



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Análisis ultraestructural de los gránulos intercromatinianos en núcleos de  
hepatocitos de la lagartija *Sceloporus torquatus*

**Trabajo de Investigación**

Que para obtener el grado de:

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

**Biól. Sarai de Jesús Cruz Gómez**

**Tutora principal: Dra. María de Lourdes Segura Valdez**

Ciudad Universitaria, CDMX. 2024



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.

*A la memoria del Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin.*

*A Gabriel mi mejor equipo, a Hagen y Jime  
los amo un montón.*

## GRACIAS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la formación que me han dado.*

*A la infraestructura del laboratorio de Nanobiología Celular, del departamento de Biología Celular, donde se realizó este trabajo.*

*A la Dra. María de Lourdes Segura Valdez por su dirección durante el desarrollo de este proyecto. Porque su guía académica me ayuda a tener focus, porque se pone contenta cuando de mis manos salen bien las cosas, porque confía en mí, porque me motiva y de manera amorosa también espera buenos resultados.*

*A la Biól. Jeniffer Acosta Cárdenas por su interés en los reptiles, por compartirme su conocimiento de manera desinteresada, porque cada día me ha permitido aprender junto a ella de su perseverancia, tenacidad, organización y sus planes de la a hasta la z si fuera necesario.*

*Al Dr. Luis Felipe Jiménez García coordinador del programa de especialización, porque sus enseñanzas, revisiones y comentarios académicos me han servido siempre para mejorar.*

*A la M. en C. Paola Martínez Amador, porque siendo una estudiante muy brillante y al ser mi compañera, me motivaba a mantener el ritmo durante nuestras clases.*

*A mis maestras de la especialización por compartirme sus conocimientos durante las clases teóricas y prácticas Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, Dra. María Luisa Escobar Sánchez, M. en C. Silvia Juárez Chavero y Esp. en M.E. Rosario Pintor Elizalde.*

*A la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch, al Biól. Erick Rodrigo Pérez López, al Biól. Oscar Said Quiroz Zerecero, la Biól. Karla Daniela González Ruíz y a Rosario Estefanía Labastida Negrete gracias por sus comentarios y su asesoría académica porque durante nuestras pláticas me cayeron varios veintes y se me fueron acomodando las ideas.*

*A Hagen Ponce de León Cruz por la elaboración del diagrama de flujo del procesamiento de material biológico, por el diseño editorial del presente trabajo y por el procesamiento digital de las micrografías electrónicas.*

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Nanobiología Celular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM y recibió recursos por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**DGAPA-PAPIIT IN223223**).

**INDICE**

Resumen .....	6
Introducción .....	8
Antecedentes.....	15
<i>Sceloporus torquatus</i> como modelo biológico .....	17
Técnica regresiva preferencial para ribonucleoproteínas con EDTA.....	17
Análisis tridimensional por estereopares .....	20
Objetivos.....	23
Metodología.....	24
Resultados.....	29
Conservación del material biológico.....	29
Análisis de la ultraestructura.....	29
Discusión .....	39
Conclusiones .....	41
Referencias bibliográficas .....	42

## RESUMEN

La organización ultraestructural en el núcleo celular incluye regiones de heterocromatina, eucromatina y una variedad de territorios subnucleares de naturaleza ribonucleoproteica de los cuales el nucléolo es el más conspicuo y el más estudiado. Además, también se han reportado otros territorios como las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos y los gránulos intercromatinianos que están relacionados directamente con el proceso de la expresión de genes que codifican para proteínas y que se transcriben a RNA mensajero (Spector, 1993 a). En los gránulos intercromatinianos se reclutan los elementos moleculares ribonucleoproteicos y proteicos que participan en el proceso de maduración del primer transcrito, el RNA pre-mensajero a RNA mensajero (Spector, 1993 b). Proceso de gran importancia biológica en el control de la expresión de los genes, ampliamente estudiado en células y tejidos de mamíferos (Vázquez Nin *et al*, 2003).

En el presente trabajo se muestran micrografías electrónicas como evidencia de la presencia de los gránulos intercromatinianos en núcleos interfásicos de hepatocitos del reptil *Sceloporus torquatus*, una lagartija vivípara. El análisis ultraestructural se realizó con muestras procesadas con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión (MET) (Vázquez-Nin y Echeverría-Martínez, 2000) y con muestras tratadas con la técnica regresiva preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969). Se incluye también el análisis tridimensional de micrografías electrónicas, capturadas en pares estereoscópicos, procesadas digitalmente para generar anaglifos.

En los núcleos en interfase de los hepatocitos de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus* se encontraron cúmulos de estructura fibrogranular formados por gránulos de 20

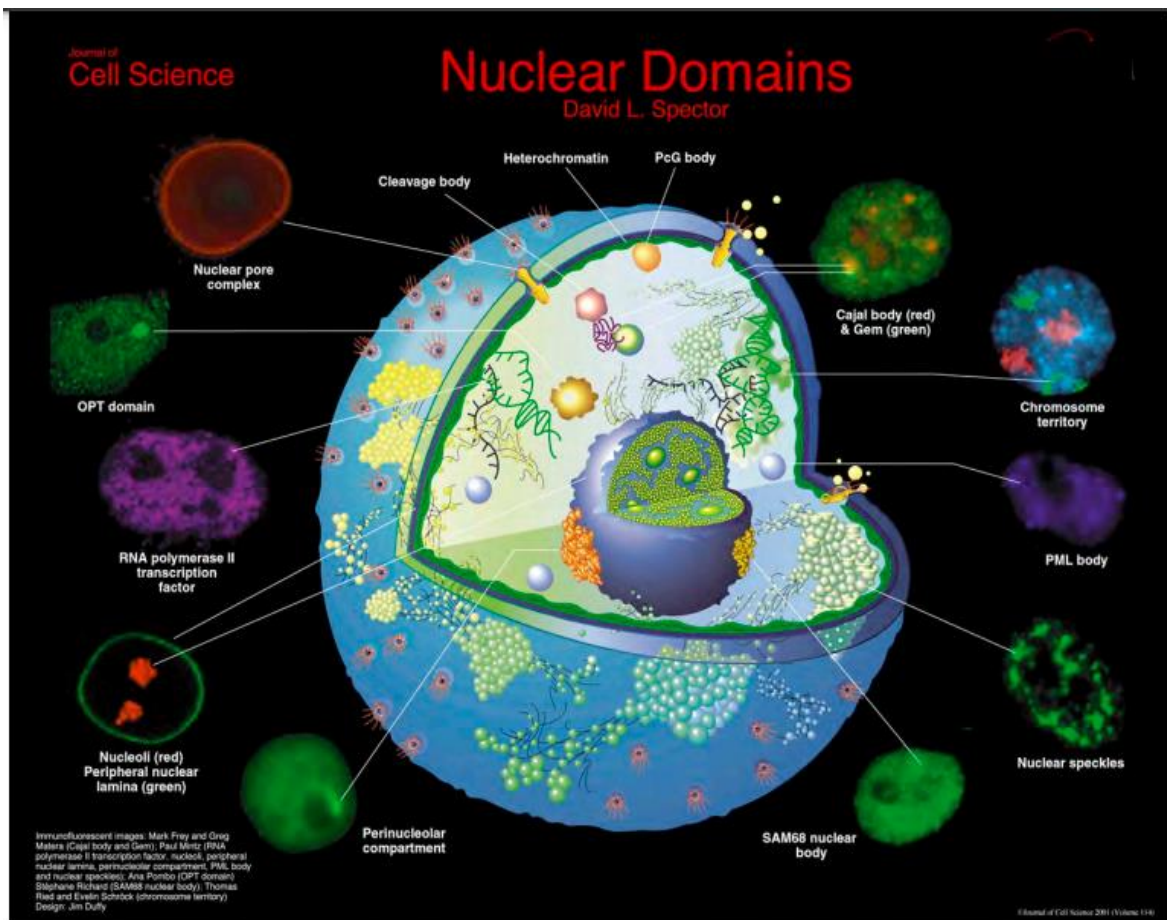
de diámetro interconectados con fibras de 9 nm de grosor ubicadas en el espacio intercromatiniano; partículas que corresponden a la definición de los cúmulos de gránulos intercromatinianos. (Monneron y Bernhard, 1969).

Los resultados de este análisis muestran que la arquitectura ultraestructural de los gránulos es similar a la reportada en mamíferos (Puvion y Bernhard, 1975); lo que sugiere que, en los reptiles, la arquitectura molecular de los procesos de control de la expresión de los genes es similar a lo descrito para núcleos de células en cultivo y células de tejidos de mamíferos.



## INTRODUCCION

El núcleo celular es una estructura altamente organizada que contiene la mayor parte del material genético de las células y desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Dentro del núcleo, existen diferentes compartimentos o dominios nucleares (figura 1) que se han identificado y caracterizado por su composición y función específica (Spector, 2001).

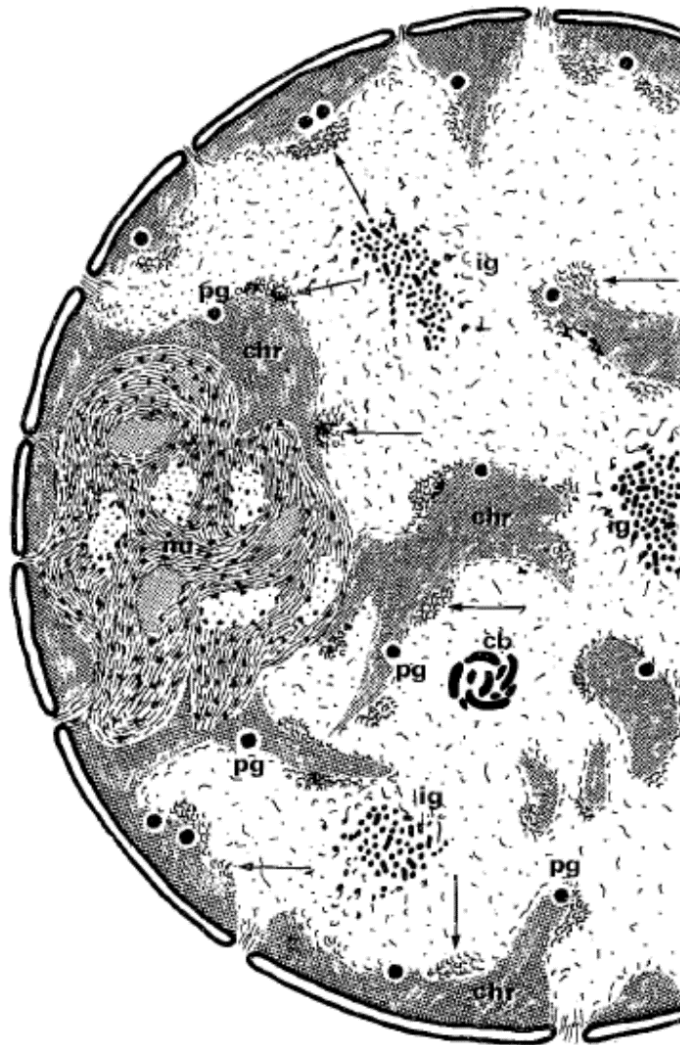


**Fig. 1. Dominios nucleares.** Imágenes de inmunofluorescencia mostrando los diferentes dominios nucleares observados por diversos investigadores: Merk Frey and Greg Matera (Cuerpos de Cajal); Paul Mintz (RNAPol II, nucléolo, lámina perinuclear, compartimento perinucleolar, patrón moteado); Ana Pombo (dominio OPT); Stéphane Richard (cuerpo nuclear SAM68); Thomas Ried and Evelin Schock (territorio cromosómico) Diseño: Jim Duffy (Tomado de Spector, 2001).

Las principales funciones del núcleo celular, incluida la transcripción, el proceso de maduración del pre-*m*RNA y el ensamblaje de los ribosomas, se han estudiado ampliamente mediante métodos bioquímicos, genéticos y moleculares. Se dispone de una gran cantidad de información sobre sus mecanismos moleculares. Sin embargo, se sabe menos acerca de cómo estos procesos se integran en el marco ultraestructural del núcleo celular, cómo se coordinan espacial y temporalmente dentro de los confines tridimensionales del núcleo. Para comprender cómo se organizan los genomas y cómo funcionan, se deben descubrir los principios básicos que rigen la arquitectura y la función nuclear (Spector, 1993 a. Spector 2001. Spector y Lamond, 2011).

Gracias a los avances tecnológicos como la aplicación del microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) en las ciencias biológicas y la implementación de técnicas histoquímicas, se ha logrado obtener gran detalle en la descripción ultraestructural del núcleo celular y relacionarlo con las funciones subcelulares. Se han desarrollado diversas estrategias metodológicas para el procesamiento del espécimen biológico; para la conservación de la ultraestructura con diversas sustancias (Sabatini, 1963), el contraste mediante el uso de metales pesados, el desarrollo de medios de inclusión para lograr cortes suficientemente delgados (Sjöstrand, 1967). A la par, el desarrollo del área de la histoquímica ha permitido avances descriptivos para estudios comparativos de tejidos e incluso entre organismos haciendo uso de compuestos químicos y su afinidad molecular por los componentes celulares (Lazarus, 1964). Con el uso de la citoquímica se reconoció un nexo entre la morfología y la bioquímica como una valiosa herramienta útil en estudios con propósitos descriptivos (Moyné, 1980). A la fecha, existen una gran diversidad de métodos y técnicas de contraste general, selectivo e incluso para detectar *in situ*, moléculas específicas. La microscopía electrónica de transmisión se ha transformado en el complemento obligado de corroboración de múltiples hallazgos obtenidos con otros métodos como los bioquímicos y los de la biología molecular. Se han

abierto los caminos a la comprensión de las funciones y la composición molecular de cada parte de la célula y de los fenómenos vitales en su conjunto. (Vázquez-Nin y Echeverría-Martínez, 2000).



**Fig. 2.** Esquema de la ultraestructura nuclear de un hepatocito, con el que Monneron y Bernhard describe la presencia de ribonucleoproteínas con su técnica regresiva preferencial con EDTA, que permite un fuerte contraste de estas estructuras y un “blanqueamiento” preferencial que se logra por la acción quelante del EDTA. Distribución de componentes estructurales; Cromatina (Chr), nucléolo (Nu), Gránulos intercromatinianos (Ig), Gránulos pericromatinianos, Fibras pericromatinianas (flechas), Cuerpo espiralado (Cb). (Tomado de Monneron y Bernhard, 1969).

En 1969, Monneron y Bernhard, desarrollaron un nuevo método ultraestructural de contraste regresivo preferencial para ribonucleoproteínas con el que se evidencian dos clases de estructuras nucleares ya conocidas: los gránulos intercromatinianos y los pericromatinianos, así como dos entidades morfológicas adicionales: fibras

pericromatinianas y cuerpos espiralados (figura 2). Para entonces ya existía evidencia directa e indirecta de que todas estas estructuras son transportadoras de RNA y del paso del material nuclear a través de los poros de la envoltura nuclear. De la misma forma, Monneron y Bernhard demostraron que, al acercarse a estos poros, los componentes granulares se transforman en finas fibrillas antes de salir del núcleo y que la heterogeneidad bioquímica de los RNAs nucleares podría tener su expresión correspondiente en el polimorfismo ultraestructural de estas partículas, cuyo papel fisiológico era poco claro.

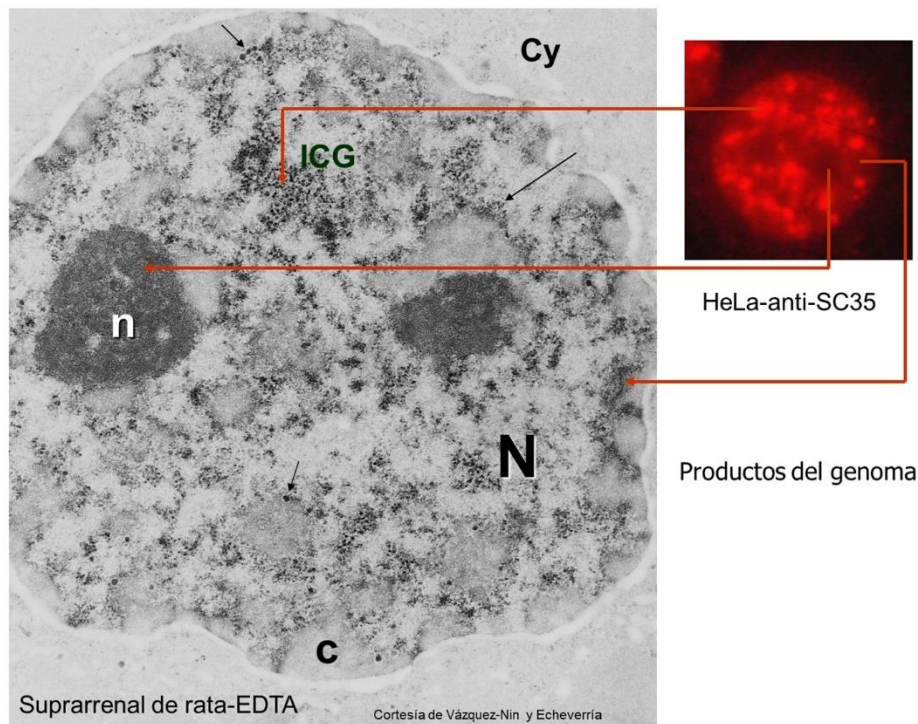
Refiriéndonos a los gránulos intercromatinianos, su primera descripción ultraestructural fue en 1959 por Hewson Swift quien empleando citoquímica ultraestructural los vio como *nubes* dispersas de partículas, presentes en las áreas de intercromatina que aparecen como partículas irregulares y finamente granulares en estructura. Swift propuso sus dimensiones, siendo su diámetro alrededor de 20 a 30 nm, mismas que incluso han sido corroboradas, con microscopía de fuerza atómica, (Zamora-Cura, 2014).

Otros avances metodológicos combinando la MET con técnicas bioquímicas permitieron el esclarecimiento de la función de los ICG. En particular, el uso de la autoradiografía que fue un avance metodológico fundamental. Con ella se demostró que los gránulos intercromatinianos incorporan pequeñas cantidades de uridina tritiada después de pulsos largos, mientras que, después de pulsos cortos, no se detecta incorporación, lo cual sugiere que no contiene RNA recién sintetizado (Fakan y Bernhard, 1971). En 1983, Spector y colaboradores proponen que los ICG tienen un papel estructural activo en el funcionamiento del núcleo, al demostrar que los ICG están asociados a RNAs de tamaño pequeño ricos en uridina (UsnRNA).

También por autoradiografía ultraestructural en 1984, el grupo de Puvion estudió la dinámica de los ICG en hepatocitos aislados de rata, pretratados con actinomicina D; notaron que al inhibir la transcripción se afecta la formación de gránulos intercromatinianos



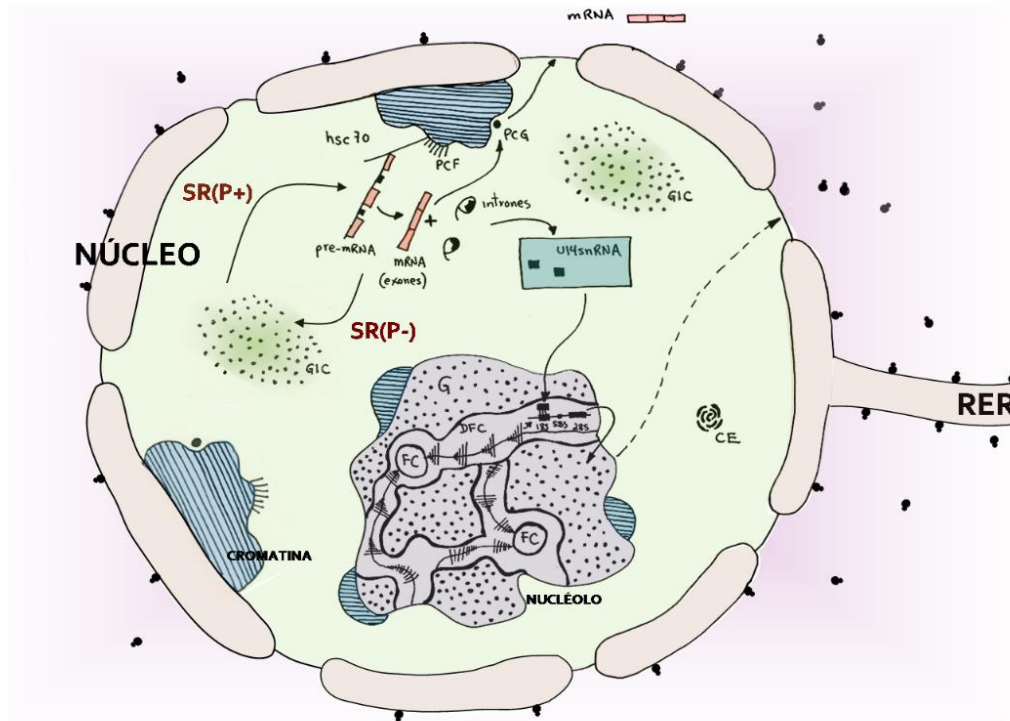
y, por ende, la regulación global de la expresión génica en la célula. En ese mismo año, aplicando inmunolocalización ultraestructural de UsnRNPs con oro coloidal, Fakan y sus colaboradores muestran que los cúmulos de ICG contienen estas moléculas asociadas a RNA recién sintetizado. (Fakan *et al*, 1984). En 1991, Spector y colaboradores proporcionan evidencia directa mediante inmunolocalización con microscopía confocal y microscopía electrónica la localización de la proteína SC-35, que es un factor de *splicing* esencial y demuestran que la fluorescencia corresponde a los gránulos intercromatinianos, de la misma forma que los factores UsnRNPs. Con lo que sugieren que estos dos componentes del espliceosoma se localizan en estas regiones nucleares a través de diferentes interacciones moleculares (Spector *et al*, 1991 Lamond y Spector, 2003). En la figura 3 se ilustra esta asociación entre los ICG y las *speckles*.



**Fig. 3.** Núcleo interfásico contrastado con la técnica de Bernhard para ribonucleoproteínas en la que se distinguen zonas internas son cúmulos de gránulos intercromatinianos (ICG), en tanto que la tinción difusa corresponde a la imagen de material fibroso de la micrografía electrónica (flecha grande); es decir, las fibras pericromatinianas (ICG) y su correlación morfológica con el arreglo de un patrón moteado de las moléculas que los integran. En particular se muestra la inmunolocalización fluorescente con la proteína SC35.

De esta forma se evidencia la presencia de factores de *splicing* en los ICG con varios estudios, entre ellos con hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Así demostraron que existe una conexión directa entre transcritos de RNA nacientes específicos y las *speckles* implicando su función en el *splicing* y regulación del transporte hacia el núcleo. (Huang y Spector 1991).

La dinámica de los ICG en función de la actividad de *splicing* en la célula se demostró al usar el adenovirus 2 como sistema modelo para estudiar la relación espacial y temporal de la transcripción y procesamiento de pre-*mRNA* en el núcleo de células de mamíferos. En ese trabajo, examinaron la localización de secuencias de RNA viral a lo largo del proceso de infección y compararon la distribución de varios factores de la célula huésped involucrados en la transcripción, *splicing* de pre-*mRNA* y en el empaquetamiento de transcritos de RNA (Jiménez-García y Spector, 1993. Busch, 2012).



**Fig. 4.** Esquema del núcleo interfásico en el que se describe gráficamente el flujo de procesos de expresión génica y la participación de las estructuras ribonucleoproteicas presentes en el nucleoplasma. (Tomado de Jiménez y Segura, 2010).

Se han hecho estudios ultraestructurales de la dinámica y abundancia de los ICG durante el ciclo celular, uno de ellos fue utilizando la tinción de plata amoniaca y anticuerpos contra snRNPs (Goodpasture y Bloom, 1975. Jiménez-García, 1989 a). En estos ensayos notaron que los ICG se dispersan en las células en división y que son más abundantes durante la interfase (Thiry, 1995). De acuerdo con lo anterior, los cúmulos de gránulos intercromatinianos no parecían sufrir ningún cambio ultraestructural bajo diversos estados fisiológicos, ya sea en términos de número, aspecto o localización.

Por otro lado, la proteómica confirma la presencia de factores de *splicing* entre ellos la proteína SR inmunofluorescente y observación de motas. Mintz y colaboradores (1999) realizaron procedimientos de aislamiento y lograron purificar al menos 75 proteínas diferentes. Posteriormente, Saitoh en 2004, realizó un análisis proteómico, con espectrometría de masas y estudios sobre la bioquímica de cúmulos de gránulos intercromatinianos, logrando caracterizar 146 proteínas entre las que estaban muchas de las ya descritas como parte de los cúmulos de ICG.

## ANTECEDENTES

Trabajos recientes que combinan métodos de biología celular, bioquímicos y moleculares, han dado luz sobre cómo funciona el núcleo y cómo se expresan los genes *in vivo*. Se han descrito los principales compartimentos estructurales del núcleo celular y discutido sus funciones establecidas y propuestas. Se han hecho observaciones sobre las propiedades dinámicas de la cromatina, el *mRNA* y las proteínas nucleares, se sabe que existen implicaciones de esos hallazgos en la organización de los procesos nucleares y la expresión génica. Se ha especulado que la autoorganización podría desempeñar un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la organización nuclear (Carmo-Fonseca, 2002).

Como ya se describió con mayor detalle, dentro del núcleo celular, las macromoléculas involucradas en los procesos de producción, transporte, regulación y coordinación de la síntesis de RNA mensajero se encuentran en dominios reconocibles (Spector, 2001). El mapeo de estas moléculas se realiza utilizando anticuerpos o sondas que reconocen los factores de *splicing*. Con inmunolocalización fluorescente, el arreglo y distribución de estos factores en el núcleo, es en forma de un patrón moteado o *speckles* descrito para mamíferos, en células en cultivo (Spector y Lamond, 2011) y tejidos (George-Tellez, 2002).

Las motas nucleares o *speckles* están compuestas por los factores de *splicing* ribonucleoproteicos (snRNPs) y no ribonucleoproteicos (no-snRNPs). A nivel celular, la morfología de las motas y su distribución es dependiente de la actividad transcripcional y de *splicing* de la célula (Ilik, 2021). El inmunomarcaje fluorescente de estas proteínas SR resulta en zonas de intensa marca que corresponde a las motas (*speckles*) embebidas en



un ambiente de tinción homogénea y difusa (patrón difuso) (Segura-Valdez, 2007). Ultraestructuralmente en el nucleoplasma, se encuentran además del nucléolo, otras partículas ribonucleoproteicas cuyas dimensiones están en el orden de los nanómetros. Estos complejos se dividen en fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos, cuerpos espiralados (figura 3), cuerpos nucleares y las polipartículas (Vázquez Nin *et al*, 2003). Las proteínas SR y otros factores de *splicing*, snRNPs y no snRNPs, organizados en el nucleoplasma en forma de motas, corresponden a los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Segura-Valdez *et al*, 2020).

Los gránulos intercromatinianos (ICG) funcionan como reservorios y sitios de recambio entre los componentes del spliceosoma (Puvion, 1996) y las fibras pericromatinianas (Cmarko, 1999). Las motas han sido caracterizadas previamente mediante el uso de diversas técnicas de microscopía y moleculares, en líneas celulares en cultivo y en células en tejidos de mamíferos (Acosta-Cárdenas, 2022). Su presencia en células en tejidos de vertebrados no mamíferos fue sugerida mediante inmunolocalización fluorescente (Segura-Valdez, 2007); sin embargo, en estos organismos no se ha llevado a cabo su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Jiménez-García en 1989b propuso que las variaciones en las partículas ribonucleoproteicas (RNPs) pueden estar relacionadas con la evolución inicial del procesamiento postranscripcional. Sugirió que en los antepasados de las plantas verdes los cambios principales en la estructura del patrón nuclear ocurrieron antes de la adquisición de los plastos y que una vez que se desarrolló, se conserva. También sugirió que, a lo largo del proceso evolutivo, los cambios a nivel de la estructura nuclear son mínimos. Por lo tanto, que haya más similitudes que diferencias en la estructura básica, refuerza la existencia de un ancestro común.

Sin embargo, aunque hay evidencias generales de la conservación de algunos procesos celulares basados en el análisis ultraestructural, aún es necesaria la evidencia de esta conservación así como la variabilidad que puede existir en una nanoestructura en diferentes grupos.

### ***Sceloporus torquatus* como modelo biológico**

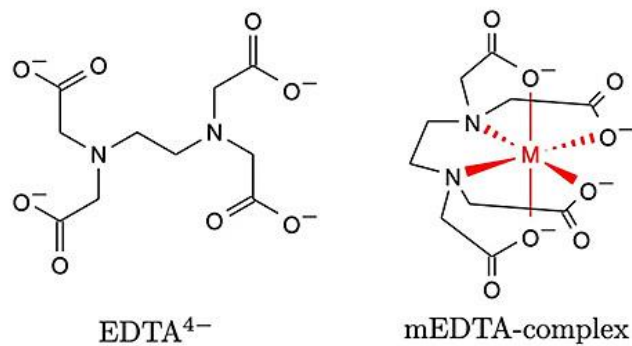
La lagartija *Sceloporus torquatus* es una especie de lagartija perteneciente a la familia Phrynosomatidae, del género *Sceloporus* que incluye varias especies de lagartijas. Esta especie en particular se caracteriza por tener un collar negro o azul oscuro, patrones de coloración dorsal variable y escamas dorsales con quillas. Se distribuye en varias regiones de América Central y del Norte, incluyendo México (Flores-Villela, 2009).

Su tipo de reproducción es vivípara, la temporada de reproducción suele ocurrir en la primavera y el verano, cuando las condiciones ambientales son favorables. El nacimiento de las crías vivas generalmente ocurre en el verano o principios del otoño, dependiendo de la ubicación geográfica y las condiciones climáticas (Blackburn, 1994). En este trabajo utilizamos a la lagartija *S. torquatus* como modelo biológico que, por su forma de reproducción vivípara, los resultados que se lograran, pudieran ser comparados con los ya publicados para mamíferos, en particular en ratas (George-Tellez, 2002).

### **Técnica regresiva preferencial para ribonucleoproteínas con EDTA**

Los trabajos previos que han demostrado la ultraestructura de los ICG y su dinámica asociada a los procesos de transcripción y procesamiento del RNA mensajero, involucran esta técnica para evidenciar la localización y organización ultraestructural de las ribonucleoproteínas, entre las que se encuentran los gránulos intercromatinianos (Jiménez-García *et al*, 1989 *b*).

El EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) tiene una alta afinidad para formar complejos con iones metálicos en solución. Estos complejos son estables y solubles en agua, y pueden aislar a los metales de otras reacciones químicas. Debido a su capacidad para donar electrones y formar enlaces coordinativos múltiples. Su funcionamiento como quelante se basa en su estructura molecular, que presenta grupos amino y ácido carboxílico. Cuando el EDTA se encuentra en presencia de iones metálicos, los grupos carboxílicos y amino se coordinan con los iones, formando complejos solubles en agua (Eckert, 2002).



**Fig. 5.** Estructura química del EDTA (izquierda) en su forma iónica no acomplexada, (derecha) EDTA formando enlaces complejo con un metal (Eckert, 2002).

En 1968 Bernhard, desarrolló un método de contraste para cortes ultrafinos, en el que se emplea EDTA, que ofrece un contraste preferencial para ciertas estructuras celulares, las ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969). Con esa técnica, los componentes celulares conocidos por contener ribonucleoproteínas se resaltan fuertemente. Mientras que todas las desoxinucleoproteínas pierden su contraste, pero no se extraen. En comparación con las imágenes clásicas, facilita la individualización de sus componentes y permite describir la distribución y la estructura fina de varios componentes de la célula que contienen RNPs. Particularmente fue útil para la exploración del núcleo en interfase.

Se utiliza en los cortes de tejido colocados en rejillas para microscopía electrónica de transmisión (MET) como parte del proceso de preparación de muestras para aclarar la

cromatina y resaltar las ribonucleoproteínas. La formación de los complejos quelados con EDTA es reversible y depende del pH y de la concentración de los iones metálicos y del quelante. Por lo tanto, el pH del medio influye en la eficacia del EDTA como quelante, ya que determina la carga de los iones metálicos y del EDTA, afectando su capacidad de unión.

Después de un pequeño contraste con acetato de uranilo, los cortes ultrafinos se flotan durante diferentes períodos de tiempo en una solución de EDTA (0.2 M). Después de este tratamiento, el poscontraste con citrato de plomo revela un contraste pesado en estructuras celulares conocidas por contener RNA, mientras que las nucleoproteínas de desoxirribosa han perdido la mayoría o todo el contraste. Esta práctica tiene el carácter de una tinción regresiva, donde los agentes quelantes desempeñan el papel de diferenciador (Spector, Goldman y Leinwand, 1998).

La densidad electrónica de la cromatina disminuye al eliminar los iones metálicos asociados con las ribonucleoproteínas, lo que permite una mejor penetración de los electrones y mejora su contraste en la imagen. El tiempo de exposición y la concentración de EDTA deben ser optimizados para lograr el aclaramiento adecuado de la cromatina y el contraste adecuado en las ribonucleoproteínas. Por lo tanto, es necesario realizar pruebas y ajustes experimentales para determinar la concentración y el tiempo de exposición adecuado al utilizar EDTA en la preparación de muestras para la MET.

### **Análisis de la ultraestructura**

La dinámica de los componentes nucleares y nucleolares se ha venido estudiando durante más de cinco décadas en los laboratorios de Microscopía Electrónica y de Nanobiología Celular, en la Facultad de Ciencias de la UNAM, trabajando con diferentes modelos. A diferencia de los extensamente estudiados mecanismos moleculares y bioquímicos; el enfoque ultraestructural es una manera muy contundente de abordar los

procesos de control de la expresión de los genes, a través de la evaluación morfológica de la expresión génica.

Dadas las posibilidades de resolución de la microscopía electrónica de transmisión, esta puede ser aplicada para estudiar estructuras nanométricas. Este trabajo contribuye a ampliar el esquema ultraestructural que se tiene con respecto a la organización del núcleo interfásico en reptiles, a la comprensión de la dinámica de los componentes ultraestructurales de ribonucleoproteínas (RNPs) en este grupo taxonómico, especialmente de los gránulos intercromatinianos las cuales no se habían abordado hasta el momento.

### **Análisis tridimensional por estereopares**

En la actualidad, el análisis de la organización tridimensional de la cromatina aporta importante información sobre la interacción espacial y temporal entre las moléculas que participan en los diferentes procesos de expresión de los genes (Rasim Barutcu *et al*, 2017). El efecto estereoscópico se basa en el principio de la visión estereoscópica humana. Nuestro cerebro combina las imágenes que recibe de cada ojo y calcula la diferencia de paralaje entre ellas para percibir la profundidad y la distancia. Las imágenes estereoscópicas aprovechan este proceso natural al proporcionar dos perspectivas diferentes, permitiendo que nuestro cerebro realice la fusión de imágenes y cree la percepción de la profundidad.

La percepción de imágenes bidimensionales por la retina se basa en el procesamiento en el cerebro de las dimensiones en los ejes X y Y (largo y ancho) de las imágenes observadas. Para la percepción de la profundidad, el cerebro recibe ciertas “claves”, el tamaño más pequeño y una coloración más oscura -el cerebro observa sombras- en los objetos que se encuentran más distantes. Sin embargo, lo más importante en la percepción de la profundidad se basa en la comparación entre las imágenes observadas por cada ojo, considerando que la distancia interpupilar es de entre 6 y 9 cm.

Las imágenes de cada ojo son ligeramente diferentes que al “cruzarse” en el cerebro, provee la percepción de profundidad (Chadler y Robertson 2009).

Las imágenes tomadas por pares estereoscópicos, son imágenes que capturan dos perspectivas ligeramente diferentes de una escena con el propósito de crear una ilusión tridimensional cuando se ven a través de un estereoscopio o un visor especial. El par estereoscópico consta de dos imágenes tomadas desde puntos de vista ligeramente diferentes, similar a la separación entre nuestros ojos. Cada imagen representa la perspectiva que tendría cada ojo si estuviera viendo la escena directamente.

La presentación de imágenes en estereopares implica el uso de ciertas herramientas y el procesamiento de las imágenes adquiridas y para su observación existen dos métodos más o menos comunes. Uno de ellos es la utilización de imágenes colocadas una junto a la otra y utilizar gafas especiales que con el ajuste a la distancia interpupilar del observador, se logra la superposición de las imágenes y la percepción de profundidad en el cerebro. El otro método, más ampliamente utilizado, se basa en la generación de anagramas superpuestos, cada uno con diferente color (Anaglifos) y que se observan con gafas especiales con un filtro azul para uno de los ojos y rojo para el otro (Chadler y Robertson 2009).

Los anaglifos son una técnica utilizada para crear imágenes en tercera dimensión (3D) mediante el uso de gafas especiales con filtros de colores. Estas imágenes se componen de dos imágenes superpuestas, una para cada ojo; que, al ser vistas a través de los filtros de las gafas, generan la ilusión de profundidad y percepción tridimensional.

Para crear un anaglifo, se deben capturar dos imágenes de la misma escena desde dos puntos de vista ligeramente separados. Las dos imágenes capturadas deben ser procesadas para resaltar las diferencias de profundidad entre ellas. Esto se logra aplicando técnicas de corrección de color y ajuste de contraste para asegurarse de que las imágenes

estén alineadas y sean visualmente coherentes. Luego, las dos imágenes separadas se combinan en una sola imagen. Este proceso resulta en una imagen anaglifo, donde los objetos más cercanos se ven en color cian y los objetos más lejanos se ven en color rojo.

Al observar las imágenes con gafas anaglíficas (azul/rojo), los filtros permiten que cada ojo vea la imagen correspondiente y se cree la ilusión de profundidad al combinar las imágenes en el cerebro. Se obtienen mejores resultados con imágenes en blanco y negro y esto hace que este método sea de mucha utilidad para el caso de la microscopía electrónica de transmisión.

## OBJETIVOS

- Determinar la presencia de cúmulos de gránulos intercromatinianos en núcleos interfásicos de hepatocitos del reptil *Sceloporus torquatus*.
- Identificar si existe relación morfológica entre los gránulos y las fibras que componen los cúmulos de gránulos intercromatinianos.



## METODOLOGÍA

Las muestras biológicas se obtuvieron del hígado de un ejemplar de hembra adulta de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus*. La colecta del organismo se llevó a cabo en la Reserva del Pedregal de San Ángel a cargo de la Universidad Nacional Autónoma de México (REPSA, UNAM) (Permiso SEMARNAT 09/K5-1005/03/22) con apego a la Norma Oficial Mexicana: NOM-059-SEMARNAT-2010. La muerte del animal y la obtención de las muestras se realizó en total apego a los lineamientos bioéticos establecidos por la Facultad de Ciencias (Aval de la CEARC con base en lo señalado en la NOM-033-SAG/ZOO-2014) y la REPSA (Permiso REPSA) Durante la cirugía de la lagartija, se seccionó sobre una placa de cera un trozo pequeño de hígado, el tejido se sumergió en una gota de aproximadamente 100  $\mu$ l de mezcla fijadora de Karnovsky (glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% amortiguados en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.2) y se obtuvieron trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Inmediatamente después, los trocitos de material biológico se sumergieron en 1 ml de solución fijadora durante 1.5 horas. Transcurrido el tiempo de fijación, se lavó varias veces con agua ultrapura purificada con un sistema Milli Q. Una parte de las fracciones de tejido se postfijaron con una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante una hora y se continuó con la deshidratación de todas las muestras; tanto de las que tenían como de las que no tenían postfijación con osmio.

Se deshidrató con soluciones de concentraciones graduales y ascendentes de alcohol etílico durante 10 minutos en cada solución. Se hicieron tres cambios de 10 minutos de alcohol absoluto. Posteriormente, debido a que la resina epóxica no es miscible en etanol, para los últimos pasos de la deshidratación se usó óxido de propileno como agente

intermediario; tres cambios, también de 10 minutos cada uno. Para lograr una eficiente infiltración del tejido, ésta se llevó a cabo lenta y gradualmente. Se infiltró durante tiempos largos, primero con una solución de óxido de propileno/resina en una proporción 2:1 durante 24 horas, se continuó por otras 24 horas en una solución de los mismos compuestos ahora en proporción 1:1 y finalmente, por tres días en una solución de óxido de propileno/resina en una proporción 1:2. Previo a la inclusión en la resina epóxica, se destaparon los tubos que contenían las muestras y se dejó evaporar el óxido de propileno durante al menos seis horas.

A continuación, se incluyó el material en moldes horizontales de silicón con resina epóxica pura y se dejó polimerizar en una estufa a 60° C durante 24 horas. De los bloques se obtuvieron cortes semifinos (200 - 600 nm de grosor) y cortes ultrafinos (40 – 60 nm de grosor) utilizando cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo automatizado.

Para obtener los cortes primero se talló el bloque de resina formando una pirámide trunca en el extremo donde se encuentra la muestra. Los cortes semifinos sirvieron para verificar la eficiencia de la conservación de la estructura tisular y reconocer la zona del tejido que sería de utilidad. Posteriormente, se ubicó esta zona en la cara del bloque de resina y se retalló una pirámide más pequeña para delimitar un área que contenga las células de interés. Se lograron los cortes ultrafinos y se colocaron sobre una rejilla de cobre de 200 mesh cubierta con una membrana plástica de formvar.

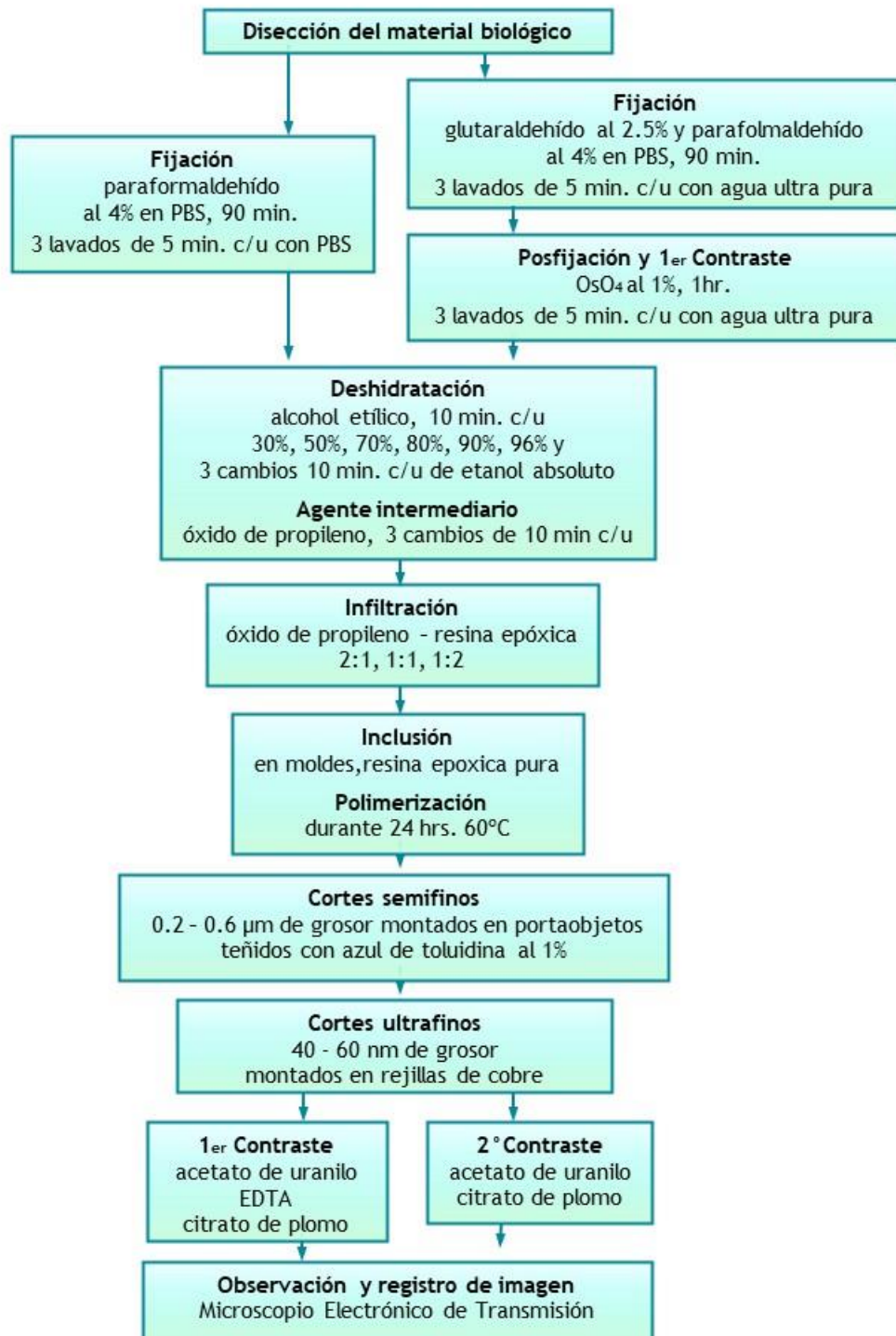
A los cortes ultrafinos de las muestras que ya tenían un primer contraste con tetraóxido de osmio, se les aplicó un segundo contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Cada rejilla con los cortes se flotó sobre una gota de acetato de uranilo al 4%, durante 20 minutos, en una cámara húmeda y cubierta de la luz. Se lavó exhaustivamente por goteo con agua ultrapura, después en otra cámara húmeda y en presencia de lentejas de NaOH, las rejillas se flotaron sobre una gota de citrato de plomo al 3.5%, durante 10

minutos. Finalmente se lavaron con agua ultrapura y se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior observación en el TEM. La técnica empleada es conocida como procesamiento convencional de la muestra biológica para muestras que serán observadas por medio de microscopía electrónica de transmisión. Se encuentra esquematizada en la ruta del lado derecho de la figura 5 y en la figura 6.

Los cortes montados en las rejillas se observaron a diferentes aumentos a 80 kV. Las imágenes se registraron de manera digital con una cámara Gatan Orius CCD, acoplada a la columna del TEM Jeol 1010. Las micrografías tomadas por pares estereoscópicos se lograron girando el goniómetro del portamuestras 20° hacia arriba y 20° hacia abajo. El diámetro de los gránulos intercromatinianos se midió con el programa Fiji/Image J.

La técnica de contraste regresiva y preferencial para ribonucleoproteínas se llevó a cabo en cortes ultrafinos de muestras que no fueron postfijadas con osmio. Los pasos se encuentran representados en la vía de la parte izquierda de la figura 5. Esta técnica consiste obtener cortes ultrafinos de material fijado con paraformaldehído al 4%, posteriormente colocar la rejilla con cortes sobre una gota de 40 µl de acetato de uranilo al 4% durante 3 minutos, después sobre una gota de solución 0.2 M de EDTA por dieciocho minutos y por último sobre una gota de citrato de plomo a 3.5% durante 2 minutos. En cada caso, después de transcurridos los tiempos mencionados, de manera abundante se lavó por goteo la rejilla con agua ultrapura y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior observación.

## Procesamiento de material biológico para Microscopía Electrónica de Transmisión



**Fig. 6.** Diagrama de flujo que representa el proceso de la muestra biológica incluido en resina epóxica. En la vía de la izquierda se muestran los pasos para obtener micrografías con el contraste regresivo y preferencial con EDTA, por la vía de la derecha se muestra la ruta del material contrastado de manera convencional.

## Procesamiento convencional para microscopía electrónica de transmisión



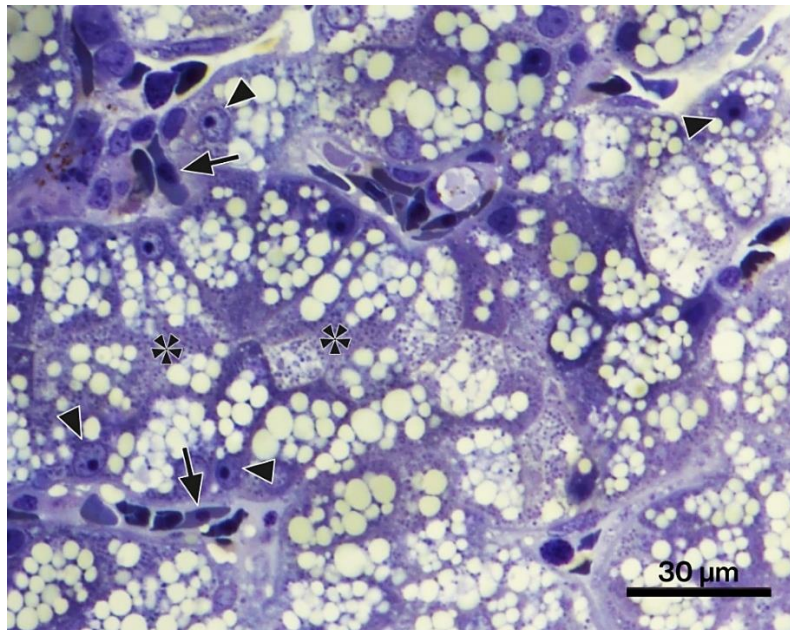
**Fig. 7.** Representación del procesamiento convencional de la muestra biológica desde la obtención de la muestra hasta la interpretación de las micrografías. Fijación con mezcla de aldehídos, inclusión en resina epóxica, primer contraste con tetraóxido de osmio y segundo contraste con acetato de uranilo y con citrato de plomo.



## RESULTADOS

### Conservación del material biológico

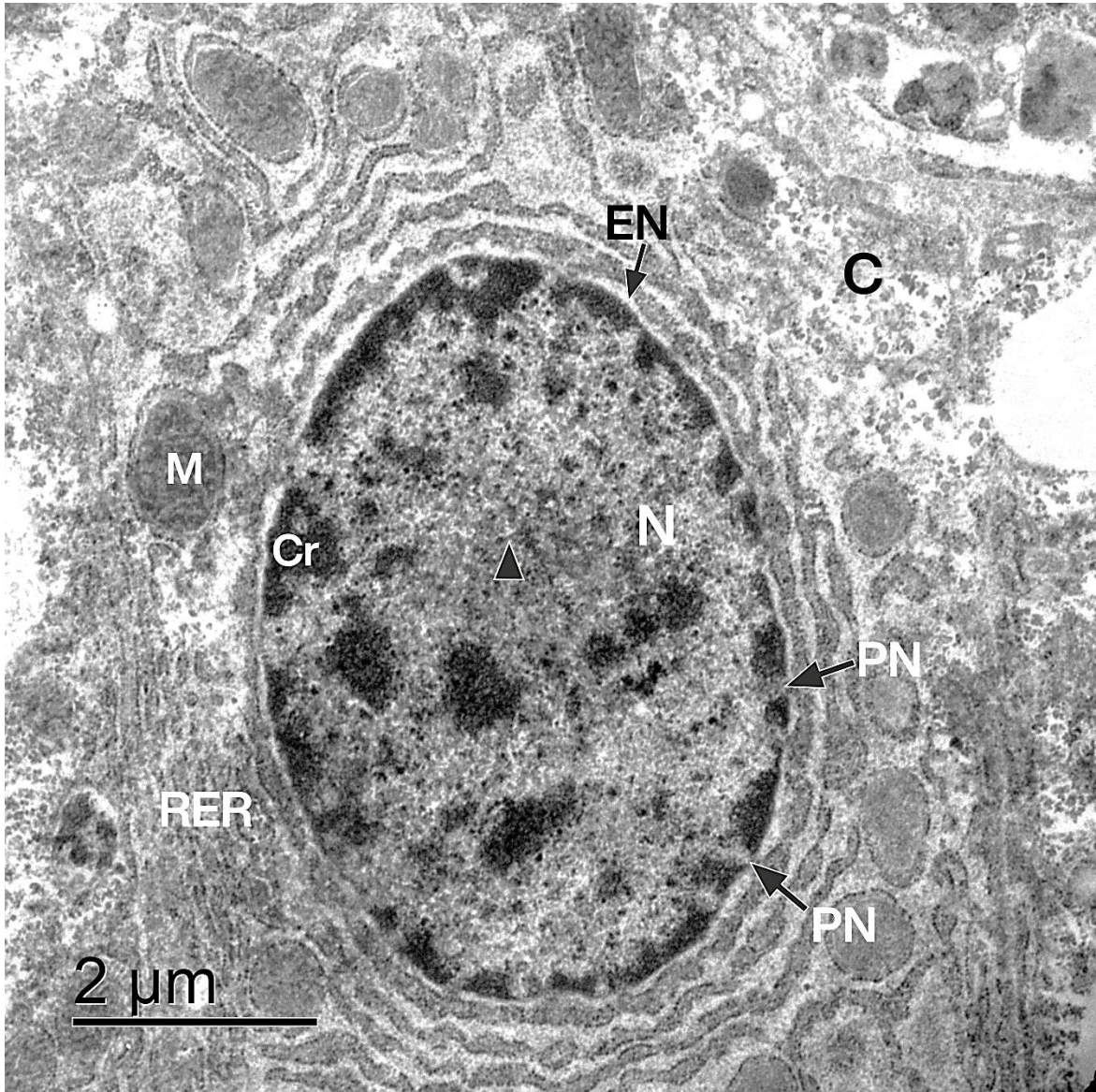
La observación al microscopio de luz de los cortes semifinos de las muestras teñidas con azul de toluidina, permitió apreciar que la conservación del tejido era adecuada y seleccionar las áreas que serían exploradas con el microscopio electrónico de transmisión (TEM). En la micrografía óptica (figura 8) se observan hepatocitos del hígado del reptil *S. torquatus*, de alrededor de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro que quizá son depósitos de glucógeno y una gran cantidad de vesículas claras, posiblemente de contenido lipídico. Algunas de ellas conservan su contenido a pesar del uso de alcoholes y óxido de propileno durante el procesamiento de la muestra. También se notan vías sanguíneas con eritrocitos nucleados. A partir de estas muestras se obtuvieron los cortes ultrafinos, seleccionando las zonas en las que se aprecian principalmente los núcleos.



**Fig. 8.** Micrografía óptica de corte semifino, hepatocitos de lagartija *Sceloporus torquatus*. Se muestran algunos núcleos (cabezas de flecha) y eritrocitos nucleados (flechas). Las células muestran vesículas lipídicas de mayor tamaño sin coloración.

Las micrografías electrónicas de este trabajo se obtuvieron de cortes ultrafinos de entre 50 a 60 nm de espesor y por sus dimensiones, en los cúmulos de ICG se encuentran de 2 a 4 gránulos sobrepuestos lo que afecta la formación de la imagen. Además, las variaciones en el grosor del corte también afectan la interpretación y análisis de las relaciones morfológicas y espaciales entre los gránulos componentes de los cúmulos y las fibras presentes en los contornos de la cromatina compacta, debido a la superposición de elementos menores al grosor del corte. Esta problemática no se resuelve mediante el uso de cortes seriados y reconstrucción tridimensional.

La siguiente imagen (figura 9) es una micrografía que muestra un panorama general de la ultraestructura de un hepatocito de hígado de *S. torquatus*, contrastado con la técnica general con acetato de uranilo y citrato de plomo.

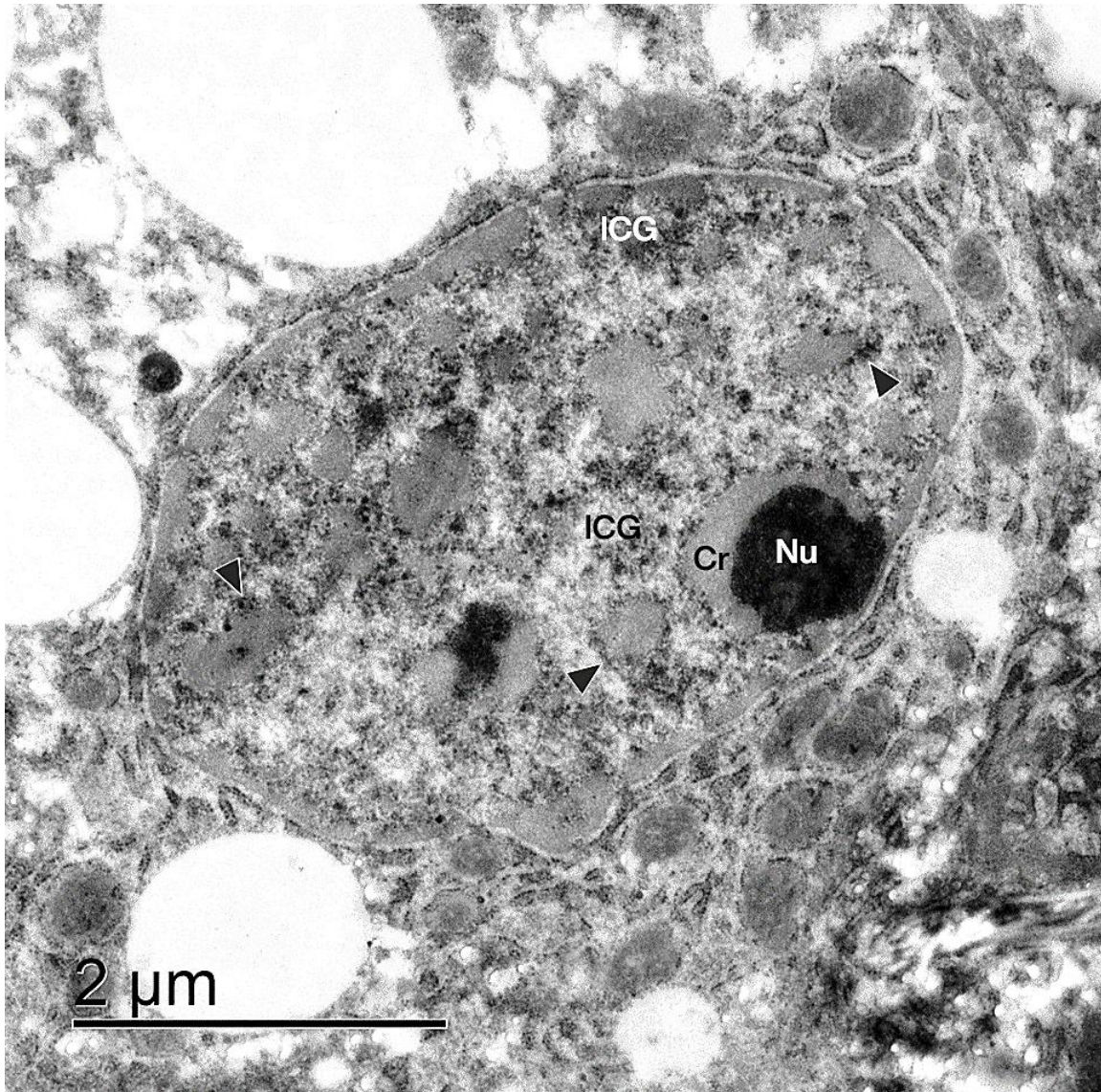


**Fig. 9** Micrografía electrónica de un núcleo celular interfásico (N) de hepatocito de la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus*, el tejido fue procesado con la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión. Primer contraste con tetraóxido de osmio, segundo contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, observado a 80 kV. En el nucleoplasma, el material más electron denso corresponde a cúmulos de cromatina compacta (Cr), algunos de los cuales se observan adosados a la envoltura nuclear (EN). En el citoplasma (C) se distinguen algunos organelos como mitocondrias (M) y el sistema de membranas en paralelo del retículo endoplásmico rugoso (RER). Y en la envoltura nuclear varios poros nucleares (PN)

Las figuras 10 y 11 muestran núcleos interfásicos de hepatocito contrastado con EDTA. En ambas micrografías se observan con mayor contraste, el nucléolo y las partículas ribonucleoproteicas. En la figura 11 se resalta uno de los cúmulos de ICG, del cual se observa un acercamiento en la figura 12.



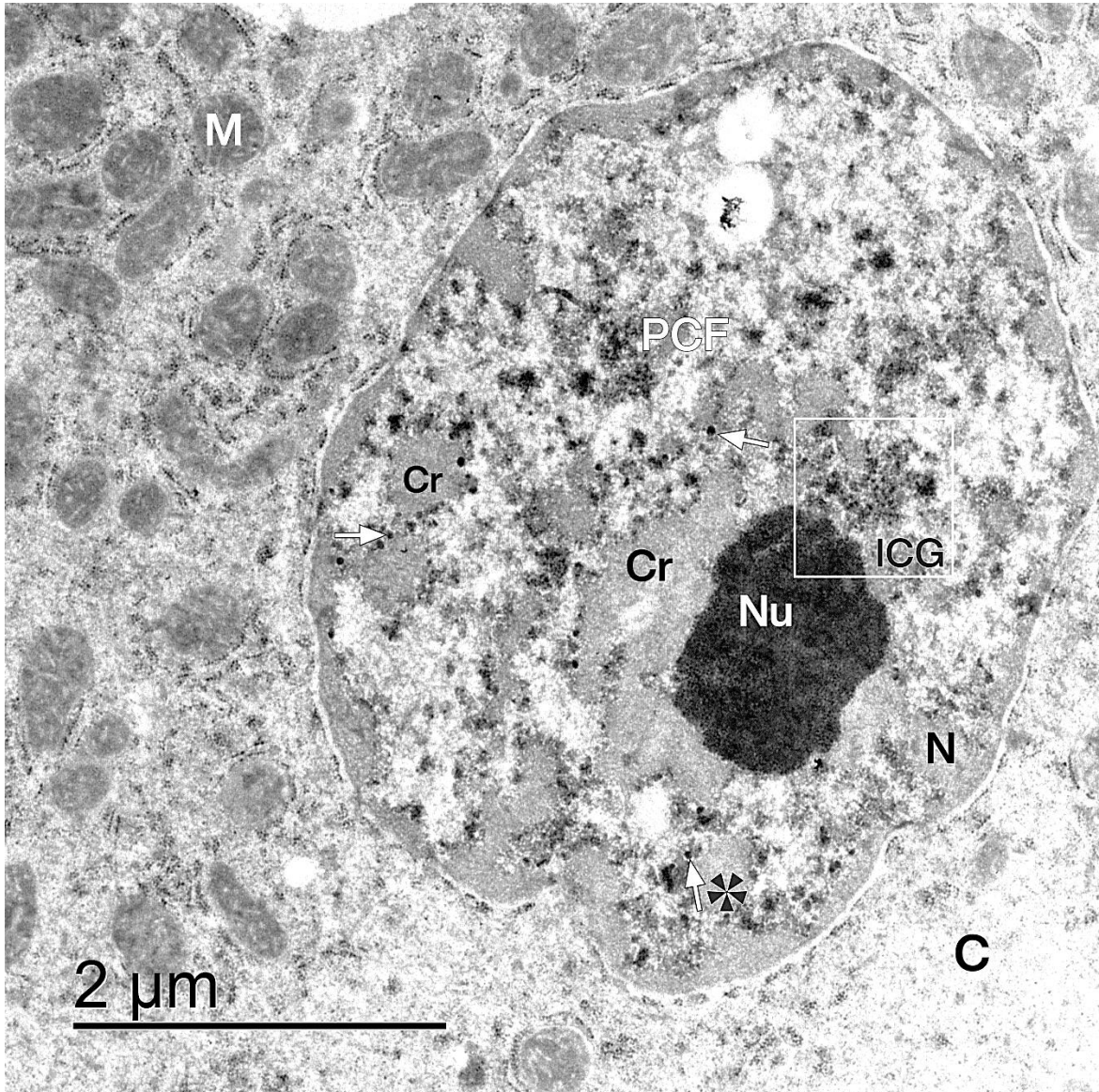
La forma de abordar el análisis ultraestructural de la organización tridimensional de los gránulos intercromatinianos (ICG) y su asociación morfológica y espacial con las fibras pericromatinianas (PCF) se llevó a cabo mediante la generación de imágenes en estereopares que se presentan colocando una al lado de la otra (figuras 13 y 14), de tal



**Fig. 10.** Micrografía electrónica de un núcleo celular interfásico de hepatocito de *Sceloporus torquatus* contrastado con la técnica regresiva preferencial con EDTA de Bernhard para ribonucleoproteínas. Se puede observar la cromatina compacta en un tono gris debido al efecto quelante del EDTA. En el nucleoplasma, en la zona intercromatiniana se aprecian varios cúmulos de gránulos intercromatinianos (ICG), con la arquitectura fibrogranular descrita en células de mamíferos. Los cúmulos se observan cercanos a las zonas fibrosas, electron densas correspondientes a las fibras pericromatinianas (cabezas de flechas)

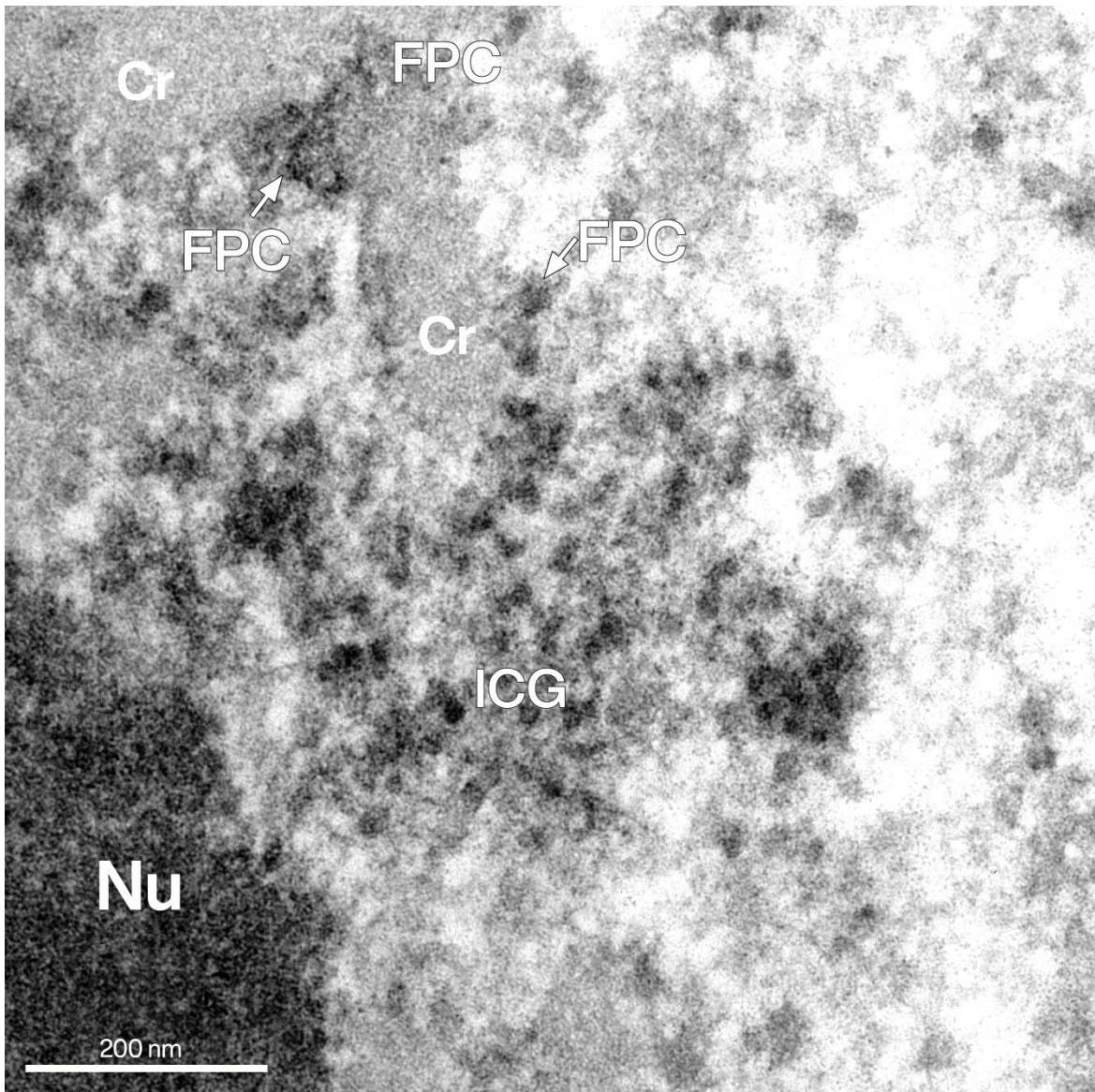


manera que el observador ajuste su distancia interpupilar para lograr la superposición de las imágenes. Considerando que cuando el cerebro logra formar una sola imagen en tercera dimensión, se perciben diferentes intensidades de grises y diferentes planos dentro del grosor del corte, unos por detrás y otros ligeramente más adelante que otros.



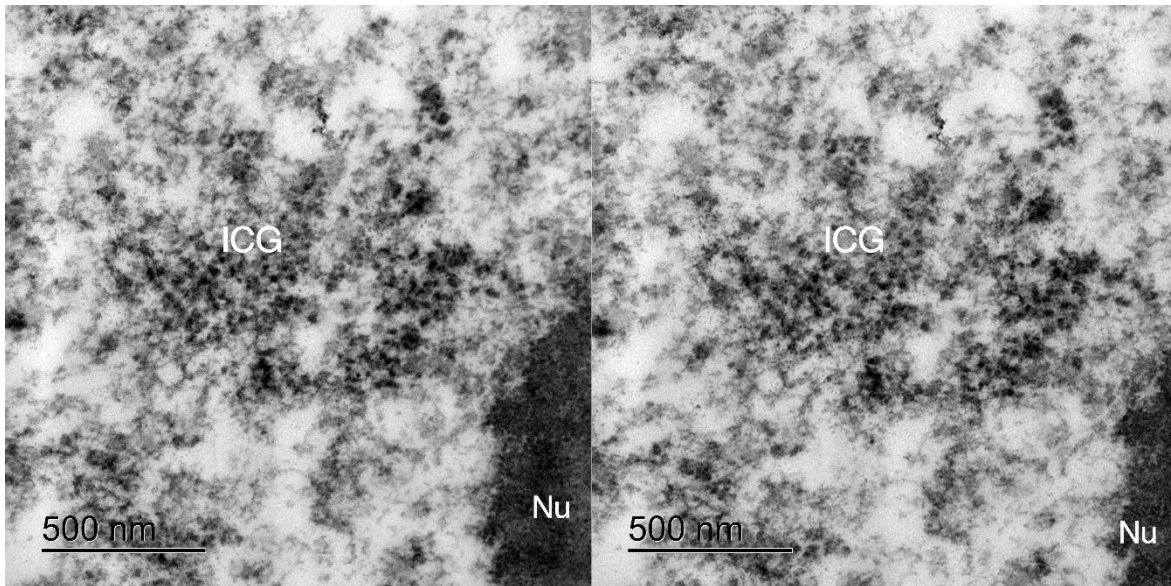
**Fig.11** Micrografía electrónica de un núcleo celular interfásico (N) de hepatocito de *Sceloporus torquatus*, contrastado con la técnica regresiva preferencial con EDTA. Nótese el borde de la envoltura nuclear, el citoplasma (C), las mitocondrias (M), los cúmulos de cromatina aclarada (Cr) adosada a ella. El nucléolo (Nu) muy contrastado y en el nucleoplasma un ambiente fibrogranular. El recuadro (véase acercamiento en la Fig. 9) muestra un cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG), fibras pericromatinianas (PCF) rodeando la cromatina y las flechas señalan algunos gránulos pericromatinianos (flechas), de mayor tamaño que los gránulos intercromatinianos que conforman el cúmulo, algunos con su halo claro característico (flecha con\*)



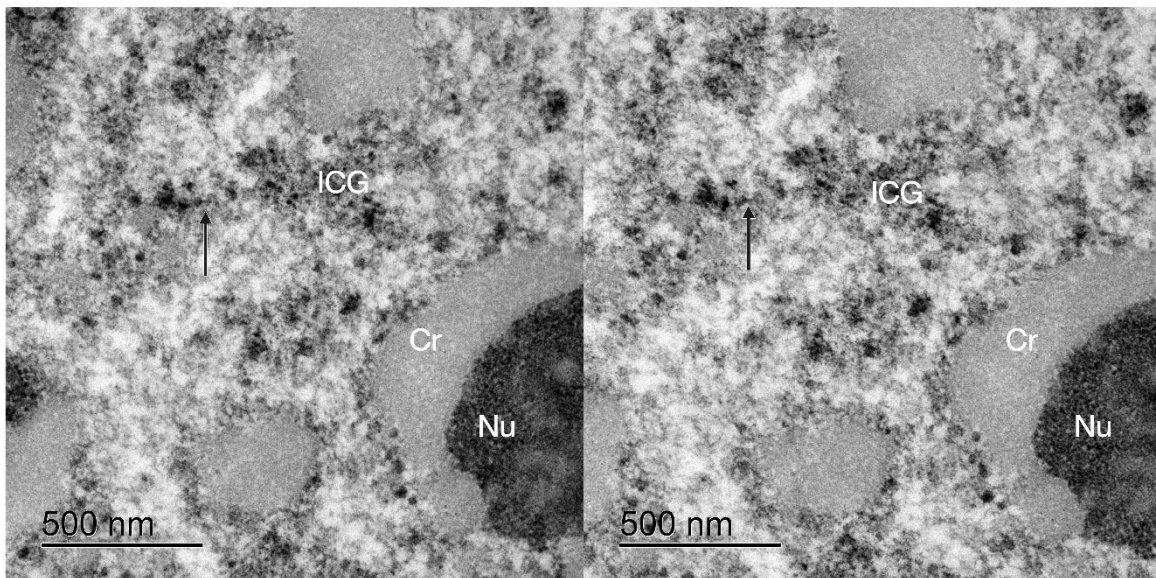


**Fig. 12** Cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG) a mayor aumento, en el que se puede apreciar su ultraestructura fibrogranular además de que se observan interconectados con las fibras pericromatinianas presentes en los bordes de los cúmulos de cromatina compacta (Cr). La muestra fue contrastada con la técnica regresiva preferencial para ribonucleoproteínas con EDTA, por lo que se puede apreciar al nucléolo (Nu) como la estructura ribonucleoproteica más conspicua y la cromatina con un contraste poco denso a los electrones.

A continuación, se muestran dos imágenes de un mismo campo, obtenidas mediante la inclinación de la muestra, lo que resulta en un par de imágenes en estereopares que se han colocado una junto a la otra para ser observadas, de ser requeridas, con gafas especiales para este tipo de observaciones.

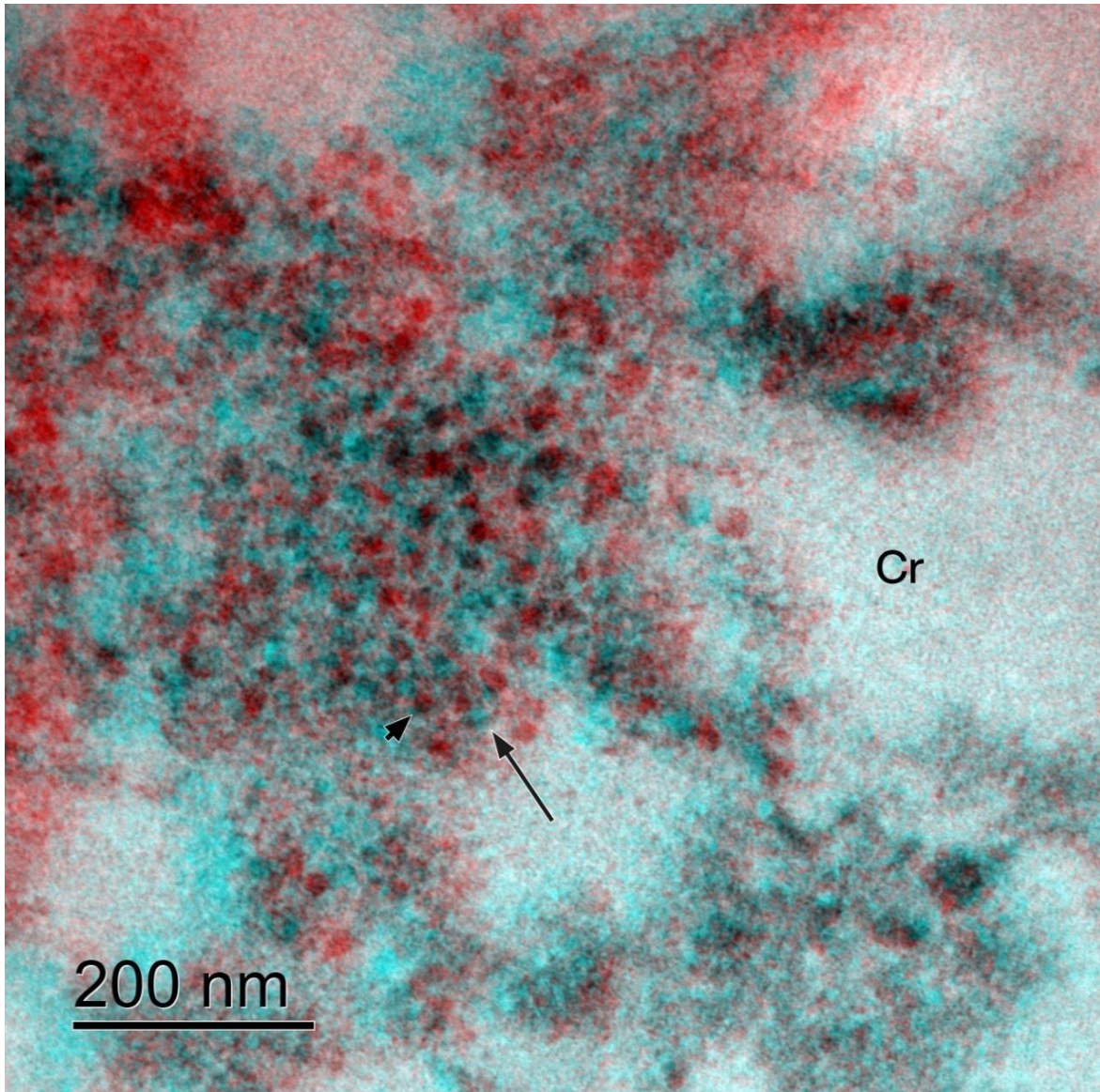


**Fig. 13y 14** Micrografías en estereopares de un cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG), próximo al nucléolo (Nu) de un hepatocito de *Sceloporus torquatus* en las que se aprecia arquitectura fibrogranular del cúmulo. La muestra fue contrastada con la técnica regresiva preferencial con EDTA de Bernhard para ribonucleoproteínas.





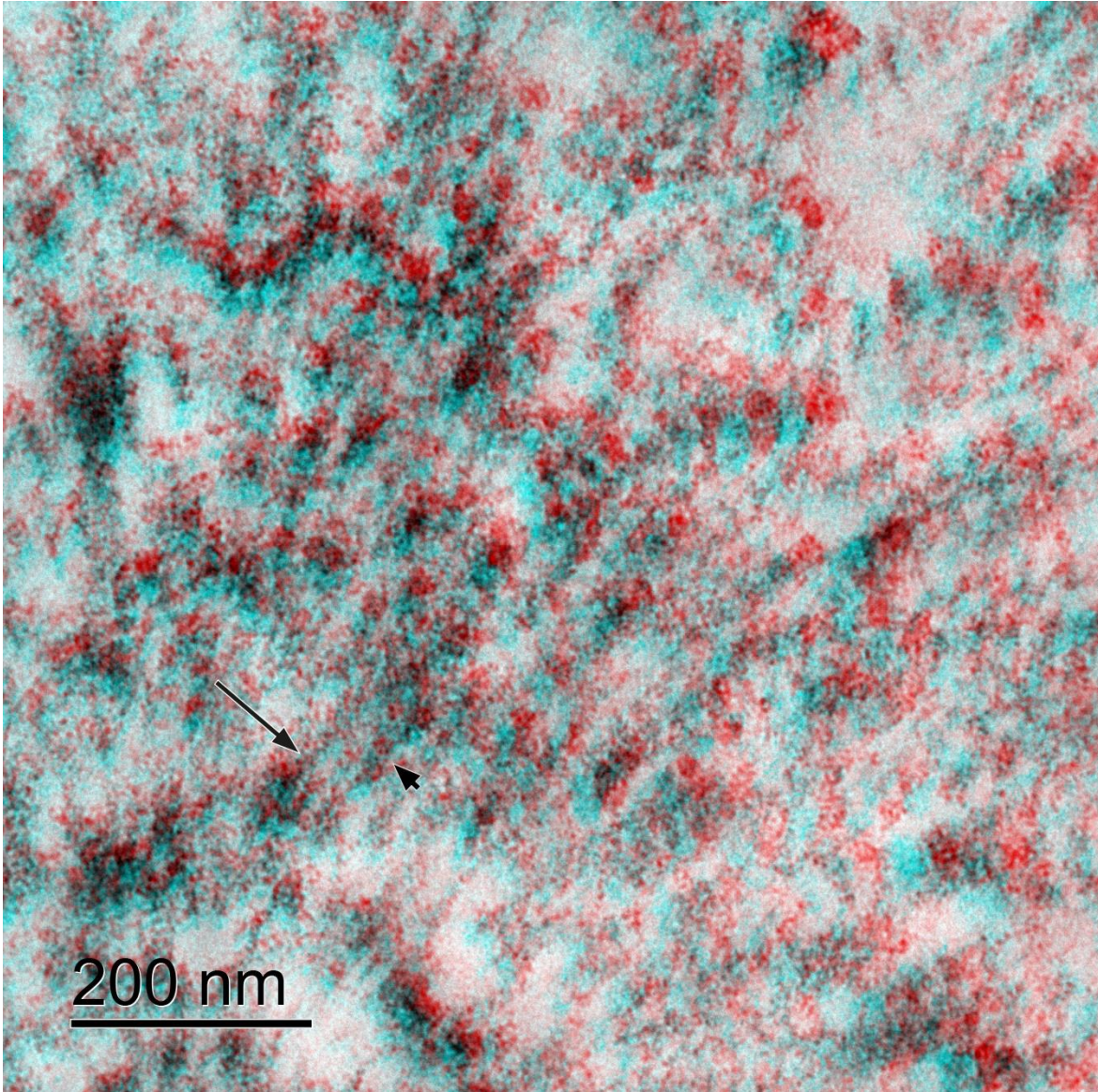
Otra forma de presentación de estas imágenes bidimensionales (figuras 15, 16 y 17) se hace mediante anagramas (azul/rojo) denominadas anaglifos para ser observadas con gafas especiales que tienen un filtro rojo para un ojo y un filtro azul para otro, de tal manera que la integración tridimensional la realiza el cerebro del observador.



**Fig. 15** Anaglifos de micrografías en estereopares de un cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG), próximo al nucléolo (Nu) de un hepatocito de *S. torquatus* en las que se aprecia arquitectura fibrogranular del cúmulo. Cromatina (Cr) aclarada por aplicar EDTA como quelante. La flecha señala una fibra y la cabeza de flecha muestra un gránulo.

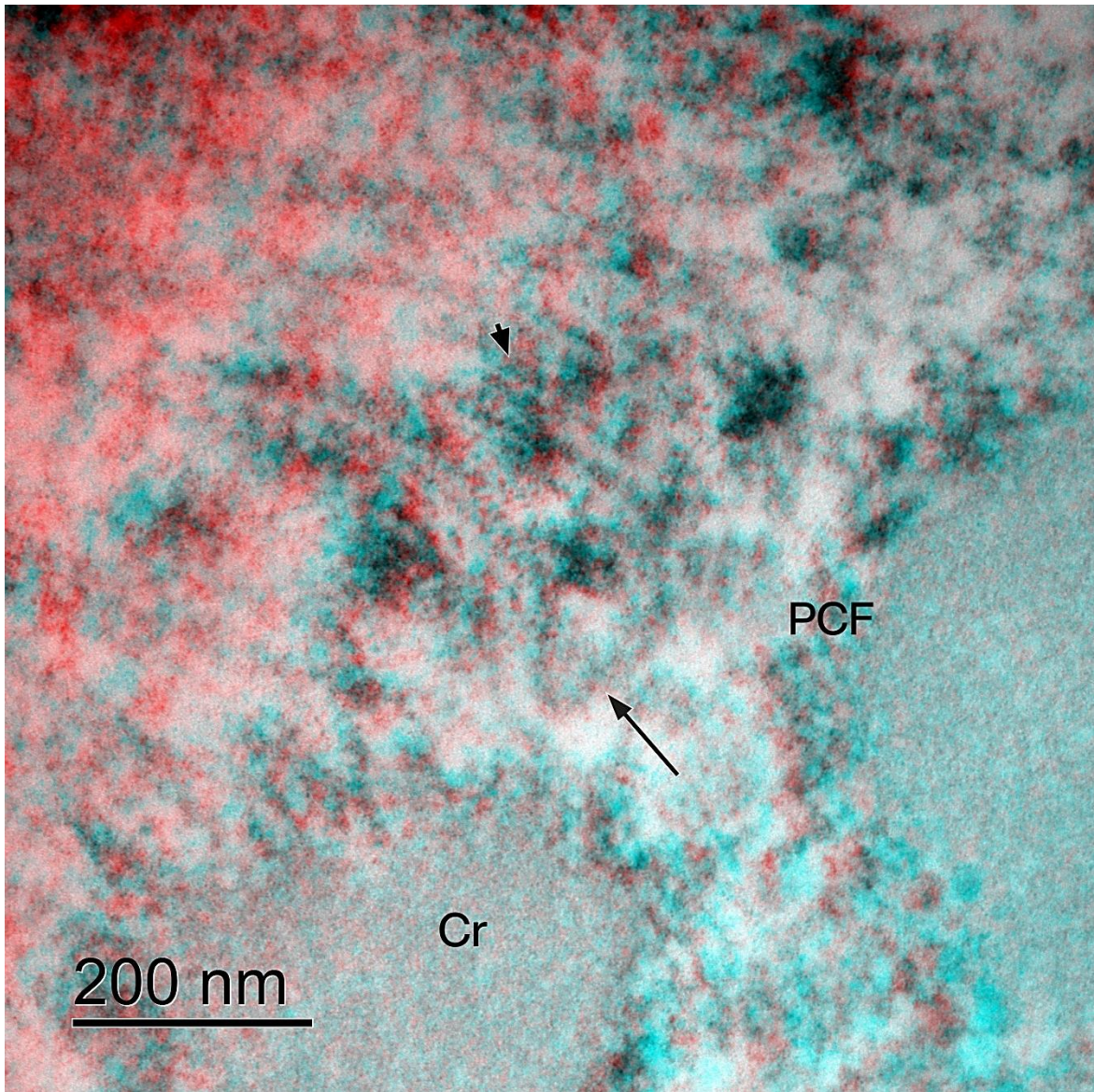


Las partículas de interés se aprecian en las imágenes en anaglifs, como una maraña gruesa, de un lazo deshilado –las fibras pericromatinianas– que se conectan con estructuras esféricas, rugosas –los gránulos intercromatinianos–.



**Fig. 16** Anaglifs de micrografías en estereopares de un cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG), próximo al nucléolo (Nu) de un hepatocito de *S. torquatus* en las que se aprecia el ambiente fibrogranular y la continuidad entre las fibras (flecha) y los gránulos intercromatinianos (cabeza de flecha).





**Fig. 17** Anaglifs de micrografías en estereopares de un cúmulo de gránulos intercromatinianos (ICG), próximo a la cromatina de un hepatocito de *S. torquatus* en las que se aprecia la continuidad entre los elementos fibrogranulares. Se usó la técnica preferencial regresiva para ribonucleoproteínas, la cromatina (Cr) se nota aclarada, adosada a ella, resaltan con tonos más oscuros las fibras pericromatinianas (PCF). Nótese la conexión que se hace evidente en el área ocupada por el cúmulo de gránulos intercromatinianos.

## DISCUSIÓN

Con estos resultados obtenidos a partir de las observaciones, se puede confirmar que hay elementos de naturaleza ribonucleoproteica (RNP) en la región intercromatiniana del nucleoplasma de los hepatocitos del reptil, la lagartija vivípara *S. torquatus*. Estos componentes RNPs se observan como agrupaciones de gránulos en cúmulos de forma irregular, ocupando de manera notoria parte del espacio intercromatiniano. La morfología y el tamaño de los ICG en los hepatocitos de este reptil son constantes, el diámetro promedio de estos gránulos es de  $20 \pm 0.53$  nm. Por lo tanto, por su tamaño, localización y composición química, coinciden con la definición de los ICG descritos en células de mamíferos descritas por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969. Además de esos ICG también se observaron, gránulos pericromatinianos (GPC) y fibras pericromatinianas (FPC).

Las variaciones del patrón moteado debido a cambios en la tasa de transcripción y *splicing* se han descrito tanto en células como en tejidos, de mamíferos y otros vertebrados (Jiménez-García y Spector 1993; Segura-Valdez *et al*, 2007). Además, como ya se ha mencionado, en mamíferos el patrón moteado corresponde ultraestructuralmente a los cúmulos de gránulos intercromatinianos. Por otra parte, también se ha descrito que estas nanopartículas nucleares asociadas con el reclutamiento de factores de *splicing* se relacionan con dicha función y que su ultraestructura es una propiedad que responde a un sistema organizado (Carmo-Fonseca, 2002).

Entonces, los resultados obtenidos en este trabajo sobre la morfología y organización ultraestructural de los ICG en hepatocitos de *S. torquatus*, sugieren que tanto la morfología, la dinámica, los mecanismos de reclutamiento de los factores de *splicing*, así



como su participación en el control de la expresión de los genes, están presentes en reptiles ya que los elementos de composición molecular de estos gránulos intercromatinianos, permiten confirmar que esta organización intranuclear de las partículas ribonucleoproteicas se ha conservado a lo largo del proceso evolutivo como ya se había sugerido en 1989 por Jiménez-García y colaboradores (Jiménez-García *et al*, 1989 *b*).

## CONCLUSIONES

- En núcleos en interfase de células del hígado de reptil, la lagartija vivípara *Sceloporus torquatus* se pudo mostrar la presencia de cúmulos de gránulos intercromatinianos con estructura fibrogranular similar a la descrita para mamíferos.
- Su composición ribonucleoproteica se corroboró con la técnica regresiva preferencial con EDTA de Bernhard.
- Mediante la reconstrucción tridimensional con estereopares procesados digitalmente para generar anaglifos, se logró apreciar las asociaciones morfológicas como interconexiones entre los gránulos y las fibras que componen los cúmulos en los que se organizan los gránulos intercromatinianos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta-Cárdenas J, Jiménez-García L.F., Segura-Valdez M.L. (2022). Speckles in tissues. **MOJ Anat Physiol**, **9**(1):1-3. doi: 10.15406/mojap.2022.09.00317
2. Bernhard, W. (1969). A new staining procedure for Microscopical cytology. **J Ultrastructure research**, **27**:250-265. doi:10.1016/s0022-5320(69)80016-x
3. Blackburn, D. (1994). Review: Discrepant usage of the term ovoviviparity in the herpetological literature. **Herpetological Journal**, **4**:65-72.
4. Busch, A., Hertel, K.J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, **3**(1):1-12. doi: 10.1002/wrna.100.
5. Carmo-Fonseca, M. (2002). The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. **Cell**, **108**:513-521. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00650-5.
6. Chandler, D.E. y Robertson, R.W. (2009). Bioimaging. Current concepts in light and electron microscopy. Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA. 440 pp.
7. Cmarko, D., Verschure, P. J., Martin, T. E., Dahmus, M. E., Krause, S., Xiang-Dong, F., & Fakan, S. (1999). Ultrastructural Analysis of Transcription and Splicing in the Cell Nucleus. after Bromo-UTP Microinjection. **Mol Biol Cell**, **10**:211-223. doi: 10.1091/mbc.10.1.211
8. Eckert, S., Mascarenhas, E.J., Mitzner, R. (2002). Inorganic Chemistry 61 (27), 10321-10328 doi: 10.1021/acs.inorgchem.2c00789
9. Fakan, S., Bernhard, W. (1971). Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high-resolution autoradiography. **Exp Cell Research**, **67**:129-141. doi: 10.1016/0014-4827(71)90628-8.
10. Fakan, S., Leser, G., Martin, T. E. (1984). Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins as Visualized by Immunocytochemistry on Thin Sections. **J Cell Biol**, **98**(1):358-63. doi: 10.1083/jcb.98.1.358.
11. Flores-Villela, O., Martínez-Salazar, E.A. (2009). Historical explanation of the origin of the herpetofauna of Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, **80**: 817- 833.
12. George-Téllez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., Jiménez-García, L.F. (2002). Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. **Biol Cell**, **94**:99-108. doi.org/10.1016/S0248-4900(02)01186-3

13. Goodpasture, C., Bloom, S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, **53**, 37–50. doi.org/10.1007/BF00329389
14. Huang, S., Spector, D.L. (1991). Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. **Genes Dev**, **5**(12A): 2288-302. doi: 10.1101/gad.5.12a.2288.
15. Huang, S., Spector, D.L. (1996). Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. **J Cell Biol**, **133**(4):719-732. doi: 10.1083/jcb.133.4.719
16. Ilik, I.A., Aktas, T. (2021). Nuclear speckles: dynamic hubs of gene expression regulation. **FEBS J**, **289**(22): 7234-7245. doi/10.1111/febs.16117
17. Jiménez-García LF, Rothblum LI, Busch H, Ochs RL. (1989 a). Nucleologenesi: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. **Biol Cell**. **65**(3):239-46. doi: 10.1111/j.1768-322x.1989.tb00795.x.
18. Jimenez-García, L.F., Elizundia, J.M., López-Zamorano, B., Maciel, A. Zavala, G., Echeverría-Martínez, O.M. and Vázquez-Nin, G.H. (1989 b). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocists. **BioSystems**, **22**(2):103-116. doi: 10.1016/0303-2647(89)90039-7
19. Jiménez-García, L.F., Spector, D.L. (1993). *In vivo* evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. **Cell**, **73**:47- 59. doi: 10.1016/0092-8674(93)90159-n
20. Jiménez-García L.F. *et al.* (2007). Biología celular del splicing. **Mensaje bioquímico** **31**:141–156. Depto. de bioquímica. Fac Med. 2007; XXXI:141-56. <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
21. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M.L. (2010). Biología celular del genoma. Las Prensas de Ciencias, UNAM, México.
22. Lamond, A.I, Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. **Nat Rev Mol Cell Biol**, **4**(8):605-612. doi: 10.1038/nrm1172..
23. Lazarus, S., Volk, B. W. (1964). Electron microscopy and histochemistry of rabbit pancreas in protein malnutrition. **Am J Pathol**: **44**(1):95-111.
24. Mintz, P.J., Patterson, D., Neuwald, A.F. *et al.* (1999). Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. **EMBO J**, **18**:4308-4320. doi: 10.1093/emboj/18.15.4308
25. Mintz, P.J., Spector, D.L. (2000). Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. **J Struct Biol**, **129**(2–3):241–251. doi: 10.1006/jsbi.2000.4213.
26. Misteli, T., Cáceres, J.F., Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. **Nature**, **387**:523-527. doi: 10.1038/387523a0.

27. Misteli, T. (2000). Cell biology of transcription and pre-*m*RNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. **J Cell Sci**, **113**:1841-1849. doi: 10.1242/jcs.113.11.1841
28. Misteli, T. (2000). The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. **Cell**, **183**(1):28-45. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.014.
29. Monneron, A., Bernhard, W.J. (1969). **Ultrastructure research**, **27**: 266-288. doi.org/10.1016/S0022-5320(69)80017-1
30. Moyne, G. (1980). Methods in ultrastructural cytochemistry of the cell nucleus. **Prog Histochem Cytochem**, **13**(1):1-72. doi: 10.1016/s0079-6336(80)80008-8.
31. Puvion, E., Bernard, W. (1975). Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy. **J Cell Biol**, **67**(1):200-14. doi: 10.1083/jcb.67.1.200
32. Puvion, E., Viron, A., Assens, C., Leduc, E.M. & Jeateur, P. (1984). Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolater rat liver cells. **J Ultrastructure research**, **87**(2): 180-189. doi: 10.1016/s0022-5320(84)80077-5.
33. Puvion, E., Viron, A. & Xu, X. (1984). High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB treated cells. **Exp Cell Res**, **152**: 357-367. doi: 10.1016/0014-4827(84)90637-2
34. Puvion, E., Puvion-Dutilleul, F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: Roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. **Exp Cell Res**, **229**:217-225. doi: 10.1006/excr.1996.0363.
35. Rasim Barutcu, A., Fitz, A.J., Zidi, S. K., vanWijnen, A.J., Llan, J. B., Stein, J. L., Nickerson, J. A., Imbalzano, A. N., and Stein, G. S. (2016). C-ing the genome: A compendium of chromosome conformation capture methods to study higher-order chromatin organization. **J. Cell Physiol**, **231**(1):31-35. doi: 10.1002/jcp.25062
36. Sabatini, D.D., Bensch, K., Barnett, R.J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. **The Journal of cell biology**, **17**(1):19-58. doi.org/10.1083/jcb.17.1.19
37. Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D. *et al.* (2004). Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. **Mol Biol Cell**, **15**:3876-3890. doi: 10.1091/mbc.e04-03-0253
38. Segura-Valdez, M. L., Negrete, C., Rodríguez, Y., Ochotorena, A., Lara, R., Moncayo, J., Gómez, C. y Jiménez-García, L. F. (2007). Organización intranuclear de proteínas SR en vertebrados. **TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol**, **10**(2):65-69.
39. Segura-Valdez, M.L., Mendoza-Sánchez, A.C., García-Mauleón, P.M.R., Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F. (2020). Electron microscopy of nuclear nanoribonucleoproteins (nanoRNPs). **MOJ Anat and Physiol**, **7**(1):15-17. doi: 10.15406/mojap.2020.07.00282
40. Sjostrand, F. (1967). *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. Academic Press. New York, London.

41. Spector, D.L., Schrier, W. H. & Busch, H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. **Biol. Cell**, **49**:1-10. doi: 10.1111/j.1768-322x.1984.tb00215.x
42. Spector, D.L., Fu, X.D. & Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre-*m*RNA splicing components and the cell nucleus. **EMBO J**, **10**:3467-3481. doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04911.x
43. Spector, D.L. (1993 *a*). Macromolecular domains within the cell nucleus. **Annu. Rev. Cell Biol**, **9**:265-315. doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.001405
44. Spector, D.L. (1993 *b*). Nuclear organization of pre-*m*RNA processing. **Current Opinion in Cell Biology**, **5**: 442-448. doi.org/10.1016/0955-0674(93)90009-F
45. Spector, D.L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A. (1998). *Cytochemical Staining and Enzyme Detection for Electron Microscopy in Cells: A Laboratory Manual*, 3:127-1. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
46. Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. **J Cell Sci**, **114**:2891-2893. doi: 10.1242/jcs.114.16.2891
47. Spector, D.L., Lamond, A.I. (2011). Nuclear speckles. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, **3**(2):1-12. doi: 10.1101/cshperspect.a000646
48. Swift, H. (1959). In *Structure and Function of Genetic Elements*, p. 134-152. **Brookhaven Symposium in Biology**, **12**. Brookhaven National Laboratory, Upton New York.
49. Thiry, M. (1995). The interchromatin granules. **Histol Histopathol**, **10**:1035-1045.
50. Vázquez-Nin, G.H y Echeverría-Martínez, O.M. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. FCE. México. 168 pp.
51. Vázquez-Nin, G.H., Echeverría-Martínez, O. M., Jiménez-García, L.F. (2003). El núcleo celular interfásico. En: Jiménez L.F. y Merchant, L. H. (Eds.) *Biología Celular y Molecular*, pp 341-394. Prentice Hall. México.
52. Zamora-Cura, A. L. y Jiménez-García, L. F. (2014). Visualization of interchromatin granules in the cell nucleus by atomic force microscopy. **J Adv Microsc Res**, **9**:296-300. doi: <https://doi.org/10.1166/jamr.2014.1224>