno de los cuales se les inyectaba estradiol de rápido metabolismo (hemisuccinato de 17β estradiol), el grupo de células al que se le había inyectado el estradiol, después, de 15 minutos presentaba una clarísima disminución de los GPCs en comparación con las células estudiadas de los ejemplares ovariectomizados sin administrarles posteriormente el estradiol, cabe destacar que tanto el volumen nucleolar, así como la frecuencia de otras partículas RNPs, relacionadas directamente con el metabolismo del RNA, no se vieron afectadas. Con estas observaciones se sugirió que la cantidad de GPCs esta regulada por la relación entre la síntesis de RNA y su salida al citoplasma, y permitieron formular la hipótesis de que el estradiol tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión genética, regulando la velocidad del pasaje de los mRNAs del núcleo al citoplasma (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

De igual manera posteriormente se compararon la densidad numérica de los GPCs y el marcado autorradiográfico del núcleo y del citoplasma de células epiteliales de la próstata ventral, en ratas normales y castradas, sin y con un tratamiento con hemisuccinato de testosterona, se encontró que la frecuencia de GPCs aumenta con la castración y disminuye media hora después de la administración de la hormona (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

1.1.1.3 Gránulos Intercromatinianos (GIC), speckles

La mayoría de los genes en las células eucariontes se encuentran segmentados, por lo que al ser transcritos por la RNA polimerasa II, se transcriben en lo que se conoce como pre-mRNA o hnRNA (RNA pre mensajero o RNA heterogéneo nuclear, respectivamente), dicho transcrito primario como había de esperarse es del mismo tamaño que el gen del que procede, para que dicho transcrito pueda

ser llevado al citoplasma y entonces traducido a su correspondiente polipéptido, por los ribosomas, tiene que ser procesado o madurado, en tres reacciones principales las cuales son: a) una metilación en el extremo 5', b) la poliadenilación en el extremo 3', c) el splicing, proceso en el cual se eliminan las secuencias no codificantes (intrones) y se unen las secuencias que se van a codificar para dar origen a un polipéptido. Para que se lleve a cabo el splicing se requieren varios factores entre ellos proteínas y varios tipos de RNA, la mayoría de dichos factores están albergados en los GICs (Ver: Cremer, T., 2004; Jiménez-García, L. F., *et al.*, 2007).

Los gránulos intercromatinianos son estructuras nucleares polimorfas y en ocasiones se les encuentra en forma continua con fibrillas, están organizadas generalmente en cúmulos, localizados en el espacio intercromatiniano de las células animales, tienen un diámetro promedio entre 20-25 nm; dichos gránulos están unidos entre si, por fibras, y fueron descritos por primera vez por Swift en 1963, con la técnica convencional para microscopía electrónica; posteriormente Bernhard con la técnica preferencial para RNPs comprueba la naturaleza ribonucleoproteica de dichos gránulos, los gránulos están compuestos de RNA de larga vida media como los UsnRNAs, los cuales están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los pre-mRNA y proteínas, por esta razón se propuso que los GICs son el almacén de la maquinaria de splicing (Ver: Mintz, P. J. *et al.*, 1999; Monneron, A., Bernhard, W. 1969; Spector, D. L. 1996).

Los gránulos intercromatinianos poseen la mayoría de los factores proteicos y diferentes tipos de RNA involucrados en el splicing. Entre los principales constituyentes de estos gránulos están 5 partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNPs), conocidas como U1, U2, U4, U5 y U6, las cuales son complejos nucleoplásmicos de RNA y proteínas que funcionan como unidades del spliceosoma. También, se encuentran más de 200 factores de splicing, entre ellos las proteínas de la familia SR, las cuales tienen unidos segmentos de RNA así como proteínas con regiones ricas en Serina y Arginina

de ahí su nombre; las cuales son necesarias para el reconocimiento de los intrones, y por lo tanto definen la región perteneciente a los exones, además, de ensamblar el spliceosoma. También hay evidencia de que son esenciales para el splicing alternativo. Los GICs “speckles” se dispersan cuando la célula entra en mitosis, pero las snRNPs y los factores proteicos del splicing se reagrupan en estructuras muy parecidas a las anteriores “speckles” durante la telofase, para luego ser importadas al núcleo de la célula hija (Ver: Lamond A. *et al.*, 1998; Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Mintz, P. J. *et al.*, 1999).

1.1.1.4 Cuerpos de Cajal (CB)

Basados estrictamente en un criterio morfológico, los estudios ultraestructurales han caracterizado varios tipos de cuerpos nucleares, uno de ellos son los cuerpos espiralados o cuerpos de Cajal, los cuales pueden ser claramente identificados en distintas especies de plantas y animales. Estas estructuras se observan al microscopio electrónico como bolas de fibras enredadas de 0.15 a 1.5 μm de diámetro (Matera, A. G., 1999; Lamond I. A., Earnshaw C. W., 1998).

Aunque su nombre deriva de estudios hechos en el microscopio electrónico, los cuerpos espiralados fueron originalmente identificados en el microscopio de luz a inicios del siglo XX, por Santiago Ramón y Cajal; quien los nombró como “cuerpos accesorios nucleolares”, su función en ese entonces no estaba muy clara, ya que su caracterización molecular comenzó a inicios de la década de 1990, y el número de componentes celulares reportado desde entonces ha ido creciendo (Matera A. G., 1999).

Los cuerpos de Cajal son encontrados dentro del núcleo, a través, de la filogenia de plantas y animales. En las plantas, están presentes en todas las especies y en todas las células de cada especie en los ejemplares hasta la fecha examinados. En algunos tipos celulares de mamíferos, se encuentran presentes los CBs, mientras que en otro tipo celular pueden estar ausentes. Los CBs son

asociados frecuentemente con el nucléolo, debido a que algunos componentes son comunes a ambas estructuras (Ver: Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004.).

Los CBs son estructuras EDTA positivas, y probablemente estén envueltas en el transporte y maduración de RNPs pequeños nucleares (snRNPs) (U1, U2, U3, U4, U5, U6) y RNP pequeños nucleolares (snoRNPs), así como en el almacenamiento de ambos, antes de aparecer en los GICs o el nucléolo, respectivamente. En particular, la modificación de nucleótidos dentro de los snRNAs del spliceosoma es regulada por pequeños RNAs específicos de los cuerpos espiralados (scaRNAs) (Ver: Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004.).

Los cuerpos de Cajal están altamente enriquecidos en varios tipos de snRNPs, proteínas nucleolares y proteínas que controlan el ciclo celular, además, de diversos factores de transcripción basal. Sin embargo, el único epítipo reportado a la fecha que puede ser usado como un marcador inequívoco para los CBs es una proteína llamada p80 coilina (Ver: Matera A. G., 1999).

Dichas partículas son continuas con las fibras pericromatinianas, y suelen estar cerca del nucléolo o de la envoltura nuclear pero, en la mayoría de los casos se encuentran en la región intercromatiniana, además, la abundancia de los cuerpos espiralados está asociada con un metabolismo alto de la célula (en: Agredano-Moreno, L. T. 1993).

1.1.1.5 Polipartículas

Las polipartículas son complejos ribonucleoproteicos, por lo tanto son EDTA positivas, y están formadas por partículas con un coeficiente de sedimentación de 30S de una unidad de mRNA repetida múltiples veces, para formar lo que en el microscopio electrónico parece una estructura semejante a cuentas ensartadas en un hilo. También son conocidas como informóferos, y tienen un tamaño aproximado de 25 nm la principal característica de estas estructuras es

que tienen tanto RNA mensajero como pre-mensajero, debido a que son de alto peso molecular y contienen una secuencia de poli-A en el extremo 3' y de marcado rápido. En un estudio de complejos transcripcionales se determinó que las moléculas de pre-mRNA aún unido a la matriz de DNA por RNA polimerasa, se unen a otras proteínas formando estructuras granulares de 20 a 35 nm, las cuales se encuentran relacionadas con las FCs y con los GIC, demostrando así la existencia de una migración de los factores de splicing hacia los lugares donde se activa la transcripción (Falcón, B. T., 2002).

1.1.1.6 Gránulos de *Lacandonia*

Los gránulos de *Lacandonia* son partículas ribonucleoproteicas abundantes, no nucleolares, que fueron encontradas y descritas por primera vez en el núcleo celular de la planta *Lacandonia schismatica*, son EDTA positivas, y se observan al microscopio electrónico, algunas veces formando cúmulos, cada gránulo tiene un diámetro aproximado de 32 nm; estudios posteriores hechos por Agredano-Moreno (1991) de hibridación ultraestructural in situ, corroboran la presencia de RNA en dichas partículas (en: Jiménez-García, L. F. *et al.* 1992).

Los gránulos de *Lacandonia* son intermedios en tamaño y distribución a los otros gránulos conocidos, GICs y GPCs, encontrados dentro del núcleo celular. Dichas partículas se creían características de la planta de la que se deriva su nombre, pero estudios posteriores localizaron dichas partículas en otra planta perteneciente al mismo orden (Triuridales), *Triuris brevistylis*, de hecho recientemente se ha incrementado el número de ejemplares en los cuales se han encontrado estas partículas, entre ellos *Ginkgo biloba* (en: Jiménez-Ramírez, J., *et al.* 2002), *Alloe vera* y en *Tulipa sp* (sin publicar aun)

Estas partículas han sido consideradas estructuras relacionadas a los gránulos pericromatinianos, y a los gránulos de los anillos de Balbiani, de acuerdo a sus características citoquímicas e inmunocitoquímicas. Además, al igual que los

GPCs, los gránulos de *Lacandonia* varían durante las diferentes etapas del desarrollo de la flor, al igual que se observa para los GPCs durante la diferenciación de las células animales (en: Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F. 2000).

Se ha encontrado más evidencia que corrobora la relación que hay entre estas tres estructuras; una de ellas es la presencia de proteínas SR (proteínas ricas en Serina y Arginina), en los gránulos de *Lacandonia* y los gránulos de los anillos de Balbiani, dichas proteínas están directamente relacionadas con el splicing y con el splicing alternativo, pero se ha propuesto la posibilidad de que estas mismas proteínas jueguen un papel importante en procesos de post-splicing, como son transporte dentro del núcleo, así como, su paso a través, del poro nuclear, cabe destacar que los GICs también contienen proteínas SR, de hecho es ahí donde cumplen un papel en el proceso de splicing, pero se ha descartado su relación, con los gránulos de *Lacandonia* ya que estos últimos no poseen snRNPs (en: Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F. 2000).

Otra evidencia que relaciona los gránulos de *Lacandonia* con los GPCs es la presencia de poli A (RNA poli A), que se asocia con el mRNA (RNA mensajero maduro), además, se evaluó si los gránulos de *Lacandonia* tienen un comportamiento similar a los GPCs, en los experimentos con ratas ovariectomizadas hechos por Vázquez-Nin; para verificar esto se analizó si variaba la cantidad de gránulos de *Lacandonia* durante el desarrollo de la flor, para esto se estudiaron células de la flor en pre y post-antesis, encontrándose que los gránulos son más abundantes en flores en pre-antesis que en post-antesis, esto se explica ya que distintos eventos como la polinización, fertilización y la formación de los órganos florales ocurre con el botón floral cerrado (pre-antesis), por lo que genes específicos a estos eventos deben ser transcritos, haciendo que varíe la cantidad de gránulos durante el desarrollo floral (en: Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, LF., 2000).

1.1.2 *Ginkgo biloba*

El árbol de Ginkgo actual es un organismo pancrónico, con fósiles claramente emparentados a él que datan del Pérmico, hace 270 millones de años. Se extendieron y diversificaron por toda Laurasia durante el Jurásico medio y el Cretácico para comenzar a escasear a partir de entonces. Se conserva desde tiempos muy remotos como árbol sagrado en los jardines de los templos chinos; los botánicos creían que esta práctica habría salvado a la especie de la extinción, pero en años recientes se han hallado Ginkgos silvestres en valles

aislados del oeste de China (Ver: Stewart, W. N., Rothwell, G. W., 1993; Futuyama, J. D., 1997).

Ginkgo biloba es un árbol dioico; esto significa que los conos masculinos y femeninos se forman en plantas distintas. Los masculinos producen el polen, que es arrastrado por el viento; los conos femeninos forman las semillas, rodeadas o envueltas por un tegumento carnoso maloliente; por ello, el árbol preferido como ornamental es el masculino (Ver: Stewart, W. N., Rothwell, G. W., 1993).

El Ginkgo se siembra con frecuencia en parques y jardines como ornamental. También se planta en las calles de algunas ciudades, donde crece a pesar de la contaminación, la falta de luz y otras condiciones adversas propias del medio urbano. Este uso generalizado ha llevado a la creación de algunas variedades cultivadas (Ver: Stewart, W. N., Rothwell, G. W. 1993).

1.1.2.1 *Diagnosis*

Árbol caducifolio de porte mediano, puede alcanzar 35 m de altura, con copa estrecha, algo piramidal y formada por uno o varios troncos. Sus ramas, generalmente rectas y empinadas, son gruesas y rígidas ya en los ejemplares jóvenes, aunque la ramificación en éstos suele ser laxa, e incluso pobre. La corteza es de color pardo grisácea o pardo oscura, con surcos y hendiduras muy marcadas.

Las hojas, de color verde claro y de entre 5-15 cm, son planas y en forma de abanico con nervadura dicotómica, las nacidas en los brotes largos suelen presentar muescas o lóbulos.

Este árbol es una gimnosperma, lo que significa que sus semillas no poseen cáscara protectora. Los sexos están separados, presentando los ejemplares

masculinos grupos de estróbilos amarillos, muy numerosos y que nacen en los brotes cortos. En los femeninos, los óvulos se encuentran en grupos de 2 ó 3, y producen una semilla blanda de color marrón amarillento y textura carnosa, tornándose al madurar verde grisáceas. Al abrirlas despiden un olor rancio ya que contienen ácido butírico.



Imágenes tomadas de la página de Internet del Missouri Botanical Garden

1.1.2.2 Clasificación

Reino: Plantae

División: Ginkgophyta

Clase: Ginkgoopsida

Orden: Ginkgoales

Familia: Ginkgoaceae

Género: *Ginkgo*

Especie: *G. biloba*



Imagen tomada de la página de Internet del Missouri Botanical Garden

1.1.2.3 Núcleo Interfásico de *Ginkgo biloba*

El núcleo celular de *Ginkgo biloba* presenta características comunes al resto de los núcleos en las demás células eucariontes; por ejemplo, dicho núcleo está delimitado por una doble membrana, la cual está interrumpida en ciertas regiones, formando los poros nucleares, a través, de los cuales se da el intercambio entre el núcleo y el citoplasma. Presenta un nucléolo característico con sus tres regiones, claramente definidas, en cuanto a la cromatina su distribución es del tipo reticulada (Jiménez-Ramírez, J., 2002; Alberts, B., *et al* 2002).

También presenta varias partículas ribonucleoproteicas; entre ellas las fibras pericromatinianas, las cuales se ha comprobado que se encuentran por igual en todos los seres vivos hasta ahora estudiados, otra partícula presente son los cuerpos de Cajal, además, de varias estructuras más; entre ellas los gránulos de *Lacandonia* que son partículas análogas a los gránulos pericromatinianos, reportados por primera vez en *Lacandonia schismatica* (Jiménez-García, L. F., 1992).

Dichas partículas se observan al microscopio electrónico de transmisión como cuerpos de aproximadamente 32 nm de diámetro, que suelen localizarse en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano; siendo estas partículas el tema de interés para el presente trabajo. De hecho, dichos gránulos abundan en esta especie, lo que nos permitió usar a *Ginkgo biloba* como modelo, para profundizar más en la biología de los gránulos de *Lacandonia*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Generales

Determinar si los gránulos de *Lacandonia* son parte de una compleja estructura fibrogranular, o si se trata de estructuras aisladas de las fibras circundantes.

1.1.2 Objetivos Particulares

- Si hubiera relación entre fibras y gránulos de *Lacandonia* analizar la relación entre ambas estructuras, mediante el análisis de imágenes estéreo pares, una técnica de reconstrucción tridimensional.
- Conocer la biogénesis de los gránulos, e identificar distintos estadios en su maduración.

1.1 Metodología

1.1.1 Obtención de las Muestras

Se colectaron yemas de hojas de *Ginkgo biloba*, para esto se ubicó un ejemplar de la planta en buen estado y posteriormente se colectó el material, la planta seleccionada fue la localizada en las proximidades a la preparatoria número 5. En el lugar de colecta se seleccionaron las yemas con mejores características con base en su color verde, las yemas seleccionadas se cortaron con una navaja Gillete de doble filo procurando cortar únicamente la yema de aproximadamente 5 mm y no dañar el resto de la hoja, se repitió el procedimiento con 3 yemas más, inmediatamente después, de cortar cada yema con la misma navaja era puesta sobre una placa de cera y sumergida en unas gotas de solución fijadora (una mezcla de Glutaraldehído al 6% y Paraformaldehído al 4% en un buffer o amortiguador de fosfatos salino, PBS a pH 7.3) puestas previamente sobre la misma placa, posteriormente se cortó cada yema sumergida en las gotas de fijador, en partes lo más pequeñas posibles con ayuda de la misma navaja, a continuación los pedazos ya cortados se colocaron dentro de un frasco vial que contenía la misma solución fijadora, se colocaron los fragmentos de cada yema en un frasco vial distinto, después, los frascos viales bien cerrados y sellados con parafilm fueron colocados en un contenedor con hielo y transportados al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM, cuidando en el trayecto que los fragmentos de las yemas axilares de la planta estuvieran siempre sumergidos en la solución fijadora.

1.1.2 Procesamiento de las Muestras

Una vez en el Laboratorio de Microscopía Electrónica los frascos viales fueron sacados del contenedor con hielo y se dividieron en dos grupos; ambos

permanecieron intactos hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Al día siguiente a un grupo de frascos se le retiró con ayuda de una pipeta Pasteur la solución fijadora e inmediatamente después, las muestras ahí contenidas fueron enjuagadas con un amortiguador de fosfatos salino pH 7.3 en cuatro ocasiones distintas con una duración de 5 minutos cada enjuague. A continuación este grupo de muestras fueron postfijadas en tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% hasta el día siguiente. Al otro día los dos grupos de muestras las que fueron postfijadas y las que no fueron postfijadas (las que permanecieron intactas desde el día de colecta), fueron deshidratadas gradualmente con etanol a distintas concentraciones 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% durante 5 minutos con cada alcohol, para finalizar la deshidratación se les colocó alcohol absoluto (100%) por tres ocasiones con una duración de 5 minutos cada una.

Después, se les colocó óxido de propileno al 100% y se realizaron con éste tres cambios de 5 minutos cada uno, a continuación del último cambio de óxido de propileno, se colocaron en una solución de óxido de propileno y resina epóxica 1:1 y permanecieron ahí a temperatura ambiente hasta el día siguiente proceso llamado preinclusión. Por último las muestras se incluyeron en una resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60 °C hasta el día siguiente (ver diagrama 1).

1.1.3 Preparación de las Muestras para su Observación

Se tomaron distintos bloques al azar para trabajar con ellos, después de retallarlos, se obtuvieron cortes semifinos de 200-250 nm de espesor, con ayuda de un ultra micrótopo LEICA ultracut R, dichos cortes fueron fijados por calor sobre portaobjetos y teñidos con azul de toluidina, posteriormente se observaron en un microscopio óptico Zeiss con el objetivo de 40X, esto para seleccionar el área de mayor interés, para luego retallar la cara del bloque nuevamente, dejándola más pequeña, y facilitar así la obtención posterior de cortes ultrafinos.

Ya delimitada nuevamente la cara del bloque se procedió a sacar los cortes ultrafinos de 50 a 70 nm de espesor (color gris a plateados) en el mismo ultra micrótomo, dichos cortes se montaron en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y de mesh abierto, recubiertas anteriormente con una membrana de formvar. Las rejillas que contenían los cortes de tejidos procesados con tetraóxido de osmio se contrastaron por flotación, utilizando la técnica convencional para microscopia electrónica, en una cámara húmeda que contenía lentes de hidróxido de sodio; primero permanecían flotando en acetato de uranilo alcohólico al 3% durante 20 minutos, enseguida eran retiradas y enjuagadas por goteo con ayuda de una piseta con agua bidestilada para luego flotarlas nuevamente en citrato de plomo al 0.3% durante 10 minutos, para finalizar se enjuagaban nuevamente por goteo con agua bidestilada y se ponían a secar en papel filtro dentro de una caja petri para evitar que se contaminaran.

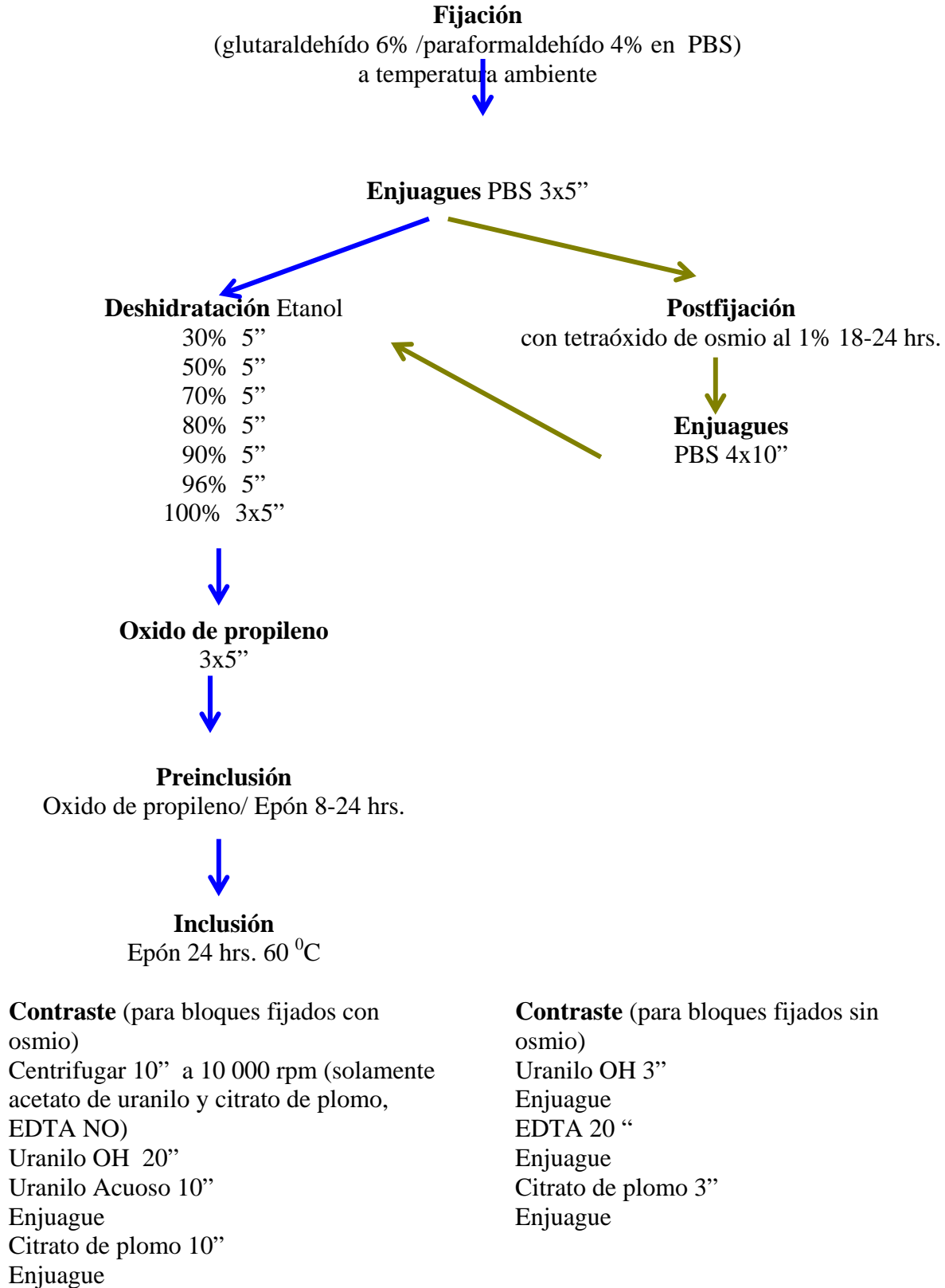
Las rejillas que contenían los cortes de tejidos que no habían sido postfijados, se contrastaron por medio de la técnica regresiva al EDTA de Bernhard, preferencial para RNPs; en una cámara húmeda que contenía lentes de hidróxido de sodio; primero permanecían flotando en acetato de uranilo alcohólico al 3% por 3 minutos, luego se enjuagaron por goteo con agua bidestilada, posteriormente se flotaron en EDTA al 0.2 M pH 6.8 por 20 minutos, luego se volvieron a enjuagar con agua bidestilada, al terminar de enjuagar se flotaron en citrato de plomo al 0.3% por 3 minutos y por último, se enjuagaron nuevamente con agua bidestilada para ponerlas a secar en papel filtro dentro de una caja de petri.

Posteriormente todas las rejillas independientemente de si fueron o no postfijadas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operando a 80 Kv, a diferentes aumentos para localizar las rejillas y las zonas de interés para el presente trabajo.

Se seleccionaron las mejores rejillas en cuanto a espesor de los cortes montados y limpieza de la técnica de contraste, luego se tomaron micrografías electrónicas

a distintos aumentos, para el registro de dichas imágenes se empleó la cámara MTI modelo CCD-300-RC y se utilizó el programa **Scion Image for Windows para TEM camera**, las imágenes obtenidas se guardaron en una carpeta en formato TIF, dichas imágenes tenían la peculiaridad, de haber sido tomadas a distintos ángulos con ayuda del goniómetro del MET, esto con la idea de hacer una reconstrucción tridimensional de los gránulos de *Lacandonia* por medio de estéreo pares, luego se procedió al análisis e interpretación de dichas micrografías.

Diagrama 1



1.1 Resultados

En la figura 1 se puede observar claramente como el nucléolo de *Ginkgo biloba* presenta las tres regiones características de cualquier nucléolo; el Centro fibrilar denso (DFC), el Centro fibrilar FC y el Componente granular GC; en esa micrografía se empleó la técnica de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas, la cual permite observar con mayor contraste la diferencia entre el DFC y el FC, siendo este primero más oscuro por su mayor contenido de RNPs, de igual manera se observa el componente granular, el cual está formado de partículas pre-ribosómicas, las cuales también son contrastadas por dicha técnica. En las figuras 2 y 3 (micrografías contrastadas por la técnica de EDTA) pueden observarse claramente los gránulos de *Lacandonia* y las fibras circundantes, aunque no se logra apreciar si están interconectados, si se logra apreciar gránulos de distintos tamaños, asociados con distintos estadios de maduración. En la figura 4 se hace una comparación de tamaño entre los gránulos de *Lacandonia* maduros y los ribosomas teniendo los primeros más del doble del tamaño que los ribosomas, dicha micrografía se contrastó por la técnica de EDTA por lo que ambas estructuras fueron fuertemente contrastadas por su alto contenido de RNPs.

En la mayoría de las micrografías de estéreopares se logra observar que los gránulos de *Lacandonia* se encuentran formando una red de gránulos y fibras, por medio de la reconstrucción tridimensional. Con ayuda de las imágenes en estéreopares, se puede observar que las fibras están asociadas a los gránulos de *Lacandonia*, conectándose con ellos en distintos puntos, y conectando los gránulos entre sí, figuras 5, 6, 7 y 8. Sugiriendo que los gránulos de *Lacandonia* tienen un origen a partir de estas fibras, más en particular se formarían del plegamiento de dichas fibras, figuras 5, 6, 7 y 13. En la biogénesis de dichos gránulos se logran apreciar claramente tres estadios, figuras 11 y 12, que en orden de maduración son: a) una partícula menor a los 32 nm de diámetro conectada con más fibras y que se localiza generalmente formando las partes

centrales de los racimos de gránulos, figuras 10 y 12; b) una partícula de tamaño aproximado a los 32 nm que aún está conectada a fibras pero su presencia es generalmente en los bordes de los racimos de gránulos, figuras 5, 6, 7, y 8; y c) una partícula de 32 nm de diámetro, similar a la anterior pero, que a diferencia del estadio anterior, no se encuentra conectada con ninguna fibra, teniendo su ubicación muy cercana a los racimos de gránulos de *Lacandonia* sin estar en aparente contacto con ellos o inclusive aislados o lejanos de su centro de origen, figuras 8, 9, 10 y 12.

De acuerdo al análisis de las distintas micrografías se aprecia que el estadio que más predomina es el estadio (a), el cual representa un 58% aproximadamente de los gránulos encontrados; seguido por el estadio (b), el cual se encuentra representado en un 35% aproximadamente, mientras que el estadio (c), se observa muy escasamente con un 7% en representación (ver gráfico 1). El conteo de los tres estadios de gránulos se hizo en base a las trece micrografías para estéreopares tomadas en el MET.

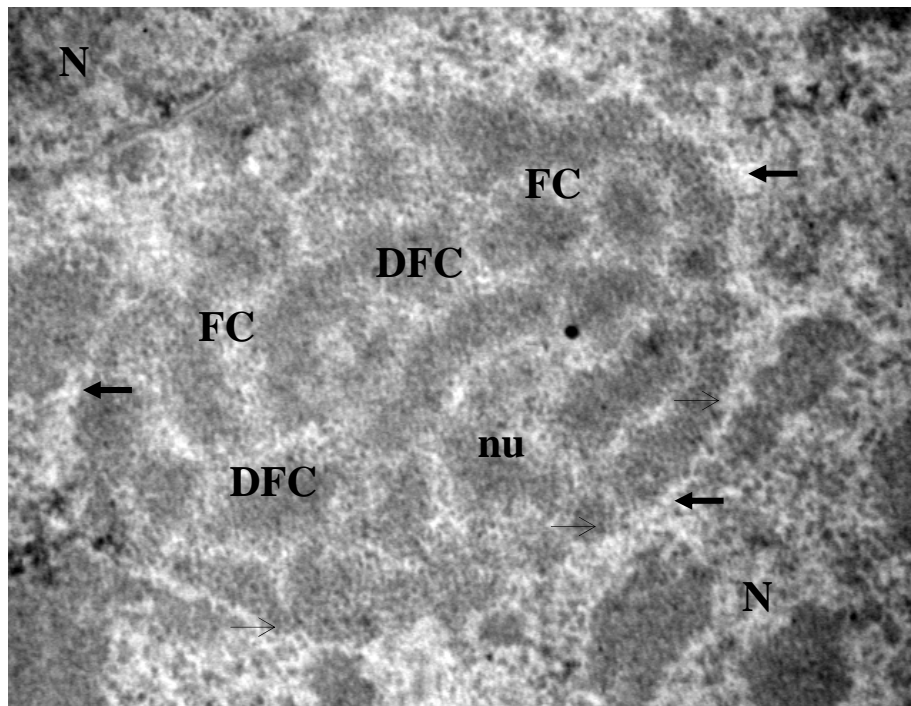


Figura 1. Micrografía electrónica del nucléolo (nu) de *G. biloba* a 30 000 aumentos, contrastada por la técnica de EDTA, el nucléolo al ser en su mayor porcentaje RNPs es fuertemente contrastado, ya que en dicha técnica, el EDTA, retira el uranilo más

rápida de la cromatina que de las partículas ribonucleoproteicas; centro fibrilar (FC, manchones blancos dentro del nucléolo); centro fibrilar denso (DFC, manchones negros dentro del nucléolo); componente granular (GC, partículas prerribosómicas flecha delgada), (N) nucleoplasma; nótese la banda continua de cromatina blanqueada que rodea el nucléolo (flechas).

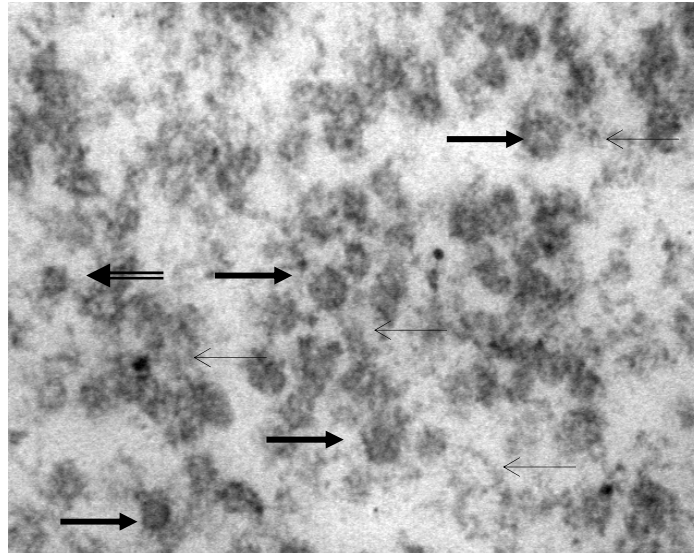


Figura 2. Micrografía electrónica a 150 000 aumentos contrastada por la técnica de EDTA, donde se muestran numerosos gránulos de *Lacandonia* (flechas gruesas) agrupados, y fibras que los rodean (flechas delgadas). Nótese que el tamaño de los gránulos no es constante, sino que varía habiendo gránulos más pequeños, sugiriendo que aun están en un estado inmaduro (flecha doble).

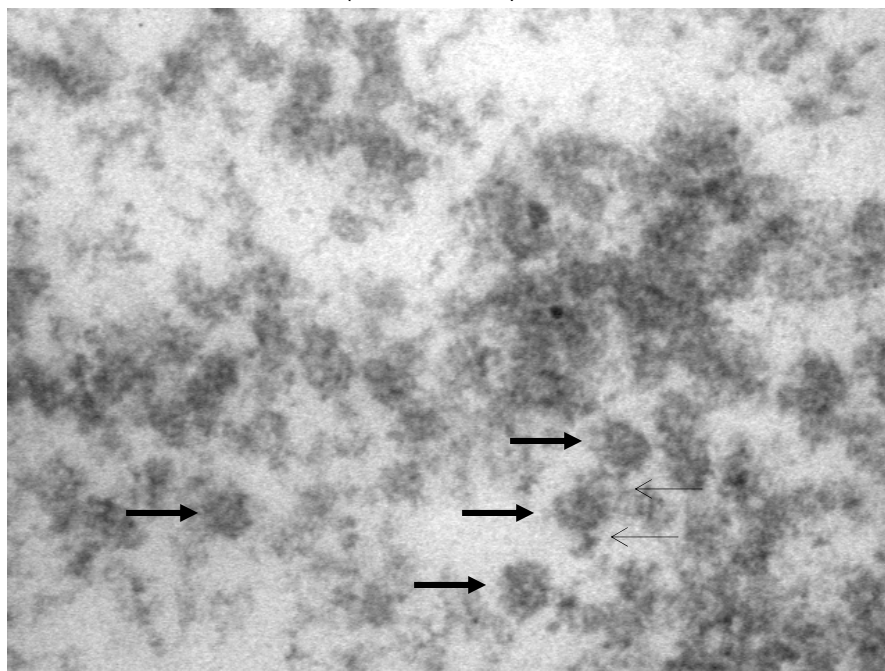


Figura 3. Micrografía electrónica a 150 000 aumentos contrastada por la técnica de EDTA, se muestran varios gránulos de *Lacandonia* agrupados (flechas gruesas), y fibras asociadas a estos, que al parecer están conectadas a los gránulos (flecha delgada).

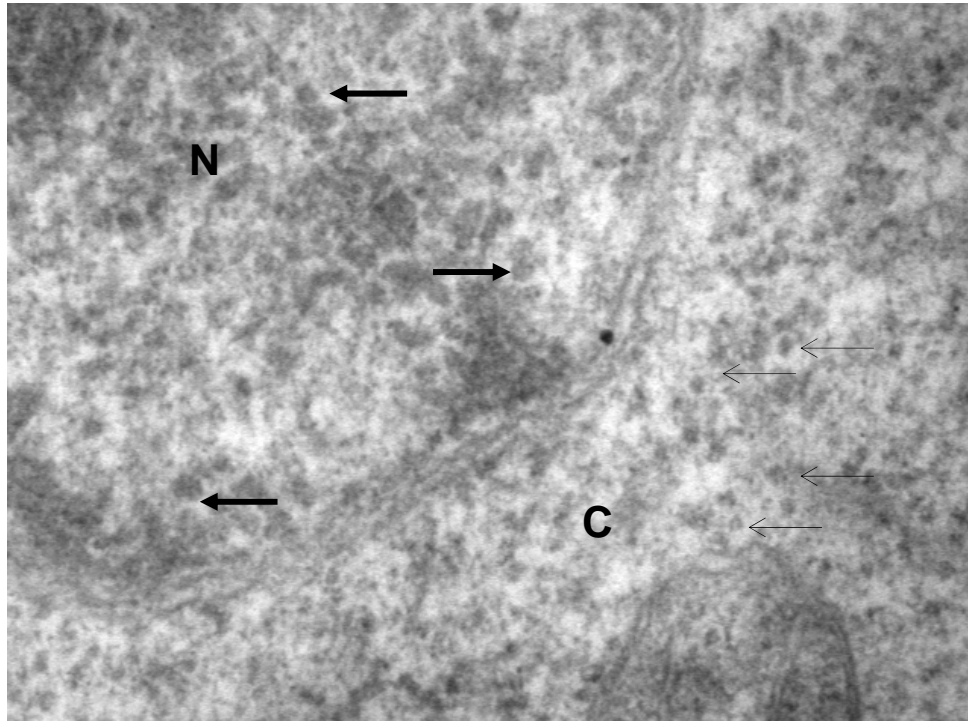


Figura 4. Micrografía electrónica contrastada por la técnica de EDTA. Se hace una comparación entre los ribosomas (flechas delgadas) y los gránulos de *Lacandonia* (flechas gruesas) nótese que los gránulos son poco más del doble del tamaño, núcleo (N), citoplasma (C), ambas partículas se contrastan por su alto contenido de RNPs.

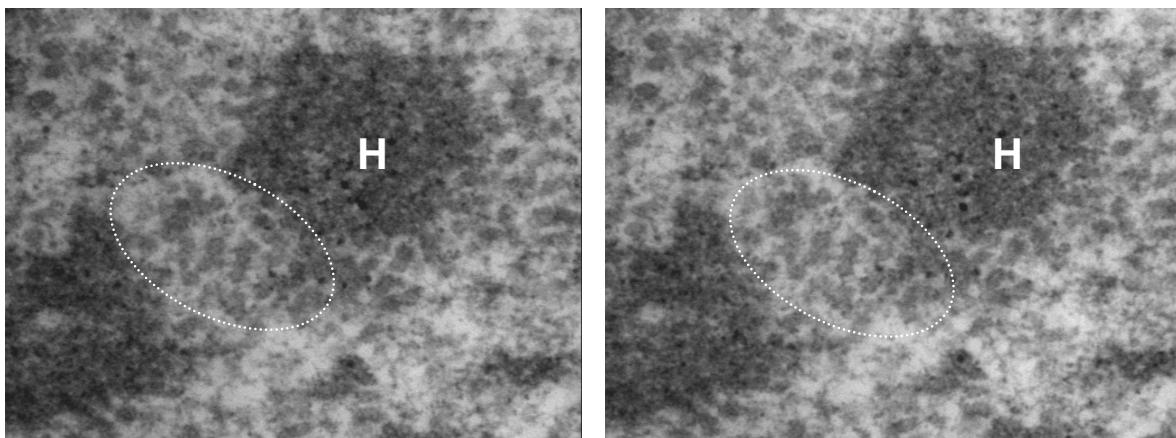


Figura 5. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET (acetato de uranilo y citrato de plomo). Se aprecian varios gránulos agrupados en racimos, interconectados entre ellos por medio de fibrillas, cerca de dos manchones de heterocromatina (H).

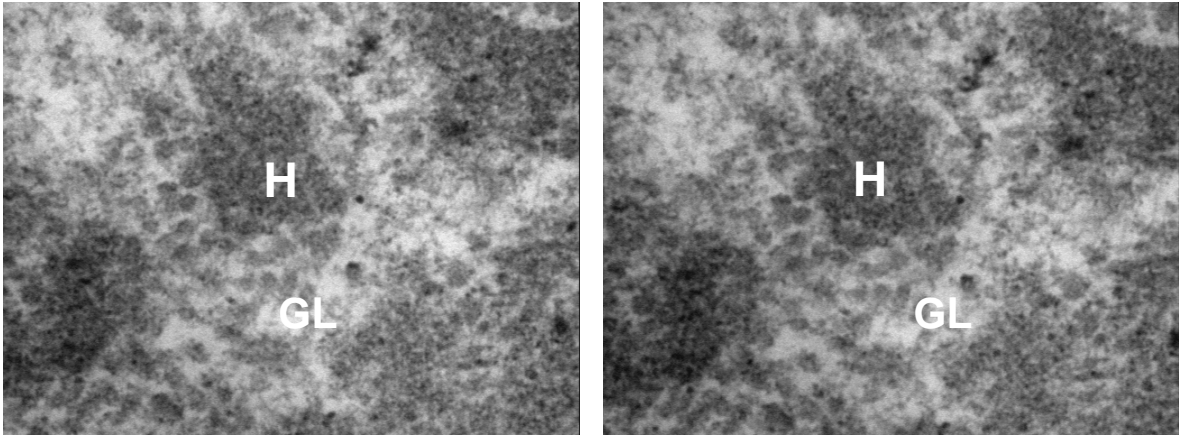


Figura 6. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, pueden apreciarse racimos de gránulos de *Lacandonia* (GL) junto a los cúmulos de heterocromatina (H), se logra apreciar que las fibras se insertan en los distintos gránulos.

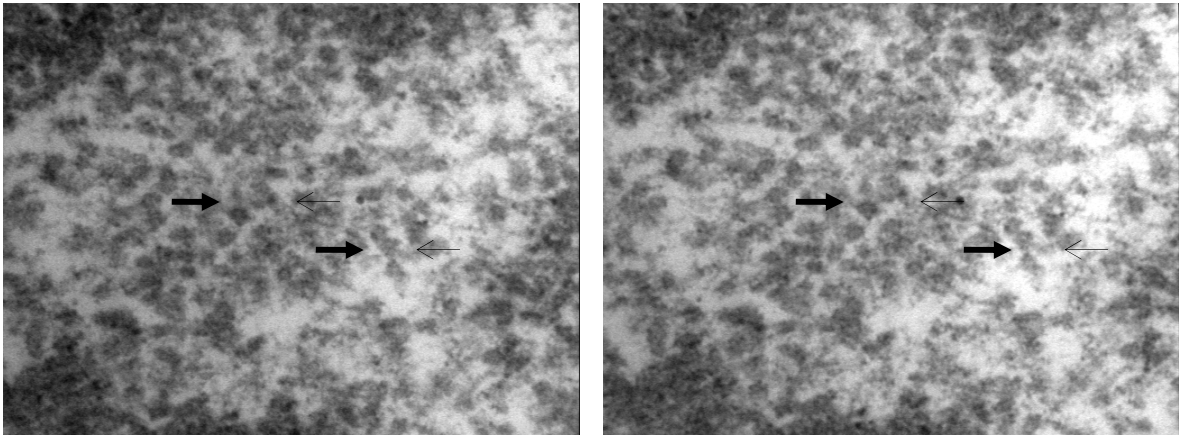


Figura 7. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, logran apreciarse que las fibras (flechas delgadas) se conectan en distintos puntos con los gránulos de *Lacandonia* (flechas gruesas), formando así, gránulos y fibras una misma estructura en común.

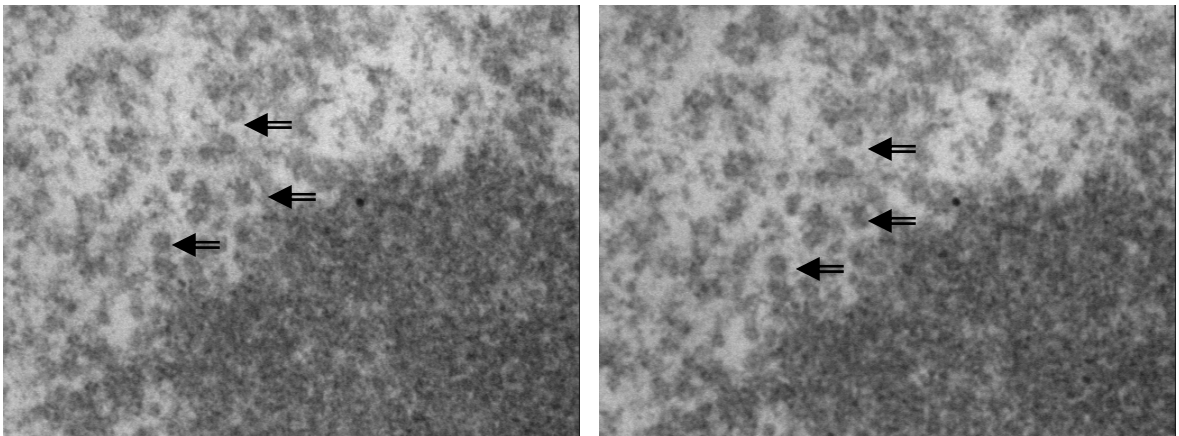


Figura 8. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, se logran apreciar gránulos de *Lacandonia* de distintos tamaños, los de menor tamaño (asociados a un estadio inmaduro), los cuales están más cercanos a los cúmulos de heterocromatina y asociados a fibras y más gránulos; mientras que los gránulos maduros (flechas

dobles) estructuras de tamaño aproximado a 32 nm se aprecian generalmente más alejados de los cúmulos y se encuentran aislados sin estar asociados a fibras.

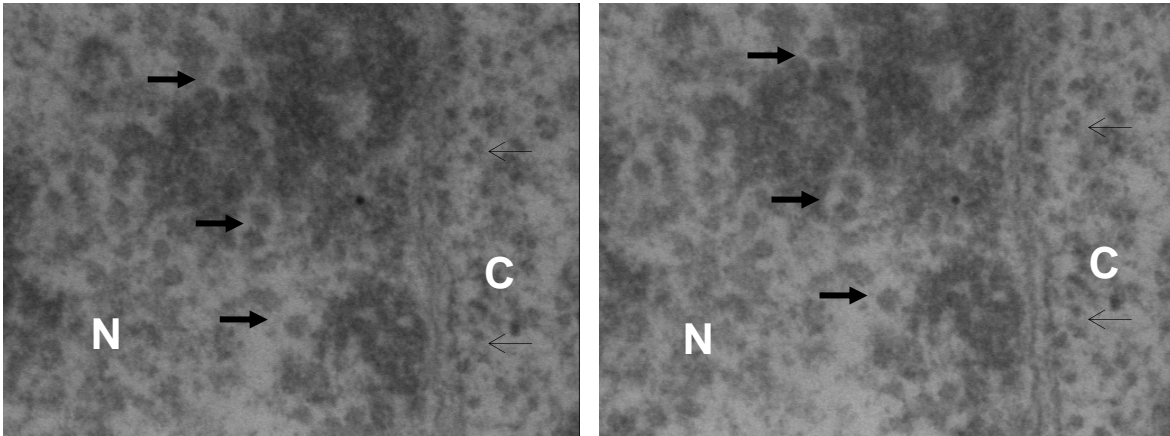


Figura 9. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, se aprecian gránulos de *Lacandonia* (flechas grandes), comparados con los ribosomas (flechas delgadas), los cuales son de casi la mitad del tamaño que los gránulos; núcleo (N), citoplasma (C).

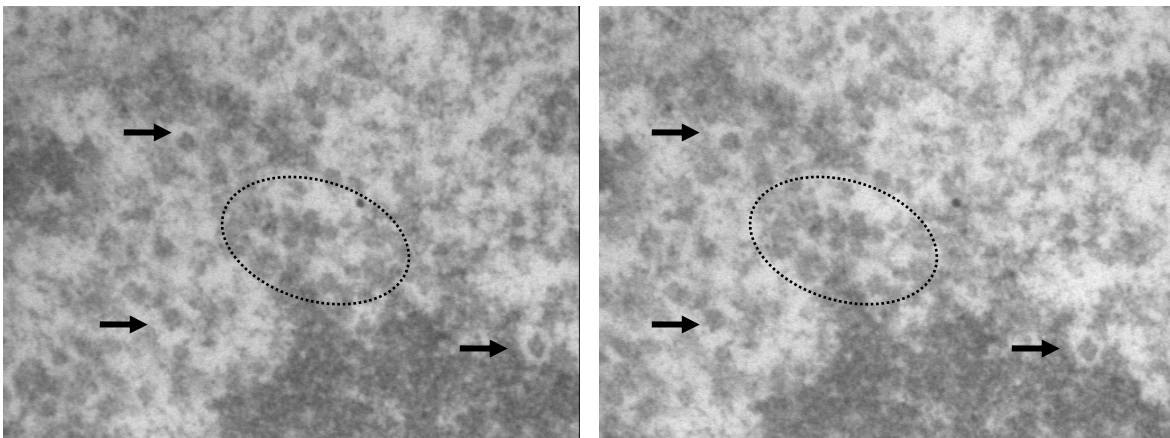
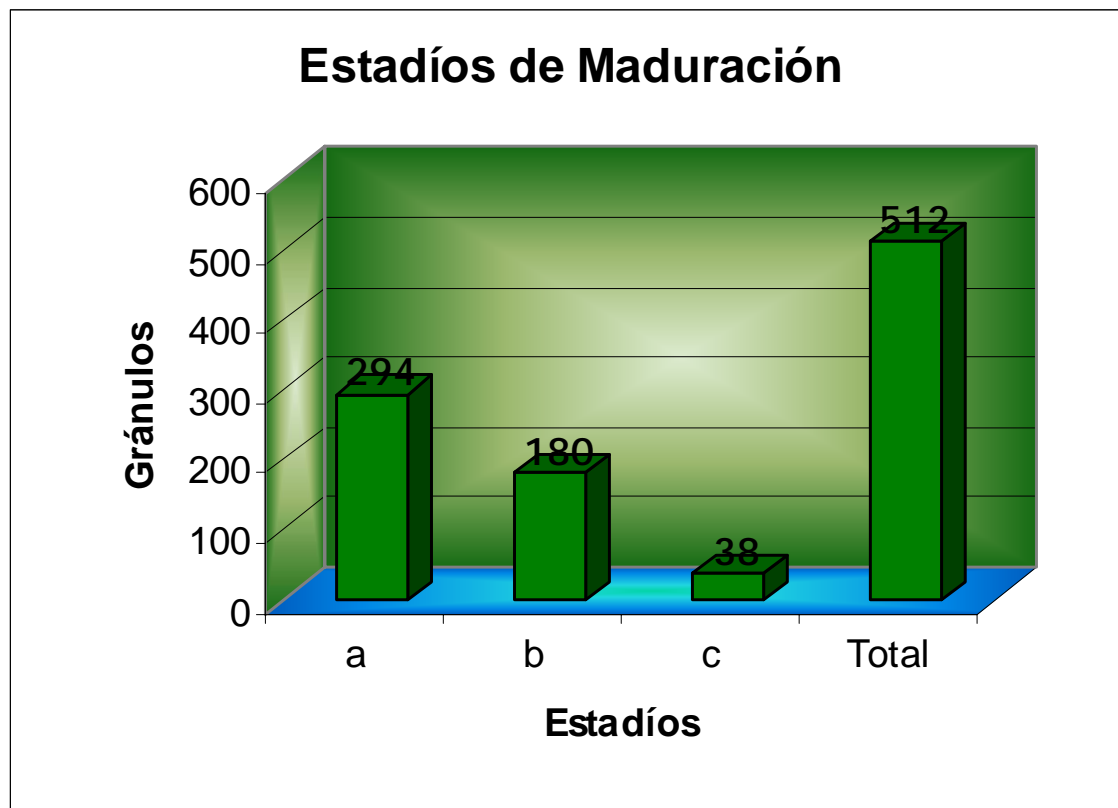


Figura 10. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, pueden verse gránulos de *Lacandonia* en distintos estadios de maduración, los gránulos marcados con una flecha gruesa parecen estar asilados de cualquier otra estructura, mientras que las formas inmaduras de los gránulos están asociadas aun ambiente fibrogranular (elipse), estando interconectados entre ellos por fibrillas y formando racimos.



Gráfica 1. Distribución de los distintos estadíos de los gránulos de *Lacandonia* en las células de las yemas axilares de *Ginkgo biloba*, se logra apreciar que prácticamente el 57% de los gránulos presentes se encuentran en el estadio (a), inmaduro, esto nos sugiere que es el estadio de más larga vida de los tres.

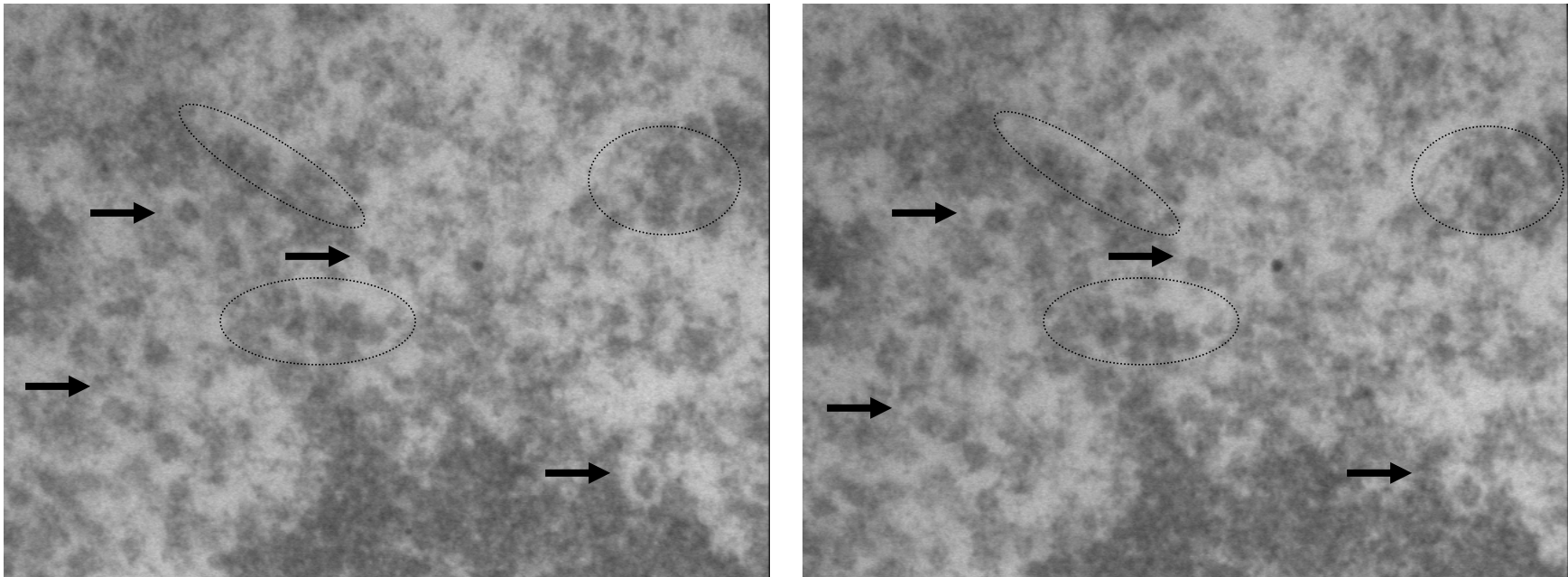


Figura 11. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 100 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, en esta micrografía se observan formas maduras de los gránulos de *Lacandonia* (flechas), dichas formas se encuentran normalmente independientes, es decir, no están asociados a más gránulos ni a fibrillas; a diferencia de los distintos estadios inmaduros que están asociados entre si y a las fibrillas circundantes, (elipse) cúmulo de gránulos de *Lacandonia*.

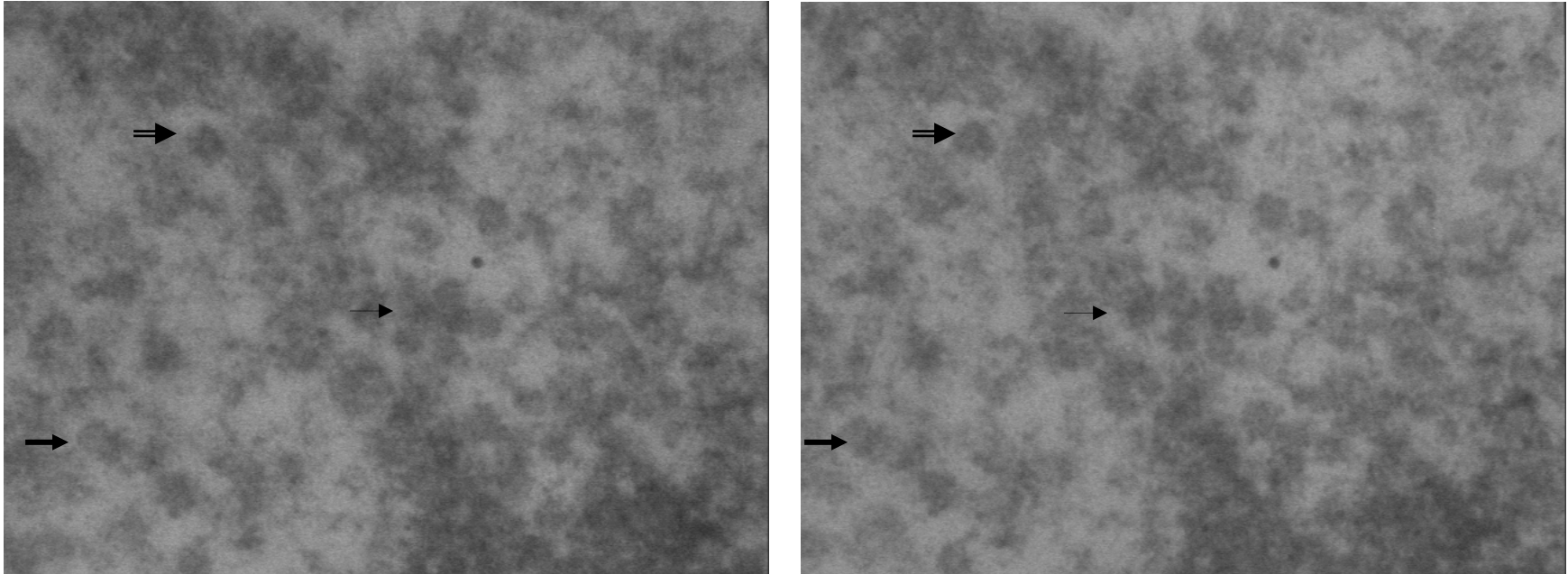


Figura 12. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 150 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, se aprecian gránulos pertenecientes a los distintos estadios, a (flecha delgada), b (flecha gruesa), c (flecha doble).

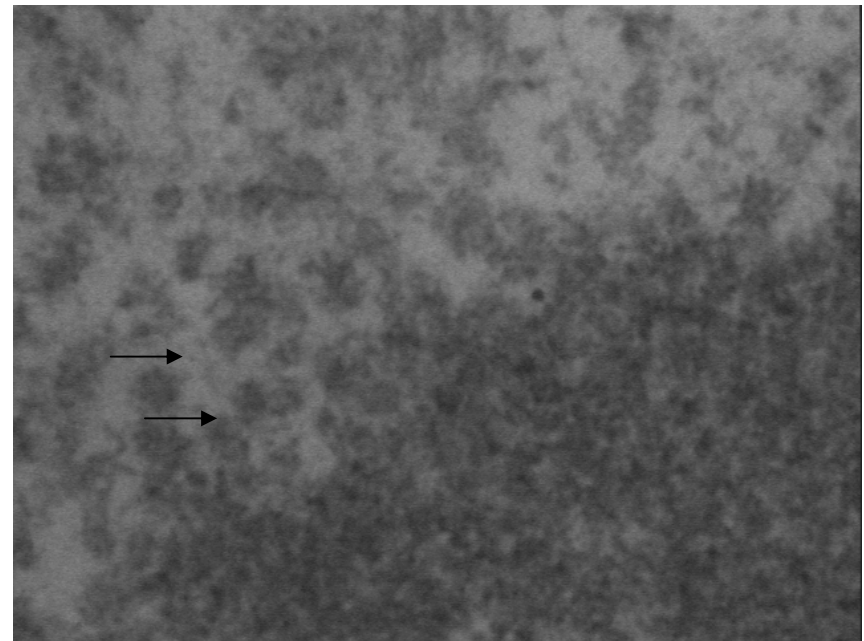
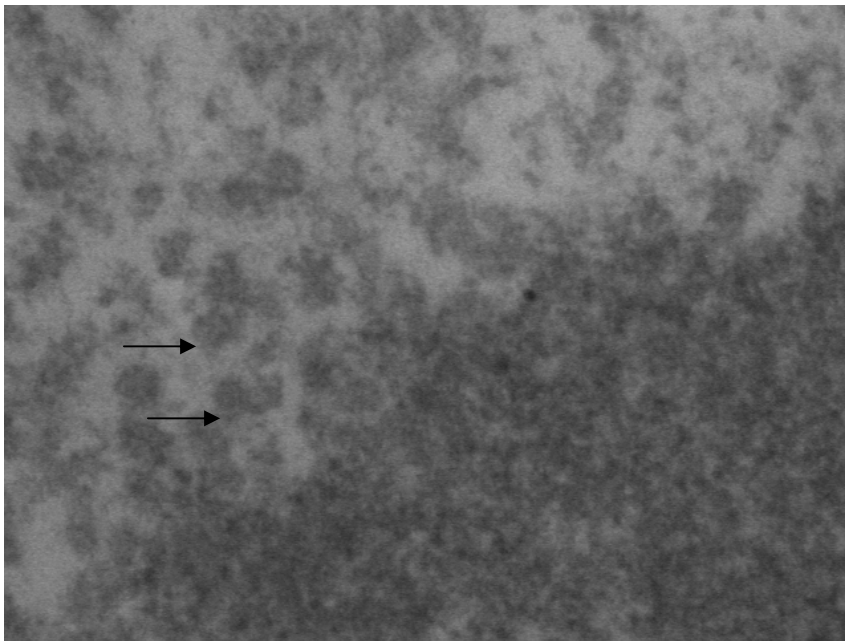


Figura 13. Micrografía electrónica de *G. biloba* a 150 000 aumentos, contrastada por la técnica convencional para MET, se logran apreciar gránulos maduros, y gránulos ligeramente irregulares (flecha), aquí se aprecia como son producto del plegamiento de las fibras circundantes.

1.2 Discusión

En la mayoría de las micrografías electrónicas se logra observar que los gránulos de *Lacandonia* se encuentran asociados a cúmulos, al menos en 2 de los 3 estadios descritos; dichos racimos se encuentran en la región pericromatiniana o intercromatiniana, de igual manera que reportó Jiménez-Ramírez y colaboradores (2002), para dicha especie; los gránulos no son los únicos elementos que se encuentran en estos cúmulos, más bien parecen estar interconectados entre si por fibrillas, esto se evidencia con mayor facilidad en las imágenes de estéreopares, técnica que permite visualizar las imágenes de una manera tridimensional, con lo cual se tiene una visión a profundidad que permite observar que efectivamente hay conexiones entre los gránulos de *Lacandonia* y las fibrillas circundantes.

Además, los gránulos de *Lacandonia* son EDTA positivos y contienen proteínas SR, lo que los hace similar a los gránulos pericromatinianos en animales. Se puede asumir que ambos pertenecen a una compleja red de fibras y gránulos, teniendo los gránulos de *Lacandonia* un origen a partir del plegamiento de estas fibrillas, que muestran ser también EDTA positivas (Agredano-Moreno *et al.*, 2000; Jiménez-García *et al.*, 1992).

El origen de los gránulos de *Lacandonia* a partir de las fibras circundantes explicaría la ligera variación de tamaño que hay entre los diferentes gránulos observados, en las distintas micrografías; ya que al formarse a partir del plegamiento de las fibras circundantes, la micrografía mostraría gránulos en distintos estadios de maduración, teniendo como forma madura una partícula aislada de las fibras circundantes que al parecer tendría 32 nm de diámetro, como reportó Jiménez-Ramírez y colaboradores (2002). También, al estar agrupados en racimos, podría suponerse un proceso de maduración análogo al de los gránulos intercromatinianos; como reportó Tapia (2006), dentro de dichos

racimos, ubicando las formas más pequeñas de los gránulos y por lo tanto las formas inmaduras cercanas a dichos racimos ó en su interior; mientras que las partículas maduras de tamaño aproximado a los 32 nm se ubicarían en la periferia de los racimos estando aisladas de estos ó inclusive podrían encontrarse lejos de estos racimos, lo que sugeriría que al igual que los gránulos pericromatinianos estarían esperando una señal externa para ser exportados al citoplasma y verter ahí su contenido de mRNA (RNA mensajero maduro), la cual es su función citofisiológica predicha.

Morfológicamente sólo se pueden apreciar tres estadios claramente diferenciados, siendo las formas maduras de los gránulos muy escasas y el estadio a (inmaduro) muy abundante, sugiriendo que es el estadio de más larga vida de los tres. De acuerdo al tipo de estudio realizado en el presente trabajo, no se sabe si la distribución de los diferentes estadios dependa de la actividad metabólica de la célula, o si dicha distribución sea independiente, para ello se necesitarían hacer trabajos posteriores, en distintos tipos celulares con diferente tasa metabólica dentro de la misma planta.

1.1 Conclusión

Por medio de la reconstrucción tridimensional hecha por imágenes estéreo pares, se observa que los gránulos de *Lacandonia* son parte de una compleja estructura fibrogranular. Los gránulos podrían tener su origen en estas fibras, como parte de un plegamiento de las mismas, como se observa en algunas micrografías. Los gránulos más que ser esféricos parecen una red de fibras enrolladas. Se reconocieron tres estadios, siendo el estadio (a), las partículas en el interior de los racimos de gránulos, las más abundantes, lo que sugiere que es la etapa de vida dentro de la biogénesis de los gránulos con mayor duración, al menos para el tipo celular estudiado (yemas axilares de *Ginkgo biloba*). No obstante la distribución de los estadios en el núcleo celular podría también depender de la actividad metabólica de la célula a lo largo del desarrollo de la planta, de igual manera como se reportó que variaba la cantidad de los gránulos en el desarrollo de la flor siendo más abundantes en la etapa de pre-antesis.

1.1 Referencias

- 1) Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F. 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatin and Balbiani ring granules. *Biol. Cell* 92, 71-78.
- 2) Agredano-Moreno, L. T. 1991. Estudio ultraestructural comparativo del núcleo celular interfásico de *Lacandonia schismatica* E. Martínez y C. H. Ramos (Triuridales: Lacandoniaceae) y *Triuris alata* Brade (triuridales: Triuridaceae). Tesis de Licenciatura. UNAM Facultad de Ciencias. México, pp. 76.
- 3) Agredano-Moreno, L. T. 1993. Estudio citoquímico e inmunocitoquímico ultraestructural de los gránulos de *Lacandonia* polipartículas presentes en los núcleos de *Lacandonia schismatica* E. Martínez y C. H. Ramos (Triuridales: Lacandoniaceae). Tesina de Especialidad en Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. UNAM Facultad de Ciencias. México, pp. 65.
- 4) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc, Nueva York y Londres.
- 5) Cremer, T., Küpper, K., Dietzel, S., Fakan, S. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus. *Biol. Cell* 96, 555-567.
- 6) Dundr, M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356, 297-310.

- 7) Echeverría, O. Moreno Díaz de la Espina, S., Jiménez-García, L. F. y Vázquez-Nin, G. H. 1999. Supramolecular Organization of a chromocentric plant nucleus. *Biol. Cell* 91, 209-219.
- 8) Falcón, B. T. 2002. Estudio de los Gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis por Microscopia Electrónica de Transmisión. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. Facultad de Ciencias. México, pp. 63.
- 9) Hozák, P., Fakan S. 2006. Functional structure of the cell nucleus. *Histochem. Cell Biol.* 125, 1-2.
- 10) Fakan, S. 2004. Where do we go in the nucleus? *Biol. Cell* 96, 553-554.
- 11) Futuyma, J. D. 1997. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 763.
- 12) Griffiths, F. A., Miller, H. J., Suzuki, T. D., Lewontin, C. R., Gelbart, M. W. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, Nueva York, pp. 860.
- 13) Jiménez, L. F. y Merchant, H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación, México, pp. 912.
- 14) Jiménez-García, L. F., Agredano-Moreno, L. T., Segura-Valdez, M. L., Echeverría, O., Martínez, E., Ramos, H. C., Vazquez-Nin, G. H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacnadoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell.* 75, 101-110.

- 15) Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L. T., Segura-Valdez, M. L. y Jiménez-García, L. F. 2002. *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. Biol. Cell 94, 511-518.
- 16) Jiménez-García, L. F., Martínez-Lara, R., Chavarria-Gil, I., Zamora-Cura, A. L., Salcedo-Alvarez. M., Agredano-Moreno, L. T., Moncayo-Sahagún, J. J., Segura-Valdez, M. L. 2007. Biología Celular del Splicing. Mensaje Bioquímico. XXXI.
- 17) Lamond A. I., Earnshaw, W. C., 1998. Structure and function in the nucleus. Science 280, 547-553.
- 18) Matera, A. G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. Trends Cell Biol. 9, 302-309.
- 19) Mintz, J. P., Patterson, D. S., Neuwald, F. A., Spahr, S. C. Spector, L. D. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. EMBO J. 18, 4308-4320.
- 20) Monneron, A., Bernhard, W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrast. Res. 27, 266-288.
- 21) Spector, D. L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. Ann. Rev. Cell Biol. 9, 265-315.
- 22) Spector, D. L. 1990. Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 147-151.
- 23) Spector, D. L. 2001. Nuclear domains. J. Sci. 114, 2891-2893.

- 24) Spector, D. L. 1996. Nuclear Organization and Gene Expression. *Exp. Res.* 229, 189-197.
- 25) Shaw, J. P., Brown WS. J. 2004. Plant nuclear bodies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 614-620.
- 26) Stewart, W. N., Rothwell, G. W. 1993. *Paleobotany and the Evolution of the Plants.* Cambridge University Press, pp 521.
- 27) Tapia-Tapia, M., 2006. Estudio Ultraestructural de los Gránulos Intercromatinianos en Hepatocitos de Ratón y en Células HeLa. Tesis de Especialidad en Microscopia Electrónica en Ciencias Biológicas. UNAM, Facultad de Ciencias, pp. 31.

Pagina del Missouri Botanical Garden

28) <http://www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=Z990>