



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio del nucléolo de cebolla (*Allium cepa*) mediante
Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía de
Fuerza Atómica”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Rubén Chávez Rosales

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Segura Valdés. Facultad de Ciencias.

COMITÉ TUTOR.

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo. Centro de Ciencias de la Atmósfera.

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla. Instituto de Biotecnología.

MÉXICO, D.F. Noviembre de 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio del nucléolo de cebolla (*Allium cepa*) mediante
Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía de
Fuerza Atómica”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Rubén Chávez Rosales

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Segura Valdés. Facultad de Ciencias.

COMITÉ TUTOR.

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo. Centro de Ciencias de la Atmósfera.

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla. Instituto de Biotecnología.

MÉXICO, D.F. Noviembre de 2014.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/530/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

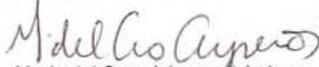
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de junio de 2014** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **CHÁVEZ ROSALES RUBÉN** con número de cuenta **301003209** con la tesis titulada "**Estudio del nucléolo de cebolla (*Allium cepa*) mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía de Fuerza Atómica**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDÉS**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VANDER GOES
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DRA. GUADALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 1ro. de octubre de 2014


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Mi total agradecimiento por la oportunidad de cursar la maestría en su programa, esto significó un nuevo punto de partida en mi vida profesional.

A CONACYT.

Por permitirme concluir los estudios de maestría por medio de una beca de tiempo completo y así poder continuar con mi desarrollo académico.

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdés.

Gracias por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por la paciencia, enseñanza y el impulso mostrado en todo momento.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo.

Gracias por toda la ayuda y amabilidad, por el tiempo dedicado a este trabajo, por sus observaciones y consejos.

A la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla.

Gracias por toda la ayuda y amabilidad, por el tiempo dedicado a este trabajo, por sus observaciones y consejos.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Gracias por la confianza y apoyo, por el tiempo dedicado a este trabajo, por sus observaciones y consejos.

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

Gracias por su disposición y amabilidad, por el tiempo dedicado a este trabajo, por sus observaciones y consejos.

A la Dra. Laura Colín Barenque.

Gracias por su disposición y amabilidad, por el tiempo dedicado a este trabajo, por sus observaciones y consejos.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno.

Por toda la ayuda, enseñanza, consejos y apoyo mostrado en el laboratorio.

A la M. En C. Reyna Lara Martínez.

Por toda la ayuda, enseñanza, consejos y apoyo mostrado en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio y grupo de trabajo.

Por el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio, por toda la ayuda y todos los buenos consejos pero sobre todo gracias por su amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres Rubén y Virginia.

Por su comprensión, apoyo y amor incondicional mostrado a lo largo de toda mi vida, por su gran amistad y enorme ejemplo, gracias por estar conmigo en mis momentos dulces y amargos, por apoyarme en mis ambiciones, sueños e inquietudes, ustedes dos son mi más grande fuente de inspiración, es una dicha para mi ser su hijo ¡Los amo!

A mis hermanas Virginia y Lilián.

Por las risas compartidas, los consejos llenos de cariño y la ayuda prestada en los momentos difíciles. ¡Las amo!

A mi abuela Cecilia q.e.p.d.

Por llenar mi niñez de alegría y amor, siempre te llevo en mi corazón ¡Te amo!

A mi tía María Luisa.

Por todos los cuidados, la enorme dedicación y todo el amor que siempre nos has tenido a mi y a mis hermanas, por que más que mi tía, eres otra madre para mi ¡Te amo!

A Zyanya Daniela

Por todos los momentos compartidos, por la enorme motivación y cariño.

ÍNDICE.

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| SUMMARY..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| EL NUCLÉOLO..... | 3 |
| ESTRUCTURA DEL NUCLÉOLO..... | 4 |
| CENTRO FIBRILAR..... | 4 |
| COMPONENTE FIBRILAR DENSO..... | 4 |
| COMPONENTE GRANULAR..... | 5 |
| BIÓGENESIS DEL rRNA..... | 6 |
| EL NUCLÉOLO EN LA MITOSIS..... | 10 |
| RNA's PEQUEÑOS NUCLEOLARES..... | 12 |
| MODIFICACIONES POSTRANSKRIPCIONALES..... | 13 |
| METILACIÓN..... | 13 |
| PSEUDOURIDINACIÓN..... | 14 |
| PROTEÍNAS NUCLEOLARES..... | 15 |
| NUCLEOLINA..... | 16 |
| FIBRILARINA..... | 17 |
| PROTEINA NUCLEOLAR B23..... | 17 |
| LA MICROSCOPIA COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL NUCLÉOLO..... | 18 |
| MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN..... | 18 |
| MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA..... | 19 |
| ANTECEDENTES..... | 21 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 22 |
| HIPÓTESIS..... | 24 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 24 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS..... | 25 |
| FIJACIÓN..... | 25 |
| POSFIJACIÓN..... | 25 |
| DESHIDRATACIÓN..... | 25 |
| CORTES..... | 26 |
| CONTRASTE PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN..... | 27 |
| MÉTODO CONVENCIONAL Ur-Pb..... | 27 |
| AMINA DE OSMIO..... | 27 |
| EDTA..... | 28 |
| RESULTADOS..... | 29 |
| DISCUSIÓN..... | 45 |
| CONCLUSIONES..... | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 53 |

RESUMEN.

Diversos estudios de Biología Celular y Molecular han contribuido a la concepción actual que se tiene sobre el nucléolo (Segura *et al.*, 2006), el cual es un compartimiento nuclear en el que ocurre la síntesis y maduración del pre-RNA y el ensamble de las subunidades del ribosoma (Jiménez-García *et al.*, 2008), morfológica y funcionalmente, está constituido por tres regiones: la llamada centro fibrilar (CF), en donde se localizan los genes que codifican para rRNA (rDNA), rodeando al CF se encuentra el componente fibrilar denso (CFD) el cual se observa como una capa compacta, en esta región se da la transcripción de rDNA y su procesamiento inicial, toda la zona fibrilar esta dentro de una región más grande compuesta principalmente por gránulos de 15 a 20 nm de diámetro denominada componente granular (CG), esta región es la más externa y es en la que se realiza el ensamble de las partículas pre-ribosómicas destinadas a ser transportadas al citoplasma para formar los ribosomas (Jiménez-García *et al.*, 2008).

Los nucléolos interfásicos en células meristemáticas de *Allium cepa* se observan al microscopio óptico como cuerpos esféricos densos de 2 a 4 μ m de diámetro (Marcano *et al.*, 1995; Quin *et al.*, 2010), por lo que resultan un modelo práctico para observar sus diferentes regiones utilizando microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica.

En este trabajo se caracterizaron morfológicamente las tres regiones del nucléolo utilizando como modelo de estudio células del meristemo apical de *Allium cepa* en interfase y observándolas en un microscopio electrónico de transmisión el cual es una herramienta común en laboratorios donde se llevan a cabo estudios ultraestructurales, también se utilizó un microscopio de fuerza atómica el cual tiene un gran potencial para analizar muestras biológicas bajo un concepto diferente al empleado por el microscopio electrónico de transmisión, lo cual abre una ventana hacia nuevas opciones para observar la ultraestructura celular, se analizan las ventajas, así como las diferencias y la complementariedad que existe entre estos dos tipos de microscopios.

SUMMARY.

Various studies of cellular and molecular biology have contributed to the current concept we have of the nucleolus (Segura et al., 2006), this is a nuclear compartment in which the synthesis and maturation of RNA occurs as well as the pre-assembly of the ribosomal subunits (Jimenez-Garcia *et al.*, 2008), morphologically and functionally, it is constituted by three regions called fibrillar center (FC), where the genes encoding rRNA (rDNA) are located. Surrounding the FC, the dense fibrillar component (DFC) is localized, which is observed as a compact layer, in this region ~~occurs~~ the transcription of rDNA and initial processing take place, the entire fibril is within an area of granules of 15 to 20 nm of diameter called granular component (GC), it is the outer region ~~and in which occurs~~ where the assembly of pre-ribosomal intended to be transported to the cytoplasm to form ribosomes occurs (Jimenez-Garcia *et al.*, 2008).

The interphasics nucleoli in meristematic cells of *Allium cepa* ~~which~~ is observed by light microscopy as dense spherical bodies of 2 to 4 μ m of diameter (Marcano *et al.*, 1995; Quin *et al.*, 2010). These are a practical model to observe different regions using transmission electron microscopy and atomic force microscopy.

In this work the three regions of the nucleolus are studied using interphasic cells of the apical meristem of *Allium cepa*, these were observed with a transmission electron microscope which is a common tool in laboratories where ultrastructural studies are made, also we used an atomic force microscope which has great potential for analyzing biological samples under a different concept employed by the transmission electron microscope, which opens a window into new options for cell ultrastructure study, the advantages are analyzed, as well as the differences and complementarity between these two types of microscopes.

INTRODUCCIÓN.

EL NUCLÉOLO.

El nucléolo es una subestructura nuclear en la cual los genes de tres de los cuatro rRNA's (RNA's ribosómicos) son transcritos y ensamblados para formar parte de la estructura del ribosoma (Alberts *et al.*, 2008). Este organelo ha sido estudiado por muchos años mediante diferentes técnicas de Biología Celular y Biología Molecular, las cuales han contribuido a la concepción actual sobre la organización funcional que éste presenta. Resultado de estos estudios hacen evidente que el nucléolo se encuentra involucrado en varios eventos, entre los que destaca, principalmente, la transcripción y procesamiento del rRNA (RNA ribosómico), el ensamblado del ribosoma, la longevidad, la detección de estrés y en el control de la actividad y proliferación celular (Derenzini *et al.*, 2006; Boisvert *et al.*, 2007). De acuerdo a las observaciones de las proteínas nucleolares en células, se sabe que el nucléolo y sus componentes son altamente dinámicos y que la estructura que se observa mediante microscopía es un estado estable, consecuencia de la difusión dinámica de macromoléculas como RNP's (ribonucleoproteínas) y pre-rRNA's, entre las diferentes regiones que presenta el nucléolo (Shaw, 2010).

El nucléolo fue descrito por primera vez por Fontana en 1781 quien observó esta estructura en la capa que recubre a la anguila. Posteriormente, Valentín en 1891 acuñó el término nucléolo refiriéndose a él en un principio como “un núcleo pequeño dentro de un núcleo grande”, El tamaño del nucléolo varía, el más pequeño observado es el de *Giardia lamblia* (0.2-0.5 μm), el de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado de hasta 1 μm , mientras que para células de raíz de plantas de hasta 10 μm (Arberts *et al.*, 2008; Jiménez *et al.* 2008; Shaw, 2010; Smetana, 2011).

ESTRUCTURA DEL NUCLÉOLO.

CENTRO FIBRILAR.

Morfológica y funcionalmente, el nucléolo está constituido por tres regiones: la llamada centro fibrilar (CF), que es la más interna y está compuesta por una malla de finas fibrillas de 4 a 8 nm de diámetro, dando un contraste en microscopia electrónica de transmisión relativamente bajo, generalmente en células con poca actividad el nucléolo contiene sólo un centro fibrilar con una forma característica que asemeja un rosca, de ahí que se les llame “núcleolos en forma de anillo”. La forma de estos CF's es más o menos globular con un diámetro de intervalo de 0,2 a 1,0 μm (Olson *et al.*, 2002; Hernández-Verdun, 2005).

Las células que son muy activas generalmente tienen grandes nucléolos, llamados “núcleolos compactos”, éstos contienen varios CF's de diferentes tamaños. En algunas células se han observado cerca de un centenar de CF's como; en fibroblastos en crecimiento logarítmico (Jordan y MacGovern, 1981) y en linfocitos estimulados (Hozák *et al.*, 1989). También se han reportado CF conspicuos que pueden ser algunas veces muy pequeños o falsos, incluso en células con un alto nivel de síntesis de rRNA, a estos los llaman “núcleolos reticulados” (Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

El CF está en amplio contacto con el componente fibrilar denso (CFD), el cual se encuentra rodeándolo, sin embargo en algunos sitios también se tiene contacto directo con fibrillas de la cromatina periférica y el componente granular CG. En esta primera región (CF) se van a localizar los genes (rDNA) que codifican para rRNA (Scheer *et al.*, 1993; Smetana, 2011).

COMPONENTE FIBRILAR DENSO

El componente fibrilar denso (CFD) consiste en finas fibrillas empaquetadas densamente de alrededor de 3 a 5 nm de grosor que le proporciona un contraste relativamente alto al observarse mediante microscopia electrónica de transmisión

(Schwaracher y Watchtler, 1993; Shaw, 2010). El CFD generalmente forma una red de hebras de 0,05 a 0,1 μ m de espesor, también llamado por algunos autores como nucleolonema (Sato *et al.*, 2005).

En nucléolos con forma de anillo, el CFD se encuentra rodeando al único CF, en nucléolos compactos cada CF está incrustado en una red de hebras de CFD que continúa entre los CF's los cuales no siempre están aislados, por lo tanto pueden estar en contacto directo con el CG o con la cromatina periférica (Schwaracher y Watchtler, 1993; Shaw, 2010).

En nucléolos reticulados o con nucleolonema se ha descrito que el CFD forma una red de hebras que se extiende sobre casi toda la zona central del nucléolo, intercalados con sólo pequeños CF's (Schwaracher y Watchtler, 1993; Sato *et al.*, 2005), y en esta región es donde se da la transcripción de genes que codifican para rRNA y su procesamiento inicial (Jiménez-García *et al.*, 2008), toda la zona fibrilar está dentro de una región más grande compuesta principalmente por gránulos denominada componente granular (CG) (Jiménez-García *et al.*, 2008; Shaw, 2010).

COMPONENTE GRANULAR

Esta región consiste en estructuras granulares que van de un diámetro de 15 a 20 nm, a veces organizados en pequeñas cadenas de gránulos. El CG se encuentra hacia la periferia del nucléolo y por lo tanto generalmente fuera del CFD. Entre el CFD y el CG existe una zona transitoria en donde se entremezclan los dos componentes y algunas veces se observa otro que se describe como un "componente fibrillo-granular" (Schwaracher y Watchtler, 1993; Hernández-Verdun, 2005; Shaw, 2010).

Esta región es la más externa y posee una alta concentración de RNP's, aquí es donde se realiza el ensamblaje de las partículas pre-ribosomales destinadas a ser transportadas al citoplasma para formar ribosomas maduros (Jiménez-García *et al.*, 2008; Shaw, 2010).

BIOGENESIS DEL rRNA.

La biogénesis del rRNA maduro es un proceso complejo que difiere notablemente de la vía de la maduración del mRNA precursor. Se necesita la presencia de factores de procesamiento para las proteínas, RNPs y grandes variedades de RNA nucleolar pequeño (snoRNA), además de una RNA polimerasa I, las secuencias no codificantes espaciadoras transcritas se eliminan a través de una acción mediada por endonucleasas y exonucleasas antes o durante el montaje de las subunidades ribosomales pequeñas y grandes en el nucléolo, pseudouridina sintasas y metil-transferasas que están involucradas en las modificaciones que sufren los rRNA, GTPasas y ATPasas que facilitan la asociación y la disociación de proteínas (Tschochner y Hurt, 2003; Sirri *et al.*, 2008).

Los genes ribosómicos (rDNA) que codifican para rRNA son muy activos y se encuentran repetidos en tándem, su transcripción es conducida por la enzima polimerasa I que comprende varias subunidades y que sintetiza una cadena larga de pre-rRNA. La transcripción ocurre entre el CF y la frontera que hay entre el CF y el CFD. El pre-RNA contiene, además de los rRNA 18S, 5.8S y 28S, secuencias espaciadoras transcritas internas y externas (Figura 1). El promotor del gen contiene dos secuencias importantes, un elemento de control río arriba llamado UBF (upstream binding factor, el cual mediante la asociación con la proteína SL-1, controla la transcripción de rRNA) y un promotor principal, que permiten la formación de un complejo transcripcionalmente competente (Voit y Grumm, 2001; Raska *et al.*, 2004; Shaw, 2010; Németh y Langst, 2011).

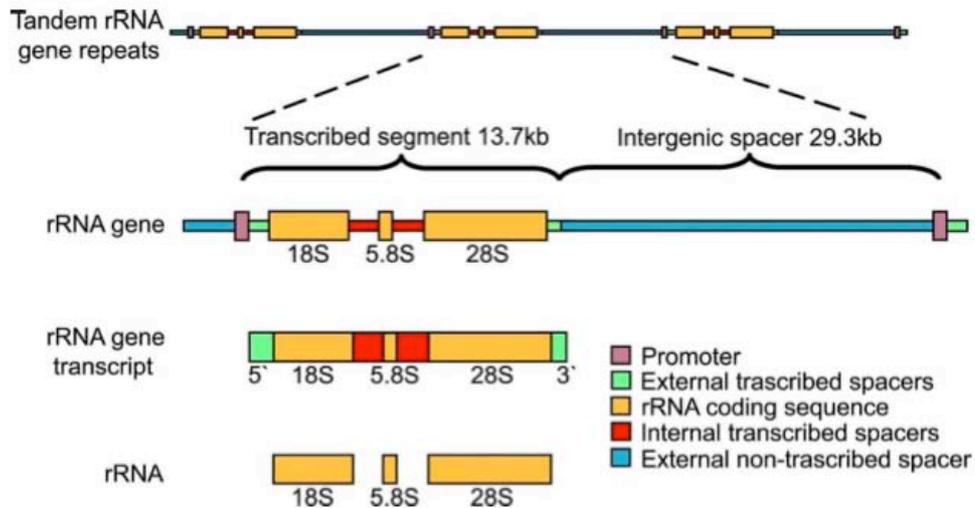


Figura 1. Diagrama de los genes rRNA y sus transcritos. Tomado de Raska *et al.* (2004).

Una vez que se da la transcripción de los pre-rRNA 45S, estos se escinden en un número de etapas hacia la maduración de las subunidades 18S, 5.8S y 28S (Raska *et al.*, 2004). La primera escisión remueve la secuencia líder 5' ETS (external transcribed spacer). Posteriormente la secuencia 3' ETS es removida, estas escisiones ocurren generalmente inmediatamente después de la transcripción pero se ha observado que puede comenzar antes de la finalización de la transcripción. Después ocurren escisiones en los ITS 1 y 2 (internal transcribed spacer) lo que produce la subunidad 18S de rRNA y posteriormente escisiones que dan lugar a las subunidades 5.8S y 28S de rRNA's, ejemplificado en la Figura 2 (Raska *et al.*, 2004; Shaw, 2010; Németh y Langst, 2011).

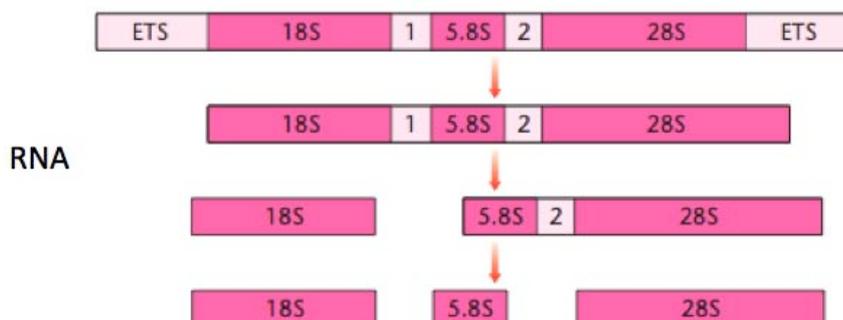


Figura 2. Diagrama donde se muestran las escisiones que sufre el rRNA. Modificado de Shaw (2010).

Las células somáticas de eucariontes superiores, así como células de levadura, contienen decenas, cientos o como en las células de las plantas, incluso miles de repeticiones de genes ribosómicos (Sáez-Vásquez y Medina, 2008). La actividad de estos genes puede ser visualizada a nivel de microscopía electrónica, en preparaciones de cromatina extendida. En la imagen que se obtiene se observa un eje de DNA al que se encuentran asociadas partículas que corresponden a la RNA polimerasa I, que a su vez están conectadas a los transcritos en proceso de síntesis que varían de tamaño de acuerdo al progreso de la transcripción. Estas imágenes fueron descritas por Miller y Beatty (1969) como árboles de navidad (Miller's christmas trees) ejemplificadas en la Figura 3. (Scheer *et al.*, 1997; Derenzini *et al.*, 2006).

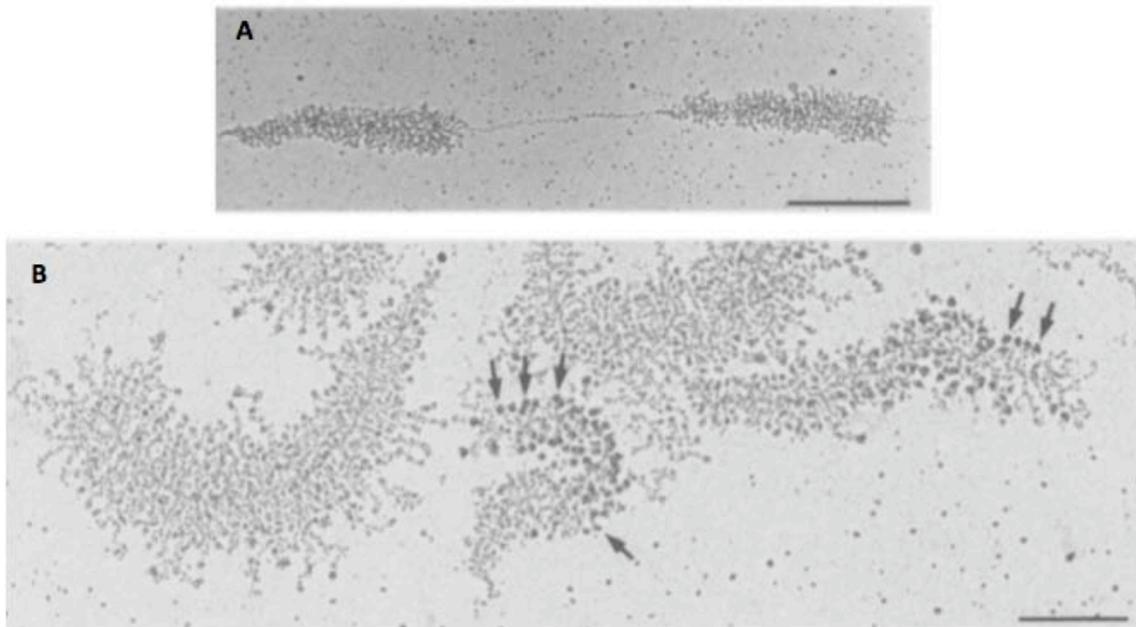


Figura 3. Imágenes que ejemplifican los llamados árboles de navidad descritos por Miller y Beatty (1969), mostrando los genes rRNA transcripcionalmente activos de ovocitos de *Locusta sp.* En A se observa el arreglo de los genes en tándem, escala de la barra 1 μ m. En B se muestran señaladas por flechas fibrillas desplegadas de ribonucleoproteínas que tienen la apariencia de gránulos compactos, escala de la barra 0.5 μ m, imagen tomada de Scheer *et al.* (1997).

La subunidad 5S que se necesita para formar ribosomas funcionales se sintetiza por separado en diferentes sitios cromosómicos situados en el nucleoplasma, ya que en eucariontes superiores los genes que codifican para la subunidad 5S han sido completamente separados de las secuencias en tándem del rDNA que se encuentran en los CF, además de que son transcritos por una RNA polimerasa diferente (RNA polimerasa II). Su transcripción se lleva a cabo de manera coordinada junto con la del rDNA, el resultado son moléculas de rRNA 5S que son importadas hacia el nucléolo para integrar la subunidad mayor a partir de rRNA's 5.8S, 28S y 5S y la subunidad menor a partir de rRNA's 18S que darán origen a ribosomas maduros (Olmedilla *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 2002; Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

La organización funcional del nucléolo puede considerarse en capas que envuelven la transcripción de los genes en una serie que corresponde a la serie temporal de pasos bioquímicos en el procesamiento del pre-rRNA lo cual se ejemplifica en la Figura 4 (Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

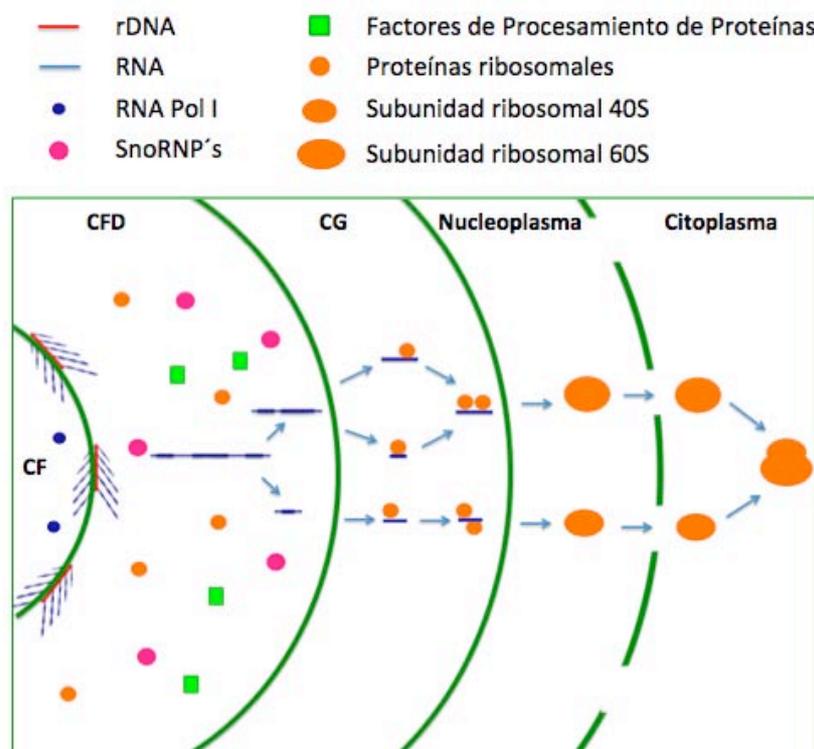


Figura 4. Esquema donde se resume la biogénesis de los ribosomas. Modificado de Boisvert *et al.* (2007).

EL NUCLÉOLO EN LA MITOSIS.

En la interfase del ciclo celular el nucléolo está compuesto por tres regiones: CF, CFD y CG, hacia el final de G2 y principio de la profase comienza la desorganización del nucléolo y el arresto de la transcripción del rDNA, el desensamble del nucléolo en la mitosis coincide con el rompimiento de la membrana de la envoltura nuclear en la llamada prometafase que es acompañada por una represión de la RNA polimerasa I la cual es fosforilada por un complejo Cdk1-Ciclina B, estas fosforilaciones son necesarias para el establecimiento y mantenimiento de la supresión del rDNA, se estima que su actividad desciende hasta llegar a solo un 30% de su actividad total en profase, y se vuelve totalmente nula la actividad llegando al final de la profase (cuando la membrana se disocia y los cromosomas son condensados) mostrado en la Figura 5 (Sáez-Vásquez y Medina, 2008; Hernández-Verdun , 2011).

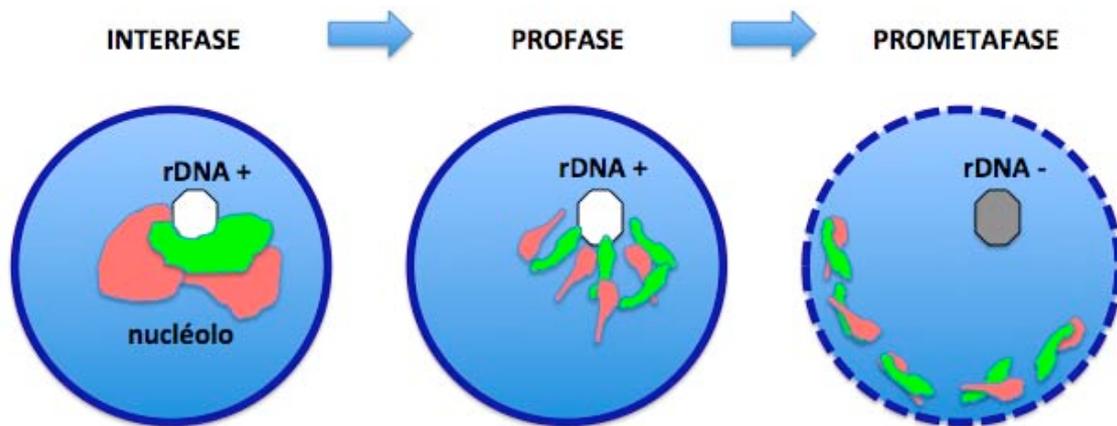


Figura 5. Ilustración del desensamble del nucléolo. Modificado de Hernández-Verdun (2011).

La maquinaria de transcripción y la RNA polimerasa I permanecen asociadas al rDNA en la región de los organizadores nucleolares (NOR nuclear organizing region) que son los sitios asociados a las constricciones secundarias de cromosomas acrocéntricos donde se localizan los *clusters* de genes de rDNA (Prieto y McStay, 2005). En este punto el nucléolo ya no es visible y los componentes para construir los futuros nucléolos son

reclutados y mantenidos en diferentes lugares durante la mitosis en cuerpos pre nucleolares (PBN) los cuales son subdominios nucleares transitorios, que se forman en la telofase y contienen proteínas nucleolares, snoRNPs y pre-rRNA. La disociación de los diferentes complejos protéicos del nucléolo ocurre también en el fin de la profase, la forma del nucléolo es modificada por la liberación de las proteínas nucleolares localizadas en el CFD y el CG (Hernández-Verdun, 2011; Carron *et al.*, 2012).

Mientras que son distribuidos los componentes de las futuras estructuras denominadas como cuerpos prenucleolares, la cromatina condensada forma un compartimiento pericromosómico, el cual es observado tanto en vertebrados como en plantas, dicho compartimiento contiene componentes del procesamiento del nucléolo que corresponde al CFD y CG, el cual se asocia con nucleolina, B23 y fibrilarina ligada a U3 además de diversas proteínas ribosómicas junto con moléculas de pre-rRNA. Estos componentes del procesamiento se encuentran distribuidos en el citoplasma y en anafase forman largas partículas citoplasmáticas llamadas NDF (nucleolus- derived foci). El hecho de localizar estos componentes indican que los complejos del procesamiento del rRNA son mantenidos en la mitosis (Olson *et al.*, 2002; Sáez-Vasquez y Medina, 2008; Hernández-Verdun, 2011).

Gracias al marcaje de proteínas nucleolares con GFP (green fluorescent protein) se sabe que éstas permanecen en la periferia de los cromosomas en metafase y migran junto con los cromosomas durante la anafase, indicando una asociación proteína-cromosoma mediante movimientos coordinados (Shaw, 2010).

Ya en la telofase, la transcripción se vuelve a activar en varios NOR's ya que el complejo Cdk1-Ciclina B se desensambla provocando el cese de las desfosforilaciones, los NDF liberan los componentes del procesamiento y junto con los PNB's son reclutados hacia los NOR's y comienza la formación de nuevos nucléolos en la fase G1 temprana como se ejemplifica en la Figura 6 (Olson *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2002; Sáez-Vasquez y Medina, 2008;).

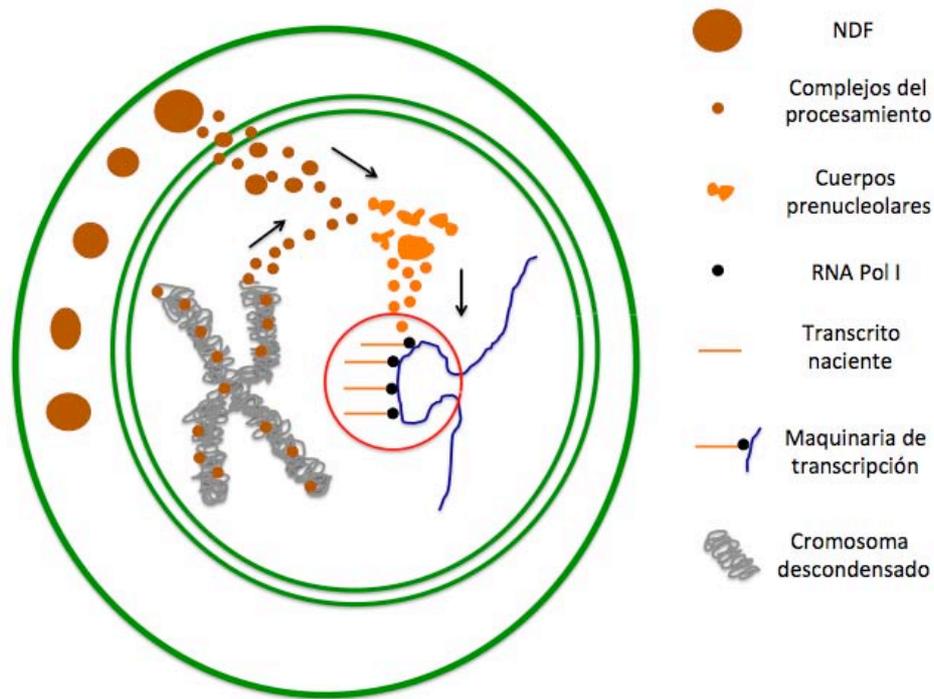


Figura 6. Diagrama de la formación de un nucléolo en telofase. Modificado de Olson *et al.* (2000).

RNA´s PEQUEÑOS NUCLEOLARES.

Los RNA pequeños nucleolares (UsnoRNA) son RNA's ricos en uridina que juegan un rol esencial en la maduración de rRNA's. En mamíferos son transcritos desde su propio promotor y en plantas desde precursores policistrónicos, cada UsnoRNA contiene varias secuencias diferentes, los precursores son importados dentro el nucléolo y escindidos en UsnoRNA's individuales (Olson *et al.* 2002).

Existen varios UsnoRNA de entre los que destacan U3 y U14 los cuales son necesarios para que se lleven a cabo todas las escisiones correctamente durante la maduración del rRNA, cada UsnoRNA se necesita en una etapa o etapas específicas, semejante al

requerimiento de pequeños RNA's nucleares (snRNA) en el *splicing* del mRNA (Weinstein y Steitz, 1999).

MODIFICACIONES POSTRANSCRIPCIONALES.

Adicionalmente al proceso de maduración del pre-rRNA, el rRNA presenta otro tipo de modificaciones que corresponden a metilaciones y pseudouridaciones, las cuales consisten en nucleótidos modificados en la posición 2'-O-ribose. Los rRNA's de células eucariotas superiores sufren hasta 100 de estas modificaciones aproximadamente (Boisvert *et al.* 2007).

METILACIÓN.

Los UsnoRNA's mediante sus estructuras conocidas como "cajas C/D" las cuales contienen dos motivos de secuencia conservados cortos, C (RUGAUGA, donde r es cualquier purina) y D (CUGA), situadas cerca de los extremos 5' y 3' del UsnoRNA, respectivamente. Regiones cortas de alrededor de 5 nucleótidos, se sitúan río arriba de la caja C y río abajo de la caja D las cuales son bases complementarias que forman una estructura de tallo-caja y sirven de guía para las metilaciones, estas se producen en 1 de 55 sitios en los pre-RNA de vertebrados y levaduras, respectivamente, que se encuentran en las regiones conservadas de rRNA maduros. La modificación toma lugar inmediatamente después de la síntesis, inclusive durante la misma. Segmentos marcados para la metilación forman dúplex con componentes de UsnoRNA, esto guía a la metilasa a los sitios que serán modificados, ejemplificado en la figura 7, (Weinstein y Steitz 1999; Olson *et al.* 2002; Shaw, 2010).

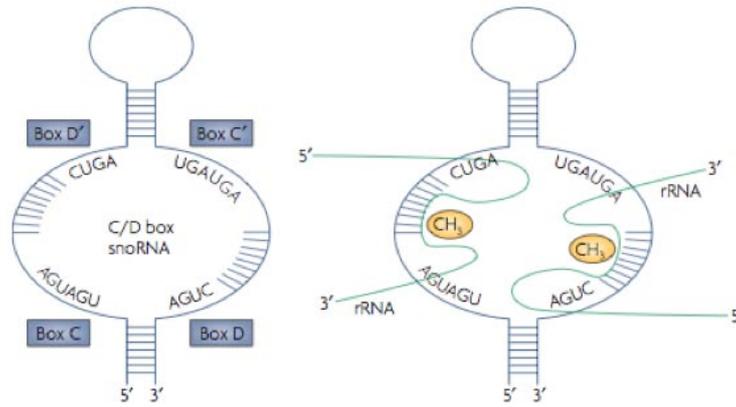


Figura 7. Diagrama donde se ejemplifica la metilación que sufren los rRNA's. Modificado de Olson *et al.* (2002).

PSEUDOURIDINACIÓN.

La pseudouridación del rRNA también está catalizada por una clase distinta de snoRNA que contiene una estructura definida en forma de “horquilla-bisagra- horquilla y una cola” con dos secuencias cortas conservadas llamadas “cajas H y cajas ACA”, una o ambas horquillas tienen un bucle interno con dos secuencias cortas que son complementarias al rRNA blanco, el espacio entre estas secuencias es llamado bolsillo de pseudouridación, la conversión de la uridina a pseudouridina en estos bolsillos está dirigida por la secuencia específica del complejo de “cajas H/ACA/snoRNA” a la cual las pseudouridilato sintasa es afín, (Figura 8), (Weinstein y Steitz, 1999; Olson *et al.*, 2002; Shaw, 2010). Hay casi tantas pseudouridaciones presentes en pre-RNA's como grupos metilo. Al igual que en la metilación los residuos modificados se encuentran en las regiones conservadas del rRNA maduro (Mourão *et al.*, 2010).

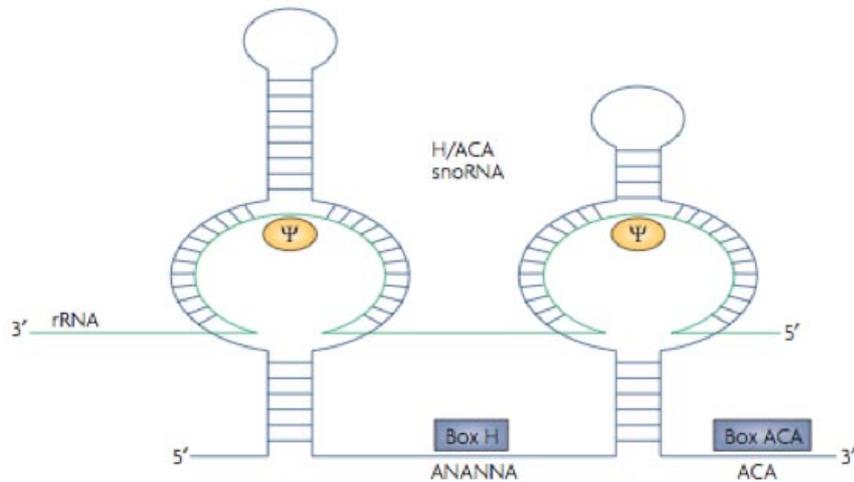


Figura 8. Diagrama donde se ejemplifica la metilación que sufren los rRNA's. Modificado de Olson *et al.*(2002).

PROTEÍNAS NUCLEOLARES.

El nucléolo contiene muchas proteínas diferentes, varias de las cuales están presentes en otras localizaciones celulares, esto incluye proteínas ribosómicas, proteínas involucradas en la transcripción del pre-RNA y su procesamiento subsecuente junto a varias otras enzimas como lo son metilasas, topoisomerasas, nucleasas, cinasas y fosfatasas (Shaw, 2010).

La transcripción del rDNA es catalizada por la RNA polimerasa I, un complejo de aproximadamente una docena de subunidades proteicas. La iniciación de la transcripción requiere la actividad coordinada de una serie de activadores transcripcionales y factores de unión. Además el nucléolo contiene tanto cromatina activa como cromatina inactiva, que puede llevar un complemento específico en el nucléolo de proteínas asociadas a cromatina (Medina *et al.*, 1995).

Actualmente, gracias a la tecnología, es posible llevar a cabo una rápida identificación de proteínas hasta el punto donde las bases de datos de proteínas del nucléolo de uno o varios tipos de células ya están disponibles. La utilización de esta información facilita enormemente el progreso en la comprensión de la composición de proteínas del nucléolo. Tres de las proteínas nucleolares mejor estudiadas son: la nucleolina, fibrilarina y proteína nucleolar B23 (Sáez-Vasquez y Medina, 2008).

NUCLEOLINA.

La nucleolina ha sido implicada en diferentes estados de la biogénesis de ribosomas y se localiza tanto en el CFD como en el CG, es una de las proteínas nucleolares más abundantes y estudiadas, ésta es una fosfoproteína similar tanto en seres humanos como en levaduras, la secuencia comienza con la alternancia de segmentos básicos y altamente ácidos en un tercio de su extremo N-terminal seguido por cuatro dominios de unión a RNA y termina con una corta secuencia que es rica en glicina y arginina dimetilada (llamados motivos RGG), algunos de éstos también se encuentran en otras proteínas nucleolares como en los segmentos ácidos de la proteína B23 y en los motivos RGG de la fibrilarina (Ginisty *et al.*, 1999).

La principal función de esta proteína es facilitar el procesamiento en las primeras etapas del pre-RNA^r interactuando con la región 5' del pre-rRNA para después reclutar componentes del procesamiento y dar comienzo a las escisiones que sufren para generar los rRNA's maduros. También puede actuar como chaperona facilitando la unión y el plegamiento interactuando durante la maduración de ribosomas (Ginisty *et al.*, 1999).

Varias proteínas, incluyendo la nucleolina, tienen transporte de regreso, ida y vuelta entre el núcleo y el citoplasma y se pueden unir a secuencias de localización nucleares (NLS) de otras proteínas nucleares, dejando abierta la posibilidad de que estén involucradas en el transporte del núcleo al citoplasma (Olson *et al.*, 2002).

FIBRILARINA.

La fibrilarina se asocia a una metil-transferasa y a snoRNA's, este complejo participa en los procesos de metilación que sufre el rRNA. Se ha visto que Nop1, la proteína homóloga de la fibrilarina en levadura, es esencial para el procesamiento de los pre-rRNA's, metilación de pre-rRNA's y el ensamble de los ribosomas, ya que sin esta proteína dichos procesos no se llevan adecuadamente (Tollervey y Kiss, 1997).

La fibrilarina fue inicialmente identificada, porque era la única proteína reconocida del suero autoinmune de un paciente con escleroderma y se le dio el nombre porque el suero sólo tiñó los centros fibrilares y los componentes fibrilares densos de nucléolos (Okano *et al.*, 1992).

PROTEINA NUCLEOLAR B23.

Esta es una fosfoproteína bien caracterizada, con múltiples actividades localizada primordialmente en el CG del nucléolo, que contiene moléculas de RNP pre-ribosómicos, encontrándose también extensamente en el componente fibrilar denso, pero, estando claramente ausente en los centros fibrilares (Spector *et al.*, 1984). Consistente con la localización en el componente granular esta proteína se encuentra asociada con la maduración de moléculas RNP pre-ribosomales (Pinol-Roma, 1999). Además B23 posee una actividad endoribonucleasa, con lo cual también participa en los estados finales de la biogénesis de ribosomas, también se comporta como molécula chaperona ya que se ha observado que importa la proteína Hiv-1/Rev hacia dentro del núcleo en cultivos celulares infectados con VIH-1 (Szebeni *et al.*, 1997; Szebeni *et al.*, 2003). La proteína B23 se puede expresar en dos isoformas, B23.1 Y B23.2 en rata, estas proteínas difieren solo en el extremo C-terminal (Herrera *et al.*, 1996).

LA MICROSCOPIA COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DEL NUCLÉOLO.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Varias estructuras diferentes han sido observadas usando microscopía electrónica de transmisión, para determinar la función, organización y transcripción y los subsecuentes estados de la biogénesis de ribosomas dentro el nucléolo (Alberts *et al.*, 2008).

Con esta herramienta se han logrado interpretar en un nivel molecular las subestructuras del nucléolo, muchos nucléolos contienen pequeñas regiones contrastadas claramente correspondientes a CF. Particularmente, en nucléolos de mamíferos se ha observado que los CF se encuentran rodeados por un material fibrilar más densamente contrastado que corresponde al CFD, el resto del volumen nucleolar esta embebido en un paquete de partículas pre-ribosómicos, esta región ha sido llamada componente granular (Scheer y Weisenberger, 1994; Olson *et al.*, 2002; Shaw, 2010).

En Nucléolos de plantas se ha observado que presentan una región central clara llamada vocuola o cavidad nucleolar. La cromatina condensada es a menudo vista en la periferia y algunas veces dentro de las diferentes regiones nucleolares (Olson *et al.*, 2002).

En algunas células de plantas hay largos CF conteniendo subregiones de cromatina condensada que han sido llamados CF heterogéneos. Características similares de estas regiones han sido identificadas en nucléolos de muchas especies y tipos celulares pero estas características pueden variar de un tipo de célula a otra y los componentes pueden ser difíciles de distinguir precisamente por estas características (Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.

Desde su invención en 1986 (Binning *et al.*, 1986), el microscopio de fuerza atómica ha sido utilizado para generar y analizar una multitud de muestras biológicas diferentes bajo el concepto de resolución atómica (Webb *et al.*, 2011).

El microscopio de fuerza atómica es miembro de la familia de microscopios de barrido por sonda. Estos microscopios utilizan una punta muy delgada (sonda) que realiza un escaneo en una estrecha proximidad hacia la superficie de la muestra para proporcionar información acerca de las propiedades de la superficie del material analizado (Francis *et al.*, 2010).

La microscopía de fuerza atómica usa una punta fina, la cual es montada sobre un cantiléver que a su vez está unido sobre un escáner piezoeléctrico, el cantiléver es capaz de presentar deflexiones debido a la fuerza que se aplique al momento del barrido de la superficie y su interacción con las diferencias topográficas que presente dicha superficie. Esta deflexión puede ser medida utilizando un láser que se refleja sobre el cantiléver hacia un detector de deflexión. La información generada es procesada mediante un sofisticado software que reconstruye una representación topográfica, que puede ser tridimensional de la superficie de la muestra (Dorobantu y Gray, 2010; Quin *et al.*, 2010).

Esto constituye una herramienta excelente en el campo de la Biología ya que permite generar imágenes 3D y analizar la topografía *in situ* tanto de células vivas bajo condiciones fisiológicas (en amortiguadores) así como de células u organelos fijados, aprovechando la resolución nanométrica que ofrece este tipo de microscopía (Francis *et al.*, 2010).

Existen tres tipos de modo de operación en microscopía de fuerza atómica:

- Modo de contacto, donde la punta está en constante contacto con la superficie y el escáner piezoeléctrico manteniendo una fuerza constante entre la punta y la superficie.
- Modo de contacto intermitente o “tapping” en el que se aplica una tensión de excitación para provocar que la punta oscile, y la diferencia de amplitud y de fase entre el voltaje de excitación y la oscilación de la punta se supervisan.
- Modo de no contacto, en el cual –como su nombre lo dice– la punta no hace contacto con la muestra, aquí el escáner piezoeléctrico también mantiene una distancia y fuerza constante (Kalle y Strappe, 2012).

ANTECEDENTES.

El análisis de la estructura celular con el microscopio de luz y electrónico ha producido un gran conocimiento sobre la morfología y función de la célula y gracias a la invención del microscopio de fuerza atómica en 1986 (Binning *et al.*, 1986), ahora existe la posibilidad de estudiar a las células con este nuevo tipo de tecnología, a escala nanométrica, sin embargo muy pocos trabajos se avocan a estudios de la estructura celular utilizando este microscopio (Müller y Dufrene, 2011).

Mediante diversos estudios previos en el laboratorio se ha documentado el análisis del nucléolo mediante microscopía electrónica de transmisión en diversos organismos como; *Trypanosoma cruzi* (López-Velazquez *et al.*, 2005), *Entamoeba histolytica* (Vazquez *et al.*, 2009) y *Giardia duodenalis* (Jiménez-García *et al.*, 2008), de hecho, para el caso del nucléolo de *Giardia*, su tamaño fue una limitante importante para que fuera descrito con anterioridad pues dicho tamaño se ubica en el rango del límite de resolución del microscopio óptico. También se ha dejado abierta la posibilidad de estudiar esta estructura celular *in situ* mediante microscopía de fuerza atómica; gracias a trabajos previos en donde se observan núcleos de células de meristemo de raíz de *Allium cepa* con microscopía de fuerza atómica (Segura-Valdez *et al.*, 2006), y en los que se observan las diferentes etapas de la mitosis también mediante microscopía de fuerza atómica (Segura-Valdez *et al.*, 2008). Más recientemente, se han obtenido micrografías de fuerza atómica de la estructura celular, con énfasis en la estructura del núcleo en interfase (Jiménez-García y Fragoso, 2010).

A pesar de que se conoce la ultraestructura de *Allium cepa*, ésta resulta compleja y aún queda pendiente el estudio y descripción del nucléolo utilizando un criterio de resolución vertical, como el que proporciona el microscopio de fuerza atómica, por ello, para estudiar esta estructura celular en el presente trabajo se eligió como modelo a *Allium cepa*, que presenta células meristemáticas con nucléolos interfásicos grandes, lo que favorece la observación de los componentes celulares en interfase y el estudio de la estructura del nucléolo *in situ* (Marcano y del Campo, 1995).

JUSTIFICACIÓN.

El conocimiento de los componentes celulares, entre ellos del nucléolo, ha tenido grandes avances gracias a técnicas de gran valor como lo es la microscopía óptica y la microscopía electrónica de transmisión y más recientemente, la microscopía de fuerza atómica, habiendo diferencia entre éstas, pero complementándose entre ellas.

La microscopía de fuerza atómica es una técnica poderosa para investigar la nanoestructura biológica de organismos, su principal ventaja, sobre la microscopía electrónica de transmisión es que permite medir detalles estructurales en la resolución de unos pocos nanómetros *in vivo* e *in situ* en células o tejidos (Dvorak *et al.*, 2000: Segura-Valdez *et al.*, 2008) y dado que no requiere alto vacío no se necesita una previa preparación de la superficie, lo cual en ocasiones puede dañar o alterar la muestra, además no forzosamente utiliza fijación, la cual frecuentemente daña la muestra y altera las propiedades de la muestra. También con la microscopía de fuerza atómica se pueden procesar imágenes en tres dimensiones lo que puede ayudar a una mejor caracterización vertical de la muestra, además de lograr una resolución del orden de nanómetros, que es un aspecto esencial para materiales biológicos (Dorobantu *et al.*, 2012).

Hasta el momento las características descritas del nucléolo mediante microscopía electrónica de transmisión, han sido clasificadas sólo con base en la densidad a los electrones, que ofrece el contraste mediante metales y sales pesadas y por su textura aparente, granular y fibrilar. Y a través de estas características se deduce que dichas diferencias corresponden en general a la presencia o ausencia de proteínas y otros componentes en distintas regiones del nucléolo así como su relación con los diferentes pasos en la biosíntesis de ribosomas (Shaw, 2010).

Dado que existen pocos estudios del nucléolo utilizando un tercer criterio para describir sus características, y que la microscopía de fuerza atómica utiliza un principio diferente al microscopio electrónico de transmisión, ya que recorre la superficie de una muestra brindando información de la estructura en sus tres dimensiones, información nanométrica con resolución vertical de la textura, distribución de las regiones y transiciones entre regiones, resulta importante que se lleven a cabo estudios ultraestructurales y morfológicos en nucléolos interfásicos de células meristematicas de

Allium cepa para describir estas características y compararlas con las generadas mediante microscopía electrónica de transmisión

HIPÓTESIS.

Los distintos componentes del nucléolo de *Allium cepa* tienen diferentes características nanométricas de resolución vertical.

OBJETIVO GENERAL.

Describir las características nanométricas del nucléolo de *Allium cepa* mediante Microscopia de Fuerza Atómica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Describir la forma, tamaño y distribución de los componentes nucleolares mediante Microscopía de Fuerza Atómica.
- Comparar los parámetros anteriores con los generados con el Microscopio Electrónico de Transmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

FIJACIÓN.

Se dejaron crecer raíces de cebollas durante 4 días; posteriormente se cortaron las puntas de la cofia (parte café de la raíz) con ayuda de una navaja y se depositaron inmediatamente en tubos eppendorf con solución fijadora (4% de paraformaldehído y 6% de glutaraldehído en PBS), los tubos se taparon y se dejó que la solución actuara toda la noche, se retiró el fijador y se lavaron las muestras con PBS 8 veces cada 10 minutos.

POSEFIJACIÓN.

Las muestras se sumergieron en una solución de OsO_4 al 1% diluido en PBS, se sellaron los tubos eppendorf con parafilm y se dejó reposar durante 12 horas. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con amortiguador PBS para retirar el exceso de OsO_4 .

DESHIDRATACIÓN.

Las muestras se deshidrataron en soluciones de etanol en concentraciones graduales de 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y absoluto, dejando 10 minutos entre cada cambio. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con óxido de propileno de 10 minutos cada uno y se procedió a realizar una pre-inclusión.

INCLUSIÓN.

Se realizó una pre-inclusión lenta mediante una relación 2:1 de óxido de propileno y resina epóxica, se sumergieron las muestras y se taparon los tubos con parafilm y se dejaron reposar durante 20 horas, se destaparon los tubos y se dejó evaporar el óxido de propileno 20 horas, se repitió la pre-inclusión mediante una relación 1:1 de óxido de propileno y resina epóxica bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Terminado el tiempo, se permitió la evaporación del óxido de propileno 20 horas, las muestras se colocaron en moldes de inclusión y se mantuvieron a 60°C durante 2 días. Finalmente, se obtuvieron muestras incluidas en la resina listas para generar cortes semifinos y

ultrafínos. La cantidad de cada reactivo para preparar la resina se muestra en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la preparación de la resina Embed.

| Reactivos | Cantidad (g) |
|------------------|---------------------|
| EMbed 812 | 3.22 g |
| DDSA | 3.75 g |
| MNA | 1.05 g |
| DME | 0.19 g |
| TOTAL | 8.21 g |

Tabla 2. Reactivos utilizados para la preparación de la resina Spurr.

| Reactivos | Cantidad (g) |
|------------------|---------------------|
| ERL 4206 | 2.05 g |
| DER 736 | 0.715 g |
| NSA | 2.95 g |
| DMAE | 0.05 g |
| TOTAL | 5.765 g |

CORTES.

Se montó el bloque de resina en un Ultramicrotomo Leica®. Para cortar las muestras, se utilizaron cuchillas de vidrio con una solapa de *maskingtape*, se generaron cortes semifínos (de 300 a 500 nm de espesor) y ultrafínos (de 50-60 nm de espesor). Para verificar la calidad del procesamiento se tiñeron los cortes con azul de toluidina revisando la integridad morfológica con un microscopio óptico Nikon® a 40 y 100 X. Los cortes ultrafínos se colocaron sobre una rejilla de cobre con membrana de formvar

o una rejilla de oro, según el contraste a emplear para después ser observados en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010).

Para analizar las muestras en el microscopio de fuerza atómica, se obtuvieron cortes semifinos montados sobre cubreobjetos de vidrio, revisados; estos se montaron sobre porta objetos y se contrastaron con azul de toluidina sin colocar cubreobjetos y se procedió a observar utilizando un microscopio de fuerza atómica modelo Bioscope (Veeco).

CONTRASTE PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

MÉTODO CONVENCIONAL Ur-Pb.

Se contrastaron las rejillas que contenían los cortes ultrafinos sumergiéndolas en una gota de acetato de uranilo (40 μ l) durante 40 minutos dentro de una caja Petri con ambiente húmedo y libre de luz, se enjuagó la rejilla durante 10 segundos con agua destilada, se secó con ayuda de papel filtro y se sumergió en una gota de citrato de plomo (40 μ l) durante 15 minutos en una caja petri con ambiente húmedo y libre de luz, se enjuagó durante 10 segundos con agua destilada, se secó con papel filtro y se procedió a observar en el microscopio electrónico de transmisión.

AMINA DE OSMIO.

Los cortes ultrafinos también se observaron en el microscopio electrónico de transmisión utilizando una técnica de contraste específico para DNA empleando Amina de Osmio. Brevemente, la técnica consiste en calentar aproximadamente 600 μ l de agua destilada, se le agregó 600 μ l de ácido acético y se agitó por 20 minutos. Posteriormente, se agregaron 10 mg de metabisulfito de sodio y se agitó por 20 minutos, se agregaron 0.002g de amina de osmio y se agitó por 20, una vez concluido el tiempo de agitación se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos, el tubo se protegió de la luz con papel aluminio y se procedió a usar inmediatamente sobre cortes montados en una

rejilla de oro previamente hidrolizados con HCl 5N durante 1 hora. La rejilla fue sumergida en una gota (20 μ l) de amina de osmio y se guardó en una cámara húmeda por 24 horas, se enjuagó la rejilla con agua destilada y se secó con ayuda de papel filtro y se observó al microscopio electrónico de transmisión.

EDTA.

Para esta técnica de contraste preferencial, no se realiza postfijación. Una vez obtenidos los cortes ultrafinos se montaron en una rejilla de cobre con membrana de formvar la cual se sumergió en una gota de acetato de uranilo (40 μ l) durante 18 minutos dentro de una caja Petri con ambiente húmedo y libre de luz, se enjuagó la rejilla durante 10 segundos con agua destilada, se secó y se sumergió en una gota de EDTA (40 μ l) durante 3 minutos, en una caja Petri con ambiente húmedo y libre de luz, se enjuagó durante 10 segundos con agua destilada, se secó con papel filtro y se sumergió en una gota de citrato de plomo (40 μ l) durante 18 minutos en una caja Petri con ambiente húmedo y libre de luz, se volvió a enjuagar durante 10 segundos con agua destilada, se secó con ayuda de papel filtro y se observó en el microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS.

Mediante microscopía de luz con campo claro, se analizaron cortes semifinos, teñidos con azul de toluidina, para verificar la conservación del material correspondiente a los meristemas de la raíz de *Allium cepa* y se seleccionaron aquellos en los que se pudiera reconocer células con núcleo y nucléolo (Figura 9), con el objetivo de 100 X se logró observar con mayor detalle los nucléolos en interfase y seleccionar una zona para realizar los cortes ultrafinos (Figura 10).

Los cortes ultrafinos contrastados con la técnica convencional Ur-Pb y observados en el microscopio electrónico de transmisión a un aumento de 10 K (Figura 11) mostraron un nucléolo con cromatina a su alrededor, al observar a un aumento de 20 K (Figura 12) fue posible apreciar las diferentes regiones del nucléolo: CF, CFD y CG. Los CF's observados correspondieron a CF's heterogéneos ya que fue posible visualizar un poco de cromatina compacta en su interior además de la que se encontró en la periferia del nucléolo, un aumento a 50 K (Figuras 13, 14 y 15), permitió ver la textura aparente de las distintas regiones y observar a mayor detalle esa textura granulosa aparente que corresponde al componente granular, también mostrado en un aumento de 40 K (Figura 16) y 80 K (Figura 17).

La Figura 18 corresponde a una micrografía electrónica utilizando contraste preferencial por EDTA detallado en materiales y métodos, en donde se observó un núcleo celular de meristemo de raíz de *Allium cepa* con 2 nucléolos rodeados por cromatina a un aumento de 3K (Figura 19), al realizar un acercamiento fue posible observar un CF heterogéneo dado que en su interior se encontró un poco de cromatina compacta, además de cromatina en la periferia, la presencia de gránulos correspondientes al componente granular, se asemeja en forma y tamaño a los ribosomas que se encuentran fuera del núcleo marcados en un recuadro, las diferentes regiones del nucléolo se apreciaron con mejor detalle en la figura 20.

En la Figura 21 se muestra una micrografía a un aumento de 8 K con una técnica de contraste específica para DNA mediante Amina-Osmio, en la cual se observa cromatina y un espacio correspondiente al nucléolo que al centro contiene material con una textura

semi-fibrosa, correspondiente a cromatina, la cual se aprecia mejor a un aumento de 20 K (Figura 22.).

Mediante el goniómetro del que dispone el microscopio electrónico de transmisión, se generaron imágenes estereoscópicas de una misma zona de la muestra, con una diferencia de 10 grados una con respecto a la otra. Con la superposición de estas imágenes, utilizando el software Anaglyph Workshop V.2.6.3 de acceso libre, se generaron anáglifos (Figuras 23 a 27), las cuales al proporcionar la percepción de profundidad, ayudan a develar estructuras que pudieran estar superpuestas.

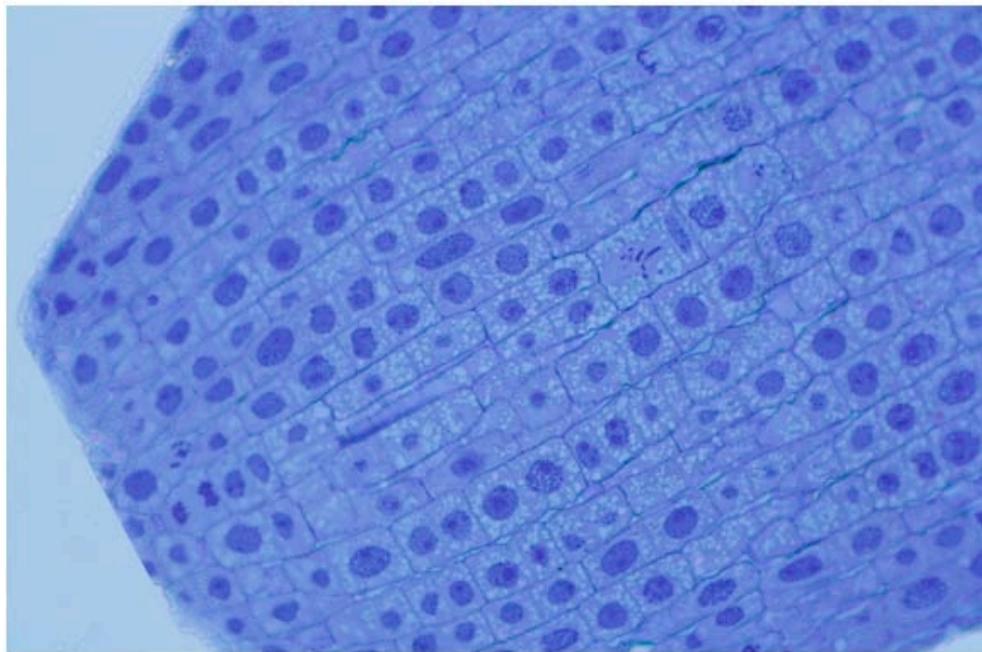


Fig. 9. Micrografía óptica de meristemo apical de *Allium cepa* a un aumento de 40 X.

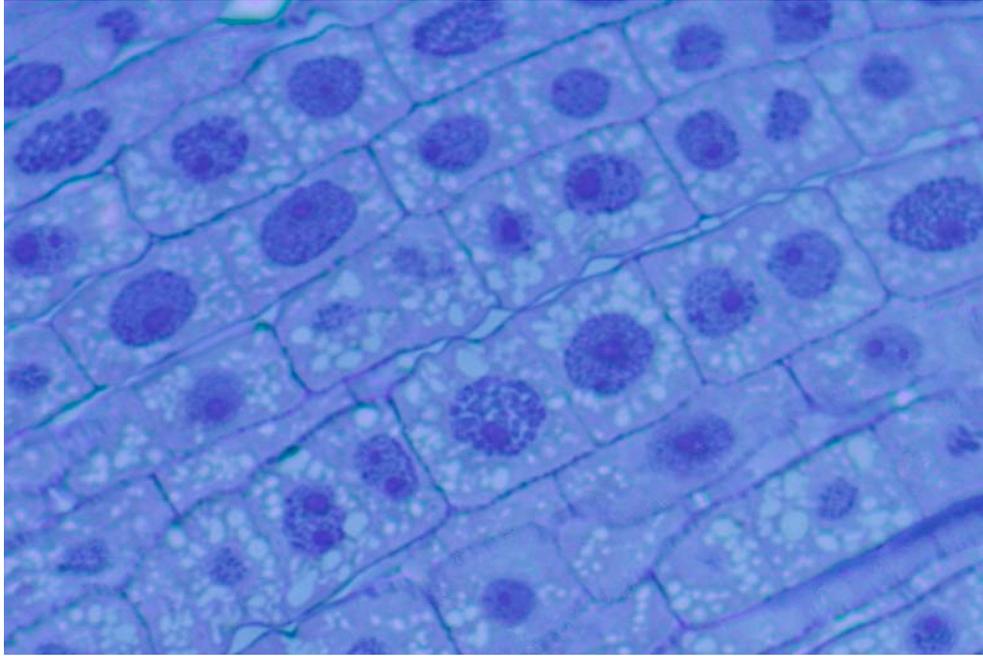


Fig. 10. Micrografía óptica de meristemo apical de *Allium cepa* a un aumento de 100 X.

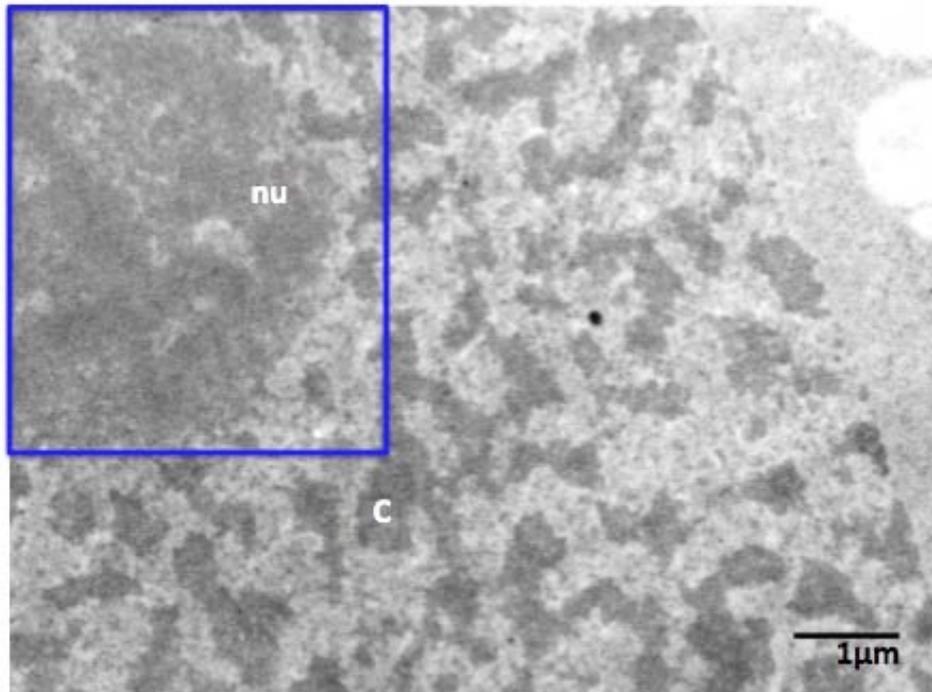


Fig. 11. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 10K, donde se ilustra el nucléolo (nu) y cromatina (c). Ur-Pb. El recuadro azul corresponde a un acercamiento mostrado en la Figura 5.

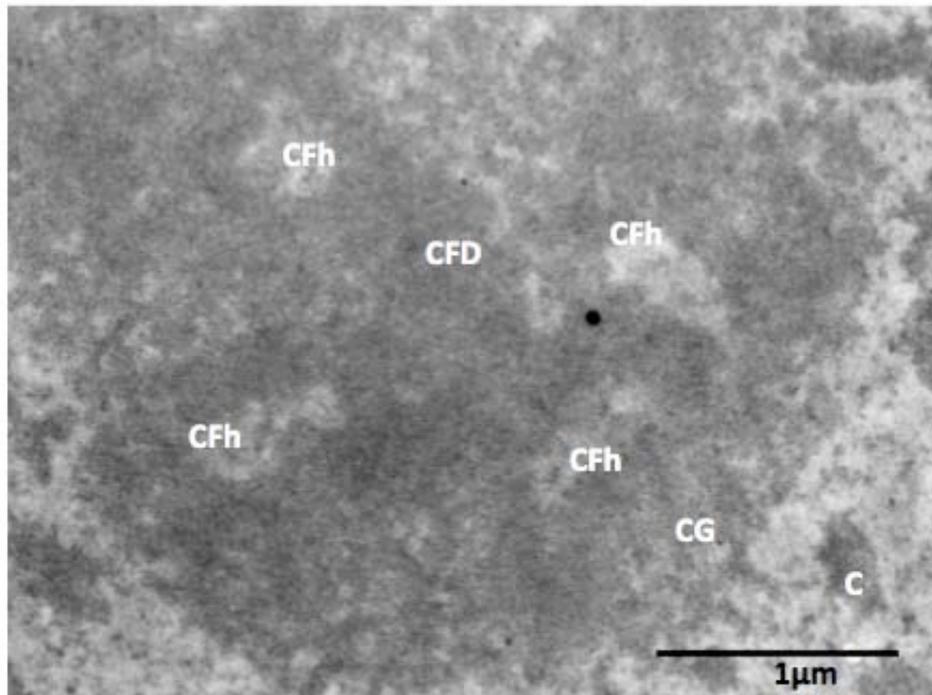


Fig. 12. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 20K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). Ur-Pb.

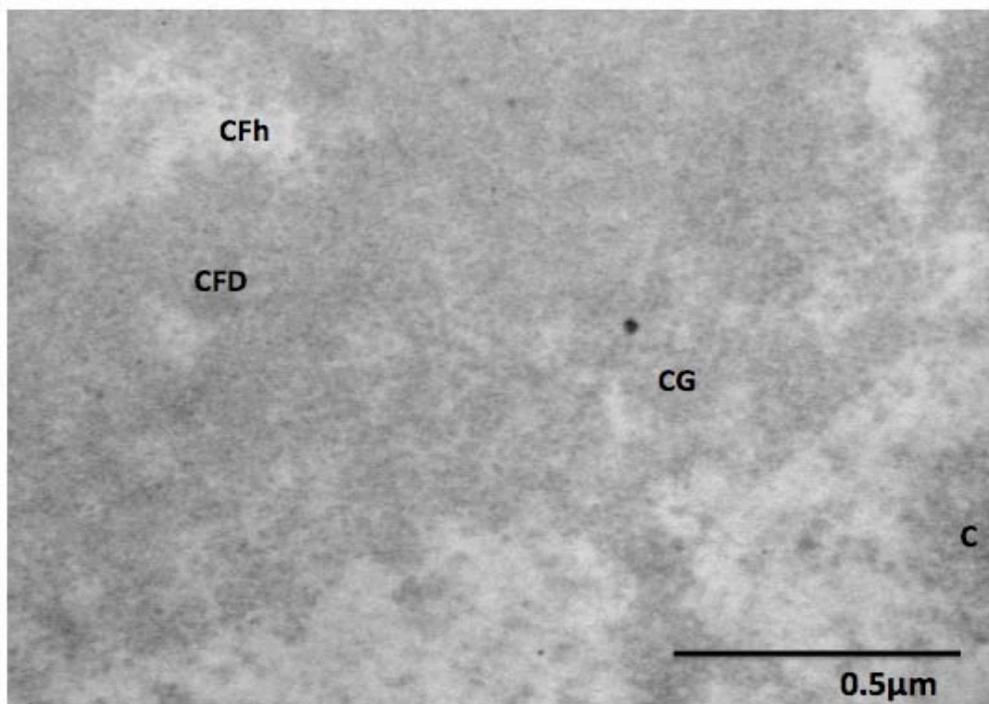


Fig. 13. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 50K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). Ur-Pb

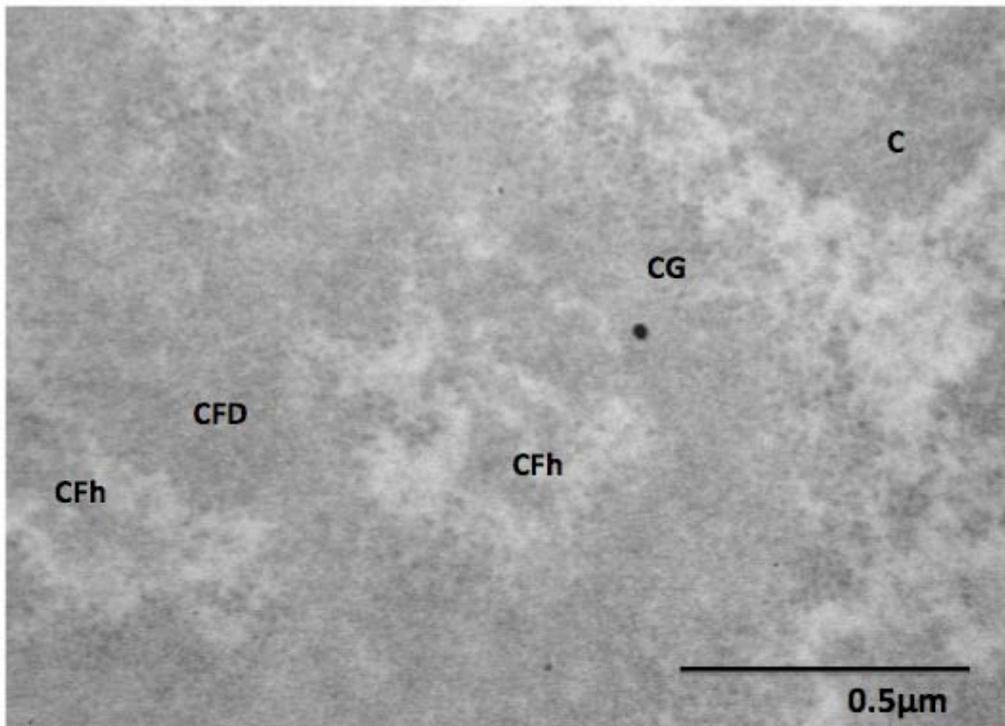


Fig. 14. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 50K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (c) Ur-Pb.

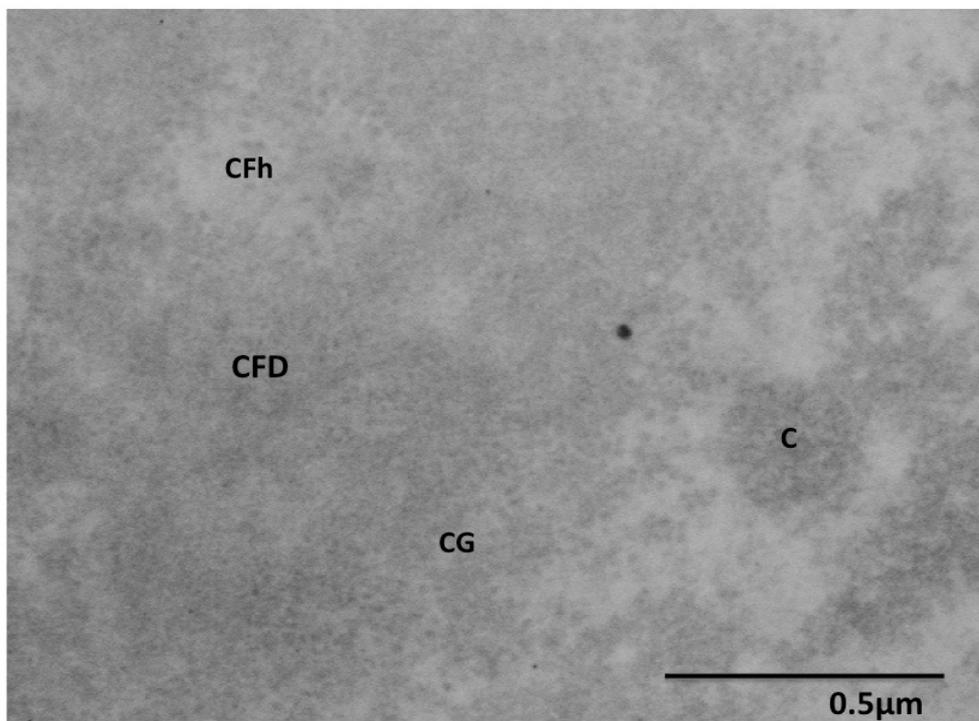


Fig. 15. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 50 K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (c) Ur-Pb.

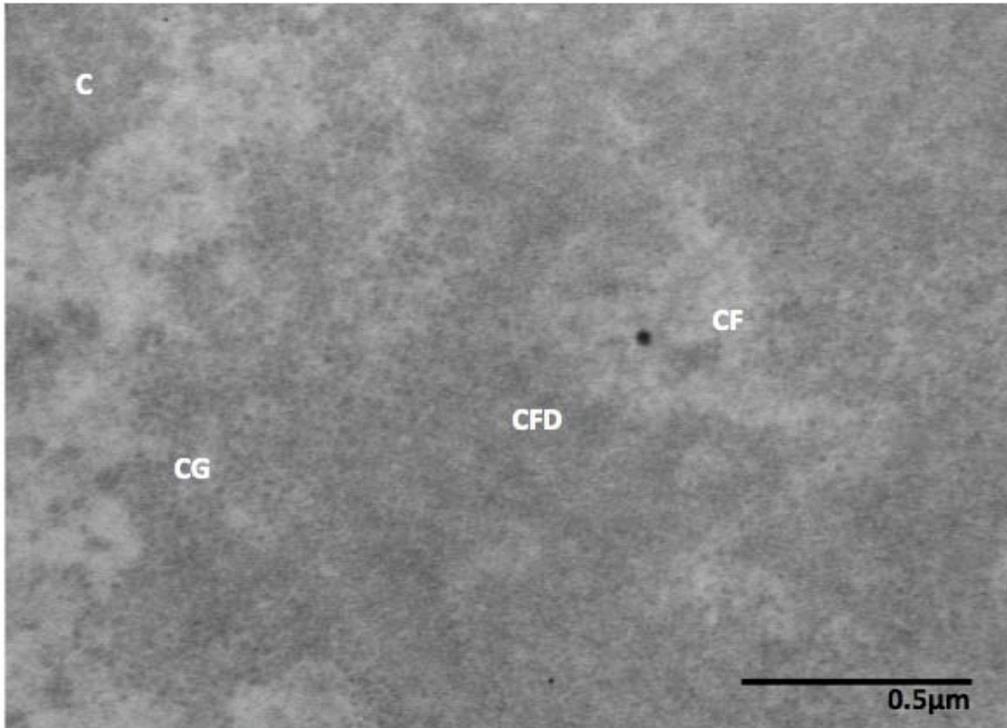


Fig. 16. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 40K, donde se ilustra el centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). Ur-Pb.

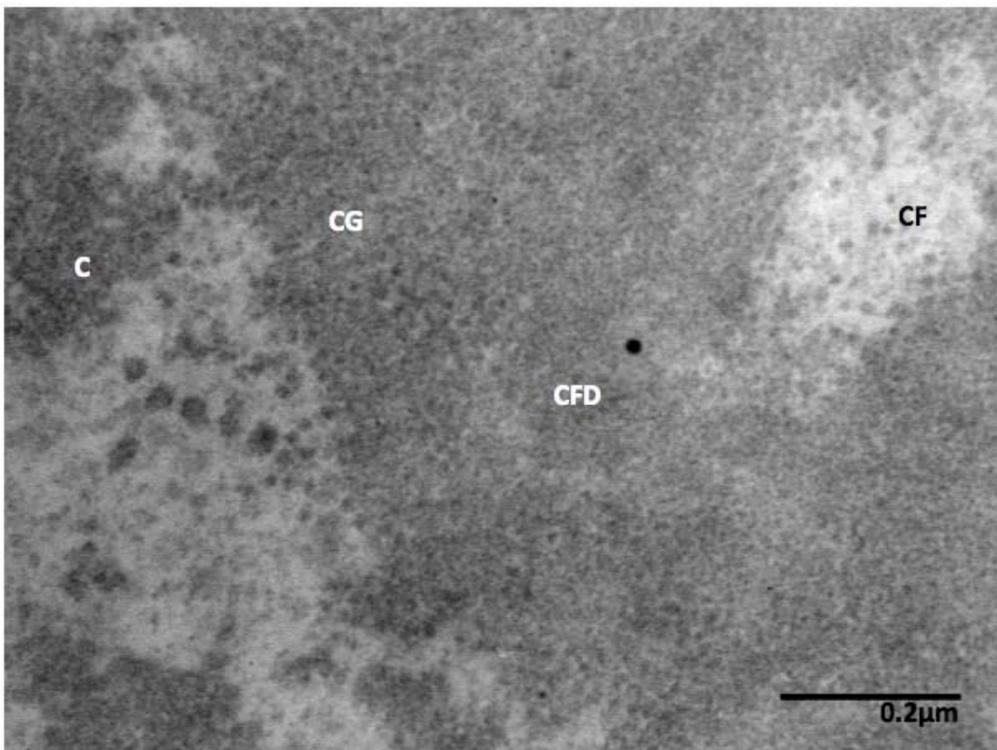


Fig. 17. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 80K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). Ur-Pb.

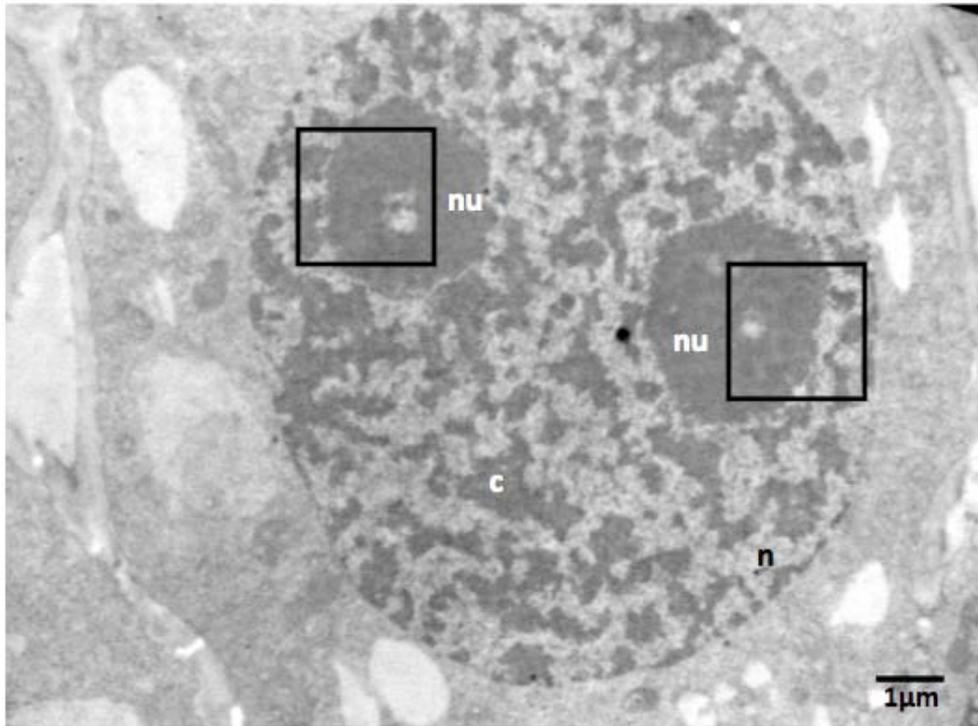


Fig. 18. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 6 K, donde se muestran dos nucléolos (nu), un núcleo (n) y cromatina (C). EDTA. Los recuadros corresponden a un aumento mostrado en las figuras 12 y 13.

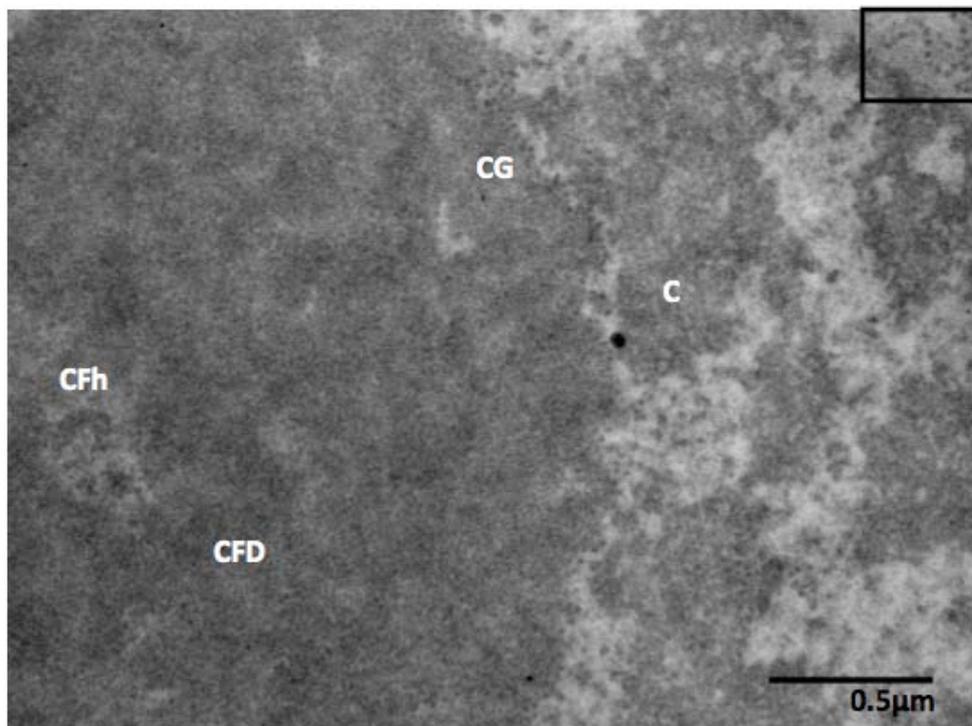


Fig. 19. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 30K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). EDTA. El recuadro muestra ribosomas en el citoplasma.

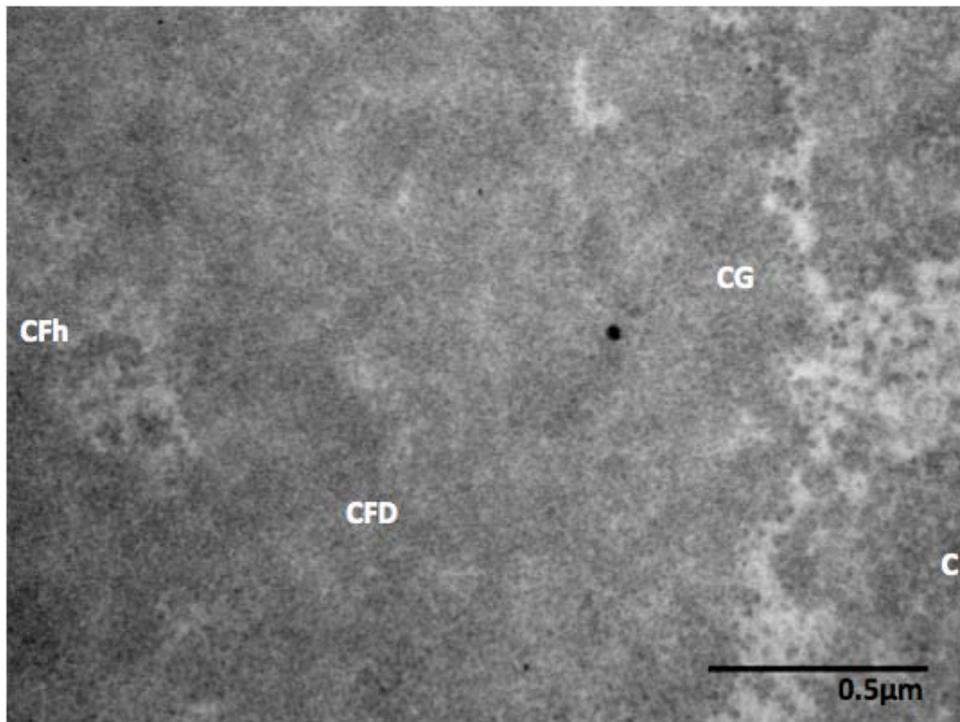


Fig. 20. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 40K, donde se ilustra el centro fibrilar heterogéneo (CFh), componente fibrilar denso (CFD), el componente granular (CG) y cromatina (C). EDTA.

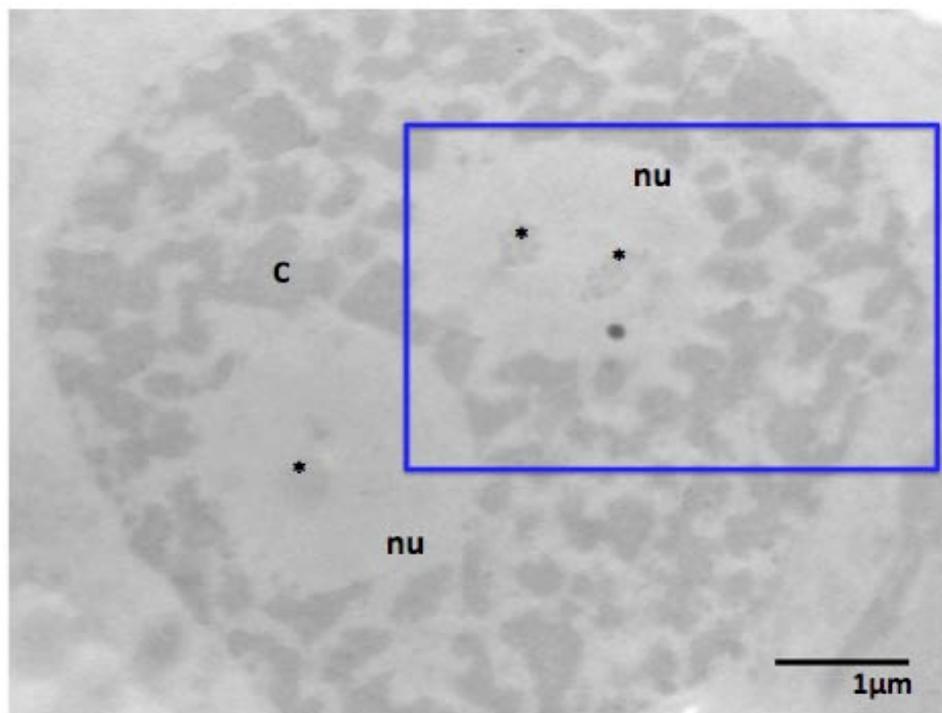


Fig. 21. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 8 K, donde se ilustra el nucléolo (nu), cromatina (c) y los asteriscos indican DNA dentro del nucléolo. Amina de Osmio. El recuadro azul corresponde a un zoom mostrado en la Figura 15.

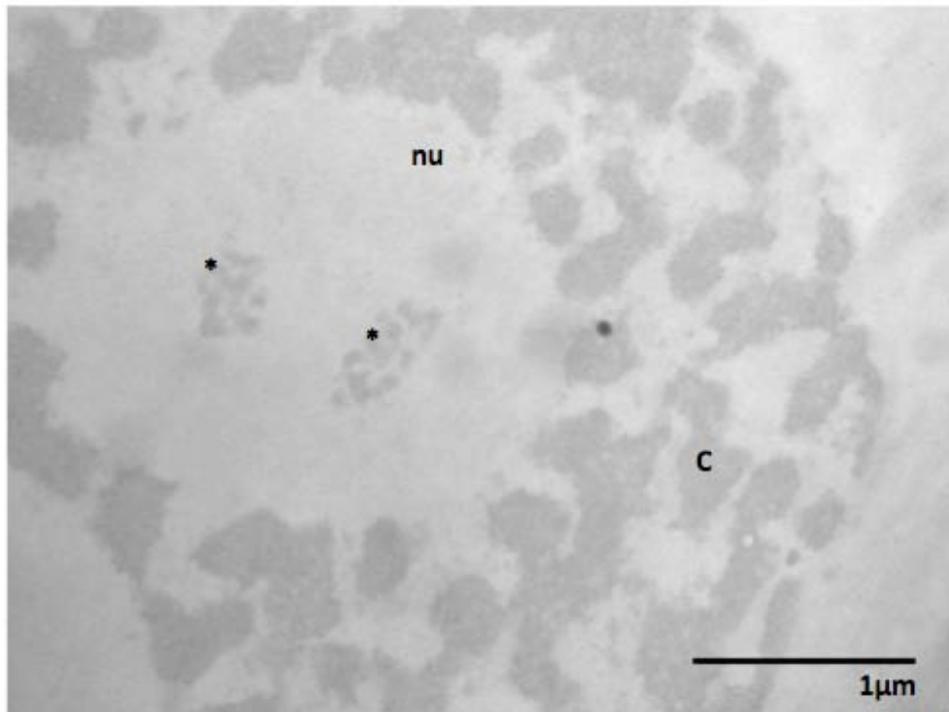


Fig. 22. Micrografía electrónica de núcleo de cebolla a 20 K, donde se ilustra un nucléolo (nu), cromatina (c) y los asteriscos indican DNA dentro del nucléolo. Amina de Osmio.

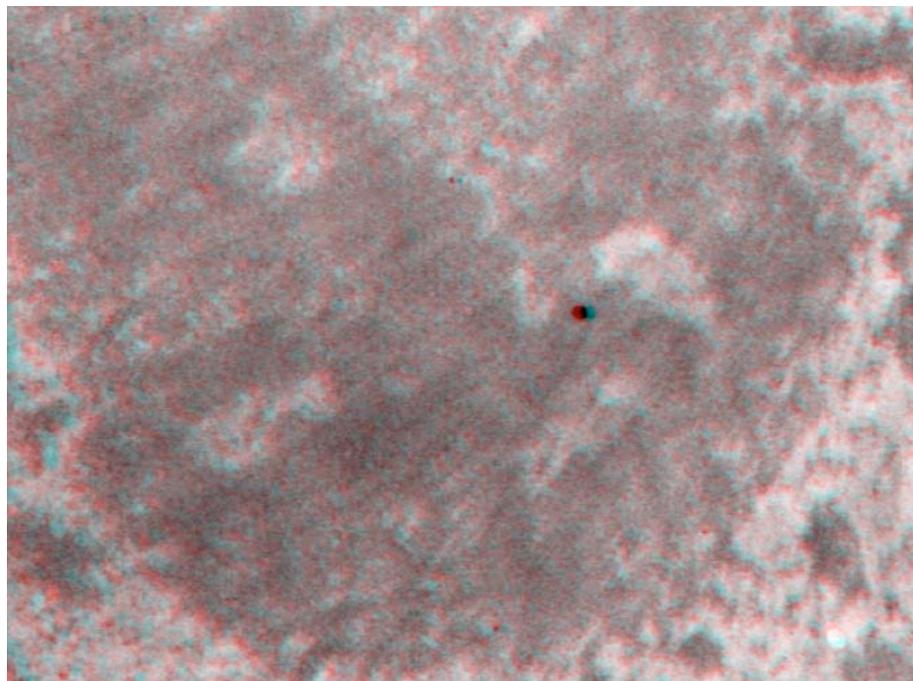


Fig. 23. Anáglifo de la figura 12.

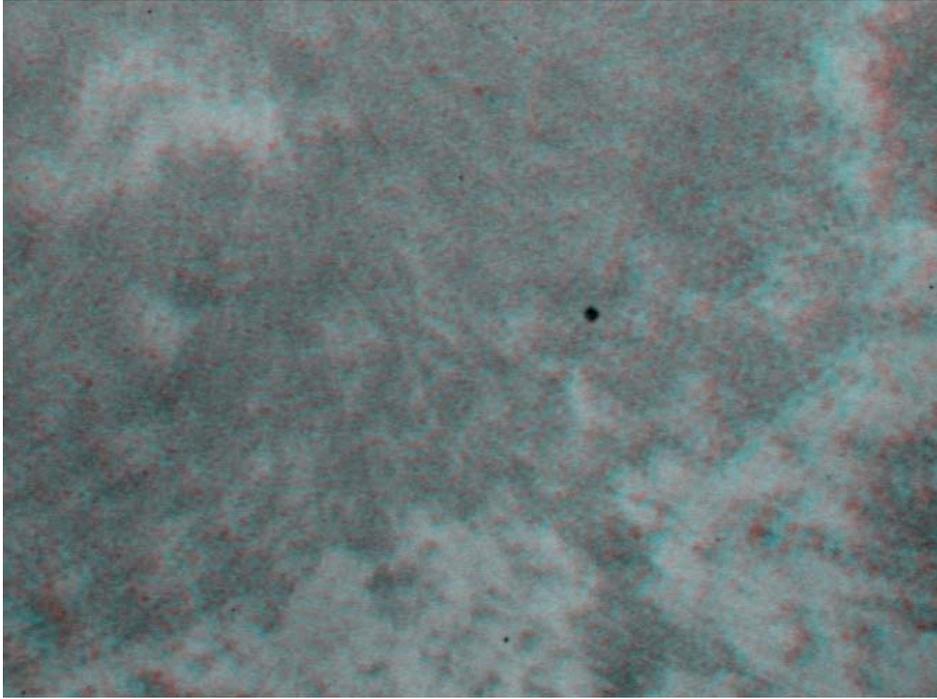


Fig. 24. Anáglifo de la figura 13.

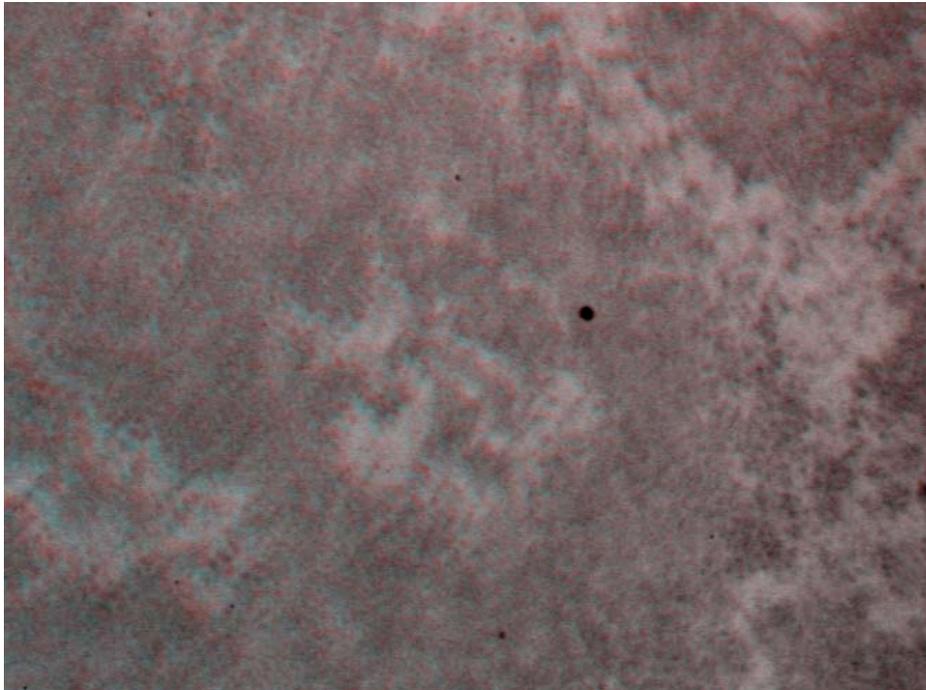


Fig. 25. Anáglifo de la figura 14.

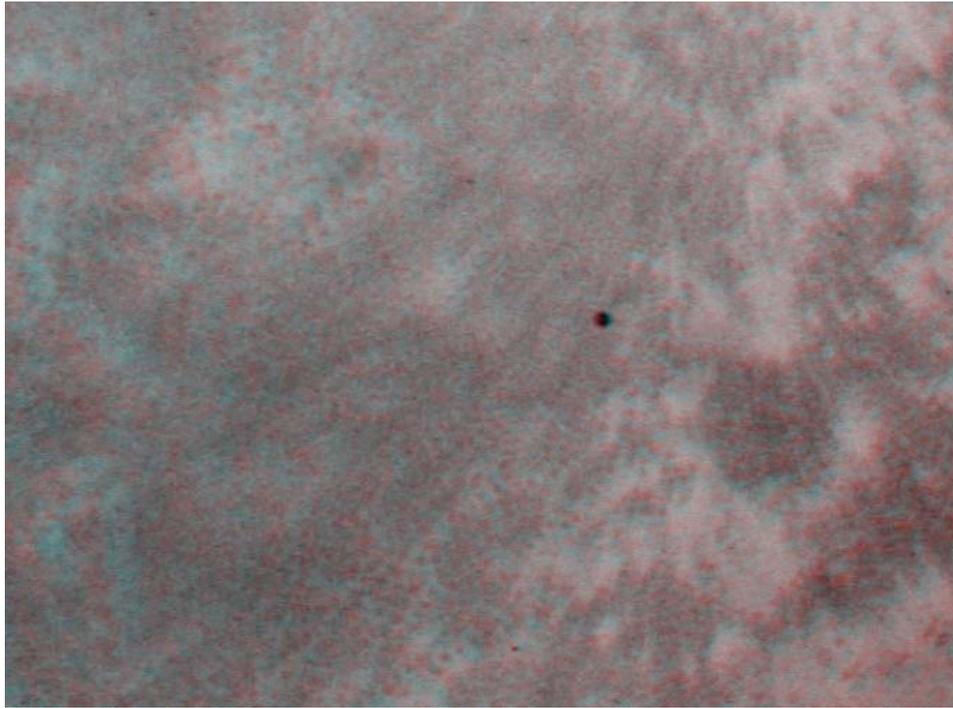


Fig. 26. Anáglifo de la figura 15.

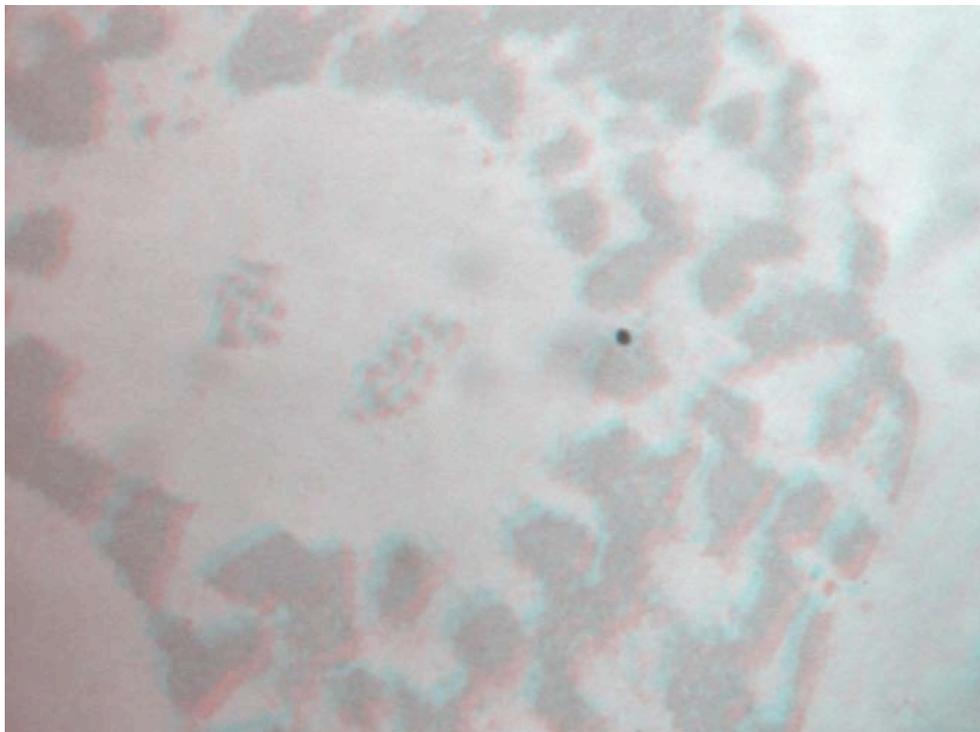


Fig. 27. Anáglifo de la figura 22.

Al analizar cortes semifinos con el microscopio de fuerza Atómica, fue posible identificar células con núcleo y nucléolos rodeados por cromatina. El análisis digital de las imágenes producidas, utilizando el software (NanoScope V.6.1 software) del microscopio de fuerza atómica, se generaron perfiles de la topografía del nucléolo, dejando en evidencia su heterogeneidad (Figura 28). Otra forma de ilustrar estas topografías se logró mediante una proyección digital tridimensional de la imagen, que se obtuvo con el mismo software, donde se aprecia el núcleo, nucléolo, vacuolas y pared celular (Figuras 29). Al realizar un barrido más pequeño ($7.5 \mu\text{m}$) es posible apreciar a mayor detalle las características heterogéneas del nucléolo (Figura 30), las cuales se hacen más evidentes al disminuir la superficie de la muestra analizada a ($4.069 \mu\text{m}$) en donde se puede apreciar un intersticio y cromatina en la periferia del nucléolo (Figura 31). En una micrografía en tercera dimensión es posible observar dos regiones dentro del nucléolo, una que corresponde a una zona granular y otra fibro-granular además de ver la diferencia de la textura aparente entre la cromatina y el nucléolo (Figura 32). La Figura 33 corresponde también a una micrografía en tercera dimensión que muestra un núcleo con su nucléolo, vacuolas y pared celular en una superficie de barrido de $3.13 \mu\text{m}$. En esta imagen es posible percibir que hay diferencia entre las texturas aparentes que presentan las diferentes regiones que constituyen al nucléolo (Figura 34), los cuales se distinguen mejor en la Figura 35.

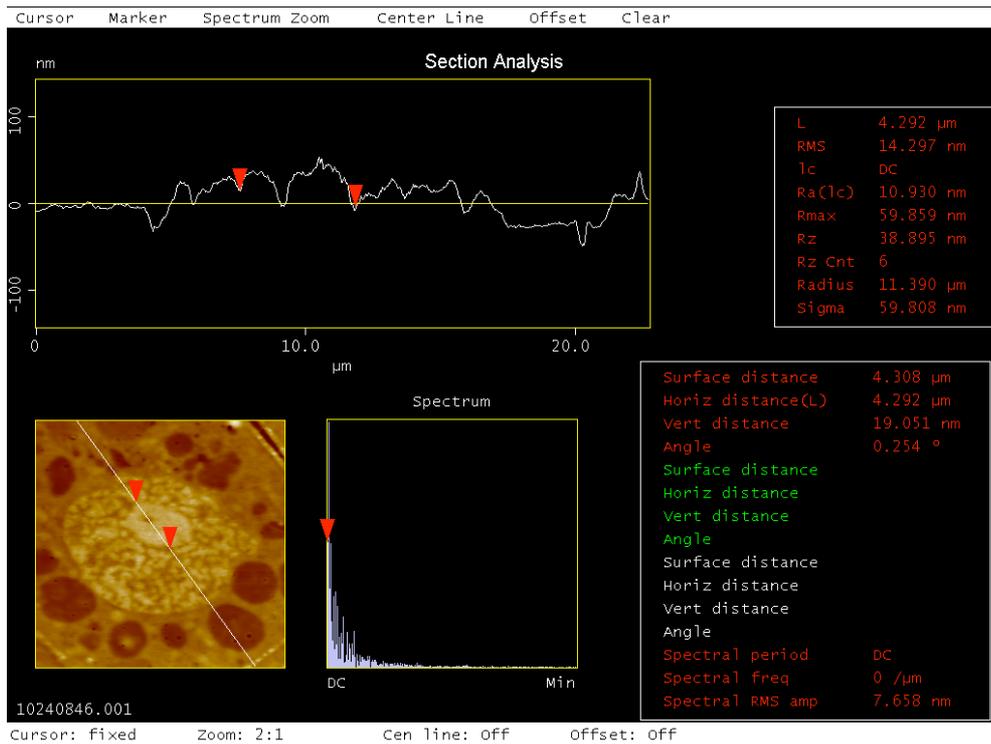


Fig. 28. Micrografía de fuerza atómica de un transecto a lo largo del nucléolo.

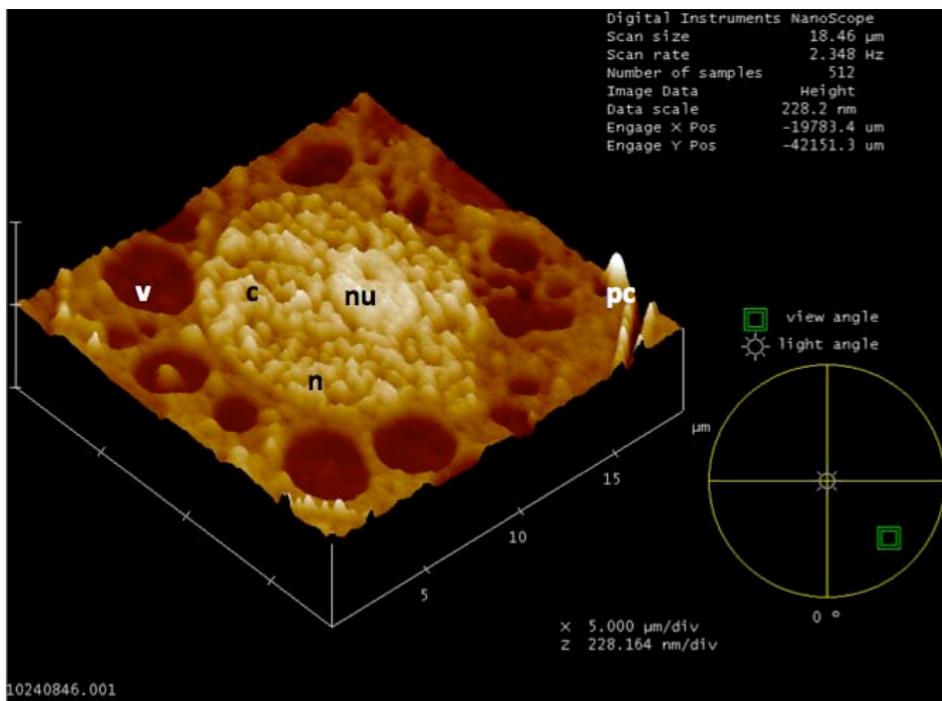


Fig. 29. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se muestran un núcleo (n), nucléolo (nu), cromatina (c), pared celular (pc) y vacuolas (v).

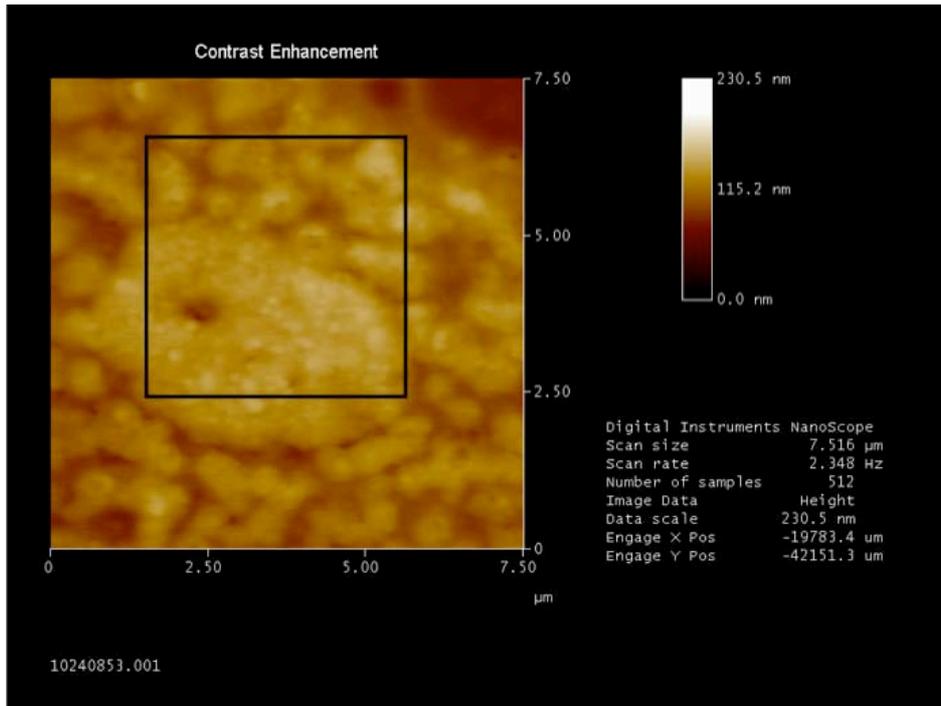


Fig. 30. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. El recuadro muestra un aumento correspondiente a la Figura 31.

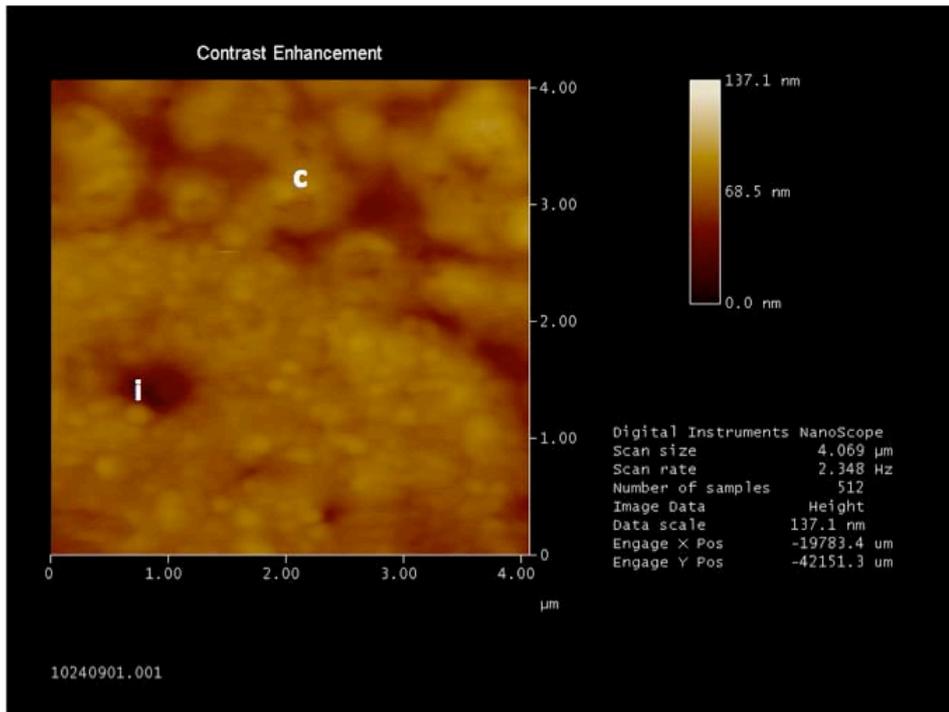


Fig. 31. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se observa núcleo un intersticio (i) y cromatina (c).

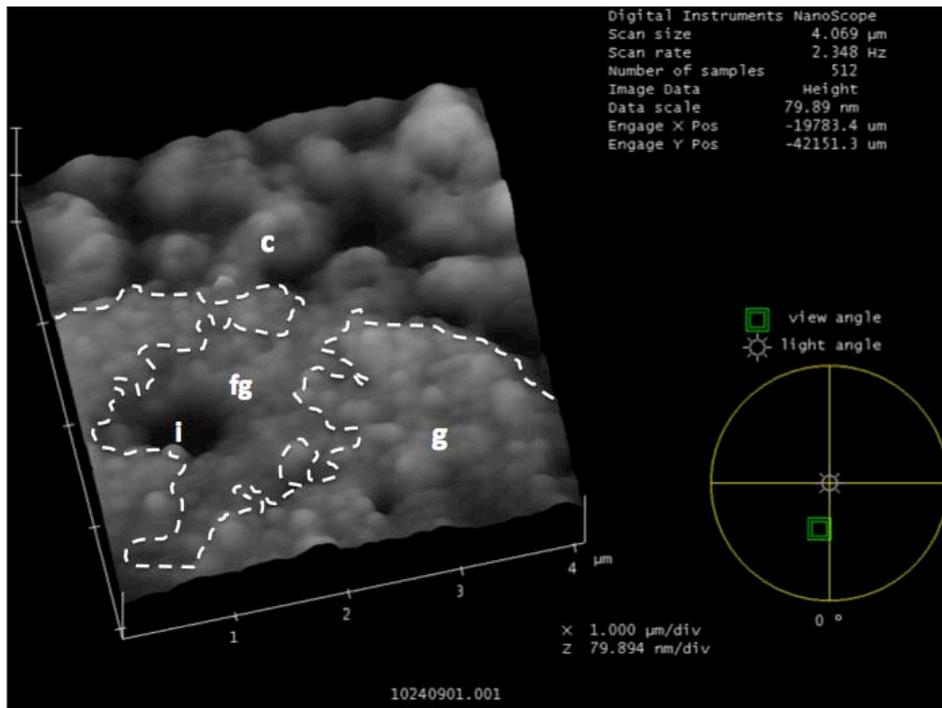


Fig. 32. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se observa un intersticio (i), cromatina (c) y dos diferentes zonas en el nucléolo una zona granular (g) y una fibro-granular (fg).

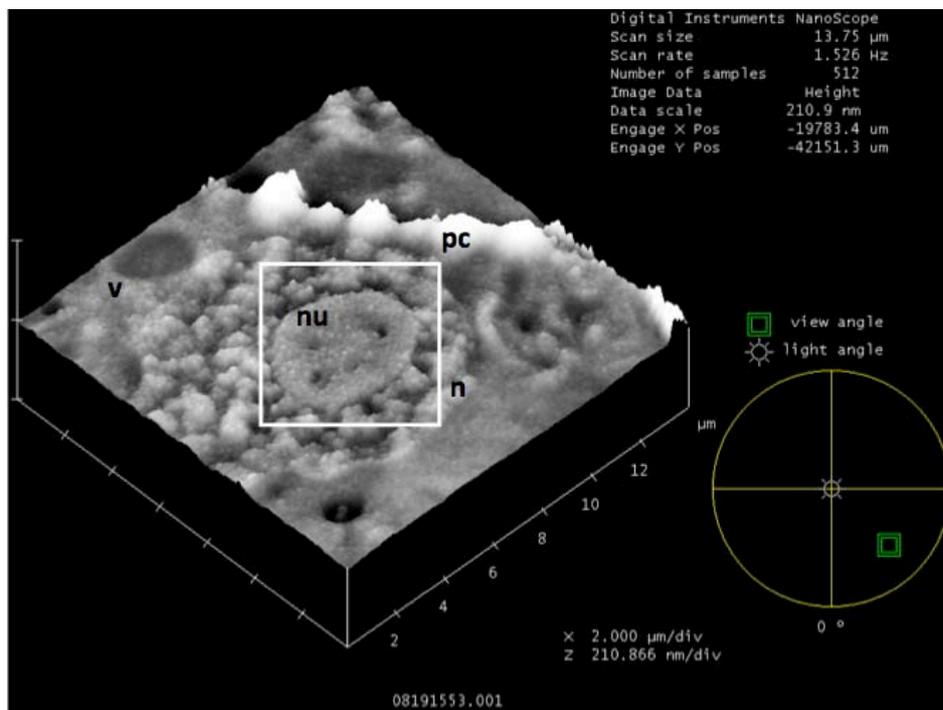


Fig. 33. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se observa núcleo (n), nucléolo (nu), pared celular (pc) y vacuolas (v), el recuadro corresponde a un aumento correspondiente a la Figura 34.

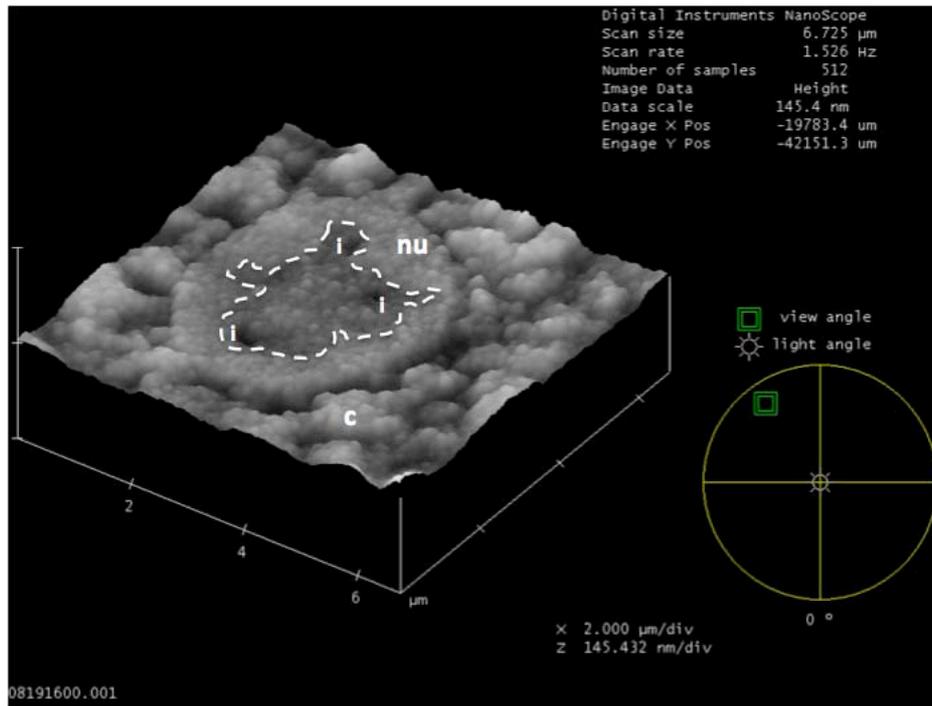


Fig. 34. Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se observa un nucléolo (nu) con intersticios (i) y cromatina (c), las líneas delimitan dos zonas dentro del nucléolo.

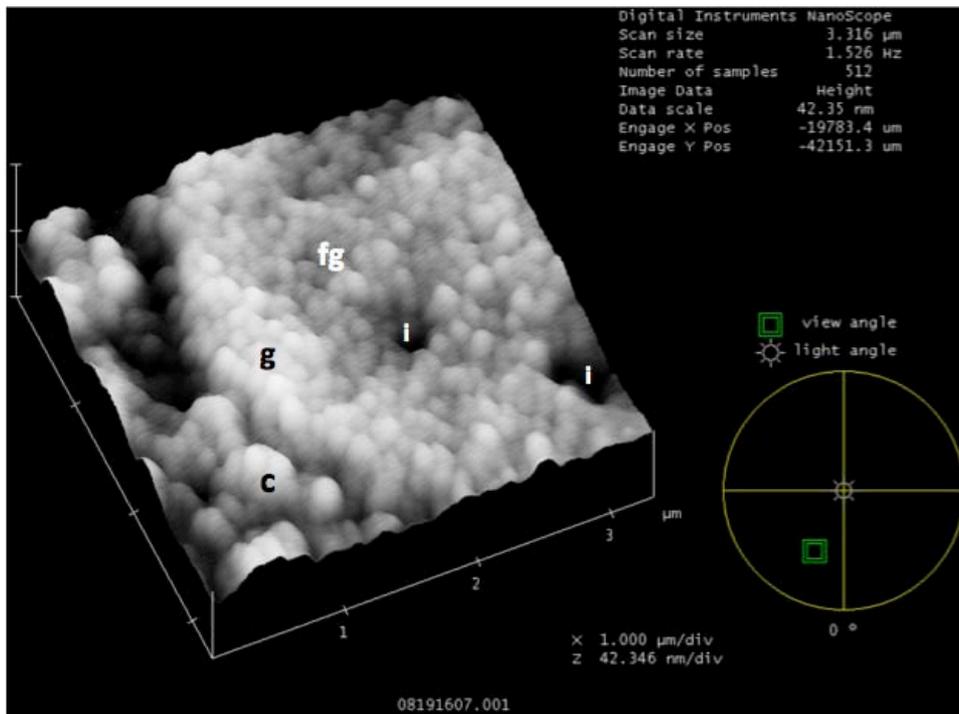


Fig. 35, Micrografía de fuerza atómica de una célula meristemática en interfase de *Allium cepa*. Se observan intersticios (i), cromatina (c) y dos diferentes zonas dentro del nucléolo, una zona granular (g) y una fibro-granular (fg).

DISCUSIÓN.

El uso de la microscopía óptica en conjunto con la microscopía electrónica de transmisión son las herramientas más usadas para observar la estructura celular, contribuyendo enormemente al concepto que se tiene actualmente sobre la célula (Segura-Valdez *et al.*, 2006), en los últimos años, se ha propuesto incluir una tercera herramienta como lo es el microscopio de fuerza atómica, que por sus características permite complementar los estudios realizados en la célula y sus diferentes componentes.

En estudios previos se utilizó un enfoque similar para observar la estructura celular y nuclear de plantas como *Lacandonia schismatica* y *Ginkgo biloba* (Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000) y utilizando como modelo a *Allium cepa*, se ha podido observar células con núcleo y nucléolo así como células en diferentes fases del ciclo celular (Segura-Valdez *et al.*, 2010)

Tomando como base lo anterior, en el presente trabajo utilizamos el microscopio de fuerza atómica para estudiar el nucléolo *in situ* *Allium cepa*, ya que planteamos que las distintas regiones de este, tienen diferentes características manométricas de resolución vertical, capaces de ser observadas mediante microscopía de fuerza atómica, lo cual puede servir para complementar el conocimiento que se tiene actualmente acerca del nucléolo y sus diferentes regiones.

En este trabajo se observaron nucléolos a partir del meristemo de raíz de *Allium cepa*, estos han sido preparados para microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica.

Mediante microscopía óptica se observaron núcleos en donde fue posible identificar cromatina y nucléolos interfásicos, estos últimos mostraron una tinción fuerte debido a su grado de compactación, lo que permitió localizar zonas en donde estos fueran abundantes utilizando objetivos de 40 y 100 X y seleccionar zonas del tejido para analizar a una mayor resolución.

Además, la microscopía óptica nos permitió analizar la morfología del tejido, esto con el fin de utilizar aquellas muestras que presentaran células con nucléolos grandes en

interfase ya que al ser una zona meristemática las células se dividen activamente por lo cual es frecuente encontrarlas en diversas etapas del ciclo celular, además la técnica de procesamiento cuando no se lleva a cabo adecuadamente puede provocar alteraciones morfológicas en la célula, los errores más comunes suelen ser una fijación deficiente, una deshidratación parcial ó una mala inclusión (Vázquez y Echeverría, 2000), lo que hace prácticamente imposible observar patrones y características específicas de la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica, por ello resultó importante verificar la morfología del tejido antes de continuar con la observación a mayores aumentos.

En trabajos previos se ha mostrado la eficiencia de la doble fijación aldehídica combinada con una postfijación con OsO₄ (Segura-Valdez *et al.*, 2006). Brevemente, la doble fijación incluye una mezcla de compuestos fijadores que se complementan. Por un lado el paraformaldehído presenta una eficiente velocidad de penetración en el tejido, pero realiza una fijación deficiente debido a su alta capacidad de polimerización; y por el otro, el glutaraldehído, el cual presenta una menor velocidad de difusión pero gracias a que en su estructura contiene dos grupos funcionales, realiza una mejor fijación del material, ya que las moléculas de las soluciones fijadoras reaccionan con los ácidos nucleicos, lípidos, glúcidos y especialmente con las proteínas a las cuales desnaturalizan, privándolas de su función evitando la degradación enzimática de los diferentes componentes celulares. Por otra parte el OsO₄ además de complementar la fijación aldehídica, añade un primer contraste a las membranas celulares al interactuar con las moléculas de fosfolípidos de la bicapa que constituye a esta estructura (Hernández-Verdun, 2011). Gracias a esto obtuvimos como resultado, una buena preservación de las muestras de meristemo de raíz de *Allium cepa*.

Una vez que se constató la calidad del procesamiento, se procedió a realizar cortes ultrafinos que permitieran reconocer las tres diferentes regiones del nucléolo utilizando microscopía electrónica de transmisión. Ultraestructuralmente, estas regiones fueron identificadas fácilmente, encontrando que los centros fibrilares aparecen como zonas poco electrodensas y con una estructura fibrilar. En el interior del nucléolo fue posible observar un material de mayor densidad a los electrones, que corresponde a cromatina compacta la cual queda alojada en el interior de los centros fibrilares durante el proceso de formación del nucléolo al término de la mitosis, durante la telofase (Hernández-

Verdun, 2011). Los centros fibrilares (CF's) que muestran este material en su interior, se denominan como centros fibrilares heterogéneos. El componente fibrilar denso (CFD) se encontró mayoritariamente rodeando a los CF's, ya que en el límite del CF se da la transcripción de pre-RNA_m y por consecuencia la formación del CFD, el cual se observó como una capa electrodensa de material fibroso sumamente compacto que se observa como una subregión dentro del nucléolo con un color gris oscuro. El CG se encontró mayoritariamente hacia la periferia del nucléolo mostrando una textura granular que corresponden a las subunidades de los ribosomas en formación (Figuras 11 a 22), estas observaciones coinciden con las descripciones que han hecho algunos autores que utilizan como modelo de estudio nucléolos de meristemo de raíz de *Allium cepa* como Marcano y Del-Campo, 1995 y con las descripciones del nucléolo de algunos capítulos de libros especializados como el de Hernández-Verdum (2011).

En las Figuras 11 a 22 se observa también cromatina asociada al nucléolo, ésta lo rodea como una cubierta de la cual parten prolongaciones que en ocasiones penetran hacia el interior del nucléolo y establecen contacto directo con los centros fibrilares (como en el caso de los CF's heterogéneos que contienen cromatina condensada en su interior). Estas fibras de cromatina que atraviesan la capa del componente fibrilar denso, forman masas heterocromáticas condensadas electrodensas de textura fibrilar.

La técnica de contraste convencional para microscopía electrónica basada en un contraste con Ur y Pb, es óptima para identificar las diferentes regiones del nucléolo, así como para destacar la presencia de cromatina condensada en la periferia nucleolar y cromatina compacta dentro del nucléolo en CF's heterogéneos (Figuras 11 a la 17), ya que son elementos de elevado número atómico que favorecen las interacciones elásticas entre los electrones del haz y el núcleo atómico de la muestra, otorgándole contraste a la preparación ya que cuando se omite este paso las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión carecen del tono gris que las caracteriza y que hacen evidente la ultraestructura celular (Vázquez y Echeverría, 2000).

Además de la técnica de contraste convencional se realizó una posfijación con una solución de OsO₄, este compuesto reacciona con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados y logra una buena preservación de las membranas celulares, además

funciona como un agente contrastante que permite observar con relativa facilidad las membranas celulares (Torres-Fernández y Ordoñez, 2003). Se observó que las muestras que fueron posfijadas al ser analizadas con el microscopio de fuerza atómica, generaron micrografías con una resolución de imagen superior, en comparación, con aquellas que no fueron sometidas a este proceso, posiblemente las primeras adquirieron rigidez extra gracias a la interacción del OsO_4 con las membranas celulares, lo cual mejoró considerablemente la resolución de imagen.

El EDTA al ser un agente quelante o antagonista de metales pesados, llega a sitios en donde se acumula el Ur, formando complejos y dada su alta solubilidad en agua, la tinción es retirada preferentemente del DNA, funcionando como una tinción reversible para localizar RNA (Monneron y Bernhard, 1969). Se utilizó la técnica de contraste preferencial con el fin de mejorar la resolución de las diferentes regiones del nucléolo, encontrando una mejora en el contraste de la pericromatina que circunda al nucléolo, también se pudo percibir que el CFD interactúa en pequeñas proporciones con el CG (Figuras 18, 19 y 20), lo cual nos habla de que no sólo se encuentra rodeando al CF si no que al ser el nucléolo una estructura dinámica y flexible, pueden estar interactuando parcialmente las diferentes regiones de este, como lo sugiere Hernandez-Verdun, 2005. Sin embargo los cortes semifinos observados bajo el microscopio de fuerza atómica no permitieron una buena resolución de imagen debido a que a estas muestras no se les realizó una posfijación con OsO_4 .

Con la técnica amina de osmio específica para DNA se generaron micrografías que muestran claramente la presencia de un material con una textura semi-fibrilar dentro del nucléolo el cual corresponde a cromatina compacta que queda dentro del nucléolo en el proceso de formación de este al término de la mitosis e inicio de la Interfase (Saez-Vasquez y Medina, 2008). Estas micrografías sirven para corroborar que gran parte de la estructura que forma al nucléolo corresponde a ribonucleoproteínas y proteínas no ribosomales (Shawn, 2010), ya que es posible observar en estas, un espacio que corresponde al volumen que ocupa el nucléolo dentro del núcleo.

Gracias al goniómetro del microscopio electrónico de transmisión se pueden tomar micrografías de una misma zona con 10 grados de diferencia, respecto, a una con la otra, esto para crear análogos, los cuales se componen de dos imágenes, cada una con

una capa de color, regularmente azul y rojo, que se superponen para producir un efecto de profundidad, ya que estas imágenes contienen una imagen para cada ojo, cuando se ve a través de unos lentes con micas que filtran los colores azul y rojo se genera una imagen tridimensional, que permite recuperar información perdida en las micrografías bidimensionales.

Ya que en las micrografías bidimensionales existe superposición de estructuras, se generaron anáglifos (Figuras 23 a 27), lo cual ayudo a mejorar la resolución de aquellas estructuras que se observaron en el componente granular con un tamaño superior a los 20 nm, estas, corresponden a gránulos característicos del CG que se encuentran tanto en el plano superior como en uno inferior creando el efecto de un agregado que pasa por una única estructura en micrografías bidimensionales y que solo es posible develar utilizando esta herramienta, la cual puede servir también como material de apoyo didáctico al ejemplificar de una manera diferente la ultraestructura celular.

Al observar diversos cortes tanto de muestras con posfijación como sin ella, se concluye que los primeros ofrecen mayor calidad en las imágenes tomadas mediante microscopio de fuerza atómica ya que la resolución en la muestra mejora considerablemente, en cuanto a las dos resinas utilizadas (Tabla 1 y 2), no se encontró que alguna de éstas influyera en la resolución de las imágenes tomadas con microscopía electrónica de transmisión o con microscopía de fuerza atómica, sin embargo las muestras que fueron incluidas en spurr ofrecieron un mejor manejo bajo el ultramicrotomo, esto puede servir como antecedente para futuros trabajos en donde se requiera visualizar la ultraestructura a partir de los meristemas de raíz de *Allium cepa*.

Como era de esperar con el microscopio de fuerza atómica se constató que los nucléolos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* tienen diferentes características manométricas de resolución vertical, se observó que no poseen una superficie lisa ya que estos presentan características heterogéneas en su estructura, resultado de la dureza diferencial que poseen los componentes que lo forman, ejemplificándolo mediante un transecto (Figuras 28) y observándolo en las Figuras 29 a 35. Con la ayuda del transecto podemos darnos cuenta que cambia la topografía del interior hacia el exterior del nucléolo, lo cual nos habla de un cambio que coincide con la transición de fases entre una región y otra, esto concuerda con lo esperado ya que previamente mediante el

análisis de micrografías tomadas con microscopio electrónico de transmisión se encontraron características específicas para cada región del nucléolo, como lo son las diferencias de densidad a los electrones que sabemos es debida a la constitución de cada una de las regiones y que tienen que ver directamente con la función específica que cada una de ellas cumple (Sirri *et al.*, 2008).

En las micrografías 32 y 35 se puede apreciar una diferencia entre la textura aparente que presenta el nucléolo, esto permite distinguir una zona con textura granular que corresponde al componente granular y una zona con textura fibro-granular que corresponde a la frontera que existe entre el componente fibrilar denso y el componente granular, estas zonas se hacen aún más evidentes en el transecto ya que por medio de este es posible detectar sutilmente las diferencias que existen en las transiciones de las diferentes regiones, lo cual sugiere que el cambio entre una región y otra no se da continua y abruptamente, si no discontinua y gradualmente. Todas las imágenes fueron generadas utilizando una punta con un diámetro de curvatura de alrededor de 20nm lo que deja abierta la posibilidad de estudiar el nucléolo utilizando puntas con un diámetro de curvatura menor a 10 nm o inclusive nanotubos que pueden llegar hasta un diámetro de curvatura de 5nm (Gilmore *et al.*, 2014) por lo cual este trabajo resulta un paso muy importante en el camino para delimitar perfectamente estas zonas de transición entre regiones. Si bien el nucléolo es una estructura estudiada ampliamente utilizando microscopía electrónica de transmisión, los diferentes componentes y regiones no habían sido analizadas en profundidad con el microscopio de fuerza atómica, ya que hasta ahora la mayoría de los trabajos que utilizan el microscopio de fuerza atómica se habían enfocado principalmente al estudio de materiales, sin embargo con el presente trabajo se reafirma que la utilización del microscopio de fuerza atómica ofrece un campo amplio de estudio en el área biológica.

También se pudieron identificar otras estructuras, como vacuolas, cromatina y pared celular, esta última presentó mayor resistencia al corte lo cual es de esperar dado su alto contenido de polisacáridos (Saez-Vasquez y Medina, 2008) y a que aparece en un plano superior que contrasta con las vacuolas que presentaron menor resistencia al corte y que en las micrografías se observan con menor altura en el eje z, consecuencia de su forma cóncava (Figuras 34 y 35), si bien estas estructuras se pueden visualizar en micrografías tomadas con microscopio electrónico de transmisión resulta imposible en estas últimas

obtener información del eje z que permita determinar la diferentes formas que pueden tener las diversas estructuras celulares, por lo cual resulta importante generar conocimiento que nos ayude a mejorar el entendimiento de su función y su papel dentro de la célula.

CONCLUSIONES.

Se reconocieron las tres diferentes regiones del nucléolo mediante microscopia electrónica de transmisión.

Con microscopía de fuerza atómica se reconocieron centros fibrilares heterogéneos y región granular.

Se demostró la heterogeneidad del nucléolo con microscopia de fuerza atómica, mediante la observación de dos zonas, granular y fibro-granular.

Los análogos de imágenes de nucléolos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* muestran detalles en la arquitectura tridimensional de las subregiones nucleolares, comparables con las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica.

Los perfiles topográficos de nucléolos de células meristemáticas de raíz de *Allium cepa* muestran la heterogeneidad de cada una de las regiones nucleolares.

La técnica convencional de procesamiento resultó adecuada para observar muestras de meristemo apical de raíz de *Allium cepa* tanto con microscopio electrónico de transmisión como con el microscopio de fuerza atómica y comparar los resultados.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2007. *Molecular biology of the cell*, 5th ed, Garland Publishing, New York. 1602p.
- Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*. 56: 930-933.
- Boisvert FM, Koningsbruggen SV, Navascués J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. *Molecular Cell Biology*. 8: 574-585.
- Carron C, Balor S, Delavoie F, Plisson-Chastang C, Faubladiet M, Gleizes PE, O'Donohue MF. 2012. Post-mitotic dynamics of pre-nucleolar bodies is driven by pre-rRNA processing. *Journal of Cell Science*. 1: 4532-4542.
- Derenzini, M., Pasquinelli, G., O'Donohue, M-F., Ploton, D., and Thiry, M. 2006. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54: 131-145.
- Dorobantu SL, Gray MR. 2010. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*. 32: 74-96.
- Dorobantu SL, Goss GG, Burrell ER, 2012. Atomic force microscopy: A nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron*. 43: 1312–1322.
- Dvorak A J, Kobayashi S, Abe K, Fujiwara T, Takeuchi T, Nagao E. 2000. The application of the atomic force microscope to studies of medically important protozoan parasites. *Journal of Electron Microscopy*. 3: 429-435.
- Francis LW, Lewis PD, Wrigth CJ, Conlan S. 2010. Atomic force microscopy comes of age. *Biology of the Cell*. 102: 133-143.

- Gilmore JL, Aizaki H, Yoshida A, Deguchi K, Kumeta M, Junghof J, Wakita T, Takeyasu K. 2014. Nanoimaging of ssRNA: Genome architecture of the hepatitis C virus revealed by atomic force microscopy. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 5: 1-7.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science*. 112: 761-72.
- Hernández-Verdun D. 2005. Nucleolus: From structure to dynamics. *Histochemical Cell Biology*. 125: 127-137.
- Hernández-Verdun D. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Landes Bioscience: Nucleus*. 2: 189-194.
- Herrera JE, Correia JJ, Jones AE, Olson MO. 1996. Sedimentation analyses of the salt and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry*. 35: 2668–2673.
- Hozák P, Novák JT, Smetana K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biology of the Cell*. 66: 225-233.
- Jiménez-García LF, and Fragoso-Soriano RJ. 2000. Atomic force microscopy of the cell nucleus. *Journal of Structural Biology*. 129, 218-222.
- Jiménez-García LF, Zavala G, Chávez MB, Ramos G., MP. López-Velázquez G, Segura-Valdez ML, Montañez C, Hehl BA, Argüelo, GR, Ortega PG. 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal of Parasitology*. 38: 1297-1304.
- Jordan EG, y McGovern JH. 1981. The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5). *Journal of Cell Science*. 52: 373-389.

- Kalle W y Strappe P. 2012. Atomic force microscopy on chromosomes, chromatin and DNA: A review. *Micron*. 43: 1224-1231.
- López-Velazquez G, Hernández R, López-Villaseñor I, Reyes-Vivas H, Segura Valdez ML, Jiménez- García LF. 2005. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*. 11: 293-299.
- Marcano L y Del-Campo A. 1995. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristematicas de cebolla *Allium cepa* tratadas con inhibidores metabólicos. *Revista Científica de la Facultad Experimental de Ciencias*. 3: 73-82.
- Medina FJ, Cerdido A, Fernández-Gómez ME. 1995. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Experimental Cell Research*. 221: 111-125.
- Monneron A y Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase cell nucleus of some mammalian cells. *Journal Ultrastructure Research*. 27: 266-228.
- Mourão A, Varrot A, Mackereth CD, Cusack S, Sattler M. 2010. Structure and RNA recognition by the snRNA and snoRNA transport factor PHAX. *RNA Journal a publication of the RNA society*. 16: 1205-1216.
- Müller DJ y Dufrene YF. 2011. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*. 21:461-468.
- Németh A y Langst G. 2011. Genome organization in and around the nucleolus. *Trend in Genetics*. 27: 149- 155.
- Okano Y, Steen VD, Medsger TA. 1992. "Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis". *Arthritis and Rheumatism*. 35: 95–100.

- Olmedilla A, Testillano P, Vicente O, Delseny M, Risueno M. 1993. Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli. RNA/RNA *in situ* hybridization autoradiography and cytochemistry. *Journal of Cell Science*. 106: 1333-1346.
- Olson OJ, Dundr M, Szebeni A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Cell Biology*. 10: 189-195.
- Olson OJ, Hingorani K, Szebeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *International Review of Cytology*. 219: 199-253.
- Piñol-Roma, S. 1999. Association of non-ribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Molecular Biology of the Cell*. 10:77-90.
- Prieto JL, and McStay B. 2005. Nucleolar biogénesis: the first small step. *Biochemical Society Transactions*. 33: 1441-1443.
- Quin R, Jiao Y, Zhang S, Jiang W, Liu D. 2010. A nanoscopic view of microbial cell surfaces. *BMC Plant Biology*. 10: 225-236.
- Raska I, Koberna K, Malinsky J, Fidlerova H, Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*. 96: 579-594.
- Sáez-Vasquez J, and Medina FJ. 2008. The plant nucleolus. *Advances in Botanical research*. 47: 1-46.
- Sato S, Yano H, Makimoto Y, Kaneta T, Sato Y. 2005. Nucléolonema as a fundamental substructure of the nucleolus. *Journal Plant Research*. 118: 71-81.
- Scheer U, Thiry M, Goessens G. 1993. Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends in Cell Biology*. 3: 236-241.

- Scheer U, and Weisenberger D. 1994. The nucleolus. *Current Opinion en Cell Biology*. 6: 354-359.
- Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D. 1997. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *CHROMOSOMA*. 105: 470-480 .
- Schwaracher HG, and Watchtler F. 1993. The nucleolus. *Anatomy and Embryology*. 188: 515-536.
- Segura-Valdez ML, Cruz G SJ, Lopez C R, Lara M R, Jiménez-García LF. 2006. Observaciones sobre la estructura del núcleo de células del meristemo de raíz de cebolla (*Allium cepa L.*) con el microscopio de fuerza atómica. *Revista Especializada en Ciencia Químico-Biológicas*. 9: 30-33.
- Segura-Valdez ML, Cruz G SJ, López C R, Zavala G, Jiménez-García LF. 2008. Visualización de la mitosis con el microscopio de fuerza atómica. *TIP Revista Especializada en Ciencia Químico-Biológicas*. 11: 87-90.
- Segura-Valdez ML, Zamora-Cura A, Gutiérrez-Quintanar N, Villalobos-Nájera E, Rodríguez-Vázquez JB, Gálvan-Arrieta TC, Jimenez-Rodríguez D, Agredano-Moreno LT, Lara-Martinez R, Jimenez-Garcia LF. 2010. Visualization of cell structure *in situ* by atomic force microscopy. *FORMATEX: Mycroscopy Science Technology Aplications and Education*. 4: 441-448.
- Shaw PJ. 2010. Nucleolus. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-11.
- Sirri V, Urcuqui-Ichima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. 2008. Nucleolus: The fascinatin nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology*. 129: 13-31.
- Smetana K. 2011. The nucleolus through the years. *Journal of Applied Biomedicine*. 9: 119-127.

- Spector DL, Ochs RL, Busch H. 1984. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma Research*. 90:139–148.
- Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A, Adam SA, Wingfield PT, Olson MO. 1997. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry*. 36:3941–3949.
- Szebeni A, Hingorani K, Negi S, Olson MO. 2003. Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein B23. *Journal of Biology Chemistry*. 278: 9107–9115.
- Tollervey D, and Kiss T. 1997. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 337-342.
- Torres-Fernandez O y Ordoñez N. 2003. Comparative effect of osmium tetroxide and ruthenium tetroxide on *Penicillium sp. hyphae* and *saccharomyces cerevisiae* fungal cell wall ultrastructure. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. 23: 225-231.
- Tschochner H y Hurt E. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trend in Cell Biology*. 13:255-263.
- Webb HK, Truong VK, Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP. 2011. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy. *Current research and Methodologies. Journal of Microbiological Methods*. 86: 131-139.
- Weinstein L, and Steitz J. 1999. Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Cell Biology*. 11, 378-84.
- Vázquez EC, Zavala G, Chávez B, Echeverría M OM, Vazquez N G, Segura-Valdez ML, Jiménez-García LF. 2009. Evidencia ultraestructural del nucléolo de *Entamoeba histolytica*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*.1: 34-37.

Vázquez N G y Echeverría M OM. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. 1ra. Edición. Fondo de Cultura Económica. 168p.

Voit R, and Grummt I. 2001. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. PNAS-Biochemistry. 98: 13631-13636.