



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESPECIALIDAD EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS GRÁNULOS  
INTERCROMATINIANOS EN HEPATOCITOS DE RATÓN Y EN CÉLULAS  
HeLa**

M. en C. Melina Tapia Tapia

ASESOR:

Dr. Luis Felipe Jiménez García



México D.F.

7-Agosto-2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>9</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....</b>	<b>10</b>
<b>6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>11</b>
6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	11
6.2 TOMA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS.....	14
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
7.1. Observación por microscopía óptica.....	15
7.2. Observación por microscopía electrónica de transmisión.....	16
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>9. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>28</b>
ANEXO 1: Antecedentes de células HeLa y hepatocitos de ratón.....	28
ANEXO 2: Preparación de soluciones.....	29
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>30</b>

## RESUMEN

Los Gránulos intercromatinianos (GIC) son ribonucleoproteínas (RNP) intranucleares que se presentan en cúmulos en células de vertebrados o dispersos en invertebrados. Contienen gran cantidad de factores de splicing, por lo que juegan un papel importante en el metabolismo del RNA intranuclear. El cúmulo de gránulos intercromatinianos se presenta como un material de fibras y gránulos de unos 15nm de diámetro, que sugiere continuidad entre estas estructuras. En este trabajo se analizó si se presenta esa continuidad. Se utilizó hígado de ratón y células HeLa en cultivo, que se procesaron para microscopía electrónica de transmisión estándar y por la técnica preferencial para RNP a base de EDTA.

Se obtuvieron imágenes en estereopares en cúmulos de GIC. Los resultados indican la presencia de cúmulos de GIC en ambos tipos celulares, en los que destacan elementos fibrosos y elementos granuloso de unos 20nm de diámetro. En ocasiones ambos elementos se conectan y los gránulos se pueden presentar en diámetros ligeramente variables.

Se concluye que en los cúmulos de GIC, hay conexión entre fibras y gránulos y se sugiere que estos últimos presentan una dinámica de formación estrechamente relacionada con las fibras.

## 1. INTRODUCCIÓN

El núcleo es una estructura delimitada por una doble membrana denominada envoltura nuclear. El núcleo contiene al DNA, en el caso de las células eucarióticas; en este compartimiento es donde se realizan los procesos genéticos centrales de la replicación del DNA y de síntesis de RNA. El núcleo presenta una organización interna compartimentalizada conformado por el nucleolo, la cromatina y partículas ribonucleoproteicas no nucleolares.

El nucleolo es una estructura sumamente densa con una gran actividad en la síntesis y procesamiento de RNAr. Dentro de un núcleo, dependiendo del tipo celular, grado de diferenciación y actividad metabólica, pueden existir hasta 3 o 4 nucleolos, los cuales varían en tamaño y densidad.

La cromatina es un conjunto de cadenas largas de DNA y proteínas asociadas llamadas nucleoproteínas. Gracias a estudios ultraestructurales, se pudo observar que la cromatina presenta dos estados de compactación, clasificando a la cromatina en heterocromatina (densa) y eucromatina (laxa). Estos dos estados de compactación se encuentran relacionados con diversos estadios fisiológicos, dado que los estudios por autorradiografía ultraestructural revelan que la cromatina laxa es la que entra en proceso de síntesis de RNA o transcripción, permitiendo que sus genes se expresen, mientras que en la cromatina compacta no siempre ocurre este proceso.

Sin embargo, la expresión del material genético en la célula también es responsabilidad de la heterocromatina, la cual se divide en facultativa y constitutiva; la primera corresponde a cromatina que presenta regiones de activación variable, dependiendo del tipo celular en que se encuentren y la cromatina constitutiva, esta conformada únicamente por regiones densas.

Microscópicamente, la distribución de la cromatina compacta en el espacio nuclear, se caracteriza por la presencia de grumos unidos a la envoltura nuclear, rodeando al nucleolo y distribuidos en el nucleoplasma y la eucromatina forma asas en la periferia de los cúmulos. Esta disposición propicia que la región que rodea a los

cúmulos de heterocromatina, sea una zona de alta actividad transcripcional. La existencia de una distribución característica de la cromatina compacta, sugiere que existe una arquitectura nuclear que asocia al nucleolo con su interfase de partículas ribonucleoproteicas no nucleolares donde se transcribe y procesa el RNA prerribosomal transcrito a partir del DNA de más de un cromosoma.

Como parte de la conformación del núcleo celular se encuentran las partículas ribonucleoproteicas no nucleolares, las cuales son complejos de RNA y proteínas que se encuentran en la región externa del nucleolo y sus dimensiones son en el orden de nanómetros. Estos complejos se dividen en fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados, cuerpos nucleares y las polipartículas.

#### Fibras pericromatinianas (FPC)

Son fibras que miden de 3 a 5 nm de diámetro de RNP que expresan morfológicamente la presencia de procesos transcripcionales, ya que se ha demostrado que contiene RNA pre-mensajero, también llamado heterogeneo nuclear (hnRNA). El RNA pre-mensajero es una copia del gen formado por secuencias en las que están codificadas exones e intrones y se encuentran situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta y en algunas regiones del nucleoplasma. En general se encuentran presentes en nucleolos de células diferenciadas, las cuales presentan gran actividad de expresión genética.

#### Gránulos pericromatinianos (GPC)

Son cuerpos esféricos de naturaleza ribonucleoproteica que miden de 30 a 50nm de diámetro y poseen una subestructura compuesta por una fibrilla retorcida de 3nm dentro del gránulo, ya que se ha demostrado que estos, son resultado del enrollamiento de una fibra pericromatiniana. La estructura esférica se encuentra rodeada por un halo claro de 20 a 50nm. La función propuesta para los gránulos pericromatinianos es la de almacenamiento de pequeñas cantidades de RNA pre-mensajero y en su mayor parte contiene RNA maduro.

Los gránulos pericromatinianos no se encuentran en todos los tipos celulares, ya que su presencia y cantidad van relacionadas al ritmo de actividad metabólica, así como de su estadio de diferenciación.

#### Cuerpos Espiralados o Cuerpos de Cajal

Son agregados esféricos de 0.3 a 0.5 $\mu$ m de diámetro, los cuales están formados por fibras de 40 a 60nm de espesor, situadas en la región intercromatiniana, los que a su vez presentan componentes relacionados con el procesamiento de los RNAs pre-mensajeros y de proteínas nucleolares. Los cuerpos espiralados tienen una relación muy variable con el nucleolo, ya que pueden estar dentro del mismo o asociado con el, como en el caso de células normales en hibernación. Estos cuerpos desaparecen durante el proceso de mitosis y se forman nuevamente en el estadio de G1 del ciclo celular, una vez que ya se ha reiniciado la transcripción.

#### Polipartículas

Son complejos ribonucleoproteicos y se encuentran formados por partículas con un coeficiente de sedimentación de 30S de una unidad de RNAm repetida múltiples veces, para formar una estructura semejante a cuentas ensartadas en un hilo. Estas polipartículas, también llamadas informóferos, tienen un tamaño de 25nm aproximadamente. La característica que tienen estas partículas es que tienen RNAs pre-mensajeros y mensajeros, ya que son de alto peso molecular y contienen una secuencia de poliA en el extremo 3' y de marcado rápido. En estudios de complejos transcripcionales se determinó que las moléculas de pre-RNAm aún unido a la matriz de DNA por la RNAPol, se unen a otras proteínas formando estructuras granulares de 20 a 35nm, las cuales se encuentran relacionadas con las fibras pericromatinianas y con los gránulos intercromatinianos, demostrando así que existe una asociación de los sitios de transcripción y de splicing, así como también la existencia de una migración de los factores de splicing hacia los lugares donde se activa la transcripción.

#### Cuerpos Nucleares

Estas estructuras miden entre 0.5 y 2 $\mu$ m de diámetro y se han encontrado en células sanas y en mayor cantidad en células patológicas. En su mayoría están formados por fibrillas dispuestas en forma circular concéntrica, fibrillas agrupadas en forma de

remolino o por fibrillas periféricas y gránulos densos centrales. Muchas de estas fibrillas y gránulos que conforman a los cuerpos nucleares, contienen RNA, dado que son reveladas por el contraste preferencial de EDTA, el cual tiñe a los RNPs.

Hasta el momento la actividad de los cuerpos nucleares es desconocido, aunque, sugiere una posible relación con estados de hiperactividad celular, lo cual se ha comprobado, mediante experimentos con estimulación hormonal, donde se observa un aumento de estos cuerpos en condiciones de estimulación.

Otras estructuras que son consideradas como cuerpos nucleares son las estructuras parecidas a anillos, las estructuras anulares y los cuerpos densos redondos.

#### Gránulos Intercromatinianos (GIC)

Son estructuras polimorfas que miden de unos 20 a 25nm de diámetro que en ocasiones se les encuentra de manera continua con fibrillas. Estos gránulos están compuestos de RNA de larga vida media como son los UsnRNAs, los cuales están relacionados con el procesamiento post-transcripcional de los pre-RNA<sub>m</sub> y proteínas; por esta razón se propuso que los GIC son almacenes de la maquinaria de splicing.

Por técnicas de purificación de proteínas se encontró que dentro de estos cúmulos de GIC se presentan aproximadamente 33 proteínas conocidas y algunas no identificadas que se relacionan con procesos de splicing de pre-RNA<sub>m</sub>. En estudios de inmunofluorescencia, se a encontrado un patrón de manchas (speckles) que muestra un modelo de distribución correspondiente a fibras pericromatinianas y cúmulos de GIC y se ha observado que los GIC parecen tener conexiones con elementos fibrilares de 9 a 10nm. Los mecanismos moleculares para la preparación de los factores de splicing en los sitios de transcripción no se conocen del todo, pero se sabe que estas manchas (GIC) tienen un rol importante en el metabolismo del RNA, basado en la ubicación de los factores de splicing pre-RNA<sub>m</sub> que se encuentra en la periferia de estas manchas.

#### RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL (3D)

Las técnicas de reconstrucción tridimensional, son métodos de análisis cualitativos de imágenes por microscopía electrónica de transmisión y algunos de estos métodos son la tomografía, cortes seriados y análisis por estereopares.



Los cortes seriados, es un método recomendado para realizar reconstrucciones 3D de estructuras u organelos más grandes al grosor de un corte ultrafino de ultramicrotomo (mayores de 60 o 90nm). Consiste en realizar cortes seriados del organelo u estructura completa, sin perder ninguno. Posteriormente se toma el corte que se encuentre en la zona ecuatorial de la estructura de interés y se toma como el corte 0. A partir del corte 0 se revisan los cortes hacia atrás (-1, -2...) y hacia delante (1, 2...) para corroborar que la serie de cortes contenga de manera integra la estructura de interés. La serie de cortes que contiene a la estructura a estudiar, se revisa por MET y se obtienen imágenes de cada uno de ellos. Finalmente, con auxilio de un programa de cómputo, se pueden emplear las imágenes digitales de los cortes, para superponerlas y generar así un modelo tridimensional.

En el caso de que se presenten estructuras que sean de un espesor menor al grosor de un corte de ultramicrotomo (60nm), es necesario emplear una técnica de reconstrucción por tomografía. La tomografía se basa en la toma de imágenes por MET a distintos ángulos de manera excéntrica para tomar la imagen a distintos niveles o por capas, para posteriormente realizar una reconstrucción digital de las imágenes tomadas en cada nivel.

## ESTEREOPARES

Una de las formas de análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión es la reconstrucción tridimensional por estereopares. Esta técnica emplea la toma de imágenes por microscopía electrónica, diametralmente opuestas a distintos ángulos de inclinación con respecto a la perpendicular de la muestra. Al tener dos imágenes tomadas con el mismo ángulo de inclinación, de lados opuestos, hace posible una superposición de la imagen al acomodarlas una junto a la otra, generando una tercer imagen por sobreposición espacial, a los ojos del observador, Esta imagen tiene la característica de parecer en tres dimensiones, lo cual permite la definición de algunos rasgos de pequeñas estructuras dentro de espesores de corte de unos 60nm, que no pueden observarse por medio de las imágenes de MET convencionales.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La relación espacial entre gránulos y fibras contenidas en los cúmulos de gránulos intercromatinianos, no ha podido ser definida a cabalidad. Dado que los gránulos intercromatinianos están relacionados con los factores de splicing, es importante conocer si existe esta relación. En este trabajo se pretende analizar a grandes aumentos esa relación, por medio de imágenes de estereopares.

## **3. HIPÓTESIS**

Hay una conexión a nivel espacial entre los componentes fibro-granulares de los cúmulos de los gránulos intercromatinianos, que puede revelarse en imágenes tridimensionales de las fibras y los gránulos intercromatinianos en células en cultivo y en células en tejidos.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

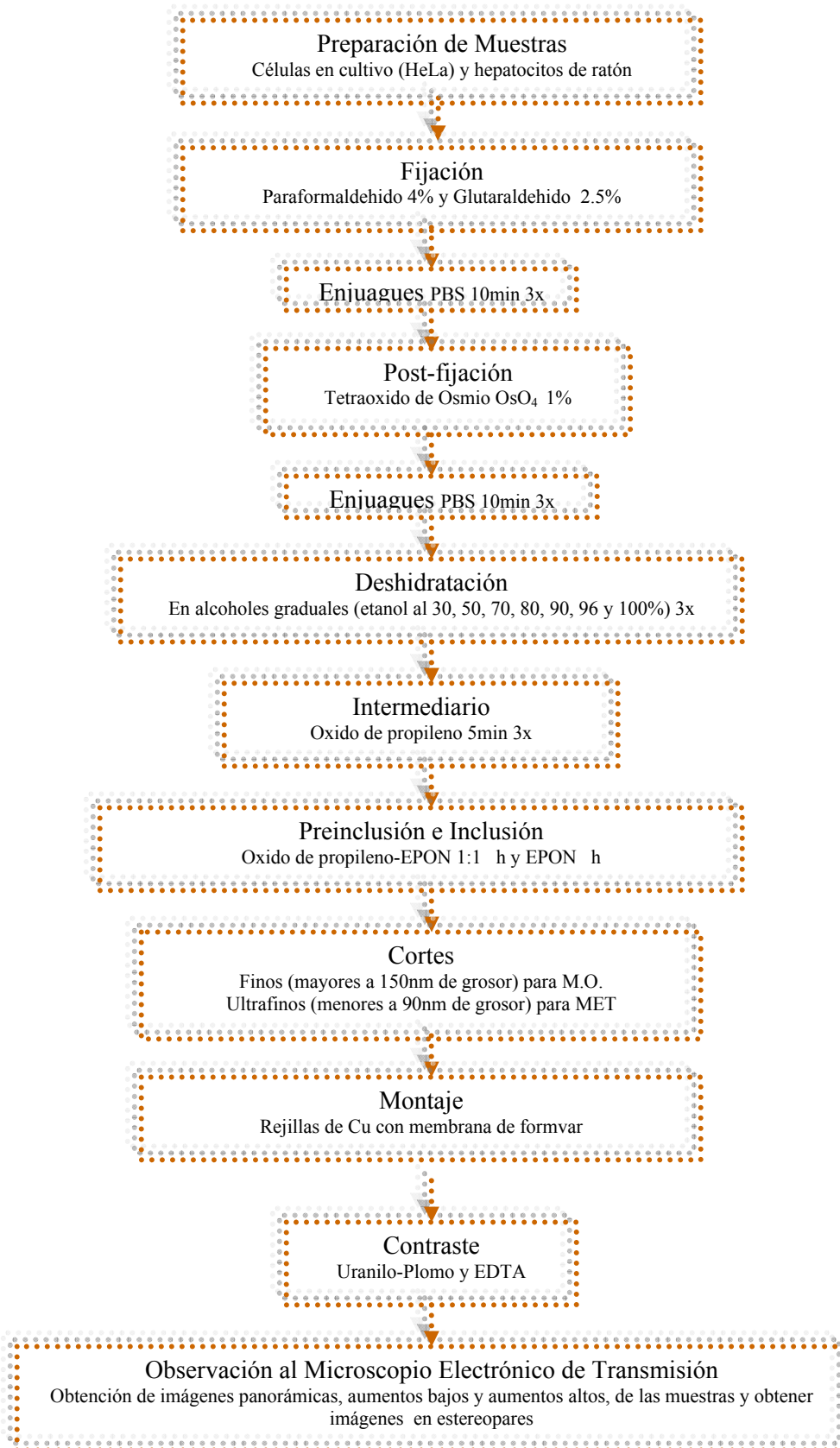
Analizar la relación espacial de los gránulos y las fibras en los cúmulos de los gránulos intercromatinianos

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar la distribución de los cúmulos de los gránulos intercromatinianos en el núcleo de células en cultivo y de tejido celular.

Observar la relación de gránulos intercromatinianos y fibras en hepatocitos de ratón y células HeLa por análisis de estereopares.

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

#### LÍNEA CELULAR HeLa

Se realizaron sub-cultivos de la línea celular HeLa en botellas de 80 cm<sup>2</sup>, empleando 17 mL de medio mínimo esencial modificado por Dulbelco (DMEM) complementado con 7% de suero fetal de bovino, como medio de crecimiento. Se incubó a 36.5 °C, hasta obtener una confluencia del 100 %. Una vez formada la monocapa.

#### Preparación de muestras para MET

A la monocapa de células se agrega con glutaraldehído al 2.5% preparado en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.3 durante 5min a temperatura ambiente, para fijar las células y preservar su estructura. Posteriormente la monocapa se desprendió de la botella de cultivo con ayuda de un gendarmen, para obtener una suspensión celular, la cual se pasó a tubos eppendorf y se centrifugaron para formar un botón celular.

Posteriormente se realizaron 3 lavados en PBS durante 5min cada uno y se hizo una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% por 30min a temperatura ambiente, se realizan de nuevo 3 lavados en PBS durante 5min cada uno. La deshidratación se realizó en etanol a distintas diluciones (30, 50, 70, 80, 90 y 96%) durante 5min en cada uno y luego se paso a 3 series de etanol absoluto durante 5min en cada uno. Una vez terminada la deshidratación se hicieron 3 cambios de óxido de propileno por 5min cada uno y se pre-incluyó en una mezcla de óxido de propileno y EPON 1:1 durante 24h.

Para la inclusión se sacan los tubos eppendorf con el EPON y se mantienen en hielo, se da un toque de centrífuga y del botón se toman pequeñas muestras del material con un aplicador y se pasan a los moldes de los bloques de inclusión y se llenan con la resina al ras de la capsula, posteriormente se dejan polimerizar durante 24h en una estufa a 60°C.

#### HEPATOCITOS DE RATÓN

Se sedó una rata en una cámara saturada con éter etílico y se realizó un corte en doble Y en la región del abdomen para extraer el hígado, mientras la rata sigue viva para evitar que el tejido se deteriore por anoxia. De inmediato se pasa el hígado a una

solución de PBS, para enjuagar los restos de sangre y después se pasó a una solución fijadora de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4%. Se procedió a cortar cubos de tejido de 1mm<sup>3</sup> o menores, los cuales se pasaron a una solución de fijación de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% y fueron almacenados a 4°C durante hora y media. Posteriormente se lava el material en tres enjuagues con PBS durante 5min en cada uno.

En este punto se tomaron dos grupos de material biológico uno se sometió a un proceso de post-fijación con tetraóxido de osmio y el resto del material no. El material que no fue post-fijado, paso directamente al proceso de deshidratación.

Para las muestras a las que se les realizó post-fijación se empleó tetraóxido de osmio al 1% en PBS (1:1) durante 30min y luego se lavados tres veces en PBS durante 5min cada uno.

Para el proceso de deshidratación se introdujo el tejido en una serie de etanol al 70, 80 y 96% durante 10min en cada uno y luego se realizaron dos pases en etanol absoluto, durante 10min en cada uno. Luego se pasó el tejido a un doble pase de óxido de propileno de 10min en cada uno. Para la pre-inclusión, se metieron los cortes en una mezcla 2:1 de óxido de propileno-EPON durante 24h, luego a una mezcla 1:1 de óxido de propileno-EPON por 24h y finalmente se incluyó en EPON, durante 24h en una estufa a 60°C.

## CORTE

Tanto para las células en cultivo, como para el tejido de ratón, se realizó el mismo procesamiento en los cortes, realizados con ultramicrotomo a temperatura ambiente y cuchillas de vidrio.

a) Se realizaron cortes semi-finos (mayores a 150nm) para teñir con azul de toluidina y ser observados por microscopia óptica.

b) Se realizaron cortes ultra-finos (menores a 90nm) dorado claros y plateados para ser contrastados con técnica de uranilo-plomo y EDTA para posteriormente ser observados por microscopía electrónica de transmisión.

## MONTAJE

Se emplearon rejillas de cobre de número de mesh variable, con película de formvar, para montar los cortes obtenidos por ultramicrotomo y se almacenaron los cortes en cajas de petri con una base de papel secante y debidamente rotuladas.

## CONTRASTE

### **a) Para los bloques con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) se emplea un contraste de Uranilo-Plomo**

Se coloca un trozo de parafilm en una caja de petri con ambiente húmedo y sobre ella se coloca una gota de acetato de uranilo. Se coloca la rejilla con la muestra del lado de la muestra en contacto con la gota durante 20min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Se enjuaga la rejilla con agua destilada en abundancia para retirar el exceso de uranilo. Se coloca la rejilla en contacto con una gota de citrato de plomo durante 10min y finalmente se enjuaga con abundante agua destilada para eliminar el exceso de plomo.

### **b) Para los bloques sin tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) se emplea la técnica para RNP a base de ácido etilen diamino tetracético (EDTA)**

Se coloca un trozo de parafilm en una caja de petri y sobre ella se coloca una gota de uranilo alcohólico y se coloca la rejilla con la muestra del lado de la muestra en contacto con la gota durante 10min a temperatura ambiente y protegida de la luz, luego se repite la operación en acetato de uranilo 10min en las mismas condiciones. Se enjuaga la rejilla con agua destilada en abundancia para retirar el exceso de uranilo. La rejilla pasa a una gota de EDTA y se deja durante 18min, se enjuaga la rejilla y se pone en contacto con una gota de citrato de plomo durante 3min y finalmente se enjuaga con abundante agua destilada para eliminar el exceso de plomo.

Todas las rejillas ya contrastadas y secas se almacenaron en un porta-rejillas debidamente rotulado, para su posterior observación al MET.

## 6.2 TOMA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS

Se tomaron imágenes por microscopía óptica, para revisar las condiciones del material celular y seleccionar la zona de tallado de las pirámides para realizar posteriormente los cortes ultrafinos con el ultramicrotomo.

La toma de imágenes por MET se realizó en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operado a 80kV. Para el registro de imagen se empleó la cámara MTI modelo CCD-300-RC, utilizando el programa Scion Image for Windows para TEM camera y las imágenes se capturaron en formato TIF y se procesaron en Power Point..

La toma de imágenes se dividió en tres:

- a) Toma de imágenes panorámicas de la muestra a bajos aumentos, con el fin de localizar los cúmulos de gránulos intercromatinianos, su forma y distribución en el núcleo.
- b) Toma de imágenes a grandes aumentos, para analizar la relación de los gránulos intercromatinianos y las fibras.
- c) Toma de imágenes con ángulos de inclinación, para analizar la relación de elementos fibrilares y granulares en tres dimensiones, con auxilio de un goniómetro integrado al MET de JEOL/JEM-1010.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Observación por microscopía óptica.

Por microscopía óptica, se reconocieron las estructuras principales de las células HeLa y de los hepatocitos de ratón, empleando una tinción de azul de toluidina.

Los cortes semi-finos de ambos grupos celulares, se realizaron para ubicar la mejor zona donde se pudieran realizar los cortes ultrafinos a emplear para MET y para revisar que las condiciones de conservación de la ultraestructura celular fueran las adecuadas para los estudios por microscopía electrónica de transmisión.

Las células de hígado de ratón (fig. 1-A), se obtuvieron a partir del procesamiento de tejido hepático. Se puede apreciar una morfología uniforme en forma de gota dentro del tejido, (A) también se observa la presencia de núcleos redondos y de 2 a 3 pequeños nucleolos (a). En el caso de las células HeLa (fig.1-B), presenta una morfología alargada y semi-estrellada, con la presencia de macronúcleos y con un número variable de nucleolos presentes en cada célula, lo que nos indica el estado patológico de la célula, dado que estas células corresponden a una línea celular de cáncer cervicouterino.

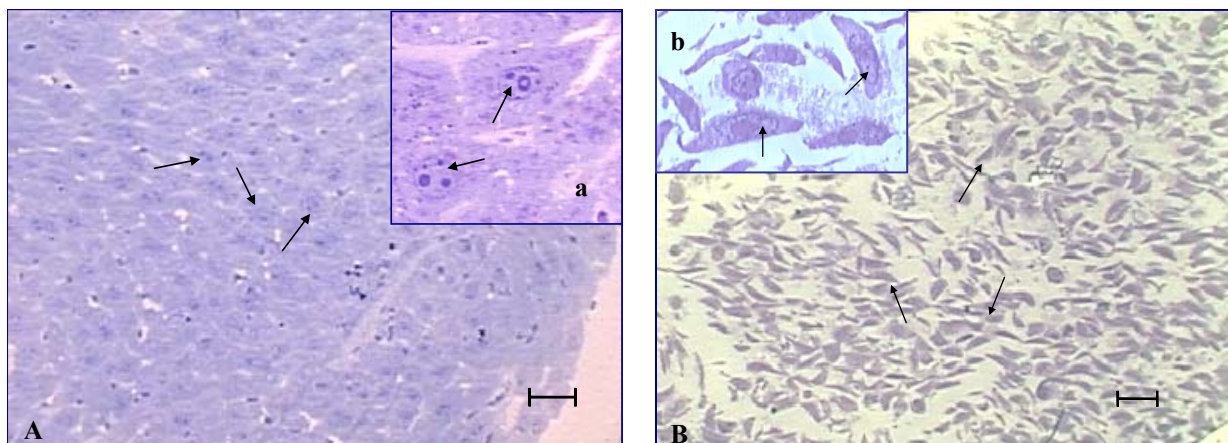


Figura 1. Micrografía óptica de tejido de hígado de ratón (A), donde se aprecia a detalle un hepatocito (a), indicando la región del nucleoplasma (flecha) dentro del núcleo. (B) corte semi-fino de un cultivo de la línea HeLa, teñida con azul de toluidina, se observan como rasgo característico macro núcleos y en algunos casos la presencia de dos o más nucleolos. También se observa una morfología alargada y la región del nucleoplasma señalada por una flecha (b). Barra: 120 $\mu$ m.



## 7.2. Observación por microscopía electrónica de transmisión.

Una vez seleccionada la zona de estudio, se obtuvieron cortes ultrafinos de entre 60 y 90nm de grosor de células HeLa en cultivo, estos cortes se contrataron por la técnica de acetato de uranilo y citrato de plomo con el fin de visualizar estructuras ribonucleoprotéicas, como GIC presentes en el núcleo.

En la imagen panorámica de una célula HeLa (fig. 2) se observan algunas estructuras principales de la célula como la membrana plasmática, el citoplasma, el núcleo con un aspecto alargado donde contiene un cúmulo importante de GIC, los que se caracterizan por poseer una textura granular con un contraste más homogéneo en comparación del resto del nucleoplasma y al nucleolo, que aparece como una región

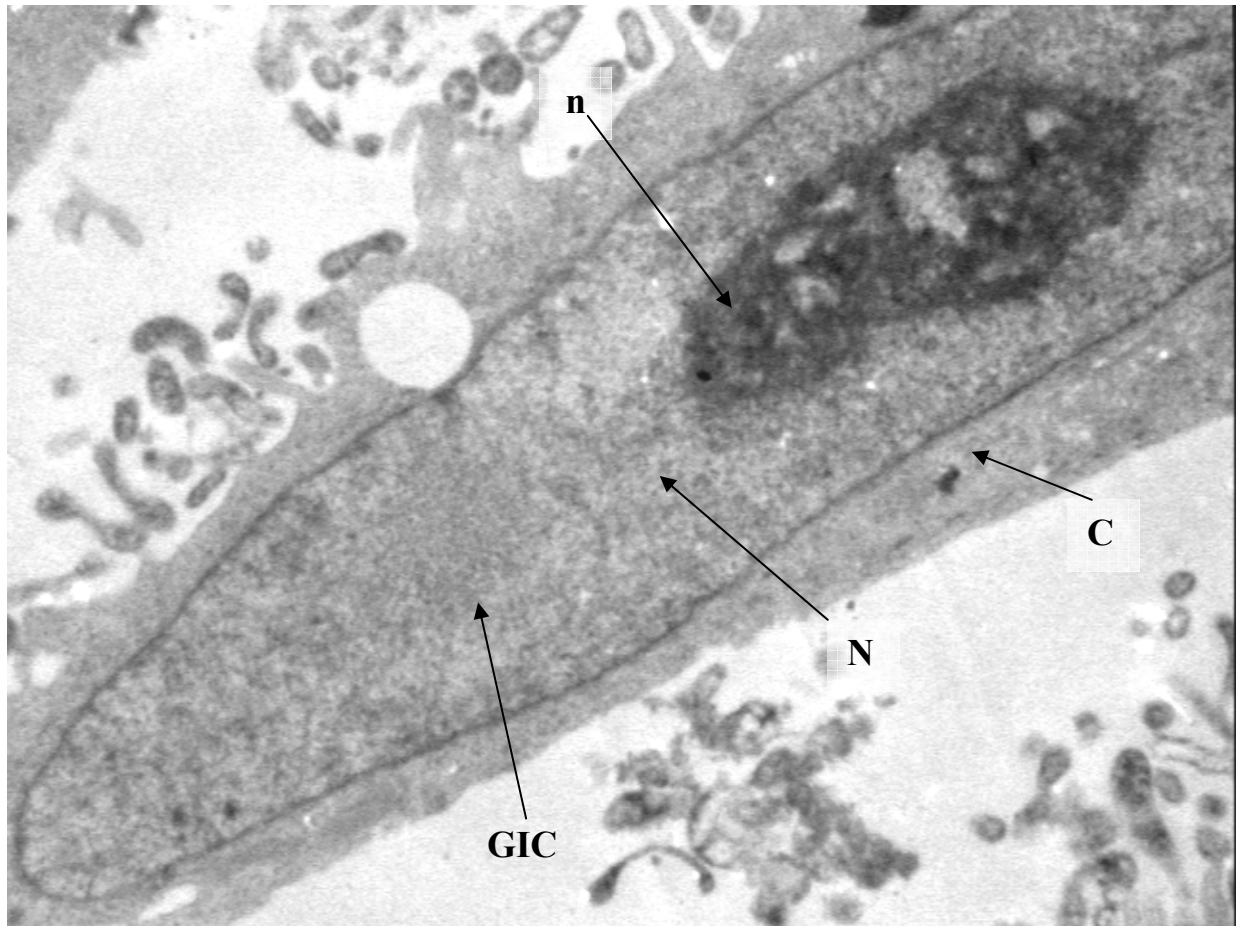


Figura 2. Micrografía electrónica estándar de una célula de la línea celular HeLa contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. Presenta un núcleo alargado (N), un nucleolo compacto de forma ovoide (n) y un cúmulo de gránulos intercromatinianos (GIC), rodeados por nucleoplasma y fuera de la envoltura nuclear el citoplasma (C).

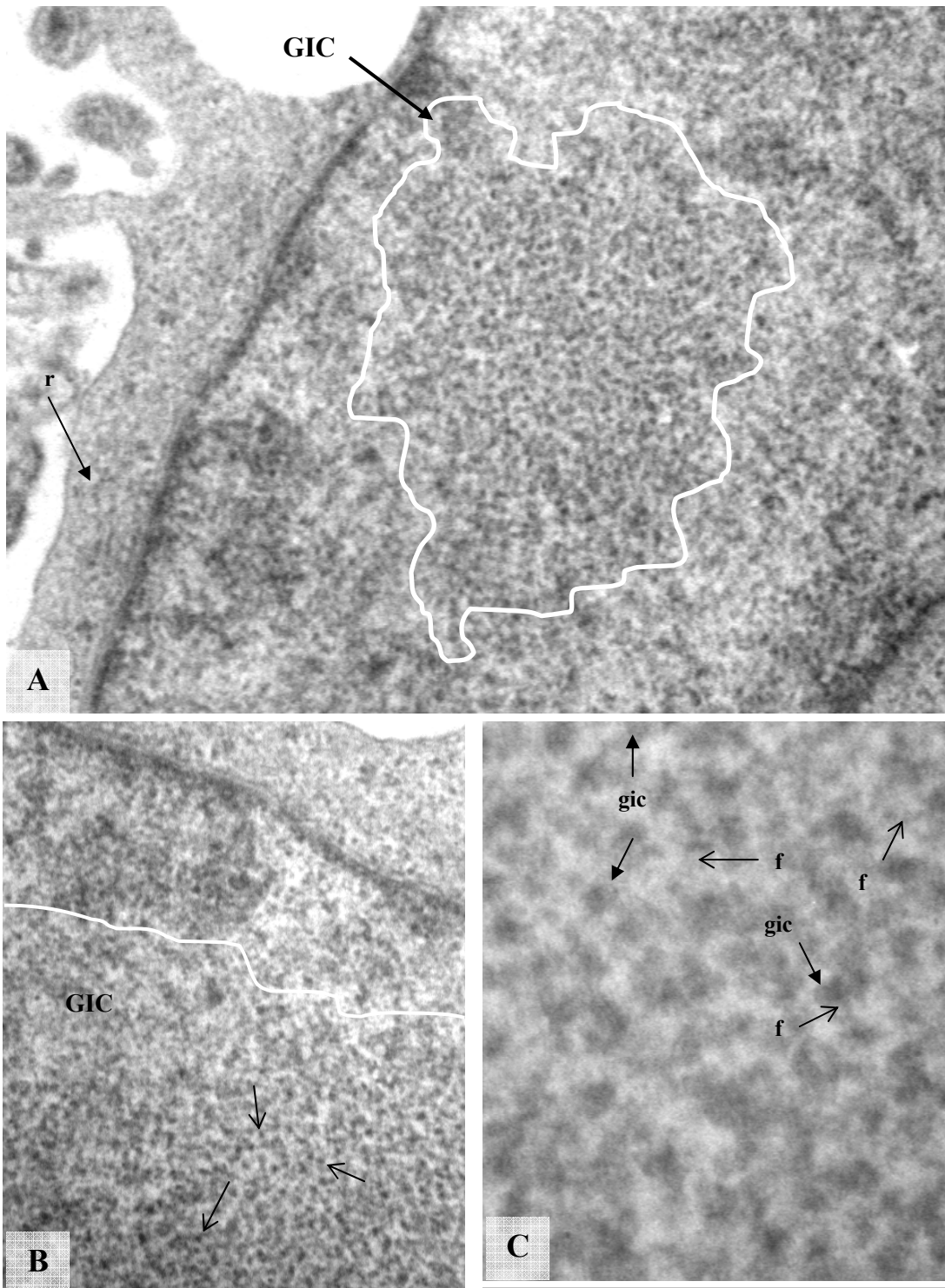


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión de núcleo de célula HeLa contrastada con acetato de uranilo y citrato de plomo. (A)Aspecto granular el que presentan los cúmulos de gránulos intercromatinianos delimitados por una línea blanca (GIC). (B)Comparación entre los gránulos intercromatinianos y los ribosomas(r) presentes en el RER. (C)Detalle a grandes aumentos donde se observan gránulos intercromatinianos (gic) y la presencia de fibrillas (f) a las que se encuentran asociadas. (Magnificación de 30, 50 y 150 kV respectivamente)

ovoide con alto grado de compactación, donde pueden apreciarse algunos intersticios en su interior.

En imágenes a bajos aumentos (fig. 3-A y 3-B) se observa un cúmulo de GIC como una región homogénea y granular y es posible visualizar la similitud en contraste y dimensiones que existe entre los gránulos intercromatinianos y los ribosomas que se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso (RER) pero a aumentos mayores (fig. 3-C) es posible observar estructuras granulares unidas por los elementos fibrilares por lo que se establece la posibilidad de que los gránulos intercromatinianos y las fibras sean una estructura continua, sin embargo no es posible visualizar si existe o no una relación entre ambas estructuras, por lo que se tomaron estereopares con el MET.

Las imágenes de estereopares permiten al observador generar una imagen en tres dimensiones. Al observar ambas imágenes al mismo tiempo y posteriormente enfocar la visión entre ambas (\*), es posible generar un empalme espacial, lo que permite resaltar las zonas de claro oscuro y ver en relieve la imagen, como se observa en la figura 4, donde a distintos aumentos puede observarse el carácter tridimensional de las imágenes, mostrando que las estructuras granulares están embebidas en una matriz fibrilar, formando una especie de "collares de cuentas", unidos, aparentemente por estructuras fibrilares (marcadas por flechas) (fig. 4-C).

En la figura 5 se muestra que las estructuras granulares en la región granular del nucleolo, se parecen estructuralmente a los gránulos intercromatinianos. La comparación entre un cúmulo de gránulos intercromatinianos delineados con una línea blanca, cercanos al nucleolo delineado en negro, muestra que la única diferencia aparente es el grado de compactación y una mayor cantidad de elementos fibrilares en el cúmulo de GIC.

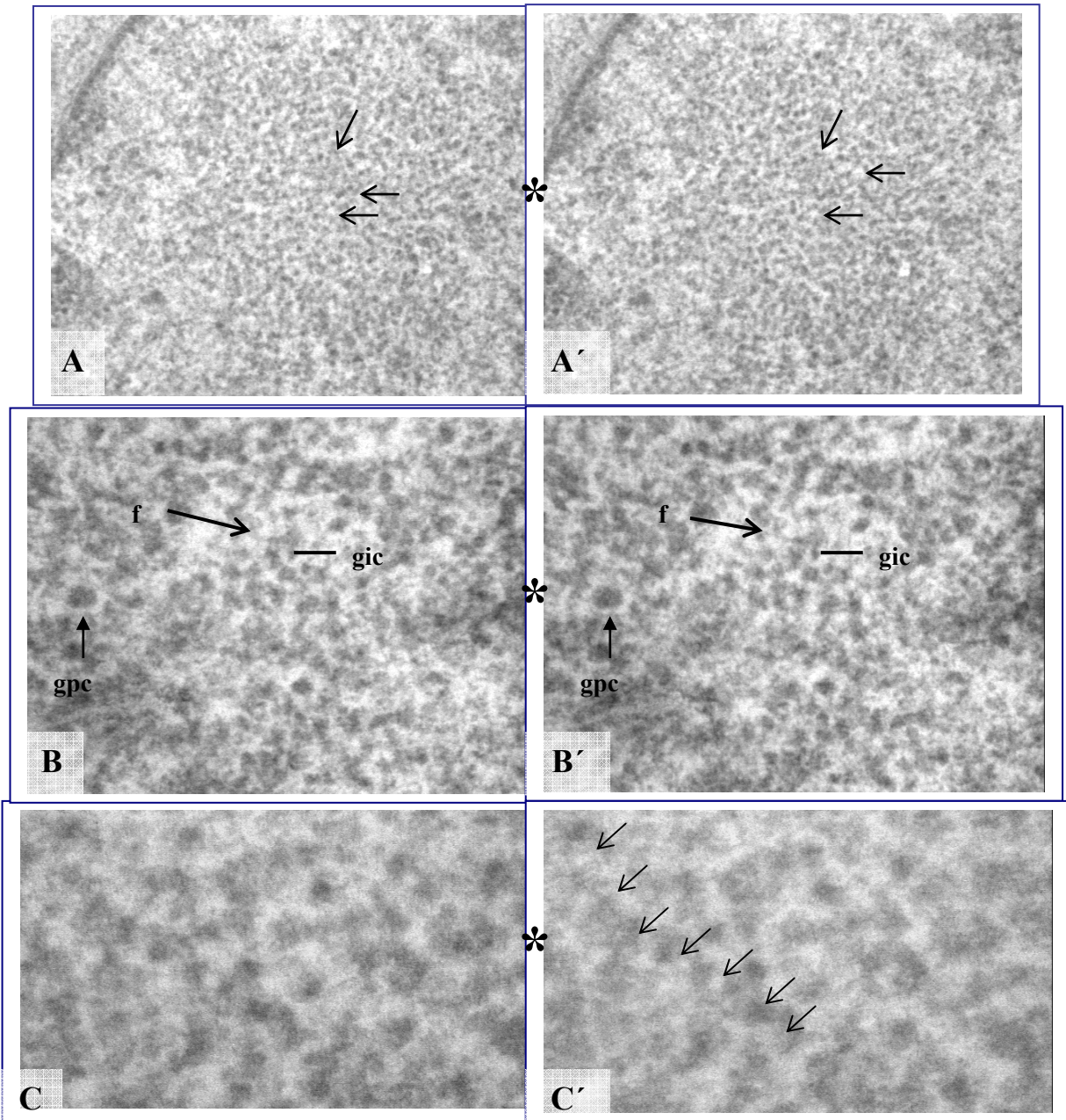


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión muestra imágenes estereopares de gránulos intercromatinianos en células HeLa. A y A' Cúmulo de gránulos intercromatinianos (50kV) con un ángulo de desplazamiento de  $10^{\circ}$  de la perpendicular. B y B' Imagen con un ángulo de  $5^{\circ}$ . Las flechas señalan gránulos individuales y se distinguen las estructuras fibrilares (f) y un gránulo pericromatiniano (gpc) (120kV). C y C', se observan las fibras (flecha) que conectan a los gránulos en un arreglo casi lineal (200kV). Para observar las imágenes en tres dimensiones, es recomendable observar cada par de imágenes concentrando el enfoque en la marca (\*).

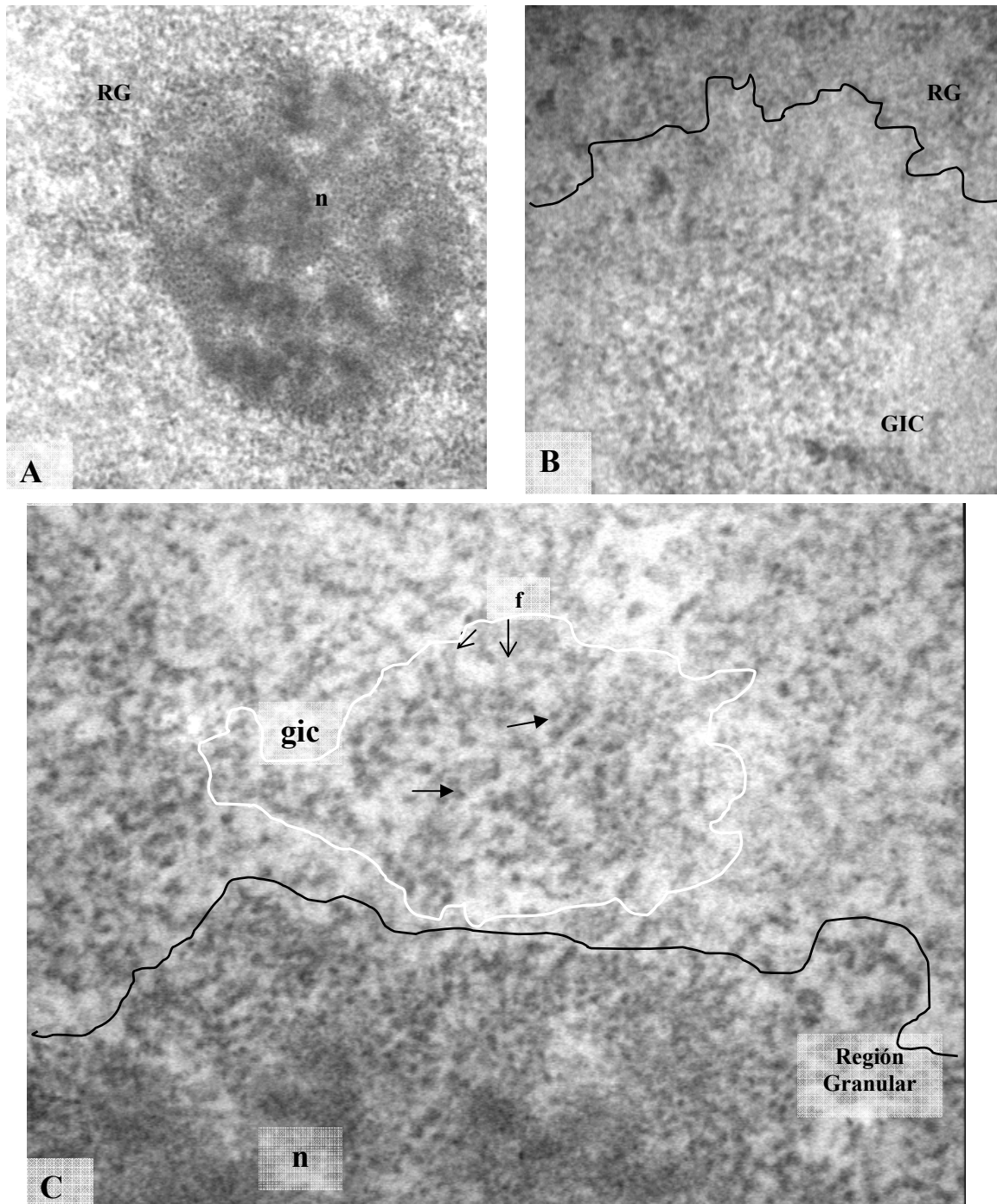


Figura 5. Comparación entre la zona granular del nucleolo y los gránulos intercromatinianos de hepatocito de ratón por microscopía electrónica de transmisión. A) Nucleolo con zonas de intersticios y subestructuras mas densas, hacia la periferia se distingue la región granular (RG) circundante (30kV). B) Detalle del cúmulo de gránulos intercromatinianos cercanos a la región granular delimitada en negro (50kV). C) Se observa la similitud entre las estructuras de la región granular (línea negra) con algunos gránulos intercromatinianos (gic), destacando la presencia de fibras (f) en el cúmulo GIC (línea blanca) (80kV). Contraste de acetato de uranilo y citrato de plomo.

En hepatocitos de ratón, se realizó una técnica de EDTA para confirmar que tanto las fibras como los gránulos corresponden a elementos ribonucleoprotéicos del cúmulo y destacar las conexiones que existen entre estas estructuras.

Dentro del núcleo de hepatocito de ratón, se observa una gran cantidad de cúmulos de GIC, los cuales varían en tamaño y tienen una forma muy heterogénea, lo que indica que la célula al momento del procesamiento tenía cierto grado de actividad de splicing (fig. 6). La variación en el tamaño de los cúmulos de GIC es muy marcada; algunos cúmulos presentan tamaños similares al nucleolo y algunos cúmulos son tan pequeños que poseen unos cuantos gránulos intercromatinianos (gic).

Gracias a la técnica de EDTA, se observa de forma más clara las conexiones presentes entre los gránulos intercromatinianos como parte de un complejo y la heterogeneidad de sus dimensiones (fig. 7-A). En imágenes estereopares (fig. 7-B y B') se observan, no solo las conexiones que se presentan entre los elementos granulares, sino los distintos niveles a los que se dan dichas conexiones y la superposición entre algunas de estas estructuras. La imagen 3D generada por las imágenes estereopares permite que se puedan realizar seguimientos de las "cadenas de cuentas" como la mostrada en la figura 8-A, delineada a partir del análisis de las imágenes 8-B y B'.

Como resultado de las observaciones de imágenes estereopares a altos aumentos, también nos percatamos de que el acomodo de las cadenas de cuentas, varían dependiendo de la heterogeneidad de las estructuras granulares y fibrilares que la componen. En segmentos en los que los gránulos intercromatinianos, presentan un contraste más uniforme, al igual que las fibras, el conjunto se mantiene con una forma lineal, mientras que, en el caso de gránulos intercromatinianos de distinto tamaño y grado de compactación, la cadena de cuentas está curvada y presenta algunos rizos. Otra característica en esta última estructura es que el grosor de las fibras varía de gránulo a gránulo, así como la distancia entre los mismos, como se observa en la figura 8-B y B' y 8-C y C'.

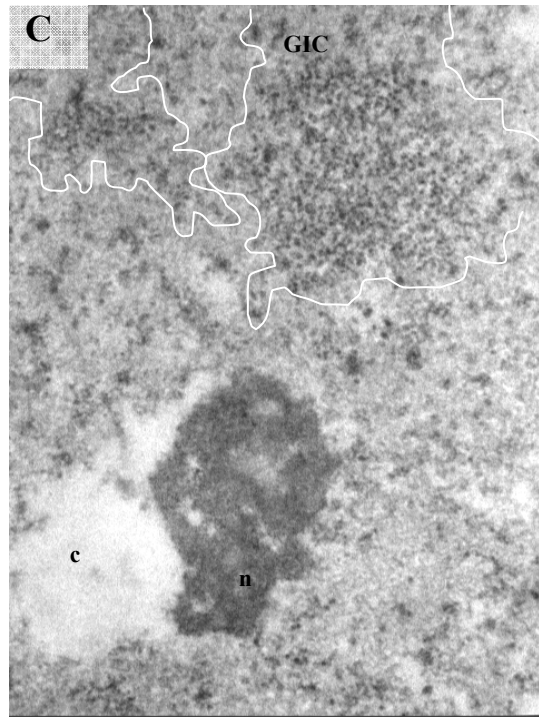
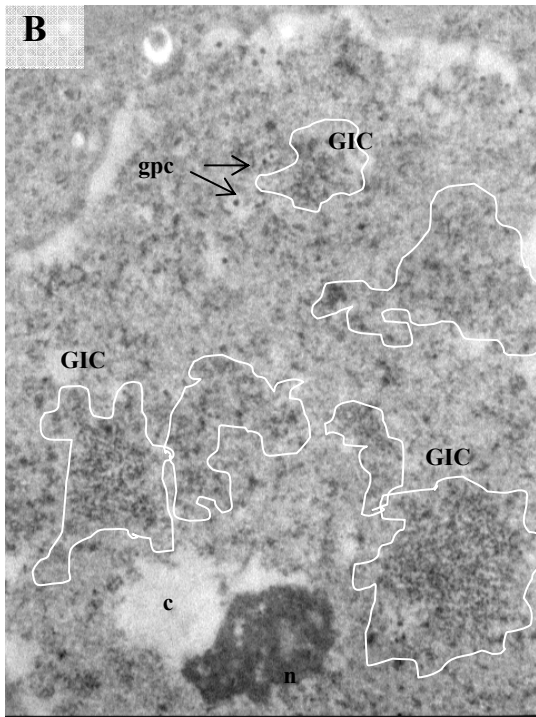
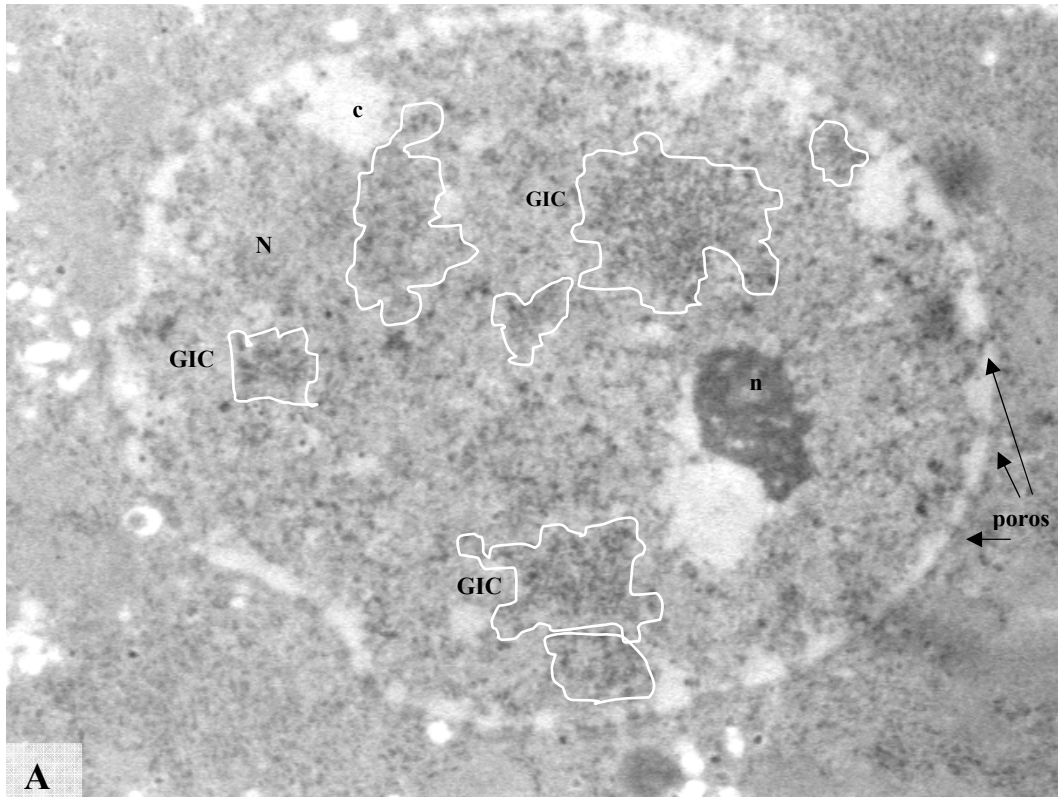


Figura 6. Micrografía electrónica de la distribución de gránulos intercromatinianos (GIC) en núcleo de hepatocito de ratón con EDTA. A) Cúmulos GIC, en el núcleo (N) celular. Se observa un nucleolo (n) rodeado parcialmente por cromatina (c) y hacia la zona de la membrana nuclear, se aprecian algunos poros que comunican al núcleo con el citoplasma (10kV). B) Morfología y tamaño irregular entre los cúmulos de gránulos intercromatinianos. También note la diferencia de tamaño entre los gránulos intercromatinianos y los gránulos pericromatinianos (gpc) (15kV). C) Detalle de irregularidad en la forma de cúmulo de gránulos intercromatinianos, delimitado por una línea blanca (25kV).

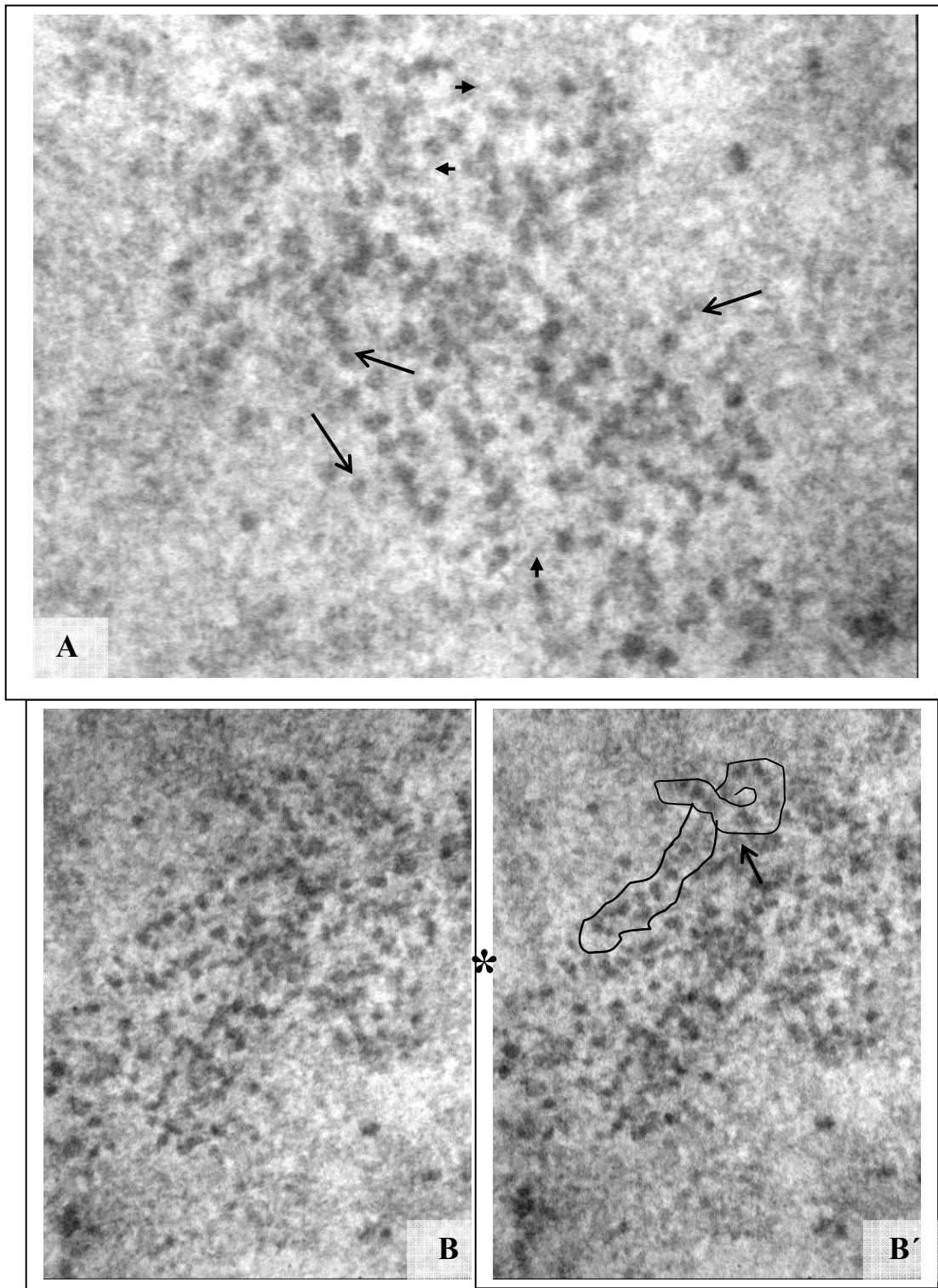


Figura 7. Micrografía electrónica de asociación de elementos fibrilares y gránulos intercromatinianos en hepatocito de ratón. A) Con flechas se marcan gránulo intercromatinianos con distinto contraste y las fibras (cabeza de flecha)(120kV). B y B' imágenes estereopares de la imagen anterior, donde se observa la organización de algunos gránulos intercromatinianos delineados con una línea negra, resaltando los distintos planos de la imagen al ver que un segmento de fibras y gránulos pasa por encima de otro (flecha) B' (100kV). Para observar las imágenes en tres dimensiones, es recomendable observar cada par de imágenes concentrando el enfoque en la marca (\*).



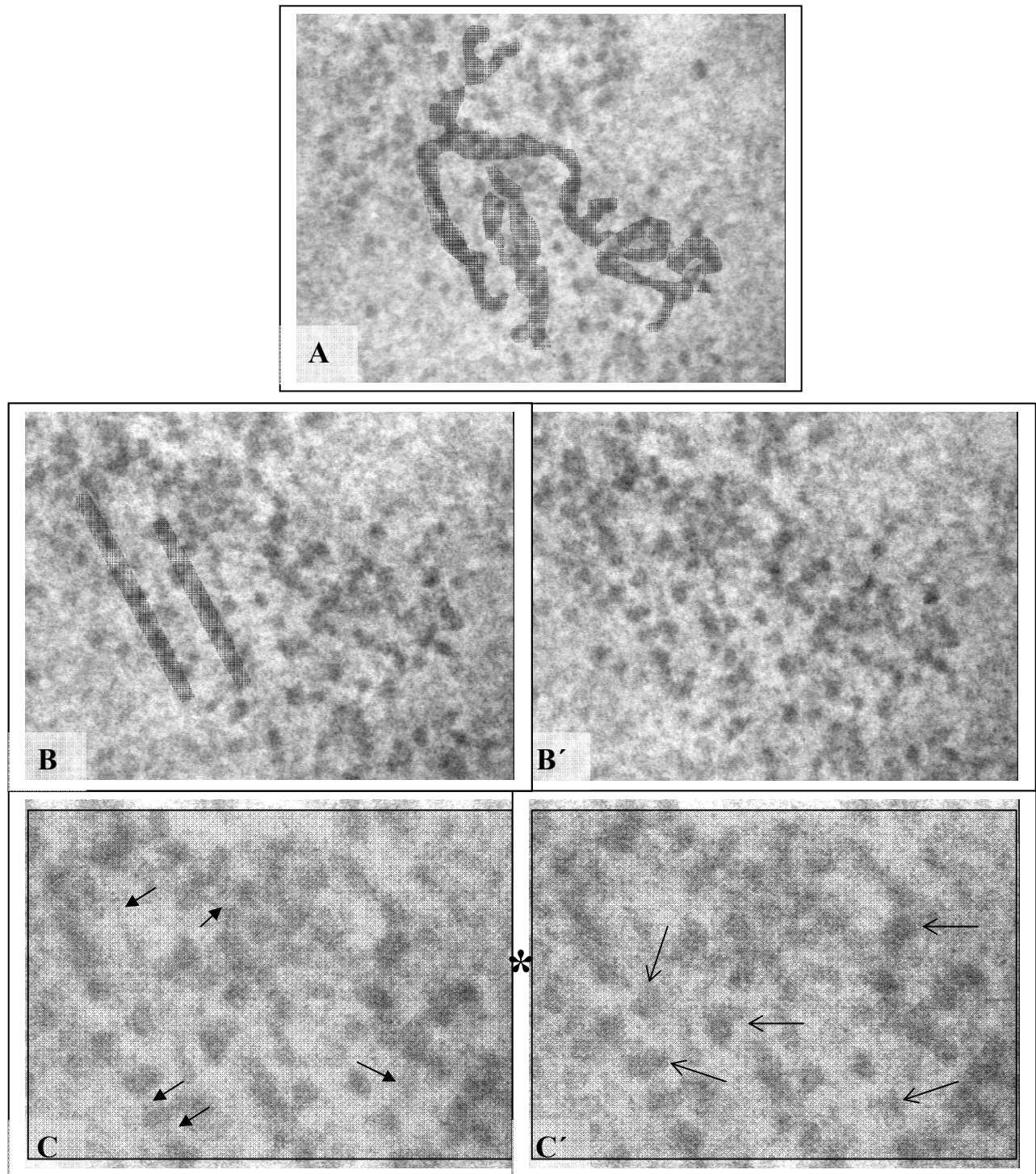


Figura 8. Micrografía electrónica de conexiones fibrilares entre gránulos intercromatinianos. A) Micrografía con montaje digital de regiones continuas de gránulos intercromatinianos y conexiones fibrilares a partir de las imágenes estereopares B y B' (100kV). B también muestra la linealidad que existe en gránulos de la misma densidad y tamaño a diferencia del resto del cúmulo. C y C' imagen estereopar a grandes aumentos donde destacan los distintos grosores de los elementos fibrilares C (flechas) y la diferente densidad y forma de los gránulos intercromatinianos C' (líneas) (150kV) así como la presencia de conexiones fibrosas entre gránulos (250kV).

A partir del análisis de las imágenes estereopares, que muestran posibles conexiones entre las estructuras granulares y fibrilares puede esbozarse un modelo de estas cadenas de cuentas de gránulos intercromatinianos (fig.9).

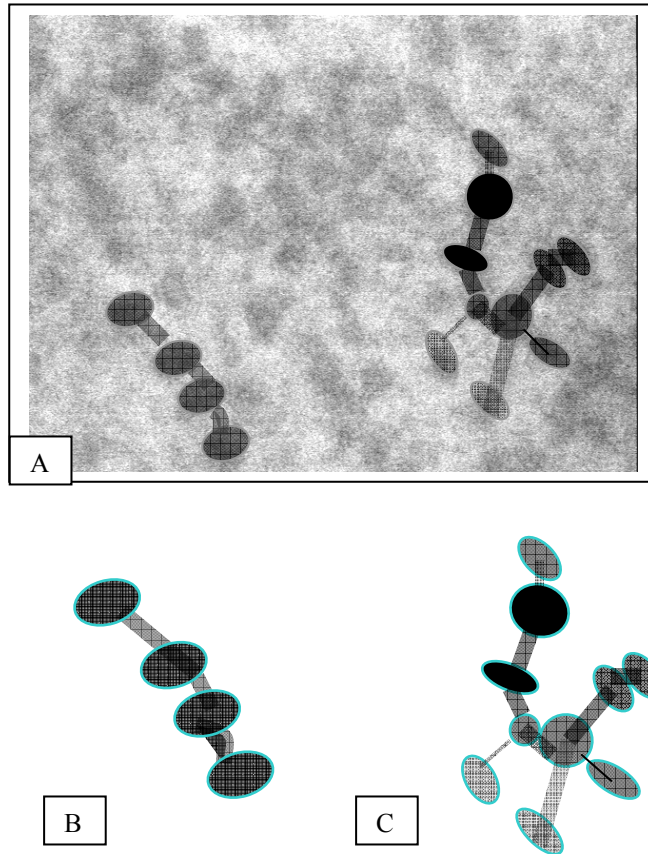


Figura 9. Esquema de arreglo entre gránulos intercromatinianos y cuerpos fibrilares. A) Micrografía electrónica empleada como plantilla de diseño de los dos arreglos principales de las cadenas de cuentas de gic. B) Estructura lineal de gránulos intercromatinianos con morfología uniforme, al igual que las fibras que lo unen. C) Estructura irregular de la cadena de cuentas de los gránulos intercromatinianos con heterogeneidad de tamaños y grado de compactación, unidas con estructuras fibrilares de distintos grosores.

Tomando en cuenta las características morfológicas, como la diferencia de tamaños, formas y estados de condensación en los gránulos, y los diversos grosores y longitudes entre gránulo y gránulo presentes en las fibras, se propone que estas cadenas de cuentas son una estructura dinámica a partir de la cual se forman los gránulos intercromatinianos y que su estructura precursora podrían ser las estructuras fibrilares.

## 8. DISCUSIÓN

En los cúmulos de los gránulos intercromatinianos los elementos fibrosos y granulares se conectan en varios puntos. En efecto, en un cúmulo, a grandes aumentos se observan en imágenes bidimensionales, conexiones entre gránulos y fibras con la técnica estándar para microscopía electrónica de transmisión. En imágenes estereopares, por el espesor del corte las conexiones se observan a varias profundidades y asociadas con gránulos de formas y tamaños ligeramente diferentes.

Con la técnica del EDTA se confirma que tanto las fibras como los gránulos corresponden a elementos ribonucleoprotéicos del cúmulo.

Tanto en células humanas en cultivo de la línea celular HeLa como en los hepatocitos de ratón se presentaron resultados similares.

Por otro lado el número de cúmulos de gránulos intercromatinianos (GIC) y su forma presenta heterogeneidad que debido al poco muestreo en este trabajo, no revela un patrón definido. Sin embargo, la forma irregular de los cúmulos, indica que las células estudiadas presentan una actividad de splicing moderada o intensa.

Asimismo, se resalta la observación de que en un cúmulo, el tamaño de los gránulos intercromatinianos individuales no parece homogéneo, lo que sugiere que su formación sea dinámica en el interior del cúmulo y su forma precursora sea el elemento fibrilar.

## 9. CONCLUSION

El empleo de la técnica de reconstrucción tridimensional por estereopares, es útil para visualizar la presencia de relación o conexiones entre las fibras y los gránulos intercromatinianos, sin embargo, con estos resultados no es posible conocer si los factores de splicing se encuentran en los gránulos intercromatinianos o en las fibras, por lo que es recomendable el empleo de técnicas de hibridación in situ ultraestructural, para conocer de manera precisa los sitios de maduración.

En cuanto al estudio de los cúmulos de los gránulos intercromatinianos y la heterogeneidad en su forma y número en el núcleo, se considera es necesario aumentar el valor de la muestra para poder determinar si se presenta algún patrón respecto a estas características.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1: Antecedentes de células HeLa y hepatocitos de ratón.

#### Antecedentes históricos de línea celular HeLa

La línea celular HeLa se ha empleado como modelo de estudio por ser una de las líneas celulares más estudiadas.

El 1° de Febrero de 1951 llegó al departamento de Ginecología de la Universidad John Hopkins, Baltimore, EE.UU., una paciente de 31 años, madre de cinco niños, que presentaba una lesión uterina de unos 2cm de diámetro. La palpación y sintomatología hicieron pensar en un chancro sifilítico, pero la biopsia posterior reveló la existencia de un carcinoma.

Antes de comenzar con la radioterapia, se le envió al doctor George Gey una biopsia de la paciente -Henrietta Lacks - identificada como HeLa por las primeras sílabas de su nombre y apellido. A partir de esta muestra, se describieron algunas de sus características morfológicas, donde se determinó que presentan un tamaño de 14 a 16  $\mu\text{m}$  con un volumen de  $1,200\mu\text{m}^3$  y es el primer cultivo in vitro de tiempo indefinido de una línea de células provenientes de un carcinoma humano lo que aseguró a Lacks, quien murió ocho meses después víctima de metástasis múltiples, una "inmortalidad" que ya alcanza los cuarenta y siete años.

El trabajo original de George Gey indicaba que "se había establecido una línea celular de carcinoma epidermoide", aunque años después, Howard W. Jones, en un re-examen de las muestras originales de la biopsia, estableció que en realidad se trataba de un adenocarcinoma. HeLa es una de las líneas celulares más estudiadas en el mundo y más citada en la literatura científica; ha contribuido a la exploración de los requerimientos nutritivos de la célula animal y a los explosivos avances efectuados en biología celular y molecular.

### ANEXO 2: Preparación de soluciones

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agredano-Moreno L., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C. y Vázquez Nin G.H., Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*, Biol.Cell, 82: 177-184, 1994.
- [2] Esquivel C., Vázquez Nin G.H. y Echeverría O.M., Evidence of repetitive patterns of chromatin distribution in cell nuclei of rat liver, Acta Anat., 136: 94-98, 1989.
- [3] Fakan S. y Bernhard W., Localization of rapidly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography, Exp. Cell Res., 67: 129-141, 1971.
- [4] Hernandez-Verdun D., Roussel P. y Gébrane-Younés J., Emerging concepts of nucleolar assembly, J. Cell Sce., 155: 2265-2270, 2002.
- [5] Jiménez-García L.F., Agredano-Moreno L., Segura-Valdez L., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C.H. y Vázquez Nin G.H., The ultrastructural study on the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* reveals a non-typical extranucleolar particle, Biol.Cell, 75: 101-110, 1992.
- [6] Jiménez-García L.F. y Merchant H., Biología Celular y Molecular, Prentice Hall, 1ªed. 2003, México.
- [7] Jiménez-García L.F. y Spector D., In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanisms, Cell, 73: 47-59,1993.
- [8] Lamond A.I. y Earnshaw W.C., Structure and function in the nucleus, Science, 280: 547-553, 1998.
- [9] Mintz P.J., Patterson S.D., Neuwald A.F., Spahr C.S. y Spector D.L., Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters, EMBO J., 18: 4308-4320, 1999.

[10] Monneron A. y Bernhard W., Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells, *J.Ultrastruct. Res.*, 27: 266-288, 1969.

[11] Scheer U. y Hock R., Structure and function of the nucleolus, *Cell biol.*, 11:385-390, 1999.