



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis ultraestructural de los gránulos
intercromatinianos y su interacción con su
entorno fibrilar en hepatocitos de ratón

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A:

PAOLA ALICIA MARTÍNEZ AMADOR



**TUTORA:
DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDÉZ**

CD. MX. ABRIL 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.

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**)

DEDICATORIAS

A mi madre, por ser el ejemplo de que la preparación continúa a cualquier edad y en cualquier ámbito de la vida.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutora la Dra. María de Lourdes Segura y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por su dirección, por transmitirme su pasión por la enseñanza y por la microscopía, por abrirme las puertas y ayudarme a continuar con mi trabajo, y porque su forma de pensar me hizo ver el mundo de otra manera en lo académico y como ser humano.

A mis maestras de la especialización M en C. Silvia Juárez Chavero y Esp. en M.E. en C.B. Rosario Pintor Elizalde, por sus enseñanzas en toda el área técnica de microscopía, su profesionalismo, su experiencia y su apoyo me hicieron mejor en mi trabajo.

A la Biól. Sarai de Jesús Cruz Gómez por su apoyo académico en la introducción y montaje de la técnica de microscopía electrónica en el laboratorio; por sus enseñanzas y su amistad en tiempos de pandemia.

A la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch por su apoyo académico en la introducción y montaje de la técnica de microscopía electrónica en el laboratorio; por sus enseñanzas y su amabilidad.

A la M. en C. María Del Pilar Ramos Godínez un especial agradecimiento por su dirección técnica en el montaje de los procesos de microscopía electrónica en un laboratorio de patología, por ayudarme a comprender este mundo laboral, su apoyo en época de pandemia fue invaluable.

A Hagen Ponce de León Cruz por el procesamiento digital de micrografías electrónicas.

Al personal técnico encargado del laboratorio, siempre dispuestas a la enseñanza y dedicadas a la excelencia.

A mis compañeros, por ser gente extraordinaria, por contagiarme su motivación para lograr sus sueños, los admiro por su dedicación y los aprecio por los momentos vividos.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN	3
MARCO TEÓRICO	4
LA INFORMACIÓN GÉNICA EN LOS SERES VIVOS	4
LA DIVERSIDAD DEL RNA.....	5
LA TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIOTAS	6
ARQUITECTURA DEL NÚCLEO INTERFÁSICO	8
DIVERSIDAD DE CUERPOS NUCLEARES.....	10
GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS.....	10
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVOS.....	17
HIPÓTESIS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
DIAGRAMA DE FLUJO.....	20
RESULTADOS.....	21
ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS.....	39
BIBLIOGRAFIA	40
ANEXOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La síntesis del RNAm.....	4
Figura 2. Asociaciones del RNA.....	5
Figura 3. El splicing	7
Figura 4. Organización del genoma eucariótico	9
Figura 5. Gránulos intercromatinianos	12
Figura 6. Estructura y conservación del tejido hepático	21
Figura 7. Estructura y conservación del hepatocito.....	21
Figura 8. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, contraste con Ur-Pb.....	22
Figura 9. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs	23
Figura 10. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, clusters de gránulos intercromatinianos	24
Figura 11. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, gránulos intercromatinianos	25
Figura 12. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, estereopares	27
Figura 13. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, anáglifo.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de cuerpos nucleares	10
Tabla 2. Medidas de longitud de Clusters de la Figura 8	26
Tabla 3. Áreas y diámetros de gránulos individuales de la Figura 9	26

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EtOH	Etanol
ICG	Gránulos intercromatinianos
MET	Microscopio electrónico de transmisión ó Microscopía electrónica de transmisión
OsO ₄	Tetróxido de osmio
PBS	Amortiguador de fosfatos
poli [A]	Cola poliadenilada
pre-mRNA	RNA precursor
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
lncRNA	RNA largos no codificantes
microRNA	RNA micro
dsRNA	RNA de doble cadena
siRNA	RNA pequeño de interferencia
RNP	Ribonucleoproteínas
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterogéneos nucleares
snRNA	RNA pequeños nucleares
snRNP	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
UsnRNA	RNA pequeños nucleares ricos en uracilo
UsnRNP	Ribonucleoproteínas pequeños nucleares ricos en uracilo

RESUMEN

Los gránulos intercromatinianos son cuerpos nucleares que facilitan la interacción entre ácidos nucleicos y ribonucleoproteínas relacionadas con la maduración del pre-mRNA. Con microscopía de epifluorescencia e inmunomarcaje para factores de *splicing*, se observa una distribución de estos factores como un patrón moteado rodeado de un patrón difuso, cuya morfología se modifica en función de la actividad transcripcional. Con microscopía electrónica de transmisión estas motas se observan como cúmulos de aspecto fibrogranular, cuya morfología, distribución e interacción muestra las modificaciones del fenotipo en función de la expresión génica. El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar ultraestructuralmente los gránulos intercromatinianos y sus interacciones espaciales con las fibras de su entorno en hepatocitos de ratón mediante imágenes estereopares con microscopía electrónica de transmisión.

Se disecó el hígado de un ratón en trozos de 1mm^3 y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución de buffer de fosfatos. Una parte de las muestras se postfijaron con una solución de tetraóxido de osmio al 1% en agua bidestilada. Todas las muestras se deshidrataron en un gradiente de concentraciones porcentuales de etanol del 30% al 100%, seguido de óxido de propileno y su posterior inclusión en resina epóxica. Se verificó la adecuada conservación de los tejidos en cortes a 400nm teñidos con azul de toluidina. Para el análisis con el microscopio electrónico de transmisión se obtuvieron cortes de 60nm y se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh, cubiertas con colodión. Los cortes se contrastaron con la técnica general con acetato de uranilo y citrato de plomo y con el método regresivo de Bernhard preferencial para ribonucleoproteínas. Se obtuvieron electromicrografías de regiones del nucleoplasma con la presencia de cúmulos de gránulos intercromatinianos e imágenes en estereopares ($+10^\circ$ y -10°) que se procesaron digitalmente para generar anaglifos.

Las imágenes en estereopares permiten observar con profundidad la distribución ultraestructural de gránulos y fibras, así como, las interacciones entre ellos. En las imágenes generadas con esta técnica, se observó la distribución del material ribonucleoproteico en cúmulos de gránulos intercromatinianos de $0.19\text{-}0.76\mu\text{m}$ y gránulos individuales de $14.41\text{-}32.92\text{nm}$, los resultados sugieren que la ultra-arquitectura entre gránulos y fibras es en forma de collar de perlas o en forma de red. En las imágenes 3D algunas zonas de interacción entre gránulos y fibras sobresalen mientras que la nube fibrilar permanece en lo profundo.

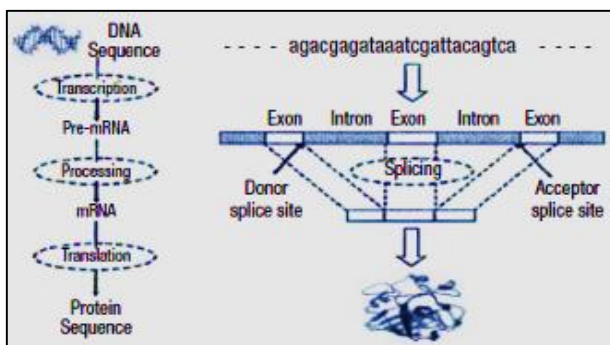
MARCO TEÓRICO

LA INFORMACIÓN GÉNICA EN LOS SERES VIVOS

La información biológica necesaria para construir y mantener la vida está almacenada y codificada en el genoma de cada organismo vivo con los que compartimos el planeta. Todos los genomas están formados de largas cadenas de nucleótidos conformando el ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA), cuyas secuencias codifican la información genética de los organismos. Dicha información fluye por diversas rutas, se libera y se utiliza de acuerdo a las necesidades de la célula, a esto se le denomina expresión génica (Louten 2016).

En eucariotas, el genoma nuclear se divide en un conjunto de moléculas muy largas de DNA organizadas y empaquetadas en cromosomas al momento de la división celular, o bien, en territorios cromosómicos en la interfase, cada cromosoma contiene un grupo definido de genes, cada gen es una secuencia de DNA que se transcribe a un RNA, si esta molécula contiene información para la síntesis de una proteína, corresponde a un RNA mensajero (mRNA), de lo contrario, corresponde a un RNA no codificante. En el mRNA, los genes son interrumpidos por regiones que no codifican a la proteína denominadas intrones, alternando con regiones que sí codifican información para la proteína denominadas exones (Figura 1) (Louten 2016).

Expresar y transcribir la información contenida en el genoma requiere de complejos procesos donde enzimas y proteínas actúan de manera coordinada. Inicialmente, el DNA debe ser transcrito a RNA mediante el proceso de la **transcripción** que se realiza en el núcleo celular. Posteriormente, el RNA es el mensaje que será leído en el ribosoma mediante el proceso de la **traducción**, que se lleva a cabo en el citoplasma, y cuyo fin es la síntesis de proteínas; ambos procesos ocurren durante toda la vida activa de la célula. Por otro lado, el proceso encargado de la perpetuación de la información genética se le



conoce como **replicación**, proceso que ocurre en el núcleo únicamente si la célula entra en la etapa de división (Aldecoa and Battilana 2007).

Figura 1. La síntesis del mRNA incluye el proceso de transcripción y de splicing del transcrito primario (Bari et al. 2012).

LA DIVERSIDAD DEL RNA

El RNA es un polinucleótido pequeño, en su mayoría de cadena simple, que puede tomar varias configuraciones intramolecularmente y cuya clasificación es la siguiente (Cech and Steitz 2014):

1. **RNA mensajeros:** Todos los RNA que codifican una proteína:
 - **RNA precursor** (pre-mRNA): Transcrito inicial que será procesado para madurar.
 - **RNA mensajero** (mRNA): Transcrito maduro que será exportado y traducido.
2. **RNA ribosomal** (rRNA): Forma parte de la estructura de los ribosomas
3. **RNA de transferencia** (tRNA): Transfiere aminoácidos en el proceso de traducción.
4. **RNA nucleares pequeños** (snRNA): Son moléculas de ~20 –200 nucleótidos, capaces de asociarse con proteínas.
 - **RNA nucleares pequeños ricos en Uridina** (UsnRNA): su principal función es en el proceso de splicing (Dreyfuss, et al. 1988)
 - **RNA nucleares pequeños nucleolares** (snoRNA): involucrados en la síntesis de ribosomas en el nucléolo (Shaw 2015).
5. **Otros RNAs:** RNA de interferencia cortos (siRNA), RNA micro (miRNA) (Michlewski and Cáceres 2019), RNA de doble cadena (dsRNA), entre otros: son reguladores de la expresión génica.

Ribonucleoproteínas (RNP's): También llamadas partículas ribonucleoprotéicas, son un conjunto de proteínas capaces de asociarse con los snRNA para formar snRNP (Hall 2017) (Figura 2B).

Proteínas de unión a RNA: Conjunto de proteínas con regiones de unión a RNA (Figura 2A) (Mitra 2019).

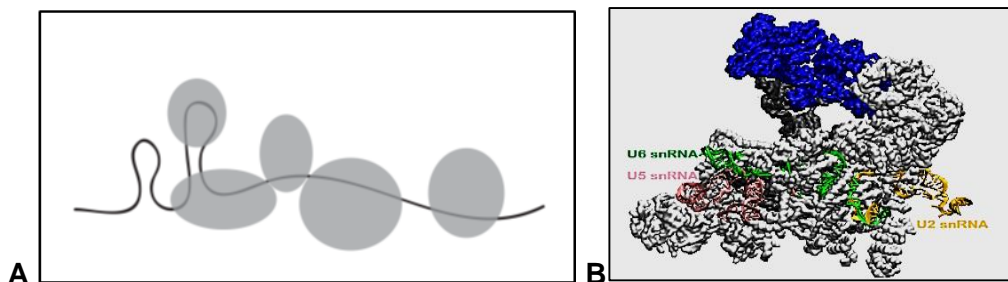


Figura 2. Asociaciones del RNA A) Esquema del RNA como andamio para varias proteínas de unión a RNA (gris) (Hogg and Collins 2008). B) Estructura 3D de una RNP. Se observa la asociación de U2snRNA(amarillo) U6snRNA (verde) y U5snRNA (rosa) con la proteína (gris) (Hall 2017).

LA TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

La transcripción es un proceso de transmisión de información, que consiste en la síntesis de RNA tomando como molde un fragmento de secuencia del DNA. En eucariotas, se divide en tres etapas:

1) Iniciación: Se lleva a cabo el ensamble del complejo de iniciación para la síntesis de los primeros nucleótidos de RNA, catalizado por la enzima RNA polimerasa cuya tarea es unirse al sitio promotor que se encuentra al inicio del gen, separar las dos cadenas de DNA formando una burbuja de transcripción, de la cual, se toma una de las cadenas de DNA como molde. **2) Elongación:** a partir de ese punto, la RNA polimerasa se desplaza a lo largo del molde, sintetizando por apareamiento de bases una cadena creciente de RNA complementaria a la cadena molde de DNA. **3) Terminación:** cuando se alcanza la secuencia terminal y se agrega la última base a la cadena de RNA, la burbuja de transcripción se colapsa y la RNA polimerasa y el RNA recién transcrito son liberados (Liu, et al. 2013).

Para el caso particular de genes que codifican proteínas, la enzima RNA polimerasa II es la responsable del proceso de transcripción, al producto inmediato se le denomina transcrito primario (pre-mRNA), es de cadena simple, un tanto inestable, dirección 5' a 3', éste requiere modificaciones postranscripcionales para formar el producto maduro (mRNA), y será ensamblado con RNP's para ser exportado hacia el citoplasma, donde actuará como un mensaje que será traducido a una proteína por el ribosoma (Matera and Wang 2014).

Los eventos de **modificación postranscripcional** del pre-mRNA son los siguientes:

- 1. Modificación de extremos:** se añade el nucleótido 7-metil guanosina (cap) al extremo 5' y una cola poliadenilada (poli [A]₋₁₀₀) al extremo 3' (Roundtree et al. 2017).
- 2. El *splicing*:** es el proceso de edición del pre-mRNA donde se cortan los intrones y se ligan los exones, ocurre de forma co-transcripcional y requiere de múltiples UsnRNA's y factores proteicos que se ensamblan en diferentes complejos (E, A, B y C) formando una estructura ribonucleoproteica conocida como ***spliceosoma*** (Figura 3), estructura dentro de la cual ocurren las reacciones químicas secuenciales de corte de intrones y unión de exones que dan como producto el mRNA maduro y la liberación de intrones que serán degradados (Morais, et al. 2021)(Kastner et al. 2019).

Las familias proteicas más importantes involucradas en el *splicing* son:

- **Las UsnRNP's:** Denominadas U1snRNA, U2snRNA, U4snRNA, U5snRNA y U6snRNA (U1, U2, U4, U5 y U6), son los principales bloques de construcción del *spliceosoma* y su interacción con el transcrito es estabilizada por proteínas SR y hnRNPs (Wahl, et al. 2009).
- **Las hnRNPs:** son estabilizadoras, es decir, se asocian al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases del mismo RNA, de ésta manera el pre-mRNA permanece accesible para interactuar con otras moléculas (Will and Lührmann 2011).
- **Las proteínas SR:** son una familia de proteínas con dominios ricos en serina y arginina y con sitios de unión a RNA, tienen funciones reguladoras en las regiones exónicas (Busch and Hertel 2012).

La regulación de la transcripción requiere complejos procesos de señalización que involucran diversas moléculas de RNA, proteínas y RNPs. La transcripción es controlada en la iniciación y en la terminación, donde los miRNA's, dsRNA's y siRNA's tienen acción inhibitoria sobre el mRNA y sobre el DNA (Rambout, et al. 2018).

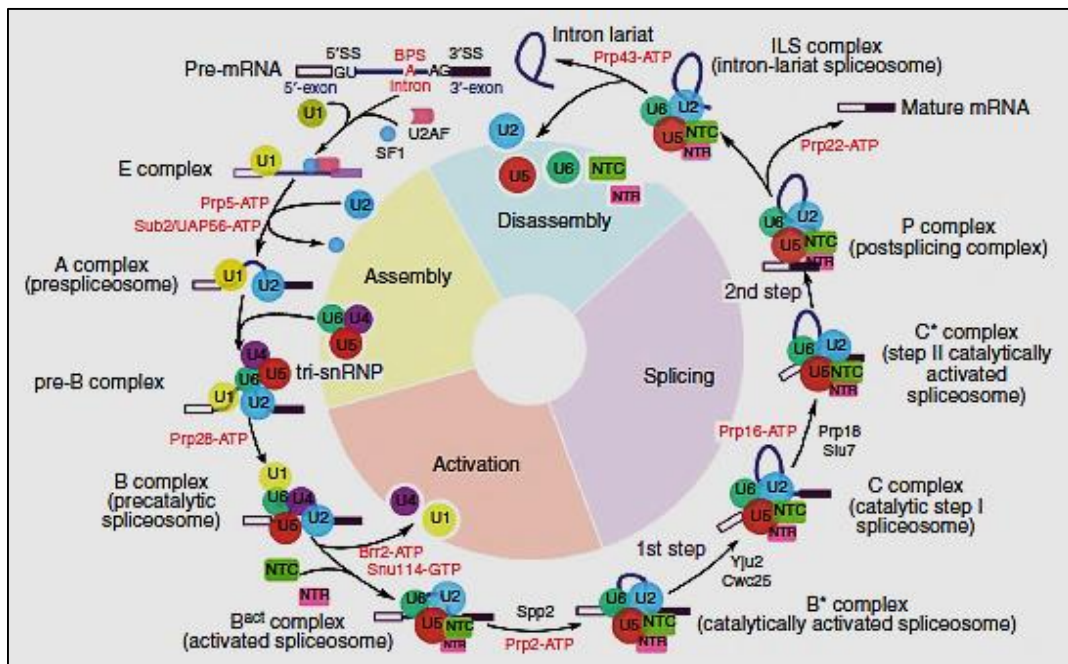


Figura 3. Etapas del *splicing*. Ensamblaje secuencial de los bloques U1, U2, U4, U5 y U6 para formar el *spliceosoma*, encargado de las reacciones químicas de corte de intrones y empalme de exones (Yan, et al. 2019).

ARQUITECTURA DEL NÚCLEO INTERFÁSICO

La organización espacial del núcleo favorece las reacciones bioquímicas de forma coordinada en un lugar confinado, carece de compartimentos delimitados por membranas, pero si cuenta con compartimentos funcionales denominados **territorios cromosómicos** donde la cromatina se distribuye, y **cuerpos nucleares** donde se segregan reacciones de la expresión génica (Pederson 2011)(Shah, et al. 2018).

La envoltura nuclear es una doble membrana que separa al núcleo del citoplasma, contiene poros y permiten el paso selectivo de material genético.

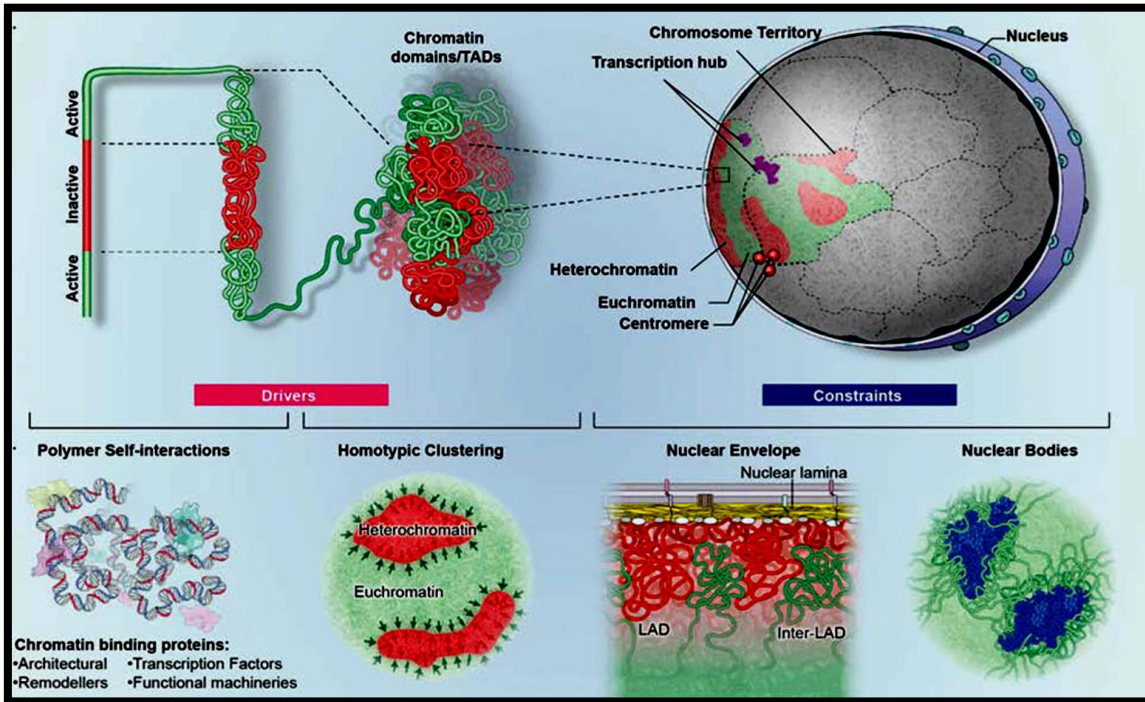
El nucleoplasma es el medio semilíquido, no homogéneo, en el interior del núcleo celular, en el que se distribuyen los ácidos nucleicos, la matriz nuclear, los cuerpos nucleares, proteínas, etc (Shevelyov and Ulianov 2019).

Lámina nuclear y matriz nuclear: son una red de proteínas filamentosas que proporcionan un andamio en el que los cromosomas pueden plegarse y permanecer reprimidos (Meldi and Brickner 2011)(Dechat et al. 2010).

La cromatina es el complejo de DNA genómico y proteínas cromosómicas, con una estructura jerárquica que va desde la fibra de cromatina que forma un nucleosoma (30nm) hasta la forma más compacta que son los cromosomas en metafase (Misteli 2020). En la interfase, la cromatina se reorganiza en **1) heterocromatina:** regiones compactas, transcripcionalmente inactivas, ubicadas en la periferia nuclear interna y en la zona perinucleolar (Sequeira-Mendes and Gutierrez 2016)(Thakur and Henikoff 2020), y en **2) eucromatina:** regiones menos compactas, transcripcionalmente activas, donde la cromatina interacciona con proteínas de expresión génica y de regulación contenidas en los cuerpos nucleares aledaños (Figura 4 A) (Ferrai et al. 2010).

Cuerpos nucleares: Denominados “gránulos de RNP’s” son sitios funcionales donde concentrados de lncRNA’s, proteínas y RNP’s se condensan y se disocian de acuerdo a las necesidades celulares (Mittag and Parker 2018). Funcionan como 1) sitios de reacción entre ácidos nucleicos y proteínas, 2) sitios de almacenamiento, modificación y reciclaje de RNA y RNP’s, y 3) como una capa adicional de regulación transcripcional, controlando el acceso de genes a factores reguladores de la expresión génica (Figura 4 B) (Courchaine, et al. 2016)(Li, et al. 2021).

A



B

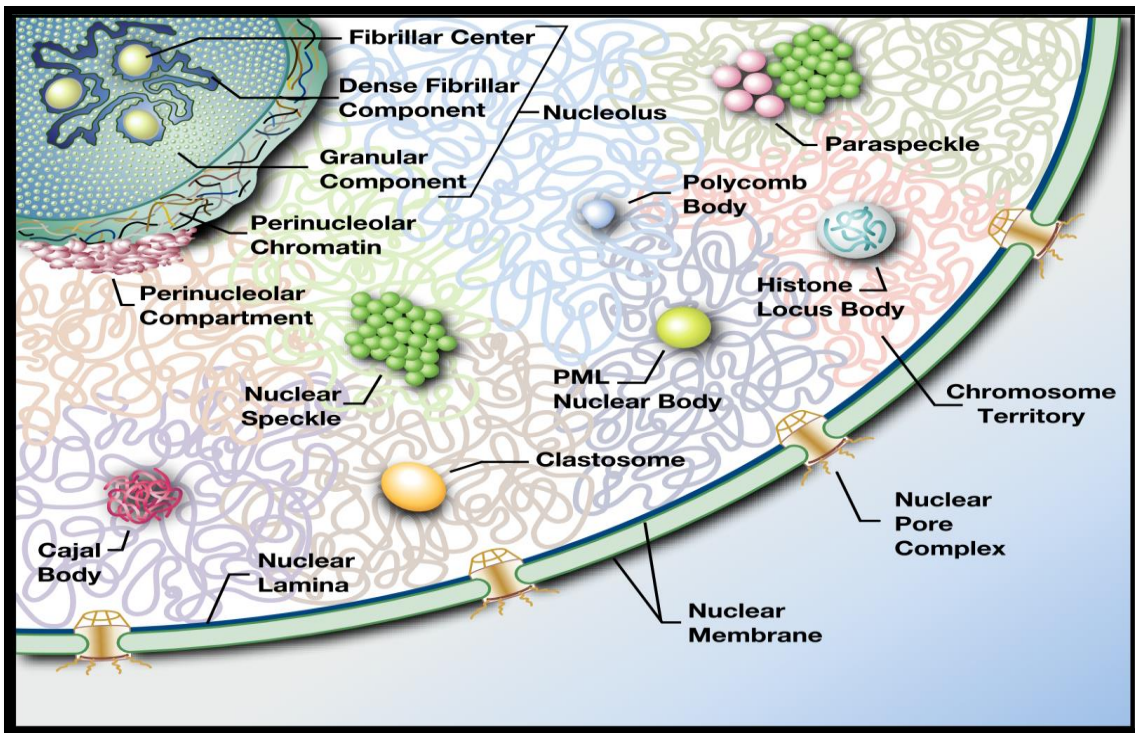


Figura 4. Organización del genoma eucariótico: A) dominios cromosómicos, eucromatina heterocromatina, espacios intercromatinianos, lámina nuclear y cuerpos nucleares (Misteli 2020) **B)** Diversidad de cuerpos nucleares (Mao, et al. 2011).

DIVERSIDAD DE CUERPOS NUCLEARES

Los cuerpos nucleares se distribuyen en los espacios de intercromatina entre las fibras de eucromatina y cerca de genes activos (D. L. Spector 2001), se caracterizan en función a su composición molecular, tamaño, forma, número, distribución nuclear y condición celular (normal, de estrés o patológica) (Dundr and Misteli 2010). Se ha comprobado que existe una red molecular de conexión y comunicación entre ellos (An, et al. 2021) (Hemmerich, Schmiedeberg, and Diekmann 2011).

Tabla 1. Caracterización de cuerpos nucleares (Mao, et al. 2011).

Nombre	No./cel	Tamaño μm	Componentes	Funciones
Cuerpos de Cajal	0-10	0.1-2.0	Coilina, SMN	Modificación de snRNAs y snoRNAs, ensamble y tráfico de snRNPs y snoRNPs, ensamble de la telomerasa y su regulación.
Clastosomas	0-3	0.2-1.2	Proteasoma 19S, 20S	Contiene proteasomas 20S y 19S, conjugados de ubiquitina y proteínas sustrato del proteasoma. Se forman en respuesta a estímulos que activan el proteasoma-dep de proteólisis.
Cuerpos de histonas	2-4	0.2-1.2	NPAT, FLASH	Transcripción y procesamiento de pre-mRNAs de histonas.
Speckles nucleares	25-50	0.8-1.8	SRSF2, SRSF1, Malat1	Almacenaje, ensamble y modificación de los factores de <i>splicing</i> del pre-mRNA
Cuerpos de estrés	2-10	0.3-3.0	HSF1, HAP	Contiene ncRNAs satélite III y es parte de la respuesta general de estrés.
Nucléolo	1-4	0.5-8.0	Maquinaria de RNA Pol I	Transcripción y procesamiento de rRNA y el ensamble de las subunidades ribosomales. Modificación y ensamble de otros RNAs y RNPs. Regula el ciclo celular secuestrando y modificando algunas proteínas.
Paraspeckle	10-20	0.5	PSP1, p54nrb, Men ϵ /B (Neat1)	Retención nuclear de mRNAs hipereditados A – I.
Compartimento perinucleolar	1-4	0.2-1.0	PTB, CUGBP	Funciones desconocidas.
Cuerpos PML	10-30	0.3-1.0	PML	En respuesta al estrés, defensa viral, estabiliza el genoma mediante el secuestro, la modificación y degradación de proteínas.
Cuerpos de policomb	12-16	0.3-1.0	Bmi1, Pc2	Contiene proteínas Policomb que regulan el silenciamiento de genes en <i>Drosophila</i> .

GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS

Los gránulos intercromatinianos (ICG), motas o *speckles* (en fluorescencia) son cuerpos nucleares dinámicos organizados en cúmulos o *clusters* distribuidos en los espacios de intercromatina, en la vecindad de sitios de transcripción activa y no activa también (Jiménez-García et al. 2007). Éstos responden a la activación de genes cercanos permitiendo la difusión de los transcritos nacientes a través de ellos o dispensando las proteínas hacia los sitios de transcripción, donde se llevan a cabo de forma alterna las reacciones de transcripción, maduración del pre-mARN y liberación del mRNA para su exportación (Liao and Regev 2021).

Desde la década de 1960 se descubrió mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión (MET) la presencia y distribución de los ICG en el núcleo y su naturaleza ribonucleoprotéica, desde entonces las investigaciones se enfocaron en la composición molecular de estos cuerpos para demostrar la hipótesis de su posible relación en el *splicing* como otra de sus funciones biológicas. Hasta 1991, Spector y colaboradores demostraron, mediante inmunolocalización en células HeLa con microscopía de barrido láser confocal y MET, la distribución del factor de *splicing*, la proteína SC-35, en la región de los ICG y fibrillas de pericromatina, esto demostró, primero, que el patrón moteado formado por los factores de *splicing* observado anteriormente mediante microscopía de fluorescencia corresponde a las ultraestructuras previamente designadas como ICG y fibrillas de pericromatina observadas en MET; en segundo lugar, se propuso que los ICG son orgánulos subnucleares involucrados en el ensamblaje del *esplíceosoma* (D.L. Spector, et al. 1991). Posteriormente en 1993, Jiménez-García y Spector identificaron, mediante hibridación *in situ* e inmunofluorescencia en células HeLa infectadas con Adenovirus, la misma redistribución nuclear entre los transcritos del RNA viral, factores de *splicing*, la RNA polimerasa II y otros RNP's, demostrando que el proceso de transcripción y *splicing* están vinculados tanto temporal como espacialmente en el núcleo, por lo que se sugirió la existencia de un mecanismo regulado de reclutamiento de los factores de *splicing* en respuesta a la activación de la transcripción (Jiménez-García and Spector 1993). En seguimiento a lo anterior, Misteli y colaboradores (1997) demostraron, mediante microscopía de fluorescencia en células BHK, que el patrón moteado es dinámico, es decir, los factores de *splicing* abandonan las motas hacia los nuevos sitios de transcripción, específicamente cuando se activan genes cercanos, lo que se observa como un halo difuso en la periferia de la mota; esto demuestra que otra de las funciones de las motas es suministrar factores de *splicing* hacia los genes activos aledaños (Misteli, et al. 1997). George-Téllez y colaboradores (2002) realizaron otro estudio enfocado en la redistribución del patrón moteado en base a la actividad transcripcional en un modelo murino, utilizando inmunofluorescencia y microscopía confocal, realizaron la inmunolocalización de los factores de *splicing* en varios tejidos celulares (hígado, páncreas, intestino, bronquios y útero), encontraron que el patrón moteado conserva características similares en los distintos tejidos con variaciones en número, distribución y tamaño, y demostraron que las motas en células uterinas cambian de una forma circular en ausencia de estradiol a una forma irregular cuando se induce la transcripción en presencia de la hormona (George-Téllez et

al. 2002). Los mismos resultados se han demostrado en una amplia gama de especies incluyendo plantas (Muñoz-Díaz and Sáez-Vásquez 2022) (Ilik and Aktaş 2021).

Actualmente, en el contenido molecular de los ICG se han identificado ~350 proteínas, siendo las más abundantes MALAT1 (un lncRNA que sirve de andamiaje para la formación del gránulo), factores de *splicing*, snRNP, hnRNP, proteínas SR (SC35), SON, subunidades de la RNA polimerasa II, PABII y RNA poli[A]+ (Galganski, et al. 2017)(Mintz and Spector 2000).

A partir de este contenido se han propuesto las siguientes funciones:

1. Son centros de expresión y regulación génica: optimizan las reacciones de maduración del pre-mRNA mediante el acceso a los factores de modificación postranscripcional y de regulación génica (Mora et al. 2022).
2. Promueven la homeostasis del nucleoplasma: mediante el almacenamiento de los factores transcripcionales y demás proteínas y RNAs.
3. Son sitios de control de calidad antes de la exportación del mRNA (Faber, et al. 2022).

Al observarse con el microscopio electrónico de transmisión (MET), las motas corresponden a los cúmulos de ICG (Figura 5B) (Lamond and Spector 2003). Tienen apariencia de grupos de gránulos pequeños esféricos y fibrosos, conectados por finas fibras (David L. Spector and Lamond 2011)(Gordon, et al. 2021). El tamaño del gránulo varía de 20–25 nm de diámetro, el tamaño del cúmulo ~ 0.3 –3 μm y el número de cúmulos va de 20 a 50 por núcleo. El tamaño del cúmulo es variable y su forma es irregular y dinámica de acuerdo a la actividad o estrés celular, es decir, cuando se activa la transcripción, los cúmulos cambian de su forma redondeada sin zonas fibrosas a forma irregular rodeados de zonas fibrosas (Chen and Belmont 2019).

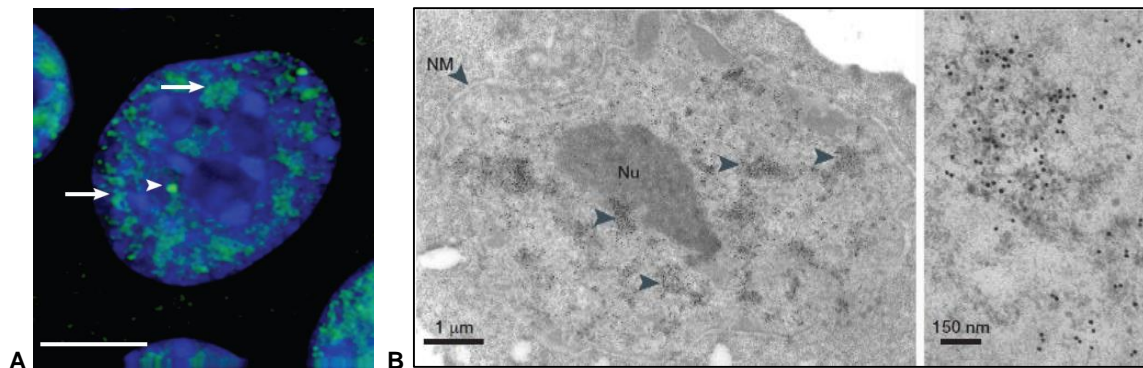


Figura 5. Gránulos intercromatinianos A) Inmunolocalización de ICG (verde) por fluorescencia B) Inmunolocalización de ICG por MET, izq: flechas señalan varios cúmulos, der: acercamiento a un cúmulo (Lamond and Spector 2003).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

La MET ha sido la principal herramienta de investigación para el análisis de la morfología de orgánulos desde 1950. El MET es un instrumento de alta resolución que utiliza un haz de electrones como fuente de radiación y campos electromagnéticos como lentes. Este instrumento produce imágenes a partir de que un haz de electrones que atraviesan una capa muy delgada de muestra, alcanzando un poder resolutivo de 0.2nm (Malatesta 2021). Algunos MET actuales hacen posible la construcción de imágenes 3D mediante la obtención de dos micrografías del mismo campo, denominadas “par estéreo”, tomadas desde dos inclinaciones diferentes (8°- 20°), un software puede convertir el par estéreo en un anáglifo para obtener la conformación tridimensional (Agudo Jácome et al. 2018).

En el caso de muestras biológicas, es necesario añadir contrastantes a base de tetróxido de osmio (OsO_4), citrato de plomo y acetato de uranilo para evidenciar estructuras como membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Cheville and Stasko 2014). En 1969, Monneron y Bernhard crearon un método de contraste preferencial que permite distinguir el RNA que forma parte de RNPs y discrimina al resto de proteínas y ácidos nucleicos que no tienen asociación con RNA. El fundamento se basa en contrastar con acetato de uranilo ácidos nucleicos y proteínas, después se adiciona EDTA, que es un quelante que atrapa todo el uranio excepto el que se une con RNA, después se agrega citrato de plomo para aumentar la electrodensidad de las estructuras que conservaron el uranio. De esta manera, se verán contrastadas únicamente fibras de RNA y todos los cuerpos nucleares que contengan RNPs. Este método de contraste, ha permitido describir finamente los ICG entre otros cuerpos nucleares (Monneron and Bernhard 1969).

Otras técnicas de citoquímica ultraestructural han sido desarrolladas para el estudio de la composición y función de los ICG y las fibras pericromatinianas (Fakan 2004): 1) la digestión enzimática: el tratamiento con DNAsas y RNAsas permitió describir los remanentes nucleares como la ultraestructura de fibras de RNPs como una red con anclaje a la lámina nuclear (Herman, et al. 1978), 2) la autoradiografía: la marcación radioactiva con [^3H]Uridina del hnRNA reveló su localización en la región de fibras de RNA (Herman, et al. 1978), 3) la inmunodetección: el marcador de RNA Br-UPT en células en cultivo ha permitido observar que el reclutamiento de factores de *splicing*, la poliadenilación y la localización del RNA naciente suceden en las fibras pericromatinianas (Cmarko et al. 1999), y 4) la hibridación *in situ*: sondas para U1, U2 snRNA y RNA poly[A]⁺ en células infectadas con virus han permitido ubicar su localización en las fibras pericromatinianas, concluyendo que éstas son

la expresión morfológica *in situ* de los transcritos nacientes en proceso de *splicing*, es decir, son los sitios de transcripción. También se ha confirmado que los ICG son reservorios de RNPs, además de tener funciones en la exportación del RNA poly[A]⁺ (Puvion-Dutilleul et al. 1994)(Puvion and Puvion-Dutilleul 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que los ICG ya han sido caracterizados mediante inmunofluorescencia y con diversas técnicas de MET, pocos estudios se han enfocado en la interacción que existe con las fibras intercromatinianas, una forma de abordar el análisis de estas interacciones es mediante la reconstrucción tridimensional o por análisis de imágenes en estereopares. En este trabajo se pretende ampliar los hallazgos de la ultra-arquitectura entre gránulos y fibras en un análisis a distinta profundidad en un corte menor a 60nm.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Las imágenes en estereopares obtenidas mediante MET nos permitirán observar la interacción entre los ICG y el ambiente fibrilar?

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios sobre los ICG han sido desarrollados mediante microscopía de fluorescencia en núcleos de células animales en cultivo (Hela y otras). Pocos estudios han observado la presencia de este patrón nuclear en tejidos de diferentes órganos de mamíferos como el hígado, el páncreas, el útero; y de otros vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves, entre otros. Dichos estudios han demostrado que los ICG se conservan de forma universal, salvo algunas variaciones en su organización y en su morfología (Segura-Valdez et al. 2007)(Acosta-Cárdena, et al. 2022).

Es de nuestro interés el ratón por ser el principal modelo mamífero que funge como control de manera estándar en estudios experimentales, y el hígado por ser un órgano con un metabolismo de constante actividad donde encontramos células con núcleos grandes mayormente eucromáticos, con una alta tasa de transcripción. Nuestro análisis se concentra en describir a detalle, la morfología y la distribución de los ICG, así como, su interacción con su ambiente fibrilar. Para el último punto, los estereopares son la técnica más adecuada, debido a que el objeto de estudio, son gránulos esféricos de 20-25nm, por lo tanto, quedan inmersos en el espesor de un solo corte de 45-60nm de muestra.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la ultraestructura de los gránulos intercromatinianos y su interacción con su entorno fibrilar en núcleos interfásicos de hepatocitos de ratón mediante imágenes en estereopares con microscopía electrónica de transmisión.

Objetivos específicos

1. Ubicar la región intranuclear en la que se distribuyen los ICG.
2. Describir el número, tamaño y forma de los ICG y de los gránulos individuales que los componen.
3. Obtener imágenes estereopares a $+10^\circ$ y -10° de inclinación en el MET.
4. Describir la interacción de los gránulos con su entorno fibrilar.

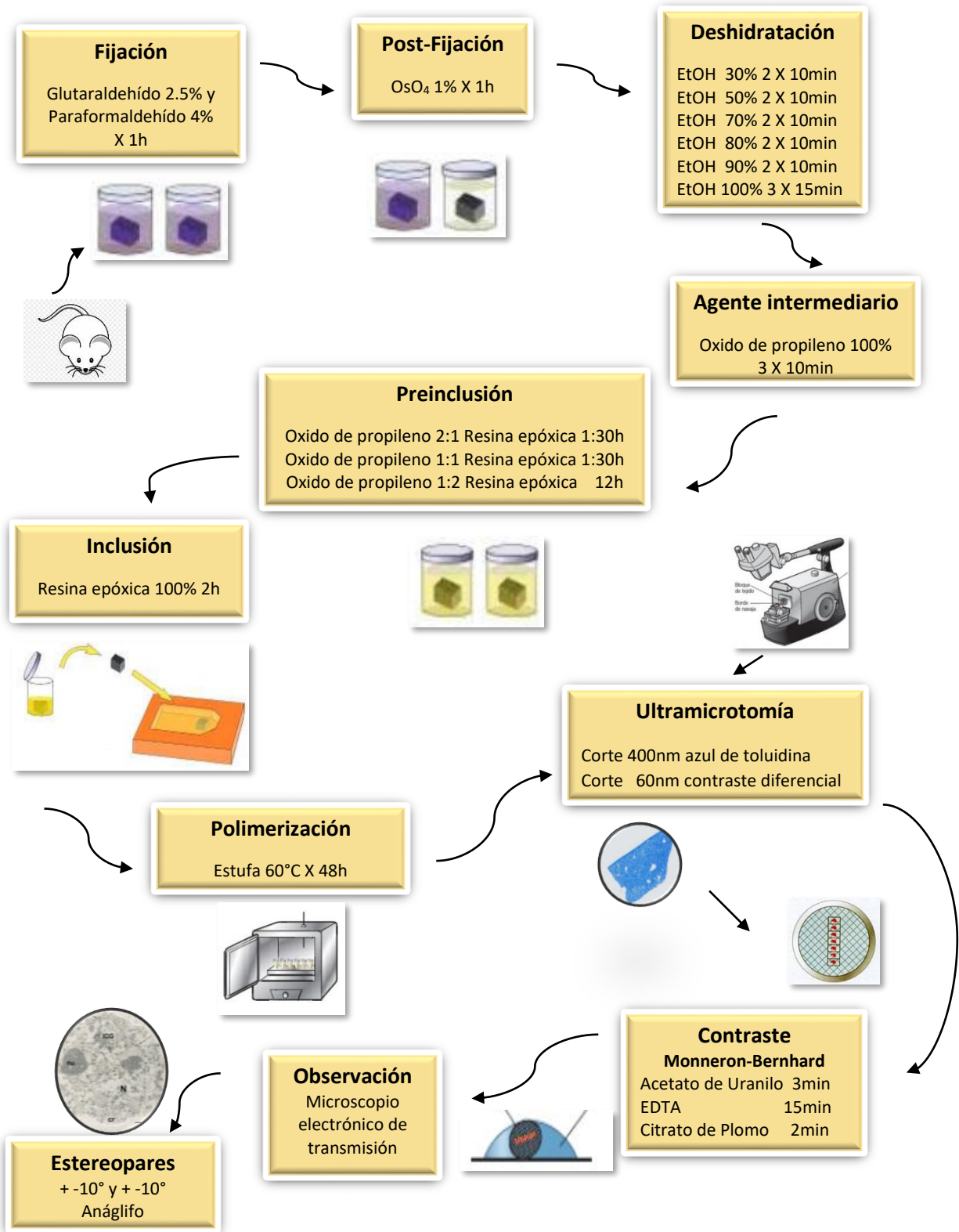
HIPÓTESIS

La ultraestructura de gránulos intercromatinianos y su interacción con su ambiente fibrilar se observará en imágenes estereopares mediante microscopía electrónica de transmisión en núcleos de hepatocitos de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de la muestra: sacrificar a un ratón BALB/C, hembra, de seis meses de edad, en etapa post-gestante, de acuerdo con los lineamientos universitarios de bioética sobre el uso de animales de experimentación. Obtener una porción del hígado en trozos de máximo 1mm³ y colocarlos en dos viales, uno para posfijación con tetróxido de osmio (OsO₄) y el otro sin OsO₄.
2. Fijación: fijar por inmersión en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% durante 1hr, enjuagar con PBS 0.1M durante 5min por triplicado, únicamente un vial se fijará en OsO₄ al 1% durante 1hr, enjuagar con PBS durante 5min por triplicado.
3. Deshidratación: agregar etanol (EtOH) en concentraciones graduales, empezando por EtOH 30%, 50%, 70%, 80%, 90% durante 10min por duplicado y EtOH al 100% durante 15min por triplicado.
4. Inclusión: Agregar óxido de propileno durante 10min por triplicado, agregar una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica en proporción 1:2 respectivamente durante 1:30hr, adicionar la misma mezcla en proporción 1:1 durante 1:30hr, continuar con una proporción 2:1 toda la noche, abrir los viales para eliminar el resto de óxido de propileno y finalmente, adicionar resina epóxica al 100% durante 2hr.
5. Polimerización: incluir los tejidos en los moldes en resina epóxica al 100%, etiquetarlos e introducirlos en la estufa a 60°C durante 48hr.
6. Ultramicrotomía: realizar cortes en el ultramicrotomo (Leica Ultracut) a 400nm y teñir con una mezcla de azul de toluidina y fucsina básica al 1% para observación de la estructura y conservación del tejido. Posteriormente realizar cortes de 50 a 60nm, de color gris, para montar en rejillas de cobre con película de colodión.
7. Contraste: realizar contraste sobre una gota con acetato de uranilo al 4% durante 3min, enjuagar con agua destilada, colocar en EDTA 1% 0.2M durante 15min, enjuagar con agua destilada, colocar en acetato de plomo al 3% durante 2min y enjuagar con agua destilada.
8. Micrografías electrónicas: Observar al MET (JEOL 1010) enfocar las áreas con ICG y tomar estereopares del mismo campo a +10° y -10°, +20° y -20°.
9. Generación de anáglifos con el software Photoshop imagen 3D e ImageJ (FIJI) para la medición de gránulos.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

1. Estructura y conservación del tejido hepático.

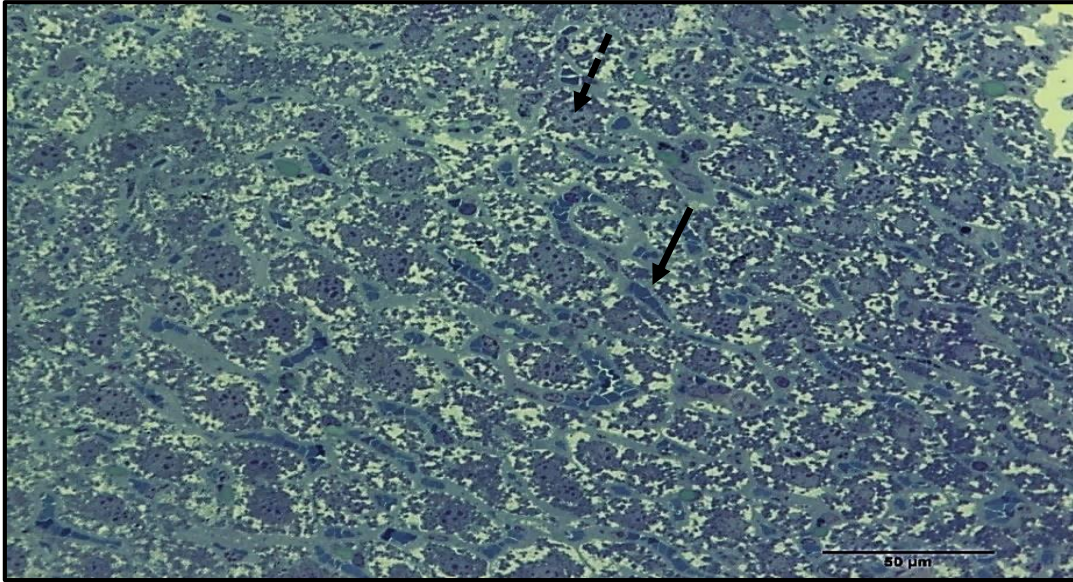


Figura 6. Estructura y conservación del tejido hepático. Fotomicrografía de campo claro de hígado de ratón fijado en glutaraldehído, incluido en resina epóxica y teñido con azul de toluidina/fucsina B, aumentos 40x, corte a 400nm. Hepatocitos con formas poliédricas, ordenados radialmente, sinusoides poco abiertos (flecha negra), núcleos redondos a ovalados (flecha punteada), citoplasma claro con zonas granulares, sin rasgos de necrosis o mala fijación.

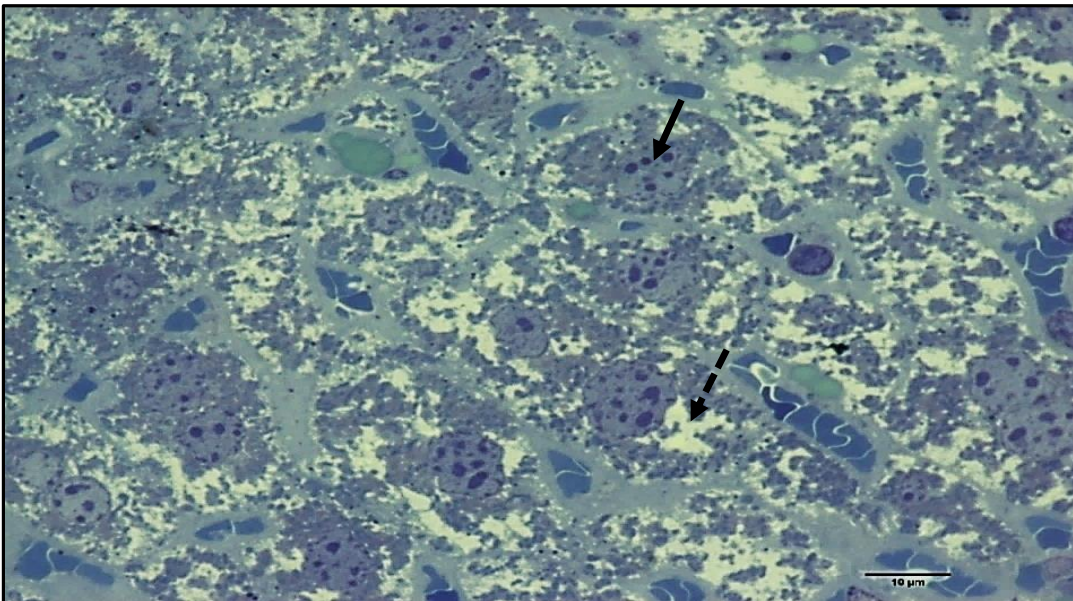


Figura 7. Estructura y conservación del hepatocito. Fotomicrografía de campo claro de hígado de ratón fijado en glutaraldehído, incluido en resina epóxica y teñido con azul de toluidina/fucsina B, aumentos 100x aceite de inmersión, corte a 400nm. Hepatocitos con forma cuadrada en su mayoría, núcleos (flecha negra) redondos eucromáticos, con múltiples nucléolos, algunos núcleos en pares, citoplasma claro (flecha punteada) con zonas granulares correspondientes a retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocondrias, vacuolas e inclusiones lipídicas.

2. Estructura nuclear con diferentes contrastes.

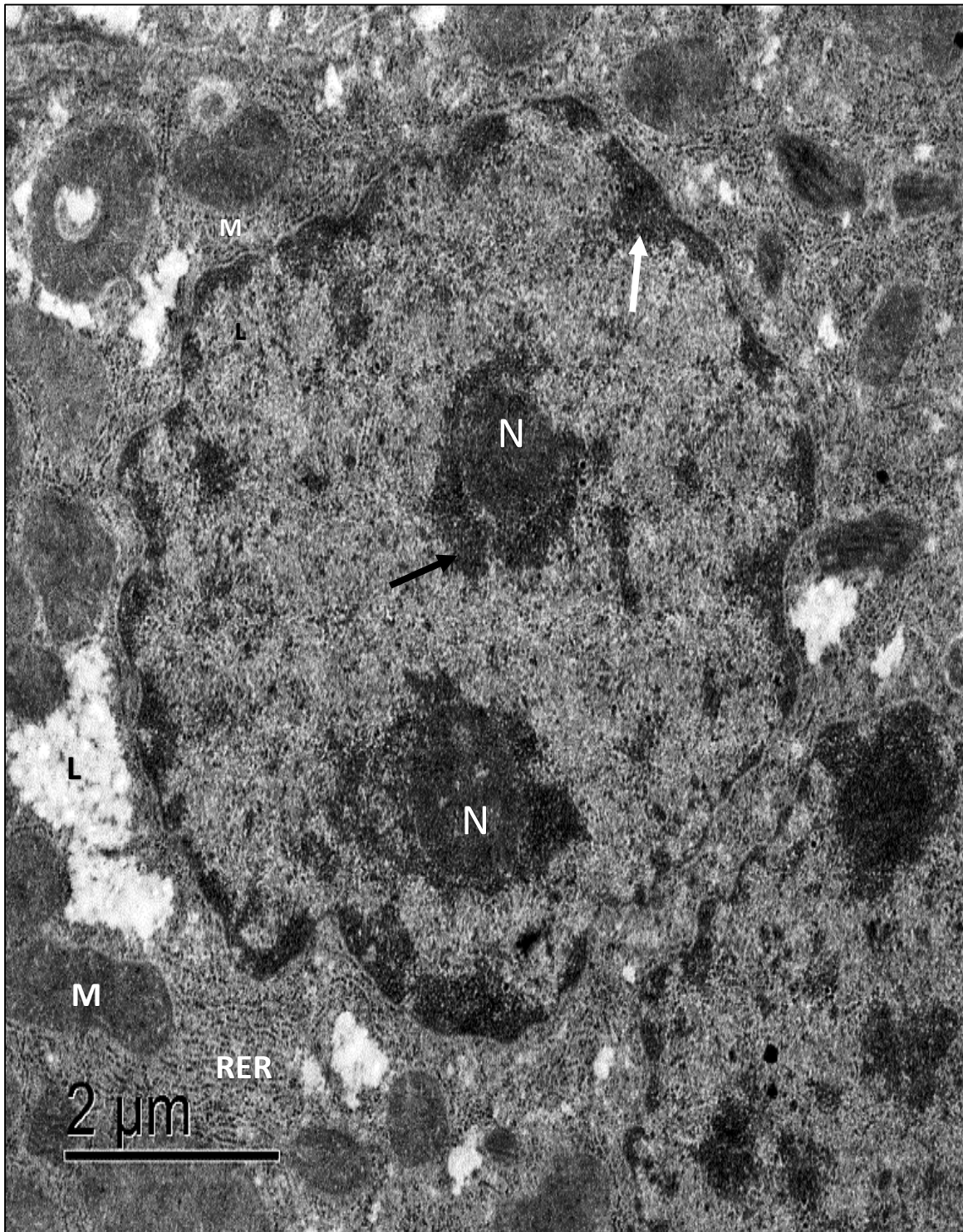


Figura 8. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, contraste con Ur-Pb. Los complejos membranosos como la membrana nuclear y parte del RER con sus ribosomas son visibles, organelos como las mitocondrias (M) y algunos cuerpos lipídicos (L). Dentro del núcleo sobresalen los nucléolos (N) rodeados de cromatina perinucleolar (flecha), la cromatina en la periferia interna de la envoltura nuclear (flecha blanca), el nucleoplasma tiene aspecto fibro-ganular.

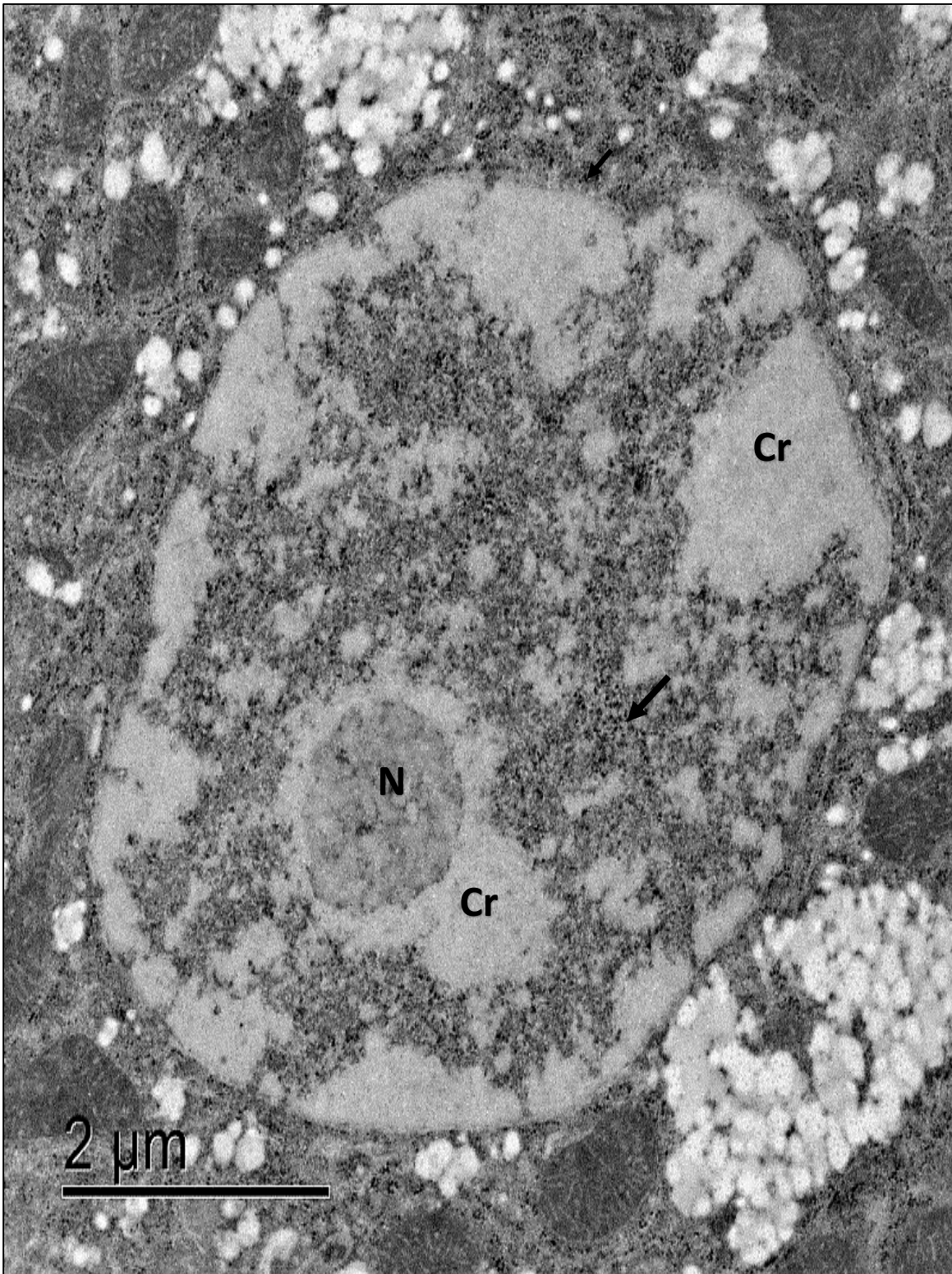


Figura 9. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs. La cromatina perinuclear (Cr) y perinucleolar se observa quelada en color gris claro, el contraste en el nucleoplasma corresponde a los espacios intercromatinianos donde abunda RNA y RNPs, tiene aspecto granular (más electrodenso) y fibrilar (menos electrodenso), los ICG se logran observar puntillizos y electrodensos (flecha), las estructuras granulares del nucléolo (N) también se contrastan.

3. Cúmulos de gránulos intercromatinianos

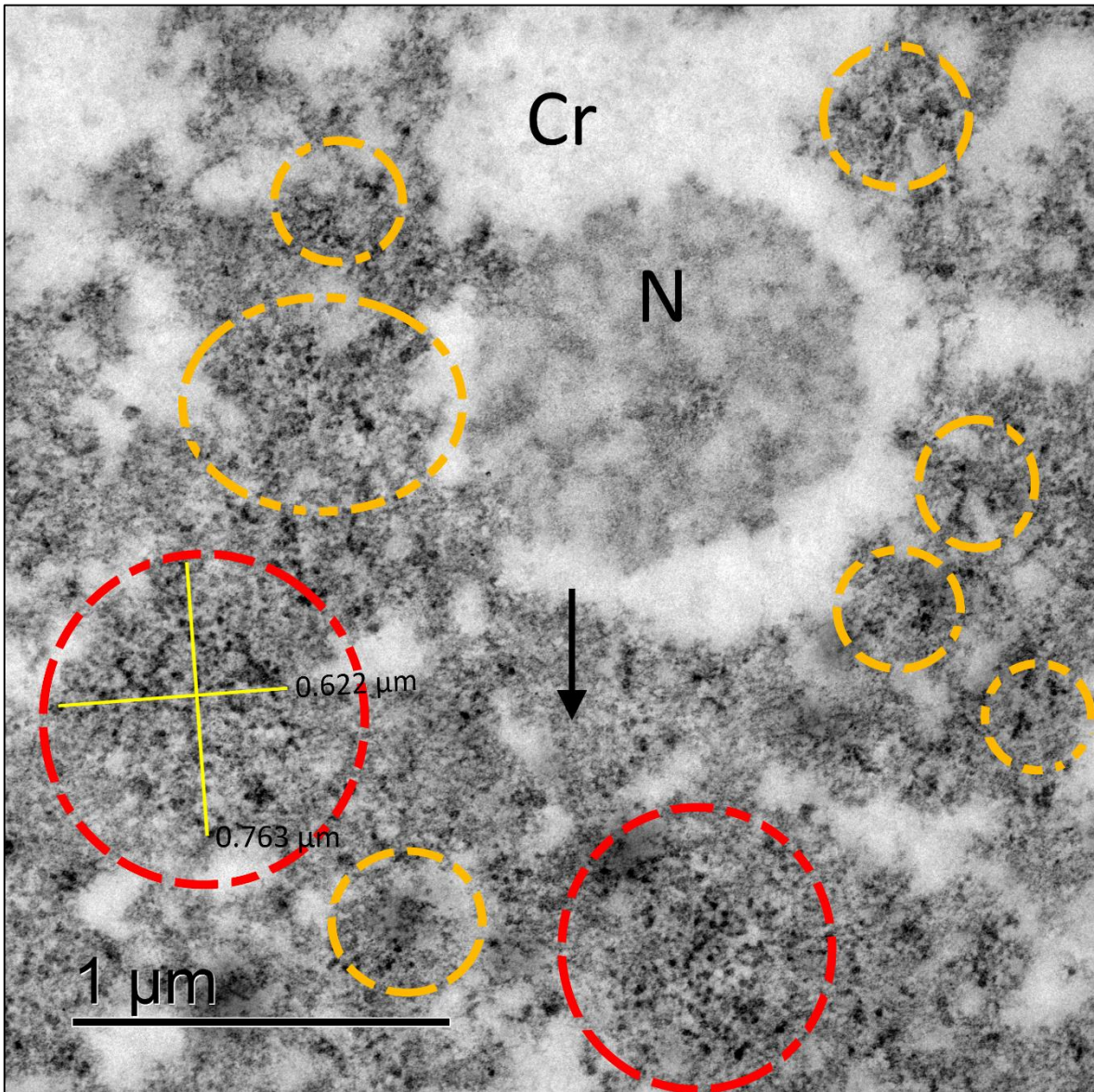


Figura 10. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, cúmulos de gránulos intercromatinianos, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs. En este acercamiento al núcleo interfásico, son evidentes múltiples cúmulos de gránulos muy electrodensos hacia el interior del núcleo en los espacios de intercromatina, su tamaño es muy variable, en su mayoría los cúmulos pequeños son polimorfos y más dispersos (marca amarilla), los cúmulos más grandes tienden a ser redondos (marca roja), inmersos en un ambiente fibrilar en tono gris (flecha), la variación de densidades de RNPs en el nucléolo (N) son evidentes, cromatina perinucleolar blanqueada (Cr).

4. El interior de un cúmulo de ICG, gránulos individuales y fibras intercromatinianas

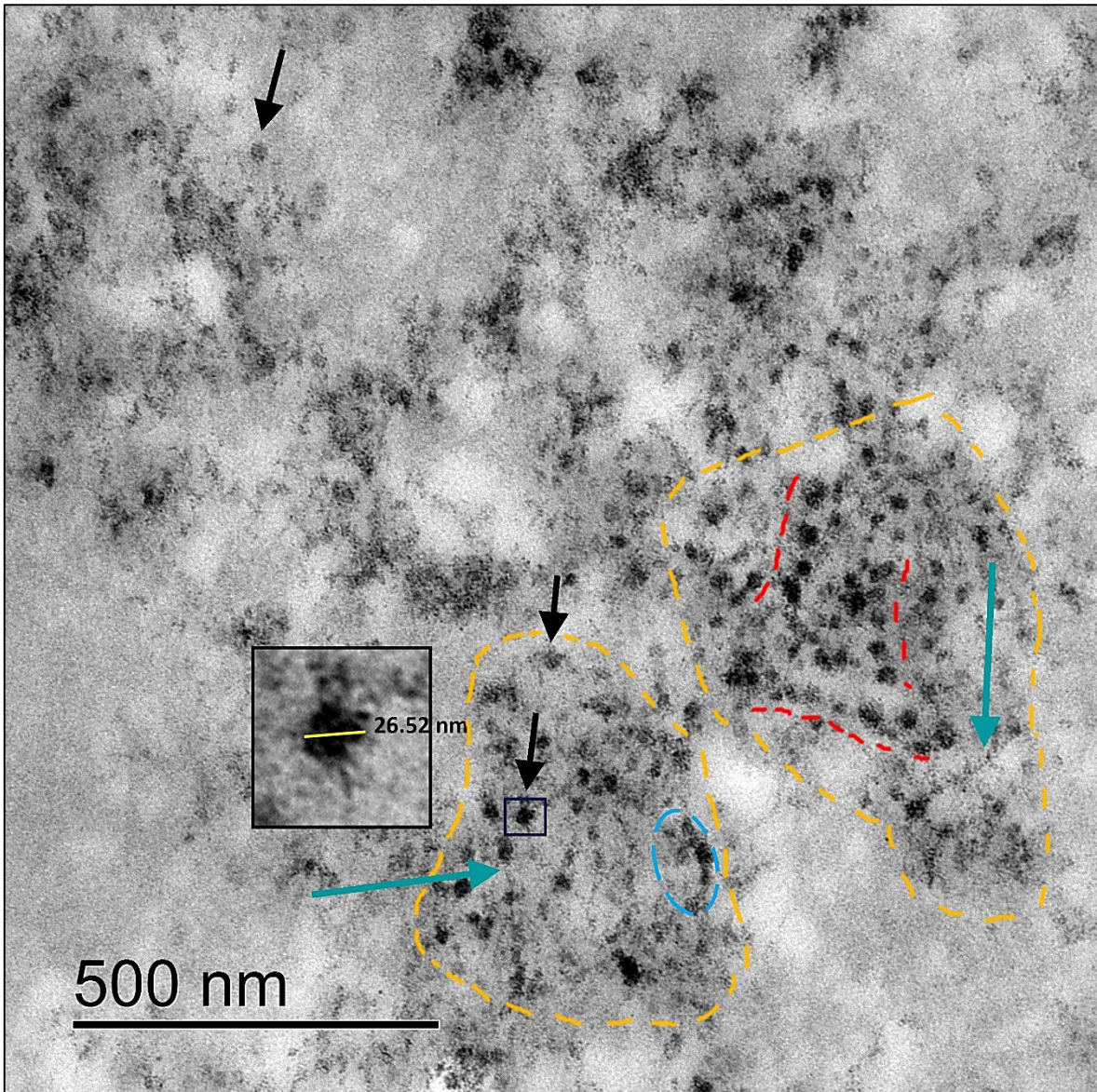


Figura 11. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, gránulos intercromatinianos, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs. Vista de dos cúmulos grandes (marca amarilla), los ICG se componen de gránulos individuales (flecha corta) que varían en electrodensidad, de tamaño homogéneo, inmersos en un ambiente fibrilar de menor electrodensidad (tono gris), tienen aspecto de permanecer agrupados, algunos se observan alineados (marca roja), en su mayoría unidos por finas fibras (flecha larga), en otros casos los gránulos parecen proyectar dichas fibras en forma de brazos hacia otras regiones u otros gránulos (marca azul).

Tabla 2. Medidas de longitud de cúmulos de la Figura 8.

# cúmulo	Longitud alto (μm)	Longitud ancho (μm)
1	0.76	0.62
2	0.71	0.63
3	0.50	0.54
4	0.42	0.35
5	0.27	0.35
6	0.27	0.30
7	0.22	0.19
8	0.21	0.15
9	0.20	0.18
10	0.19	0.19

Tabla 3. Áreas y diámetros de gránulos individuales de la Figura 9

Gránulo (n)	Área (nm ²)	Diámetro (nm)	Gránulo (n)	Área (nm ²)	Diámetro (nm)
1	851.18	32.92	27	447.74	23.88
2	788.96	31.69	28	447.74	23.88
3	749.37	30.89	29	447.43	23.87
4	739.63	30.69	30	443.97	23.78
5	726.75	30.42	31	408.15	22.80
6	655.11	28.88	32	398.72	22.53
7	653.23	28.84	33	396.84	22.48
8	651.34	28.80	34	394.95	22.42
9	612.70	27.93	35	394.64	22.42
10	572.16	26.99	36	394.01	22.40
11	566.19	26.85	37	378.93	21.97
12	563.68	26.79	38	366.68	21.61
13	552.37	26.52	39	364.79	21.55
14	525.98	25.88	40	355.05	21.26
15	525.03	25.86	41	314.83	20.02
16	517.49	25.67	42	312.00	19.93
17	508.07	25.43	43	312.00	19.93
18	501.47	25.27	44	312.00	19.93
19	501.47	25.27	45	311.06	19.90
20	485.44	24.86	46	282.78	18.97
21	478.85	24.69	47	265.82	18.40
22	471.30	24.50	48	262.99	18.30
23	471.30	24.50	49	248.85	17.80
24	469.42	24.45	50	163.07	14.41
25	467.53	24.40	Media	469.88	24.15
26	463.14	24.28	Desvest	149.56	3.90

5. Estereopares de gránulos intercromatinianos

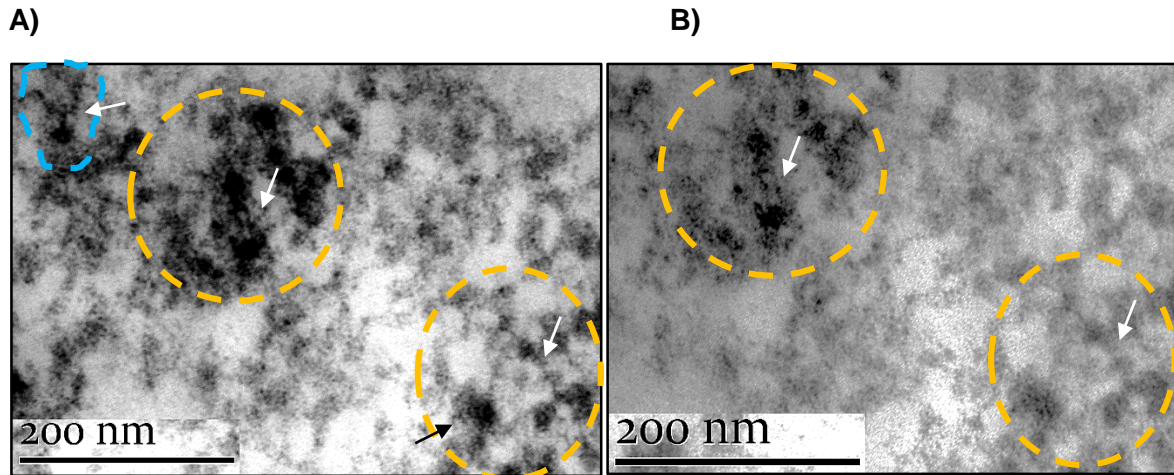


Figura 12. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, estereopares, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs. Estereopares de gránulos individuales a A) -10° y B) $+10^\circ$ de inclinación, las regiones circuladas en amarillo señalan sitios de interacción entre gránulo y fibra (flecha), se observan cambios sutiles en algunas interacciones cuando se cambia de ángulo, en A) se observa la interacción de un gránulo con una fibra ramificada (círculo azul).

6. Anaglifo de gránulos intercromatinianos

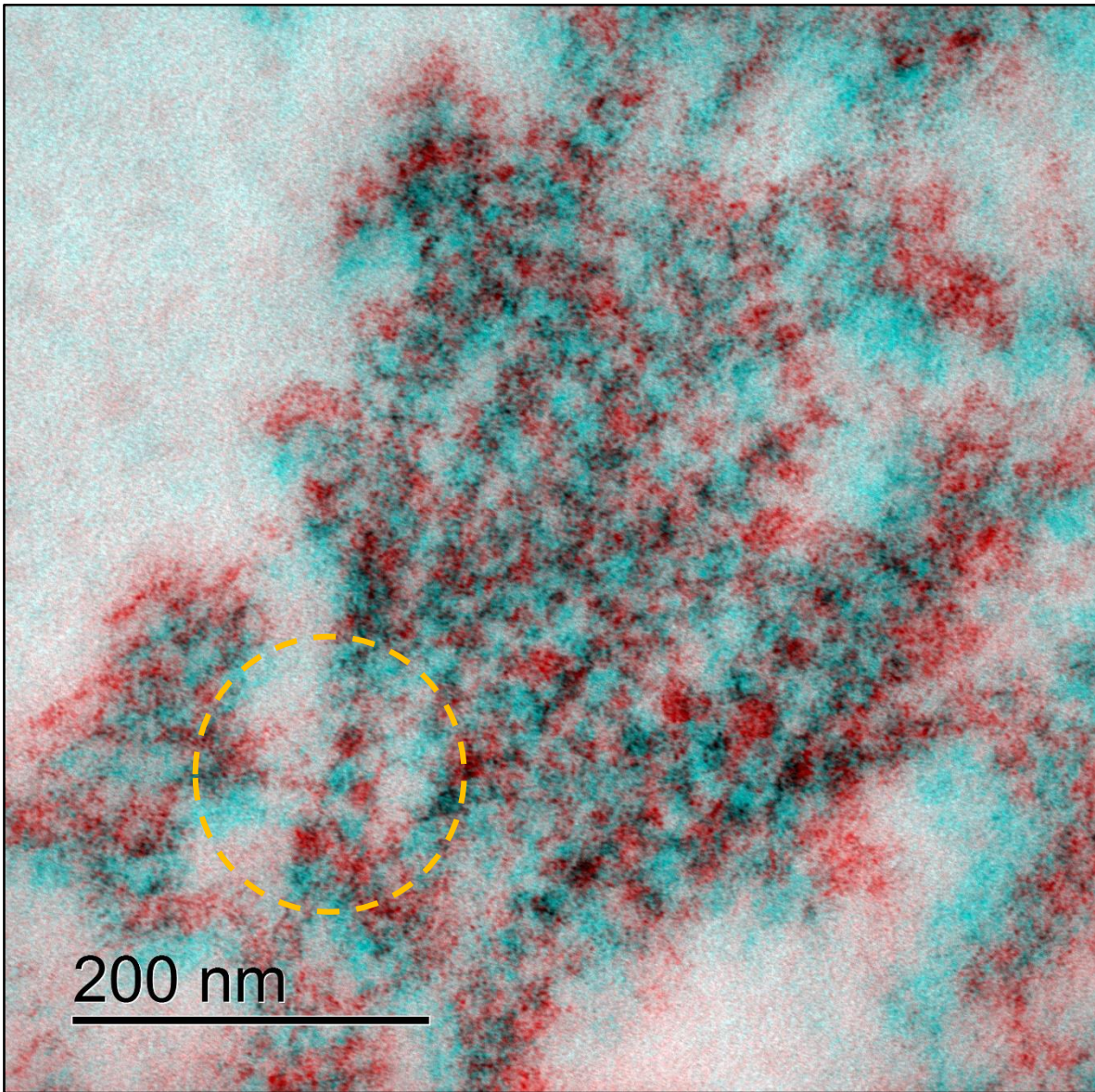


Figura 13. Micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, anaglifo, contraste regresivo con Ur-EDTA-Pb diferencial para RNPs. Anaglifo elaborado a partir de estereopares de gránulos individuales a -20° y $+20^\circ$ de inclinación, las regiones circuladas en amarillo señalan sitios de interacción entre gránulo y fibra, se observan varias fibras proyectadas de un solo gránulo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los hepatocitos, en condiciones normales, tienen forma poliédrica, con núcleos grandes y redondos, con uno o dos nucléolos evidentes, se organizan en cordones rodeados de sinusoides y canaliculos, y una de sus funciones más importantes es la de acumular glucógeno, esto se observa como gránulos en el citoplasma. En la fotomicrografía de la Figura 6, a 40X aumentos, teñida con azul de toluidina, se observa una densidad homogénea de hepatocitos similares en el parénquima, con una distribución acordonada y radial, rodeados de sinusoides poco abiertos con eritrocitos, algunos conductos son evidentes, núcleos redondos a ovalados y citoplasma con zonas claras, probablemente por inclusiones lipídicas y vacuolas, y zonas azules de aspecto granular correspondientes a múltiples mitocondrias, RER y glucógeno, el color claro puede indicar acarreo o extracción de componentes citoplásmicos. No se observan rasgos de hipoxia o necrosis por mala fijación como exceso de vacuolas o deformación del tejido. En la fotomicrografía de la Figura 7 a 100X, se observa con mayor claridad una densidad uniforme de hepatocitos de morfología cuadrada, con núcleos centrales y otros en pares, muy unidos entre sí, eucromáticos y con múltiples nucléolos. Estos resultados corresponden a lo reportado en la literatura como estructura normal del tejido hepático (Si-Tayeb, et al. 2010).

Para complementar la buena conservación celular a nivel ultraestructural, la postfijación con OsO_4 revela la conservación de membranas y organelos membranosos. En la Figura 8 observamos un corte ultrafino a 60nm con contraste convencional de Uranilo – Plomo, correspondiente a una panorámica del núcleo de un hepatocito, libre de artefactos puntillizos por precipitados de OsO_4 , la conservación de las membranas es evidente, por ejemplo, se percibe la membrana nuclear que se continúa con algunas regiones del RER con ribosomas insertados evidentes, múltiples mitocondrias de tamaño y forma normal, no hinchadas, con crestas evidentes y algunos cuerpos lipídicos electrolúcidos. Dentro del núcleo se observa un nucleoplasma de aspecto fibrilar y granular, con zonas eucromáticas electrolúcidas, sobresalen dos nucléolos rodeados de cromatina perinucleolar con las subestructuras fibrilares y granulares internas evidentes. La heterocromatina es electrodensa, correctamente distribuida en la periferia interna de la membrana nuclear y los poros nucleares son electrolúcidos entre las fibras de heterocromatina en la región de la membrana nuclear. Esta descripción corresponde a criterios indicativos de una correcta conservación de la ultraestructura de acuerdo a la literatura.

Enfocándonos en la arquitectura nuclear, la citoquímica ultraestructural es nuestra principal herramienta para el análisis de RNPs y las estructuras que forma, para esto la doble fijación con osmio se omitió porque no permite distinguir entre ambos ácidos nucleicos. La Figura 9 muestra una micrografía electrónica de núcleo de hepatocito de ratón, sin postfijación con OsO_4 , contrastado de acuerdo al método regresivo propuesto por Monneron y Bernhard (1968), a un corte de 45-55nm se aplicaron contrastantes en el siguiente orden, acetato de uranilo por 3 min, EDTA por 15 min y citrato de plomo por 2 min. El principal resultado de este contraste de acuerdo al autor es el blanqueamiento de la cromatina, tanto en las zonas compactas perinucleares como en las zonas laxas hacia el interior del núcleo. Los poros nucleares, contrario a nuestro resultado anterior, se observan electrodensos abriendo camino entre la cromatina compacta hasta llegar a la membrana nuclear. La virtud de este método es que los componentes que permanecen contrastados contienen RNA; en la imagen se observa que el RNA también genera estructura en los espacios de intercromatina, el aspecto es granular inmerso en un fondo fibroso, se sabe que los gránulos corresponden a RNPs, se observan puntillizos, muy electrodensos y en algunas zonas agrupados. El nucléolo, es un cuerpo que contiene zonas granulares de RNPs que se observan débilmente contrastadas y zonas de cromatina que se observan blanqueadas, especialmente en la región perinucleolar.

Haciendo un aumento sobre estas regiones ribonucleoproteicas podemos observar los ICG, la Figura 10 muestra una micrografía electrónica a mayor aumento donde se puede observar la distribución de algunos cúmulos de ICG. Los resultados concuerdan con lo citado en varias caracterizaciones: En la imagen, se pueden identificar varios tipos de cúmulos muy electrodensos, distribuidos de manera dispersa hacia el interior del núcleo en los espacios de intercromatina, compuestos de pequeños gránulos, la cantidad de cúmulos de ICG identificados fueron 10 en solo ese campo, en la Tabla 2 se observa que el tamaño de los cúmulos es muy variable, con longitudes que van desde 0.19-0.76 μm , en su mayoría, los cúmulos pequeños son polimorfos y más dispersos, por el contrario, los cúmulos más grandes tienden a ser redondos; todos se encuentran inmersos en un fondo de menor electrodensidad (tono gris) con aspecto fibrilar.

Si enfocamos en aumentos aún mayores, podemos observar los detalles en el interior de un solo cúmulo, la Figura 11 muestra una micrografía electrónica a mayor aumento donde se puede apreciar el interior de dos cúmulos de ICG, ambos tienden a lo circular en su forma, en la imagen se logra identificar que un cúmulo se compone de múltiples gránulos individuales, aunque no todos los gránulos son redondos, la mayoría tiende a la redondez, de electrodensidad variable. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la selección de 50 gránulos pertenecientes al cúmulo más grande, su forma es homogénea y redonda, su tamaño oscila entre 14.41 y 32.92 nm con una media de 24.15 ± 3.9 nm, inmersos en un ambiente o nube fibrilar de menor electrodensidad (tono gris), pareciera que tienden a permanecer agrupados, en su mayoría, unidos por fibras muy delgadas, algunos se ordenan en forma lineal, semejante a un collar de perlas, en otros casos los gránulos parecen proyectar dichas fibras en forma de brazos hacia otras regiones u otros gránulos. En estos aumentos, la variación de electrodensidad tanto de gránulos como de fibras brinda información sobre la profundidad de campo, se puede observar que no todos los gránulos se encuentran a la misma profundidad, o todos tendrían el mismo tono de contraste, en el caso de las fibras los tonos de gris son aún más variables porque son tres veces más delgadas que un gránulo (9-10nm).

Para describir mejor la interacción de los gránulos con las fibras en términos de profundidad, los estereopares son nuestra principal herramienta, pues nos brinda la información sobre cómo se distribuyen nuestros objetos de estudio en la profundidad de un corte no mayor a 60nm. La figura 12 muestra dos micrografías electrónicas de estereopares, es decir, imágenes del mismo campo, pero en distinto ángulo A) -10° y B) $+10^\circ$ de inclinación. Comparando las mismas regiones donde se observan gránulos y fibras en interacción (marcas en amarillo), se distinguen cambios en los tonos del contraste en algunas interacciones cuando se cambia de ángulo, en la figura B el contacto con las fibras se difumina en tonos grises, mientras que en el ángulo A las interacciones se observan más electrodensas y definidas, hay que considerar que un gránulo de 20nm puede caber tres veces en un grosor de 60nm, por lo tanto, las tonalidades en el contraste pueden reflejar la cantidad de materia o densidad de cada gránulo o fibra. Dentro del círculo azul, se observa un gránulo y una fibra con la misma electrodensidad, y se percibe como la fibra parece una prolongación del gránulo que después se ramifica.

Para integrar los estereopares se generó un anáglifo que debe ser observado con los lentes adecuados para apreciar la tridimensionalidad del espacio. La Figura 13 es una micrografía electrónica de núcleo con contraste regresivo diferencial para RNPs, el anáglifo se elaboró a partir de estereopares a -20° y $+20^\circ$ de inclinación en Photoshop. Se puede observar tridimensionalmente que la ultraestructura de la nube fibrilar tiene un grado de profundidad que permite identificar a mejor detalle las interacciones entre las fibras y los cúmulos de gránulos. Se aprecia que estos elementos forman una ultraestructura definida semejante a una red que mantiene en contacto algunos elementos o bien, brinda andamiaje para la unión de gránulos que varían en tamaño y formas. Las regiones circuladas en amarillo señalan sitios de interacción entre gránulos bien definidos y finas fibras, se identifican varias fibras proyectadas a partir de un solo gránulo que después se pueden ramificar.

DISCUSIÓN

Los cortes semifinos a 400nm teñidos con azul de toluidina son la introducción histológica para el estudio por MET, donde se observan áreas amplias de nuestro tejido y se selecciona el mejor campo, aunque la información se limita al tamaño, la forma, la posición de las células enteras y sus núcleos, los detalles histológicos típicos brindan suficientes criterios sobre una buena o mala conservación de la arquitectura celular. Nuestros resultados (Figura 6 y 7) sugieren una morfología preservada de los hepatocitos bajo los siguientes criterios: existe una similitud homogénea en la densidad celular del parénquima, los sinusoides y canalículos aparecen medianamente abiertos, no se observaron distribuciones anómalas en el citoplasma, ni cambios por hipoxia o autolíticos sugerentes de mala fijación, como fuerte vacuolización y granulación citoplasmática, vacuolización extracitoplasmática entre los cordones hepáticos, espacios vacíos entre los hepatocitos o desorganización tisular, los núcleos de las células parenquimatosas son redondos, homogéneos entre sí y con múltiples nucléolos, no hipertróficos, irregulares o con cromatina marginada, no se observaron condiciones hepáticas comunes como esteatosis, fibrosis o inflamación (Rodrigues da Cunha et al. 2017).

El hígado es un órgano parenquimatoso cuyo estudio por microscopía electrónica requiere de un procesamiento más lento del tejido. Inicialmente, la fijación por perfusión a través de la vena porta es reportado como el mejor método para este tipo de tejidos. Sin embargo, la fijación por inmersión sigue siendo el método más factible en múltiples investigaciones y es de rutina cuando se trata de biopsias en general. Este método arroja buenos resultados tomando algunas precauciones: Uno de los principales inconvenientes de la inmersión es la penetración lenta del fijador, inclusive cuando la pieza del tejido es de 1 mm³, el fijador penetra a una velocidad de 0.5mm/hr, lo cual significa que el centro del bloque permanecerá sin fijar durante la mayor parte de una hora, por ello el bloque no se debe devastar en exceso y los primeros cortes de las regiones externas serán las mejor conservadas; además el fijador sufre agotamiento, es decir, va cambiando en sus propiedades químicas conforme va reaccionando con los componentes celulares. Como un método alternativo, Wisse E y colaboradores (Wisse et al. 2010) mostraron resultados comparables a la perfusión mediante la inyección con aguja del fijador en trozos de tejido de 1 cm³ antes de la inmersión. El segundo punto en la fijación por inmersión es que las sinusoides no se conservan en su totalidad, por lo que no se observarán abiertos y habrá presencia de

glóbulos rojos que evitan que el fijador llegue con rapidez a las células del parénquima más internas.

Por el contrario, en la posfijación con OsO_4 , la perfusión no arroja buenos resultados, siendo la inmersión el mejor método a elegir. Los resultados de la fijación con OsO_4 son un complemento necesario para revelar la buena conservación de la arquitectura interna de la célula a nivel de ultraestructura, la correcta distribución de los sistemas membranosos sin colapsos o ampollas de las membranas celulares y, en el caso del tejido hepático, la alta cantidad de mitocondrias, gránulos de glucógeno y la distribución de cuerpos lipídicos, vacuolas y lisosomas puede ser anómala si se encuentran en los espacios intercelulares (Figura 8). Cabe mencionar, la importancia de evitar los precipitados del OsO_4 , pues dicho artefacto puntillizo, muy electrodensito, que no forma parte del tejido, puede influir en la interpretación del ambiente nuclear. Con respecto a los artefactos, George Palade, uno de los padres fundadores de la microscopía electrónica (EM), cita que “*una de las mayores dificultades en EM es distinguir entre estructuras genuinas y artefactos*”. La interpretación de imágenes TEM del hígado requiere conocimiento de la estructura normal del tejido y experiencia con los numerosos artefactos en fijación, inclusión, corte, contraste, etc (Kılıçoğlu and Erdemli 2011).

La deshidratación con etanol confiere varios cambios no deseados a las células como precipitación de proteínas, acarreo de moléculas citoplásmicas, membranas lipídicas disueltas y endurecimiento del tejido. Nuestras imágenes sugieren cambios por un posible acarreo o extracción del citoplasma, en regiones un tanto claras (Figura 7). Para evitar estos fenómenos algunos autores proponen reactivos aditivos a los fijadores, como iones Ca^{2+} o Li^+ , ferrocianuro, ácido tánico y ácido pícrico. Por otra parte, el hígado puede contener múltiples vacuolas que no deben ser confundidas como artefactos por mala deshidratación, para ello, en tejidos parenquimatosos, se recomienda aumentar los tiempos de deshidratación hasta 30 min en cada cambio (Kuhn and Wild 1992).

Enfocándonos al interior del núcleo interfásico, ha sido ampliamente estudiado que algunos componentes del nucleoplasma también confieren una ultra-arquitectura bien definida. Desde 1959 Hewson Swift (Swift 1959) realizó las primeras observaciones contrastando con osmio y plomo en tejido hepático de rata, describieron tres regiones muy evidentes: la región del nucléolo aparece rodeado de un anillo de cromatina, con una estructura interna nucleolar compleja, la región de intercromatina es difusa y no cuenta con componentes grandes y definidos, sino nubes dispersas de partículas granulares, y las áreas de

cromatina son aglomeraciones periféricas que contienen canales que unen a la membrana nuclear con las regiones de intercromatina, nuestros resultados en tejido hepático de ratón son concordantes (Figura 8). Adicionalmente, Swift realizó un tratamiento con RNAsas y concluyó que existen zonas donde el RNA se concentra, como el nucléolo, el espacio intercromatiniano y el citoplasma. E intuyó una posible asociación del RNA con varios componentes nucleares; actualmente, se sabe que el RNA se asocia con proteínas (RNPs) y con la cromatina.

Para identificar estas regiones con alta concentración de RNA y RNPs la citoquímica ultraestructural es nuestra principal herramienta para contrastar diferencialmente RNA e individualizar algunos componentes nucleares. En 1968, Monneron y Bernhard (Monneron and Bernhard 1969) crearon un método de contraste regresivo adicionando EDTA como un agente quelante del uranio que blanquea la cromatina, pero mantiene el contraste del RNA en sus distintas formas. Ellos también encontraron un patrón de distribución de las subestructuras nucleares, contrario al método anterior, la cromatina condensada sobre la membrana nuclear, la cromatina asociada al nucléolo y los aglomerados de cromatina dispersa en el nucleoplasma es débilmente contrastada y conserva un color gris claro o blanquecino, la zona de los poros nucleares es electrodensa desde la envoltura nuclear hasta el espacio de intercromatina, el nucléolo y sus gránulos se observan electrodensos, así como los ribosomas citoplásmicos, pero es la región intercromatiniana la que destaca con sus detalles al utilizar este método, es en esta zona donde el RNA y los RNPs se distribuyen en una densa red irregular que se une a los poros nucleares, se compone de gránulos muy electrodensos dispersos en un fondo gris de aspecto fibrilar, los autores clasificaron a los gránulos en dos entidades morfológicas 1) gránulos de intercromatina y 2) gránulos pericromatinianos, en nuestras imágenes a pocos aumentos (Figura 9) los ICG aparecen en forma de cúmulos electrodensos y puntillizos hacia el interior del núcleo.

Si hacemos un acercamiento a esta región intercromatiniana (Figura 10), podemos observar más a detalle que el RNA, en sus múltiples formas, también genera un patrón estructural específico, partiendo de lo grande a lo pequeño, el primer cuerpo que podemos describir son los cúmulos de ICG, estos han sido identificados en múltiples especies (Segura-Valdez et al. 2007), lo que sugiere que son universales, salvo por algunas variaciones en densidad, tamaño, número y forma, en el caso de los mamíferos, en estudios realizados en distintos tejidos de rata se ha observado que los cúmulos son en su mayoría amorfos aunque los más grandes tienden a ser redondos, mediante fluorescencia se sabe que una célula típica

de mamífero contiene de 25-50 cúmulos de ICG (Acosta-Cárdenas, et al. 2022), sin embargo, en MET donde solo se observa un corte en dos dimensiones la cantidad de cúmulos que se pueden identificar va de 10 a 15, el tamaño y la densidad es muy variable porque pueden aparecer muy dispersos o más compactos de acuerdo a los cambios metabólicos de la célula (Juarez Chavero 1999), por lo que no existe un promedio de referencia para definir a los cúmulos de ICG salvo un amplio rango en micras (0.3 - 3 μm), imágenes en neuronas, que siempre son eucromáticas y de metabolismo activo, revelan gránulos demasiado dispersos en el nucleoplasma y pocos aglomerados (Salcedo Álvarez 2010). En nuestro modelo de estudio, el ratón arroja resultados muy parecidos a la rata, aunque los cúmulos de ICG no llegan a ser tan grandes 0.19 – 0.76 μm y la mayoría son pequeños y muy dispersos, resultados esperados en un órgano de metabolismo activo como el hígado.

El interior de un cúmulo está conformado por una agrupación de numerosos gránulos de RNPs. Los gránulos actúan como los ladrillos que construyen una ultra estructura definida al interior de un cúmulo, son el segundo cuerpo que describiremos cuya observación requiere de mayores aumentos y la profundidad del campo es una variable fundamental para tratar de analizar su arquitectura (Figura 11). Los gránulos tienen una morfología más homogénea, algunos son polimorfos pero la mayoría tienden a ser redondos, de acuerdo a nuestros resultados miden de 14 – 32 nm de diámetro, algunos tienen la apariencia de tener dos brazos que sobresalen en forma de finas fibras de 9-10nm de diámetro, capaces de proyectarse hacia otras regiones y unirse a otros gránulos tomando una arquitectura lineal en forma de collar de perlas, que se puede torcer en formas de espiral o de “S”; otros pocos parecen tener tres o cuatro brazos, lo que indica que la red puede no ser lineal. Poco se ha especulado evolutivamente sobre la relación estructura-función de este tipo de acomodo granular o su significado biológico. Los gránulos varían en electrodensidad, es decir, tienen diferentes tonalidades en el contraste, probablemente se debe a que la cantidad de materia no siempre es la misma, pues en la profundidad de un corte de 60nm pueden aparecer gránulos de 20nm completos y otros incompletos, o bien hasta tres gránulos completos en diferentes alturas cuyo contraste puede que sea variable, es posible que los gránulos que aparecen más completos y más cercanos a la superficie sean los más densos y los gránulos claros son incompletos o no alcanzaron contrastante por estar más profundos, estudios adicionales con otro tipo de técnicas podrían responder este fenómeno que también atañe a cuerpos más pequeños como las fibras. Los gránulos siempre aparecen inmersos en un

ambiente con aspecto de nube fibrilar o de finas fibras delgadas con diferentes contrastes en tonos grises (Salcedo Álvarez 2010).

La nube fibrilar y las fibras de unión son el tercer cuerpo que parece conferir gran parte de la arquitectura, todavía no está claro si son una entidad aparte que sirve de andamio o si son parte de los mismos gránulos o si son transcritos nacientes, lo único que podemos observar es que no siempre son visibles, pues algunas uniones se observan con claridad, otras aparecen difusas y otras no se observan, probablemente la profundidad de campo tan amplia para un cuerpo de 10nm las hace ver difusas o perderse de vista, también queda en duda si todos los gránulos requieren estar en contacto con las fibras o no necesariamente, el contacto entre las fibras y los gránulos es difícil de comprobar bajo las condiciones de una imagen 2D que no permite analizar la profundidad.

Por ello es necesaria la obtención de imágenes 3D que nos muestren el dinamismo que existe en un solo corte. Una de las técnicas más comunes para obtener un volumen es la integración de cortes seriados, pero esta no es adecuada en este tipo de muestras, donde el objeto de estudio (9-25nm) es menor a la profundidad del corte (50-60nm), otros análisis se han realizado con microscopía de fuerza atómica cuyas imágenes en 3D nos indican la topografía del núcleo, pero no es visible la interacción entre fibras y gránulos (Zamora Cura 2015). Por ello, la técnica más adecuada es la obtención de imágenes estereopares tomadas desde diferentes ángulos ($+10^\circ$ y -10°) haciendo uso del goniómetro del microscopio electrónico. Los estereopares son una forma de explorar la profundidad al tomar dos imágenes y su observación requiere de un estereoscopio para que el cerebro pueda reconstruir una imagen 3D. Nuestro objetivo es obtener información sobre la profundidad y verificar si el cambio de perspectiva nos permite analizar la relación entre gránulos y fibras con particular atención en algunas zonas de contacto, pues se sabe que los ICG son cuerpos dinámicos y su forma de interacción ha sido poco estudiada mediante microscopía electrónica. Trabajos anteriores han usado la misma técnica en fibroblastos humanos demostrando en su reconstrucción interacción entre los gránulos y su ambiente fibroso (Del Toro-Rangel et al. 2020). Nuestras imágenes (Figura 12) revelan cambios sutiles en el contraste de un ángulo a otro, se marcan las zonas donde el contacto y la unión entre gránulo y fibra permanecen al cambiar de ángulo, rodeado en color azul se observa un gránulo en contacto con una fibra que se bifurca y no parece unirse a otro gránulo, en amarillo observamos uniones simples o con una sola fibra y uniones con doble fibra y un gránulo con cuatro fibras en contacto. Otra manera de abordar la obtención de imágenes

3D es la construcción de un anaglifo mediante el software Photoshop, también requiere de lentes anaglifas para la percepción de profundidad. En nuestros resultados (Figura 13) se pueden observar en 3D, circulado en amarillo, la interacción entre finas fibras y gránulos unidos en forma de cruz. Este método se ha utilizado con anterioridad para observar la interacción entre fibras de DNA asociadas con gránulos de Lacandonia en *Araucaria heterophylla* (Almeida Juárez 2014).

Si bien estos resultados no pueden ser concluyentes porque no se alcanza a resolver toda la profundidad, es verdad que estas interacciones dicen mucho sobre la ultraestructura de la red y su forma de interaccionar nos deja abiertas algunas preguntas, ¿las fibras se interconectan entre fibras o solo con gránulos?, ¿la nube fibrilar es una red que no se alcanza a resolver o solo es material ribonucleoprotéico disperso? y ¿Cuál es el significado biológico de dicha ultraestructura?.

CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó mediante MET la ultraestructura de núcleos interfásicos en hepatocitos de ratón. Los resultados de la fijación con osmio indican que la fijación del tejido por inmersión y su inclusión en resina epóxica fueron suficientes para la conservación de las subestructuras celulares.

Mediante la técnica de contraste regresiva de Monneron y Bernhard se logró ubicar la región en la que se distribuye el material ribonucleoprotéico, en un corte se caracterizaron 10 cúmulos de ICG de $0.19 - 0.76\mu\text{m}$ de amorfos y dispersos a redondos y densos. De la misma forma, se caracterizaron los gránulos individuales que los componen, en un solo cúmulo se contaron 50 gránulos de $14 - 32\text{nm}$ de diámetro con forma redonda, la mayoría unidos entre sí por fibras.

Se observó que la ultra-arquitectura entre ICG y su entorno fibrilar es en forma de collar de perlas que puede tomar diversos plegamientos o en forma de red donde las fibras se ramifican y los gránulos pueden tener hasta cuatro conexiones.

Finalmente, la exploración de la profundidad mediante imágenes 3D construidas con estereopares a $+10^\circ$ y -10° de inclinación nos permitió observar tridimensionalmente algunas zonas donde la interacción entre gránulos y fibras sobresale y la nube fibrilar difusa en tono gris permanece en lo profundo.

PERSPECTIVAS

Actualmente, ya existen técnicas que podrían hacer aportaciones prometedoras para resolver la estructura de cuerpos menores a 30nm .

La criofractura nos puede brindar imágenes que describan en relieve las interacciones de la red dentro de los IGC.

La técnica FIB-SEM promete devastar porciones de hasta 5nm , lo que permitiría realizar cortes seriado para reconstruir una imagen 3D de los IGC.

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta-Cárdenas J, Jiménez- García LF, Segura-Valdez M de L. (2022). *Speckles in tissues*. *MOJ Anat Physiol*. 9(1):1–3. doi 10.15406/mojap.2022.09.00317.
2. Agudo Jácome L, Pöthkow K, Paetsch O, Hege H-C. (2018). *Three-dimensional reconstruction and quantification of dislocation substructures from transmission electron microscopy stereo pairs*. *Ultramicroscopy*. 195:157–70. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2018.08.015>.
3. Aldecoa F, Battilana C. (2007). *Genómica y proteómica : Un paso más*. *Acta Médica Peru*. 23(3):185–92. ISSN: 1018-8800. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=96623311>
4. Almeida Juárez AG. (2014). *Estructura del núcleo celular de Araucaria heterophylla (Araucariaceae) con microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica*. Universidad Nacional Autónoma de México.
5. An H, de Meritens CR, Shelkovnikova TA. (2021). *Connecting the “dots”: RNP granule network in health and disease*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 1868(8):119058. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119058>
6. Bari G, Reaz R, Choi H-J, Jeong B-S. (2012). *Survey on Nucleotide Encoding Techniques and SVM Kernel Design for Human Splice Site Prediction*. *Interdiscip Bio Cent*. 4(4):1–6. doi: 10.4051 / ibc.2012.4.4.0014
7. Busch A, Hertel KJ. (2012). *Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 3(1):1–12. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wrna.100>
8. Cech TR, Steitz JA. (2014). *The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones*. *Cell*. 157(1):77–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>
9. Chen Y, Belmont AS. (2019). *Genome organization around nuclear speckles*. *Curr Opin Genet Dev*. 55:91–9. doi:10.1016/j.gde.2019.06.008.
10. Cheville NF, Stasko J. (2014). *Techniques in Electron Microscopy of Animal Tissue*. *Vet Pathol*. 51(1):28–41. doi 10.1177/0300985813505114.
11. Cmarko D, Verschure PJ, Martin TE, Dahmus ME, Krause S, Fu XD, et al. (1999). *Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection*. *Mol Biol Cell*. 10(1):211–23. doi: 10.1091/mbc.10.1.211
12. Courchaine EM, Lu A, Neugebauer KM. (2016). *Droplet organelles?*. *EMBO J*. 35(15):1603–12. doi 10.15252/emboj.201593517.

13. Dechat T, Adam SA, Taimen P, Shimi T, Goldman RD. (2010). *Nuclear lamins*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(a000547):1–22. doi: 10.1101/cshperspect.a000547.
14. Del Toro-Rangel EF, Lara-Martínez R, Segura-Valdez M de L, Arzate H, Villegas-Mercado CE, Jiménez-García LF. (2020). *Transfection of Human Gingival Fibroblasts with Cementum Protein 1 does not Alter the Ultrastructure of the Interchromatin Granule Clusters in the Cell Nucleus*. EC Dent Sci. 19(8):179–86.
15. Dreyfuss G, Philipson L, Mattaj JW. (1988). *Ribonucleoprotein particles in cellular processes*. J Cell Biol. 106(5):1419–25. doi: 10.1083/jcb.106.5.1419.
16. Dundr M, Misteli T. (2010). *Biogenesis of nuclear bodies*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(a000711):1-15. doi: 10.1101/cshperspect.a000711
17. Faber GP, Nadav-Eliyahu S, Shav-Tal Y. (2022). *Nuclear speckles - a driving force in gene expression*. J Cell Sci. 135(13):jcs259594. doi:10.1242/jcs.259594
18. Fakan S. (2004). *The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry*. Histochem Cell Biol.122(2):83–93. doi 10.1007/s00418-004-0681-1
19. Ferrai C, de Castro IJ, Lavitas L, Chotalia M, Pombo A. (2010). *Gene positioning*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(a000588):1–17. doi: 10.1101/cshperspect.a000588
20. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. (2017). *Nuclear speckles: Molecular organization, biological function and role in disease*. Nucleic Acids Res. 45(18):10350–68. doi: 10.1093/nar/gkx759.
21. 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*. Biology of the Cell, 94(2), 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)01186-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)01186-3)
22. Gordon JM, Phizicky D V, Neugebauer KM. (2021). *Nuclear mechanisms of gene expression control: pre-mRNA splicing as a life or death decision*. Curr Opin Genet Dev. 67:67–76. doi:10.1016/j.gde.2020.11.002.
23. Hall KB. (2017). *RNA and Proteins: Mutual Respect*. F1000Research. 6(345):1–11. doi: 10.12688/f1000research.10572.1
24. Hemmerich P, Schmiedeberg L, Diekmann S. (2011). *Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance*. Chromosom Res. 19(1):131–51. doi 10.1007/s10577-010-9161-8
25. Herman R, Weymouth L, Penman S. (1978). *Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin-depleted nuclei*. J Cell Biol. 78(3):663–74. doi: 10.1083/jcb.78.3.663.

26. Hogg JR, Collins K. (2008). *Structured non-coding RNAs and the RNP Renaissance*. *Curr Opin Chem Biol*. 12(6):684–9. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.027.
27. Ilik İA, Aktaş T. (2021). *Nuclear speckles: dynamic hubs of gene expression regulation*. *FEBS J*. 289(22): 7234-7245. doi:10.1111/febs.16117
28. Jiménez- García FL, Lara Martínez R, Gil Chavarría I, Zamora Cura AL, Salcedo Alvarez M, Agredano Moreno LT, et al. (2007). *Biología Celular Del Splicing*. Mensaje Bioquímico. 31:141–56. <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
29. Jiménez-García L. F., & Spector, D. L. (1993). *In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism*. *Cell*, 73(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90159-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90159-N)
30. Juárez Chavero S. (1999). *Efecto del 17B estradiol sobre la densidad de granulos intercromatinianos en ratas ovariectomizadas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Kastner B, Will CL, Stark H, Lührmann R. (2019). *Structural insights into nuclear pre-mRNA splicing in higher eukaryotes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 11:a032417. doi: 10.1101/cshperspect.a032417
32. Kılıçoğlu S, Erdemli E. (2011). *Comparing The Different Fixatives For Examination of Liver Tissue Ultrastructure*. *J Ankara Univ Fac Med*. 64(2):75–9. https://dergipark.org.tr/tr/doi/10.1501/Tipfak_0000000835.
33. Kuhn D, Wild P. (1992). *The influence of buffers during fixation on the appearance of smooth endoplasmic reticulum and glycogen in hepatocytes of normal and glycogen-depleted rats*. *Histochemistry*. 97(1):5–11. doi: 10.1007/BF00271275.
34. Lamond AI, Spector DL. (2003). *Nuclear speckles: A model for nuclear organelles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(8):605–12. doi 10.1038/nrm1172
35. Li W, Jiang C, Zhang E. (2021). *Advances in the phase separation-organized membraneless organelles in cells: A narrative review*. *Transl Cancer Res*. 10(11):4929–46. <https://dx.doi.org/10.21037/tcr-21-1111>
36. Liao SE, Regev O. (2021). *Splicing at the phase-separated nuclear speckle interface: A model*. *Nucleic Acids Res*. 49(2):636–45. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa1209>
37. Liu X, Bushnell DA, Kornberg RD. (2013). *RNA polymerase II transcription: structure and mechanism*. *Biochim Biophys Acta*. 1829(1):2–8. doi:10.1016/j.bbagr.2012.09.003.
38. Louten J. (2016). *Features of Host Cells: Cellular and Molecular Biology Review*. *Essent Hum Virol*, p.31–48. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00003-X>

39. Malatesta M. (2021). *Transmission electron microscopy as a powerful tool to investigate the interaction of nanoparticles with subcellular structures*. *Int J Mol Sci*. 22(23):12789. <https://doi.org/10.3390/ijms222312789>.
40. Mao YS, Zhang B, Spector DL. (2011). *Biogenesis and function of nuclear bodies*. *Trends Genet*. 27(8):295–306. doi:10.1016/j.tig.2011.05.006.
41. Matera AG, Wang Z. (2014). *A day in the life of the spliceosome*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(4):294. doi:10.1038/nrm3742.
42. Meldi L, Brickner JH. (2011). *Compartmentalization of the nucleus*. *Trends Cell Biol*. 21(12):701–8. doi:10.1016/j.tcb.2011.08.001.
43. Mendoza Sánchez AC. (2017). *Gránulos intercromatinianos*. [Tesis] Universidad Nacional Autónoma de México.
44. Michlewski G, Cáceres JF. (2019). *Post-transcriptional control of miRNA biogenesis*. *Rna*. 25(1):1–16. <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.068692.118>.
45. Mintz PJ, Spector DL. (2000). *Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles*. *J Struct Biol*. 129(2–3):241–51. doi:10.1006/jsbi.2000.4213
46. Misteli T, Cáceres JF, Spector DL. (1997). *The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells*. *Nature*. 387(6632):523–7. <https://doi.org/10.1038/387523a0>
47. Misteli T. (2020). *The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function*. *Cell*. 183(1):28–45. doi:10.1016/j.cell.2020.09.014.
48. Mitra M. (2019). *Elements of RNA, its Techniques and Applications*. *Am J Curr Microbiol*. 7(1):34-39. doi 10.5281/zenodo.2552817
49. Mittag T, Parker R. (2018). *Multiple Modes of Protein–Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly*. *J Mol Biol*. 430(23):4636–49. doi:10.1016/j.jmb.2018.08.005.
50. Monneron A, Bernhard W. (1969). *Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells*. *J Ultrastruct Res*. 27(3):266–88. doi: 10.1016/s0022-5320(69)80017-1.
51. Mora A, Huang X, Jauhari S, Jiang Q, Li X. (2022). *Chromatin Hubs: A biological and computational outlook*. *Comput Struct Biotechnol J*. 20:3796–813. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.07.002>
52. Morais P, Adachi H, Yu YT. (2021). *Spliceosomal snRNA Epitranscriptomics*. *Front Genet*. 12:652129. doi: 10.3389/fgene.2021.652129
53. Muñoz-Díaz E, Sáez-Vásquez J. (2022). *Nuclear dynamics: Formation of bodies and trafficking in plant nuclei*. *Front Plant Sci*. 13(984163):1–22. doi 10.3389/fpls.2022.984163

54. Pederson T. (2011). *The nucleus introduced*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(5):1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a000521
55. 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(2):217–25. doi: 10.1006/excr.1996.0363.
56. Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Visa N, Puvion E. (1994). *Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection*. J Cell Sci. 1994;107(6):1457–68. doi: 10.1242/jcs.107.6.1457.
57. Rambout X, Dequiedt F, Maquat LE. (2018). *Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre-mRNA Splicing*. Chem Rev. 118(8):4339–64. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00470.
58. Rodrigues da Cunha EL, da Silva Matos R, Claret Pereira NR, Oliveira PR de, Daemon E, Camargo-Mathias MI. (2017). *Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (Mus musculus) caused by the acaricides: fipronil and thymol*. J Histol Histopathol. 4(1):9. <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-4-9>.
59. Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. (2017). *Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation*. Cell. 169(7):1187–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>
60. Salcedo Álvarez MO. (2010). *Distribución de los gránulos intercromatinianos y elementos de maduración de mRNA durante la diferenciación de neuroblastos de embrión de pollo*. Universidad Nacional Autónoma de México.
61. Segura-Valdez M de L, Negrete García C, Rodríguez Gómez Y, Sáenz Ochotorena A, Lara Martínez R, Moncayo Sahagún J de J, et al. (2007). *Organización intranuclear de proteínas SR en vertebrados*. TIP Rev Espec en ciencias químico-biológicas. 10(2):65–9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211938003>.
62. Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. (2016). *Genome architecture: from linear organisation of chromatin to the 3D assembly in the nucleus*. Chromosoma. 125(3):455–69. doi 10.1007/s00412-015-0538-5
63. Shah FR, Bhat YA, Wani AH. (2018). *Subnuclear distribution of proteins: Links with genome architecture*. Nucleus. 9(1):42–55. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1361578>
64. Shaw PJ. (2015). *Nucleolus*. In: eLS. p. 1–11. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001352.pub4>

65. Shevelyov YY, Ulianov S V. (2019). *The nuclear lamina as an organizer of chromosome architecture*. *Cells*. 8(136):1–13. doi:10.3390/cells8020136
66. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. (2010). *Organogenesis and Development of the Liver*. *Dev Cell*. 18(2):175–89. doi 10.1016/j.devcel.2010.01.011.
67. Spector D.L., Fu, X. D., & Maniatis, T. (1991). *Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus*. *The EMBO Journal*, 10(11), 3467–3481. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04911.x>
68. Spector DL, Lamond AI. (2011). *Nuclear speckles*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(a000646):1–12. doi: 10.1101/cshperspect.a000646.
69. Spector DL. (2001). *Nuclear domains*. *J Cell Sci*. 114(16):2891–3. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.16.2891>.
70. Swift H. (1959). *Studies on nuclear fine structure*. *Brookhaven Symp Biol*. 12:134–52.
71. Thakur J, Henikoff S. (2020). *Architectural RNA in chromatin organization*. *Biochem Soc Trans*. 48(5):1967–78. <https://doi.org/10.1042/BST20191226>
72. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. (2009). *The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine*. *Cell*. 136(4):701–18. doi 10.1016/j.cell.2009.02.009
73. Will CL, Lührmann R. (2011). *Spliceosome structure and function*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(a003707). doi: 10.1101/cshperspect.a003707
74. Wisse E, Braet F, Duimel H, Vreuls C, Koek G, Olde Damink SWM, et al. (2010). *Fixation methods for electron microscopy of human and other liver*. *World J Gastroenterol*. 16(23):2851–66. doi:10.3748/wjg.v16.i23.2851.
75. Yan C, Wan R, Shi Y. (2019). *Molecular mechanisms of pre-mRNA splicing through structural biology of the spliceosome*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 11(a032409):1–19. doi: 10.1101/cshperspect.a032409
76. Zamora Cura AL. (2015). *Estudio de nanoribonucleoproteínas nucleares con microscopía de fuerza atómica*. Universidad Nacional Autónoma de México.

ANEXOS

SOLUCIONES MET

AMORTIGUADOR SORENSEN pH 7.2

Reactivos	Sorensen 0.2M
NaH ₂ PO ₄ monobásico (1H ₂ O)	4.4g
Na ₂ HPO ₄ dibásico anhidro	12.81g
H ₂ O _{dest}	500ml

AMORTIGUADOR PBS pH 7.4, 0.15M

Reactivos	1X
NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄ dibásico	2.17g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Disolver en H ₂ O _{dest} caliente, aforar y ajustar pH 7.4	1000mL

FIJADOR GLUTARALDEHÍDO 2.5% / PARAFORMALDEHÍDO 4%

1. Pesar 1.82g de paraformaldehído y diluir a 60°C.
2. Medir 1.6mL de Glutaraldehído 70%
Aforar a 45mL con PBS pH 7.4

FIJADOR TETROXIDO DE OSMIO OsO₄ 2%

1. Lavar la ampollita 1g, eliminar etiquetas y despegar cristales de la ampollita.
2. Añadir 50mL de H₂O_{dest} en un frasco ámbar.
3. Romper la ampollita dentro del frasco agitando vigorosamente.
4. Agitar hasta disolver, puede tardar hasta 28h.
5. Separar la solución en dos frascos uno de trabajo 4°C y otro para congelación -4°C.
6. Sellar los frascos con parafilm, colocar guante blanco encima y llevar a refrigeración.

PREPARACIÓN DE ALCOHOLES

1. $V1 = \frac{50\% (100\text{mL})}{100\%} = 50\text{mL OH}_{100\%}$
2. $V1 = \frac{70\% (100\text{mL})}{100\%} = 70\text{mL OH}_{100\%}$
3. $V1 = \frac{80\% (100\text{mL})}{100\%} = 80\text{mL OH}_{100\%}$
4. $V1 = \frac{96\% (100\text{mL})}{100\%} = 96\text{mL OH}_{100\%}$
5. Aforar a 100mL con H₂O_{dest}

PREPARACIÓN DE RESINA

Plastificante: Epon - EM bed-812 (glicidolico de éter 100).
Endurecedor: MNA - Methyl norbenen-2,3-dicarboxylic anhydride.
Firmeza: DDSA - Dodeceny succinic anhydride.
Catalizador: DMP30 -2,4,6-Tris (dimethylamino methyl) phenol.

reactivos	(g)
Epon	3.55
DDSA	2.35
MNA	1.6
DMP30* 1.5g/100gmezcla	0.09
Total	7.59

PREPARACION DE HCl 1N

$$100\text{mL} * \frac{[\text{mol HCl}]}{1000 \text{ mL}} * \frac{\text{PM}}{1 \text{ mol HCl}} * \frac{\%}{37\text{gHCl puro}} * \frac{\rho}{1.49\text{g HCl impuro}} = 6.62\text{mL HCl } 39\%$$

PREPARACION DE NaOH 1N

$$100\text{mL} * \frac{[\text{mol NaOH}]}{1000 \text{ mL}} * \frac{\text{PM}}{1 \text{ mol NaOH}} * \frac{\%}{99\text{g NaOH puro}} = 4.03\text{g NaOH } 99\%$$

AZUL DE TOLUIDINA 1%

1. Disolver 1g de borato de sodio (borax) en 100ml H₂O_{dest} caliente
2. Agregar 1g de azul de toluidina.
3. Filtrar.

NITRATO DE PLOMO Pb(NO₃)₂ 2.66% DE REYNOLDS

1. Llevar a ebullición un litro de agua destilada por 10 min para eliminar el CO₂.
2. Enfriar a temperatura ambiente.
3. Pesar 2.66g de nitrato de plomo + 3.52g de citrato de sodio Na₃C₆H₅O₇*2H₂O.
4. Agregar 60mL de agua hervida, agitar hasta obtener una solución lechosa.
5. Adicionar lentamente 16mL de NaOH 1N agitando hasta que se vuelva transparente.
6. Aforar a 100ml con agua hervida. pH 12
7. Almacenar la solución en una botella de plástico a 4°C

CITRATO DE PLOMO 0.3% HAYAT

1. Llevar a ebullición un litro de agua destilada por 10 min para eliminar el CO₂.
$$\text{CO}_2 + \text{Pb} \rightarrow \text{PbCO}_3$$
2. Enfriar a temperatura ambiente.
3. Disolver 300mg de citrato de plomo en 100ml agua destilada.
4. Adicionar gota a gota NaOH 1N ~3.5mL lentamente y agitar hasta color transparente.
5. Aforar con agua hervida.
6. Filtrar o centrifugar antes de usarla.

ACETATO DE URANILO 3% UAc DE WATSON pH 4.5

1. Disolver 1.5g de acetato de uranilo en 50mL agua destilada hervida ó
2. Disolver 5g en 100mL MeOH y EtOH 50%.
3. Almacenar en botella ámbar 4°C, mantener en reposo antes de usarla.
4. Filtrar o centrifugar antes de usarla.