



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Ultraestructura del nucléolo de *Ginkgo biloba*

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

P R E S E N T A:

Ana Paulina Mendoza von der Borch

TUTORA:

Dra. María de Lourdes Segura Valdez



2020

CD.MX.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Nanobiología Celular y de Microscopía Electrónica del edificio Tlahuizcalpan, en la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Segura Valdez y el apoyo de los proyectos PAPIIT IN217917 y PAPIIME PE213916.

## **Agradecimientos**

A los Doctores Lourdes Segura Valdez y Luis Felipe Jiménez García por el apoyo, el conocimiento compartido y la asesoría; por todas sus enseñanzas tanto en el ámbito profesional como personal. Me considero muy afortunada de trabajar con académicos tan grandes de espíritu y sabiduría.

A la M. en C. Silvia Juárez por las sus enseñanzas en la parte práctica de la microscopía electrónica y por sus comentarios enriquecedores en la revisión de este trabajo.

A mi compañera Saraí de Jesús Cruz Gómez por la asesoría técnica en el procesamiento de las muestras, análisis de imágenes y uso del ultramicrotomo. Gracias también por la amistad y el cariño.

A la Dra. Reyna Lara por su apoyo en el manejo del microscopio electrónico y por la asesoría técnica.

A la M. en C. Rosario Pintor por sus enseñanzas en el manejo del ultramicrotomo.

A la Dra. Lourdes Agredano Moreno por sus consejos técnicos, siempre certeros.

A todos mis profesores de la especialidad por su dedicación, enseñanza y ejemplo.

A los estudiantes del laboratorio Jenny, Natalia, Erick, Diego, Iraís y Said por el cariño, los conocimientos, experiencias y anécdotas compartidas.

*A mis padres, jefecitos santos de la vida y del corazón*  
*A mi hijo Foncho; fuente de cariño, inspiración y energía*

## Contenido

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Resumen .....  | 6  |
| 2.   | Introducción .....   | 8  |
| 2.1. | El nucléolo .....  | 8  |
| 2.2. | Los componentes nucleolares .....  | 12 |
| 2.3. | El nucléolo vegetal .....  | 13 |
| 2.4. | <i>Ginkgo biloba</i> .....   | 14 |
| 3.   | Justificación .....  | 17 |
| 4.   | Objetivo.....  | 17 |
| 4.1. | Objetivos Particulares.....  | 17 |
| 5.   | Metodología .....  | 18 |
| 5.1. | Obtención del material biológico .....   | 19 |
| 5.2. | Procesamiento del material biológico .....   | 19 |
| 5.3. | Corte, contraste y observación en el microscopio óptico .....                          | 20 |
| 5.4. | Corte, contraste y observación en el microscopio electrónico de transmisión (TEM)..... | 21 |
| 6.   | Resultados y discusión .....   | 22 |
| 6.1. | Obtención del espécimen .....  | 22 |
| 5.2  | Microscopía Óptica .....   | 22 |
| 5.3  | Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....                                      | 24 |
| 7.   | Conclusiones .....   | 37 |
| 8.   | Perspectivas .....   | 38 |
| 9.   | Referencias.....   | 39 |

## 1. Resumen

El nucléolo es la estructura más prominente dentro del núcleo de células eucarióticas. Su función más conocida es la de sintetizar y procesar el RNA ribosomal así como ensamblar las subunidades de los ribosomas; sin embargo, recientemente se han descubierto muchas otras funciones nucleolares que resultan fundamentales para el funcionamiento celular.

El nucléolo es una estructura *sine qua non* del dominio Eucarya. A pesar de la inmensa importancia celular del nucléolo, a la fecha no existe un consenso sobre la cantidad de componentes subnucleolares ni de las funciones que se realizan en cada componente, ni siquiera en cuanto a su función más estudiada: la biogénesis de ribosomas.

Ultraestructuralmente, se han descrito tres componentes morfológicos: centros fibrilares (FCs), componente fibrilar denso (DFC) y componente granular (GC). Algunos autores han propuesto que los nucléolos de plantas, protistas, hongos, invertebrados y anamniotas son bipartitas, es decir, que solamente tienen dos de los tres componentes y que carecen de centros fibrilares. La distribución de los componentes nucleolares varía en distintos tipos celulares mostrando grandes diferencias, por ejemplo, entre nucléolos de células vegetales y animales.

*Ginkgo biloba* es la única especie viva de la división Ginkgophyta, por lo que se ha catalogado como un “fósil viviente”. Es por esto, que el objetivo del presente trabajo es observar, analizar y describir el nucléolo de esta planta. Con este fin, se tomaron muestras de meristemas foliares de *G. biloba* y se procesaron con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión (TEM), se obtuvieron cortes semifinos y cortes ultrafinos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación en el TEM.

Las imágenes obtenidas nos muestran que el procedimiento; desde la toma de la muestra biológica, su procesamiento, la obtención de los cortes, el contraste, la observación en el TEM, hasta la captura de la imagen se realizó correctamente.

A partir de este estudio se concluye que las células de *Ginkgo biloba* son heterogéneas, de aproximadamente 20 micras de diámetro. El núcleo es central, grande y reticulado; de alrededor de 5 micras de diámetro y contiene gránulos de *Lacandonia*.

El nucléolo es central, redondo y reticulado; con un diámetro de 1 a 2 micras; contiene intersticios nucleolares; es tripartita, ya que contiene los tres componentes nucleolares: componente fibrilar denso, centros fibrilares y componente granular. Los centros fibrilares son prominentes y heterogéneos. El componente dominante es el fibrilar denso.



## 2. Introducción

### 2.1. El nucléolo

El nucléolo es la estructura más prominente dentro del núcleo de células eucarióticas (fig. 1). Es el sitio de síntesis, procesamiento y ensamblaje de las subunidades de rRNAs (Alberts et al., 2008).

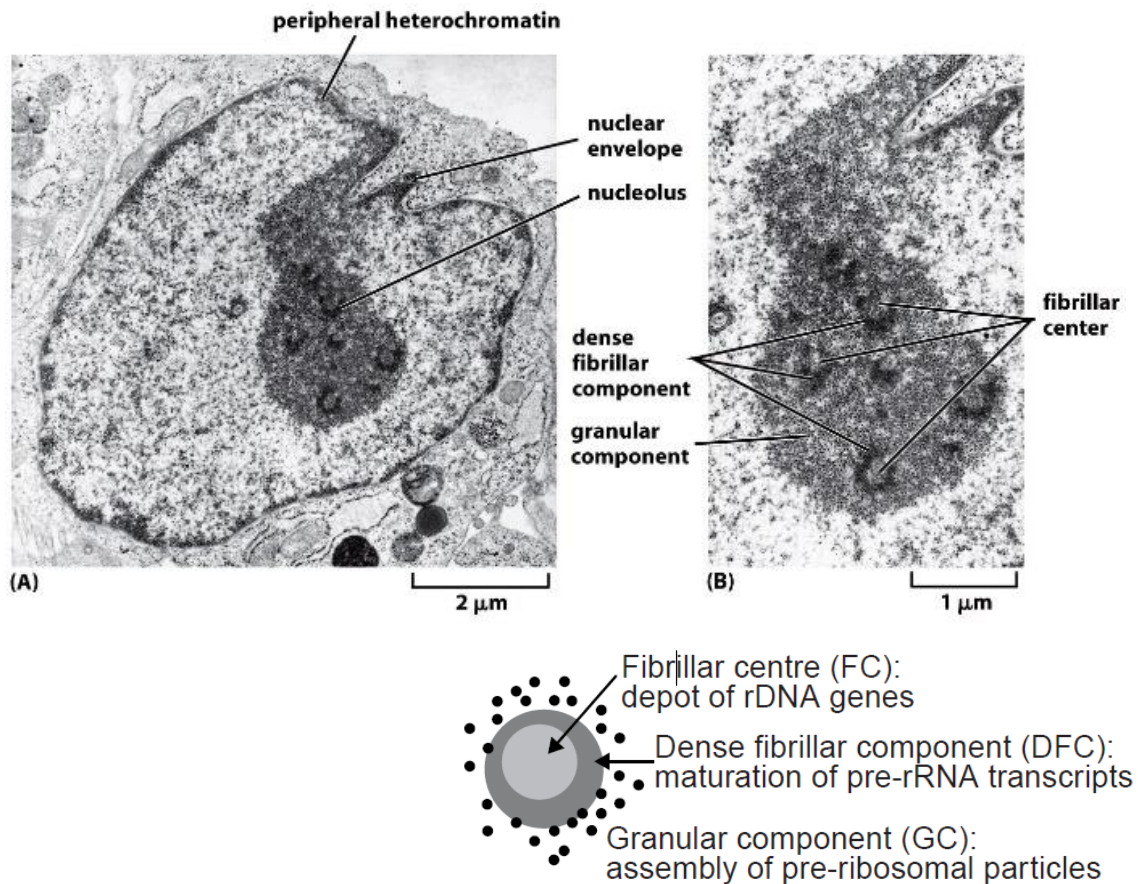


Figura 1. Micrografía electrónica del nucléolo de fibroblasto humano A) Micrografía del núcleo B) Micrografía del nucléolo (Alberts et al., 2008) C) Esquema de los tres componentes nucleolares (Carmo et al., 2000).

Formado por un gran agregado de macromoléculas como los genes que codifican al rRNA, precursores de rRNAs, las subunidades de rRNAs maduras, enzimas procesadoras del rRNA, snoRNPs, proteínas ribosomales y ribosomas parcialmente ensamblados (Alberts et al., 2008).

El nucléolo es una estructura *sine qua non* del dominio Eucarya. El único organismo con núcleo que durante mucho tiempo se consideró carente de nucléolo era *Giardia lamblia*, un parásito unicelular perteneciente a linajes de eucariota tempranamente divergentes. Recientemente, con técnicas de citoquímica molecular moderna (inmunocitoquímica e hibridación *in situ*) a nivel ultraestructural, se demostró la presencia de nucléolo en los núcleos de *Giardia*, aunque la primera evidencia de la presencia de esta subestructura ribonucleoproteica en este organismo unicelular binucleado fue la técnica de tinción de plata para organizador nucleolar, visualizada tanto a nivel de microscopía de luz como a nivel de microscopía electrónica de transmisión. El nucléolo de *Giardia* es el nucléolo más pequeño que se conoce en la naturaleza con un diámetro de dimensiones que se encuentran en el límite de resolución de la microscopía de luz (Jiménez-García et al. 2016).

Durante la interfase, el nucléolo se encuentra bien definido, pero durante la mitosis al condensarse los cromosomas el nucléolo se disocia y se reintegra durante la telofase a partir del organizador nucleolar (NOR) (fig. 2).

Como es de esperarse, el tamaño del nucléolo se relaciona con el número de ribosomas que está produciendo una célula. Así, en células con alta síntesis de proteínas ocupa el 25% del volumen nuclear (Alberts et al., 2008).

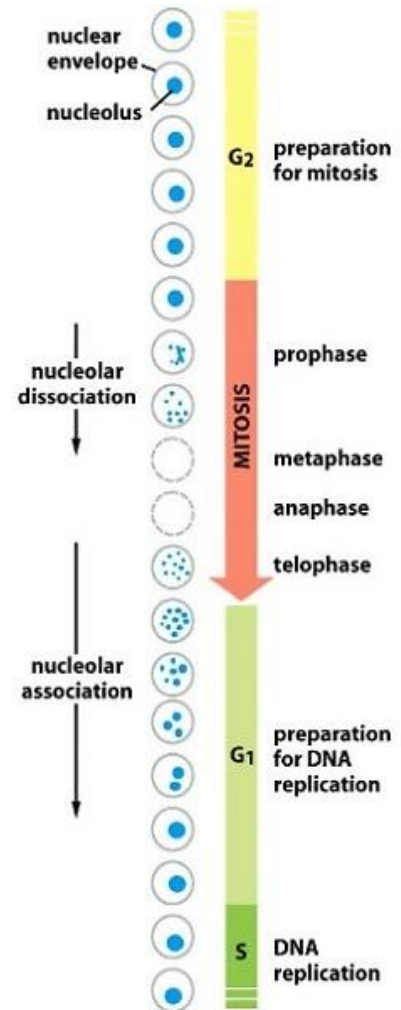


Figura 2. Fusión nucleolar (Alberts et al., 2008).

La estructura y funciones nucleolares han sido estudiadas mediante muy diversas técnicas, como anclaje de proteínas nucleolares a proteínas fluorescentes, aislamiento y purificación de nucléolos, análisis proteómico mediante espectrometría de masas, microscopía electrónica de transmisión y de barrido (Fig. 3). El movimiento secuencial del rRNA a través de los subcompartimentos FC, DFC y GC se ha demostrado adicionando pulsos cortos de nucleótidos halogenados a las células, mostrando al rRNA naciente en las uniones FC-DFC desplazándose hacia las regiones de GC (Lam et al., 2005).

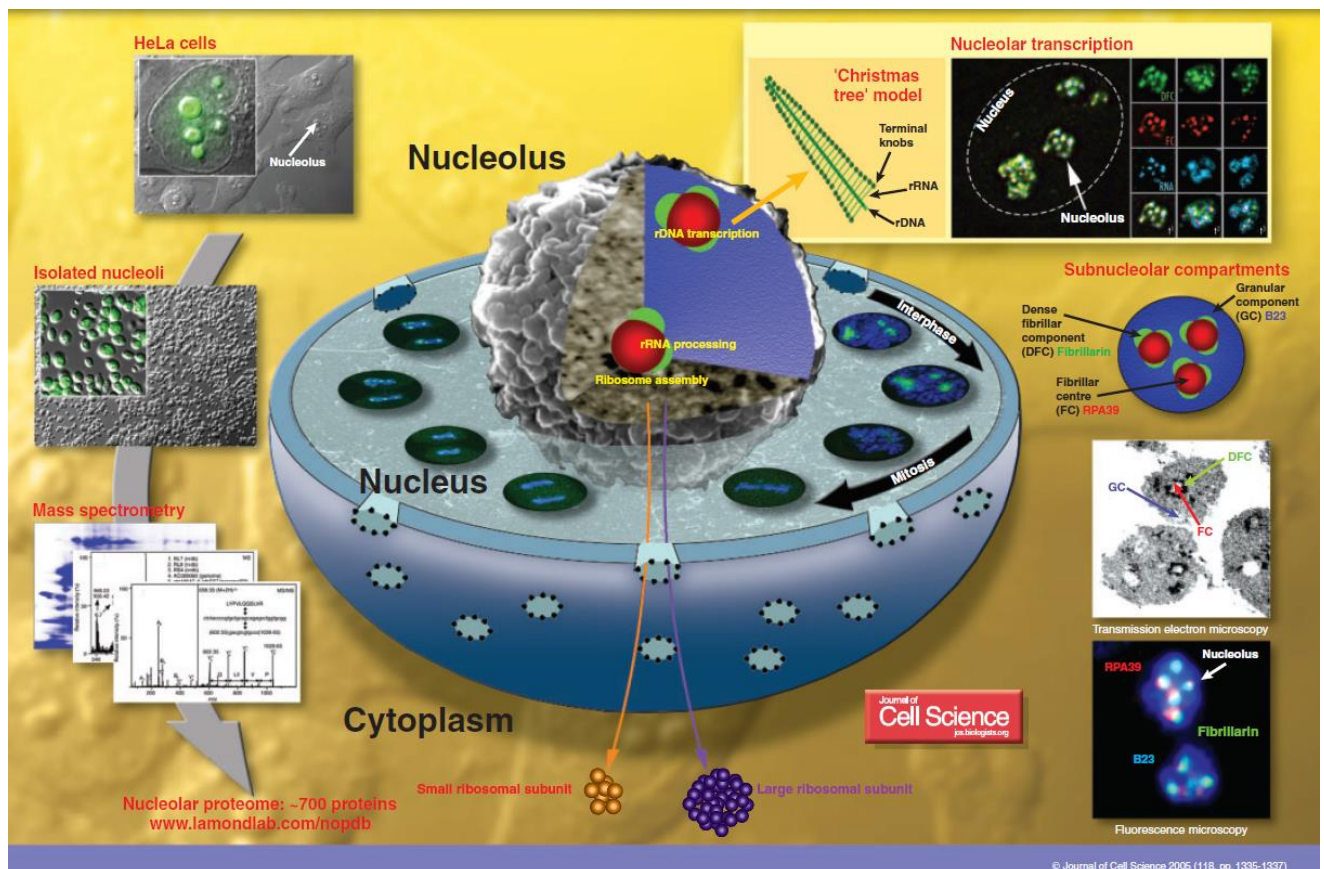


Figura 3. Diferentes técnicas que se han utilizado para estudiar el nucléolo (Lam et al., 2000).

El nucléolo es un organelo dinámico y multifuncional que participa en varios procesos vitales. Además de la síntesis de ribosomas, tiene un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, censado y reparación de daño al DNA, control del envejecimiento celular, actividad de telomerasa y metabolismo telomérico, vías de

exportación nuclear, procesamiento de los mRNAs y RNAs no codificantes, modificaciones de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPs) y coordinación de la respuesta celular al estrés (Olson et al., 2002; Villegas et al., 2018). Está involucrado en la biogénesis de la mayoría de las partículas ribonucleoproteicas (RNPs) (Thiry et al., 2005).

Recientemente, se ha descrito al nucléolo como el eje central organizador de muchas funciones nucleares; con un constante intercambio de proteínas y ácidos nucleicos entre el nucléolo y el nucleoplasma. Entre estas funciones, se incluyen la organización tridimensional del genoma, la respuesta al estrés, reparación y recombinación de DNA, regulación de la transcripción, mantenimiento telomérico y otras funciones celulares esenciales (Iarovaia et al., 2019).

El nucléolo es visible en el microscopio óptico con contraste de fases o contraste diferencial de interferencia (DIC), o en microscopía de fluorescencia si se expresa una proteína fluorescente anclada a una proteína nucleolar (Lam et al., 2005).

Gracias a su densidad y estructura robusta, es posible purificar y aislar los nucléolos, manteniendo la morfología y tamaño muy similares a los observados en células vivas, incluso manteniendo cierta actividad transcripcional (Lam et al., 2005).

A partir de la purificación de nucléolos de diferentes líneas celulares se ha realizado una base de datos de las proteínas nucleolares humanas, donde se encuentran alrededor de 50,000 péptidos contenidos en aproximadamente 4,500 proteínas (Ahmad et al., 2009).

Entre las proteínas nucleolares se han encontrado algunas que no parecen tener relación con la biogénesis de subunidades ribosomales, por ejemplo; proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, reparación de daño al DNA, y procesamiento del mRNA. La existencia de estas proteínas nucleolares es consistente con la idea de que el nucléolo tiene otras funciones además de la generación de las subunidades de rRNA (Lam et al., 2005).

La forma del nucléolo varía dependiendo del tipo celular. En levaduras el nucléolo se ve como una sola estructura con forma de medialuna junto a la envoltura nuclear y

ocupa más de un tercio del núcleo. En levaduras se producen en promedio 40 ribosomas por segundo, por lo que deben exportarse del núcleo 80 subunidades ribosomales (Fonseca et al., 2000).

En las células animales y vegetales, los nucléolos son estructuras muy dinámicas mostrando una gran variabilidad dependiendo de la actividad. Nucléolos muy activos son grandes, con muchos FCs, DFC y GC. En cambio, células quiescentes o con nucléolos inactivos por interrupción transcripcional tienen nucléolos pequeños y compactos, donde los componentes morfológicos tienden a segregarse en bloques adyacentes (Shaw y Jordan, 1995).

## 2.2. Los componentes nucleolares

A pesar de la inmensa importancia celular del nucléolo, y de la gran cantidad de publicaciones sobre su estructura, composición y funciones, a la fecha no existe un consenso sobre la cantidad de componentes subnucleolares ni de las funciones que se realizan en cada componente, ni siquiera en cuanto a su función más estudiada: la biogénesis de ribosomas.

La mayoría de los autores coinciden en que, ultraestructuralmente el nucléolo de la mayoría de las células eucarióticas consta de tres componentes morfológicos: centros fibrilares (FCs), componente fibrilar denso (DFC) y componente granular (GC) (fig. 1 y 3) (Jiménez y Merchant, 2003). Sin embargo, otros autores como Thiry y colaboradores (2005) plantean que muchos nucléolos eucariontes son bipartitas, es decir; que solo contienen dos de los tres componentes nucleolares (DFC y GC), a partir de sus observaciones proponen que el tercer componente (FC) surgió en la historia evolutiva en la transición entre amniotas y anamniotas. De esta forma, según esta propuesta, los nucléolos de reptiles, aves y mamíferos son tripartitas (con los tres componentes); mientras que plantas, protistas, hongos, invertebrados y anamniotas tienen nucléolos bipartitas.

Los FCs están formados por fibras de 5 nm de grosor semitransparentes a los electrones, el DFC se conforma por abundantes fibras electrodensas de 4 a 8 nm de espesor, y el GC por gránulos de 15 a 20 nm de diámetro (Segura, 1996).

En cuanto a las funciones de los componentes subnucleolares, se ha reportado que los FCs se encuentran múltiples copias de los genes para rRNAs, organizados en una o más secuencias tándem en los loci denominados regiones organizadoras nucleolares (NORs). De todos los genes de rRNAs, solo algunos se encuentran activos, estos se encuentran generalmente en la periferia de los FCs, extendiéndose hacia el DFC. Los transcritos nacientes de rRNA se alejan del DNA templado y se detectan primero en el DFC y después en el GC. La biogénesis de los rRNAs involucra una serie compleja de modificaciones post-transcripcionales, los pre-rRNAs iniciales residen en el componente fibrilar denso, mientras que los eventos de procesamiento tardío ocurren en el GC, formado por numerosos gránulos de aproximadamente 15 nm. Finalmente, los pre-rRNAs son translocados al citoplasma a través de los poros nucleares (Fonseca et al., 2000). Sin embargo, la localización de los sitios de transcripción del rDNA es motivo de controversia, dependiendo del autor ocurre en los FCs, en el DFC, en la interfase FC-DFC, o en una combinación de estas tres opciones (Raska, 2003). La actividad transcripcional de los genes de rDNA, detectada después de la incorporación de Br-UTP, se ha localizado solamente en la periferia de los FCs, en el DFC y principalmente en la transición entre estas dos regiones (Sáez-Vásquez y Medina, 2008).

### 2.3. El nucléolo vegetal

Los nucléolos de células vegetales también han sido estudiados, incluso hay una base de datos de las proteínas nucleolares de *Arabidopsis thaliana* (<http://bioinf.scri.sari.ac.uk/cgi-bin/atnopdb/home>) donde se encuentra información de las 217 proteínas nucleolares identificadas mediante análisis proteómicos de nucléolos aislados de cultivos celulares de *Arabidopsis* (Brown et al., 2005).

La distribución de los componentes nucleolares varía en distintos tipos celulares. En los nucléolos de células meristemáticas vegetales, más del 50% está formado por

DFC, solo el 1% es FC y el resto es GC e intersticio nucleolar. En cambio, en nucléolos activos de cultivos celulares de mamíferos, el 17% es DFC, el 25% es FC y el 75% es GC (Sáez-Vázquez y Medina., 2008).

En plantas se han reportado dos tipos de FCs: los homogéneos (similares a los de células animales), que presentan una alta actividad y fibras de cromatina descondensada; y los heterogéneos, con una baja actividad y además de contener estas fibras, contienen regiones densas formadas por cromatina condensada. El RNA parece no estar presente en los FCs, mientras las proteínas son su principal componente. Los centros fibrilares heterogéneos son pocos y grandes, y se asocian con una baja tasa de transcripción nucleolar (Risueño et al., 1982).

El intersticio nucleolar es característico de nucléolos vegetales con una alta actividad transcripcional y de procesamiento, característico de células en proliferación en fase G2 (Sáez-Vázquez y Medina., 2008).

#### 2.4. *Ginkgo biloba*

*Ginkgo biloba* es una planta gimnosperma, perteneciente a la división Ginkgophyta, considerada un “fósil viviente” ya que los organismos de este grupo se originaron en el período pérmico, hace más de 200 millones de años, fueron muy abundantes y diversos en la era mesozoica y actualmente esta especie es la única representante de este grupo. Se ha catalogado como la segunda especie gimnosperma más importante de preservar, debido a su alto valor de EDGE (Evolutivamente Distintivo y en Peligro de Extinción Global, por sus siglas en inglés), *Wollemia nobilis* tiene el primer lugar (fig. 4) (Forest et al., 2018).

*Ginkgo biloba* es un árbol grande, de hoja caduca que alcanza hasta 30 metros de altura, con distintivas hojas verdes bilobuladas, algo coriáceas, en forma de abanico, con venas divergentes (casi paralelas). Las hojas se vuelven de color amarillo brillante en otoño. Son plantas dioicas (los individuos masculinos o femeninos). Por lo general, los viveros venden solo árboles masculinos, porque los árboles femeninos producen

semillas envueltas en cubiertas carnosas similares a frutos que al madurar caen al suelo y se abren emitiendo un olor desagradable ([www.missouribotanicalgarden.org](http://www.missouribotanicalgarden.org)).

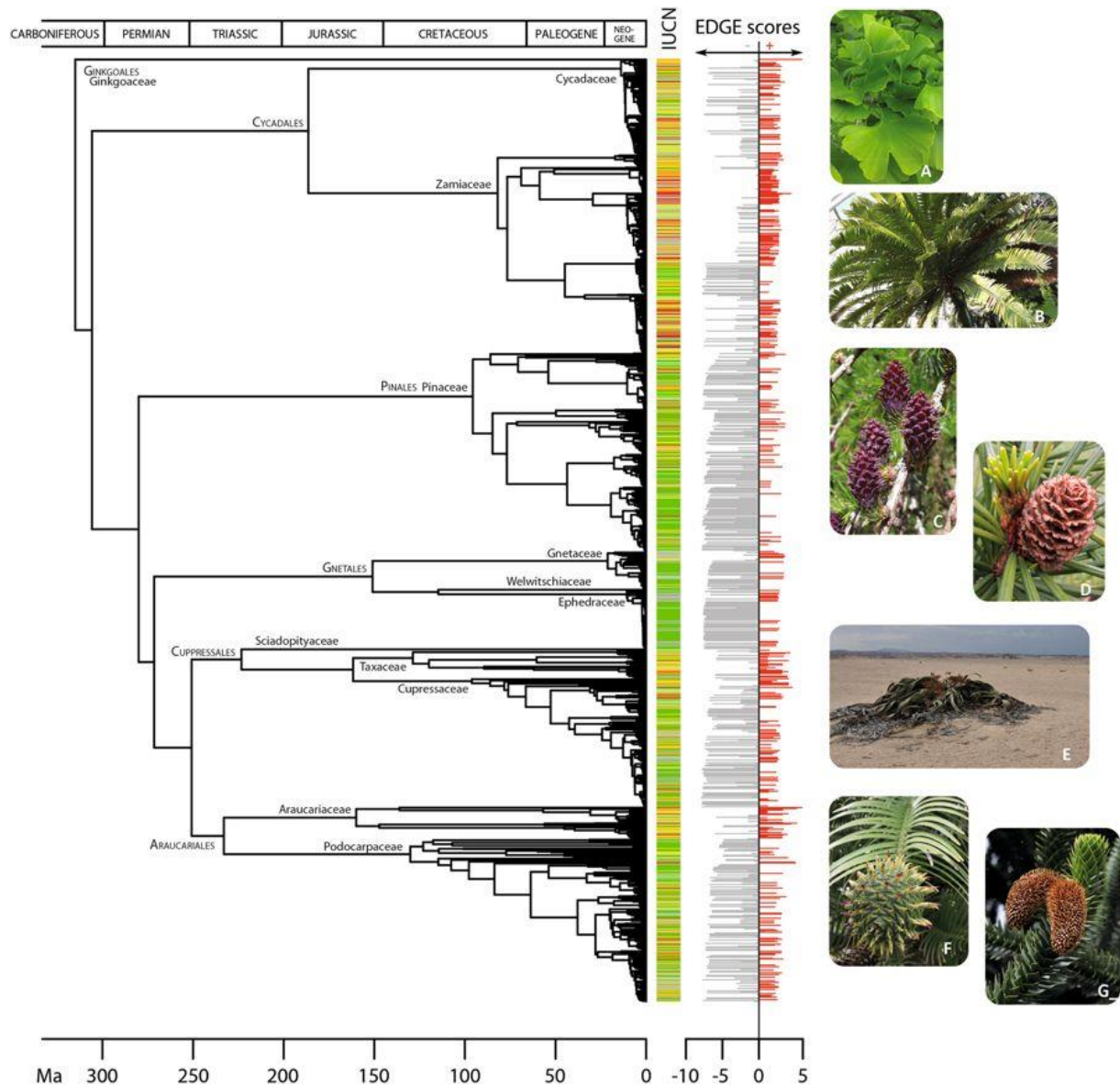


Figura 4. Árbol filogenético de las gimnospermas, basado en regiones de DNA plastídico y nuclear, comparando 923 especies. Se indica el valor de EDGE para cada una. *Ginkgo biloba* tiene el segundo lugar de EDGE y el primero de ED (Forest et al., 2018).



El núcleo de *Ginkgo biloba* se ha estudiado a nivel ultraestructural, donde se reportó la presencia de gránulos de *Lacandonia*, como los reportados en *Lacandonia schismatica*, sugiriendo la presencia de características y funciones nucleares específicas de células vegetales que aún no se han descrito. Estos gránulos son partículas de RNP que se cree están involucradas en el metabolismo intracelular del mRNA, en su almacenamiento y/o transporte, así como en los últimos pasos del procesamiento del pre-mRNA (Jiménez et al., 2002).

En plantas, se han encontrado dos tipos de núcleo dependiendo del acomodo de la heterocromatina: cromocéntrico y reticulado. El núcleo de *G. biloba* es reticulado (Jiménez et al., 2002).

El nucléolo de *G. biloba* se ha logrado observar por microscopía de fuerza atómica, permitiendo distinguir el componente fibrilar denso del componente granular (Jiménez et al., 2020).

### 3. Justificación

Debido a la gran importancia evolutiva y funcional del nucléolo, en nuestro grupo de trabajo, estamos interesados en identificar las diferencias y similitudes en los nucléolos de distintos grupos taxonómicos del dominio Eucarya. *Ginkgo biloba* es la única especie viva de la división Ginkgophyta, por lo que se ha catalogado como un “fósil viviente”, todo estudio de biodiversidad vegetal, debe incluir a esta planta. Es por esto que resulta fundamental observar, analizar y describir el nucléolo de esta planta.

### 4. Objetivo

- Observar, analizar y describir el nucléolo de *Ginkgo biloba* a nivel ultraestructural.

#### 4.1. Objetivos Particulares

- Observar el nucléolo de *G. biloba* a nivel ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Identificar si en el nucléolo de *G. biloba* están presentes todos los componentes nucleolares: componente fibrilar denso, componente granular y centros fibrilares.
- Realizar un análisis y descripción de la ultraestructura de este nucléolo.

## 5. Metodología

Las zonas cercanas a los meristemos foliares de *Ginkgo biloba* se procesaron para su observación en el microscopio óptico y electrónico. La metodología realizada se resume y esquematiza en la figura 5 y se detalla a continuación.

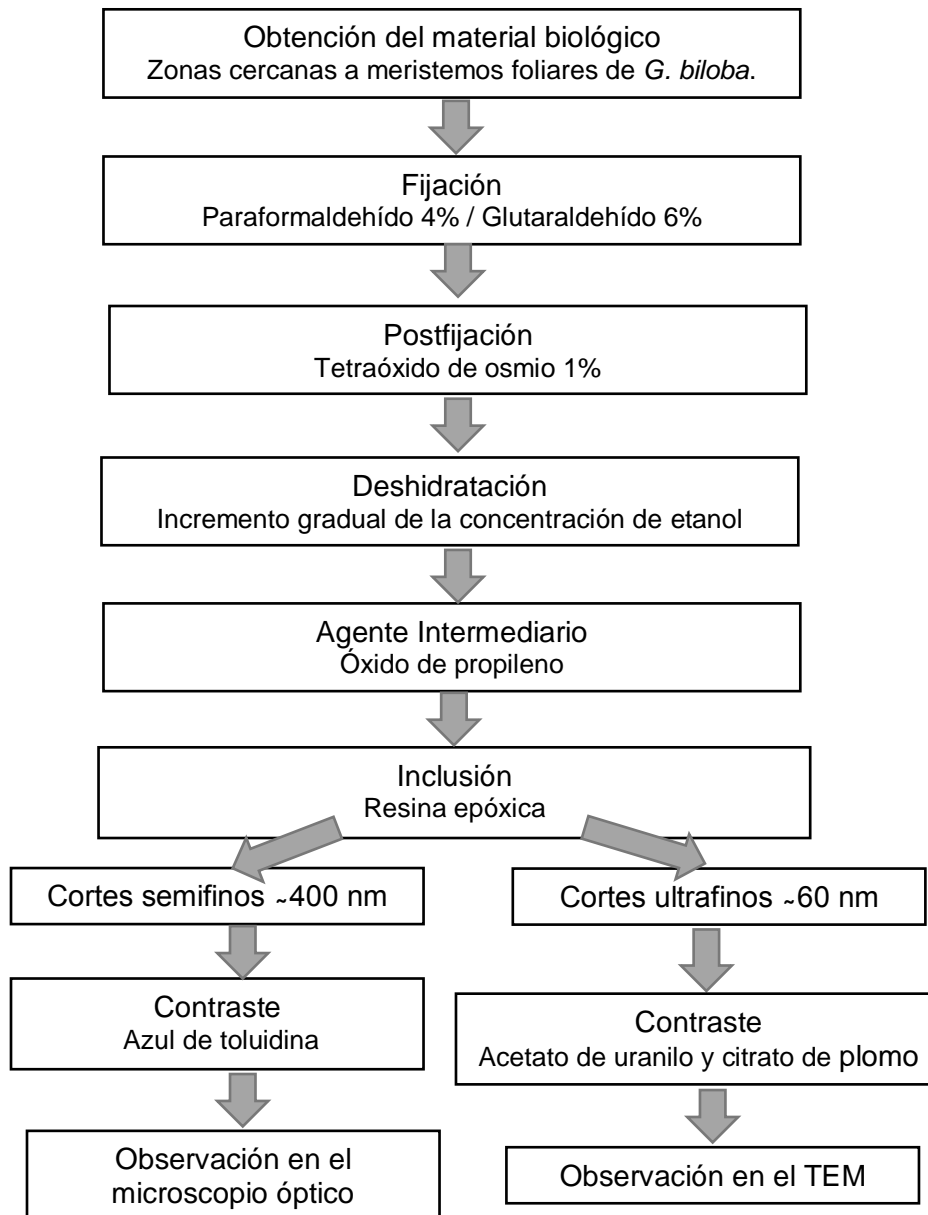


Figura 5. Esquema de la metodología seguida en el presente estudio.

## 5.1. Obtención del material biológico

Se utilizaron muestras de zonas cercanas a los meristemos foliares de *Ginkgo biloba* (fig. 6), éstas se procesaron para su observación en el microscopio óptico y electrónico como se detalla a continuación.

## 5.2. Procesamiento del material biológico

**Fijación:** Las muestras biológicas se cortaron con una navaja en fragmentos pequeños de aproximadamente 1 mm, inmediatamente después se colocaron en solución fijadora. Esta solución contenía 6% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído en buffer fosfatos salino pH 7 (PBS).

Las muestras se dejaron en esta solución en frasco tapado durante 48 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se retiró el exceso de solución fijadora con 5 lavados de agua milli Q de 5 minutos cada uno.

**Postfijación:** Una vez retirada el agua del último lavado se agregó tetraóxido de osmio al 1%. Se dejó tapado y a temperatura ambiente durante 24 horas.

**Deshidratación:** Se retiró la solución de tetraóxido de osmio y las muestras se deshidrataron gradualmente con soluciones crecientes de etanol (30, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%). Las muestras se dejaron 10 minutos en cada solución, al terminar se hicieron otros dos lavados con etanol al 100%.

**Agente intermediario:** Se retiró la solución de etanol y se realizaron 3 cambios de 5 minutos con óxido de propileno.

**Inclusión:** El óxido de propileno se sustituyó con una mezcla 2:1 de óxido de propileno y resina epóxica (EMbed 812) y las muestras se dejaron en esta solución durante 2.5 horas. Luego se sustituyó por una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina epóxica y se dejaron en esta solución por 76 horas. Posteriormente se dejó el frasco destapado durante 24 horas para permitir la evaporación del óxido de propileno y el aumento gradual de la concentración de resina.

Luego las muestras fueron transferidas a moldes previamente cubiertos con resina y se incubaron a 60 °C durante 48 horas para permitir la polimerización.

De esta forma, se obtuvieron bloques con material fijado que se pueden almacenar indefinidamente a temperatura ambiente para posteriormente realizar cortes y estudiar el material biológico con diferentes técnicas de microscopía.

### 5.3. Corte, contraste y observación en el microscopio óptico

**Preparación del bloque:** Con el fin de obtener cortes para su observación al microscopio, se formó una pirámide en cada bloque con material fijado, para esto se colocó en un soporte y se retalló manualmente con una navaja de rasurar hasta darle forma de pirámide dejando arriba una base en forma de trapecio de aproximadamente 1 mm de longitud justo encima del material biológico.

**Corte:** Utilizando un ultramicrotomo y cuchillas de vidrio de 2.5 cm y 45 °C, en un ángulo de 4 °C entre la vertical y la cara anterior de la cuchilla se realizaron cortes semifinos de aproximadamente 300 nm de grosor que se deslizaron sobre la superficie del agua de la barquilla de la cuchilla.

**Contraste:** Los cortes fueron recogidos de la superficie del agua con un asa de cobre para colocarlos sobre un portaobjetos donde se adhirieron al exponer la parte inferior del portaobjetos al calor generado por un mechero de alcohol. Posteriormente se contrastaron con el colorante paragon adicionando una gota de colorante, luego exponiendo unos instantes al calor del mechero, dejando enfriar y enjuagando con agua destilada para finalmente observar la preparación en el microscopio óptico.

Preparación del colorante paragon (Arenas, R. 2008):

- Azul d toluidina 0.356g
- Fucsina básica 0.135g
- Alcohol etílico 30% 50mL
- Alcohol isopropílico al 70% (como fijador)

Finalmente, las muestras se observaron al microscopio óptico.

#### 5.4. Corte, contraste y observación en el microscopio electrónico de transmisión (TEM)

A partir de las observaciones de los cortes semifinos de buena calidad, se trabajó sobre ese mismo bloque con la pirámide ya formada para obtener cortes para observar en TEM.

**Corte:** El procedimiento fue muy similar que el de microscopía óptica, la diferencia es que en este caso los cortes fueron ultrafinos de aproximadamente 60 nm de espesor, lo que se determinó por su color plateado.

**Contraste:** Los cortes fueron recogidos en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro y se contrastaron colocándolas sobre una gota de acetato de uranilo al 4% durante 20 minutos, después se lavaron con agua destilada y se colocaron sobre una gota de citrato de plomo al 0.4% durante 10 minutos, se lavaron con agua nuevamente, se eliminó el exceso de agua y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su observación en el TEM.

**Observación en TEM:** Los cortes contrastados se observaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión 1010 de la marca Jeol a 80 kVs.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Obtención del espécimen

A partir de cortes de meristemas foliares de *Ginkgo biloba* se realizó el procesamiento para su observación en el microscopio óptico y electrónico (fig. 6).



Figura 6. Especimen de *Ginkgo biloba* de los jardines de la Facultad de Ciencias, UNAM.

### 5.2 Microscopía Óptica

Con el fin de observar de manera panorámica la muestra de tejido vegetal, primero se realizaron cortes semifinos de aproximadamente 300 nm de espesor, se contrastaron con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico (fig. 7).

En la figura 7A podemos observar una serie de cortes semifinos captados en una gota de agua, fijados y contrastados.

En la figura 7B observamos una región de células meristemáticas que se caracterizan por ser células pequeñas, con núcleos grandes y pared celular delgada.

En la figura 7C se encuentra una región de células que a pesar de ser cercanas a los meristemas foliares, tiene ya un alto grado de diferenciación, mostrando varios tipos celulares que varían tanto en la forma exterior como en el contenido intracelular, evidenciando diferentes roles biológicos.

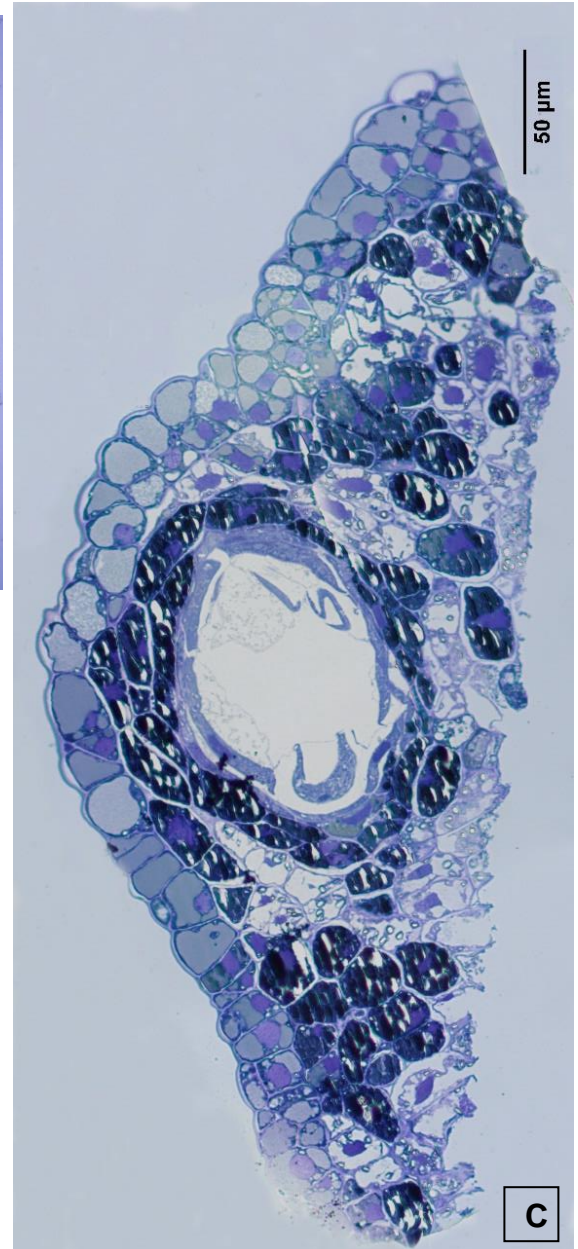
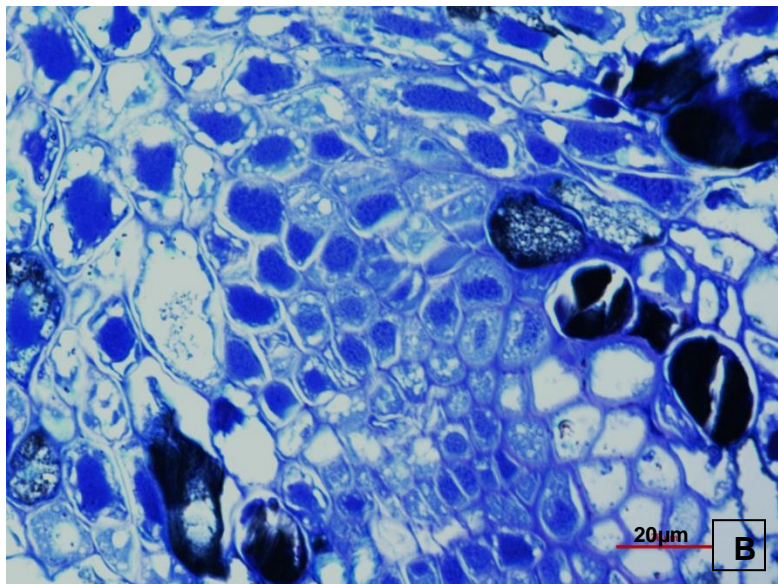
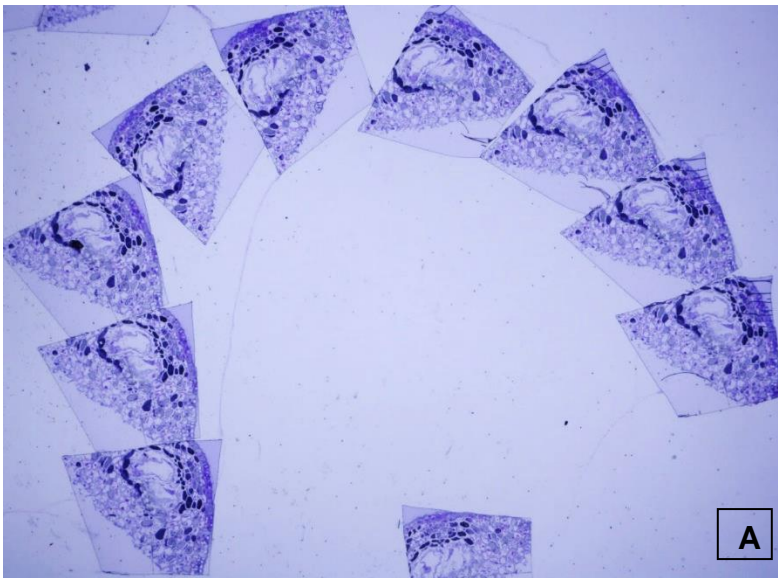


Figura 7. Fotomicrografías de cortes semifinos de regiones cercanas a los meristemas foliares de *Ginkgo biloba* teñidos con azul de toluidina. A) Serie de cortes semifinos, B) Células meristemáticas y C) Vista panorámica de una zona con células ya diferenciadas donde se observan diversos tipos celulares.



### 5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el fin de estudiar los nucléolos a nivel ultraestructural, se obtuvieron cortes ultrafinos de alrededor de 60 nm de espesor que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en el TEM (fig. 8 – 15).

Las imágenes a bajos aumentos nos muestran células heterogéneas, de aproximadamente 20 micras de diámetro (fig. 8).

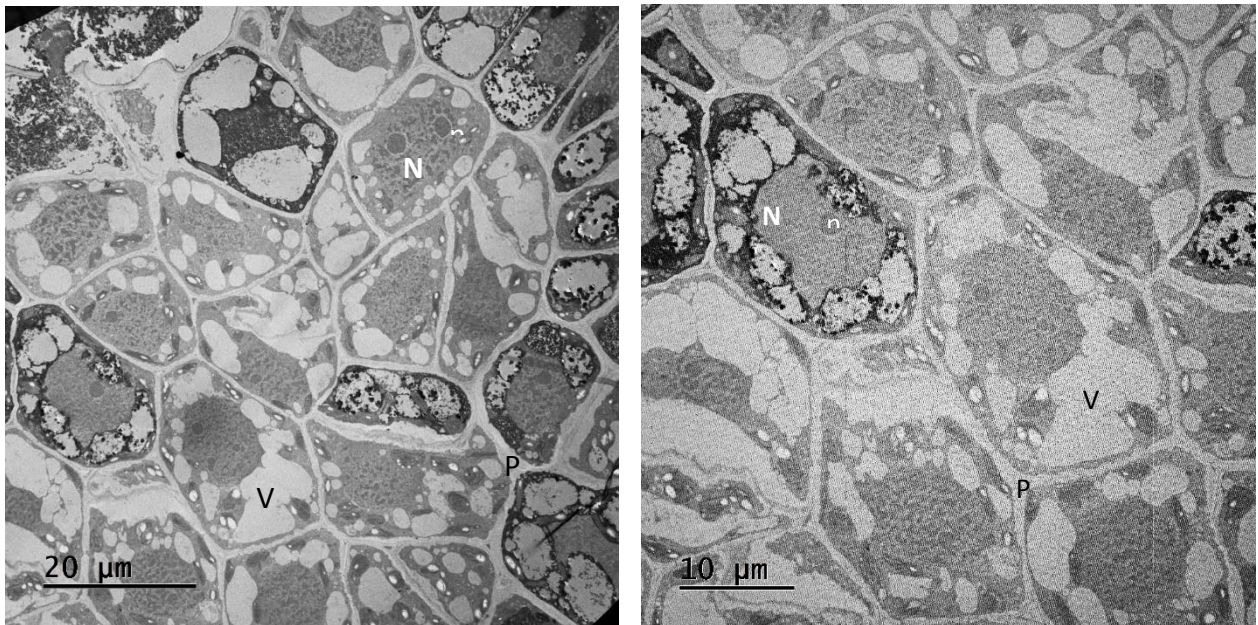


Figura 8. Micrografías electrónicas de *G. biloba* donde se observa la heterogeneidad celular. Núcleo (N), nucléolo (n), vacuola (V), pared celular (P).

Al enfocar en una sola célula, identificamos claramente diversos componentes subcelulares (núcleo, nucléolo, mitocondrias, cloroplastos, vacuolas, vesículas, así como vesículas con material electrodensito que muy probablemente contienen taninos) (fig. 9).

En varias de las imágenes obtenidas se puede apreciar el contenido vacuolar, lo cual es un indicativo de buena preservación del material biológico (fig. 9 y 10).

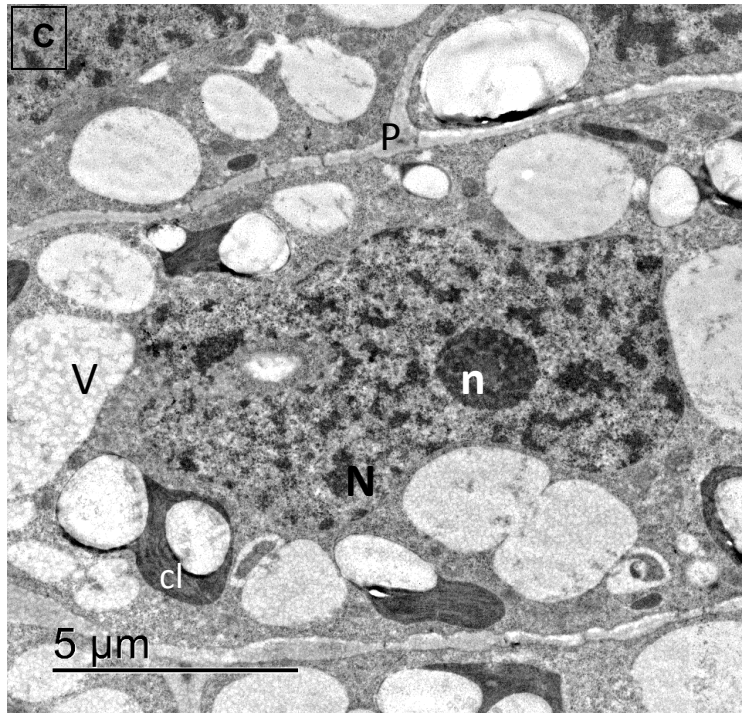
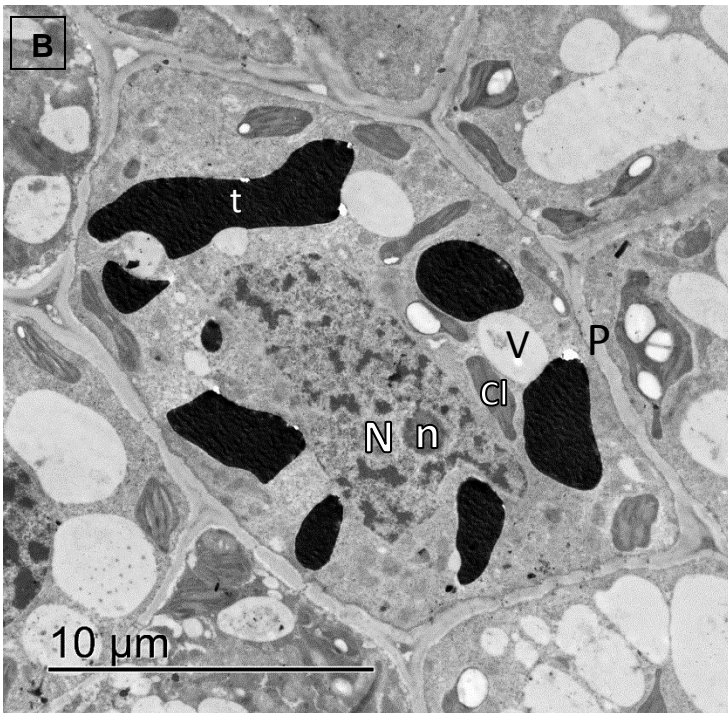
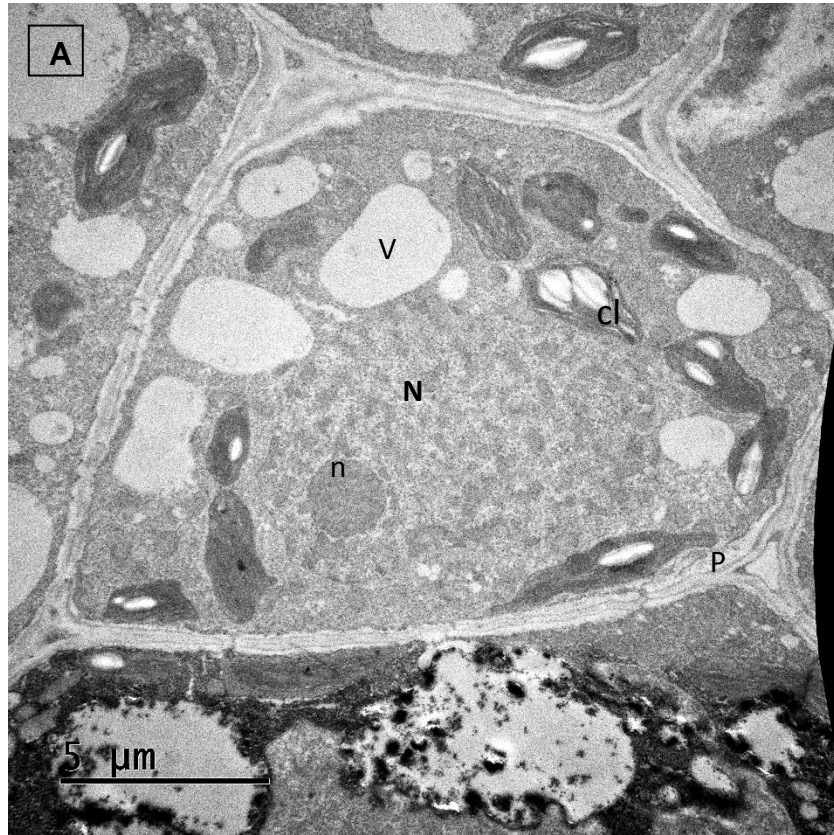


Figura 9. Micrografías electrónicas de células de *G. biloba* donde se pueden observar los diferentes componentes subcelulares. Núcleo (N), nucléolo (n), vacuola (V), pared celular (P), cloroplasto (cl), vesículas con posibles taninos (t).

Con un mayor acercamiento, podemos ver con mayor detalle el núcleo celular, apreciando que las células de *G. biloba* tienen un núcleo central, grande y reticulado, de aproximadamente 5 micras de diámetro y con abundantes gránulos de *Lacandonia*, lo que concuerda con lo reportado previamente (Jiménez., et al 2002) (fig. 9-15).

Encontramos varios núcleos donde no se observó el nucléolo, lo cual seguramente se debió a que esta región subnuclear no estaba en ese plano del corte (fig. 10). Sin embargo, también se encontraron núcleos con varios nucléolos (fig. 13 a).

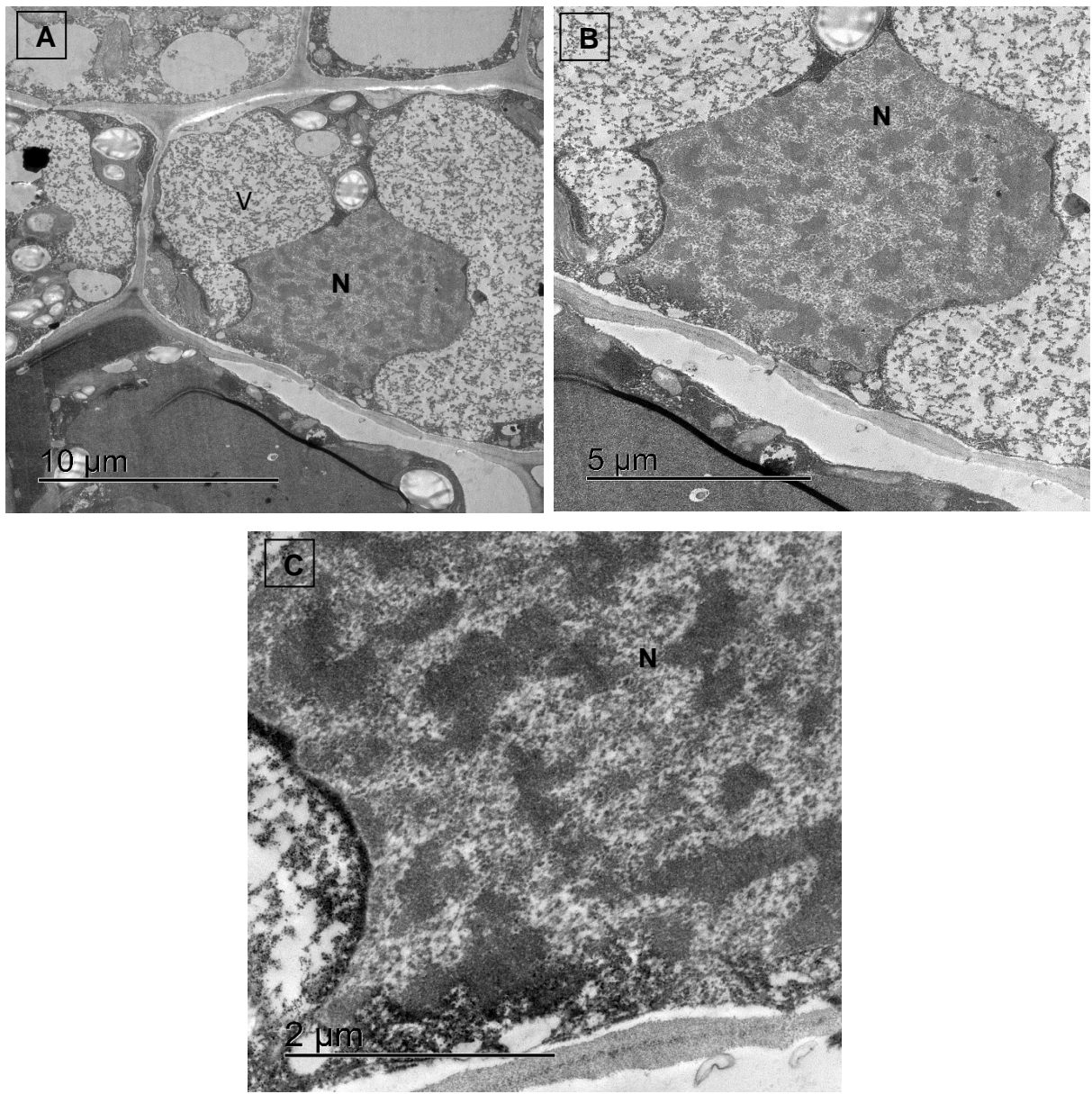


Figura 10. Micrografías electrónicas de un núcleo celular de *G. biloba* observado a diferentes aumentos. Núcleo (N), vacuola (V), pared celular (P).

En el núcleo se observan claramente los gránulos de *Lacandonia* cuyo diámetro se ha reportado de 32 nm (Jiménez., et al 2002), esto resulta muy notorio al compararlo con el tamaño de las partículas ribosomales que se encuentran en el citoplasma (fig. 11).

Con una mayor magnificación podemos apreciar con detalle el nucléolo, que es el objeto de estudio de este trabajo, y es la estructura más prominente dentro del núcleo.

Los nucléolos observados son redondos, centrales y reticulados, con un diámetro de 1 a 2 micras, en los que predomina el componente fibrilar denso (fig. 11-15).

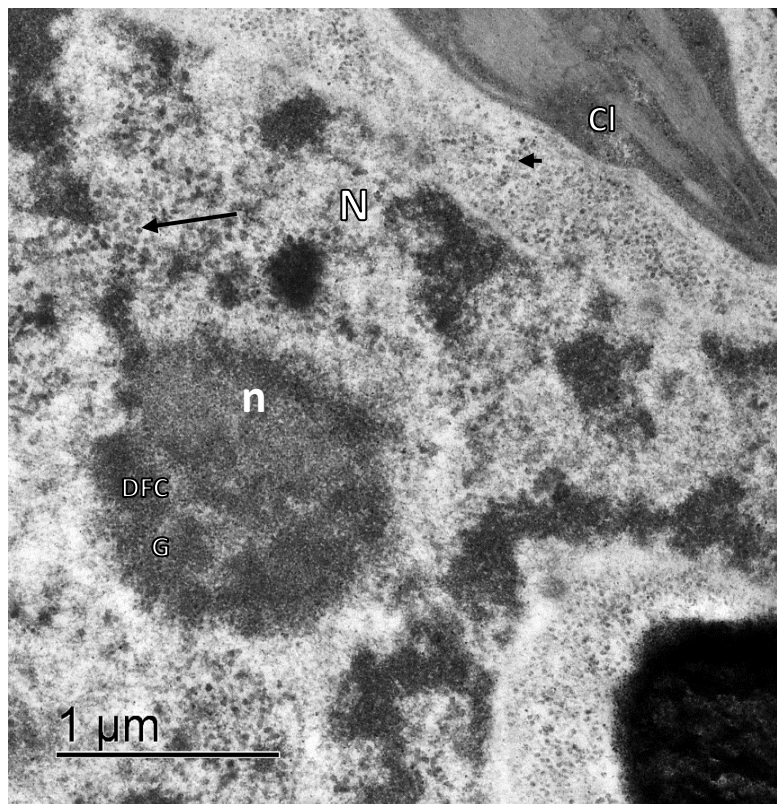


Figura 11. Micrografías electrónicas del nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), cuerpo de Cajal (CB), cromatina compacta (Cr), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (G), → ribosoma, ----→ gránulo de *Lacandonia*. Esta imagen es un acercamiento al nucléolo de la figura 9B.

Son nucléolos tripartitas ya que se aprecian los tres componentes nucleolares (componente granular, componente fibrilar denso y centro fibrilar), en los que domina el componente fibrilar denso. Los centros fibrilares son prominentes y heterogéneos, es decir, rodeados por cúmulos de cromatina compacta (fig. 12, 13, 14 y 15).

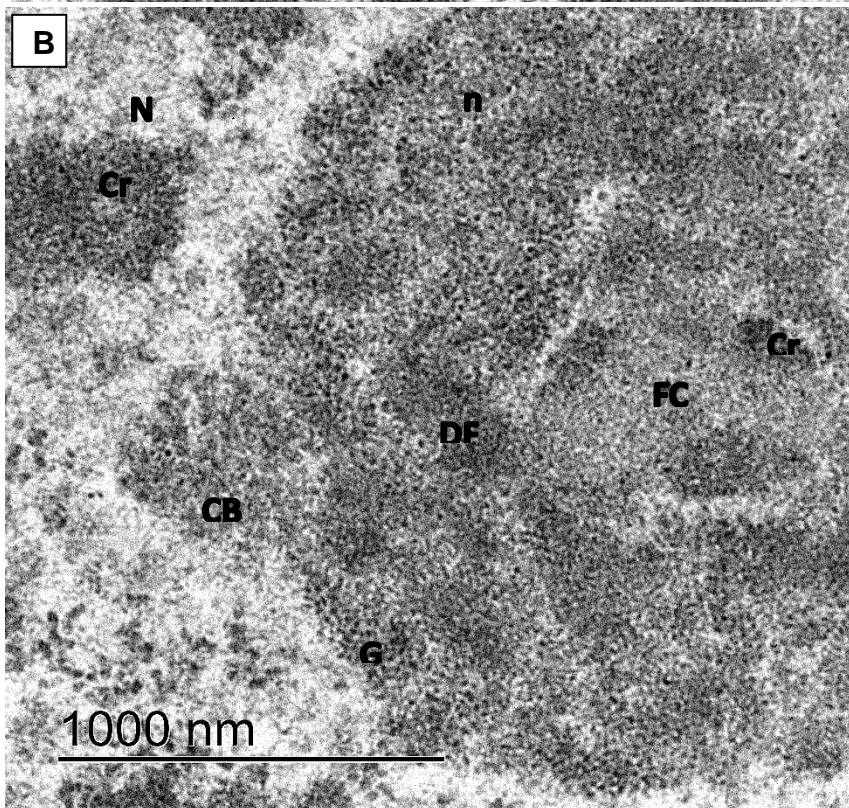
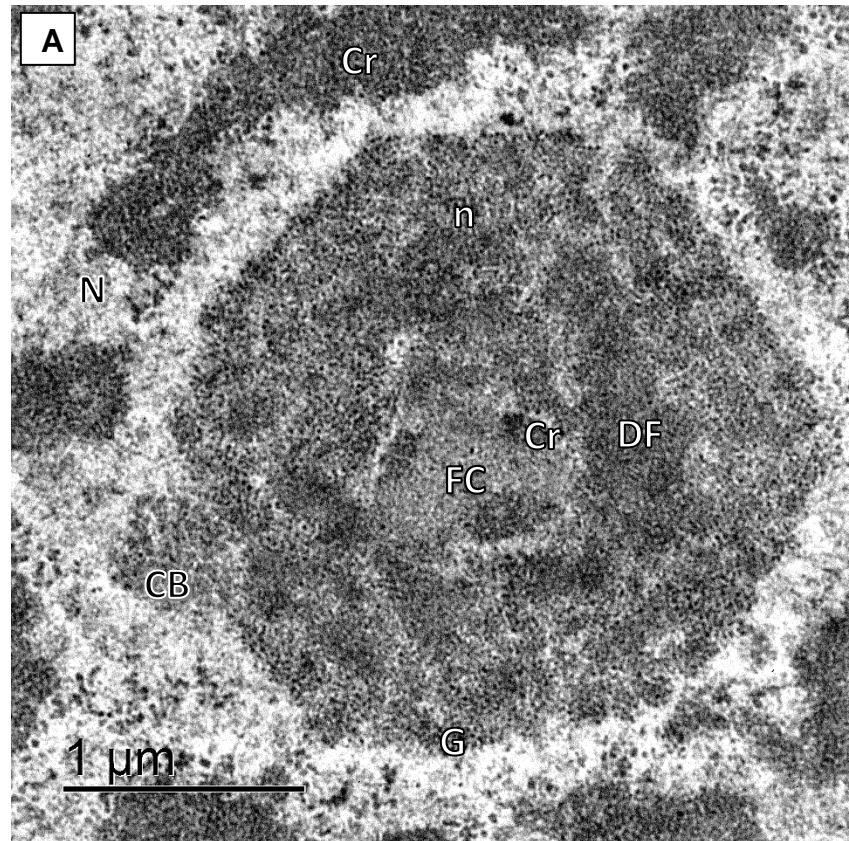


Figura 12. Micrografías electrónicas del nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), cuerpo de Cajal (CB), cromatina compacta (Cr), componente fibrilar denso (DFC), centro fibrilar (FC), componente granular (G).

En la figura 12 podemos distinguir un cuerpo de Cajal, que podemos identificar debido a su forma, tamaño, densidad, estructura fibrilar interna.

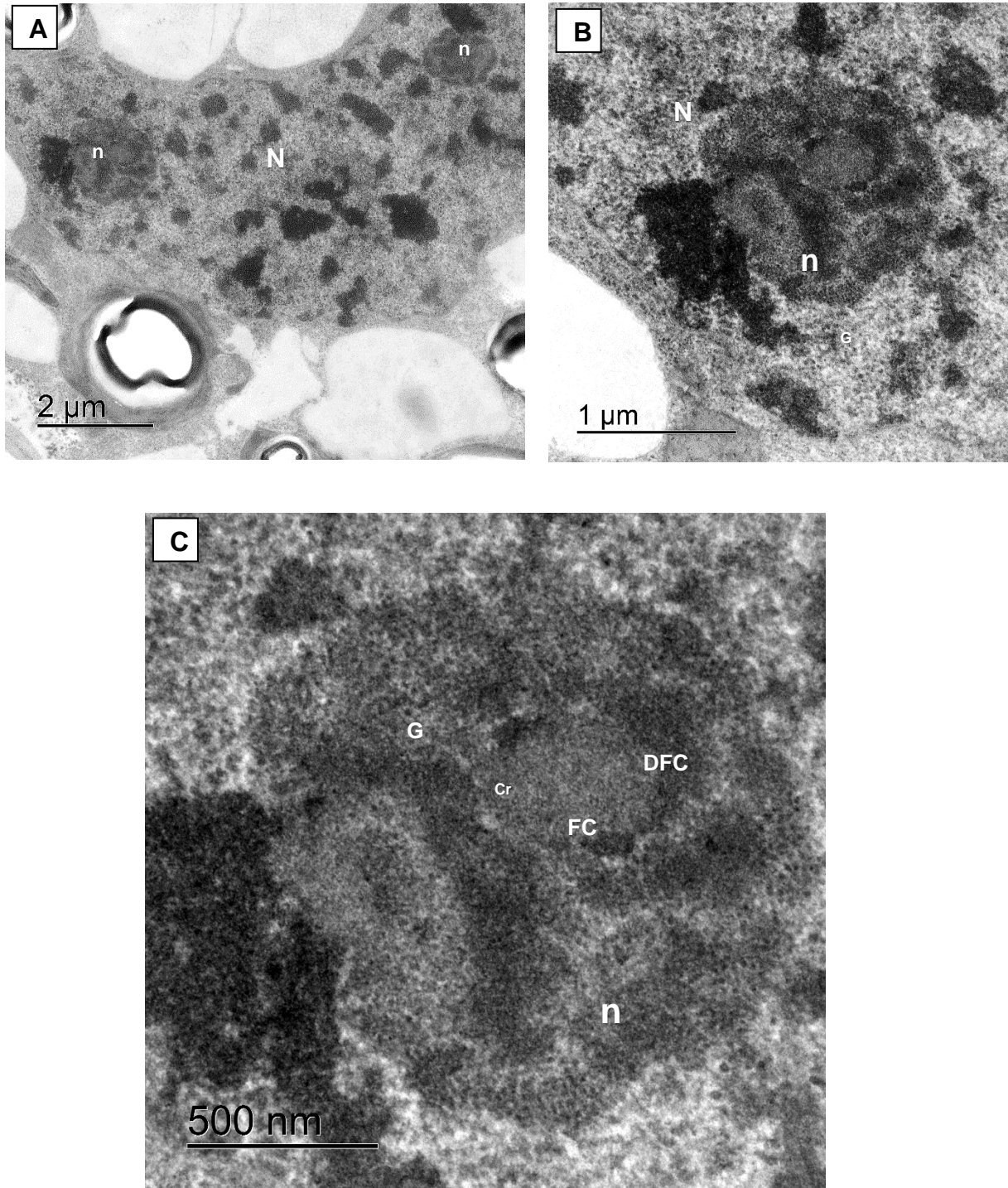


Figura 13. Micrografías electrónicas de un núcleo de *G. biloba* con dos nucléolos, mostrando diferentes acercamientos de un nucléolo. Núcleo (N), nucléolo (n), cromatina compacta (Cr), componente fibrilar denso (DFC), centro fibrilar (FC), componente granular (G).

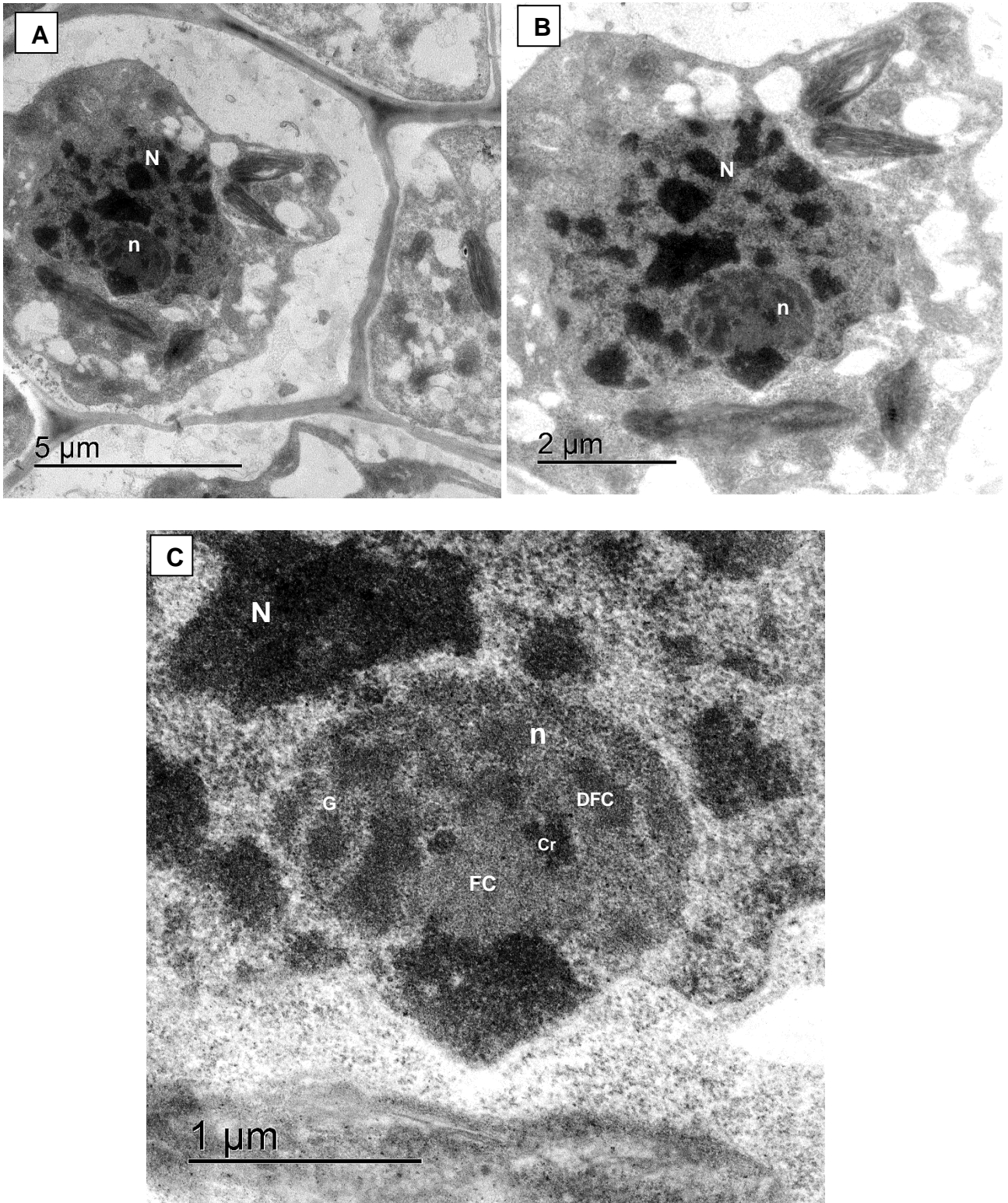


Figura 14. Micrografías electrónicas de una célula de *G. biloba* donde se observa el núcleo (N), el nucléolo (n), el componente fibrilar denso (DFC), el componente granular (G) y el centro fibrilar

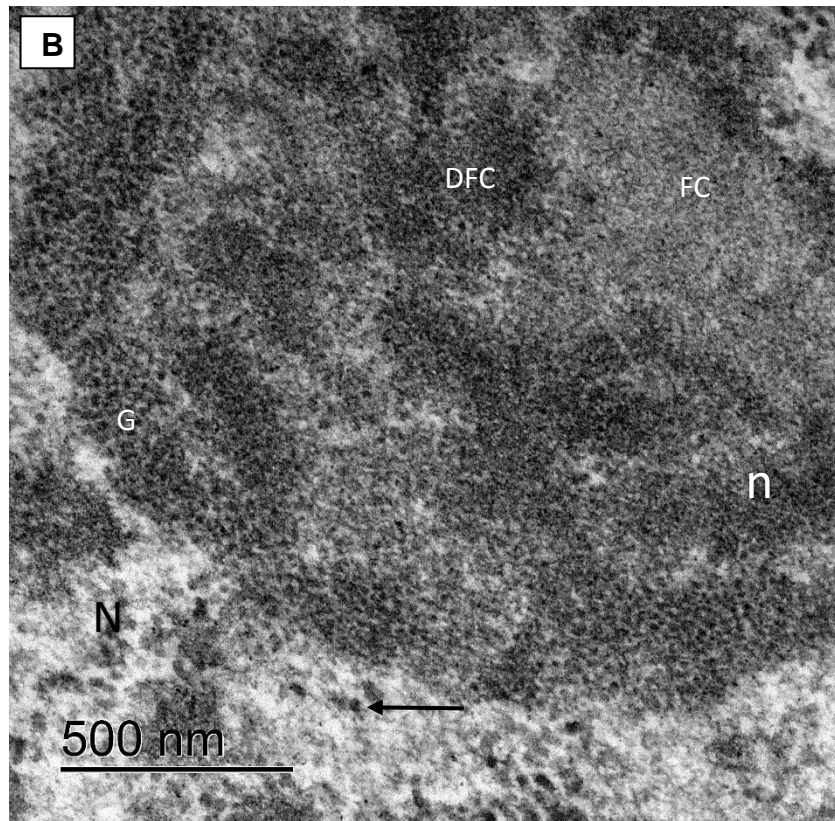
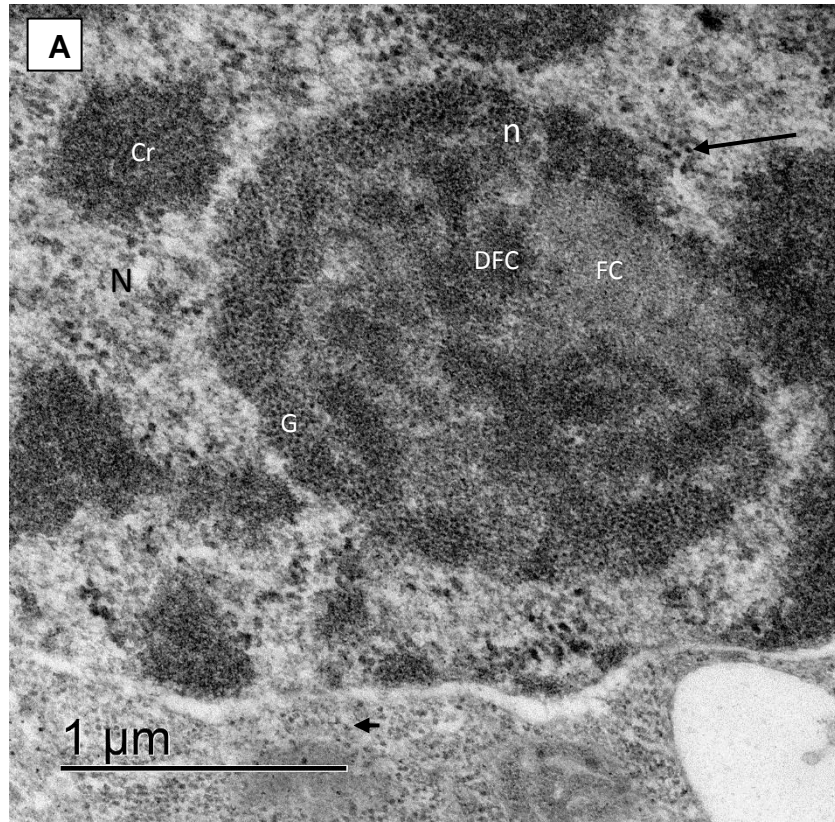


Figura 15. Micrografías electrónicas de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (G) y centro fibrilar (FC).



En las figuras 16, 17 y 18 podemos observar con mayor detalle el componente granular, estos nucléolos con gran cantidad de este componente nos indican una alta síntesis ribosomal.

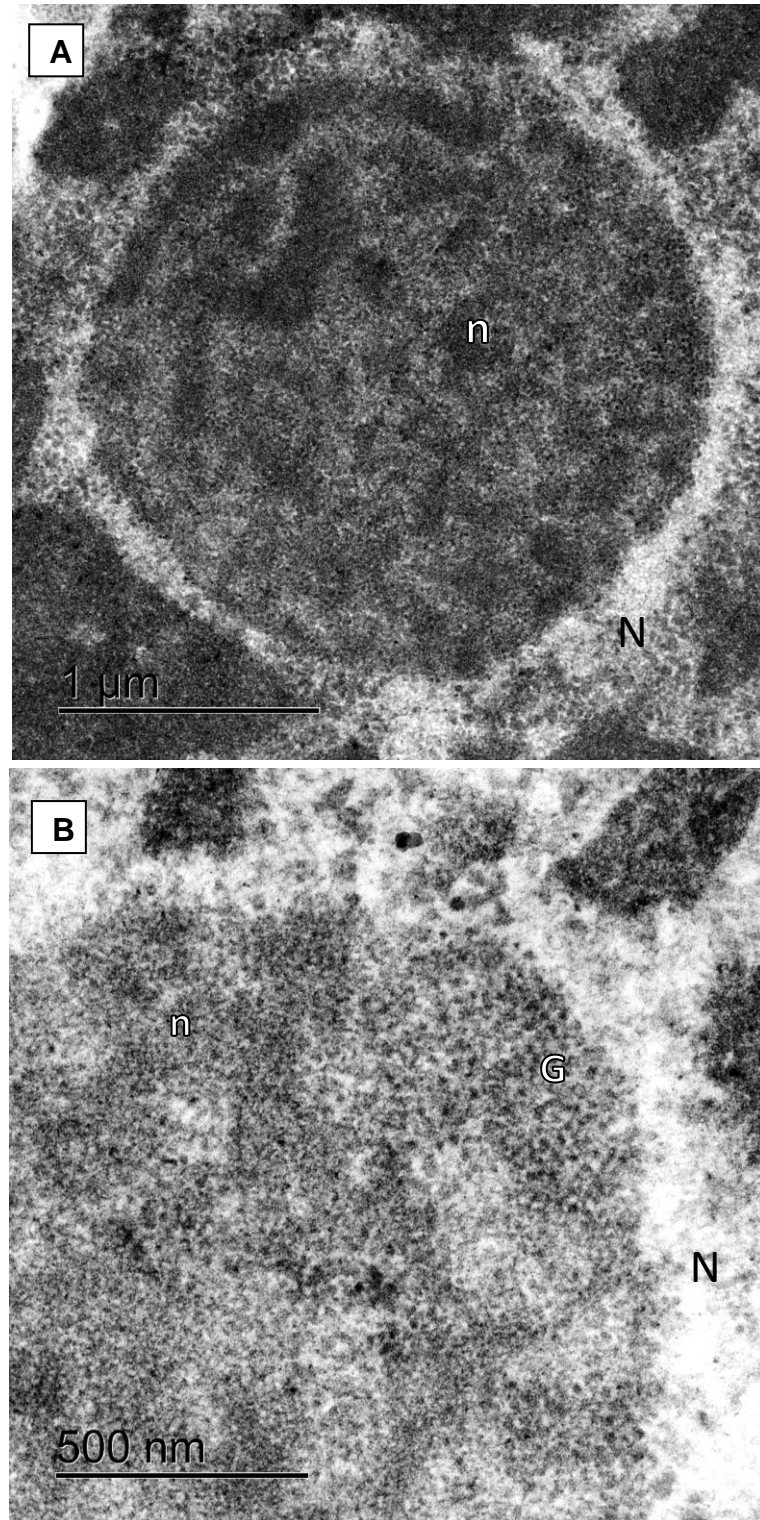


Figura 16. Micrografía electrónica de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente granular (G).

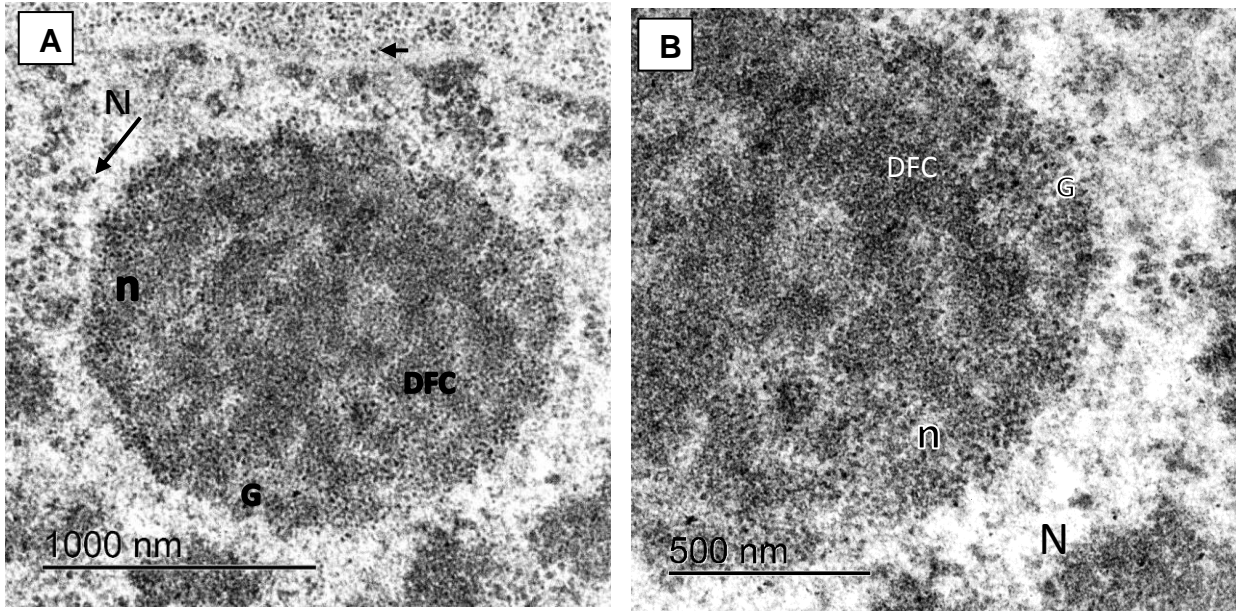


Figura 17. Micrografía electrónica de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (G), ----> gránulo de *Lacandonia*.

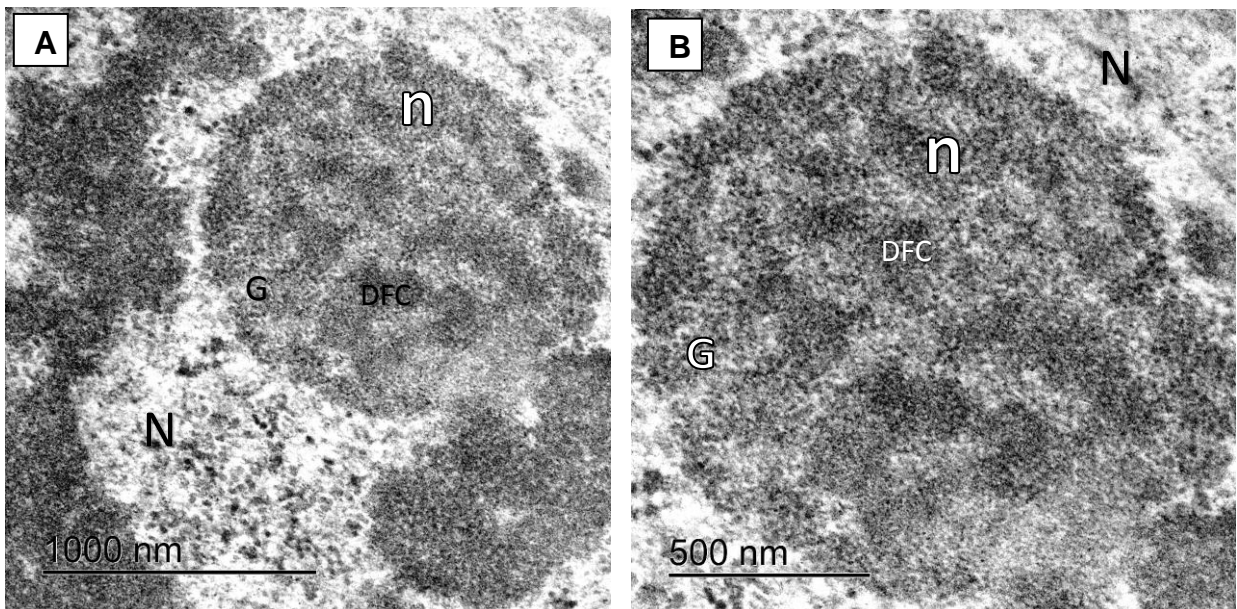


Figura 18. Micrografía electrónica de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (G).

Como se muestra en la figura 19, también pudimos observar en algunos nucléolos un intersticio nucleolar.

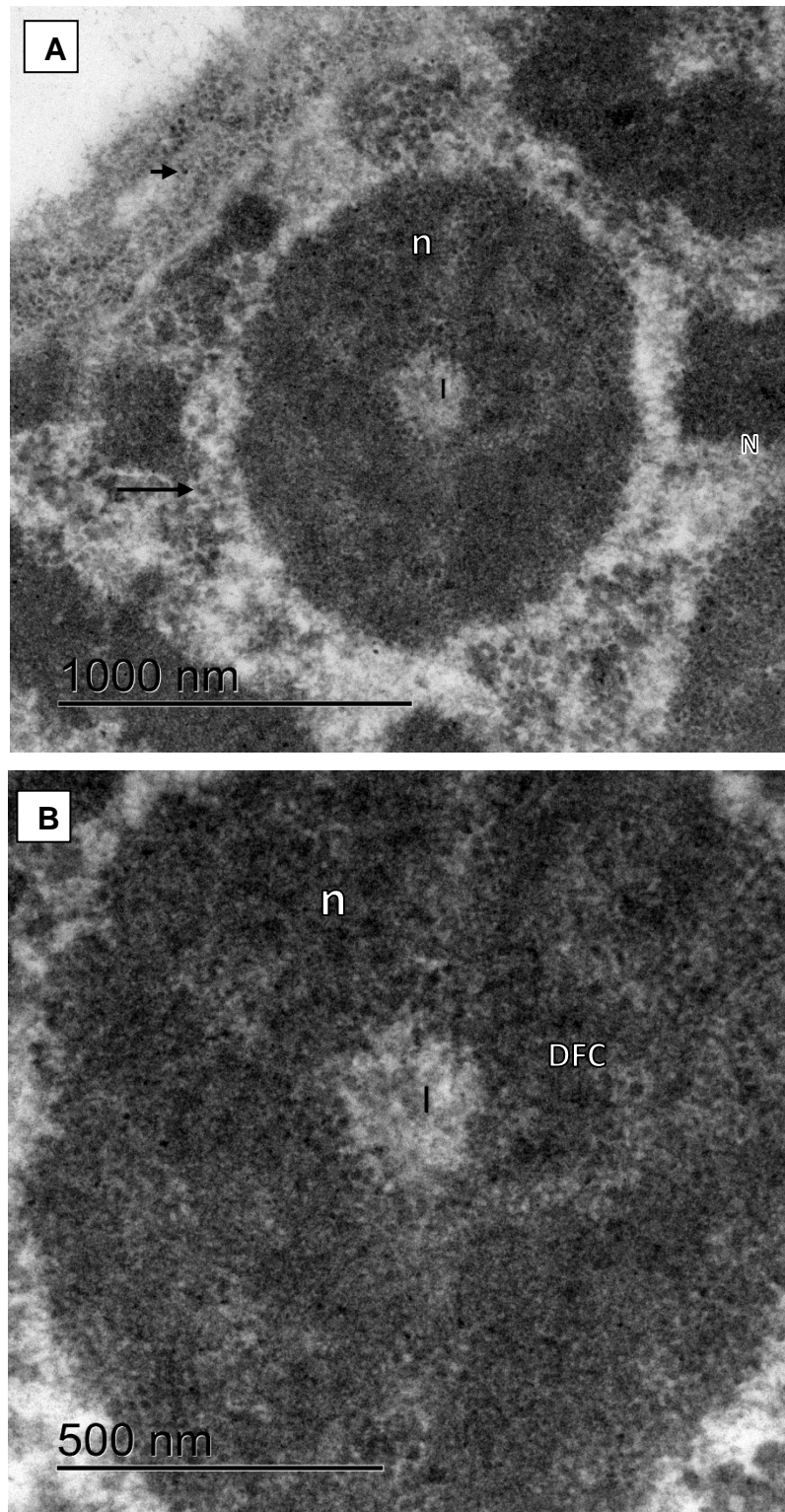


Figura 19. Micrografía electrónica de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente fibrilar denso (DFC) e intersticio nucleolar (I).

Finalmente, en la micrografía de la figura 20 podemos apreciar la región del organizador nucleolar alrededor del nucléolo, así como un gran cúmulo de cromatina compacta en el centro del nucléolo, además se aprecia con mucha claridad el componente granular.

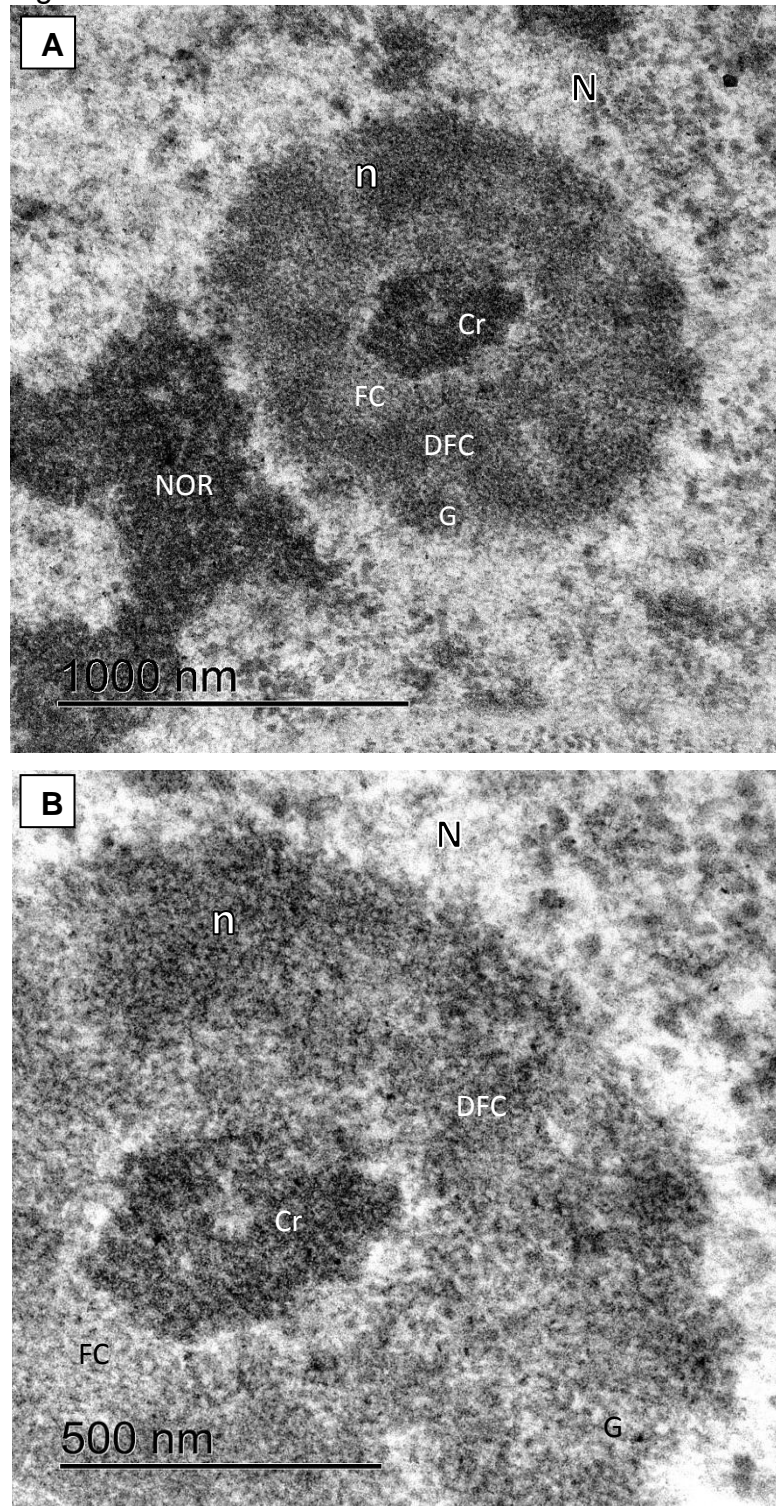


Figura 20. Micrografía electrónica de un nucléolo de *G. biloba*. Núcleo (N), nucléolo (n), componente fibrilar denso (DFC), componente granular (G), centro fibrilar (F), cromatina compacta (Cr), región del organizador nucleolar (NOR).

Las imágenes obtenidas mostraron que los núcleos observados de *Ginkgo biloba* son reticulados, esto concuerda con lo reportado previamente (Jimenez et al., 2002).

A partir de las imágenes obtenidas, se calculó el área de cada nucléolo y su proporción en el área total del núcleo en cada imagen, mostrando que los nucléolos ocupan en promedio el  $6.6\% \pm 5.2$  del área ocupada por el núcleo, si extrapolamos estos resultados a volumen, obtenemos que aproximadamente el 2.2% del volumen del núcleo corresponde al nucléolo, esta baja proporción explica por qué se encontraron varios núcleos en los que no logramos identificar al nucléolo (fig. 10).

Los resultados muestran que se realizó un adecuado manejo y procesamiento del material biológico desde la fijación hasta la observación en el TEM, como se detalla a continuación:

La buena fijación con glutaraldehído y paraformaldehído se puede apreciar ya que se pueden distinguir claramente los diferentes compartimentos celulares, sin espacios translucidos, y las mitocondrias se observan completas, sin porciones vacías ni fragmentadas.

El tetraóxido de osmio no logró contrastar el material, aunque no precipitó; las imágenes obtenidas por TEM no mostraron contrastadas a las membranas biológicas.

El material fijado tuvo una total deshidratación, por lo que no se encontró encogimiento del tejido en las observaciones al TEM.

La inclusión en resina también fue adecuada, lo que permitió obtener bloques con la consistencia necesaria para obtener buenos cortes ultrafinos.

El correcto manejo del ultramicrotomo se refleja en que las imágenes obtenidas no presentaron mellas ni vibraciones.

Por último, las imágenes obtenidas en el TEM no presentaron precipitados de uranio ni de plomo, lo que nos muestra que el procedimiento de contraste también se realizó correctamente.

## 7. Conclusiones

Se logró procesar adecuadamente las muestras foliares de *G. biloba* para su observación en TEM, a partir de estas se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm, se contrastaron y se analizaron en el microscopio electrónico de transmisión.

Los resultados muestran una buena preservación y observación de las células, organelos, núcleos y en particular nucléolos. Además, las imágenes no presentan mellas, ni grandes vibraciones, ni precipitados de los contrastantes. Esto nos indica que el material fue procesado y manipulado correctamente.

En los cortes analizados observamos células heterogéneas, de aproximadamente 20 micras de diámetro, donde pudimos identificar diversos componentes subcelulares tales como el núcleo, el nucléolo, mitocondrias, cloroplastos, vacuolas y vesículas con taninos.

Cada célula tiene un núcleo central, grande y reticulado, de un tamaño aproximado de 5 micras de diámetro y con abundantes gránulos de *Lacandonia*.

Se confirmó que el núcleo de *Ginkgo biloba* es reticulado como se ha reportado para esta y otras plantas (Jimenez et al., 2002).

El nucléolo es central, redondo y reticulado, con un diámetro de 1 a 2 micras, y ocupa aproximadamente 2.2% del volumen del núcleo. Además, en varios nucléolos se encontraron intersticios nucleolares. En la mayoría de los núcleos se observaron uno o dos nucléolos.

En la composición del nucléolo se logró identificar el componente fibrilar denso, los centros fibrilares y el componente granular. Es decir, son nucléolos tripartitas ya que contienen los tres componentes.

En la mayoría de los nucléolos observados, el componente dominante fue el fibrilar denso.

Los centros fibrilares son prominentes y heterogéneos, es decir con cúmulos electrodensos de cromatina compacta.

## 8. Perspectivas

Las imágenes obtenidas en este estudio se pueden analizar mediante técnicas informáticas para determinar de manera cuantitativa la fracción de cada componente nucleolar.

Las conclusiones obtenidas en este estudio pueden complementarse y corroborarse mediante otras pruebas especializadas como: la técnica de amina de osmio para evidenciar las zonas con DNA, una tinción regresiva con EDTA para corroborar las zonas con ribonúcleoproteínas, una inmunolocalización de la RNA polimerasa I para confirmar su ubicación nucleolar y elucidar el o los componentes donde se localiza, también se podría realizar una autorradiografía con bromouridina para demostrar dónde se están transcribiendo los genes ribosomales, y hacia donde migran en diferentes tiempos, para determinar la función de las diferentes regiones nucleolares.

Finalmente, sería muy interesante obtener cortes ultrafinos seriados que nos permitan elaborar una reconstrucción tridimensional de un nucléolo de *G. biloba*.

## 9. Referencias

1. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts y Walter. (2008). Molecular biology of the cell. 5<sup>th</sup> ed.
2. Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A. y Lamond, A. I. (2009). NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. Nucleic acids research, 37(Database issue), D181–D184. doi:10.1093/nar/gkn804.
3. Arenas-Guzman R. (2008). Micología Médica Ilustrada. Mc Graw Hill. 3<sup>a</sup> ed. pp 355.
4. Brown, J. W., Shaw, P. J., Shaw, P., & Marshall, D. F. (2005). *Arabidopsis* nucleolar protein database (AtNoPDB). Nucleic acids research, 33(Database issue), D633–D636. doi:10.1093/nar/gki052.
5. Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L y Campos I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. Nat Cell Biol. E, 107-112.
6. Forest F, Moat J, Baloch E, Brummitt E, Bchman S, Ickert-bond S, Hollingsworth P, Liston A, Little D, Mahews S, Rai H, Rydin C, Stevenson D, Thomas P y Buerki S (2018). Gymnosperms on the EDGE. Scientific Reports 8:6053.
7. Iarovaia OV, Minina EP, Sheval EV, et al. (2019). Nucleolus: A Central Hub for Nuclear Functions. Trends Cell Biol. 29(8):647-659. doi:10.1016/j.tcb.2019.04.003
8. Jiménez-Ramírez J, Agredano-Moreno LT, Segura-Valdez ML, Jiménez-García LF. (2002). *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei Biol Cell. 94(7-8):511-8.
9. Jiménez LF, Merchant H. (2003). Biología Celular y Molecular. 1<sup>a</sup> ed. Prentice Hall. pp 380-381.
10. Jiménez-García LF, Lara-Martínez R, Garza-Melchor RE, et al. (2017). The nucleolus of *Giardia lamblia*. MOJ Anat Physiol. 3(2):41–43. DOI: 10.15406/mojap.2017.03.00083
11. Lam YW, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. (2005). The nucleolus. J Cell Sci. 1;118(Pt 7):1335-7.
12. Missouri botanical garden Homepage. Consultado el 30 de enero de 2020. <https://www.missouribotanicalgarden.org>



13. Olson, M. O., Hingorani, K. and Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219, 199-266.
14. Raska I. (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Review. Trends Cell Biol.* Oct;13(10):517-25.
15. Risueño MC, Medina FJ y Moreno Díaz de la Espina S. (1982). Nucleolar fibrillary centers in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Set.* 58, 313-329.
16. Sáez-Vásquez, F.J. y Medina, F.J. (2008). *The plant nucleolus.* Elsevier. *Adv. Bot. Res.* 47.
17. Segura-Valdez ML. (1996). *Disección Molecular del Nucléolo in situ. Visualización de Acidos Nucleicos Nucleolares por Hibridación in situ Fluorescente y Ultraestructural.* Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
18. Segura-Valdez ML, Pineda-Vázquez D, Mendoza-von der Borch AP y Jiménez-García LF. (2020). Nucleolar Structure by Atomic Force Microscopy. *Microsc. Microanal.* 26 (Suppl 1), 131-132. doi:10.1017/S1431927620000872
19. Shaw PJ y Jordan EG. (1995). The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93–121.
20. Thiry, M., and Lafontaine, D. L. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15 (4), 194–199. doi: 10.1016/j.tcb.2005.02.007
21. Villegas-Mercado CE, Agredano-Moreno LT, Bermúdez M, Segura-Valdez ML, Arzate H, Del Toro-Rangel EF, Jiménez-García LF. (2018). Cementum protein 1 transfection does not lead to ultrastructural changes in nucleolar organization of human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 53(4):636-642.