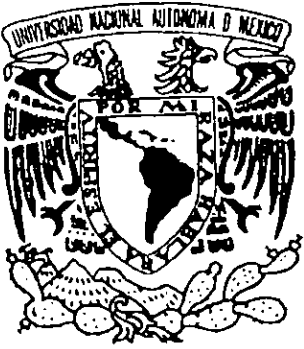


00341



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 2

FACULTAD DE CIENCIAS DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Evolución Nucleolar Ultraestructura del nucléolo de Giardia lamblia y Euglena gracilis.

290758

T E S I S QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACION EN MICROSCOPIA ELECTRONICA APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLOGICAS PRESENTA MARIA DEL PILAR RAMOS GODINEZ



México, D.F.

2001



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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos a cada uno de los asesores el tiempo dedicado a la revisión de la tesina y a mi formación profesional.

### GRACIAS

**Dr. Adolfo Martínez Palomo**, agradezco el haber aceptado ser parte de esta tesina y le reitero mi admiración y cariño.

**Dra. Bibiana Chávez**, agradezco su inmenso cariño hacia a mi, así como su invaluable colaboración en la realización de esta tesina.

**Dr. Luis Felipe Jiménez**, Gracias por confiar en mi y permitirme desarrollar un granito de sus investigaciones.

**Dra. Guadalupe Zavala**, gracias por guiarme en la culminación de esta tesina con cariño, paciencia y por permitirme ser su amiga.

**E. M. E. A. C. B. Ernestina Flores**, gracias por apoyarme en la realización de esta tesina, así como su revisión.

Le agradezco a mi **esposo** y a mi **hijo** el cariño y comprensión del tiempo invertido en mi vida profesional.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
El nucléolo.....	3
<i>Giardia lamblia</i> .....	4
<i>Euglena gracilis</i> .....	6
OBJETIVOS.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	9
Cultivo y procesamiento de células HeLa.....	9
<i>Giardia lamblia</i> . Tratamiento con actinomicina D.....	11
Procesamiento de muestras para MET.....	11
Impregnación con plata para estudio ultraestructural.....	12
<i>Euglena gracilis</i> . Tratamiento con actinomicina D.....	13
Procesamiento de las muestras para MET.....	13
RESULTADOS	
<i>Giardia lamblia</i> .....	15
<i>Euglena gracilis</i> .....	17
DISCUSION.....	26
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	30

## Resumen

En eucariontes, el nucléolo es un componente ribonucleoproteico intranuclear. Es el sitio de síntesis y procesamiento de ARN prerribosomal y del ensamblado de las partículas prerribosómicas. En mamíferos, con el microscopio electrónico de transmisión (MET) se reconocen tres componentes principales: el componente granular, los centros fibrilares y el componente fibrilar denso. Mediante la aplicación de un método preferencial para contraste de las estructuras ribonucleoproteicas, se logró la caracterización general de los componentes nucleares no nucleolares durante la interfase en núcleos de células animales, de plantas, de hongos y de protoctistas. Sin embargo, hasta ahora no se ha analizado al nucléolo desde el punto de vista evolutivo. El presente trabajo fue diseñado para estudiar las características de la estructura nucleolar en los núcleos de dos especies de protoctistas, i.e. *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis*.

Se utilizaron muestras en suspensión obtenidas de cultivos axénicos, que fueron procesadas para microscopio de luz y MET. Unas muestras se prepararon para impregnación argéntica y otras para la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas. En varios experimentos se utilizó Actinomicina D (AD), sustancia que inhibe la síntesis de RNA a partir del molde de DNA, debido a que se intercala entre ambos componentes formando uniones con guanina y citosina y produce segregación nucleolar. Se llevaron a cabo pruebas sobre la efectividad de esta sustancia tóxica a diferentes concentraciones y se estudiaron sus efectos sobre el nucléolo a nivel ultraestructural. Se tomó como referencia un sistema de cultivo de células humanas

(HeLa), sometido a las mismas condiciones experimentales. Las muestras fueron fotografiadas a diferentes aumentos para reproducir y comparar los cambios resultantes de los componentes nucleolares en los casos citados.

En las muestras estudiadas con microscopía electrónica convencional en condiciones normales, se presentó una estructura intranuclear que por su tamaño, densidad a los electrones y reactividad a la impregnación argéntica, podría corresponder al nucléolo. No obstante, el cuerpo nucleolar en *Euglena gracilis* presenta una morfología aparentemente más compleja. En cuanto al efecto de dosis iguales de AD, en *Giardia lamblia* no se presentó una segregación evidente del cuerpo nucleolar, mientras que en *E. gracilis* se observaron notables cambios en los tratados con respecto a los testigos de células en cultivo. Los resultados ultraestructurales y de los experimentos con AD permiten reconocer diferencias en la organización de los nucléolos de ambas especies.

## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos pueden ser definidos como sistemas que por sí mismos pueden reproducirse y mantenerse. Presentan barreras que los limitan del medio, mantienen su identidad y transforman materia y energía del exterior. Todos los seres vivos actuales están formados por células que presentan una serie de características moleculares comunes. En todos ellos, la información génica se encuentra almacenada en las moléculas de DNA y de RNA. Las proteínas son el producto de la expresión de esta información, cuya presencia puede explicarse por el proceso de evolución biológica. Las células se diferencian por presentar a las moléculas citadas dentro de una envoltura que define al núcleo (eucariontes) o libres en el citoplasma (procariontes). En las células eucariontes, el nucléolo representa un elemento de especial importancia en los procesos de regulación del metabolismo, cuyo significado ha sido profundamente estudiado por diferentes grupos de trabajo a nivel estructural y molecular.

### El Nucléolo.

Heitz en 1933 y MacClintock en 1934, establecieron bases firmes para argumentar que el nucléolo se formaba a partir de un segmento específico de determinados cromosomas (organizador nucleolar) (en Segura-Valdez, 1996). Posteriormente, diferentes investigadores establecieron que el nucléolo es una estructura ribonucleoproteica que consta de tres compartimentos denominados *centros fibrilares (FC)*, *componente fibrilar denso (DFC)* y *componente granular (G)*. El nucléolo contiene gran cantidad de RNA y es el sitio de gran actividad de su síntesis. Además, se han identificado aproximadamente 400 proteínas que son nucleolares y una gran cantidad de RNAs pequeños (en Jiménez-García, 1988). Es el centro de producción de ribosomas, la estructura de los cuales, en eucariontes es de carácter ribonucleoproteico, formada por dos subunidades, la grande

que contiene los rRNAs de 28S y 5.8S y la pequeña de rRNAs de 18S (S coeficiente de sedimentación específico).

La estructura del nucléolo refleja características muy particulares en los diferentes tipos de organismos eucariontes, dependiendo de la etapa de diferenciación y maduración de las células, así como de su actividad metabólica. En la mayoría de ellos, se ha logrado la caracterización de dicha estructura; sin embargo, en organismos considerados "primitivos" aún quedan por resolver algunas incógnitas, como en el caso del nucléolo de algunos eucariontes parásitos, entre ellos *Giardia lamblia*, o en otros protistas que presentan núcleos de organización muy particular, que poseen cromosomas compactos durante el periodo de interfase, como sucede en *Euglena gracilis*.

***Giardia lamblia*** es un protista parásito del duodeno y parte del yeyuno de mamíferos, que en los humanos causa infecciones intestinales de grado variable, desde asintomáticas hasta diarreas crónicas con absorción deficiente. La infección se adquiere al ingerir quistes en el agua o en alimentos contaminados.

Ciclo de vida.- El ciclo se inicia cuando los quistes tetranucleados sufren la acción de las enzimas de los jugos gástricos a un pH de 1.3-2.7, en un ambiente muy favorable a la temperatura corporal (37°C). En esta primera etapa el quiste adquiere flexibilidad y movilidad; sin embargo, el desenquistamiento sucede al pasar al duodeno o al yeyuno en donde el pH entre 6.8-7.2 favorece el rompimiento de la pared en un polo del quiste y se inicia la salida de un par de trofozoitos que permanecen unidos por algunas horas, antes de colonizar la mucosa del intestino. Los trofozoitos son la forma infectiva causante de la giardiasis, muchos de los cuales se multiplican e instalan en la región del intestino señalada, pero otros se enquistan, continúan en el tracto y salen al exterior en las heces fecales. El ciclo se repite al ser ingeridos nuevamente. La forma biológica de trofozoito



produce daño al organismo infectado, como la deficiencia de absorción, que resulta de la adhesión de los trofozoitos al epitelio intestinal (Gillin y col.,1996). Se ha sugerido la posibilidad de que el parásito libere toxinas, sin embargo, no se ha identificado ninguna.

Estructura del trofozoito de *Giardia lamblia*. Mide de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho. El citoesqueleto consiste de microtúbulos y microfilamentos. Presenta una superficie cónica o disco ventral adhesivo en la periferia del cual se ha detectado  $\alpha$ -actina, tropomiosina y miosina. La presencia de proteínas contráctiles en el disco explica la participación de esta estructura en el proceso de adhesión.

Presenta 4 pares de flagelos con el arreglo típico de microtúbulos (9+2) observado en eucariontes. La supuesta existencia de aparato de Golgi, durante la fase de enquistamiento (Gillin y col, 1996), vacuolas lisosomales, glicógeno, ribosomas y de retículo endoplásmico se basa en algunas evidencias presentadas por diversos autores (Sogin y col.,1989). En *Giardia* no se presentan mitocondrias, ni peroxisomas y es considerada de los organismos eucariontes más primitivos, con metabolismo anaerobio y dependencia total de nucleótidos exógenos. Las especies de *Giardia* son eucariontes de naturaleza metabólica primitiva, que se refleja en la localización citosólica de enzimas de metabolismo energético, con muchas similitudes a las vías bacterianas (Sogin y col, 1989). En la etapa trofozoito vegetativa otros factores como la ausencia de Golgi y la escasa cantidad de retículo, influyen en los patrones particulares de transporte de proteínas sin participación de un sistema de endomembranas. *Giardia* presenta dos núcleos de igual tamaño y colocados simétricamente a los lados de la línea media del cuerpo celular definidos por la envoltura nuclear, que se encuentra parcialmente cubierta con ribosomas. Se logró determinar durante los estadios de replicación nuclear utilizando timidina marcada ( $\text{H}^3$ ) y DAPI fluorescente (4'6' Di-Amino, 2 phenyl Indol), que ambos

núcleos se replican al mismo tiempo (Wieseann y col., 1984). En los trofozoítos expuestos a uridina H<sup>3</sup> el marcaje se incorpora igual en ambos núcleos, lo cual indica que ambas estructuras llevan a cabo actividad transcripcional similar (Kabnick y Peattie 1990). A pesar de lo anterior, no se cuenta con información detallada sobre la estructura nucleolar, organelo que participa en la síntesis y procesamiento de la mayor cantidad de RNA en eucariontes. *Giardia* representa la primera línea divergente conocida de los eucariontes. Esta es una consideración apoyada en las características de las secuencias de ARN ribosomal, que como en bacterias son cerradas (Sogin y col, 1989).

***Euglena gracilis***.- Es un protista de vida libre. Los estudios del núcleo de *Euglena* comienzan con Buchman en 1894. En la mayoría de las especies de euglenidos el núcleo presenta forma ovoide ó elongada que varía de 2 a 30 µm de diámetro. Chu (1974), encontró una estricta correlación entre el tamaño de la célula y el tamaño del núcleo de *Euglena*. Por contraste de fases observó la cromatina formando filamentos y cuando fijaron estas células, el núcleo se observaba con apariencia granular. En algunos núcleos los cromosomas irradian del "endosoma", mientras que en otros los cromosomas se enrollan al azar a través del nucleoplasma. La naturaleza de estos cromosomas puede ser vista en ciertos puntos y en algunas especies. Las tinciones de microscopía de luz en combinación con tratamientos de nucleasas, indican la presencia de RNA pero no de DNA. Sin embargo Gordon (1982) identificó estructuras finas durante la mitosis de *Euglena*. Un cuerpo semejante a un cuerpo nucleolar o "endosoma".

La química del "endosoma" es similar a la del nucléolo de organismos más evolucionados. La razón para usar el termino "endosoma" es debido al comportamiento que tiene este cuerpo durante la mitosis euglenoide, ya que persiste en la división y se

conserva durante el ensamblado de las subunidades del ribosoma. Leedale 1958, reportó una mitosis para 3 especies de *Euglena* como una fragmentación nuclear no conectada con la reproducción. El núcleo interfásico se halla en la región central o posterior de la célula en todas las especies, pero durante el movimiento euglenoide puede moverse alrededor de la célula y es capaz de cambiar de forma. Los cromosomas conservan las condiciones a través de la interfase cuando las delicadas hebras de cromatina pueden ser evidentes.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Identificar las características de la estructura nucleolar en *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis* en condiciones normales y experimentales.

### Objetivos específicos:

- 1) Analizar los componentes nucleolares en organismos tratados con diferentes concentraciones de actinomicina D (AD).
- 2) Utilizar células HeLa, para estandarizar las metodologías.
- 3) Determinar las alteraciones del nucléolo por efecto de AD utilizando la técnica de impregnación argéntica y la de contraste preferencial para ribonucleoproteínas.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Cultivo y procesamiento de células HeLa.

1. Las células HeLa se incubaron durante 48 hrs en cajas de petri sobre cubreobjetos de vidrio, utilizando medio de cultivo RPMI (Sigma) adicionado con 10% de suero fetal (Gibco) y antibióticos 1% (Sigma), durante 48 horas a 37°C y en atmosfera de nitrógeno al 5%. Las células adheridas a los cubreobjetos, al llegar a confluencia, se sometieron a la acción de la actinomicina D (Sigma a-1410) de una solución stock 2.5 mg/ml que fue diluida en el medio RPMI a una concentración final de 0.25 µl/ml y se incubaron por 4 horas dentro de las mismas cajas.

2. Posteriormente a la incubación con la toxina, se lavaron con PBS a temperatura ambiente y se fijaron para ser procesadas para su estudio con el microscopio de luz.

3. Se utilizó glutaraldehído al 1.6% en PBS, para fijar a las células durante 10 minutos. Parte de las muestras se utilizaron para la impregnación con plata y otras se tiñeron con azul de toluidina para observar directamente al microscopio de luz.

#### 3.a. Procesamiento para impregnación con plata.(Goodpasture y Bloom, 1975).

Se utilizó solución Carnoy (alcohol etílico al 70% y ácido acético glacial en proporción 3:1) por 5 minutos para fijar las células adheridas a los cubreobjetos. Posteriormente se pasaron por alcohol al 70% y 50 % por 3 minutos en cada paso y finalmente por agua, dentro de la caja de cultivo. Las manipulaciones se realizan rápida y cuidadosamente, evitando la desecación de las células.

Se adicionó una gota de nitrato de plata al 50% sobre el material y se colocó sobre la platina caliente (aproximadamente 55°C) durante 3 minutos. A continuación se trataron con una mezcla 1:1 de plata amoniaca y revelador y se calentaron en la platina hasta que la muestra tomó coloración marrón.

En un paso intermedio, las células adheridas a los cubreobjetos se lavaron con agua a 4°C, cuidadosamente, la reacción de impregnación fué controlada con tres o cuatro lavados con agua fría. El lavado se repite después del revelador.

A continuación se deshidrataron con alcoholes 50-70% y absoluto, con cambios de tres minutos. Se pasaron por xilol y se procedió al montaje de las células con resina sobre portaobjetos. Estas se observaron al microscopio de luz.

3.b. Para la tinción con azul de toluidina, se utilizó la mezcla de colorante al 0.3% disuelto en acetato de sodio 0.3 M, ajustando a pH 5.2 con ácido acético. Se aplicó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Se montaron con resina sobre portaobjetos y se observaron al microscopio de luz.

Tratamiento con actinomicina D en *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis*.

Los puntos descritos para el tratamiento de células HeLa con el tóxico, se llevaron a cabo en forma similar con muestras de *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis* tanto para células cultivadas en suspensión como para organismos adheridos sobre cubreobjetos. En ambos casos se realizaron pruebas con diluciones 0.2, 0.35 y 0.5 µl/ml.

Los cultivos de *Giardia lamblia* fueron donados por el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN y las muestras de *Euglena gracilis* fueron donadas por el laboratorio de Bioenergética de la Facultad de Estudios Superiores Unidad Zaragoza.

***Giardia lamblia*** . Tratamiento con actinomicina D.

Los tubos de cultivo se colocaron en hielo, por espacio de 10 minutos. Para despegar las células que se encontraban adheridas en la periferia, se agitaron suavemente y se

centrifugaron a 2,000 r.p.m. por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó 2 ml de medio, en el cual se resuspendieron nuevamente los parásitos. En estas condiciones se adicionó a los tubos diferentes concentraciones de AD (0.2, 0.35 y 0.5  $\mu\text{l/ml}$ ). El tratamiento se mantuvo por 4 horas dentro de la estufa a 36°C.

El siguiente paso consistió en lavar el material con PBS pH 7.2 para proceder a la fijación con glutaraldehído al 1.6% en PBS y se separaron dos lotes para procesamiento por dos diferentes métodos: microscopía electrónica de transmisión e impregnación argéntica.

#### **Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET).**

Después de 1 hora de fijación, postfijamos el material con tetraóxido de osmio al 1% en solución acuosa durante 1 hora. Se lavaron las células con PBS varias veces antes de la deshidratación gradual con alcohol etílico en concentraciones crecientes desde 70% hasta llegar a 3 cambios de alcohol absoluto y se pasó a óxido de propileno. El procedimiento se continuó con la imbibición de las muestras con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica en concentraciones 2:1, 1:1 y 1:2.

Después de 24 horas de preinclusión, se llevó a cabo la inclusión en resina pura preparada con la fórmula para mezclas de mediana dureza utilizada en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. La polimerización se realizó en estufa a 60° por 24 horas.

Se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos con un microtomo Ultracut Reichert, en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Cancerología de la SSA.

#### **Impregnación con plata para estudio ultraestructural.**

Inicialmente las muestras se postfijaron durante 5 minutos con Carnoy (ac. acético-alcohol) y se hidrataron con alcoholes del 70, 50, 30% y agua previamente a la técnica de impregnación argéntica con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) calentando en la platina a  $60^\circ$ , esta reacción se interrumpió con agua helada, lavando cuidadosamente hasta que el agua del lavado salio clara. Posteriormente se llevó a cabo la reacción con revelador y plata amoniacal ( $\text{NH}_4\text{Ag}$ ) en pruebas de 10, 15, 30, 45 minutos y una hora, hasta que la muestra tomó un color ocre. En cada paso las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm. Finalmente se procedió a llevar a cabo el protocolo de rutina para MET, deshidratando gradualmente en alcoholes para incluir en resina epóxica.

#### ***Euglena gracilis***. Tratamiento con Actinomicina D.

Se separaron las euglenas del medio de cultivo, por centrifugación y posteriormente se retiró el sobrenadante, resuspendiendo en 2 ml de medio al que se adicionó AD en concentraciones de 0.2, 0.35 y 0.5  $\mu\text{l/ml}$ . El tratamiento se mantuvo por 4 horas a temperatura ambiente.

El siguiente paso consistió en lavar el material con PBS a pH 7.2 para proceder a la fijación con glutaraldehido 1.6% en PBS y se separaron dos lotes para procesamiento por los dos diferentes métodos ya mencionados.

**Procesamiento de muestras para MET:** Después de 1 hora de fijación del material tratado con AD como está citado en el párrafo anterior, se procedió a postfijar parte del material con tetraóxido de osmio al 1% en solución acuosa durante 1 hora. Después de la postfijación y antes de la deshidratación, se lavaron las células varias veces con PBS, al igual que las muestras no postfijadas en osmio.



Para los dos tipos de muestras, la deshidratación se llevó a cabo de manera gradual con mezclas de alcohol etílico en concentraciones crecientes desde 70% hasta llegar a 3 cambios de alcohol absoluto y 2 cambios de óxido de propileno. Para la imbibición de las células se utilizaron mezclas de óxido de propileno y resina epóxica aumentando la concentración en proporción 2:1 por 1 hora, 1:1 durante la noche y 1:2 durante 1 hora. Después de la preinclusión, se llevó a cabo la inclusión en resina epóxica pura preparada con la fórmula para mezclas de mediana dureza y la polimerización se llevó a cabo en estufa de 60° por 24 horas.

Para el estudio de *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis* se obtuvieron cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y para el estudio de la ultraestructura nucleolar, se utilizaron cortes ultrafinos. Se realizaron dos diferentes procedimientos de contraste, la técnica convencional con soluciones de acetato de uranilo al 3% y plomo de Luft, para muestras postfijadas con osmio y la técnica preferencial de Bernhard (1969) para ribonucleoproteínas, con soluciones de acetato de uranilo al 3% y citrato de plomo 0.3 % utilizando un paso intermedio de EDTA en solución a pH 6.8, que funciona como agente quelante. La técnica de Bernhard se aplicó en material no postfijado con osmio.

Los mismos pasos descritos para la impregnación con plata de muestras de *Giardia lamblia*. se siguieron para la impregnación de muestras de *Euglena gracilis* y el material fué incluido en Epón posteriormente. Los cortes semifinos y ultrafinos fueron realizados con un microtomo Ultracut Reichert. Se utilizaron los procedimientos de contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo para las muestras postfijadas con osmio y la técnica EDTA de contraste preferencial de Bernhard (1969), para las muestras sin postfijación.

Los especímenes para el estudio ultraestructural fueron analizados en un Microscopio Electrónico Carl Zeiss modelo EM10 propiedad de la Facultad de Ciencias de la UNAM, obteniéndose micrografías de las muestras. Las imágenes fueron impresas en papel a diferentes ampliaciones y se realizó el estudio comparativo de los efectos de la AD en *Giardia lamblia* y *Euglena gracilis*, con respecto al efecto que se observa en células HeLa.

## RESULTADOS

Las características del núcleo de los dos organismos estudiados, son totalmente diferentes por lo cual los resultados se describen de manera individual.

El comportamiento de los componentes intranucleares ante el efecto inhibitor de la actinomicina D (AD), fue analizado respecto a lo observado anteriormente a nivel ultraestructural en células HeLa en cultivo, por lo cual las concentraciones de tratamiento iniciales se aplicaron con respecto a este modelo. Sin embargo el tóxico requirió de concentraciones mucho mas altas respecto a las de las células Hela para lograr el efecto de segregación nucleolar.

Se probó la efectividad de la AD inicialmente sobre las células en cultivo; en concentración 0.16  $\mu\text{l/ml}$ , produjo la segregación nucleolar que se aprecia claramente a microscopio de luz. Esta misma concentración se aplicó a los cultivos de protistas, y en ellos no se presentaron cambios en el nucléolo, por lo cual se adecuaron dosis de mayor concentración 0.2  $\mu\text{l/ml}$ , 0.35 $\mu\text{l/ml}$  y 0.5  $\mu\text{l/ml}$ .

### ***Giardia lamblia***

En muestras postfijadas con osmio, *Giardia lamblia* presentó núcleos delimitados por la envoltura nuclear y en el interior se distinguen numerosas partículas de forma granular y fibrilar distribuidas en forma homogénea. Estos núcleos, dependiendo de la orientación del corte, se presentaron en forma oval y el contraste fue mas bajo que el observado en las estructuras del citoplasma, en el cual se aprecian claramente los ribosomas, algunas vacuolas, los centriolos en racimo de los flagelos, ocasionalmente los flagelos y parte del

retículo endoplásmico; la estructura del disco de adhesión solamente fue reconocido en cortes que atravesaron esta zona.

En muestras contrastadas con la técnica general uranilo-plomo, de material incluido en resina epóxica con y sin osmificación, se observó una región ligeramente más electrodensa hacia la periferia en uno de los polos y el contraste general fue más bajo, incluso en las estructuras citoplasmáticas. En las muestras post fijadas con osmio la imagen fue semejante, el contraste del núcleo fue ligeramente menor con respecto al de las estructura citoplásmicas (fig. 1).

Con la aplicación del contraste preferencial del EDTA, se observó en forma clara la distribución homogénea de una gran cantidad de gránulos y fibrillas ribonucleoproteicas, semejantes a las observadas en los núcleos de otros grupos de eucariontes y en forma muy particular la regionalización de un cúmulo, adherido en uno de los polos a la envoltura nuclear y su orientación coincidió en ambos núcleos del trofozoito de *Giardia* en la mayoría de los casos. En este cúmulo se reconocen granulos de diferentes tamaños y material fibrilar (fig. 2).

En los núcleos de los organismos tratados con actinomicina D se vio la concentración del material electrodense tanto hacia la periferia del núcleo como hacia uno de los extremos. Este aspecto fue evidente con la impregnación argéntica, en muestras sometidas a tratamiento con AD a concentraciones 0.5  $\mu\text{l/ml}$ , 0.35 $\mu\text{l/ml}$  y 0.2  $\mu\text{l/ml}$ . En las muestras sometidas a mayor concentración del inhibidor, se presentaron alteraciones, principalmente en el citoplasma, ya que la mayoría de los núcleos conservan la distribución de sus componentes y la envoltura se mantiene completa. En las muestras

sometidas a 0.2  $\mu$ l/ml de AD y con impregnación argéntica se observaron los elementos nucleares mejor definidos y se notó menor alteración del citoplasma (fig.3).

### ***Euglena gracilis***

En muestras de *Euglena gracilis* postfijadas con osmio, incluidas en epon y contrastadas por la técnica convencional de uranilo plomo, se reconocieron abundantes elementos en el nucleoplasma delimitado por la envoltura nuclear. Se observaron claramente numerosos cuerpos de cromatina compacta, un nucléolo excéntrico de naturaleza heterogénea y numerosas estructuras menores (fig. 4a).

En las imágenes amplificadas a grandes aumentos, (30,000) se identifica la subestructura nucleolar formada de diversas partículas entremezcladas. En material sin osmificación, contrastado con EDTA, los cromosomas bien compactados se observan como estructuras blanqueadas, mientras que los diferentes elementos ribonucleoproteicos se vieron bien definidos. También se encontraron numerosas estructuras de forma fibrilar y granular muy electrondensas, ampliamente dispersas en el espacio intranuclear. El nucléolo presenta una estructura ligeramente heterogénea, con zonas claras y otras de mayor contraste, sin embargo se aprecia la continuidad entre ellas (fig. 4b).

En las muestras de *Euglena gracilis* sometidas a la acción de actinomicina D, se reconoció claramente la segregación de los componentes del nucléolo; en los organismos tratados con el tóxico a mayor concentración (0.5  $\mu$ l/ml), se presentaron diferentes elementos contenidos en una matriz fibro-granular compacta, ampliamente dispersa en la cual se reobservan centros claros con granulos ribonucleoproteicos de pequeñas dimensiones y otro tipo de gránulos de mayor tamaño que se localizaron en la periferia,

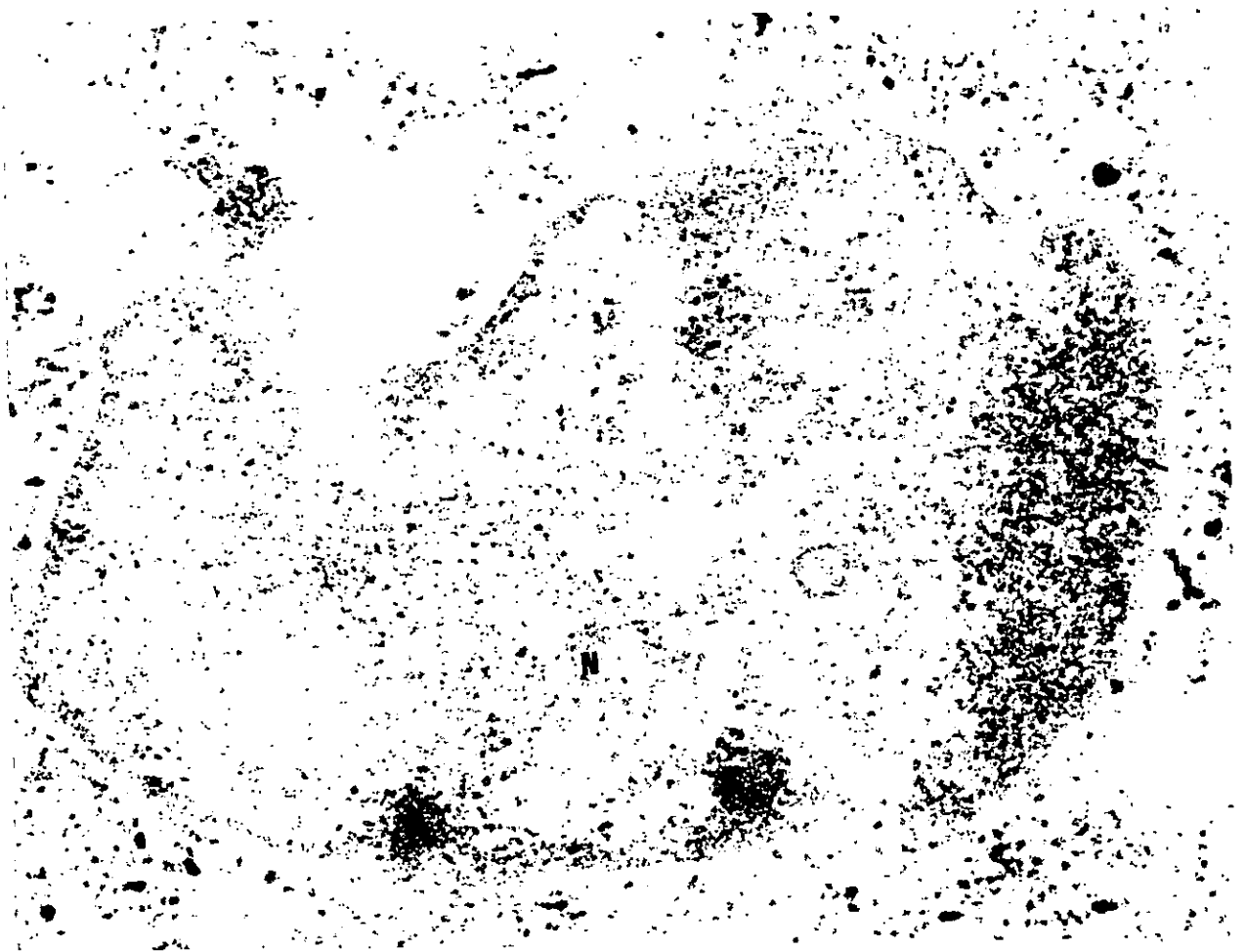
simulando la descarga en grandes cúmulos hacia el nucleoplasma. El efecto de la AD en la concentración mas baja (0.2  $\mu\text{l/ml}$ ) es menos evidente, aunque se manifiesta el inicio de la segregación nucleolar (fig 5 a y b).

Lo anteriormente descrito se observa con mayor detalle en las muestras sometidas a la impregnación argéntica. En las muestras tratadas con AD a concentración de 0.35 $\mu\text{l/ml}$  se reconocen los componentes nucleolares, parcialmente entremezclados aunque el componente granular se localizo principalmente hacia la periferia (fig.6), en algunos núcleos el efecto es menos marcado. En material tratado con AD a concentraciones de 0.5  $\mu\text{l/ml}$ , el efecto sobre el nucléolo fué dramático, se produjo la completa segregación de los centros fibrilares, la región fibrilar densa y el componente granular (fig.7). En las muestras sometidas a la menor concentración del inhibidor (0.2  $\mu\text{l/ml}$ ) el efecto se manifestó en diferentes grados, algunos nucléolos muestran numerosos centros bien definidos marcados con plata otros solamente uno o dos, los núcleos tratados con ésta dosis de AD, presentaron generalmente un pequeño cuerpo nuclear marcado fuertemente con plata a distancia variable del nucléolo.

Es importante señalar que aún en los organismos tratados con altas concentraciones de AD, no se producen alteraciones profundas, en general, el citoplasma y los núcleos conservaron la distribución de sus componentes y la envoltura se nucleolar se observo completa.



1.- Micrografía electrónica de un corte de *Giardia lamblia* en donde se observan diferentes elementos del citoplasma (c) y el núcleo celular (N). Como parte de los componentes nucleares se aprecia una región electrodensa polarizada (flecha). Material postfijado con osmio, incluido en epón y contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 40 000 X. El material fue procesado por la técnica convencional para M.E.



2.- Micrografía electrónica de un núcleo (N) de *Giardia lamblia* en el que se observó una región de fuerte densidad orientada polarmente (flecha). Material incluido en epón y contraste preferencial de EDTA, para ribonucleoproteínas. 84 000 X.





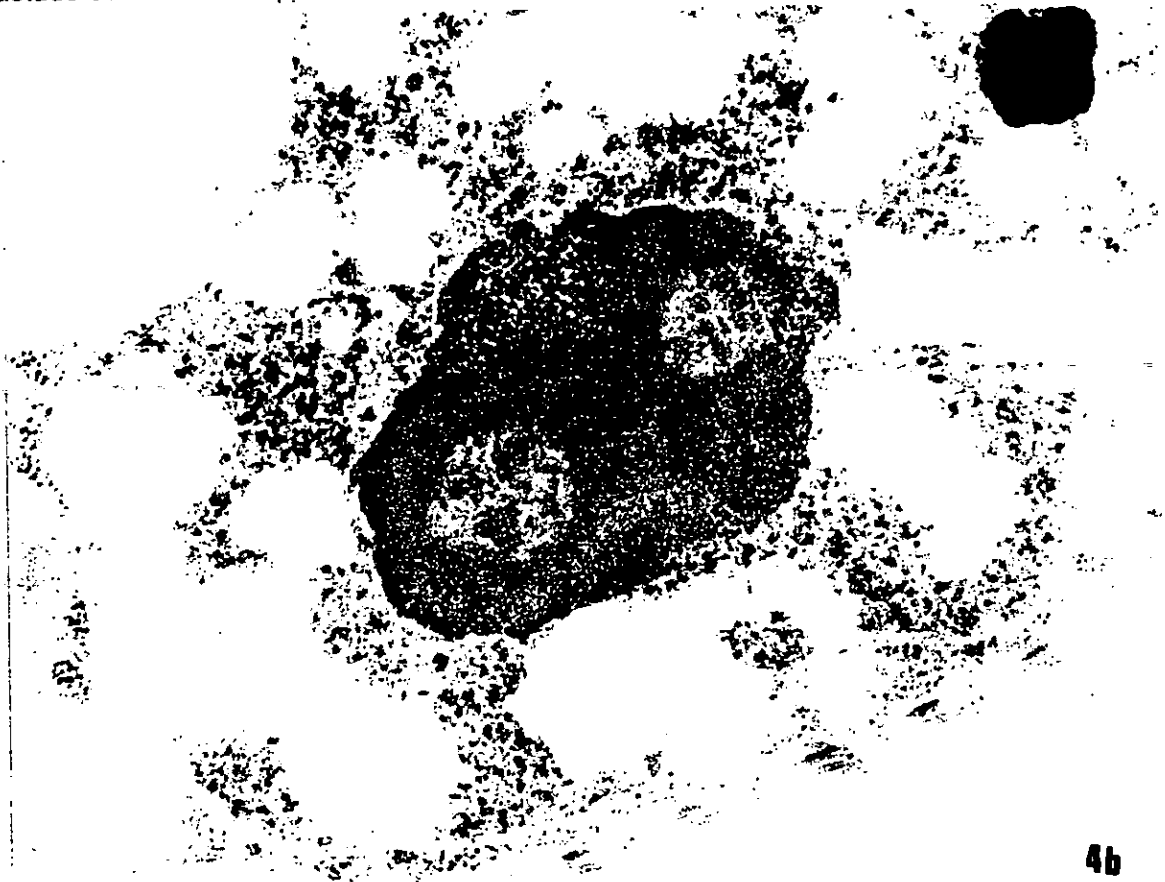
3.- Micrografía electrónica de *Giardia lamblia*, sometida a tratamiento con actinomicina D, 0.25  $\mu$ l/ml. Impregnación argéntica. El material impregnado se ubica en la periferia y es electrodensó. El material fue procesado por la técnica convencional para M.E. 63 000 X.



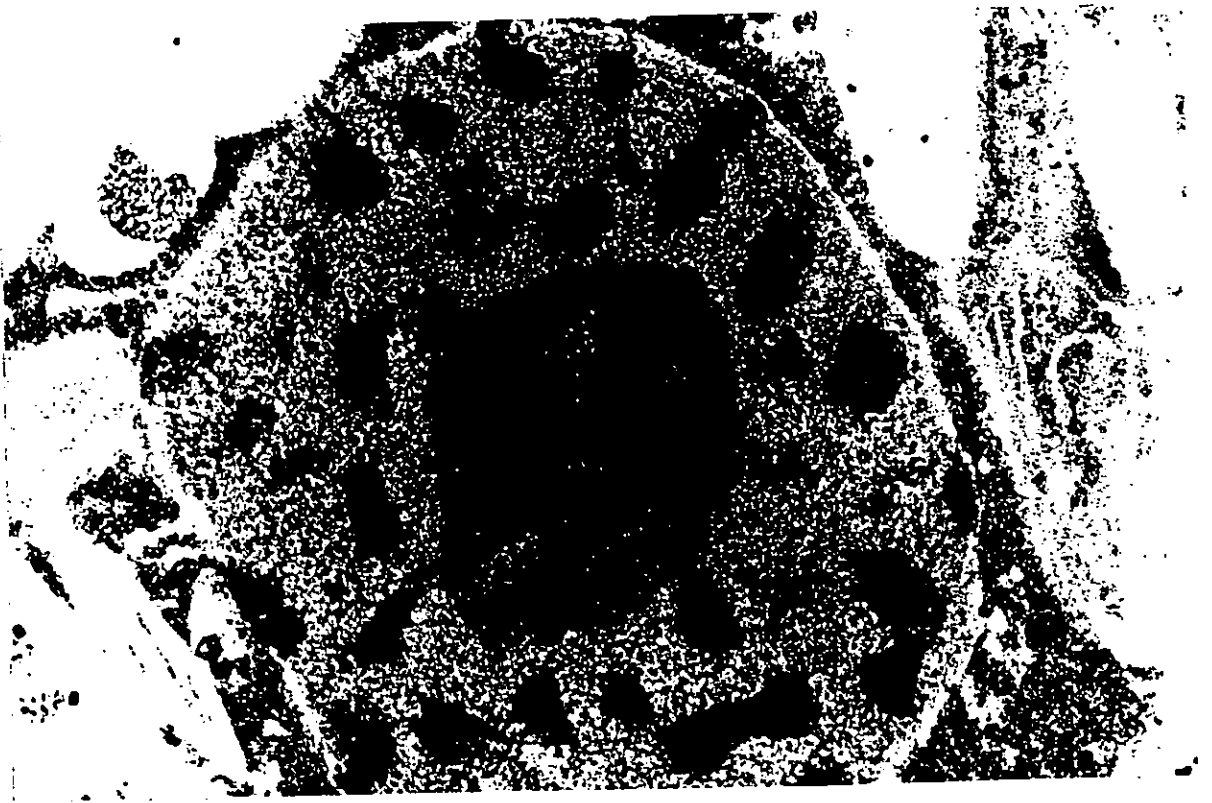
4a

4a.- Micrografía electrónica de un corte de *Euglena gracilis* en donde se observan diferentes elementos del citoplasma (c), cloroplastos (cl), vacuolas (v) y el núcleo celular (N). Entre los componentes del núcleo se identifican los cromosomas compactados (\*) y diferentes estructuras ribonucleoproteicas, además del nucléolo (n). Material postfijado en osmio, incluido en epón y contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 14 400 X.

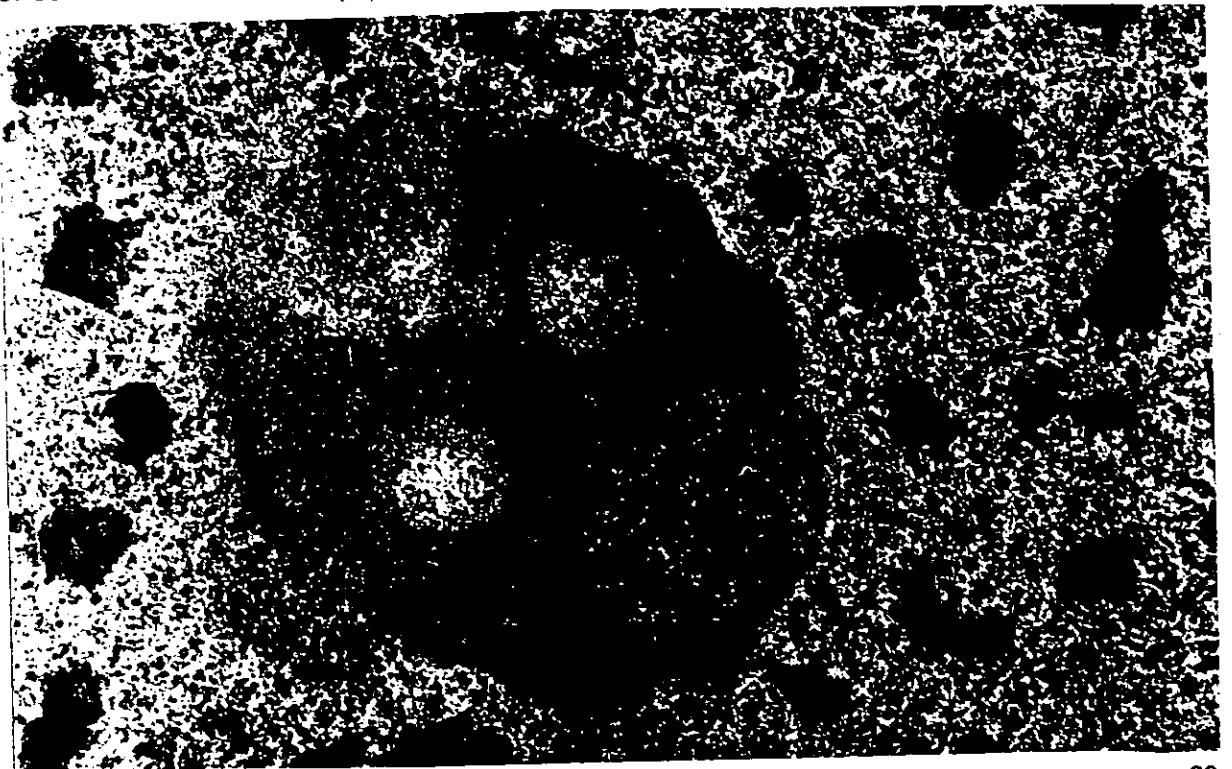
4b.- Región del núcleo en que se reconocen los cromosomas blanqueados en contraste con las diferentes estructuras ribonucleoprotéicas y el nucléolo (n). Material incluido en epón y contrastado con la técnica preferencial de EDTA, para ribonucleoproteínas. 30 000X.

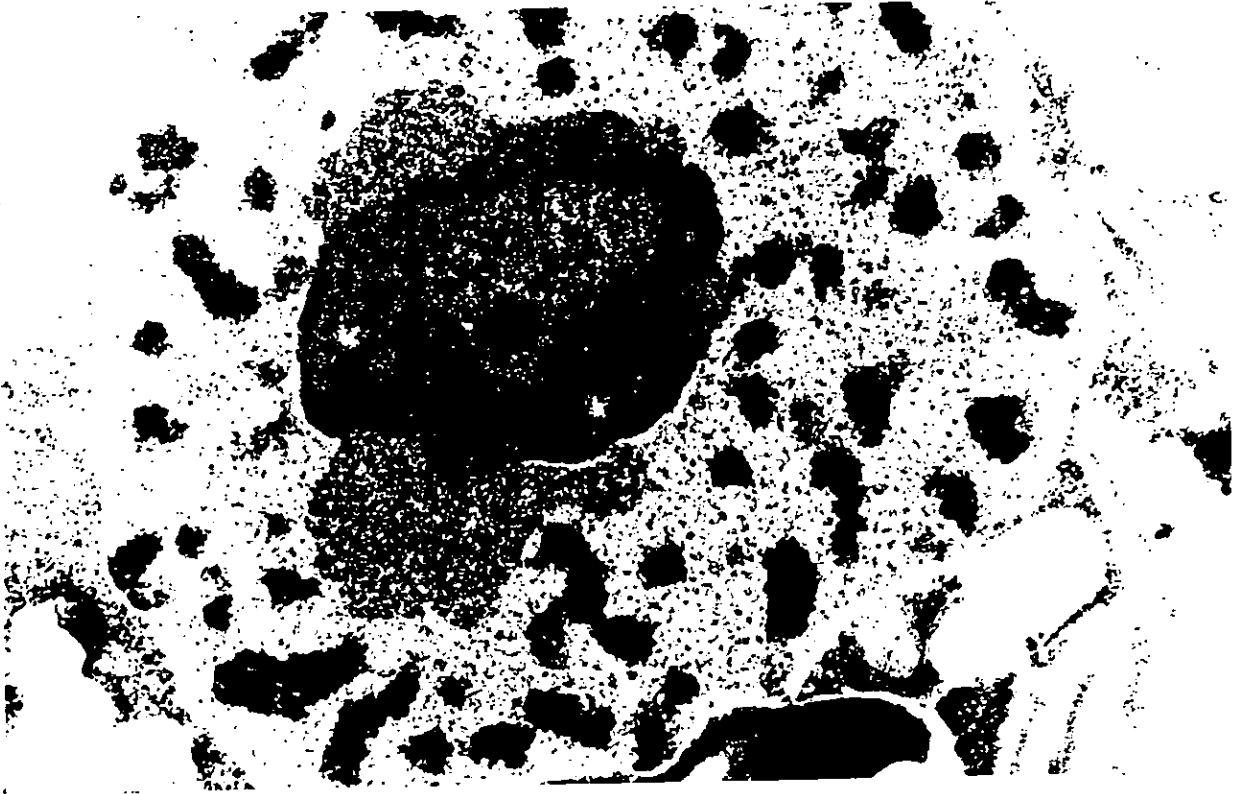


4b

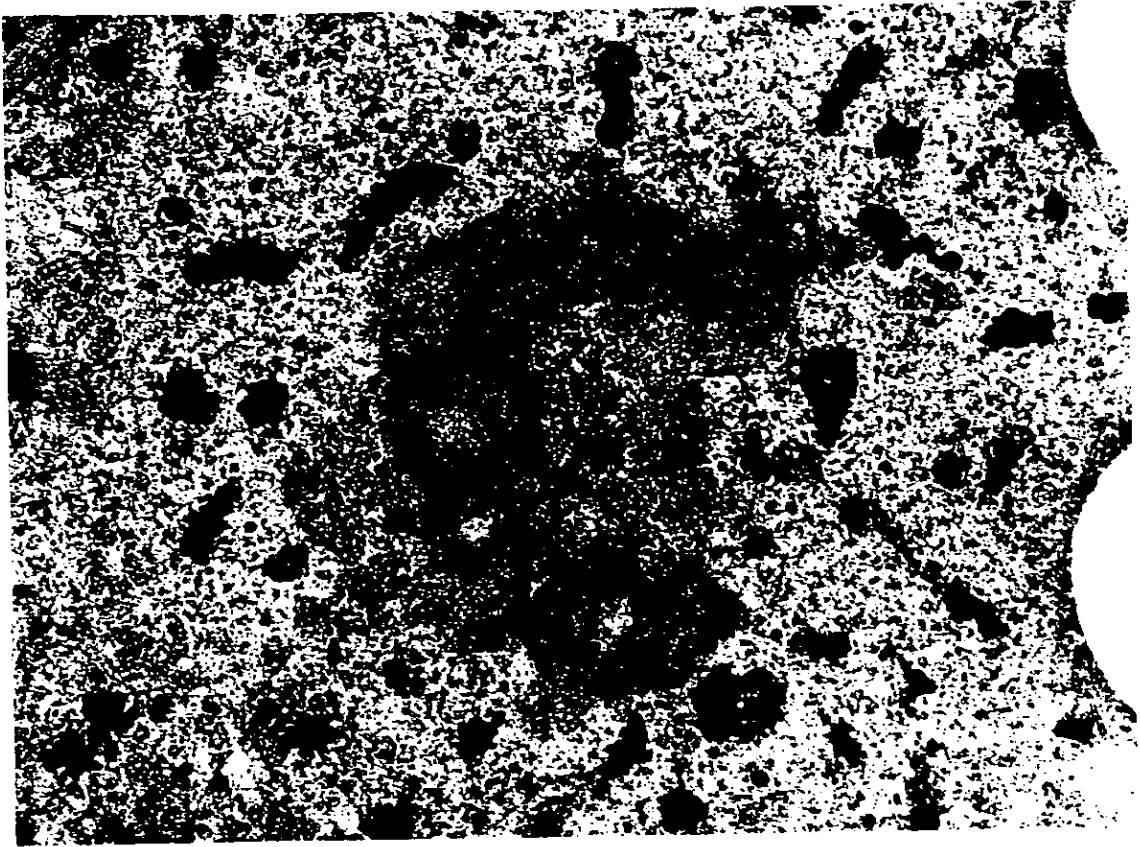


5.- Micrografía electrónica de *Euglena gracilis*. Muestras tratadas con AD, 0.25 $\mu$ l/ml, en que se reconocen la zona granular (g) y la zona fibrilar (f). Contraste general de uranio y plomo. 5a.- Corte del núcleo (N). 27 500X. 5b.- Imagen del nucléolo (n). 40 000X.





6.- Micrografía electrónica de *Euglena gracilis*, sometida a tratamiento con actinomicina D 0.35  $\mu\text{l/ml}$ . Material incluido en epón y contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo . El material granular del nucléolo se segrega a la periferia. Impregnación argéntica. 25 000X.



7.- Micrografía electrónica de *Euglena gracilis*, sometida a tratamiento con actinomicina D 0.5  $\mu\text{l/ml}$ . Material incluido en epón y contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo . Impregnación argéntica.60 000X.

## DISCUSIÓN

Whitaker (1969) sugirió una separación dicotómica entre eucariontes y procariontes. Posteriormente Margulis (1974) con su esquema de los cinco reinos enfatizó esta dicotomía entre procariontes y eucariontes. Actualmente, con el desarrollo de diferentes herramientas analíticas se pueden definir las características subcelulares y moleculares las cuales ayudaran a despejar dudas sobre el número de reinos eucariontes que representan linajes independientes. Estos se han identificado debido a las investigaciones de Sogin (1989) las cuales proponen que los protistas representan el reino eucarionte mas "viejo" y divergente. A este respecto Carlin (1980) consideró al núcleo como un organelo que puede ser utilizado a nivel estructural para el establecimiento de relaciones filogenéticas, debido a que es una estructura altamente conservada pero a la vez suficientemente variable en protistas.

Muchas pruebas apoyan la idea de que el género *Giardia* corresponde a la primera línea divergente de eucariontes. Este argumento de una línea descendente se basa en el análisis de las secuencias de RNAr, las cuales son cerradas como las de las bacterias conocidas en la actualidad. De esta manera el grado de cambios evolutivos en las regiones codificadoras del RNAr eucarionte es más rápido que el de los microorganismos procariontes, y se considera que los organismos eucariontes como *Giardia* pueden ser tan antiguos como las eubacterias y las arqueobacterias.

Paralelamente al estudio del núcleo, el nucléolo puede ser considerado un cronómetro adecuado para el análisis de los cambios evolutivos descendentes. El nucléolo es un organelo polimórfico con notables variaciones en tamaño y en la distribución de sus componentes aún en células del mismo tipo. En algunos organismos, la estructura de este

organulo se conoce al detalle, sin embargo en otros como en *Giardia lamblia*, su existencia apenas se ha sugerido.

A partir de estos datos, resultó de gran interés aplicar una metodología que permitiera una diferenciación ultraestructural nucleolar clara entre *Euglena gracilis* que presenta un núcleo con características muy particulares pero con un nucléolo bien definido y *Giardia lamblia* que no tiene un nucléolo bien definido, y sus características se desconocen .

Mediante el uso de Actinomicina D (AD) se logró evidenciar tres tipos celulares simultáneamente segregación nucleolar, en *Euglena*, al utilizar una dosis de 0.35  $\mu$ l de AD. Con dosis más elevadas se observó destrucción nucleolar y alteraciones en la interfase nucléolo/nucleoplasma con el material segregado saliendo en masas a este nivel, lo cual nos revela, en primer lugar la toxicidad de este compuesto y después que este organismo aún en las dosis más bajas reacciona ante el estímulo de esta droga, dejando entrever la gran plasticidad que puede tener a nivel nuclear y nucleolar, manteniéndose con vida aún después de 4 horas del tratamiento.

Con la serie de tratamientos de AD y técnicas citoquímicas utilizadas en el estudio del nucléolo de *Giardia lamblia* se logró observar la segregación de material. Considerando los avances, se propone que la región electrodensa, observada en contacto con la envoltura nuclear en un polo del núcleo, es una estructura constante que representa al nucléolo de *Giardia lamblia*, el cual presenta una gran resistencia a la AD, aún a dosis muy altas En tales condiciones el organelo no presenta alteración ultraestructuralmente detectable

Debido a que en *Giardia lamblia* no se aprecian modificaciones estructurales dramáticas, es posible:

1. Que el parásito no es sensible a esta concentración de la droga, que es suficientemente tóxica para los otros tipos celulares,
2. que su DNA, no presenta el orden de la secuencia de pares de bases guanina-citosina, como en los otros grupos o finalmente,
3. que presente un mecanismo metabólico muy eficiente.

En particular este organismo parásito puede haber desarrollado sistemas tan complejos para mantener sin riesgo su información genética y su conservación como especie que estos elementos, le han permitido sobrevivir a lo largo de tanto tiempo sin grandes alteraciones y además adaptarse a un medio ambiente tan hostil como podría ser el intestino en el cual tiene que sobrevivir a la acción de jugos gástricos, enzimas lisosomales y demás mecanismos de defensa a los que se encuentran expuestos. Estas circunstancias no son iguales para *Euglena*, la cual aunque su medio ambiente sea hostil no es comparable al que representa el medio interno de otro organismo, el cual va a reaccionar respondiendo a través de diversos mecanismos para eliminar al parásito. De esta manera la presión de selección y de cambio debe ser mucho más fuerte para *Giardia* la cual por lo mismo presenta un núcleo tan poco penetrable y reactivo con un nucléolo enmascarado que asegura la conservación de su información sin reducir su capacidad de adaptación y sobrevivencia.

En resumen, en este trabajo se presenta la descripción parcial, a nivel ultraestructural del nucléolo de *Giardia lamblia*, el cual reconocemos por su distribución intranuclear periférica, densidad electrónica, naturaleza fibrosa principalmente y su capacidad de reactividad a la impregnación argéntica con la técnica para organizador nucleolar. Ya que



en este estudio con las técnica utilizada no se logró la segregación nucleolar de este elemento, es necesario realizar estudios tendientes a conocer la razón de este fenómeno y a esclarecer la distribución de moléculas nucleolares típicas como el RNA ribosomal en esta estructura por hibridación *in situ* ultraestructural o inmunocitoquímica, que permita localizar proteínas, como fibrilarina.

Por otro lado, *Euglena gracilis* que es un protista mas evolucionado, presenta características nucleolares más claras, como composición fibrogranular, intensa capacidad de impregnación argéntica y segregación nucleolar cuando se somete a tratamiento con actinomicina D.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## Bibliografía

- Bernhard, W. 1969 A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27: 250-265
- Goodpasture, C. And Bloom, S.E. 1975. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Silver Staining. Chromosoma. SINENSIA 17:75-134
- Chu, S.P. (1974) Contribution to our knowledge of the genus *Euglena*. SINENSIA 17: 75 - 134
- Carling, R.K. 1980 Poly (A). A new evolutionary probe. J. Theor. Biol. 82:353-362.
- Gillin, F.D., Reiner, D, S. .and McCaffery. J. M. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu. Rev. Microbiol, 50: 679-705.
- Leedale, G.F. 1982 The Biology of *Euglena* Acad. Press. Ed. Dennis E. Burton 3:185-239
- Jiménez-García, L.F., 1988. El nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kabnick, K.S. and Peattie, D.A. 1990 In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent J. Cell Sci. 95:353-360
- Margulis, L. 1974. Five-kingdom classification and the origin and evolution of cell. Evol. Biol. 7:45-78.

- Segura Valdez M. de L. 1996 Disección Molecular del Nucléolo *in situ* Visualización de Ácidos Nucleicos Nucleolares por Hibridación *in situ* Florescente y Ultraestructural Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Biología) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sogin M. L. et al. 1989. Phylogenetic Meaning of the Kingdom concept: An Unusual Ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243: 75-77.
- Wieseahn, G.P. E.L. Jarroll, D.G. Lindemarl, E.A. Meyer and L.M. Hallick. 1984. Autorradiografía Experimental Parasitol. 58: 94-100.
- Whittaker, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163:150-160.