



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**



Estructura del núcleo celular de *Araucaria heterophylla*  
(Araucariaceae) con Microscopía electrónica de transmisión  
y Microscopía de fuerza atómica.

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ARISBETH GUADALUPE ALMEIDA JUÁREZ

Director de Tesis:

Dr. Luis Felipe Jiménez García



Los Reyes Iztacala, Estado de México

2014



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.

*A mi familia:*

*Mi madre Carmen,  
Mis hermanos Alberto y Felipe,  
y a mi abuelita Albertina, a quien extraño  
y recuerdo con aprecio.*

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su  
laboratorio no es sólo un técnico:  
es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como  
un cuento de hadas”*

*Marie Curie*

Mi sincero agradecimiento:

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por dirigir esta tesis y por brindarme su apoyo, comprensión y enseñanzas para realizar este proyecto.

A la Dra. Lourdes Agredano por sus enseñanzas de microscopía electrónica y por aconsejarme en cualquier momento.

A Ernestina Ubaldo quien me apoyó para realizar la técnica de amina de osmio para tinción de DNA.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por otorgarme una beca en el último semestre del desarrollo de la tesis a través del proyecto PAPIIME, PE211412.

A mis compañeros y miembros de laboratorio, Carlos, Rubén, Damián, Florely, Reyna Lara y Anita, por su amistad y atenciones.

A mi familia, que me ha apoyado para culminar esta etapa importante de mi vida.

A todos mis profesores, amigos y a los tantos roomies con quienes he compartido experiencias, aprendizaje y diversión.

## INDICE

Introducción.....	6
Núcleo.....	6
Cromatina.....	7
Nucléolo .....	9
Gránulos de Lacandonia.....	9
<i>Araucaria heterophylla</i> .....	10
Ultraestructura celular.....	12
Microscopía Electrónica de Transmisión.....	12
Microscopía de Fuerza Atómica.....	14
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	18
Materiales y métodos.....	19
Resultados y discusión.....	26
Conclusiones.....	45
Referencias.....	46

## **ABREVIATURAS**

AFM - microscopio de fuerza atómica

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilendiaminotetra-acético

GL - gránulos de Lacandonia

MET - microscopio electrónico de transmisión

mRNA – ácido ribonucleico mensajero

RNPs – ribonucleoproteínas

rRNA – ácido ribonucleico ribosomal

# INTRODUCCIÓN

## Núcleo

El núcleo celular es el organelo membranoso más prominente de las células eucariotas, es el sitio de almacenamiento, replicación y expresión de la información genética (Koolman & Röhm, 2004; Spector, 2001). Contiene casi todo el DNA de la célula, que junto con las histonas y proteínas del citoesqueleto forma la cromatina (Koolman & Röhm, 2004).

El núcleo está organizado por dominios macromoleculares dinámicos involucrados en el metabolismo de DNA y RNA. Estos dominios están compuestos de cromatina, fibras y gránulos pericromatinianos, cuerpos espiralados y cuerpos nucleares; dominios que pueden ser visualizados por microscopía de luz y microscopía electrónica (Jiménez-García & Fragoso-Soriano, 2000).

A diferencia del núcleo de animales, el núcleo de plantas ha sido relativamente menos estudiado que cualquier otro organelo celular, probablemente porque se asume que los núcleos de plantas y animales son similares (Vaughn, 2013). Sin embargo la organización macromolecular del núcleo en plantas, permite reconocer dos tipos nucleares que se identifican por los patrones de la disposición de la heterocromatina; el núcleo cromocéntrico y el reticulado (Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1992).

El núcleo cromocéntrico (figura 1a) se encuentra en plantas del tipo procromosomal (p.ej. *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*), en el cual, durante la telofase, los cromosomas casi pierden su contorno, lo que forma masas irregulares de cromatina (Busch, 1974). Por otra parte, el núcleo reticulado (figura 1b) es generalmente encontrado en plantas con cromosomas largos (p. ej. *Allium cepa*, *Vicia faba*), donde todo el DNA está en una disposición de hebras de eucromatina densas (Busch, 1974).

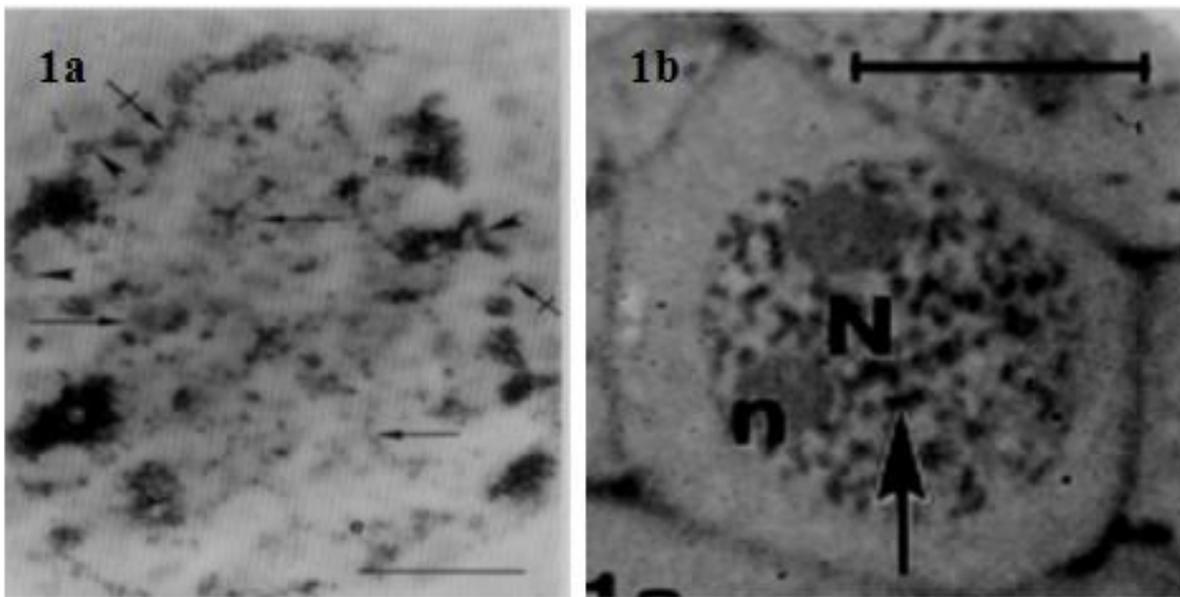


Figura 1. (1a) Núcleo cromocéntrico de *Chiranthodendron pentadactylon* (Echeverría *et al.*, 1999) se observa la cromatina en forma de manchones oscuros. (1b) núcleo reticulado de *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez *et al.*, 2002) la cromatina se encuentra en forma de redes.

### **Cromatina**

La cromatina es la región del núcleo donde se localiza el DNA y proteínas asociadas. La estructura de la cromatina es altamente compleja y dinámica (Saha *et al.*, 2006) donde la mayoría de las proteínas asociadas son histonas.

Las histonas son una familia de proteínas que están asociadas con el DNA nuclear y son estructuras de empacamiento (Kalle & Strappe, 2012). Existen cinco tipos de histonas tipificadas por la abundancia de lisina y arginina. A las histonas con alto contenido de lisina se les denomina H1; con poca lisina H2A y a las moderadamente ricas en lisina H2B. Las histonas ricas en arginina se denominan H3 y H4 (Alberts *et al.*, 2002).

Las proteínas de tipo no histonas que conforman a la cromatina son las encargadas de regular la transcripción, duplicación, reparación y recombinación del DNA (Watson *et al.*, 2006).

La cromatina se clasifica en dos grupos de acuerdo al nivel de condensación durante la interfase: heterocromatina y eucromatina (Spector, 1993).

Hay dos tipos de heterocromatina: *constitutiva* y *facultativa (inducible)*. Aunque ambos tipos pueden ser heredados a través de numerosas divisiones celulares, cada tipo tiene diferente arreglo y función. La heterocromatina constitutiva principalmente comprende elementos genéticos repetitivos, como los telómeros y centrómeros, que se localizan en la periferia nuclear. En contraste, la cromatina facultativa puede formarse en cualquier lugar del núcleo y su formación requiere silenciamiento de genes e inactivación de cromosomas (Obeordoerffer & Sinclair, 2007).

La eucromatina se encuentra dispersa en casi todo el núcleo, las fibras están empaquetadas de forma menos densa que los cromosomas mitóticos (Cassimeris *et al.*, 2011). La eucromatina es transcripcionalmente activa y comprende aquellos genes que la célula necesita transcribir activamente (Jiménez-García & Merchant, 2003; Spector, 1993).

### **Nucléolo**

El nucléolo es el sitio de síntesis y procesamiento de rRNA (Spector, 1993). Es el compartimento intranuclear más evidente y con mayor número de ribonucleoproteínas conocidas. En células eucariontes en el nucléolo ocurre la biogénesis y ensamble de las subunidades del ribosoma (Segura-Valdez *et al.*, 2013; Spector, 1993).

### **Gránulos de Lacandonia (GL)**

En la estructura de la célula vegetal, una nueva ribonucleoproteína (RNP) denominada como gránulo de Lacandonia (GL) está presente entre las hebras de cromatina compacta de *Lacandonia schismatica* y especies afines como *Triuris brevistylis*, *T. alata* (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994) y *S. spruceanum* (Zamora-Cura, 2006)

Los GL son ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro, su tamaño y distribución intermedia es semejante a los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos encontrados en células animales (Agredano-Moreno & Jiménez-García, 2000).

Estos gránulos contienen poli (A)+ RNA como los gránulos pericromatinianos

(Visa, *et al.*, 1993) lo que da soporte a que estas partículas pudieran contener mRNA. (Vazquez-Nin & Echeverría, 1996). Así mismo, contienen proteínas SR, una familia de proteínas relacionadas con los procesos de splicing y post- splicing (Manley & Tacke, 1996) y tienen una asociación con fibras de la cromatina (Agredano-Moreno *et al.*, 1994).

Posteriormente, la presencia de estos gránulos en *Gingko biloba* (Jiménez-Ramírez *et al.*, 2002), indica que su distribución en los diferentes grupos de plantas puede ser mayor.

Se ha reportado que los gránulos de Lacandonia también se localizan en las angiospermas *Illicium floridanum*, *Pelargonium hortorum* (Guzmán-López, 2003) *Aloe vera* y *Tulipa* sp y en gimnospermas como *Taxodium mucronatum* (Alonso-Murillo, 2008) algunas especies del género Equisetum (Jiménez-Ramírez. Tesis sin publicar) y helechos *Adiantum capillus veneris* (Romero-Martínez, 2010).

### ***Araucaria heterophylla***

*Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco, conocida comúnmente como Araucaria (figura 2), es una gimnosperma nativa de la Isla de Norfolk en el Océano Pacífico (Ntima, 1968) Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Araucariaceae

Género: *Araucaria*

Especie: *A. heterophylla*



Figura 2. Árbol de *Araucaria heterophylla*

Araucariaceae es una familia de plantas que data del período Triásico y se tipifica como una familia antigua de coníferas, por tal motivo los árboles de *Araucaria* son caracterizados como “fósiles vivientes” entre las coníferas (Kershaw & Wagstaff, 2001).

En la actualidad el género *Araucaria* incluye 19 especies, de las cuales 13 son endémicas de Nueva Caledonia, con otros seis grupos distribuidos a través la isla de Norfolk, al oriente de Australia, Nueva Guinea, Argentina, Chile y el Sur de Brasil (Kershaw & Wagstaff, 2001).

*A. heterophylla* (Salisbury, 1807) es un árbol columnar muy popular de uso ornamental y utilizado como árbol de navidad (Schans *et al.*, 2004). Estos árboles son visualmente llamativos y son importantes en plantaciones de algunos países y en la jardinería.

## **Ultraestructura celular**

La estructura detallada de un espécimen biológico como célula, tejido u órgano observado bajo el microscopio electrónico es conocida como ultraestructura (TAH, 2000). Para la observación detallada de la ultraestructura celular es indispensable la utilización instrumentos de alta resolución que permita obtener la información necesaria para describir partículas nanoscópicas como los GL.

## **Microscopio electrónico de transmisión**

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar una muestra delgada por una de sus caras, dando una imagen por electrones que emergen por la cara contraria (Vázquez-Nin & Echeverría, 2000); su resolución es de 2 nm.

Las principales partes que lo constituyen son:

- a) Columna (óptica electrónica)
- b) Sistema de vacío
- c) Sistemas de enfriamiento
- d) Corrientes de alimentación y sus controles
- e) Dispositivos de registro de la imagen

En microscopía electrónica de transmisión convencional (CTEM o TEM) la tensión de aceleración de instrumentos de rutina es de 100-200kV. Los electrones son emitidos en el cañón de electrones por un termoiónico, Schottky, o emisión de campo (Williams & Carter, 2009).

Tres o cuatro lentes en el condensador permiten la variación de la abertura de iluminación y el área de la muestra iluminada. La distribución de intensidad de electrones detrás de la muestra forma la imagen con un sistema de lentes, compuesto por tres a ocho lentes, en una pantalla fluorescente (Reimer & Kohl, 2008).

La imagen puede ser grabada por la exposición directa de una emulsión fotográfica o una placa de imagen dentro del vacío, o en formato digital a través de una pantalla fluorescente, junto con una placa de fibra óptica a una cámara CCD (Vázquez-Nin & Echeverría, 2000).

Los electrones interactúan fuertemente con los átomos de la dispersión elástica e inelástica. Por lo tanto, la muestra debe ser de un espesor muy fino, del orden de 5-100 nm para el haz de electrones de 100kV, dependiendo de la densidad y composición elemental del objeto y la resolución deseada. Se necesitan técnicas de preparación especial para este; electropulido y grabado por haz de iones en la ciencia de materiales y ultramicrotomía de tejidos teñidos y embebidos en resinas o criofijación en las biociencias (Reimer & Kohl, 2008).

## **Microscopía de Fuerza atómica**

El microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es un instrumento no óptico que posee un sistema de retroalimentación digital que puede realizar espectroscopia de fuerza sobre una muestra con el fin de trazar la rigidez local de la muestra, además de proporcionar su topografía (Elings *et al.*, 1993).

Se compone de un escáner tridimensional piezoeléctrico, de exploración, ya sea la muestra o un sensor de fuerza. El sensor de fuerza es un tipo de contacto con una punta montada sobre un voladizo y un sensor para detectar la deflexión de la palanca en la punta. La señal desde el sensor va a un convertidor A-D y luego es procesada para controlar el movimiento vertical de la muestra o el sensor (Elings *et al.*, 1993).

En la operación, las señales del piezoeléctrico suben y bajan durante la exploración, para aumentar y disminuir la fuerza de la punta en la muestra y utilizar la señal del sensor para indicar el cambio en la altura de la punta para medir la constante del resorte de la muestra (Elings *et al.*, 1993). Esta constante puede determinarse con una resolución espacial nanométrica.

La formación de imágenes se realiza mediante el registro de los efectos de la interacción de las fuerzas entre la punta y la superficie que el cantiléver va escaneando sobre la muestra (figura 3) (Bragga & Ricci, 2004)

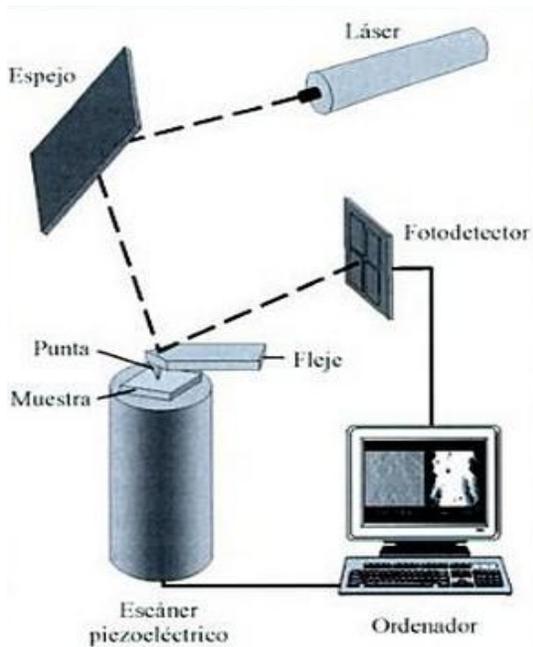


Figura 3. Diagrama del AFM. Una punta muy fina es desplazada sobre la superficie de la muestra biológica; el mecanismo de control del piezoeléctrico permite que la punta se mantenga con una fuerza constante sobre la superficie de la muestra y sobre el soporte de la punta se refleja el haz de láser que es registrado por un fotodetector. El ordenador procesa la información formando una imagen.

Imagen tomada de: Ministerio de Educación y Ciencia, 2012.

El microscopio de fuerza atómica tiene tres modos de aplicación:

Modo de no contacto

En este modo de acción del AFM la punta del cantiléver vibra cerca de su frecuencia de resonancia, de modo que vibre cerca de la superficie de la muestra planeando a una distancia alrededor de 10-150 Å por encima de la superficie de la muestra, para detectar las fuerzas atractivas de Van der Waals que actúan entre la punta y la muestra, esta técnica se utiliza cuando no se quiere deteriorar la superficie de la muestra (figura 4) (Poole & Owens, 2003; Bragga & Ricci, 2004).



Figura 4. Modo de no contacto, la punta oscila a una distancia cercana a la muestra. Tomada de: [http://www.wikiskripta.eu/images/4/44/AFM\\_-\\_kontaktni\\_mod.jpg](http://www.wikiskripta.eu/images/4/44/AFM_-_kontaktni_mod.jpg)

### Modo de contacto

En este modo la punta mantiene contacto físico con la muestra (figura 5). Conforme la punta barre la superficie, la fuerza de contacto origina la flexión del cantiléver de modo que éste se adapta a la superficie topográfica de la muestra (Alexander *et al.*, 1989). En este caso, la interacción de fuerzas entre la punta y la muestra son principalmente repulsivas por naturaleza.

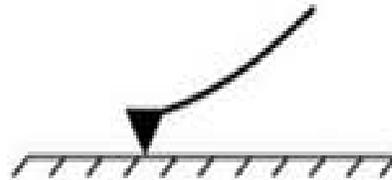


Figura 5. Modo de contacto en AFM, la punta mantiene contacto físico con la muestra. Tomada de: [http://www.wikiskripta.eu/images/4/49/AFM\\_-\\_bezkontaktni\\_mod.jpg](http://www.wikiskripta.eu/images/4/49/AFM_-_bezkontaktni_mod.jpg)

### Modo de contacto intermitente o “tapping”

Esta técnica permite obtener imágenes de alta resolución en muestras blandas, esta aplicación la punta está en contacto intermitente con la superficie a la vez que la barre, el cantiléver oscila sobre la muestra, con una variación de amplitud cercana a la frecuencia de resonancia natural (figura 6) (Poole & Owens, 2003, Putman *et al.*, 1994).

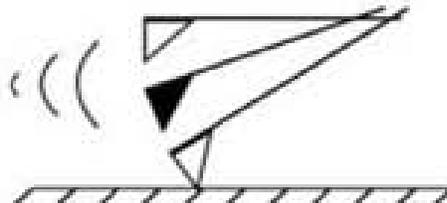


Figura 6. La punta oscila y barre al mismo tiempo la muestra. Tomada de: [http://www.wikiskripta.eu/images/1/16/AFM\\_-\\_poklepovy\\_mod.jpg](http://www.wikiskripta.eu/images/1/16/AFM_-_poklepovy_mod.jpg)

## HIPÓTESIS

Si los gránulos de Lacandonia están presentes en los núcleos de plantas con cromatina reticulada como *Taxodium mucronatum* y *Gingko biloba*, las cuales son gimnospermas al igual que los miembros de la familia Araucariaceae, entonces es probable que los núcleos de *Araucaria heterophylla* sean de tipo reticulado y presenten gránulos de Lacandonia.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar el patrón ultraestructural del núcleo de células de *Araucaria heterophylla*

### Objetivos específicos

- Conocer el tipo de distribución de la cromatina que presentan los núcleos de *A. heterophylla*.
- Determinar si los gránulos de Lacandonia están presentes en los núcleos de *A. heterophylla*

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Colecta*

Se compraron cuatro ejemplares jóvenes de *Araucaria heterophylla* en el mercado de plantas de Xochimilco, DF., con el propósito de garantizar la adquisición de éstos árboles de ornato a lo largo del estudio (figura 7).



Figura 7. Dos árboles de *Araucaria heterophylla*

### *Obtención y preparación de muestra.*

Se obtuvieron cortes pequeños ( $1\text{mm}^3$ ) de zonas meristemáticas de hojas de *A. heterophylla* para garantizar zonas de tejido con un gran número de núcleos. Estos fragmentos fueron distribuidos en dos tubos eppendorf (1.5 ml) debidamente etiquetados y los fragmentos fueron procesados con técnicas estándar para microscopía electrónica, siendo el primer paso la fijación del tejido.

Las muestras fueron fijadas con una mezcla de glutaraldehído al 6% y paraformaldehído al 4%, en buffer PBS (pH 7.2) durante 24 horas. Posteriormente se realizaron lavados con PBS y únicamente para uno de los tubos se postfijó el tejido con tetraóxido de osmio al 1%; ambos tubos (*con y sin osmio*) fueron sellados con parafilm y se dejaron reposar durante 24 horas a 4°C.

Las muestras de los tubos *con y sin osmio* fueron posteriormente deshidratadas con un tren de alcohol (etanol) a diferentes concentraciones desde 30% a 100% cambiando la concentración de etanol cada 5 minutos (de menor concentración a la mayor) y finalmente tres cambios con alcohol absoluto. Después las muestras de ambos tubos fueron pre-incluidas en una mezcla 5:1 de resina EMBED/óxido de propileno y se realizaron cambios de concentración cada dos horas hasta llegar a 1:1 de EMBED/óxido de propileno, en esta concentración se dejó reposar la muestra durante 24 horas, al término de este periodo se destaparon los tubos eppendorf para que se evaporara el óxido de propileno. Este proceso consta de 1 o 2 días, posteriormente los tubos se inclinaron para que se resbalara la resina y solamente quedaran los pedacitos de tejido en los tubos.

### *Inclusión*

Para este procedimiento se colocó un poco de resina en el fondo varios tubos eppendorf de 1.5 ml (entre 5 y 10 tubos, dependiendo de la cantidad de muestra) se marcaron los tubos colocando en el interior una etiqueta con el número de folio

de la muestra y posteriormente las muestras fueron embebidas en resina epóxica (EMBED). Para ayudar a que la muestra se fuera hacia el fondo del tubo se centrifugaron por 1 min aproximadamente. Luego de este proceso se dejaron polimerizar en una estufa a 60-70°C durante 48 hrs; después del tiempo de polimerización se retiraron los bloques de los tubos eppendorf.

### *Ultramicrotomía*

A cada bloque se le realizó un piramidado inicial para obtener el área deseada de corte, se utilizaron cuchillas de vidrio para explorar los bloques, una vez que se encontró el área deseada se cambió la cuchilla por una nueva. Se realizaron cortes semifinos de 250 a 500 nm de espesor, que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico. Después de su observación se seleccionaron los bloques con zonas de tejido con mayor número de células nucleadas y pocas inclusiones.

## **Microscopía Electrónica de Transmisión**

### *Obtención de cortes*

De los bloques seleccionados se obtuvieron cortes ultrafinos de 40 a 50 nm que fueron colocados en rejillas de cobre para su contraste.

### *Contraste*

Previamente al contraste los reactivos se centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm. Los cortes que se colocaron en rejillas fueron contrastados con

acetato de uranilo y citrato de plomo que son sales de metales pesados que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones.

En la base de una cámara húmeda se colocó parafilm; encima de éste se dispuso una gota de 40µl de acetato de uranilo en la cual se sumergió la rejilla durante 30 minutos, después de este periodo, se lavó la rejilla con agua desionizada y se secó con papel filtro. Posteriormente se colocó una gota citrato de plomo (40 µl) en el parafilm, la rejilla se colocó dentro de la gota durante 12 minutos, se lavó y secó de la forma anteriormente mencionada.

#### *Método preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs)*

Se utilizó una técnica de contraste con EDTA (ácido etilendiaminotetra-acético) como intermediario, éste método es preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969). Se realizó el mismo procedimiento que en el contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, colocando una gota de 40 µl de uranilo y sumergiendo la rejilla durante 3 minutos, se lavó y secó para posteriormente colocarla en una gota de EDTA durante 13 minutos, después de lavarla y secarla, la rejilla se introdujo en una gota de citrato de plomo durante 3 minutos, luego se lavó con agua desionizada y se secó con papel filtro.

#### *Tinción exclusiva para DNA*

Para esta tinción se utilizó amina de osmio, que contrasta DNA. Los cortes ultrafinos se colocaron en una rejilla de oro, y ésta introdujo en una gota de 40 µl de HCL 5N durante 1:15 hrs. Al término de este lapso de tiempo se lavó la rejilla

con agua desionizada y se secó con papel filtro, la rejilla se colocó en una cápsula Been y a ésta cápsula se le colocaron 40  $\mu$ l de amina de osmio. Se selló la cápsula con parafilm y se colocó en una cámara oscura y húmeda, donde fue almacenada a 4°C durante cuatro días. Después se lavó la rejilla con agua desionizada y se secó.

#### *Observación al MET*

Los cortes ultrafinos contrastados fueron observados al microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010, operando a 80KV, se observaron los cortes a diferentes aumentos (3,000-120,000X) y se captaron las imágenes de interés.

### **Microscopía de Fuerza Atómica**

#### *Obtención de cortes*

Se obtuvieron cortes semifinos de 250-500 nm de los bloques antes seleccionados con zonas de células nucleadas y con pocas inclusiones, para la obtención de estos cortes se utilizaron cuchillas de vidrio nuevas y se cambiaba de filo constantemente con el fin de evitar mellas y/o desgarre de tejido.

Los cortes se colocaron en portaobjetos de vidrio nuevos y limpios, después de que se colocaron los cortes se pasó el portaobjetos sobre flama del mechero de alcohol con el fin de que se adhirieran los cortes al vidrio mediante el calor, y se tiñeron con azul de toluidina previamente filtrado. Estas condiciones garantizaron

que los cortes no tuvieran contacto con el polvo u otro contaminante.

#### *Observación al AFM*

Los cortes semifinos se observaron al AFM por medio de protocolos descritos previamente (Jiménez-García & Fragoso Soriano, 2000). Utilizando el software del AFM se obtuvieron imágenes a diferentes aumentos y se realizó un análisis de la topografía de la zona nuclear de células de *A. heterophylla* y se identificaron estructuras nucleares.

#### *Morfometría de gránulos de Lacandonia*

Se utilizó el programa ImageJ para medir el diámetro de los gránulos de Lacandonia, calibrando la escala de 72píxeles = 100nm, para realizar las mediciones de los gránulos de Lacandonia, se obtuvo el promedio y la desviación estándar.

#### *Visualización de estructuras 3D*

##### *MET*

Con ayuda de un goniómetro que contiene el MET, se obtuvieron imágenes con variación de 10° entre cada una; estas imágenes fueron utilizadas para generar estereopares o anáglifos para provocar un efecto tridimensional en los GL y las zonas nucleares. Para este procedimiento se utilizó el programa Anaglyph maker.

## *AFM*

Se utilizó el software del AFM para obtener 525 imágenes de una célula de *A. heterophylla* en las cuales se varió el ángulo y profundidad, éstas imágenes se utilizaron para realizar un video de corta duración en el cual se observa el núcleo de *A. heterophylla* a 360°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las células de *A. heterophylla* presentan núcleos de forma redondeada y bajo el microscopio óptico se distinguen las hebras de cromatina formando pequeñas redes (figura 8).

Las zonas seleccionadas para la observación al MET y AFM constan de zonas numerosas células meristemáticas cuya función principal es la división celular (Espíndola, 2004). Estas células son pequeñas, poseen núcleo grande y poco citoplasma.

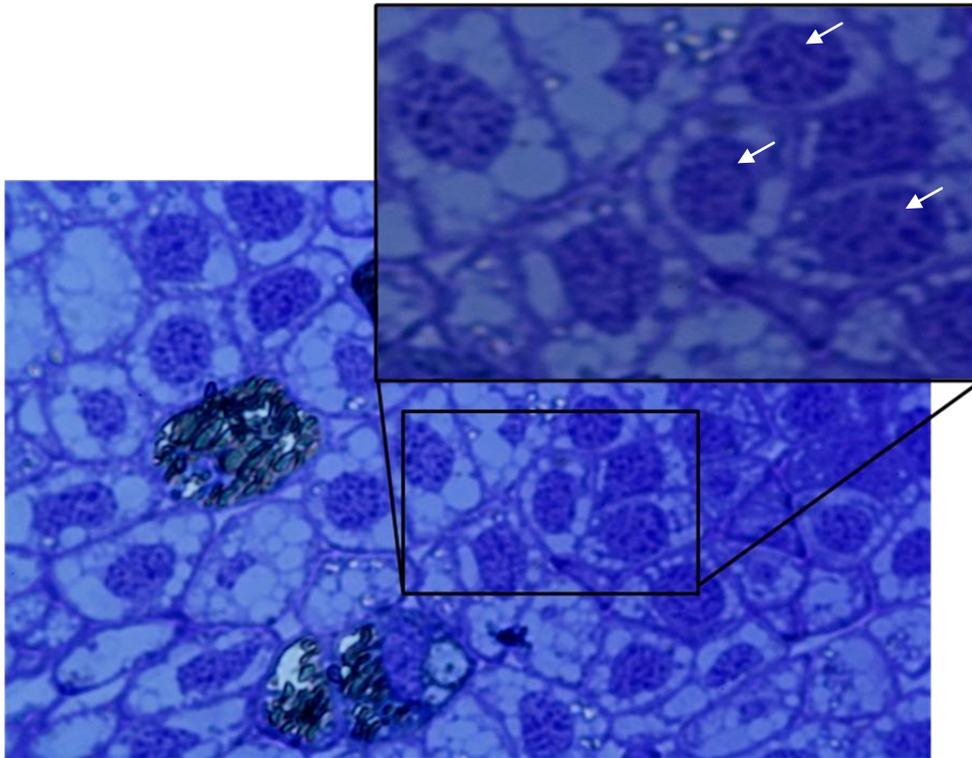


Figura 8. Células meristemáticas de *A. heterophylla* los núcleos están más teñidos que el citoplasma, las células poseen núcleos grandes; dentro del núcleo se observan pequeñas hebras de cromatina en disposición de red (flechas). De color verde se aprecian inclusiones propias de este género de plantas.100X.

Con las micrografías obtenidas se puede afirmar que el núcleo de *A. heterophylla* es de tipo reticulado, al igual que *A. angustifolia* otro miembro de la familia Araucariaceae cuyos núcleos reticulados pueden ser observados en las micrografías presentadas en los trabajos de Mastroberti & Mariath (2008).

A bajo aumento se distinguen células parenquimales de *A. heterophylla* con núcleos de formas irregulares y alargadas (figura 9). Se observa que el citoplasma se distribuye en forma de hebras que rodean al núcleo y a las vacuolas de mucílago.

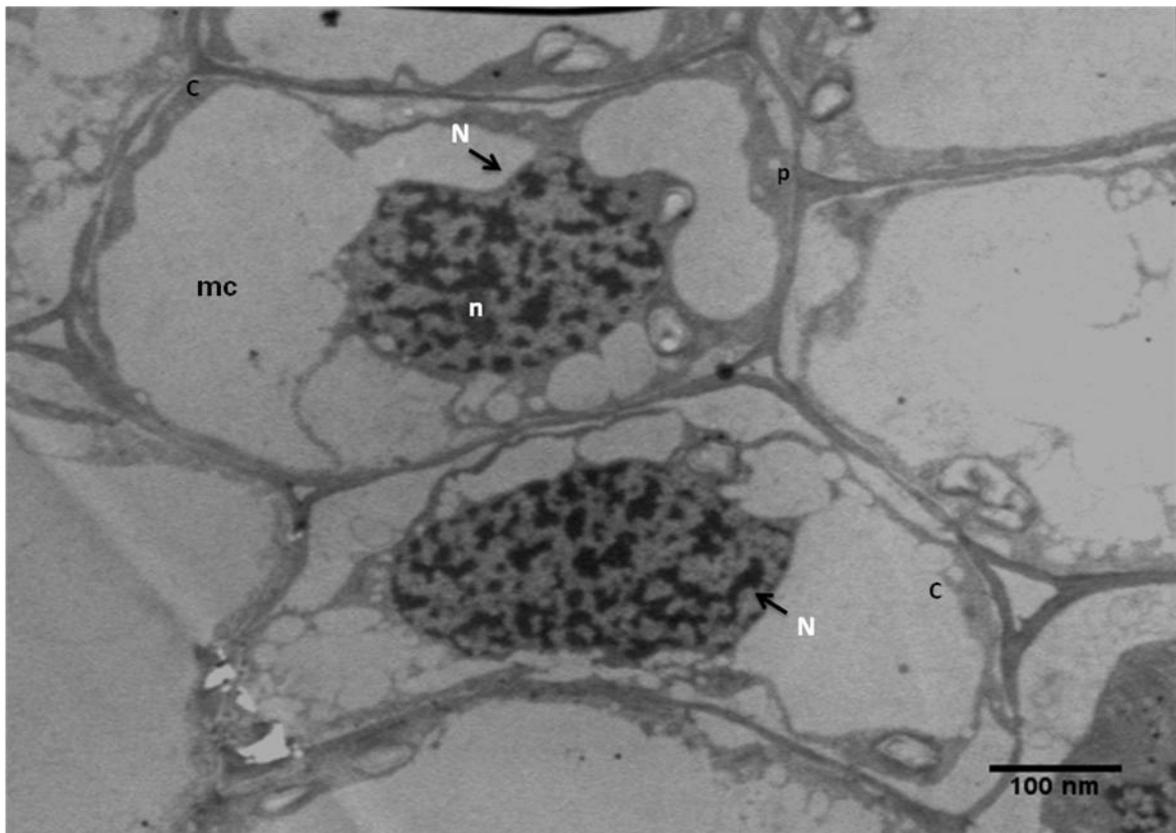


Figura 9. Células parenquimales de *A. heterophylla*. Contraste convencional para MET (Ur-Pb). (C) citoplasma, (N) núcleo, (n) nucléolo, (p) pared celular, (mc) mucílago. 3,000X.

Esta forma de distribución del citoplasma (hebras delgadas) es muy común en los

miembros de la familia Araucariaceae, éstas plantas presentan células compartimentalizadas denominadas células de mucílago (Mastroberti & Mariath, 2008) que divergen tempranamente en el tejido de hojas inmaduras, en las que al llegar a la etapa de madurez el núcleo y citoplasma se desvanecen.

Por tal motivo, las células observadas en este estudio fueron células parenquimales, que a diferencia de las células de mucílago, mantienen el núcleo, citoplasma y contienen pocas vacuolas mucilaginosas (figuras 9 y 10).

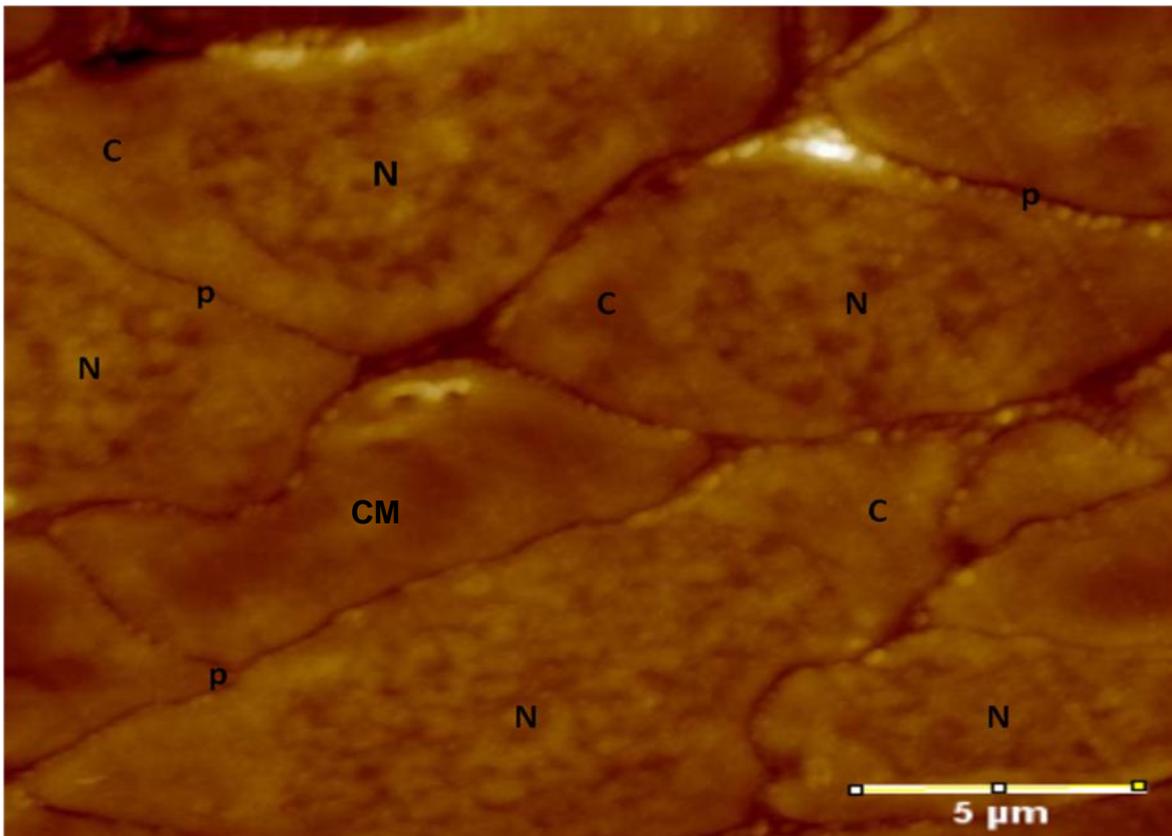


Figura 10. Células de *A. heterophylla* bajo AFM. (C) citoplasma, (N) núcleo, (p) pared celular, (CM) célula de mucílago.

El núcleo de *A. heterophylla* contiene cromosomas largos (figura 11) y presenta un patrón de distribución de la cromatina reticulado (figuras 12 y 13). Lo anterior concuerda con la descripción de núcleo reticulado de Busch (1974) y más recientemente con la tipificación del núcleo de *G. biloba* y otras plantas. (Jiménez-Ramírez *et al.*, 2002).

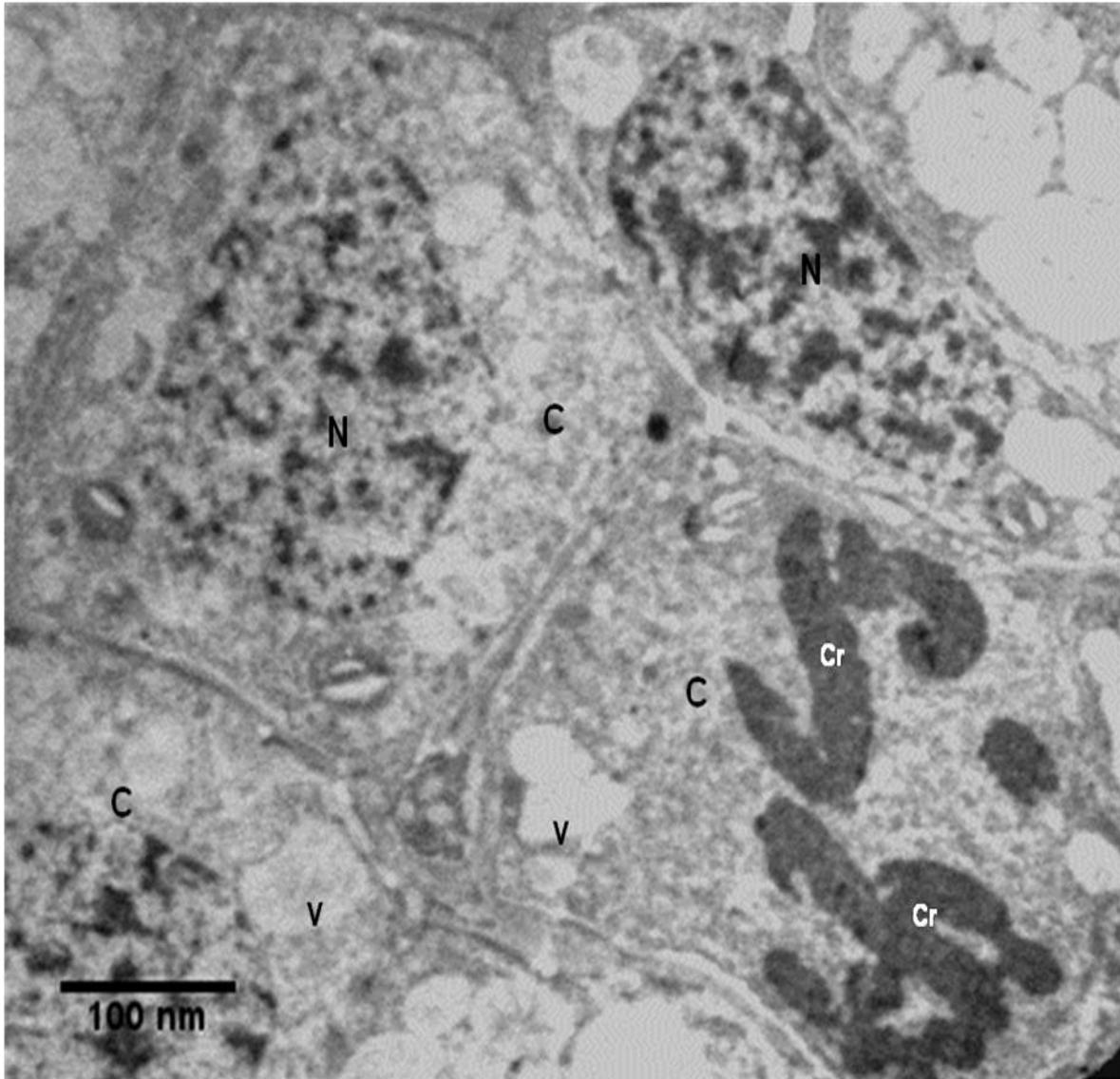


Figura 11. Células parenquimales de *A. heterophylla* contrastadas con la tinción convencional para MET (Ur-Pb). (C) citoplasma, (N) núcleo, (p) pared celular, (cr) cromosomas, (v) vacuolas. 3,000 X.

Las micrografías obtenidas con el contraste de amina de osmio para teñir DNA (figura 12), permiten observar con claridad la disposición de las hebras de cromatina en los núcleos, que están dispuestas formando redes electrodensas en el nucleoplasma y se puede distinguir al nucléolo con un contraste menor al de la cromatina compacta.

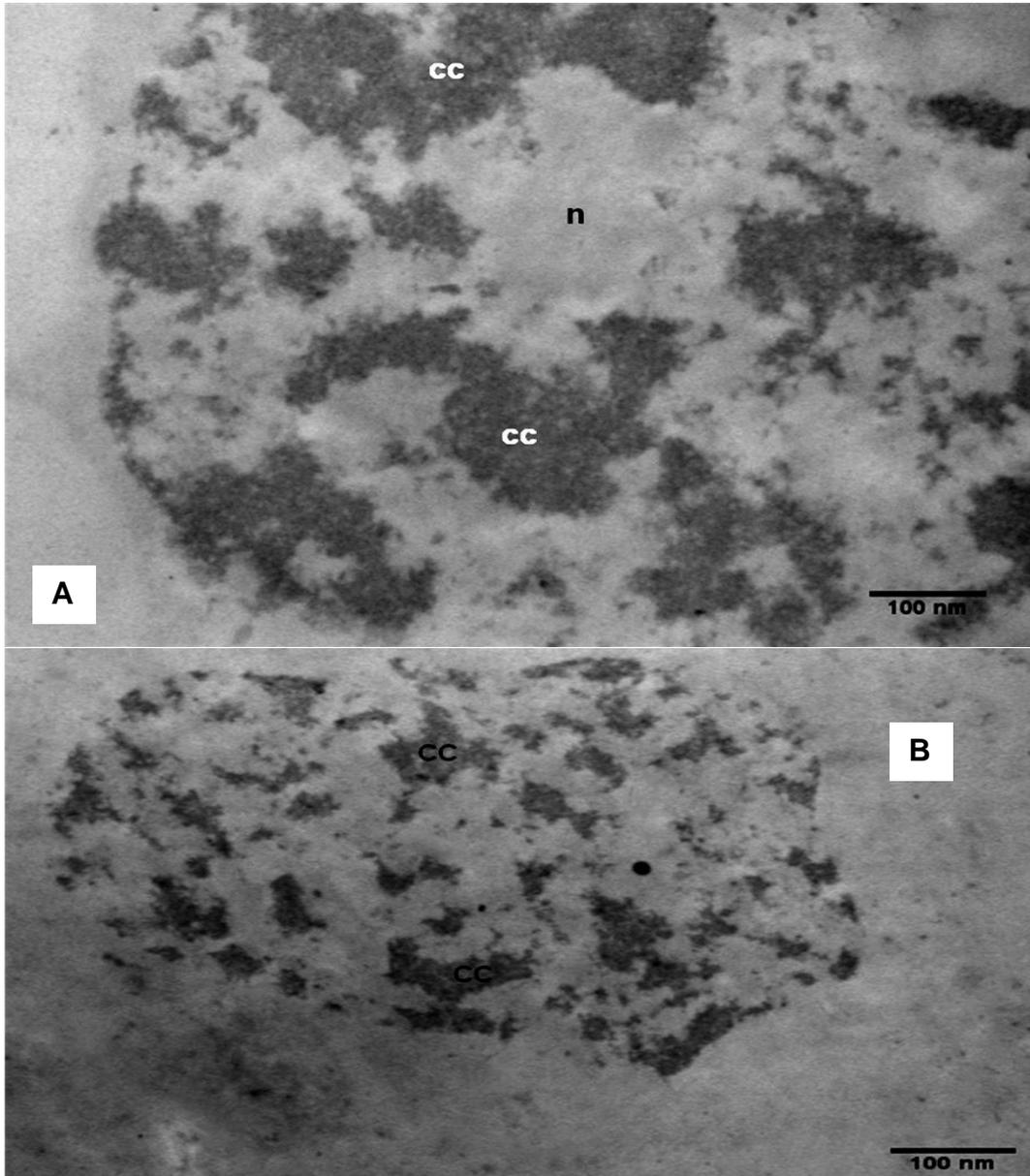


Figura 12. Núcleo de *A. heterophylla*. Contraste con amina de osmio. **(A)** (cc) cromatina compacta, (n) nucléolo. 25,000X. **(B)** Las hebras de cromatina tienen una disposición en forma de red. 10,000X.

Así mismo, con micrografías obtenidas bajo el microscopio de fuerza atómica, se evidencia el patrón reticulado de la cromatina en núcleos de *A. heterophylla* (figura 13).

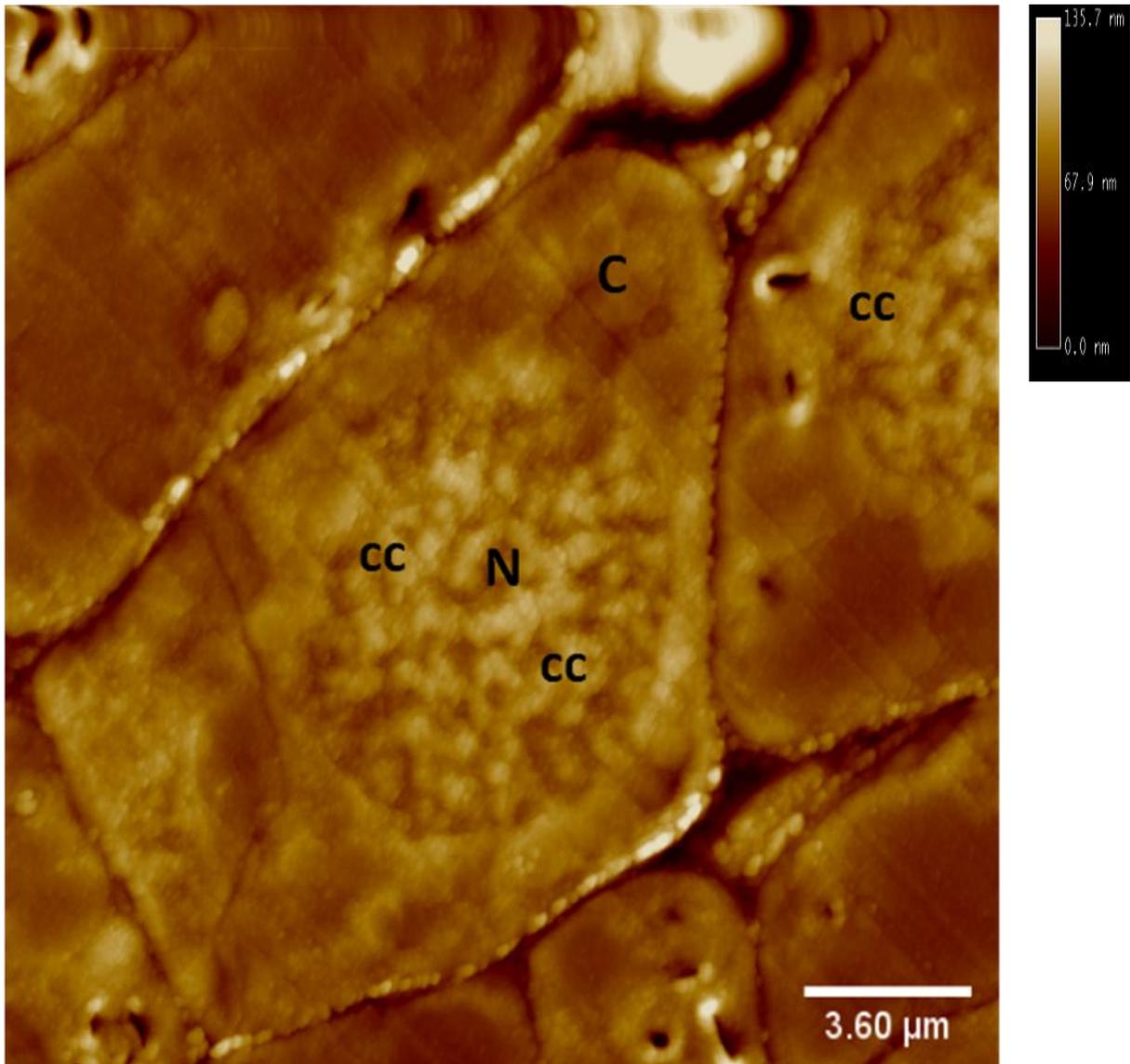


Figura 13. Núcleo de *A. heterophylla* bajo el AFM: Se observan las hebras de cromatina en el núcleo y los límites de la pared celular con respecto a las demás células. (C) citoplasma, (N) núcleo, (cc) cromatina compacta.

El núcleo reticulado es un rasgo que comparte *A. heterophylla* con otras gimnospermas como *G. biloba* (Jiménez-Ramírez, 2002) y *T. mucronatum* (Alonso-

Murillo, 2008).

Existe una diferencia topográfica entre el resto del nucleoplasma con respecto a las hebras de cromatina (figuras 14 y 15). La cromatina tiene un relieve alto, que bajo AFM permite apreciar el volumen del contenido celular.

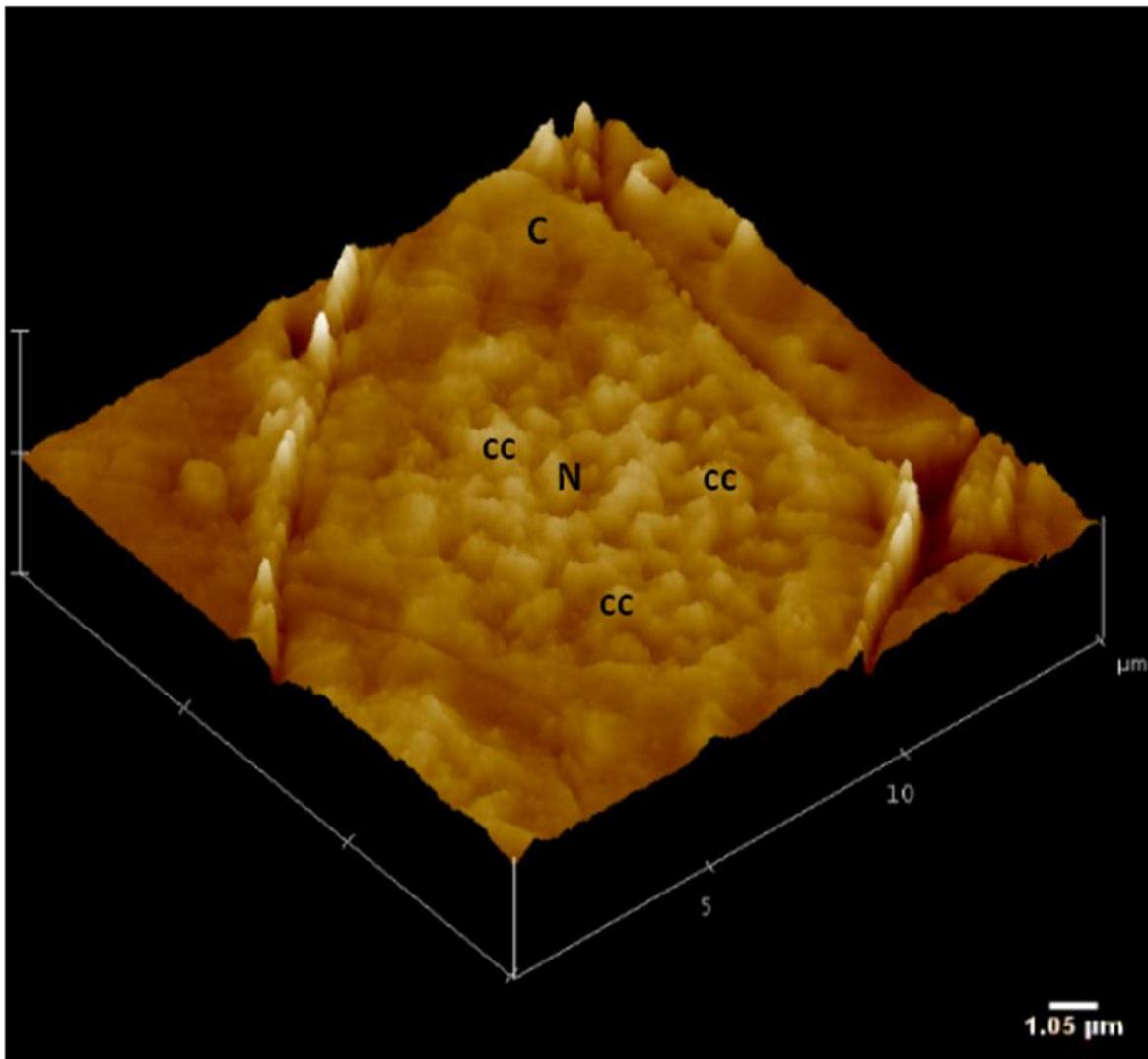


Figura 14. Imagen tridimensional del núcleo de *A. heterophylla* vista bajo AFM. Se observan las diferencias topográficas entre los componentes de la célula. (C) citoplasma, (N) núcleo, (cc) cromatina compacta.

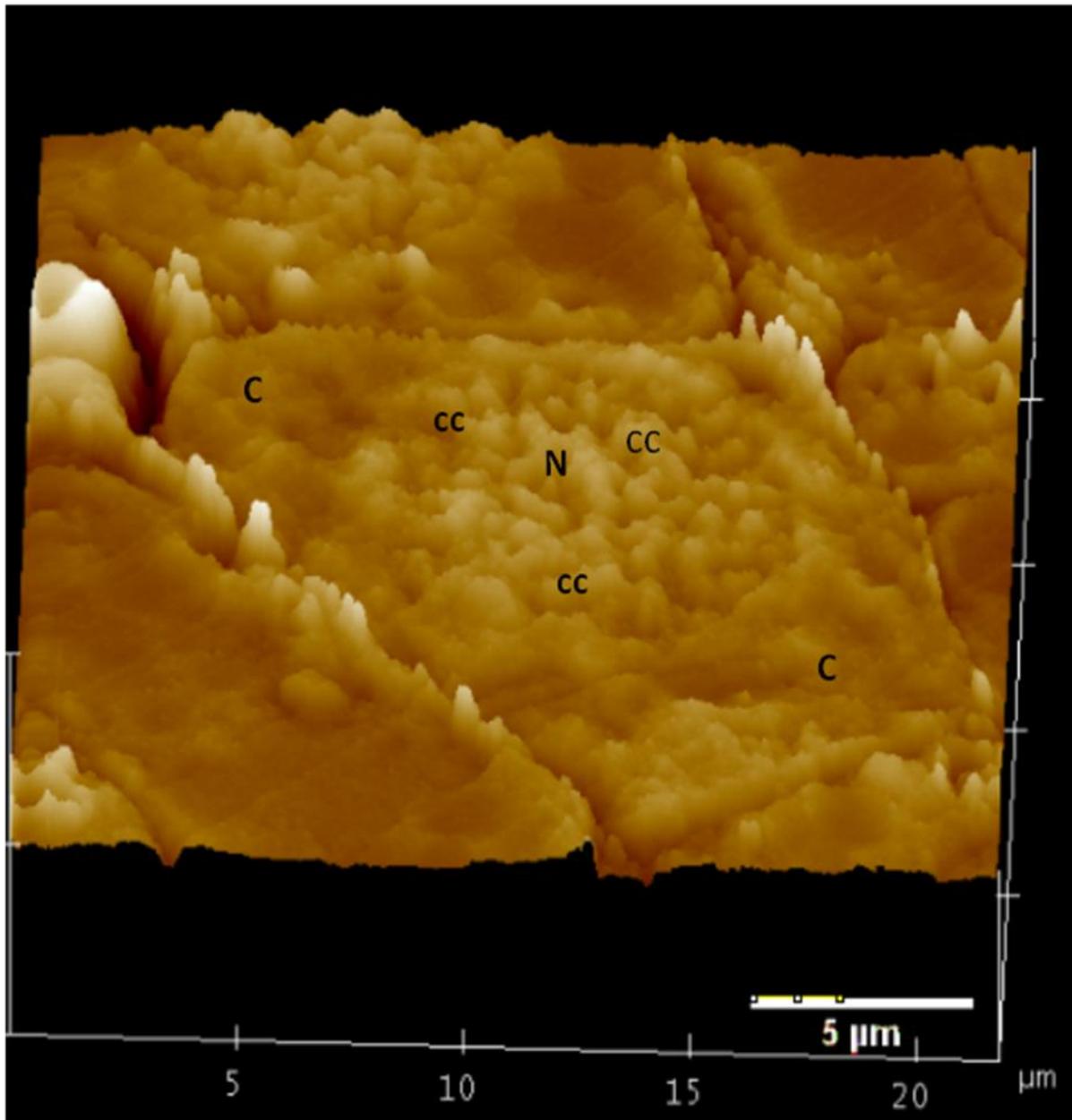


Figura 15. Topografía de una célula de *A. heterophylla* bajo AFM. Las hebras de cromatina demuestran una tipificación reticulada. (C) citoplasma, (N) núcleo, (cc) cromatina compacta.

Los perfiles topográficos (figuras 16 y 17) de los núcleos de *A. heterophylla* muestran que la cromatina tiene diferentes dimensiones de grosor y altura en todo el núcleo. Los núcleos en interfase de *A. heterophylla* miden  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diámetro, fase de la mitosis en la que alcanzan su máxima talla (Webster *et al.*, 2009).

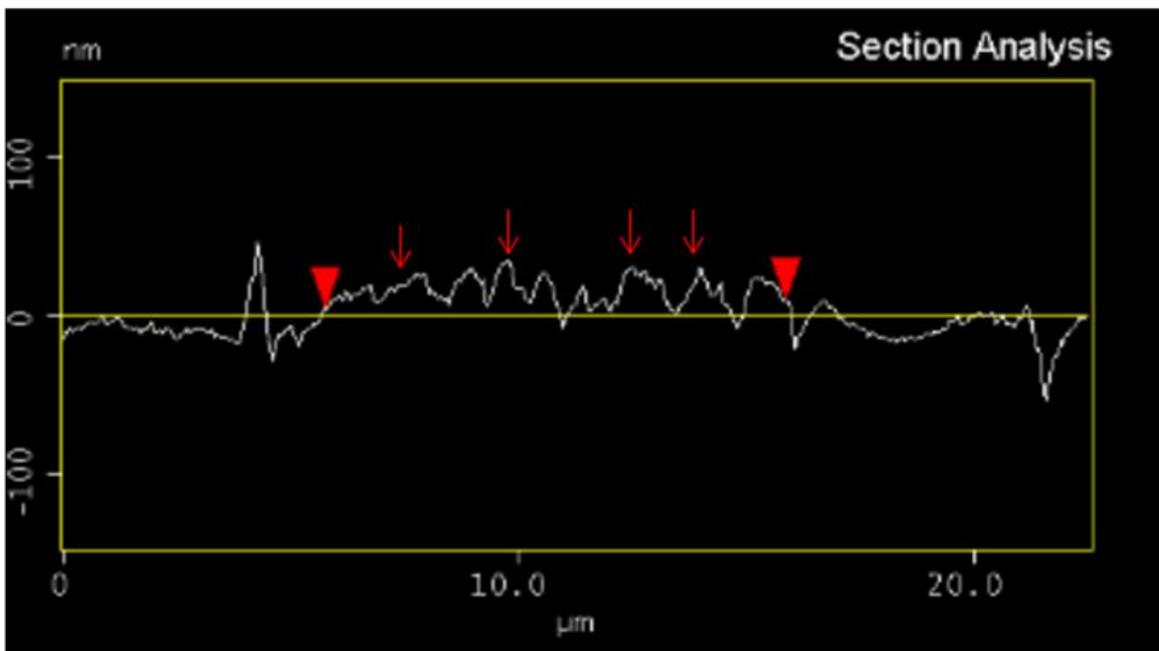
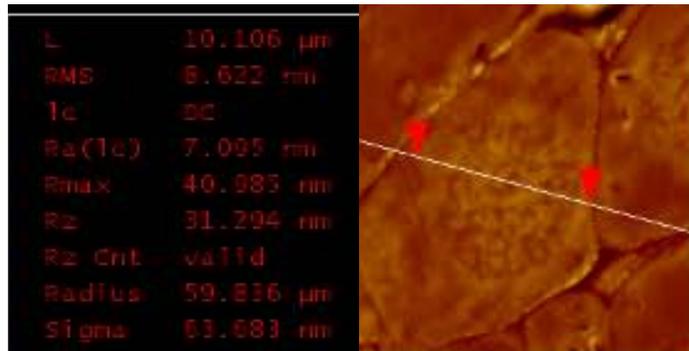


Figura 16. Perfil de un núcleo de *A. heterophylla* (ancho). Las flechas rojas señalan el relieve de las hebras de cromatina.

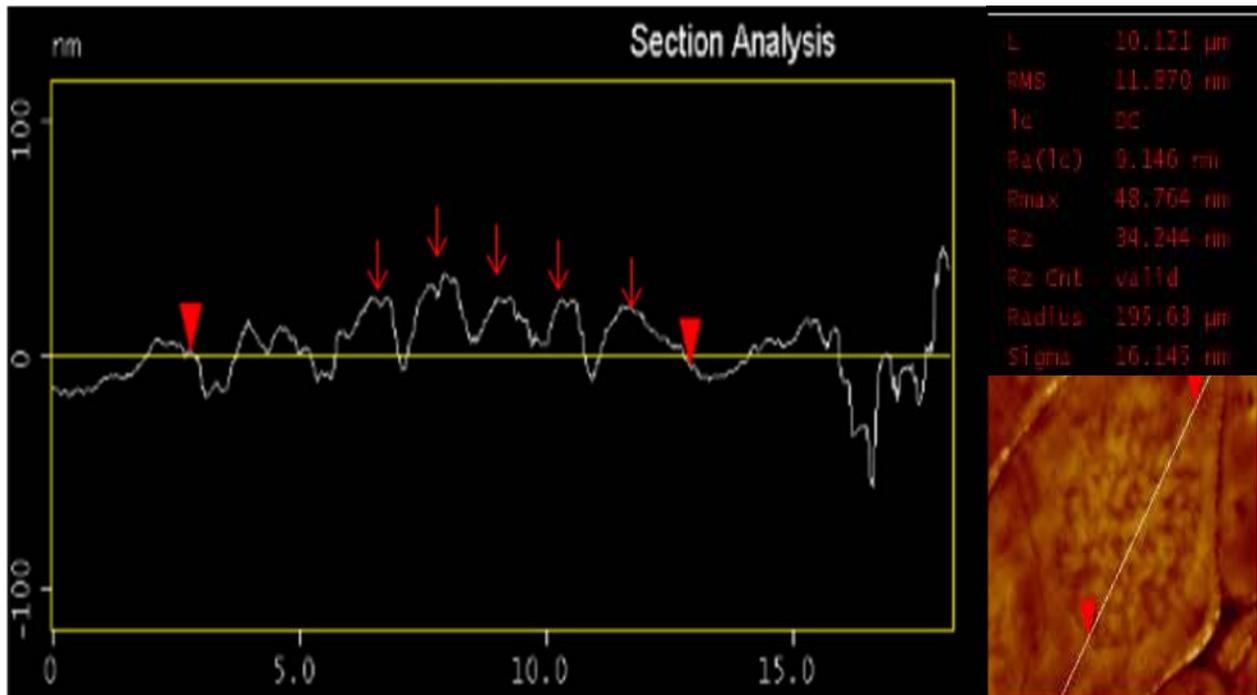


Figura 17. Perfil (largo) de un núcleo de *A. heterophylla*, las flechas rojas señalan el relieve de las hebras de cromatina.

En la figura 18 se observa un núcleo reticulado de *A. heterophylla*, el nucléolo de estas células es poco prominente y de forma irregular, presenta una alta densidad electrónica con respecto al nucleoplasma, sitio que contiene la cromatina compacta (regiones más electrodensas) y zonas fibrogranulares, donde se localizan los gránulos de Lacandonia (GL).

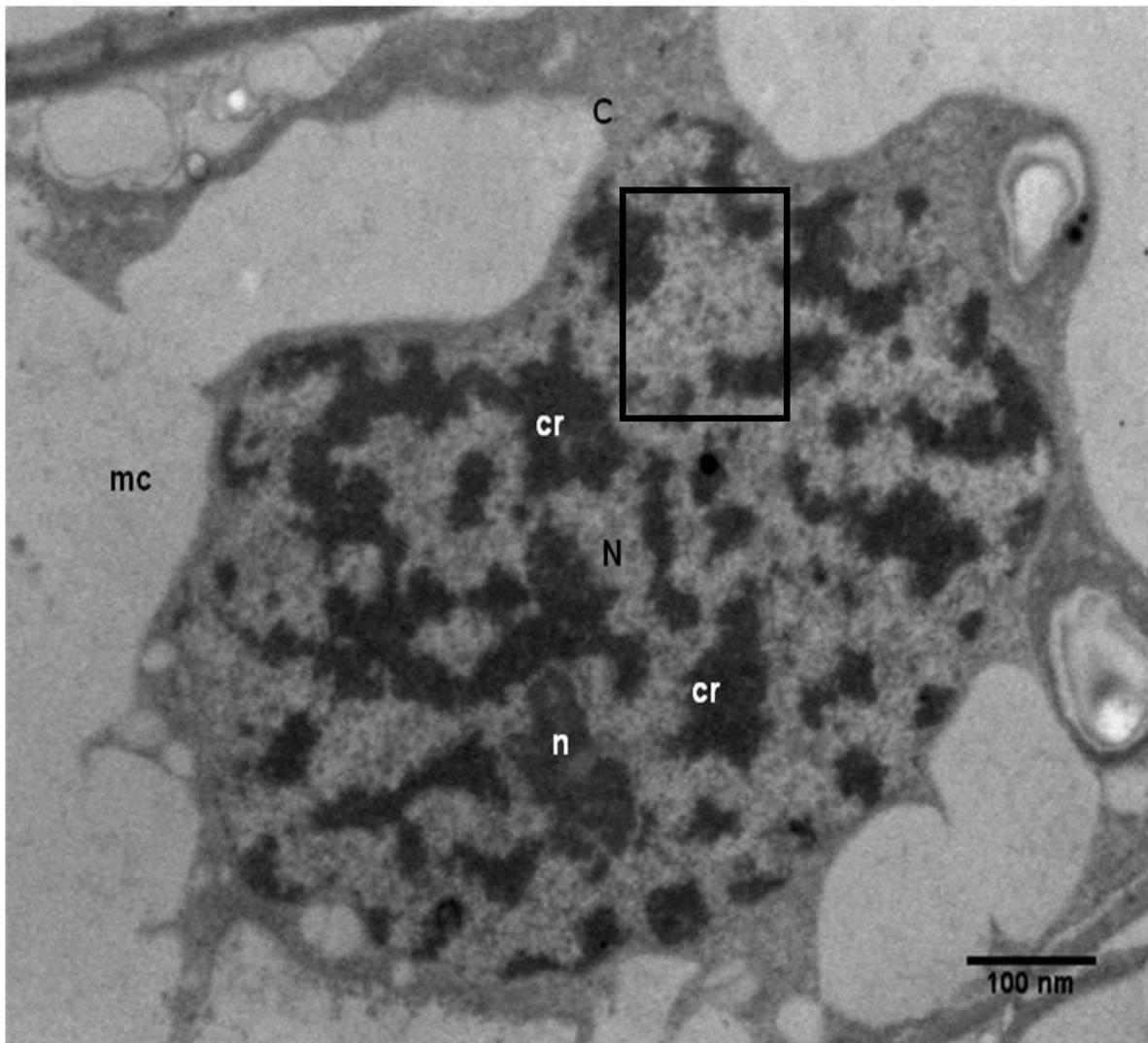


Figura 17. Núcleo de una célula parenquimal de *A. heterophylla*. Contraste convencional para MET (Ur-Pb). (C) citoplasma, (N) núcleo, (n) nucléolo, (cc) cromatina compacta, (mc) mucílago. El recuadro negro señala zonas fibrogranulares. 8,000X.

En la zona fibrogranular del nucleoplasma se pueden distinguir gránulos de Lacandonia entremezclados con fibras (figura 19 y 20), que a mayor aumento pueden ser observados como partículas redondeadas individuales y/o en cúmulos.

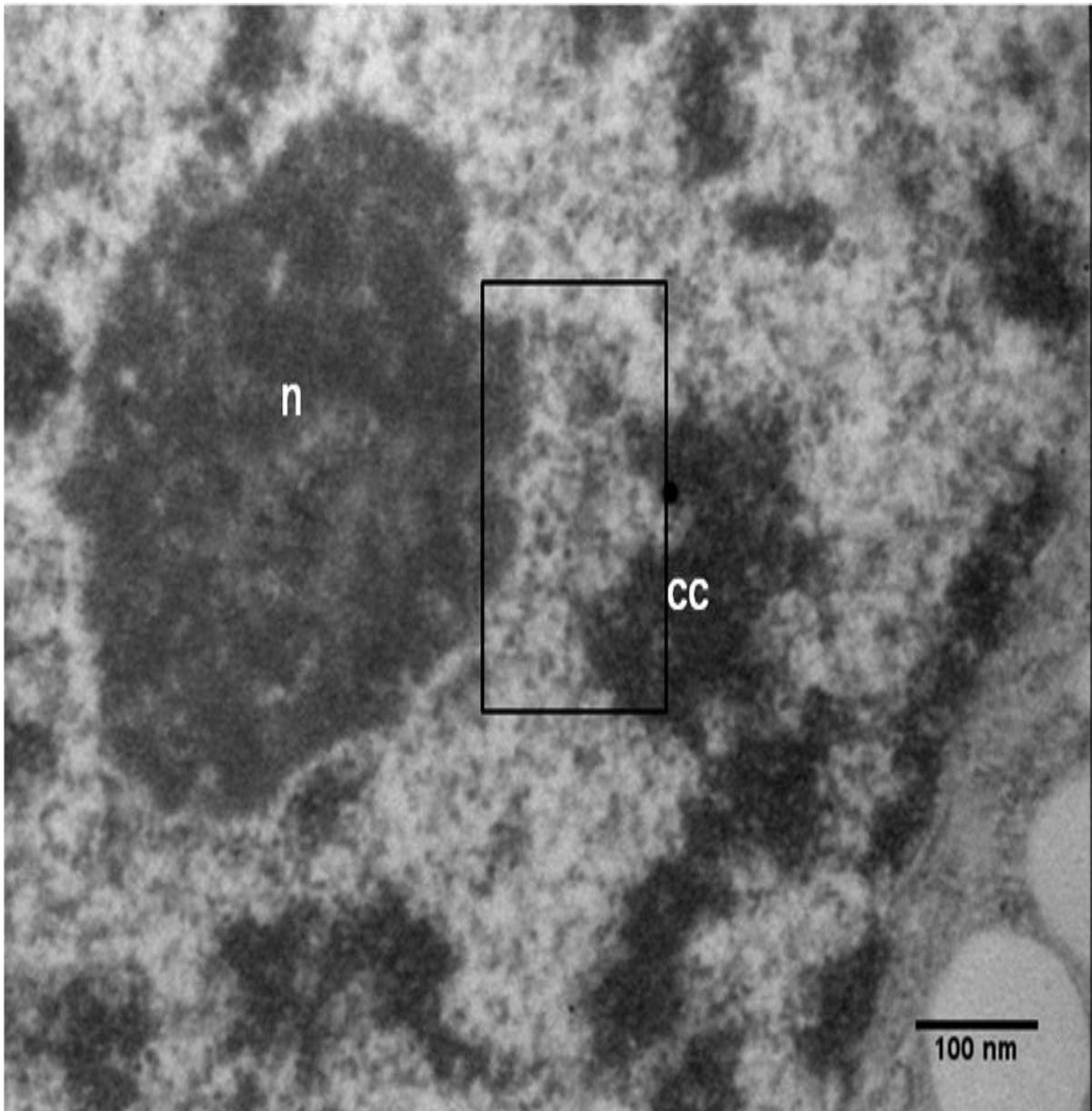


Figura 19. Núcleo celular de *A. heterophylla*. (n) nucléolo, (cc) cromatina compacta, el cuadro marca una zona con gránulos de Lacandonia. 25,000X.

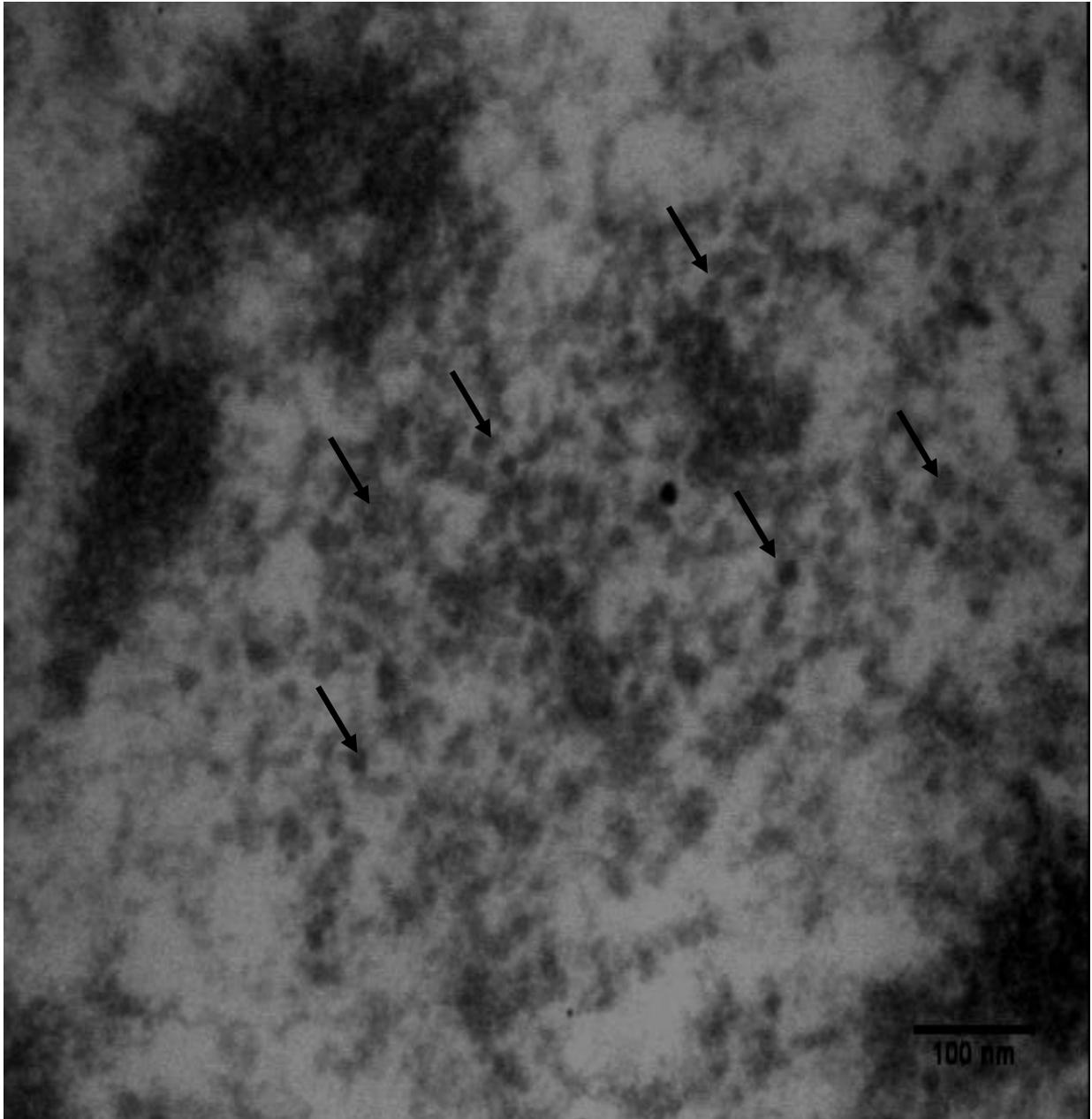


Figura 20. Nucleoplasma de células de *A. heterophylla*. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia. 60,000X.

Para tipificar a los gránulos de Lacandonia se utilizaron los siguientes criterios: *tamaño, forma, asociación con fibras y distribución*. Estos criterios permiten distinguirlos de otras ribonucleoproteínas y/o gránulos peri e intercromatinianos.

Los gránulos de Lacandonia poseen dimensiones mayores que los ribosomas (figura 21). Con el programa ImageJ se midió el diámetro de los gránulos de Lacandonia maduros (más grandes y redondos) y se obtuvo un valor de  $31.8 \pm 1.5$  nm de diámetro.

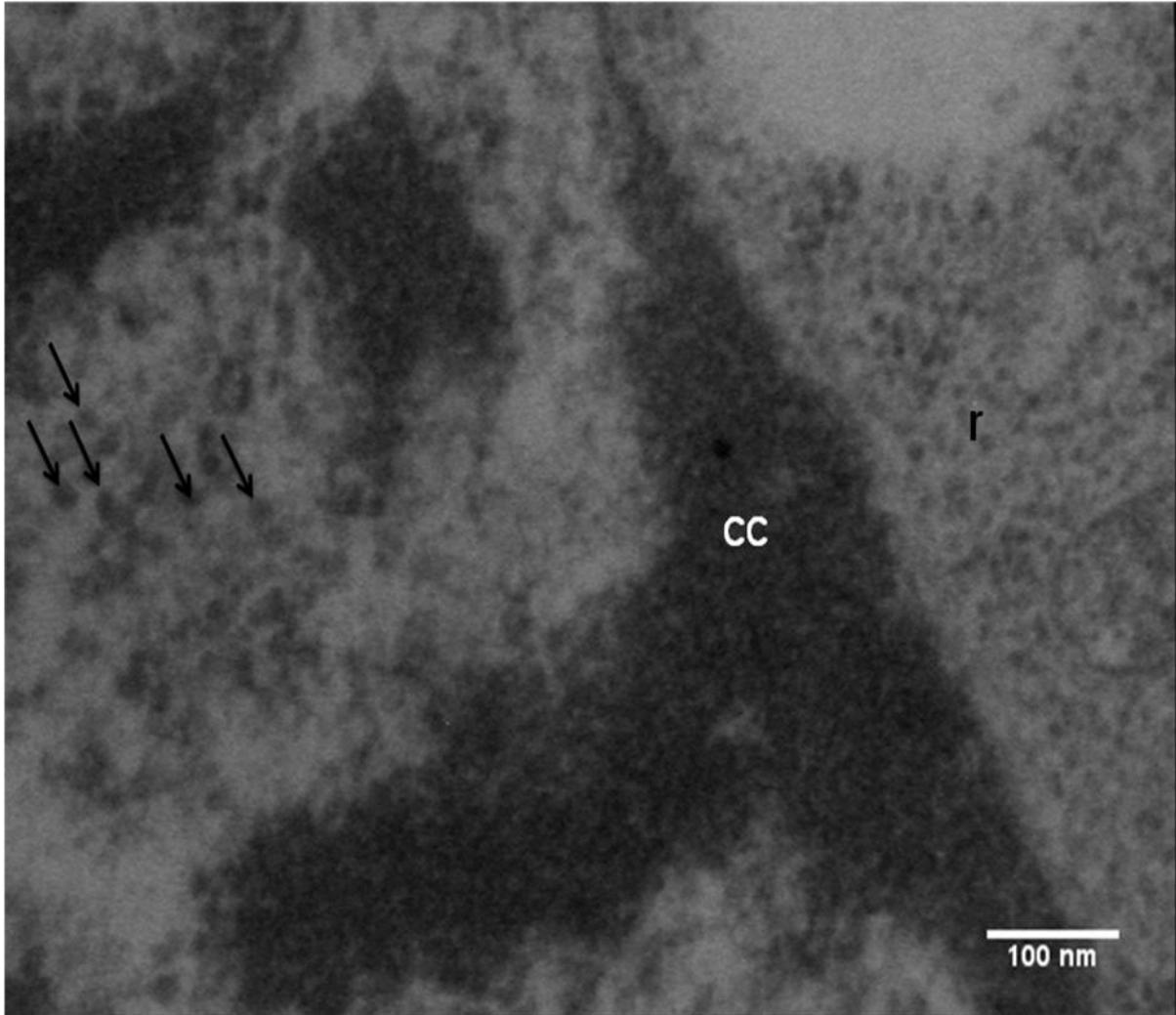


Figura 21. Nucleoplasma de *A. heterophylla*. Contraste convencional para MET. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia, (r) ribosomas, (cc) cromatina compacta. 60,000 X.

Los gránulos de Lacandonia son identificados por su forma redondeada (figuras 22 y 23) y su diámetro puede ser heterogéneo. Este es un rasgo similar a lo que ocurre en otras plantas como *Ginkgo biloba* en la cual dicha heterogeneidad de tamaños está asociada con los distintos estadios de maduración de la planta (Gaona-López, 2008).

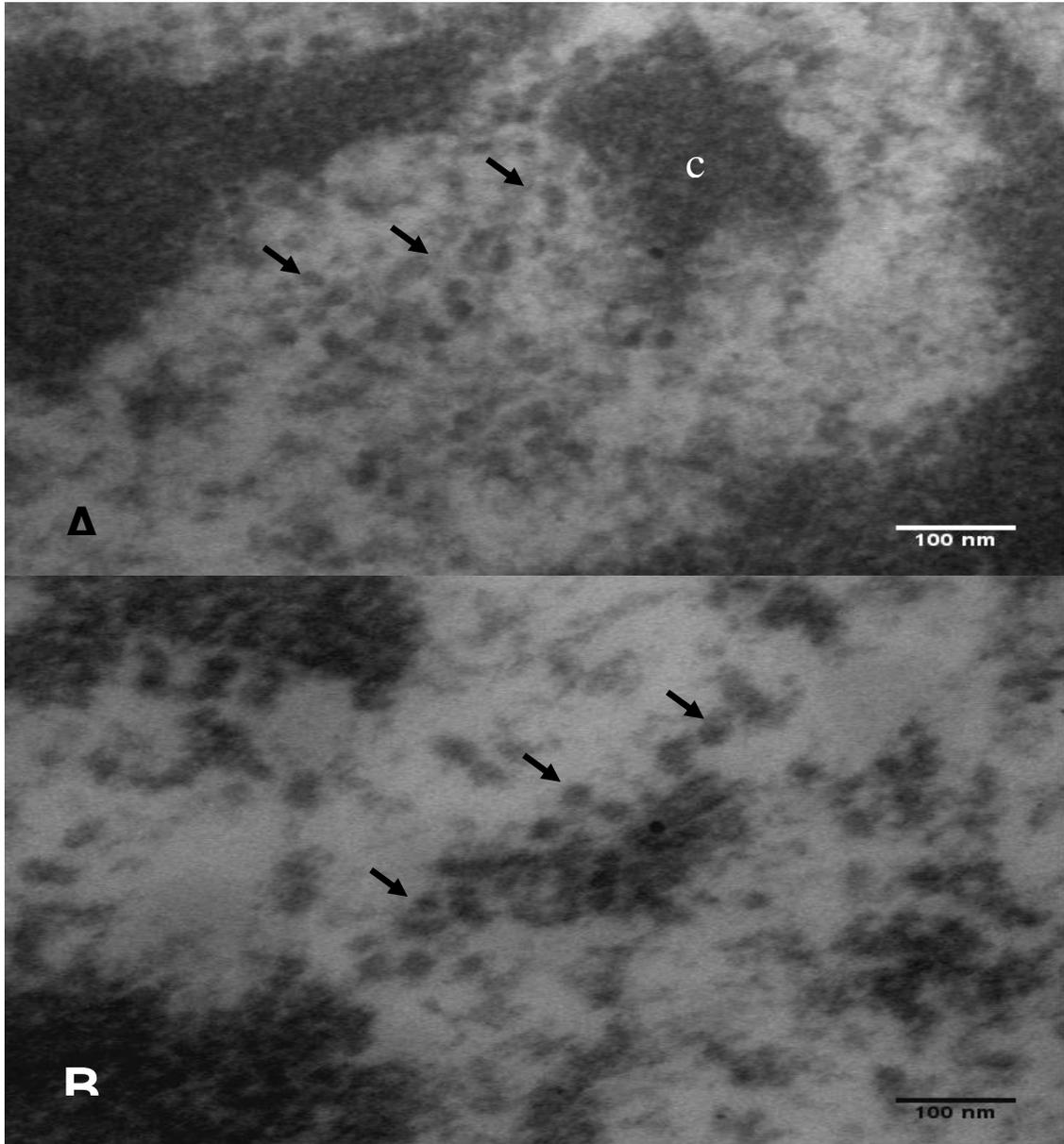


Figura 22. Nucleoplasma de *A. heterophylla*. Contraste convencional para MET. (A) Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia, (cc) cromatina compacta. 80,000X. (B) Gránulos de Lacandonia asociados a fibras. 100,000X.

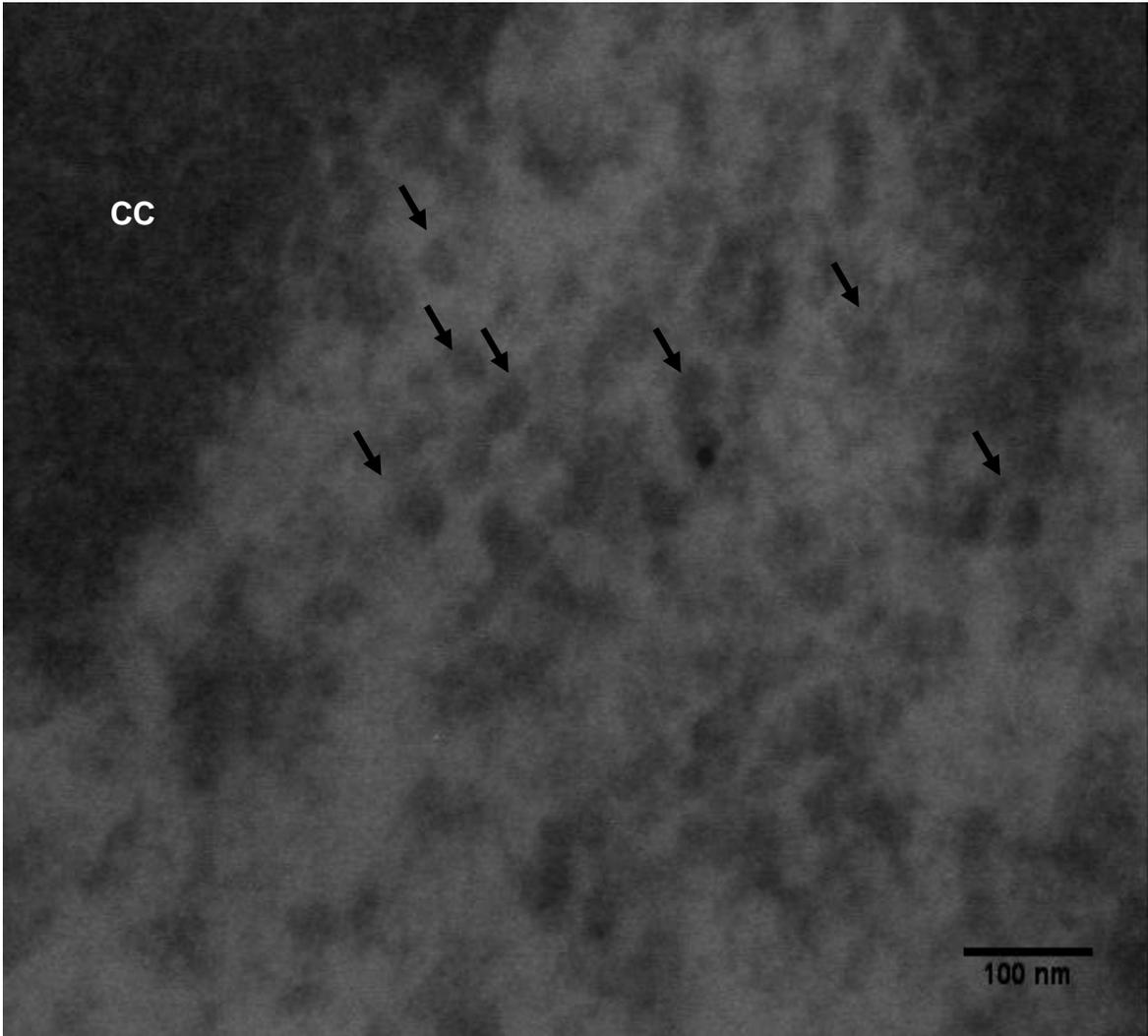


Figura 23. Zona granulo-fibrilar de *A. heterophylla*. Contraste convencional para MET. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia. (cc) cromatina compacta. 120,000X.

Con la tinción de EDTA para ribonucleoproteínas se tiñeron únicamente gránulos de RNA, los cuales se observaban como partículas redondas en el nucleoplasma (figura 24), que por su tamaño y forma corresponden a los gránulos de Lacandonia (Jiménez-García, 1992). Es importante destacar que los gránulos de Lacandonia se encuentran distribuidos en todo el nucleoplasma, en el espacio inter y pericromatiniano del núcleo de *A. heterophylla*.

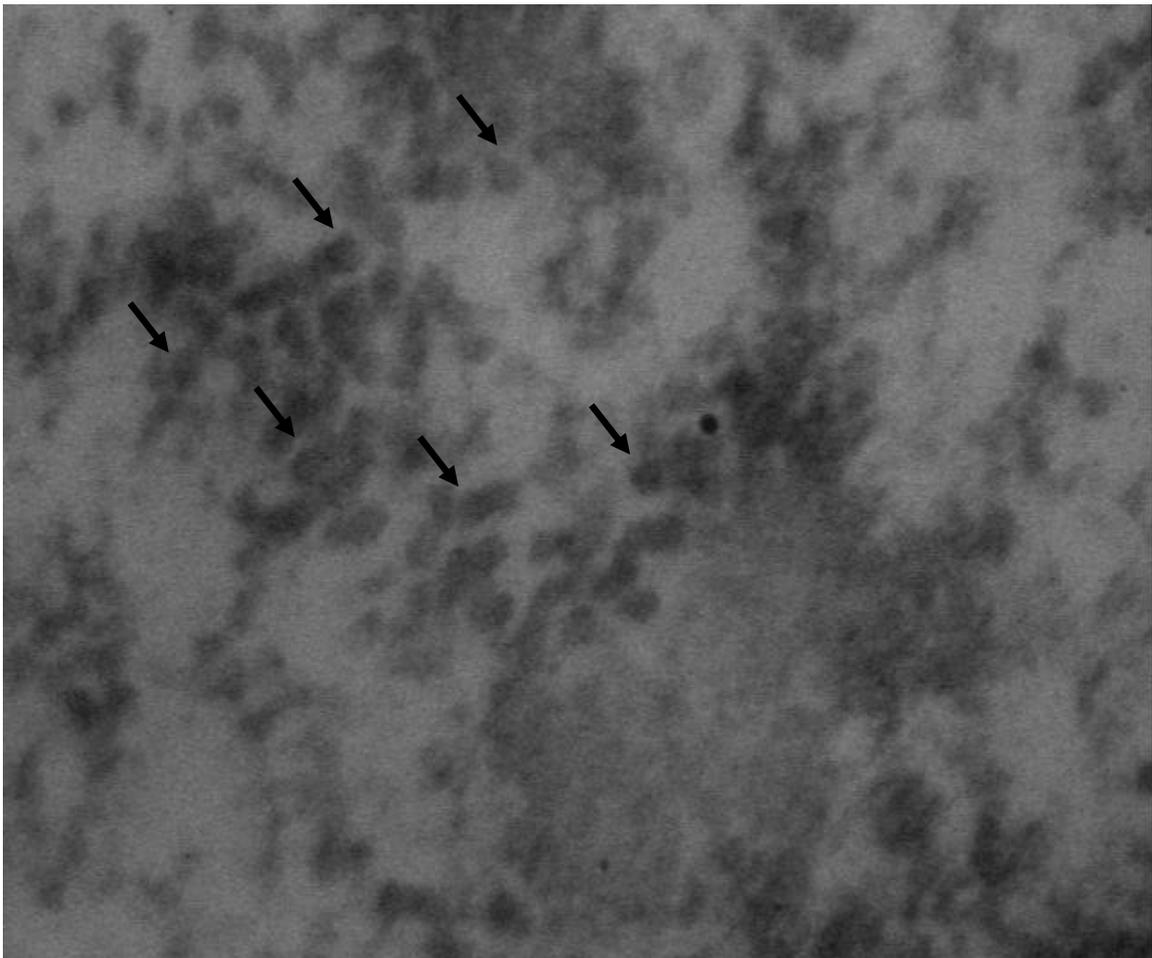


Figura 24. Zona granulofibrilar de *A. heterophylla*. Contraste con EDTA (Ur-EDTA-Pb) para ribonucleoproteínas. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia. 100 000 X.

Mediante el análisis de imágenes estereopares se observa una continuidad una relación entre fibras de DNA asociadas con gránulos de Lacandonia (figuras 25 y 26), también se observa que los GL se distribuyen también cúmulos.

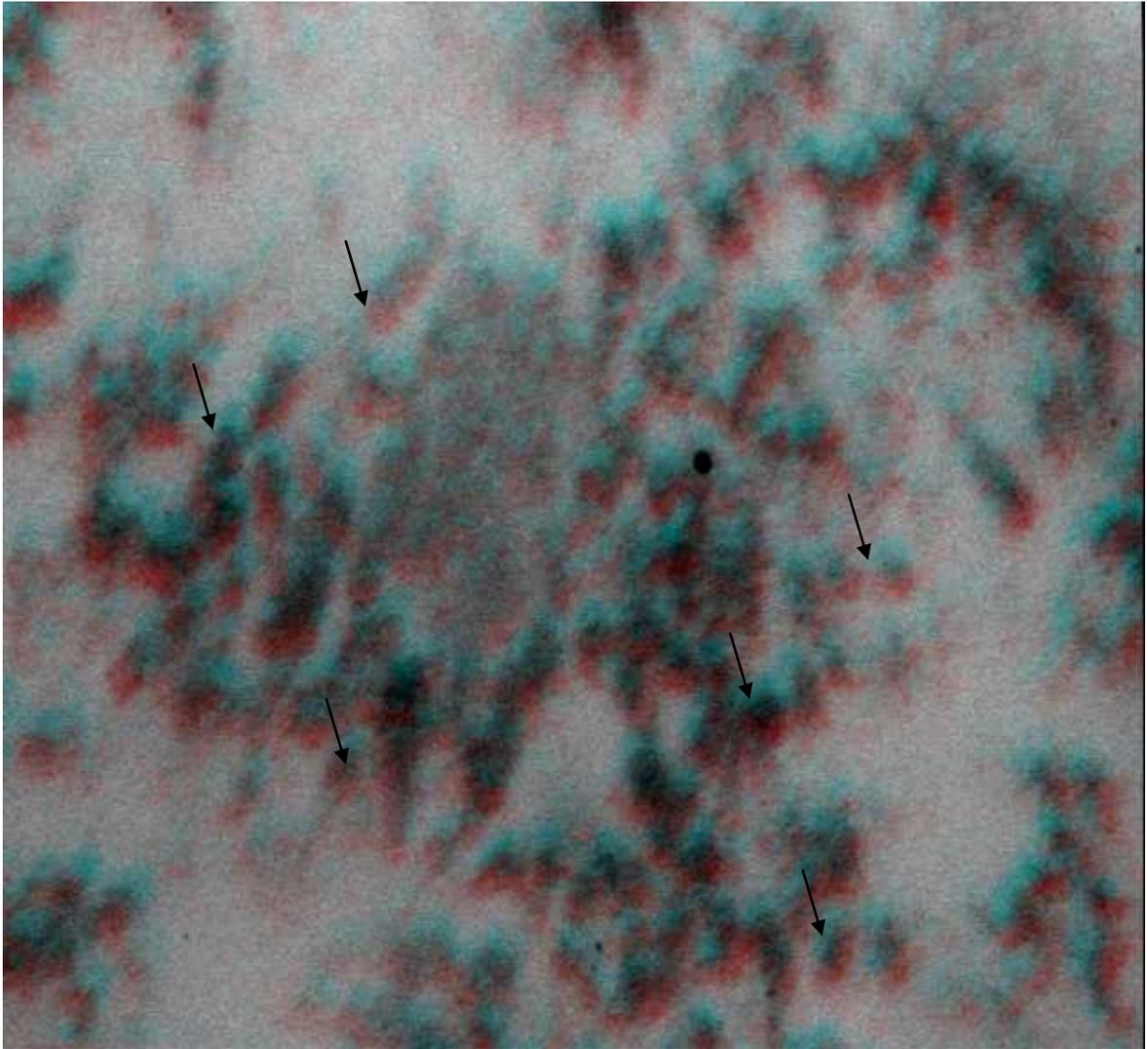


Figura 25. Estereopares de gránulos de Lacandonia en *A. heterophylla*. Contraste con EDTA (Ur-EDTA-Pb) para ribonucleoproteínas. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia. 100,000X.

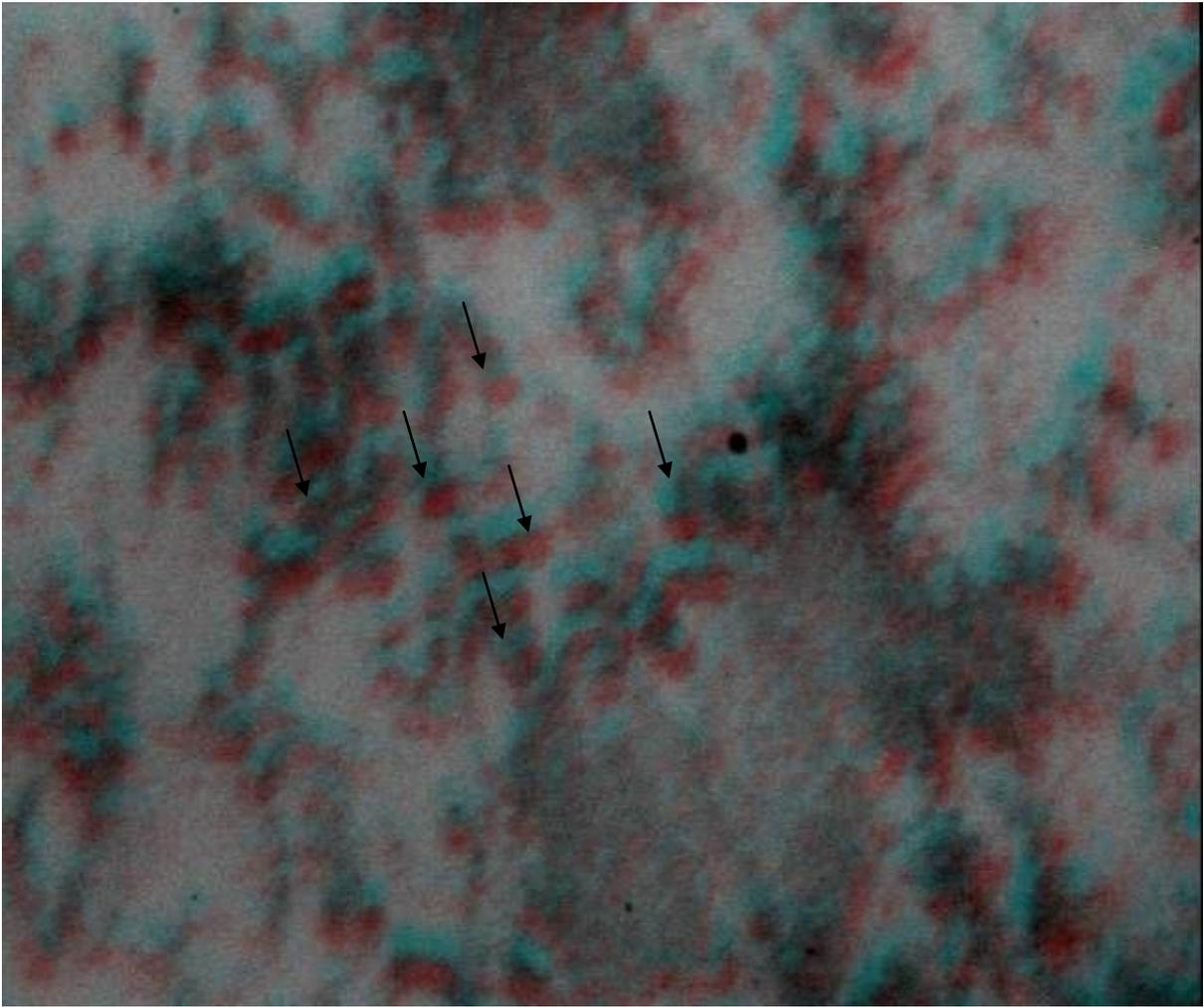


Figura 26. Estereopares de gránulos de Lacandonia en *A. heterophylla*. Contraste con EDTA (Ur-EDTA-Pb) para ribonucleoproteínas. Las flechas señalan los gránulos de Lacandonia. 100,000X.

La distribución de los GL en el Reino Plantae parece ser amplio, ya que es posible encontrarlos en angiospermas de la familia Triuridiaceae y en las gimnospermas de las divisiones Cycadophyta, Ginkgophyta, Coniferophyta, también en grupos de plantas tempranamente divergentes como Pteridophyta y Equisetophyta (Romero-Martínez, 2010). En este trabajo se determinó la presencia de GL en *A. heterophylla* una gimnosperma de la división Pinophyta. Esto puede ser un indicador que los GL sean un carácter sinapomórfico entre las plantas.

## CONCLUSIONES

- El núcleo de *Araucaria heterophylla* tiene un tipo de distribución de la cromatina reticulado y contiene gránulos de Lacandonia.
- Las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de microscopía de fuerza atómica son útiles como herramientas complementarias en el análisis de la estructura del núcleo celular y partículas nucleares, pues ofrecen información nanométrica en dos y tres dimensiones, respectivamente.

## REFERENCIAS

- 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.
- Agredano-Moreno L.T., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M., Martínez E., Ramos C., Nin G.H.V. (1994). Cytochemical and Immunocytochemical Study of Nuclear-Structure of *Lacandonia schismatica*. *Biol. Cell.* 82: 177-184.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., 4<sup>th</sup> edition. New York. 1392 p.
- Alexander S., Hellemans L., Marti O. (1989). An atomic resolution, atomic force microscope implemented using optical level. *J. Appl. Phys.* 66: 164-167.
- Alonso-Murillo C.D. (2008). Análisis ultraestructural de la biogénesis de los Gránulos de *Lacandonia* en “Ahuehuete” (*Taxodium mucronatum*). Trabajo de Investigación. Especialista en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas. UNAM.
- Bernhard W. (1969). A New staining Procedure for Electron Microscopical Cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27:250-265.
- Bragga P.C. & Ricci D. (2004). Atomic force microscopy: biomedical methods and applications. Series: Methods in molecular biology (Totowa,N, J): 242.

- Busch H. 1974. The Cell Nucleus. Academic press INC. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Volume I USA. 612p.
- Cassimeris L., Lingappa V. R., Plopper G., & Lewin B. (2011). Lewin's cells. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers.
- Elings V.B., Gurley J.A., Maivald P. (1993). Atomic Force Microscope. Google Patents. Disponible en línea: <http://www.google.com/patents/US5224376>
- Espíndola D.C. (2004). Prácticas de Biología de organismos multicelulares. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 100p.
- Gaona-López C. (2008). Análisis tridimensional de los gránulos de Lacandonia en el núcleo celular de *G. biloba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Guzmán-López A.G. (2003). Estudio del Núcleo de las Angiospermas *Illicium floridanum* y *Pelargonium hortorum* por Microscopía de luz, Microscopia Electronica de Transmisión y Microscopía de Fuerza Atómica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Jiménez García L.F., Reynoso Robles R., Fragoso Soriano R., Agredano Moreno L.T., Segura Valdez M.L., González Moreno S., Ramos C.H., Martínez E. (1998). Biología Celular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. Bol. Soc. Bot. Méx. 62: 5-14.
- Jiménez-García L.F. & Fragoso-Soriano R. (2000). Atomic Force

Microscopy of the Cell Nucleus. J. Struct. Biol. 129: 218-222.

- Jiménez-García L.F. & Merchant H. (2003). Biología celular y molecular. PEARSON EDUCACIÓN. México. 912p.
- Jiménez-García L.F., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M.L., Echeverría L., Martínez E., Ramos C.H., Vázquez-Nin G.H. (1992). The ultrastructural study of the interphase nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. Biol. Cell. 75: 101-110.
- Jiménez-Ramírez J., Agredano-Moreno L.T., Segura-Valdez M.L., Jiménez-García L.F. (2002). Lacandonia granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. Biol. Cell. 94: 511-518.
- Kalle W. & Strappe P. 2012. Atomic force microscopy on chromosomes, chromatin and DNA: A review. Micron, 43: 1224-1231.
- Kershaw P. & Wagstaff B. (2001). The Southern Conifer Family Araucariaceae: History, Status, and Value for Paleoenvironmental Reconstruction. Annu. Rev. Ecol. Syst. 32: 397- 414.
- Koolman J. & Röhm K.H. 2004. Bioquímica. Texto y Atlas. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid., España. 492p.
- Magonov S.N., Eling V.B., Whangho M.H. (1997). Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. Surf Sci. 375:1385-91.
- Manley J.L. & Tacke R. (1996). SR proteins and splicing control. Genes Dev. 13: 1569-1579.
- Mastroberti A. A. & Mariath J.E.A. (2003). Compartmented cells in the

mesophyll of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Am. J. Bot.* 51:267-274.

- Molina G.I. (1782). *Saggio sulla storia naturale del Chili*. S. Tommaso d'Aquino, Bologna. 9p.
- Moreno Díaz de la Espina S., Mínguez A., Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M. (1992). Fine structural organization of a non- reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. *Chromosoma* 101: 311-321.
- Ntima O.O. (1968). The araucarias. Fast Growing Timber Trees of the Lowland Tropics 3. Oxford. England. Commonwealth Forestry Institute. 139 p.
- Oberdoerffer P. & Sinclair D.A. (2007). The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 692-701.
- Poole Jr. C.P. & Owens F.J. (2003). *Introducción a la Nanotecnología* Ed. Reverté. Barcelona, España. 400 p.
- Putman C.A.J., Vanderwerf K.O., Degrooth B.G. (1994). Tapping mode atomic force microscopy and liquid. *Appl. Phys. Lett.* 64:2454-2456
- Reimer L. & Kohl H. (2008). *Transmission Electron Microscopy. Physics of Image Formation*. 5a Edición. Springer series in Optical Sciences. 602p.
- Romero-Martínez I. (2010). Análisis Ultraestructural de la biogénesis de los gránulos de Lacandonia en equisetos (*Equisetum hyemale L*) y helechos (*Adiantum capillus-veneris*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 71p.

- Saha A., Wittmeyer J., Cairns B.R. (2006). Chromatin remodeling; the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 7842- 7848.
- Salisbury R.A. (1807). The characters of several Genera in the natural order of Coniferae: with remarks on their stigmata, and cotyledons. *Trans. Linn. Soc. London.* 8: 308–317.
- Schans A.V.D, Schockman L.M., Cloudy J.B. (2004). *Tropical and Subtropical Trees.* Thames & Hudson Ltd. Holborn, London. p 30.
- Segura-Valdez M.L., Agredano-Moreno L.T., Nepomuceno-Mejía T., Fragoso-Soriano R., Álvarez-Fernández G., Zamora-Cura A., Lara-Martínez R., Jiménez- García L.F. 2014. *Cell Nanobiology. Chapter 1. Agricultural and Biological Sciences. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A role for Antioxidants.* 26p.
- Segura-Valdez M.L., Zamora-Cura A., Gutiérrez-Quintanar N., Villalobos-Nájera E., Rodríguez-Vázquez J.B., Galván-Arrieta T.C., Jiménez-Rodríguez D., Agredano-Moreno L.T., Lara-Martínez R., Jiménez-García L.F. (2010). Visualization of cell structure *in situ* by atomic force microscopy. En: Méndez-Vilas, A. & Díaz, J. (eds) *Microscopy: science, technology, applications and education (Microscopy Book Series),* Formatex, Badajoz, Spain.
- Spector D.L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 265-315.
- Spector D.L. 2001. Nuclear Domains. *Cell Science at Glance.* J. Cell Sci.

114: 2891-2893.

- TAH. (2000). Dictionary of the English language. Fourth Edition.
- Vaughn K. (2013). Immunocytochemistry of Plant Cells. Springer Dordrecht Heidelberg, New York London. USA. 135 p.
- Vázquez-Nin G.H. & Echeverría O.M. (1996). The polytene nucleus in morphological cytochemical and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. Eur. J. Histochem. 40:7-16.
- Vázquez-Nin G.H. & Echeverría O.M. (2000). Introducción a la Microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. 1ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México. DF. 165p.
- Visa N., Puvion-Dutilleul F., Harper F., Bachellerie J.P., Puvion E. (1993). Intranuclear distribution of Poly (A) RNA determined by electron microscope *in situ* hybridization, Exp. Cell. Res. 208: 19-34.
- Watson JD. Baker TA. Bell SP. Gann A, Levine M. Losick R. (2006) Biología Molecular del Gen. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. S.A. España. 776 p.
- Webster M., Witkin K.L, Cohen-Fix O. (2009). Sizing up the nucleus: nuclear shape.size and nuclear-envelope assembly. J. Cell Sci. 122: 1477-1486.
- Williams D.B., Carter B.C. (2009). Transmission Electron Microscopy. Part 1: Basics. A Textbook for Materials Science. Second Edition. Springer. 760p.
- Zamora-Cura A.L. (2006). Estudio del núcleo Interfásico de *Soridium spruceanum* Miers por Microscopía de Luz, Electrónica y de Fuerza atómica. Tesis de Licenciatura. UNAM. 51 p.