

ARTÍCULO

RECONSTRUCCIÓN Y VISUALIZACIÓN 3D DEL INTERIOR DE LAS CÉLULAS

Mónica Buendía Padilla y Javier Ambrosio Hernández

Reconstrucción y visualización 3D del interior de las células

Resumen

Hasta el día de hoy se sigue intentado mostrar y hacer comprender el interior de las células bajo un ambiente bidimensional. Sin embargo, debido a los avances tecnológicos experimentales en laboratorio, así como computacionales, ya es posible aplicar la visualización tridimensional y hacer inmersión virtual en el interior de las células. En el presente trabajo se muestra, a través de lo obtenido experimentalmente en el laboratorio durante la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos, la forma en que las imágenes microscópicas obtenidas pueden ser reconstruidas, visualizadas, seccionadas y empleadas para realizar navegación virtual dentro de ellas. Se considera que a través de esta estrategia de observación computacional, se brindan mayores elementos visuales que permiten mejorar la capacidad observacional, la comprensión de lo que se observa, y como resultado de ello, es posible la generación de hipótesis visuales que de otra forma no podrían haber sido obtenidas mediante simples observaciones microscópicas.

Palabras clave: visualización 3D, reconstrucción 3D, inmersión virtual.

Abstract

Teaching and observation of the inner components of cells are mainly based on bi-dimensional images. However, in present days, there are important experimental advances in the laboratory and computers for applying tridimensional observations and virtual immersion navigations inside of the cells. In the present work is shown, using a model of phagocytosis of red blood cells by macrophages, how microscopic images can be reconstructed, visualized, sectioned and used for performing virtual navigation inside of the cells. It is considered that this computational strategy of navigation can offer better capability for observation and comprehension of the inner components of the cells. These kind of computational observations could drive to propose visual hypothesis that cannot be obtained by simple microscopic observations.

Keywords: 3D visualization, 3D reconstruction, virtual immersion.

Visualización 2D y 3D

Aunque en la actualidad se cuentan con estrategias de visualización computacional que permiten la observación tridimensional (3D) y la navegación por inmersión virtual, aún es común que en la biología, durante la enseñanza de la composición interior de las células, se empleen modelos en ambientes bidimensionales o de dos dimensiones (2D) (Stith, 2004). Así, la enseñanza se vuelve más compleja y cabe la posibilidad de que haya una menor comprensión en relación a la distribución de los componentes biológicos en el interior de las células, y con ello se entienda aún menos la función de los componentes intracelulares dentro de un ambiente tan limitado. Por esto, ya no es adecuado continuar intentando enseñar la dinámica y composición celulares en un ambiente 2D, más cuando existe un consenso bien aceptado de que la biología celular es dinámica tridimensionalmente (Alvania, 2011). Si uno observa una imagen en 2D (en la que se sólo se presenta en dos ejes: x,y), las células parecen planas y da la impresión que todos sus componentes (organelos y complejos moleculares) están en ese mismo plano. En cambio, cuando uno observa una imagen 3D (en la que se observa la célula en tres ejes: x,y,z), los componentes intracelulares aparecen distribuidos en distintos planos, lo cual muestra que el ambiente intracelular es espacial. Un ejemplo de ello puede verse en las figuras aquí presentadas, donde una célula (un macrófago de ratón) internaliza (fagocita) a otras células sanguíneas (eritrocitos de carnero). En las imágenes, tanto el núcleo del macrófago, como los eritrocitos, se marcaron con distintos compuestos químicos fluorescentes, mientras que el núcleo se marcó específicamente con el reactivo conocido como DAPI, el cual se une al material genético del macrófago, el otro, conocido como FITC, se unió especialmente a las proteínas de la superficie de los eritrocitos (Dado que estas células ya maduraron, perdieron su núcleo y por ello no son teñidas con el DAPI). Luego, debido a la naturaleza química de los compuestos, se les excita con una longitud de onda específica por lo que se les observa con una fluorescencia colorida. Por lo tanto, los núcleos de los macrófagos se ven azules y los eritrocitos, verdes.

Cuando se observa la figura 1 (una imagen 2D), hay incertidumbre de cuál es la forma, el tamaño y la distribución real del núcleo y de los eritrocitos dentro de la célula, mucho menos una idea del nivel en que se encuentran en el microambiente espacial del macrófago. Ahora, gracias a la ventaja técnica que brinda la microscopía confocal, si se ve a la misma célula bajo diferentes niveles del eje axial (eje z), a lo largo de su grosor (Fig. 2), se observa que la distribución del marcaje fluorescente cambia en el interior de la célula. Por lo tanto, bajo este tipo de visualización es posible estimar mejor la distribución espacial del marcaje de los componentes intracelulares. Este tipo de observación mejora sustancialmente la comprensión de lo que estudia y permite interpretar mejor la forma, el tamaño, la localización de los componentes intracelulares, así como su posible dinámica y función.

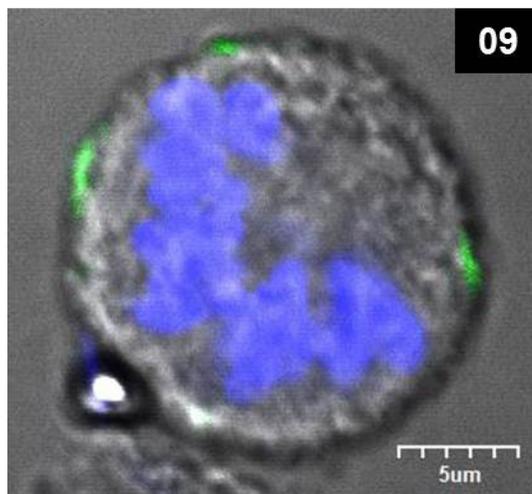


Figura 1. Macrófago con eritrocitos en su interior. Observación bajo la técnica de Nomarsky (gris). El núcleo del macrófago se ve en azul y los eritrocitos de carnero en verde. La imagen fue obtenida en un microscopio confocal OLYMPUS FV1000 con el objetivo 60x, apertura numérica 1.35 y zoom digital 5. Cada una de las 5 divisiones de la barra blanca representa 1 micra.

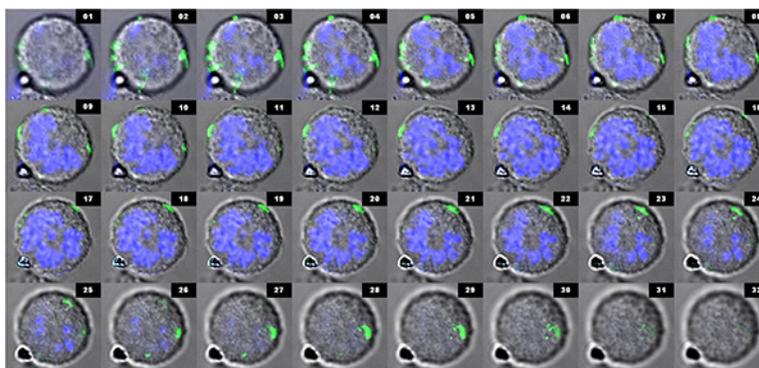


Figura 2. Serie de cortes en el eje z de un macrófago en proceso de fagocitosis de eritrocitos. En la imagen se presentan 32 secciones ópticas (cada una de 0.49 µm de grosor). Nótese que la distribución de los componentes celulares marcados fluorescentemente varía en cada una de las secciones. El color del marcaje fluorescente corresponde a lo indicado en la fig1

Sin embargo, incluso cuando se observe detenidamente la secuencia de imágenes de la figura 2, aún hay incertidumbre acerca de cómo se distribuyen las estructuras marcadas fluorescentemente en el microambiente celular. Por ello, si tales observaciones microscópicas son agrupadas y procesadas computacionalmente, es posible generar reconstrucciones y visualizaciones de la célula completa bajo un ambiente 3D como se aprecia en la figura 4. La generación de esta imagen tridimensional permite que la célula sea analizada bajo distintos ángulos de observación, lo que nunca podrá ser obtenido mediante las técnicas microscópicas convencionales. Aún mejor, gracias al manejo

computacional de las imágenes reconstruidas, es posible observarlas con mayor o menor aumento; rotarlas y seccionarlas de forma digital en cualquier plano (véase el video 1s) y efectuar inmersiones virtuales en el interior de las células reconstruidas. En el observatorio IXTLI de la DGTIC de la UNAM se cuenta con una tecnología computacional que permite la inmersión virtual de un objeto que modifica la percepción y la sensación de lo que se observa en una pantalla simple. En la Facultad de Medicina, también de la UNAM, este tipo de observaciones e inmersiones virtuales ya forman parte de la enseñanza de la medicina. En ambos sitios, aun cuando inicia el empleo de la tecnología para la observación e inmersión virtual en 3D de las células, ya es una forma de apreciación de las imágenes que definitivamente impacta la forma de estudiar y comprender la biología de las células como ya se ha establecido en la literatura (Murphy, 2003) y como puede observarse para la reconstrucción tridimensional del citoesqueleto del parásito protozoario *Gardia lamblia* y las células flama de cisticercos de *Taenia solium*.

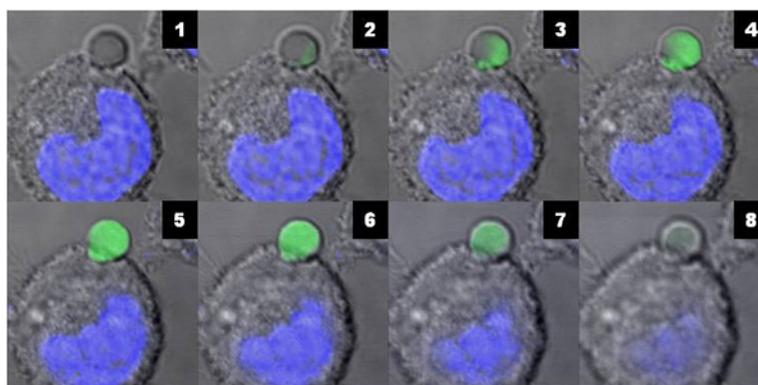


Figura 3. Serie de cortes en el eje z de un macrófago al inicio de la fagocitosis de un eritrocito. Observación bajo la técnica de Nomarsky (gris). El núcleo del macrófago se ve en azul y el eritrocito de carnero en verde. La imagen fue obtenida en un microscopio confocal OLYMPUS FV1000 con el objetivo 60x, apertura numérica 1.35 y zoom digital 9.

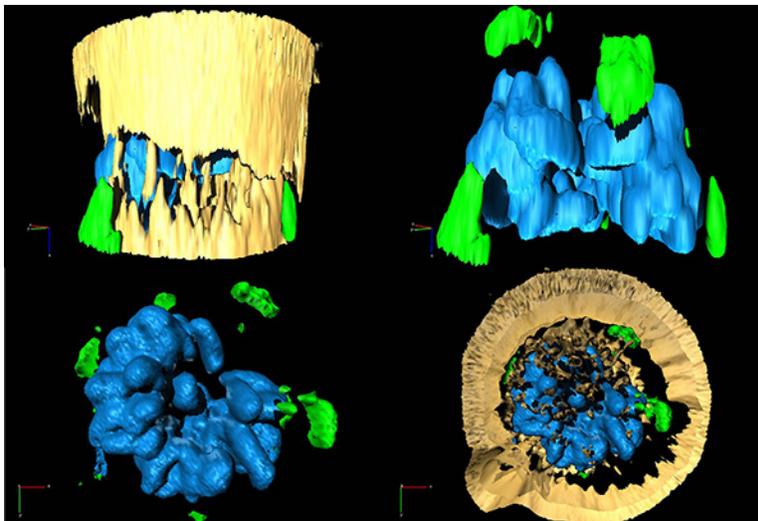


Figura 4. Reconstrucción 3D de un macrófago con eritrocitos en su interior. Reconstrucción 3D de superficie, a partir de las 32 secciones ópticas (de $0.49 \mu\text{m}$ de grosor c/u) mostradas en la figura 2, con el programa Amira V 5.3.2. El cubo representa el volumen y los ejes x,y,z se indican en la parte inferior-izquierda en rojo, verde y azul, respectivamente. El color amarillo corresponde al color gris producido por la técnica de Normasky y sugiere el límite y la forma de la célula (el macrófago). Obsérvese que con la reconstrucción se ve que no todos los eritrocitos están en el interior del macrófago y que posiblemente ello indique que estaban en proceso de inicio de la fagocitosis porque están adheridos a la superficie celular. Núcleo (azul); eritrocitos (verdes). Cada una de las imágenes de la figura pueden ser observadas de forma individual, con la ayuda de anáglifos, presentadas en las figuras 1s1-1s4 del material suplementario.

¿Visualizar una célula en 3D?

Como se indicó, con las imágenes 2D (Fig. 1) sólo es posible determinar el largo y el ancho de lo que se observa con la visualización de seccionamientos en “z” (Figs. 2 y 3). Hay una aproximación al largo, ancho, grosor y distribución espacial de los componentes intracelulares y, si se realiza reconstrucción y visualización de las imágenes 3D (Figs. 4-7), las observaciones permiten situar en el espacio a otros elementos que no habían sido considerados con anterioridad. Esta forma de visualización facilita la integración y, por tanto, la interpretación de los datos. En las imágenes de la figura 4, a diferencia de la figura 1, varios eritrocitos (en color verde), que han sido fagocitados, se observan dispersos en el interior del citoplasma del macrófago (el cual está delimitado por el color amarillo). La observación 3D de la figura 1 (descompuesta en imágenes en la fig. 4) muestra que el núcleo tiene una forma y distribución espacial que no se había visto: el DAPI (en color azul) parece estar asociado a sinuosidades continuas, que aparentan proyectarse con cierto grado de simetría, y que se encuentran empacadas dentro de un espacio definido del núcleo. Si éste se hace rotar computacionalmente (obsérvese los videos 2s, 3s, 3s2 y 4), y se observa el video 3s2 con anáglifos, se percibe cómo los componentes celulares tienen una distribución espacial

distinta en el eje z por la sensación de profundidad conferida. De esta manera, hay mayores posibilidades de mejorar la interpretación de la relación que guardan los elementos observados. También, aun cuando no se hayan marcado fluorescentemente todos los componentes celulares, dado que algunos elementos son registrados por el tipo de estudiomicroscópico que se emplea (en el caso de las figuras 1, 2 y 3, en las que se hicieron observaciones por microscopía confocal combinada con la técnica de Nomarsky), éstos pueden ser reconstruidos computacionalmente por el grado de relieve de la forma en que se les observó. En las figuras 4 y 6, la reconstrucción de este relieve (en el que el color amarillo es falso) brinda una mejor idea de la distribución espacial de los marcajes en azul y verde. Asimismo, en las figuras 5, 6 y 7 (correspondientes a la reconstrucción 3D de la figura 3), se muestra un eritrocito adherido a un macrófago. El eritrocito aún no ha sido internalizado por el macrófago y todavía conserva su forma. Sin embargo, si se rota la imagen reconstruida en 3D de la figura 5, como se observa en la figura 7, dicho eritrocito se ve deformado. La modificación de la forma del eritrocito podría deberse a su interacción con la superficie del macrófago.

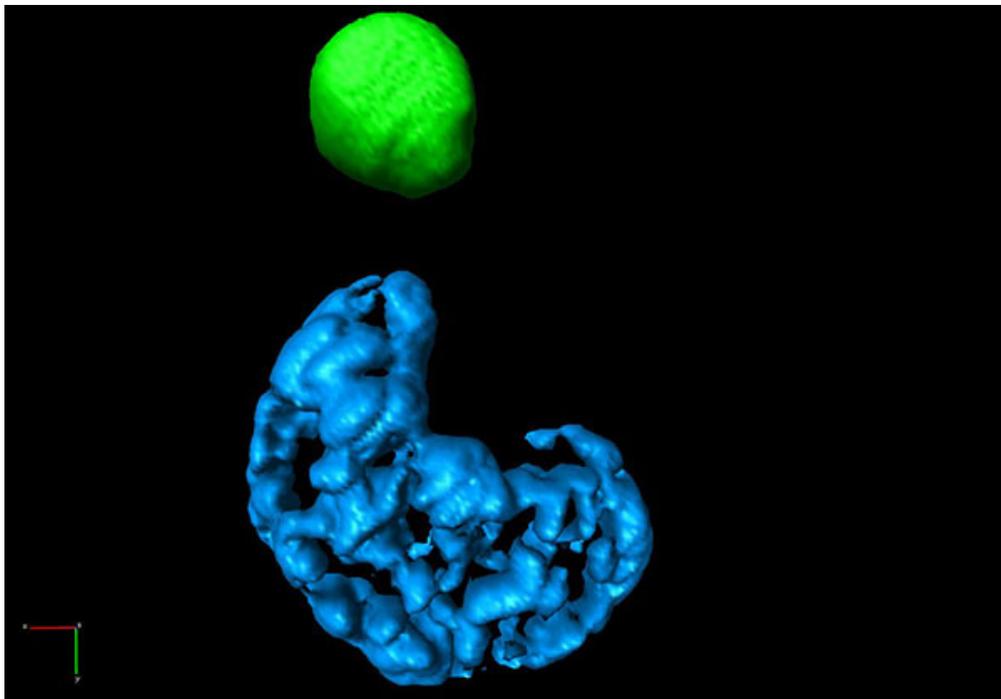


Figura 5 Vista apical de la reconstrucción 3D del núcleo de un macrófago y un eritrocito al inicio de la fagocitosis. Reconstrucción a partir de 8 secciones ópticas (de 0.8 μm de grosor c/u)

Por lo anterior, se considera que la visualización en 3D es una herramienta útil para efectuar observaciones de células u organismos, reconstruir su interior y con ello, efectuar navegación virtual dentro de ellas. De otra forma, no sería posible visualizar lo sucedido en un nivel microscópico como ha sido establecido (Feng et al., 2007). Además, uno de los efectos inmediatos por la forma de observación computacional, es la generación de hipótesis visuales, como se indica en relación al eritrocito al ponerse en contacto con el macrófago. Las hipótesis generadas impulsan la realización de nuevos estudios, así como la ampliación o reconsideración de las interpretaciones de lo que aparentemente se había contemplado al observar las células bajo las técnicas convencionales. Otra aplicación inmediata, que hace de la visualización 3D una herramienta poderosa, es el registro visual de la forma celular y la distribución de las estructuras intracelulares, luego de alteraciones o modificaciones del microambiente en el que se encuentren las células. Aun más, desde el punto de vista de la enseñanza, las imágenes generadas son más atractivas e ilustrativas y mejoran las formas de transmisión del conocimiento de procesos dinámicos que de otra forma serían difíciles de mostrar.

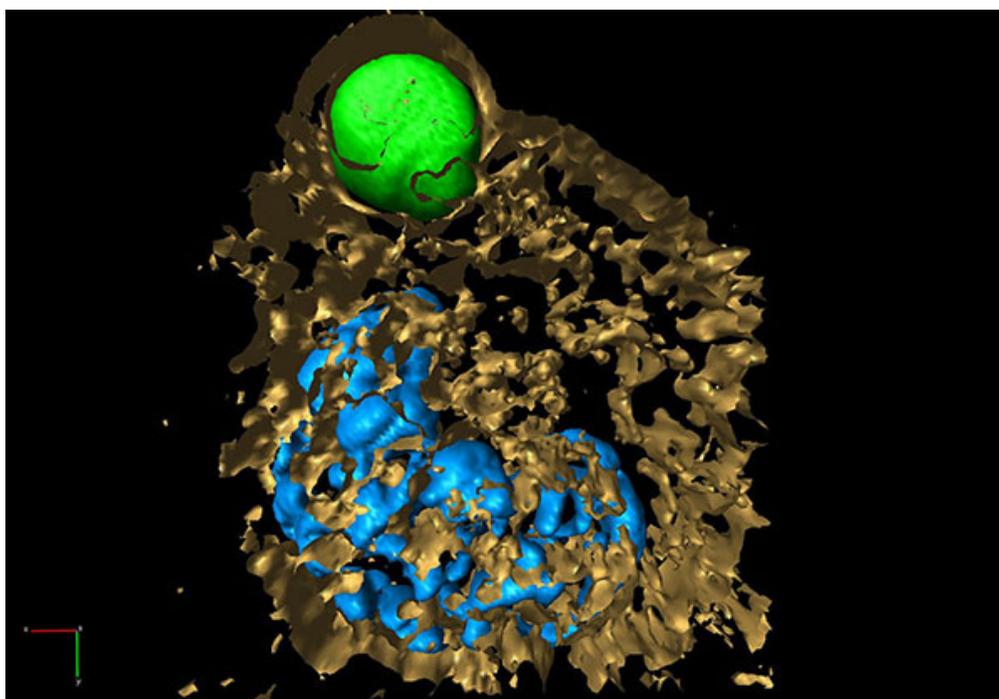


Figura 6 Vista apical de la reconstrucción 3D del núcleo de un macrófago, y un eritrocito al inicio de la fagocitosis. El color amarillo corresponde al color gris producido por la técnica de Normasky y sugiere el límite y la forma de la célula (el macrófago). Reconstrucción a partir de 8 secciones ópticas (de 0.8 μm de grosor c/u). Véase con anáglifos en la figura 2s del material suplementario.

La visualización científica en 3D y la inmersión virtual son novedosas formas para la presentación de algo ya establecido de manera natural, es una forma más clara de mostrar lo que sucede en el nivel microscópico (McGill, 2000). Incluso, las observaciones de imágenes 3D, como las de las figuras 4, 5, 6 y 7, generan un diferente tipo de sensación de profundidad cuando se realizan con la ayuda de lentes especiales como los anáglifos (ver todas las figuras y el video 3s2 del material suplementario). O bien, cuando las imágenes reconstruidas se proyectan bajo diferentes ángulos de observación, luego de procesamientos de las imágenes, mediante cortes sagitales, coronales o transversales (ver el video 1s del material suplementario). Por ello, estas formas de visualización ya se consideran recursos indispensables para la enseñanza de la biología celular (Alvania, 2011; Iwasa, 2010) y se ha demostrado que mejoran la comprensión y aprendizaje de lo proyectado en el monitor o en una pantalla (McClellan et al., 2005).

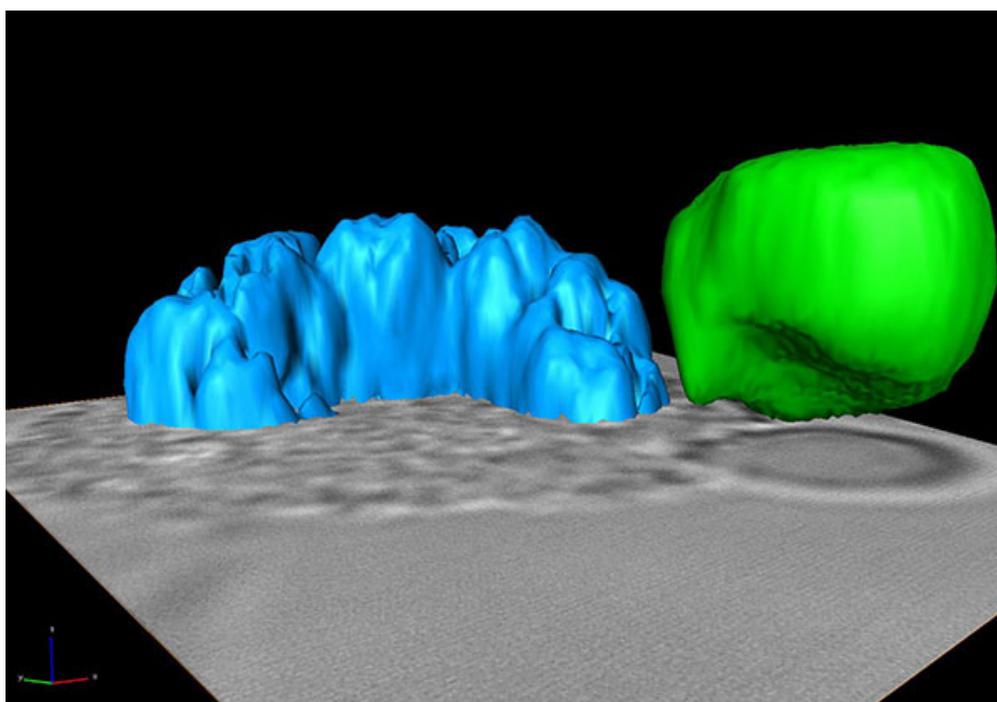
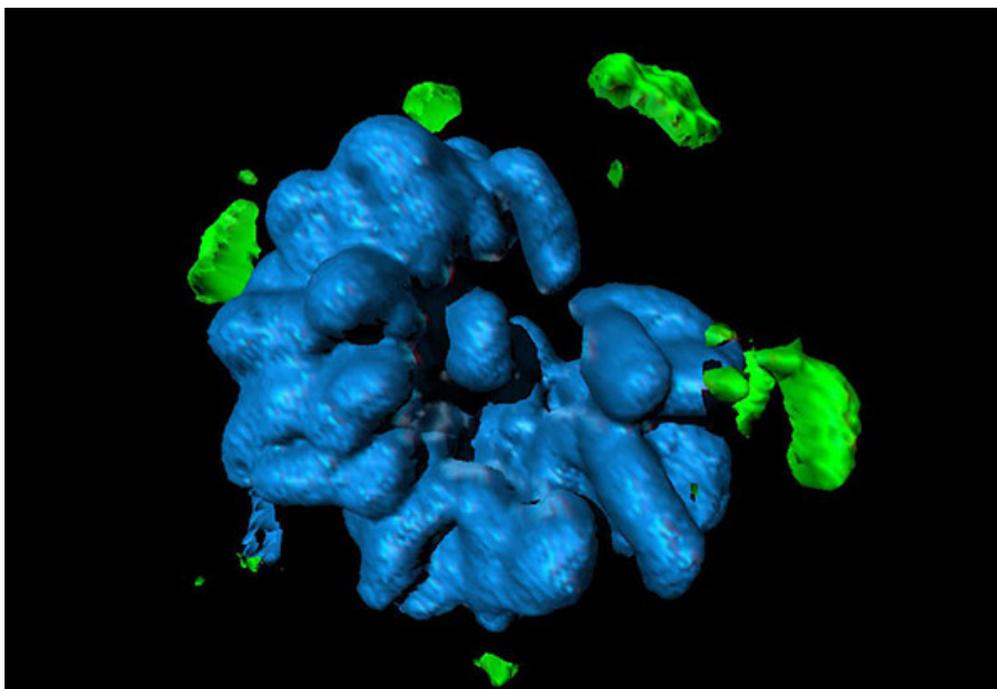


Figura 7. Vista lateral de la reconstrucción 3D del núcleo de un macrófago y un eritrocito al inicio de la fagocitosis. En la base se colocó el último corte correspondiente a la microscopía de Nomarsky que define la forma del macrófago. Véase el video 5 del material suplementario.

Visualización 3D en Biología Celular

La visualización en 3D de las células no es una novedad, ya que existen diferentes recursos computacionales con los que se puede realizar. Solo se requiere definir la estrategia de visualización por realizar y de que material se parte. En el año 2000, McGill mencionó que las películas de los eventos celulares ya están escritas, sólo se requiere encontrar la forma de

visualizarlas, rodarlas y proyectarlas. Ejemplos de visualización en 3D (que combinan aspectos teóricos, experimentales y computacionales) son las imágenes y animaciones presentadas: el surgimiento continuo de sitios en internet como MolecularMovies.org, así como realizar viajes al interior de las células virtuales.



Por la jerarquía estructural presente en los sistemas biológicos, así como por las necesidades de visualizar ciertas estructuras o procesos biológicos, las observaciones microscópicas dependen de la combinación de diferentes tipos de preparación de especímenes, herramientas de visualización y de análisis computacionales. Ejemplos de ello es lo que se ha efectuado con células eucariontes, componentes del citoesqueleto y organelos celulares para los que se han llevado a cabo reconstrucciones a partir de microscopía confocal, así como de microscopía electrónica mediante el empleo de la criotomografía electrónica, la cual es también conocida como tomografía electrónica por congelación (Frank, 2002). Esta última, ha sido cada vez más utilizada como una herramienta de visualización en 3D a un nivel ultraestructural o nanométrico del interior de las células. Son ejemplos las imágenes de parásitos como el gusano *Schistosoma mansoni* (Collins III et al., 2011), las células flama parte del sistema de eliminación de sustancias tóxicas de cisticercos de *Taenia solium* (Valverde et al., 2011), los parásitos de la malaria contenidos en los eritrocitos infectados (Soares et al., 2011) y el protozoario *Crithidia deanei* (Machado et al., 2010), así como organelos intracelulares como el aparato de Golgi de células del páncreas (Marsh et al., 2001); los canalículos secretores y mitocondrias de células parietales de la mucosa

gástrica (Duman et al., 2002); las mitocondrias de hígado de rata (Mannella et al., 2001); los endosomas o cuerpos multivesiculares (Murk et al., 2003); filamentos gruesos de miosina de células musculares cardíacas (Zoghbi, et al., 2008) y los cromosomas (Schroeder et al., 2009). También, se recomienda observar las imágenes para visualizar la interacción virus-membrana plasmática de la célula huésped (Maurer et al., 2008), la formación de copas fagocíticas de macrófagos (Goodridge et al., 2011) y los flagelos de espermatozoides de erizos de mar (Nicastro et al., 2005). Sin embargo, aun cuando muchas de las imágenes, animaciones y modelos en 3D se han obtenido desde varios años atrás, todavía son pocos los libros de texto de biología celular donde se incluyan como material adicional.

Generación de modelos celulares

Como se ha indicado, las reconstrucciones en 3D parten desde el procesamiento computacional de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (Valverde et al., 2011), microscopía electrónica de transmisión (Nicastro et al., 2005) o de microscopía electrónica de doble haz (Rigort, 2012). Independientemente de la estrategia microscópica que se haya elegido, las imágenes obtenidas pueden ser procesadas para observar su interior mediante segmentaciones en el eje z, mientras que en algunos casos las segmentaciones se obtienen por "cortes" mediante el empleo de luz láser o ultramicrotomo. En otros, los cortes se realizan mediante el uso de iones. La microscopía electrónica tiene una posición especial entre las herramientas de visualización, ya que abarca un amplio intervalo de escalas: desde el nivel atómico y molecular hasta al nivel de organelos o de células enteras.

Paquetes computacionales y técnicas

Quizás, el factor limitante de la visualización 3D (una de las causas por las que la tecnología no se ha aplicado ampliamente) son los paquetes computacionales que requiere, cuyo aprendizaje podría tomar mucho tiempo (sobre todo si son programas computacionales comerciales como AMIRA) o bien, podría ser utilizado sólo por quienes cuentan con una licencia. Sin embargo, esto no limita el empleo de sistemas computacionales para realizar visualizaciones y reconstrucciones en 3D, ya que existen programas públicos que incluso son menos complejos. Uno de ellos, conocido como ImageSurfer, podría favorecer este aspecto. Con los programas computacionales mencionados, así como con otros que también están accesibles, es posible el realizar reconstrucciones de superficie o de volumen. Durante estos proceso se pueden seguir dos estrategias: la primera, basada en la reconstrucción o el delineado de los contornos para definir la estructura (denominada reconstrucción de la superficie) y la segunda, con la que se permite la visualización de todo el volumen que abarca la superficie (denominada reconstrucción del volumen). Sin embargo, aunque ambas estrategias son utilizadas, es necesario considerar que con la última podrían tenerse dificultades de interpretación. La comparación con la reconstrucción de superficie elimina

gran parte de la información contenida en el volumen, pero este tratamiento permite que las presentaciones obtenidas sean más fáciles y rápidas de entender (Feng et al., 2007).

La generación de los modelos tridimensionales, así como de su visualización, no es sólo un ejercicio que permite una mejor presentación de lo que se busca en relación a la enseñanza de la dinámica de las células, también es una importante estrategia que se ha consolidado para la presentación visual de resultados de trabajos de investigación microscópica y que ha sido adaptada en diferentes revistas. De hecho, son las revistas conocidas del tipo "open journal" las que mejor se han adaptado a esta estrategia de publicación, en donde la mayoría de las imágenes y animaciones se presentan en los documentos complementarios (de la misma manera que se hace para el presente artículo). Sin embargo, cada vez los documentos con publicaciones se vuelven más interactivos y, por ello, ya hay integración de texto con imágenes generadas en 3D. Éstas pueden ser manipuladas directamente por los lectores en los sitios en que aparecen, ya que mejoran la comprensión de lo que se requiere transmitir en el artículo publicado. Este tipo de publicaciones se basan en los formatos PDF (Ruthensteiner y Heß, 2008) lo cual es ya una forma de comunicación entre la comunidad científica.

Perspectivas

Es claro, por lo que se ha indicado, que se va a generar un mayor impacto en la presentación de imágenes relacionadas con aspectos de la dinámica celular; si se presentan imágenes o animaciones en ambientes 3D que abarquen todo el conocimiento que se ha generado al respecto (Iwasa, 2010). De ser así, los materiales obtenidos, bajo estas estrategias, constituyen un excelente recurso educativo para la biología celular, ya que en ellos se ilustran movimientos de componentes intracelulares, como sucede durante el tráfico intracelular, el desplazamiento de organelos y su localización durante fenómenos como la división celular, o bien, eventos intracelulares que se originan por la presencia de un patógeno que llegue a este nivel celular (Stith, 2004). Seguramente, este tipo de estrategias podrían encontrarse en poco tiempo dentro de las aulas, en donde se aprovecharán los recursos que generan los sistemas de presentación de imágenes en 3D, e incluso, ya se podría contar con un número de modelos suficientes, porque cada vez hay una mayor incorporación de profesionales que han logrado integrar los campos de la visualización científica, como biólogos, médicos, ingenieros en computación, matemáticos, etc. Un ejemplo de los avances, que ya se tienen al respecto, es la venta de libros de texto clásicos de biología celular, que incluyen material interactivo contenido tanto en discos CD o DVD y el acceso a páginas de las editoriales, o sitios web con un número creciente de imágenes al respecto. Muchas de éstas son generadas en 3D y ya han sido aprovechadas por las compañías editoriales para incorporarlas a sus sistemas de enseñanza, lo cual enriquece de sobremana lo aprendido en el aula en relación a la biología celular.

Agradecimientos

Este trabajo contó con los apoyos económicos de la DGAPA-IXTLI IX200610 y DGAPA IN201510. Agradecemos la valiosa asistencia técnica en el laboratorio del Dr. Jorge Gaona Bernal del Laboratorio de Virología, la Biól. Olivia Alicia Reynoso Ducoing y las Dras. Laura Valverde-Islas y Ana Guadalupe Hernández del Laboratorio de Biología del Citoesqueleto de Parásitos, ambos de la Facultad de Medicina (FM). En la asistencia técnica para el uso de la microscopía confocal a la CD María José Gómora Herrera del Depto. de Embriología de la FM y al Biól. Gabriel Orozco Hoyuela de la Unidad de Microscopía del Inst. de Fisiología Celular de la UNAM. Asimismo, agradecemos el apoyo recibido para los análisis computacionales, las reconstrucciones 3D y la inmersión virtual al M. en C. Elio Vega del Depto. de Visualización y al Ing. en Computación Gabriel Rubín Castellanos y la Biól. Lizbeth Heras Lara, ambos pertenecen al Observatorio de Visualización IXTLI de la DGTIC-UNAM.

Bibliografía

- Alvania R. The third dimension: cell biology comes alive. *Trends in Cell Biology* 21 (2011): 681
- Ben-Harush K., Maimon T., Patla I., Villa E. and Medalia O. Visualizing cellular processes at the molecular level by cryo-electron tomography. *Journal of Cell Science* 123 (2010): 7-12
- Collins III J., King R., Cogswell A., Williams D., Newmark P. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (2011): e1009
- Duman J., Pathak N., Ladinsky M., McDonald K., Forte J. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. *Journal of Cell Science* 115 (2002): 1251-1258
- Feng D., Marshburn D., Jen D., Weinberg R., Taylor II R., and Burette A. Stepping into the third dimension. *The Journal of Neuroscience* (2007): 12757-12760
- Frank J., Wagenknecht T., McEwen B., Marko M., Hsieh C.E. and Mannellab C. Three-dimensional imaging of biological complexity. *Journal of Structural Biology* 138 (2002): 85-91
- Gavin M. and Grant J. Electron Cryotomography. *BioTechniques* 43 (2007): 413-420
- Goodridge H., Reyes C., Becker C., Katsumoto T., Ma J., Wolf A., Bose N., Chan A., Magee A., Danielson M., Weiss A., Vasilakos J. & Underhill D. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a "phagocytic synapse". *Nature* 472 (2011): 471-475
- Iwasa J. Animating the model figure. *Trends in Cell Biology* 20 (2010): 699-704

Machado M.C., Costa C.M., Schenkman S., De Azevedo A.C., Miranda K., De Souza W., Elias MC. The Bacterium Endosymbiont of *Crithidia deanei* Undergoes Coordinated Division with the Host Cell Nucleus. *PLoS ONE* 5 (2010): e12415

Mannella C., Pfeiffer D., Bradshaw P., Moraru I., Slepchenko B., Loew L., Hsieh C., Buttle K., and Marko M. Topology of the Mitochondrial Inner Membrane: Dynamics and Bioenergetics Implications. *IUBMB Life* 52 (2001): 93-100

Marsh B., Mastronarde D., Buttle K., Howell K., McIntosh R. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001): 2399-2406

Maurer U., Sodeik B., and Griinewald K. Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008): 10559-10564

McClean P., Johnson C., Rogers R., Daniels L., Reber J., Slator B., Terpstra J., and White A. Molecular and Cellular Biology Animations: Development and Impact on Student Learning. *Cell Biology Education* 4 (2005): 169-179

McGill G. Molecular Movies... Coming to a Lecture near You. *Cell* 133 (2008): 1127-1132

Murk N., Humbelt M., Zieset U., Griffith M., Posthuma G., Slot W., Kostert J., Verkleijt J., Geuze J., and Kleijmeer J. Endosomal compartmentalization in three dimensions: Implications for membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003): 13332-13337

Murphy R., Velliste M. and Porreca G. Robust Numerical Features for Description and Classification of Subcellular Location Patterns in Fluorescence Microscope Images. *Journal of VLSI Signal Processing* 35 (2003): 311–321

Nicastro D., Mcintosh R., and Baumeister W. 3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (2005): 15889-15894

Rigort A., Bäuerlein F., Villa E., Eibauer M., Laugks T., Baumeister W., and Plitzko J. Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2012): 4449-4454

Ruthensteiner B. and Heß M. Embedding 3D Models of Biological Specimens in PDF Publications. *Microscopy Research and Technique* 71:778-786 (2008).

Schroeder E., Pérez F., Zeile U., Wanner G. Focused ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: a promising tool for 3D analysis of chromosome architecture. *Journal of Structural Biology* 165 (2009): 97-106

Soares L.C., De Souza W., Jiao C., Barrabin H., Miranda K. Visualizing the 3D Architecture of Multiple Erythrocytes Infected with Plasmodium at Nanoscale by Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy. *PLoS ONE* 7 (2012): e33445

Stith B.J. Use of Animation in Teaching Cell Biology. *Cell Biology Education* 3 (2004): 181-188

Valverde L.E., Arrangoiz E., Vega E., Robert L., Villanueva R., Reynoso O., Willms K., Zepeda A., Fortoul T., Ambrosio J. Visualization and 3D Reconstruction of Flame Cells of *Taenia solium* (Cestoda). *PLoS ONE* 6 (2011): e14754

Zoghbi M., Woodhead J., Moss R., and Craig R. Three-dimensional structure of vertebrate cardiac muscle myosin filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008): 2386-2390