



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Estudio ultraestructural de las ribonucleoproteínas nucleares
relacionadas con la expresión genética en dos líneas celulares
del periodonto

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. EDITH FLORELY DEL TORO RANGEL

Tutor:

Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de ciencias UNAM

Miembros del comité tutor:

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
Facultad de odontología UNAM
Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre
Instituto de física UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Mayo de 2021



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.

Díos primeramente a tí gracias por tus bondades a mí vida.

*A mí esposo Carlos y mí Hija Arantxa: gracias por ser el motivo de mí vida,
la razón de mis alegrías, los amo.*

*A mis padres Elízama y Florentino: gracias por sus oraciones, por tanto
amor y apoyo incondicional los amo.*

*A quienes se me adelantaron en este camino, los extrañaré siempre, Tío
“Pín”, a mí tío y compadre Carlos, Tía Gloria... gracias por haber sido parte
de mí vida, los llevo en mí corazón.*

Agradecimientos

A mi tutor el *Dr. Luis Felipe Jiménez García*, gracias por sus enseñanzas que han aportado en gran manera a mi formación académica. Gracias por su apoyo, paciencia y confianza.

Gracias al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)* por el apoyo económico otorgado durante el periodo de duración de los estudios de doctorado.

Al *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud* de la *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. gracias por la oportunidad de ingresar y culminar mis estudios de doctorado.

Al *Departamento de Posgrado e Investigación (DEPeI)* de la *Facultad de Odontología UNAM* por su formación Académica.

Al *Laboratorio de Microscopía Electrónica* de la *Facultad de Ciencias* de la *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. gracias por su formación académica.

Gracias a los miembros de mi comité tutor que semestre a semestre estuvieron apoyándome en las evaluaciones, corrigiéndome, enseñándome y aconsejándome para la elaboración de este proyecto:

Gracias *Dra. Elba Rosa Leyva Huerta* por sus consejos para la elaboración de mi proyecto de doctorado, gracias por su confianza y apoyo.

Gracias *Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre* por sus preguntas en cada evaluación, por sus observaciones, las enseñanzas en microscopía electrónica, gracias por ser un excelente maestro.

Dr. Luis Felipe Jiménez García gracias por su apoyo, enseñanzas, gracias por exigirme a ser mejor, gracias por su confianza y por ser mi maestro.

Gracias a mi jurado evaluador:

Dr. Higinio Arzate del laboratorio de tejidos mineralizados de la DEPEI UNAM: por su apoyo en la realización de este proyecto, gracias por sus comentarios y enseñanzas cada vez que lo requerí. Gracias por la donación de las líneas celulares con las que se llevó a cabo este proyecto y su apoyo sin condiciones.

Dra. Ana María Fernández Presas. gracias por sus enseñanzas, apoyo y comentarios para esta tesis así como durante mi examen de candidatura. Gracias por siempre apoyarme.

Dra. Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis gracias por su apoyo, por sus comentarios para esta tesis.

Dra. Dra. María De Lourdes Segura Valdez: gracias por sus valiosos comentarios y correcciones a esta tesis. Gracias por su confianza y apoyo durante estos años.

Gracias a la *Dra. Reyna Lara Martínez* por sus enseñanzas sobre microscopía y biología celular en el laboratorio de microscopía electrónica. Gracias por la paciencia, por tus consejos y por motivarme a seguir adelante.

Gracias *Dra. Teresa I. Fortoul Van Der Goes* por sus correcciones a este proyecto para el examen de candidatura. Gracias por su paciencia y apoyo.

Gracias *M. en C. Carlos Acosta Trujillo* por su ayuda en la realización de gráficas y técnicas estadísticas de esta tesis.

Gracias *Dr. Lía A. Hoz Rodríguez* por la ayuda en la obtención de los cultivos celulares con los que se realizó este proyecto.

ÍNDICE

RESÚMEN	7
I. ANTECEDENTES	8
1. Periodonto	8
1.1 Encía.....	8
1.2 Ligamento periodontal.....	8
1.3 Hueso alveolar.....	9
1.4 Cemento radicular.....	9
2. Proteína del Cemento 1 (CEMP1)	10
3. Fibroblastos	11
3.1 Fibroblastos Gingivales Humanos.....	12
3.2 Fibroblastos Gingivales Humanos Transfectados con la Proteína del Cemento 1 (CEMP1).....	12
4. Núcleo Celular	13
4.1 Nucléolo.....	14
4.2 Gránulos intercromatinianos.....	14
4.3 Fibras pericromatinianas.....	15
4.4 Gránulos pericromatinianos.....	16
4.5 Cuerpos de Cajal.....	16
II. Planteamiento del problema	17
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
<i>A) CULTIVO CELULAR.....</i>	<i>20</i>
<i>B) PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....</i>	<i>20</i>
<i>C) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU OBSERVACIÓN POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....</i>	<i>21</i>
a) Obtención de cortes semifinos y tinción con azul de toluidina.....	21
b) Obtención de cortes ultrafinos, montaje y contraste.....	21
<i>D) ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL.....</i>	<i>22</i>
<i>E) CONTEO DE NUCLÉOLOS POR LÍNEA CELULAR Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</i>	<i>23</i>
<i>F) CONTEO DE GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</i>	<i>23</i>
VII.	
RESULTADOS.....	24
VIII. DISCUSIÓN.....	40
IX. CONCLUSIÓN.....	44
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Estudio Ultraestructural de Ribonucleoproteínas nucleares de dos líneas celulares del periodonto

RESUMEN

El núcleo celular de las células eucariotas es muy complejo, altamente dinámico, organizado y multifuncional. El núcleo celular es el sitio de los principales eventos celulares, es el mayor sitio de expresión génica, es el sitio de síntesis y procesamiento del RNA mensajero, biogénesis de las subunidades del ribosoma, es el sitio donde se lleva a cabo la replicación y reparación del DNA. (Misteli, 2000). Al igual que el citoplasma, el núcleo está compartimentado para facilitar la coordinación de estas vías, aunque a diferencia del citoplasma los subcompartimentos nucleares no tienen membranas que los delimiten.

El análisis ultraestructural del núcleo celular líneas celulares eucariontes se ha realizado durante años en diversos tipos líneas celulares así como en tejidos obteniendo como resultado diferentes características fenotípicas relacionadas con la expresión génica, más sin embargo no se conocen los cambios ultraestructurales de las ribonucleoproteínas nucleares de líneas celulares del periodonto como Fibroblastos gingivales humanos (HGF), ni tampoco en líneas celulares transfectadas como Fibroblastos gingivales humanos transfectados con la proteína del cemento 1 (HGF-CEMP1), esta última línea celular es de interés ya que los fibroblastos gingivales humanos no son células mineralizantes y esta transfección induce a estas células a la mineralización y a la expresión de proteínas de matriz de hueso y cemento radicular (Carmona-Rodríguez et al., 2007).

I Antecedentes

1. Periodonto

El periodonto es el conjunto de tejidos dinámicos que tiene diferentes funciones entre ellas brindar soporte a los órganos dentales y mantenerlos dentro de su alveolo, ayudan a la fonación, distribuye las fuerzas de masticación, provee un reservorio de células para la homeostasis, participa en la regeneración y reparación del tejido y también protege a la raíz dental. Está constituido por cuatro tejidos; dos tejidos blandos: la encía y el ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados: el hueso alveolar y el cemento radicular (Nanci & Bosshardt D., 2006).

1.1 Encía

El tejido conectivo gingival no es diferente al de la piel, está compuesto principalmente de colágenos, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenascina y elastina, en proporciones variables dependiendo su localización (Bartold & Narayanan, 2006). La importancia de la encía en el periodonto consiste en el papel que tiene para resistir las agresiones producidas por bacterias, químicos y traumas a las que la cavidad oral está expuesta día a día (Nanci & Bosshardt D., 2006).

Los componentes celulares más abundantes son los fibroblastos (Carranza, Newman, Takei, & Klokkevold, 2006) (Bartold & Narayanan, 2006)

1.2 Ligamento periodontal

Es un tejido conectivo especializado con recambio metabólico, que se localiza entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Sus principales funciones son: brindar soporte a los órganos dentales manteniéndolo en su alvéolo, soportar las fuerzas masticatorias y actúa como receptor sensorial, necesario para el posicionamiento oclusal (Nanci & Bosshardt D., 2006).

El ligamento periodontal es un tejido fibroso. Sus elementos fibrosos son en gran medida los tipos de colágeno I y III, que atraviesan el espacio del ligamento y se insertan en la superficie del cemento y del hueso como las fibras de Sharpey. Estos dos tipos de colágenas se codistribuyen con tipo V, XII y colágena tipo VI, esta última se encuentra presente en forma de microfibrillas. El ligamento contiene también insulina (colágeno tipo XIV) fuertemente asociada con las fibrillas (Nanci & Bosshardt D., 2006).

Los elementos celulares de este tejido son los fibroblastos, los cementoblastos, los osteoblastos y los osteoclastos; la población celular de fibroblastos es la más predominante y son las células que se encargan de sintetizar y remodelar la matriz extracelular. Se ha demostrado que existen diferentes subpoblaciones de fibroblastos, dentro de estos: los que presentan el fenotipo mineralizante, enriquecidos en fosfatasa alcalina y tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos o cementoblastos y son responsables de la producción de cemento radicular acelular con fibras extrínsecas y también se encargan del mantenimiento del espacio del ligamento periodontal (Carranza et al., 2006) (Bartold & Narayanan, 2006) (Cho & Garant, 2000) (McCulloch, Lekic, & McKee, 2000).

1.3 Hueso Alveolar

La composición bioquímica del hueso alveolar ha sido poco estudiada. Al igual que los demás tejidos del periodonto, las colágenas tipo I y III son las principales constituyentes orgánicas de los huesos. Además de las colágenas, los análisis bioquímicos de extractos de hueso alveolar han revelado la presencia de polipéptidos biológicamente activos, incluyendo la sialoproteína ósea y la osteopontina. Los principales proteoglicanos identificados en el hueso alveolar son condroitin sulfato (Bartold & Narayanan, 2006).

1.4 Cemento radicular

El cemento es un tejido conectivo avascular mineralizado que cubre toda la superficie de la raíz de los órganos dentarios. Forma la interfaz entre el ligamento periodontal y la dentina radicular. El estudio del cemento radicular ha sido difícil ya

que su distribución es limitada (Bartold & Narayanan, 2006). La ultraestructura del cemento es similar a la del hueso y de la dentina, sin embargo cuenta con características únicas que lo hacen diferente: la ausencia de vascularización directa, carece de inervación y drenaje linfático, tiene un bajo recambio metabólico y no sufre procesos de remodelación sino que tiene un proceso de aposición constante (Saygin, Giannobile, & Somerman, 2000).

Aproximadamente el 50% de la matriz inorgánica del cemento es hidroxiapatita, considerando que hasta un 90% de la matriz orgánica se compone de las colágenas tipo I y III. El cemento también contiene colágenas tipo V y VI en lugares pericelulares y colágena tipo XIV asociada con fibras de Sharpey. Los proteoglicanos se asocian principalmente con cementoblastos y cementocitos y han sido identificados como versicano, decorina, biglicano, fibromodulina y lumican, syndecan-2 pero syndecan-1 ya que éste ha sido localizado en el cemento acelular. Además, las proteínas no fibrosas tales como la sialoproteína ósea, osteopontina, tenascina, fibronectina, osteonectina y varios proteoglicanos también están presentes en la matriz orgánica del cemento (Bartold & Narayanan, 2006). Se ha demostrado que las moléculas mencionadas anteriormente han sido identificadas en hueso, no son cemento específicas e influyen las actividades biológicas de células del tejido conectivo.

El cemento tiene dentro de sus componentes moléculas específicas como el la proteína de adhesión al cemento (CAP)(Arzate, Olson, Page, Gown, & Narayanan, 1992) y la proteína del cemento 1 (CEMP1) (Arzate et al., 2002) (Alvarez-Pérez, Pitaru, Alvarez-Fregoso, Reyes-Gasga, & Arzate, 2003).

2. Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La proteína del cemento 1 CEMP1 es una proteína con un peso molecular teórico de 25.9 kDa. Está constituida por 247 aminoácidos, esta proteína fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados in vitro. Se expresa en cementoblastos putativos, en subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal con localización paravascular, cementoblastos

y células de los espacios endosteales (Villarreal-Ramírez et al., 2009).

CEMP1 no se expresa en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta por lo que constituye un marcador biológico para los cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal (Arzate et al., 2002) (Alvarez-pérez, Narayanan, Zeichner-david, Rodríguez, & Arzate, 2006) (Kémoun et al., 2007). Se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobre expresión de éste en fibroblastos gingivales humanos (células no mineralizantes) promueve la diferenciación de estas células hacia un fenotipo mineralizante (Carmona-Rodríguez et al., 2007).

CEMP1 participa en el depósito y composición de los cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de las proteínas ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos in vitro (Alvarez-Pérez et al., 2003) (Arzate, Chimal-Monroy, Hernández-Lagunas, & Díaz de León, 1996) por lo que, es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento (Kitagawa et al., 2006).

Existen estudios que demuestran que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz de esmalte reguladas por la fosforilación de Smad1 y por la vía de MAPK, se diferencian a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, sugiriendo una regulación en su proliferación y diferenciación celular (Kémoun et al., 2007).

3. Fibroblastos

Los fibroblastos son las células más abundantes del tejido conjuntivo, tienen como función principal la biosíntesis de la matriz extracelular, que incluye tanto en fibras como a la matriz amorfa. Son células que deriva de células mesenquimatosas y puede diferenciarse a células adiposas e incluso a condrocitos.

En cortes con microscopio de luz se observan con dificultad, se ve con claridad su núcleo paralelo al eje largo de las fibras de colágena pero el citoplasma se ve

escasamente. Cuando la célula se encuentra activa con tinción de H-E presenta forma fusiforme, con núcleo ovalado de cara abierta (cromatina laxa/ eucromatina es la forma descondensada de la cromatina y por tanto, activa. Este tipo de cromatina confiere a las células muy activas), el citoplasma ligeramente basófilo por la ligera cantidad de retículo endoplásmico rugoso, esta organela es la más evidente en microscopio electrónica de transmisión junto con aparato de Golgi, incluso la célula presenta algunas ramificaciones. Si la célula esta inactiva recibe el nombre de fibrocito, su núcleo es más condensado (cara cerrada o cromatina condensada/heterocromatina. Este tipo de cromatina es la que encontramos de manera condensada y le confiere a las células las características morfológicas de poseer un núcleo de cara cerrada.) y su citoplasma más acidófilo (Fortoul-van der Goes, 2013).

3.1 Fibroblastos gingivales humanos (HGF)

Los Fibroblastos gingivales humanos son constituyentes del tejido conectivo periodontal. Los fibroblastos gingivales producen colágena tipo I, III y V cuya estructura sirve como andamios para numerosas glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz extracelular asociada. Por otra parte los fibroblastos también producen integrina $\beta 1$, una proteína transmembranal implicada en la regulación de la migración celular, la proliferación, supervivencia / apoptosis y la diferenciación; esta proteína también interactúa directamente con otras células, como en adhesión celular eucariota /procariota (Carranza et al., 2006) .

3.2 Fibroblastos gingivales humanos transfectados con CEMP1 (HGF-CEMP1)

La transfección de genes de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en fibroblastos gingivales humanos (HGF) las cuales son células que no son mineralizantes induce a estas células a la mineralización y a la expresión de proteínas de matriz de hueso y cemento radicular, por lo tanto la proteína del cemento 1 tiene un papel como regulador local de la diferenciación de cementoblastos y en la mineralización

de la matriz de cemento. CEMP 1 podría participar en la diferenciación y mineralización de células no osteogénicas (Alvarez-pérez et al., 2006).

4. Núcleo celular

El núcleo celular fue observado por primera vez 1700, fue descrito en 1802 por Franz Bauer. El núcleo está rodeado por una doble membrana que lo protege contra el estrés ambiental asegurando su reparación, duplicación y transcripción. La membrana no es continua alrededor del núcleo, está interrumpida por los poros nucleares que son complejos de proteínas específicas localizadas en la envoltura nuclear, denominados complejos de poro nuclear y gracias a estos se lleva a cabo el transporte de moléculas entre los compartimientos nucleares y citoplasmáticos de la célula. La membrana externa está continua con el retículo endoplásmico rugoso y esto sirve para separar los sitios de transcripción génica a partir de los sitios de la traducción del mRNA en el citoplasma; la membrana interna contiene proteínas específicas que la unen a la lámina nuclear la cual le da soporte a todo el núcleo se le llama espacio perinuclear el cual está contiguo con el lumen del retículo endoplásmico (Spector, 1993) (Miroslav Dundr and Tom Misteli, 2001) (Alberts et al., 2007) (David Stanek and A Fox, 2017).

El núcleo contiene la información genética de la célula y también es el sitio de las principales actividades metabólicas, incluyendo la síntesis de DNA, la transcripción, splicing del pre-RNA, síntesis y ensamblaje de la subunidad del ribosoma.

La localización de los factores nucleares en NBs (cuerpos nucleares) puede servir para varias funciones, incluyendo la mejora de la eficiencia de las reacciones mediante la creación de una alta concentración local de los factores necesarios involucrados en un proceso común. Los NBs también pueden dividirse en factores específicos, pueden controlar el acceso de las enzimas y los receptores de sus sustratos y pueden desempeñar un papel en el transporte intranuclear y en el control de la expresión génica (Spector, 1993) (Miroslav Dundr and Tom Misteli, 2001).

El núcleo celular está altamente compartimentado, el núcleo interfásico, a diferencia de las organelas celulares en el citoplasma, no tiene membranas que delimiten los compartimientos nucleares. Estos cuerpos nucleares son el nucléolo, gránulos intercromatinianos, gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas y cuerpos de Cajal.

Se han realizado muchos estudios con los que se han caracterizado tanto funcionalmente como morfológicamente algunos cuerpos o dominios nucleares (Miroslav Dundr and Tom Misteli, 2001) (Alberts et al., 2007).

4.1 Nucléolo

El nucléolo es la estructura de naturaleza rionucleoproteica más grande y evidente dentro del núcleo interfásico. La principal función de esta estructura es la biogénesis del ribosoma, la transcripción y el procesamiento del RNA pre-ribosomal y el ensamble de las subunidades ribosómicas 28S, 18S, y 5.8S características de las células eucariontes. La formación del nucléolo es dependiente de la transcripción así como del ciclo celular; en la mayoría de las células eucariontes el nucléolo entero se disgrega durante la mitosis y vuelve a formarse en la telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), ya que el nucléolo es una estructura dinámica que se forma en respuesta a los requerimientos para la síntesis de nuevos ribosomas (Lamond A.I., Earnshaw, W.C., 1998).

4.2 Gránulos Intercromatinianos

A nivel ultraestructural es posible observar cúmulos de gránulos intercromatinianos (ICG) que son estructuras nucleares sin membrana que se detectan como 20 a 50 puntos de forma irregular y se organizan en cúmulos en los espacios intercromatinianos del núcleo, que miden entre 20-25 nm de diámetro y juegan un papel muy importante en el ensamblado, modificación y almacenamiento de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA (Misaki Matsui *et al.*, 2020). Entre los constituyentes de estos gránulos, se

encuentran las proteínas de la familia SR (como el factor SC35) y la subunidad grande de la RNA polimerasa II en su forma hiperfosforilada. Mediante inmunomarcaje fluorescente de las proteínas SR, se observa que estos factores de procesamiento se organizan en forma de motas o *speckles*, las cuales presentan formas redondas, compactas y brillantes cuando la actividad transcripcional disminuye, mientras en células activas el patrón moteado es de formas irregulares, menos brillantes y rodeadas de un patrón difuso

Los ICGs han sido sometidos a análisis proteómicos, donde se han podido identificar 146 proteínas. Las proteínas son de diferentes tipos y entre ellas se encuentran las proteínas de la familia SR, que están involucradas en el reconocimiento del RNA y del dominio SR (Hall et al., 2006). Se ha observado que sí existe una acumulación de factores de *splicing* como el de las proteínas SR hiperfosforiladas en los sitios de síntesis, los ICGs se desensamblan, lo que altera la coordinación entre la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA en núcleos de mamíferos (Spector, D.L., Fu, X.D., and Maniatis, T., 1991).

4.3 Fibras pericromatinianas

Las fibras pericromatinianas (PCFs) fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969) como “la expresión morfológica extranucleolar de la transcripción”. Estas estructuras tienen un diámetro de 3 a 5 nm y están situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta. Pueden ser observadas al microscopio electrónico de transmisión donde son detectadas en sitios de transcripción por la incorporación de uridina tritiada o la 5-bromouridina 5'trifosfatada, lo que nos indica la presencia de transcritos nacientes (Lamond, A.I, and Spector, D.L., 2003; Spector D.L., 1993; Fakan,S., 1994). Se ha visto que hay una relación directa en la densidad de estas estructuras con el rango de síntesis de pre-mRNA, además de que puede ser estimulada o inhibida por la acción de varios tipos de drogas y hormonas. Aunado a esto, en estudios bioquímicos y de autorradiografía para ubicar los sitios de transcripción, se ha observado que las PCF migran hacia los espacios intercromatinianos mientras que el RNA inicia la maduración (Jiménez, G. L. F et al., 2007).

4.4 Gránulos pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos son estructuras ribonucleoproteicas ya que son EDTA positivas. Fueron descritas por primera vez por Watson en 1962, son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro, procedentes del enrollamiento de las fibras pericromatinianas y son rodeados por un halo claro de 25nm que se hace distinguir de manera fácil en las micrografías electrónicas; generalmente están ubicados en el borde de los grumos de cromatina compacta, pero también se les puede ver en la región intercromatiniana, aunque de manera escasa. Se ha encontrado evidencia de que los gránulos pericromatinianos almacenan y transportan mRNA, hacia el citoplasma para ser traducidos a proteínas (Jiménez, G. L.F., 1993; Monneron, A., Bernhard, W. 1969).

4.5 Cuerpos de Cajal

Los cuerpos de Cajal fueron observados por primera vez por Ramón y Cajal en 1903, quien los describió como cuerpos accesorios del nucléolo. Fueron redescritos ultraestructuralmente por Monneron y Bernhard (1969) como agregados esféricos de 0.3-0.5 μm de diámetro, contrastados por el procedimiento de acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo y están formados por fibras de 40-60 nm de espesor, localizándolos en la zona intercromatiniana, sin relación aparente con el nucléolo. Los cuerpos de Cajal contienen moléculas que participan en la biogénesis del RNA nuclear. Hay evidencias que sugieren que tienen un papel en la modificación y ensamblaje de snRNPs. También se encuentran snRNPs, involucradas en el procesamiento del rRNA (Spector, D.L., 2006; Fakan, S., 1984; Monneron, A., and Bernhard, W., 1969; Gall, J.G., 2000).

II. Planteamiento del problema

El análisis ultraestructural del núcleo celular líneas celulares eucariontes se ha realizado durante años en diversas tipos líneas celulares así como en tejidos obteniendo como resultado diferentes características fenotípicas relacionadas con la expresión génica. Se requiere conocer el fenotipo para así poder caracterizar la ultraestructura de la expresión génica de líneas celulares derivadas del periodonto como lo son Fibroblastos gingivales humanos (HGF) y Fibroblastos gingivales humanos transfectados con la proteína del cemento 1 (HGF_CEMP1).

III. Justificación

La transfección de genes en células puede inducir modificaciones en el rearrreglo subcelular por lo que es necesario generar patrones de organización interna en la célula que puedan servir para comparar los cambios que ocurren con la introducción de genes. En especial varias estructuras nucleares se relacionan con la expresión genética y podrían alterarse con los procesos de transfección en general. Aunque hay datos de reorganización nuclear no se conocen los cambios en los fibroblastos gingivales transfectados con CEMP1. Los datos pueden utilizarse como características diagnósticas de estas células.

Hipótesis

Las estructuras nucleares tales como el nucléolo, fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos y cuerpos de Cajal, están presentes en las líneas celulares HGF y HGFCEMP1 aunque con características diferentes.

IV. Objetivos

Objetivo General

Conocer las características ultraestructurales de las ribonucleoproteínas del núcleo en las líneas celulares HGF1 y HGF_CEMP1.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de las ribonucleoproteínas descritas en otras células, en las líneas celulares del periodonto.
- Conocer las relaciones espaciales de las partículas a través del análisis tridimensional del nucléolo, gránulos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos y cuerpos de Cajal.
- Conocer la densidad volumétrica del nucléolo, gránulos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos y cuerpos de Cajal.

V. Método

Líneas Celulares. Se utilizan fibroblastos gingivales humanos y fibroblastos gingivales humanos transfectados con el gen codificante de la proteína CEMP1, donadas por el Dr. Higinio Arzate del laboratorio de tejidos mineralizados del departamento de posgrado e Investigación de la facultad de Odontología.

A) Cultivo celular

El cultivo celular se realizó con la técnica convencional reportada por Narayanan y Page (1976).

Las células se crecen y se mantienen en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Cuando llegan a confluencia, las células se cosechan, utilizando tripsina-EDTA al 0.025% y se transfirieron para su expansión. Las células se mantienen en una incubadora a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los experimentos se realizan con células del cuarto al quinto pase.

B) Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras se procesaron por la técnica estándar para microscopía electrónica de transmisión descrita anteriormente (López-Velázquez et al., 2005). Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm se fijaron en una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos salino a pH 7.3 durante 2 horas a temperatura ambiente, fueron postfijadas en Tetraóxido de Osmio al 1% durante 1 hora. También se procesaron otras células sin postfijación con Tetraóxido de Osmio. Se deshidrataron utilizando una serie gradual de etanol a concentraciones 30%, 50%, 70%, 80%, 90% durante 5 minutos con cada tipo de alcohol, se finalizó la deshidratación con alcohol absoluto (100%) haciendo dos lavados de 10 minutos cada uno posteriormente se colocó óxido de propileno al

100% y se hicieron dos lavados por 10 minutos cada uno, en el último cambio de óxido de propileno, en una solución de óxido de propileno y resina epóxica 1:1 (EMS) permanecieron así durante 48 horas y posteriormente se realizó la preinclusión; las muestras se incluyeron en resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 48 horas para posteriormente realizar ultramicrotomía.

C) Preparación de las muestras para observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En los bloques de resina obtenidos se elimina la mayor cantidad de resina posible, alrededor de la muestra con ayuda de navajas marca Dorco, nuevas y limpias, formando una pirámide procurando que sus cantos formen un trapecio con bordes bien definidos, en la superficie de la cúspide.

a) Obtención de cortes semi-finos y tinción con azul de toluidina

Esta tinción es adecuada para material nuclear e identificar RNA. Una vez hecha la pirámide se obtienen cortes semi-finos de 200-300 nm de espesor con ultramicrotomo Leica Ultracut R, se fijan los cortes con calor en un porta objetos de vidrio, se tiñen con azul de toluidina para observarse en un microscopio óptico Axiostar de Carl Zeiss y un objetivo de 40X con una cámara Nikon E-800, con la finalidad de observar para verificar la conservación de la morfología celular y seleccionar el área que mostrara más cantidad de células.

b) Obtención de cortes ultrafinos, montaje y contraste

De los cortes semifinos obtenidos se seleccionó el área que mostrara más núcleos celulares, se retalla una pirámide más pequeña en la cara del bloque para poder tener un área precisa del área de interés. Seleccionada esta zona se procedió a realizar los cortes ultrafinos de 50-60nm de espesor (color gris acerado) en el ultramicrotomo LEICA ultracut R, los cortes fueron montados en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro recubiertas con una membrana de colodion.

Para las células que fueron post-fijadas con Tetraóxido de Osmio, las rejillas con

los cortes se contrastaron por flotación, utilizando la técnica convencional para microscopía electrónica en una cámara húmeda que contenía torundas húmedas, las rejillas permanecían flotando en acetato de uranilo acuoso al 4% durante 20 minutos, se retiraban al finalizar ese tiempo y se enjuagaron por goteo con agua desionizada con ayuda de una piseta, posteriormente se flotaron nuevamente en una caja petri que contenía lentejas de hidróxido de sodio y permanecían flotando en citrato de plomo al 0.3% por 10 minutos y se enjuagó por goteo con una piseta con agua desionizada.

Para las células que fueron tratadas sin post fijación con Tetraóxido de Osmio, las rejillas también se contrastaron por flotación, pero se utilizó la técnica de contraste de EDTA para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969); en una cámara húmeda que contenía torundas húmedas las rejillas permanecían flotando en acetato de uranilo acuoso al 4% durante 3 minutos, se retiran al finalizar los 3 minutos y se enjuagaron por goteo con una piseta con agua desionizada, a continuación se flotaron nuevamente en una caja petri que contenía EDTA, este procedimiento se realizó durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron nuevamente por goteo con una piseta que contenía agua desionizada. Posteriormente en una caja petri que contenía lentejas de hidróxido de sodio en ambiente de humedad se flotaron las rejillas en citrato de plomo al 0.3% por 3 minutos y se enjuagaron por goteo con una piseta con agua desionizada.

El exceso de agua de las rejillas se retiró con ayuda de papel filtro y se dejaron secando dentro de una caja petri y para evitar la contaminación de las muestras con polvo.

Posteriormente las rejillas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operando a 80KV, las observaciones se realizaron a diferentes aumentos para localizar las zonas de interés. Para el registro de las imágenes se utilizó la cámara MTI modelo CCD-300-RC y la cámara Sc600 gatan JEOL, las imágenes obtenidas fueron guardadas en formato TIF para luego ser analizadas e interpretadas.

D) Análisis tridimensional

El análisis tridimensional se realizó con imágenes en estereopares, obtenidas con un goniómetro acoplado al Microscopio Electrónico de Transmisión. Los ángulos de inclinación utilizados fueron diez grados hacia arriba y 10 grados hacia abajo para generar una imagen anaglífica con ayuda del programa *Anaglyph Maker* (http://www.stereoeye.jp/software/index_e.html), o lentes estereoscópicas y de esta manera se logró el efecto en tercera dimensión (3D) que nos permite visualizar las estructuras nucleares.

E) Conteo de nucléolos por línea celular y análisis estadístico

Utilizando el software de Image J en cortes semifinos con un espesor de 200-250 nm teñidos con azul de toluidina y se encontraron diferencias en el número de nucléolos entre cada línea celular tal como se muestra en la **gráfica 1**. En total se contaron 350 núcleos para cada línea celular. Se realiza la prueba estadística de U de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para dos muestras independientes.

F) Conteo de gránulos intercromatinianos y análisis estadístico

El conteo de GIC se realiza por mota, un total de 50 motas por línea celular, se eligen al azar entre 100 imágenes por línea celular para evitar sesgos; el conteo también se realiza por área en un área de 430um por línea celular, ambos conteos se llevan a cabo de manera manual en el programa Image J. Se realiza la prueba estadística de U de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para dos muestras independientes.

RESULTADOS

Línea celular HGF

Tinción con azul de toluidina

Al realizarse la tinción con azul de toluidina en células creciendo en monocapa, se observan Fibroblastos Gingivales Humanos de forma fusiforme, su núcleo celular de forma oval, nucléolos en la mayoría de las células más de un nucléolo; también se observa un núcleo en división (Figura 1).

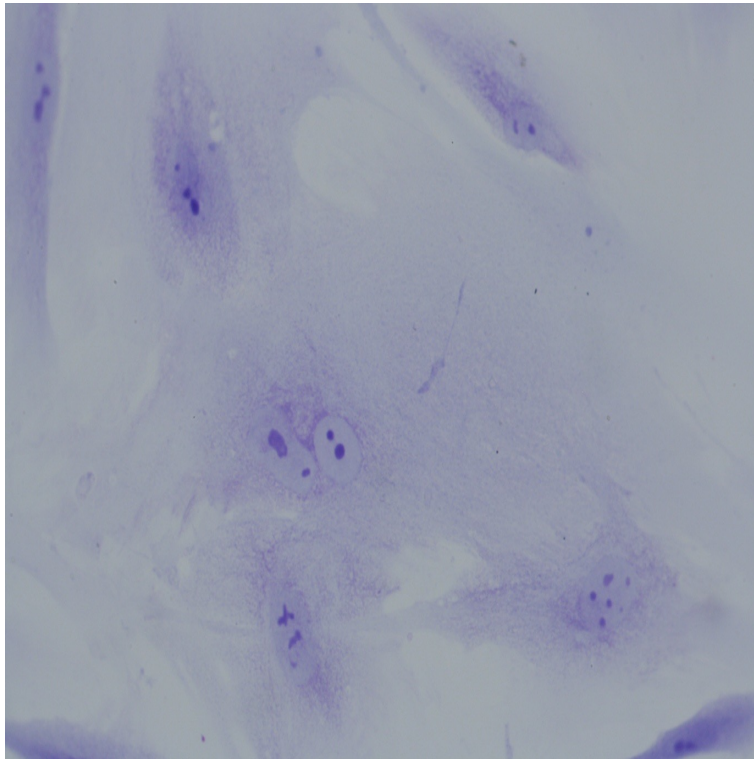


Figura 1. Línea celular de Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF), teñida con azul de toluidina. 40X

Microscopía electrónica de transmisión línea celular HGF

En las células de la línea celular HGF (fibroblastos gingivales humanos) se observa parte del citoplasma, algunas vacuolas, el núcleo celular que presenta una forma irregular (Figuras 2, 5 y 7), mientras que núcleos de la línea celular HGF son de forma irregular, dentro del nucleoplasma se observa de manera muy evidente el nucléolo y con mayor frecuencia un nucléolo (Figuras 2, 3, 5 y 6). A menores aumentos se aprecia un ambiente fibro-granular que predomina en el nucleoplasma (Figuras 2, 3 y 5). Se observa el núcleo delimitado por la envoltura nuclear en la cual la cromatina se encuentra adherida a la parte interna de la envoltura nuclear (Figuras 2 y 3) y esto a mayores aumentos se muestra más evidente (Figuras 5, 7 y 8). Se aprecia un cúmulo de gránulos intercromatinianos con fibras que los conecta (Figuras 4). Estos gránulos intercromatinianos son del tamaño de los ribosomas que se encuentran en la parte externa de la envoltura nuclear (Figuras 3). También se observa en la periferia del núcleo gránulos pericromatinianos (Figuras 4 y 7).

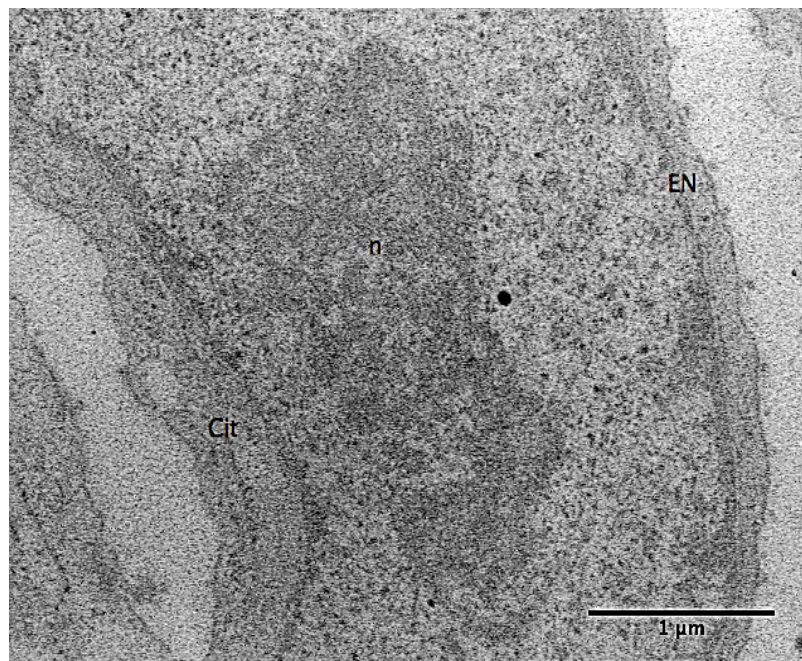


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultra-fino de núcleos celulares de la línea celular HGF contrastado con Ur-Pb. SE Se identifican estructuras nucleares. Nucléolo (n), envoltura nuclear (EN). Citoplasma (Cit).

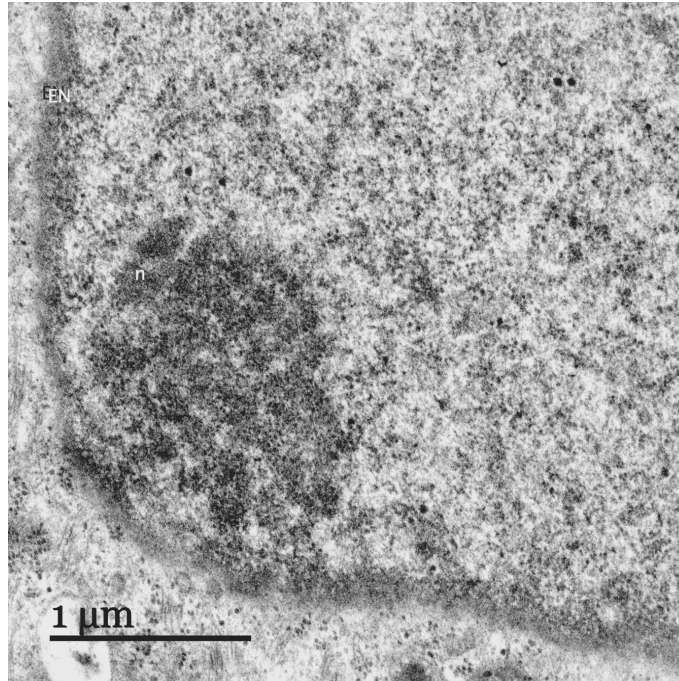


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultra-fino de núcleos celulares de la línea celular HGF contrastado con Ur-Pb. SE Se identifican estructuras nucleares. Nucléolo (n), envoltura nuclear (EN). Citoplasma (Cit).

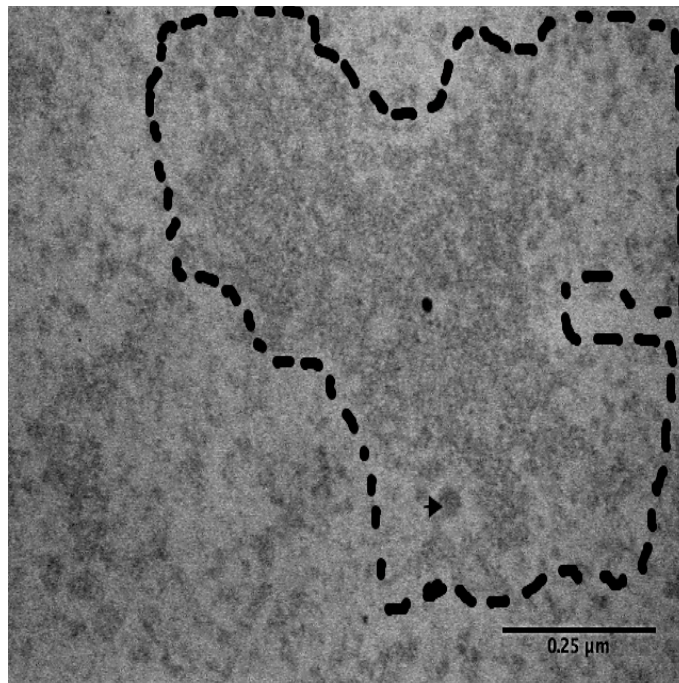


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión de núcleos de la línea celular HGF contrastada con Ur-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma. Un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada) y un gránulo pericromatiniano (flecha).

Cuando se emplea el método de tinción de EDTA, se observa en todas las células examinadas un patrón muy constante de la distribución de subestructuras nucleares, la pared condensada por la cromatina a lo largo de la envoltura nuclear (Figuras 5, 7, 8 y 10), la cromatina (Figuras 5-10), nucléolo (Figuras 5 y 6) y los grumos asociados de cromatina dispersa en el nucleoplasma están muy débilmente teñidas (Figuras 5-10), mientras que los nucléolos (Figuras 5 y 6), los gránulos intercromatinianos (Figuras 5-10) y gránulos pericromatinianos (Figura 7) se muestran con un contraste muy denso similar a como se observan los ribosomas citoplasmáticos (Figuras 5, 7, 8 y 10) . El uso de un goniómetro acoplado al microscopio electrónico de transmisión permitió crear imágenes estereopares, en estas imágenes se observan los componentes nucleares densamente contrastados dentro del nucleoplasma, se identifican con claridad la interconexión de los gránulos intercromatinianos y las fibras pericromatinianas (Figura 10).

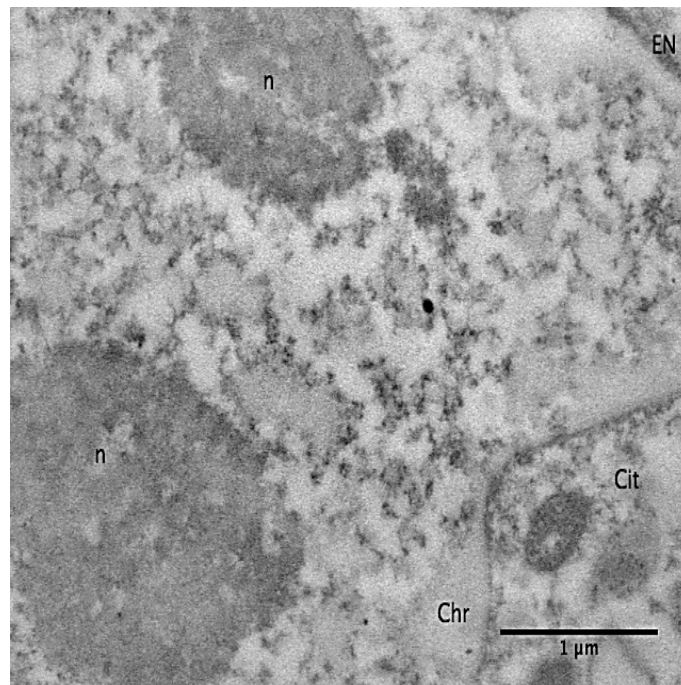


Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observan dos nucléolos densamente contrastados (n), material fibro-granular en el nucleoplasma y cromatina (Chr) adherida a la parte interna de la envoltura nuclear (EN).

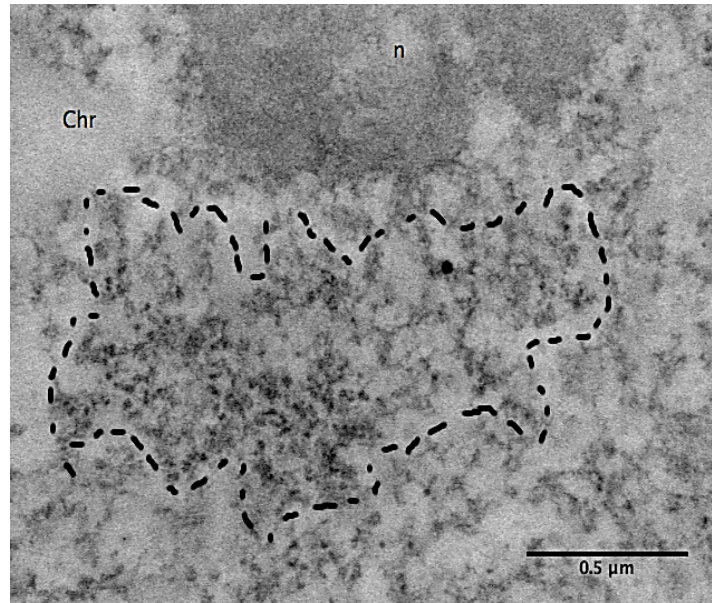


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observan un nucléolo densamente contrastados (n), material fibro-granular en el nucleoplasma y Un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada).

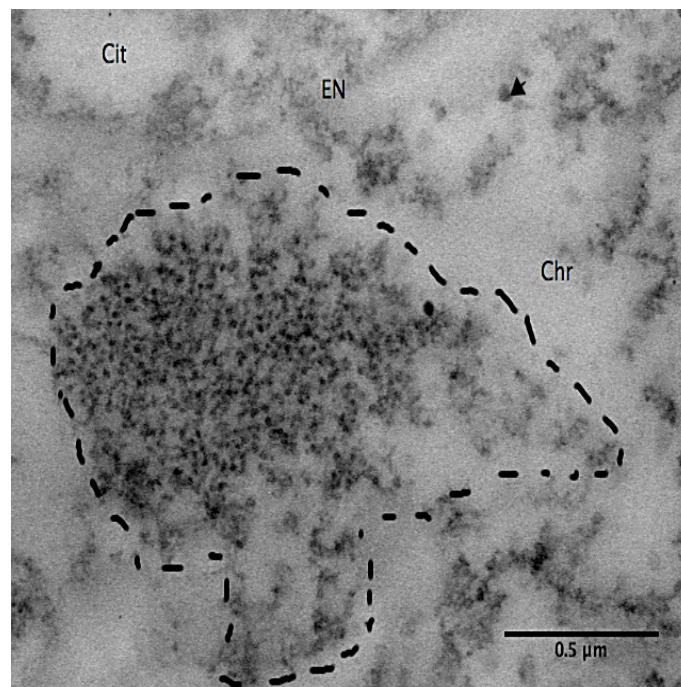


Figura 7. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada), un gránulo pericromatiniano (flecha) y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

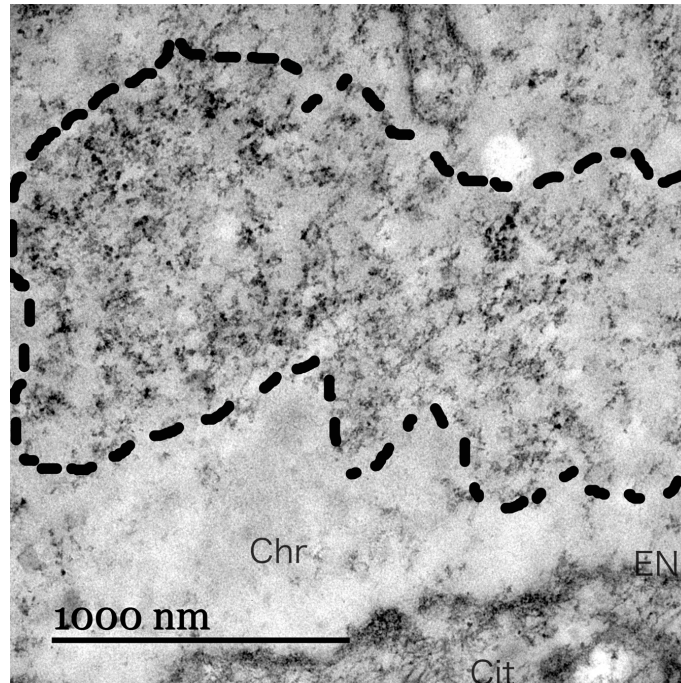


Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada) y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

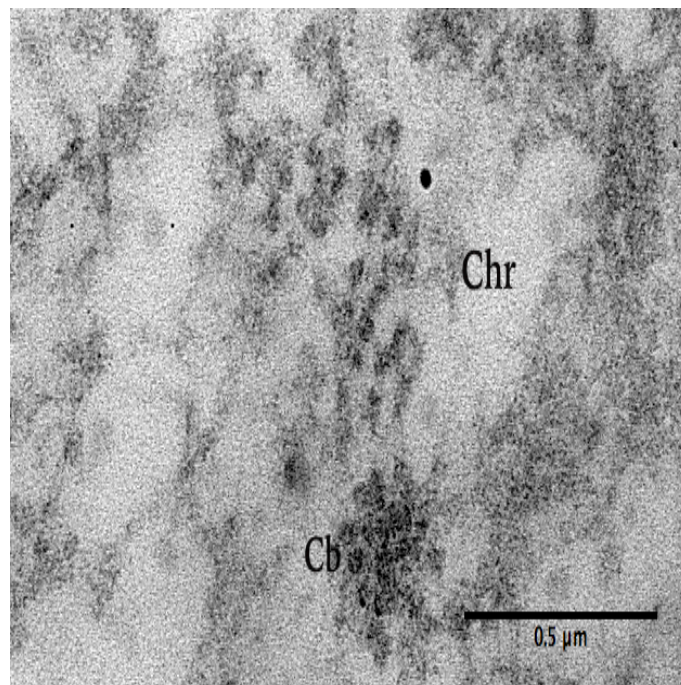


Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, cromatina (Chr) débilmente contrastada y un cuerpo de Cajal (Cb) en el nucleoplasma.

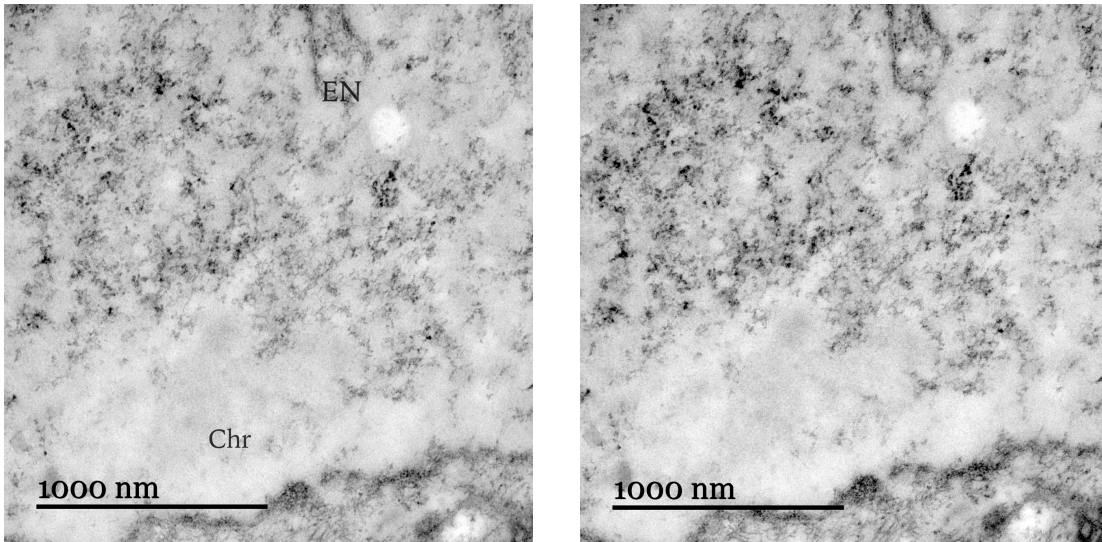


Figura 10. Imágenes estereopares de micrografías electrónicas de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, un cúmulo de gránulos intercromatinianos y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

Línea celular HGF-CEMP1

Tinción con azul de toluidina

Al realizarse la tinción con azul de toluidina en cortes semi-finos de células creciendo en cultivo, se observan las células de forma redondeada, su núcleo celular de forma oval y circular, los núcleos presentan un nucléolo en su mayoría (Imagen 11).

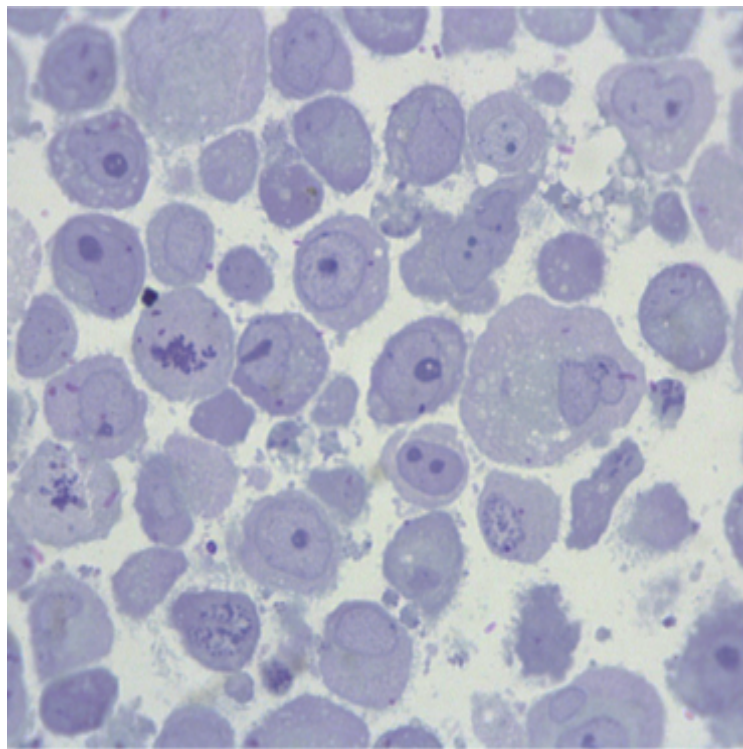


Figura 11. Micrografía óptica de un corte semifino de células de la línea celular de Fibroblastos Gingivales Humanos transfectada con el gen que codifica para la proteína del cemento 1 (HGF_CEMP1), teñida con azul de toluidina. 100X

Microscopía Electrónica de Transmisión línea celular HGF_CEMP1

En las células de la línea celular HGF_CEMP1 se observa el citosol, algunas vacuolas, el núcleo celular que se presenta de forma alargada (Imagen 12), se identifica el nucléolo (Figuras 12, 13, 14, 16 y 17). Se observa el núcleo

delimitado por la envoltura nuclear y se encuentra por la parte interna de la envoltura nuclear poca chromatina adherida a la envoltura (Figuras 12, 13, 15, 16, 17, 18, y 21). El nucleoplasma presenta abundante contenido fibro-granular, más con el contraste de uranilo-plomo en esta línea celular no es tan notorio a bajos aumentos los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Figuras 12-21). Los gránulos intercromatinianos son del tamaño de los ribosomas que se encuentran en la parte externa de la envoltura nuclear (Imágenes). También se logran identificar con claridad en la periferia del núcleo los gránulos pericromatinianos (Figuras 13 y 17).

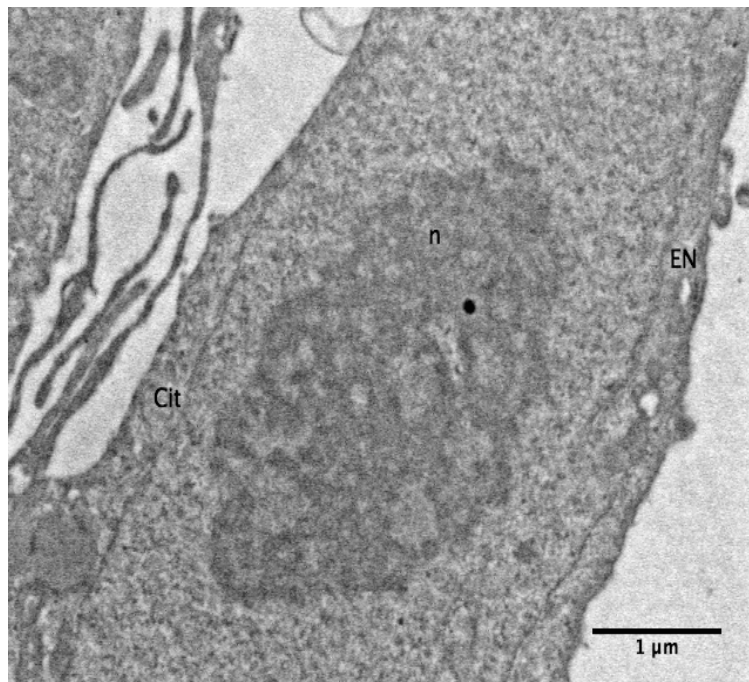


Figura 12. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-Pb. Se observa un nucléolo, material fibro-granular en el nucleoplasma, la envoltura nuclear (EN) y el citoplasma (Cit).

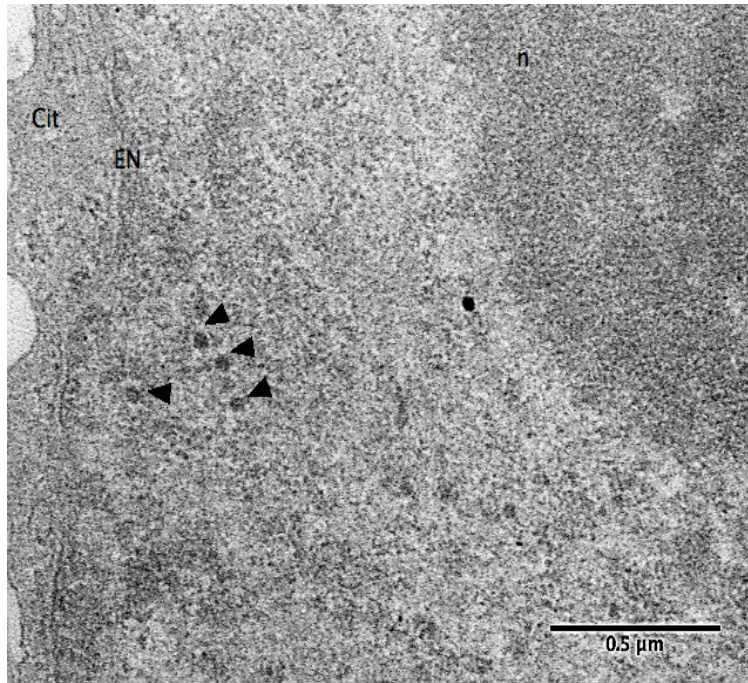


Figura 13. Micrografía electrónica de transmisión de núcleos de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-Pb. Se observa un nucléolo (n), material fibro-granular en el nucleoplasma y gránulos pericromatinianos (flechas).

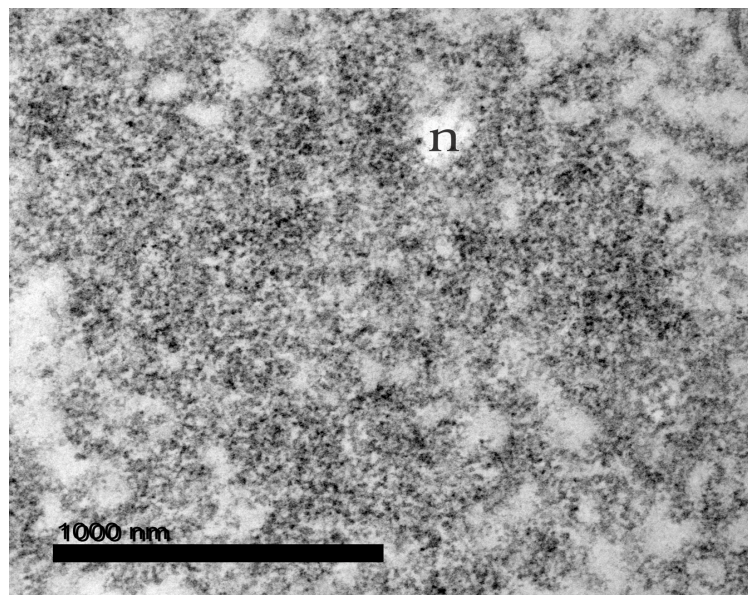


Figura 14. Micrografía electrónica de transmisión de núcleos de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-Pb. Se observa un nucléolo y material fibro-granular en el nucleoplasma.

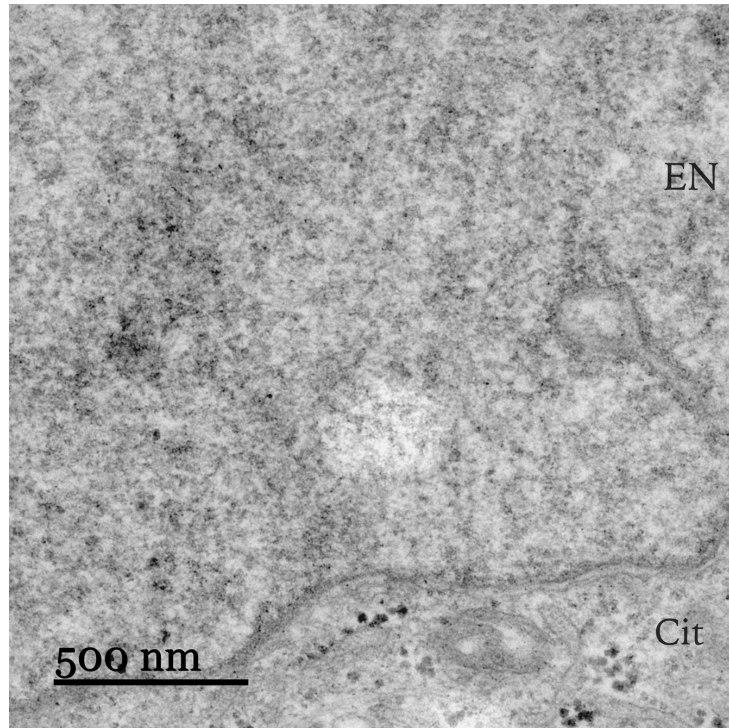


Figura 15. Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultra-fino de un núcleo celular de la línea HGF_CEMP1 contrastados con Ur-Pb, se observa material fibro-granular en el nucleoplasma. Envoltura nuclear (EN). Citoplasma (cit).

La técnica de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs), retira el uranilo más rápidamente de la cromatina que de las partículas ribonucleoproteínas y debido a esto se observa el nucléolo fuertemente contrastado (Figuras 16 y 17) ya que tiene un gran contenido de RNPs. Se observa en todas las células examinadas un patrón densamente contrastado muy constante de distribución de subestructuras nucleares (Figuras 16-21) la cromatina al no contener ribonucleoproteínas se encuentra blanqueada (Figuras 16-21), los grumos de cromatina dispersa en el nucleoplasma están muy débilmente teñidos, mientras que los nucléolos y los gránulos inter y pericromatinianos se muestran con un contraste denso (Figuras 16-21) similar a como se observan los ribosomas citoplasmáticos (Figuras 17, 18 y 21). Con este tipo de contraste los cúmulos de gránulos intercromatinianos se muestran muy evidentes (Figuras 18, 19 y 21), también los gránulos pericromatinianos se observan con un contraste muy denso en la periferia nuclear (Figura 17). Las imágenes estereopares nos muestran los

cúmulos de gránulos intercromatinianos densamente contrastados dentro del nucleoplasma, se observa la interconexión de los gránulos intercromatinianos y las fibras pericromatinianas (Figura 21).

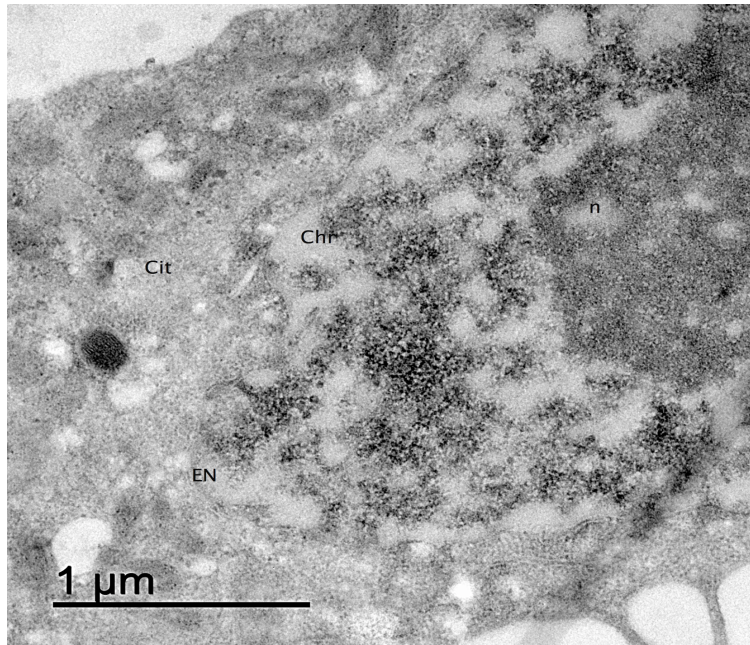


Figura 16. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa un nucléolo (n), material fibro-granular en el nucleoplasma y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

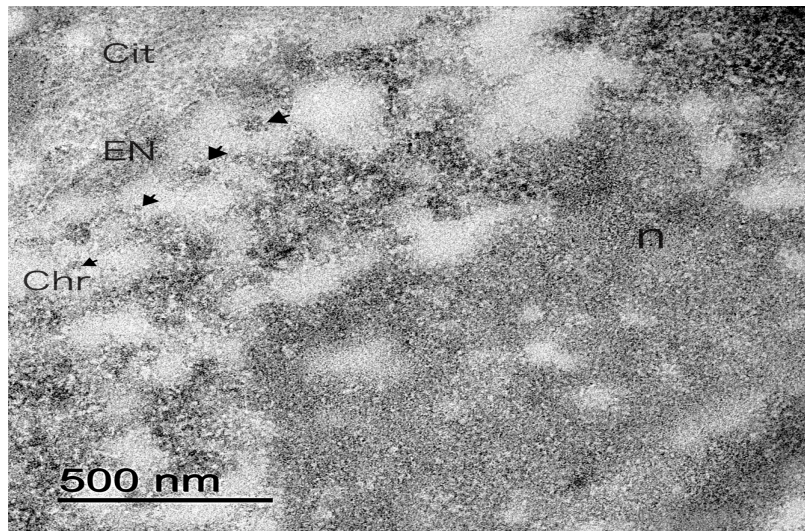


Figura 17. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa un nucléolo, material fibro-granular en el nucleoplasma, gránulos pericromatinianos (flechas) y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN). Citoplasma (cit).

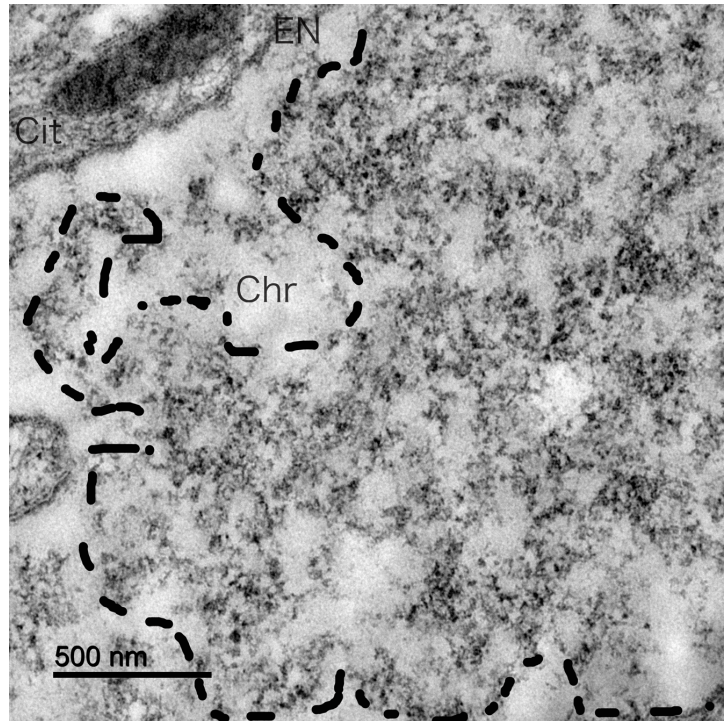


Figura 18. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada) y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

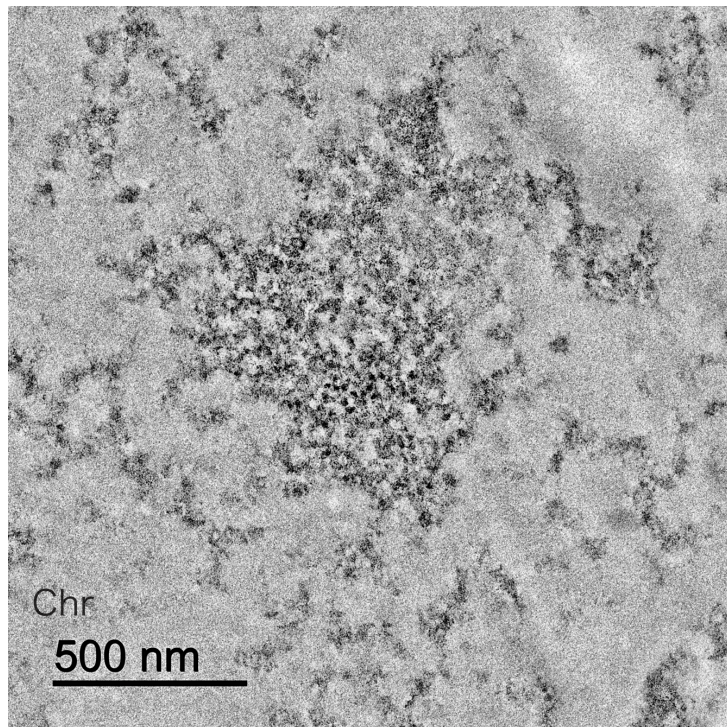


Figura 19. Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultra-fino de núcleos celulares de la línea celular HGF_CEMP1 contrastado con Ur-EDTA-Pb. Se identifica un cúmulo de gránulos intercromatinianos (zona punteada) y cromatina (Chr).

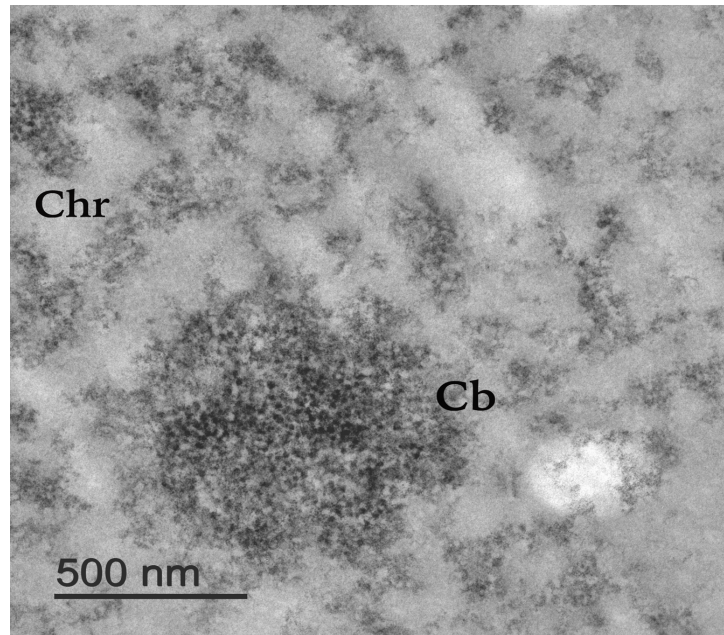


Figura 20. Micrografía electrónica de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, cromatina (Chr) débilmente contrastada y un cuerpo de Cajal (Cb) en el nucleoplasma

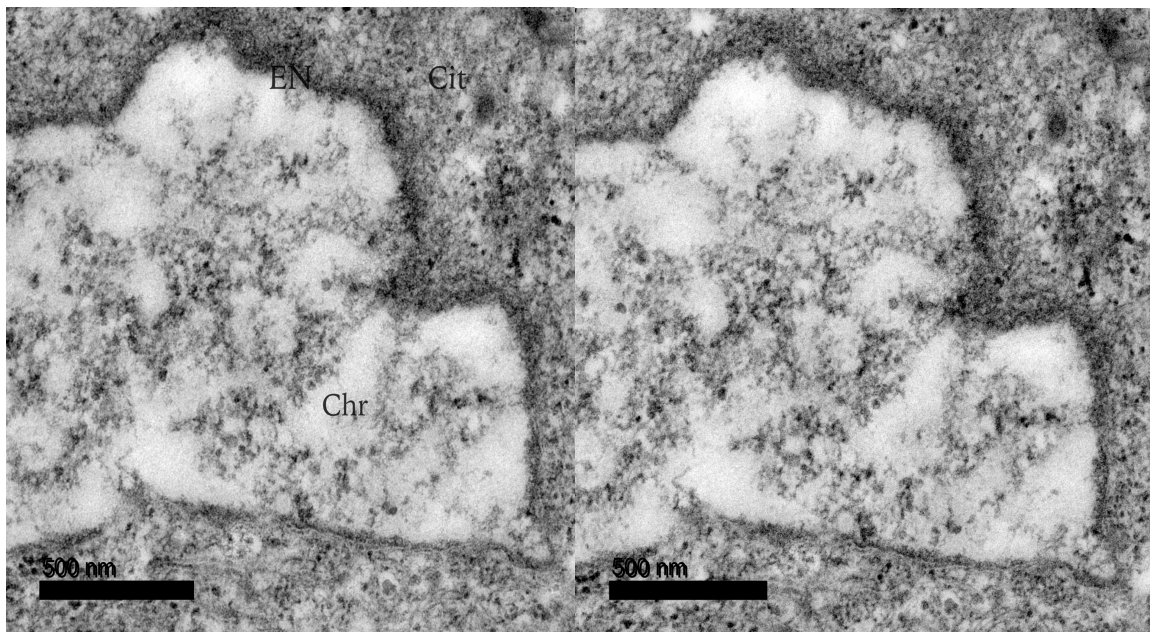
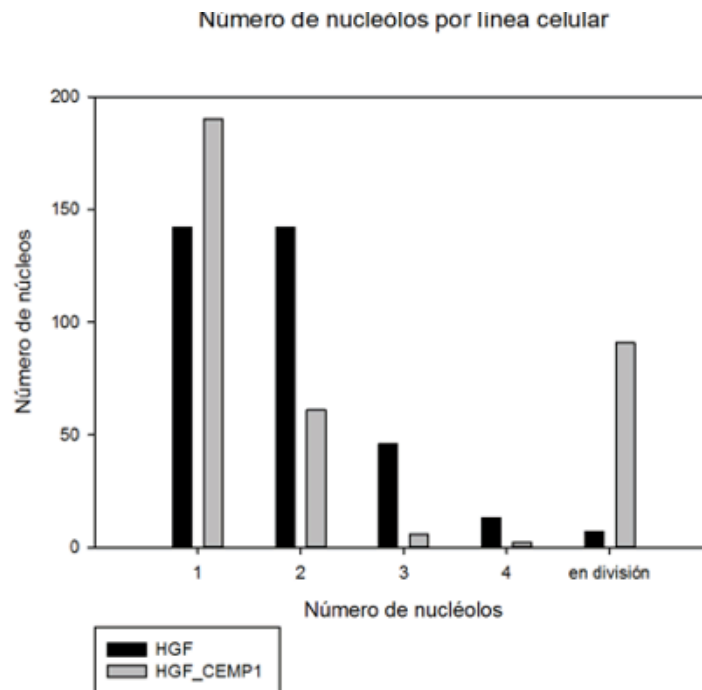


Figura 21. Imágenes estereopares de micrografías electrónicas de transmisión de un núcleo de la línea celular HGF_CEMP1 contrastada con Ur-EDTA-Pb. Se observa material fibro-granular en el nucleoplasma, un cúmulo de gránulos intercromatinianos y cromatina (Chr) adherida a la envoltura nuclear (EN).

Conteo de nucléolos por línea celular

Se encontraron diferencias en el número de nucléolos entre cada línea celular tal como se muestra en la **gráfica 1**. En total se contaron 350 núcleos para cada línea celular. En la línea celular HGF se encontraron una mayor cantidad de núcleos con dos nucléolos, mientras que para la línea celular HGF_CEMP1 hay un mayor número de núcleos con un solo nucleólo; también es evidente que la línea celular HGF_CEMP1 tiene un mayor número de núcleos en división. Se realizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para dos muestras independientes, con un valor de $P = <0,001$.



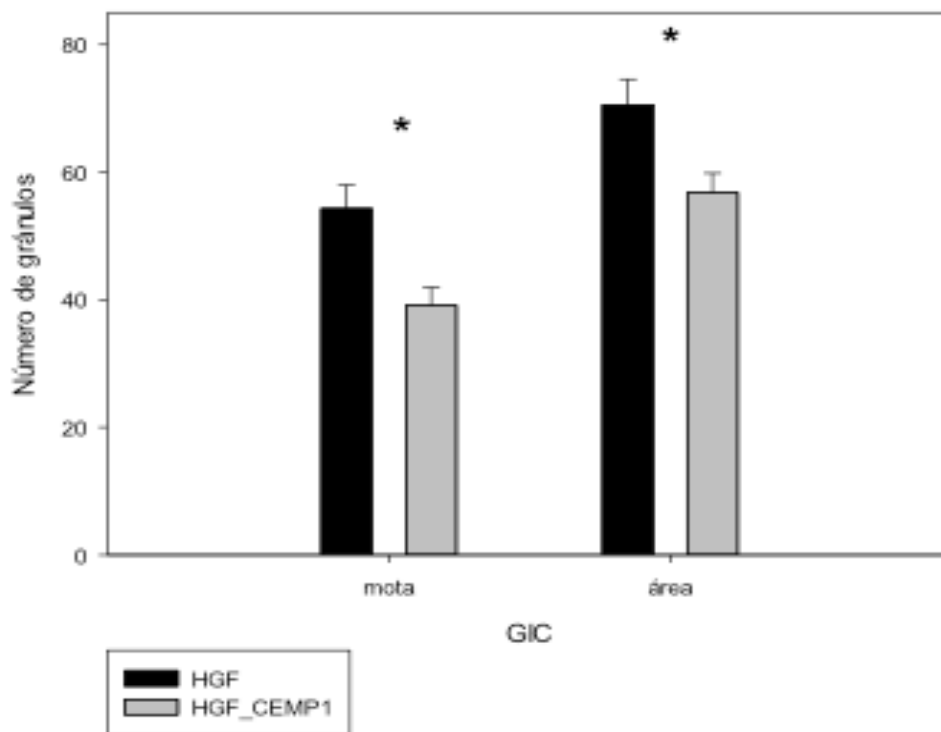
$P = <0,001$

Gráfica 1. Conteo de nucléolos por línea celular. La línea celular HGF presenta un mayor número de núcleos con dos nucléolos; mientras que la línea celular HGF presenta un mayor número de núcleos con un solo nucleólo. Significancia estadística $P < 0,001$.

Conteo de Gránulos intercromatinianos (GIC)

Se encontraron diferencias entre las líneas celulares HGF y HGF_CEMP1, en el conteo por motas y por área hay una mayor cantidad de GIC en la línea celular HGF (**gráfica 2**). Se realizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney, prueba no paramétrica para dos muestras independientes, en el conteo por mota el valor de $P = 0.001$; en el conteo por área de $430\mu\text{m}$ el valor de $P = 0.010$. En la línea celular HGF_CEMP1 hay una mayor cantidad de fibras pericromatinianas que en la línea celular HGF.

Número de Gránulos intercromatinianos



Gráfica 2. Conteo de gránulos intercromatinianos (GIC) en las líneas celulares HGF y HGF_CEMP1. Hay un mayor número de GIC en la línea celular HGF.

DISCUSIÓN

Se analizaron y caracterizaron las estructuras ribonucleoproteicas del núcleo celular de las líneas celulares HGF y HGF_CEMP1 por microscopía electrónica de transmisión, a través de una tinción general de acetato de uranilo y citrato de plomo, que nos permitió conocer en general los componentes del núcleo de estas dos líneas celulares; con la técnica de EDTA que es preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969) (Monneron y Bernhard, 1969) esta técnica elimina el uranilo más rápidamente de la cromatina que de las partículas de ribonucleoproteínas, nos permitió conocer y caracterizar las estructuras nucleares que contienen ribonucleoproteínas (RNPs) como son: nucléolo, gránulos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos y cuerpos de Cajal.

En este trabajo se demostró que la transfección con CEMP1 no vuelve al núcleo celular diferente, las características de sus estructuras ribonucleoproteicas no cambian; el nucléolo, gránulos intercromatinianos fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos y cuerpos de Cajal presentan diámetro, forma y misma ubicación. El control del número de un cuerpo nuclear es poco conocido, el número de nucléolos, que se forman alrededor de un número fijo de regiones organizadoras nucleolares que consiste en constantes repetidas de rDNA en un número definido de cromosomas, varía mucho en diferentes tejidos y tipos celulares (Mao, Y. S *et. al* 2011).

Estudios previos han demostrado que el tamaño y el número de cuerpos nucleares no son fijos, sino que dependen de las condiciones fisiológicas de la célula. El número de nucléolos se correlaciona positivamente con la proliferación celular; los núcleos de mamíferos contienen uno o pocos nucléolos. En células en cultivo el tamaño del nucléolo puede ser diferente y el número de nucléolos puede ser entre uno y seis; sin embargo, el número de nucléolos no se puede determinar con precisión ya que el nucléolo se fusiona en células humanas de una a dos horas después de la entrada de las células en interfase (Hernández-Verdun 2006).

En cuanto a los resultados encontrados en los cuerpos de Cajal, la línea celular HGF se observaron mayor cantidad de cuerpos de Cajal y esto nos indica que podría haber más proteínas nucleolares, en HGF hay más cuerpos de Cajal y más núcleos con dos nucléolos por lo tanto hay más proteínas de control del ciclo celular y más proteínas nucleolares lo que es concordante con el resultado de HGF tiene más núcleos con dos nucléolos y en HGF_CEMP1 hay más núcleos con un solo nucléolo ya que se encontraron menos cuerpos de Cajal por lo tanto hay menos proteínas nucleolares. Otro hallazgo que se encontró es que en HGF_CEMP1 hay un mayor número de núcleos en división y esto puede hacer referencia al haber menos cantidad en esta línea de cuerpos de Cajal hay también menos proteínas de control de ciclo celular y por lo tanto se acorta el ciclo celular en G1 y S. Por otro lado al encontrarse mayor cantidad de cuerpos de Cajal en Fibroblastos gingivales humanos nos dice que hay más snRNPs inmaduros importados en el núcleo ya que se acumulan por primera vez en los cuerpos Cajal. Una vez que los snRNP están completamente maduros, se liberan del cuerpo de Cajal al nucleoplasma llevar a cabo el *splicing* (Roithova Adriana et al., 2018).

Con el fin de caracterizar los grupos de GIC dentro del núcleo de la célula, se analizaron su distribución y la densidad de GIC por μm^2 de cada línea celular. En la línea celular HGF, se encontró un promedio de 49 gránulos intercromatinianos por mota, mientras que para la línea celular HGF_CEMP1 se obtuvo un promedio de 35 gránulos por mota; Esto indica que la línea celular HGF presenta importantes diferencias cuantitativas con respecto a la línea celular HGF_CEMP1, en términos de su actividad transcripcional y de *splicing*. Esto nos indica que si hay más cantidad de gránulos intercromatinianos en HGF ya que las *speckles* o GIC tienen grandes concentraciones de snRNPs y proteínas relacionadas con el *splicing* entonces hay una mayor tasa de almacenamiento de factores de transcripción y *splicing*. Al evaluar los cambios ultraestructurales finos de los GIC que es congruente con trabajos previos que la morfología de los gránulos es un reflejo de la actividad de transcripción y *splicing* (Spector et al., 1993).

En la ultraestructura nuclear de la línea celular HGF_CEMP1 hay una mayor cantidad de fibras de pericromatina entremezcladas con algunos gránulos a diferencia de la línea celular que HGF con el mayor número de gránulos intercromatinianos, lo que puede sugerir que la línea HGF_CEMP1 tiene una mayor tasa de pre-mRNA síntesis (Spector *et al.*, 1993). Otros estudios han demostrado que las fibras pericromatinianas se marcan rápidamente con uridina [3H], lo que sugiere que estas estructuras presentan transcritos de RNA nacientes y por lo tanto es el lugar donde se lleva a cabo la actividad de transcripción y de splicing (Bachelierie, Puvion y Zalta, 1975) (S Fakan, 1976) (S Fakan y Puvion, 1980).

Al realizar conteos de gránulos pericromatinianos encontramos que HGF_CEMP1 tiene mayor cantidad de gránulos pericromatinianos y estos resultados nos sugieren que hay mayor cantidad de transporte de mRNA al citoplasma ya que estas estructuras están relacionadas con el almacenamiento del mRNA maduro y el transporte hacia el citoplasma (Jiménez, G. L.F., 2003; Monneron, A., Bernhard, W. 1969) lo cual concuerda con los resultados obtenidos donde HGF_CEMP1 tiene aparentemente mayor cantidad de fibras pericromatinianas, significa una mayor tasa de síntesis de pre-mRNA y por lo tanto hay mayor cantidad de gránulos pericromatinianos al haber más material que exportar hacia el citoplasma para después traducirse a proteínas.

Aunque mediante los análisis anteriores se han observado diferencias cuantitativas notables entre las líneas celulares, al analizar las muestras mediante la reconstrucción tridimensional por estereopares a partir de micrografías electrónicas de transmisión, se puede observar que para ambas líneas celulares el patrón moteado corresponde a grupos de células. gránulos Intercromatinianos unidos por fibras pericromatinianas. Los gránulos intercromatinianos están compuestos de gránulos y fibras de pericromatina que se encuentran en la superficie de la IGC, y se distribuyen de forma difusa por todo el nucleoplasma.

Nuestros resultados indican que tras la transfección de HGF con CEMP1, no se detectan cambios ultraestructurales en los ICG, lo que sugiere que la producción de mRNA es normal. El trabajo futuro se centrará en estudiar si hay o no cambios a nivel molecular. Es tentador mencionar que después de la transfección, de CEMP1, las células no muestran cambios ultraestructurales y esto puede tenerse en cuenta para considerar el uso putativo para terapia génica. Esta noción encaja con resultados anteriores que indican que no se detectan cambios ultraestructurales para la morfología nucleolar (Villegas Mercado *et al.*, 2018).

CONCLUSIÓN

Este trabajo muestra que tras la transfección de genes CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos, no hay cambios en la disposición de ultraestructura de los nucleólos, cuerpos de Cajal, fibras pericromatinianas y los gránulos intercromatinianos. Las diferencias detectadas observadas están presentes en la densidad de los gránulos intercromatinianos,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Biología molecular de la célula*. (Omega, Ed.) (5a ed.).
- Alvarez-Pérez, M., Pitaru, S., Alvarez-Fregoso, O., Reyes-Gasga, J., & Arzate, H. (2003). Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *Journal of Structural Biology*, *143*, 1–13.
- Alvarez-pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-david, M., Rodríguez, B., & Arzate, H. (2006). Molecular cloning expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*, *38*, 409–419.
- Arzate, H., Chimal-Monroy, J., Hernández-Lagunas, L., & Díaz de León, L. (1996). Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res*, *31*, 144–148.
- Arzate, H., Jiménez-García, L., Alvarez-Pérez, M., Landa, A., Bar-Kana, I., & Pitaru, S. (2002). Immunolocalization of a Human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived protein. *Journal of Dental Research*, *81*(8), 541–546.
- Arzate, H., Olson, S. W., Page, R. C., Gown, A. M., & Narayanan, A. S. (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *The FASEB Journal*, *6*, 2990–2995.
- Bartold, P. M., & Narayanan, S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, *40*(68), 29–49.
- Bernhard, W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J Ultrastruct Res.*, *27*(3), 250-265.
- Carmona-Rodríguez, B., Alvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., Arzate, H. (2007). Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *358*(3), 763–9.

- Carranza, F. A., Newman, M. G., Takei, H. H., & Klokkevold, P. R. (2006). *Carranza's clinical periodontology*. (Elsevier, Ed.) (10mo ed.).
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, 24, 9–27.
- Fakan, S. (1994) Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.*, 4(3), 86-90.
- Fakan, S., Leser, G., Martin, T.E. (1984). Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol.*, 98(1),358-363.
- Fortoul-van der Goes, T. I. (2013). *Histología y biología celular*. (I. Mc.Graw-Hill, Ed.) (2a ed.).
- Gall, J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol.*,16, 273-300.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol.*, 125,135-148
- Jiménez-García, L.F., Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell*, 73, 47-59.
- Kémoun, P., Laurencin-dalicious, S., Rue, J., Farges, J.-C., Gennero, I., Conte-Auriol, F., ... Salles. (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2 / -7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.*, 329, 283–294. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0397-3>
- Kitagawa, M., Kudo, Y., Ogawa, I., Abiko, Y., Miyauchi, M., & Takata, T. (2006). Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *BBRC*, 309, 1050–1056.
- Lamond, A. I., Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science*, 280(5363), 547-553.
- Lamond, A.I., Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(8), 605-612.

- López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M.deL., Jiménez-García, L.F. (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.*, 11(4), 293-299.
- Mao, Y. S., Zhang, B., Spector, D.L. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.*, 27(8), 295-306.
- McCulloch, C. a, Lekic, P., & McKee, M. D. (2000). Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology 2000*, 24, 56–72.
- Miki, Y., Narayanan, A. S., & Page, R. C. (1987). Mitogenic Activity of Cementum Components to Gingival Fibroblasts, 1399–1403.
- Miroslav Dundr and Tom Misteli. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Society*, 356, 297–310.
- Matsui, M., Sakasai, R., Abe, M., *et al.* (2020). USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9. *Oncogenesis*, 9, (6), 60.
- Misteli, T. (2000). Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science*, 113, 1841-1849
- Monneron, A., Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res.*, 27(3), 266-288.
- Nanci, A., & Bosshardt D., D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40, 11–28.
- Roithová, A., Klimešová, K., Pánek, J., *et al.* (2018). The Sm-core mediates the retention of partially-assembled spliceosomal snRNPs in Cajal bodies until their full maturation. *Nucleic Acids Res.*, 46, (7), 3774-3790.
- Saygin, N. E., Giannobile, W. V, & Somerman, M. J. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 24, 73–98.
- Spector, D. L., Fu, X. D., Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.*, 10(11), 3467-3481
- Spector, D. L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol*, 9, 265–315.
- Spector, D.L., Goldman, R.D. (2006). Constructing and Expressing GFP Fusion Proteins. *CSH Protoc.*, 2006, (7).

Staněk, D., Fox, A. H. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol.*, 46, 94-101.

Villarreal-Ramírez, E., Moreno, A., Mas-Oliva, J., Chávez-Pacheco, J. L., Narayanan a S., Gil-Chavarría, I., Arzate, H. (2009). Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(1), 49–54.

Villegas-Mercado, C.E, Agredano-Moreno, L.T., Bermúdez, M., *et al.* (2018). Cementum protein 1 transfection does not lead to ultrastructural changes in nucleolar organization of human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.*, 53(4), 636-642.