

00361
2
lej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

13

EVOLUCION NUCLEAR EN ANIMALES

Enfoque ultraestructural de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares del período interfásico.

T E S I S

Que para optar por el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS (Biología)
P r e s e n t a
Luis Felipe Jiménez García

México, D.F.

~~2002~~
2002



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.

Esta tesis se elaboró en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., durante los años de 1983 a 1985 y bajo la asesoría de los Doctores Olga Margarita Echeverría Martínez y Gerardo Hebert Vázquez Nin.

A los doctores Olga Margarita Echeverría Martínez y Gerardo Hebert Vázquez Nin, por su confianza incondicional, por su paciencia y por el apoyo total en todo momento desde mi ingreso al Laboratorio de Microscopía Electrónica.

Al M. en C. Juan Luis Cifuentes Lemus, a los Dres. Annie pardo Gemo y Alfonso Torre Blanco, a los M. en C. Víctor Manuel Valdés López y Concepción Sánchez Gómez por la revisión crítica de esta tesis, por sus sugerencias y por su colaboración para que saliera adelante este escrito.

A los compañeros del Lab. de Microscopía Electrónica, M. en C. Clara Ezquivel Huesca y Bernardino López Zamorano, Guadalupe Zavala Padilla, Patricia Rovira García, José Manuel Elizundia Alvarez, José Fragoso y Ramón Barboza, por el ambiente de cooperación recíproca.

A los compañeros de los cursos de Biología de Campo por colaborar como parte del proyecto de investigación en donde se enmarca la tesis.

A todos mis amigos, y principalmente a Juan S. Núñez, Eduardo Delgadillo, Beatriz Rendón, Jaime Reza, Gerardo Vilchis, Héctor Hernández, Juan C. Camacho, Armando del Valle, Francisco J. López A., Ricardo Rentería, Luis A. Rubio, Lorena Campos, Leticia García, Laura Paz, Sonia Bárcena, Martha Rangel, Juan Pérez, Fidel Domínguez, Angel Ramírez, Tomás Irigoyen, Ernesto Chávez, Miguel Salas y los que me faltan, por su amistad y cooperación.

A mis padres y hermanos; en especial a la señora Teresa García y a la señora Beatriz Calderón por su participación indirecta pero muy importante en la culminación de este trabajo de tesis.

A la Biól. Martha Salcedo, por su ayuda y confianza académica, por su amistad y por intentar incorporarme nuevamente a la actividad.

A Noemí Noriega, Adolfo Galeana y Lourdes Guerrero.

A la P. de Biól. Ma. de Lourdes Segura Valdez, por su compañerismo, paciencia, ayuda desinteresada y por el tiempo dedicado a la terminación de este trabajo. A su familia, por su cooperación.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

Si bien la estructura de la cromatina parece muy estable entre los Eucariontes, la ultraestructura de las ribonucleoproteínas, aunque se conoce todavía poco, pudiera ser mucho más variable (Moyné. Bertaux, Puvion, 1975).

Quizá, debido a que el núcleo es una parte tan importante para la célula, la filogenia basada en el tipo de núcleo puede ser más confiable que la basada en cloroplastos, flagelos o en aspectos de la morfología de las células (Oakley, 1978).

INDICE

I.	RESUMEN -----	1
II.	INTRODUCCION -----	2
II.1	Antecedentes -----	5
II.1.1	Núcleo interfásico -----	5
II.1.1.1	Ribonucleoproteínas intranucleares -----	8
II.1.1.1.1	Gránulos pericromatinianos -----	8
II.1.1.1.2	Fibras pericromatinianas -----	10
II.1.1.1.3	Fibras intercromatinianas -----	10
II.1.1.1.4	Gránulos intercromatinianos -----	11
II.1.1.1.5	Cuerpos espiralados -----	12
II.1.1.1.6	Nucleolo -----	12
II.1.1.2	Estructuras no ribonucleoproteicas -----	14
II.1.1.2.1	Matriz nuclear -----	14
II.1.1.2.2	Lámina densa -----	15
II.1.1.2.3	Cromatina -----	15
II.1.2	Procesamiento postranscripcional del mRNA -----	19
II.1.2.1	"Capping" o metilación del extremo 5' -----	21
II.1.2.2	Adición de la "cola" de poli-A en el extremo 3' -----	23
II.1.2.3	"Splicing" o eliminación de intrones -----	23
II.1.2.4	Procesamiento de otros RNAs -----	28
II.1.3	Filogenia -----	29
III.	MATERIAL Y METODO -----	35
III.1	Procesamiento del material para su observación al microscopio electrónico -----	35
III.2	Morfometría -----	37
IV.	RESULTADOS -----	38
IV.1	Porifera -----	39
IV.2	Cnidaria -----	39
IV.3	Nemertina -----	39
IV.4	Sipunculoidea -----	40
IV.5	Annelida -----	40
IV.6	Hemichordata -----	40
IV.7	Chordata -----	41
IV.7.1	Cephalochordata -----	41
IV.7.2	Vertebrata -----	41
IV.7.2.1	Pisces -----	41
IV.7.2.2	Amphibia -----	41
V.	DISCUSION -----	59
VI.	CONCLUSIONES -----	65
VII.	EPILOGO -----	66
VIII.	REFERENCIAS -----	68

I. RESUMEN

La marcada diferencia entre los núcleos celulares interfásicos de mamíferos y de *Euglena* y la carencia de un estudio con enfoque evolutivo sobre el comportamiento de las ribonucleoproteínas (RNP) intranucleares relacionadas con el procesamiento postranscripcional de los RNAs, nos llevó a investigar a este organelo dentro de un esquema filogenético que considera distintos niveles de organización tisular.

Se estudiaron por primera vez al microscopio electrónico, los núcleos celulares interfásicos de diferentes tejidos de Porifera, Cnidaria, Nemertina, Annelida, Sipunculoidea, Hemichordata, Cephalochordata, Pisces y Amphibia mediante la técnica regresiva de contraste preferencial para RNP.

Los resultados muestran la presencia de nucleolo, fibras y gránulos pericromatinianos (FPC y GPC) y la presencia de fibras y gránulos intercromatinianos (FIC y GIC). El diámetro promedio de los GPC, del halo que los rodea y de los GIC no muestra diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p > 0.05$). El diámetro promedio intergrupar para los GPC es de aproximadamente 428 Å y de aproximadamente 193 Å para el halo que los circunda. El diámetro de los GIC es de unos 260 Å.

Se concluye que en animales hay un patrón morfológico común para el procesamiento postranscripcional de los RNAs pre-mRNA y del pre-rRNA probablemente, lo que sugiere un origen común a partir de uno o varios ancestros para este reino.

II. INTRODUCCION

Los aspectos ultraestructurales del núcleo celular interfásico se estudian desde el punto de vista de la concepción evolutiva del mundo vivo debido a las diferencias tan notables observadas entre los núcleos de mamíferos (1) y de *Euglena gracilis* (2).

Actualmente se conoce bien la estructura fina del núcleo en interfase de células de mamíferos debido fundamentalmente a la publicación de una técnica regresiva de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (RNP) (3), de una técnica de contraste preferencial para cromatina (4) y de una técnica de contraste específico para cromatina, del tipo Feulgen (5). La marcada diferencia entre los núcleos de *E. gracilis* y mamíferos nos llevó a pensar que es posible intentar observar diversos patrones morfológicos nucleares que permitieran, en organismos actuales, elaborar relaciones filogenéticas nuevas o ratificar las ya establecidas para casi 1400 millones de años, del organelo que compartamentaliza el material genético en eucariontes (6).

Las partículas ribonucleoproteicas intranucleares se relacionan con el procesamiento, almacén y/o transporte de RNA del núcleo al citoplasma (7), y representan el sustrato morfológico donde pueden ocurrir tales fenómenos.

Ultraestructuralmente presentan una gran heterogeneidad, que podría estar correlacionada con aspectos funcionales que tal vez no se establecieron desde la primera aparición de los seres con núcleo en el planeta. Más bien pensamos que esa heterogeneidad sea la consecuencia de la acumulación de pequeños cambios cuantitativos (genéticos) que se traducen en cambios cualitativos manifiestos (fenotípicos). Este cambio gradual y continuo, base de la teoría evolutiva neodarwiniana, sin embargo puede no ser del todo correcto y quizá la evolución de las especies sea un proceso más discontinuo en el que no es posible encontrar estados intermedios, como ha sido postulado por la teoría del equilibrio puntuado (8).

Se han realizado muchos intentos tendientes a organizar una secuencia evolutiva natural de los seres vivos. Los esquemas tradicionales basados en caracteres morfológicos, embriológicos, paleontológicos, etc. han sido complementados, y en ocasiones modificados, por características basadas en aspectos moleculares, fisiológicos y celulares. De acuerdo a esto, el presente estudio intenta ser un aporte a los esquemas evolutivos trazados con otros caracteres.

Por otro lado, se pretende complementar una serie de investigaciones sobre la ultraestructura nuclear. Anteriormente se han utilizado drogas, hormonas y un sistema modelo de diferenciación con el objeto de aclarar el posible papel citofisiológico de las partículas nucleares actuales relacionadas con el metabolismo postranscripcional del RNA en sistemas transcripcionales alterados, es decir, en sistemas donde la transcripción de algunos genes se reprime por el proceso de diferenciación celular (se inactivan ciertos genes) y en sistemas donde la transcripción ocurre de acuerdo a estímulos ambientales (se "prenden" y se "apagan" ciertos genes durante el ciclo celular). Desde este punto de vista se pretende, entonces, obtener información ultraestructural acerca de lo que puede pasar con las partículas RNP intranucleares en sistemas donde se piensa que se originan y se pierden genes, esto es, a lo largo de la historia evolutiva. Creemos posible que la estructura nuclear en animales sea diferente, cualitativamente, en organismos considerados como primitivos en la escala filogenética, con base en las variantes que se han sufrido respecto de un patrón común que puede bien ser encontrado entre los organismos que originarían a los metazoarios: los Protoctistas.

La ultraestructura nuclear interna puede representar un parámetro confiable para llevar a cabo estudios evolutivos pues es en el núcleo donde residen los complejos multimacromoleculares relacionados con el gene, base de la variabilidad genética.

En resumen, el trabajo aquí presentado intenta estudiar los posibles cambios en la disposición, forma, tamaño y número de las partículas RNP intranucleares relacionadas con el almacén, trans



porte y procesamiento del RNA, a la luz de la teoría evolutiva. Así entonces, se estudia el núcleo mediante una técnica regresiva de contraste preferencial para RNP y se dan elementos para discutir los resultados desde el punto de vista de la filogenia, del posible papel de las partículas mencionadas en el procesamiento del RNA, de la arquitectura y fisiología nuclear en general.

II.1 ANTECEDENTES

II.1.1 NÚCLEO INTERFÁSICO

Los núcleos celulares fueron vistos y descritos por primera vez por Leewenhoek en 1770 en los glóbulos rojos del salmón. Describiendo sus figuras dijo: "Las figuras 2ABCD representan las partículas ovaales de la sangre de un salmón que pesaba arriba de 30 libras ... se representan las partículas que parecían delgadas y gruesas, pero que no encaraban al ojo directamente. Las de la figura C sí lo hacían y en su mayoría tenían una especie de pequeña luz (*lumen*) clara en el centro (núcleo), más larga en unos que en otros, lo que ha hecho que el Grabador haga su máximo esfuerzo para imitarlo". También observó núcleos en peces lenguados, describiéndolos como "puntos pequeños y brillantes". Trembley y Müller en 1774 y 1778 respectivamente, observaron núcleos en *Stentor* y otros protozoarios. Asimismo Hewson en 1777 observó núcleos en glóbulos rojos de peces, anfibios, reptiles, aves y en invertebrados como la langosta de mar. Fontana, por otro lado, describió los núcleos celulares en la sustancia gelatinosa que cubre la piel de las anguilas y los reporta diciendo que "...uno ve un cuerpo pequeño (*petit corps*) interno, situado en diferentes puntos de cada glóbulo". Purkinje en 1825 habla de una vesícula germinativa en los cigotos de las aves, pero no encontró una relación con la *lumen* o los *petit corps* ya descritos. En vegetales, desde 1802, Bauer ya había dibujado núcleos de células del tejido laxo que subyace al canal del estigma de la orquídea *Bletia Tankervilleae* pero sus trabajos se publicaron mucho tiempo después. Brown, conociendo los trabajos de Bauer, se da cuenta de que el núcleo no ocurre sólo esporádicamente en las células y acuñó el nombre con que se conoce actualmente a este organelo. En efecto, fue Robert Brown quien en su obra "Observation on the Organs and Mode of Fecundation in Orchidae and Asclepiadaceae", aparecida en 1831 en un folleto y reproducida en 1833, describe al núcleo celular diciendo que "... en cada célula de la epidermis de una gran parte de esta familia (Orchidae), especialmente en aquellas con hojas membranosas, se observa una aréola circular simple, por lo general algo

más opaca que la membrana de la célula... esta aréola o NUCLEO, como quizá pueda ser denominada, no se halla confinada en la epidermis sino que se encuentra en el parénquima o en las células internas del tejido ... puedo aquí reconocer que sé de casos en que el núcleo no es solitario en cada utrículo o célula".

No obstante, Valentín en 1836 fue quien introdujo la palabra núcleo en la citología animal, describiéndolo en el epitelio que cubre los vasos del plexo coroide del cerebro y diciendo "... pero cada uno de ellos contiene en el centro de su interior, una estructura redonda y oscura que recuerda el núcleo que hay en el reino vegetal en las células epidérmicas del pistilo". De esta manera se marcaba un paso fundamental en el estudio cariológico considerando a esa pequeña "nuez" como una estructura constante en células animales y vegetales, dentro del contexto de la teoría celular en gestación que nacía del desarrollo conceptual de la fibra, el glóbulo y la hilera de glóbulos y desembocaba en el nacimiento de la frase "teoría celular" acuñada por Schwann para significar que "... uno puede incluir bajo en nombre de teoría celular, en el sentido más amplio, la afirmación de que existe un principio de construcción (Bildungsprinzip) para todo producto orgánico y que este principio de construcción es la formación celular (9,10).

Los estudios que se tienen sobre el desarrollo histórico del conocimiento del núcleo han sido analizados en otras ocasiones (11-17) y aquí solamente se ha hecho mención de los aspectos que quizá queden oscuros en la literatura por su poca accesibilidad. Por lo tanto hablaremos de los rasgos más relevantes que en la actualidad se tienen sobre el comportamiento citofisiológico del núcleo celular en interfase.

Aproximadamente 1400 millones de años atrás, cuando aparecieron los primeros eucariontes en la evolución, en el período precámbrico (6), se incrementó la explotación del fenómeno de la recombinación genética que traía consigo el aumento sustancial en la variabilidad genética sobre la que actuaría la selección natural

contribuyendo en gran medida a la actual diversidad del mundo vivo. Se ha descrito en muchas ocasiones cómo ha sido el desarrollo del conocimiento sobre el núcleo celular, tanto durante la mitosis como durante la interfase. Aquí, lo que nos interesa es el aspecto morfofisiológico que se tiene en nuestros días, particularmente en el período de interfase y haciendo énfasis en los componentes ribonucleoproteicos (RNP) que tienen que ver con los procesos de transporte, almacén y procesamiento postranscripcional de los RNAs.

Aún cuando no está perfectamente establecida la estructura y función de la cromatina, se sabe que es la matriz a partir de la cual se sintetizan los componentes moleculares que intervendrán en la síntesis de proteínas y en la replicación genética (18-21). En este trabajo, nos enfocaremos en los complejos RNP intranucleares descritos desde finales de los años cincuenta de este siglo, pero hablaremos someramente de otras estructuras nucleares, ya que existen excelentes revisiones sobre el tema de núcleo (18, 22, 23). Cabe destacar que los conocimientos descritos a continuación son el producto de la convergencia de técnicas estructurales y bioquímicas, en particular, de las modernas técnicas de electroforesis en gel y obtención de secuencias de nucleótidos y técnicas autorradiográficas de alta resolución combinadas con métodos de contraste específico o preferencial, como son la del ácido etilen diamino tetraacético (E.D.T.A.) para RNP, la del ácido fosfotúngstico (PTA) para cromatina y otras (23).

Morfológicamente se definen tres regiones nucleares: la región de cromatina compacta, la región intercromatiniana y la región del cuerpo nucleolar. En la primera se encuentra distribuida la cromatina transcripcionalmente inactiva, rodeada de la región pericromatiniana, que es la subregión transcripcionalmente activa. La región intercromatiniana se define como el espacio nuclear que se encuentra entre cúmulos de cromatina compacta. El cuerpo nucleolar corresponde a la zona que ocupa el nucleolo, lugar donde se sintetizan los RNAs ribosomales 18S y 28S (18,23). Las RNP intranucleares se aso-

cian a estas regiones y se describen a continuación.

II.1.1.1 RIBONUCLEOPROTEÍNAS INTRANUCLEARES

II.1.1.1.1 GRÁNULOS PERICROMATINIANOS

Los gránulos pericromatinianos (GPC) fueron descritos por primera vez por Watson en 1962 (24) y parece que se encuentran en todos los núcleos celulares interfásicos de eucariontes. Se localizan cercanos a conglomerados de cromatina compacta y son corpúsculos individuales de 300 a 500 Å de diámetro que con las técnicas habituales de microscopía electrónica presentan un centro denso a los electrones formado por fibras de entre 10 y 30 Å de grosor y un halo claro alrededor, de aproximadamente 250 Å de diámetro (7, 25). Su estructura, composición y función apenas están siendo aclarados.

El posible significado citofisiológico de estas partículas se hizo evidente en un trabajo en el que se compararon las características estructurales, morfométricas, citoquímicas y autorradiográficas de estos gránulos en hepatocitos de rata y en los gránulos de los anillos de Balbiani de los núcleos con cromosomas politénicos de células de glándulas salivales de *Chironomus*. Se sugirió entonces que funcionarían almacenando y/o transportando intranuclearmente el RNA mensajero o premensajero (26). Posteriormente se realizaron diversos estudios tendientes a apoyar tal hipótesis. Se analizaron los efectos de diferentes inhibidores metabólicos, la deficiencia alimenticia y los agentes físicos sobre el número, estructura y disposición de los GPC y otros cuerpos RNP.

Se utilizó cortisol (27), α -amanitina (28), cicloheximida (29), mitomicina C (30), cloruro de cadmio (31), bleomicina (32), hipoalimentación y realimentación (33), temperaturas supranormales (34) o hipotermia (35). El uso de estos agentes, debido a efectos colaterales (toxicidad), no aporta evidencias claras del mecanismo por el cual estas partículas se alteran en número, calidad y disposición. Sin embargo, al estudiar los efectos de las variaciones del nivel de estradiol sobre las RNP del núcleo de células epiteliales endometriales, pues el estradiol no produce toxicidad (36), se

encontró que una disminución en el nivel de la hormona produce un aumento significativo del número de GPC por unidad de volumen nuclear, mientras que la administración del estradiol tiene el efecto contrario. Esto llevó a proponer un efecto postrascricional del estradiol y a apoyar los efectos postulados sobre la síntesis de RNA (37). Se pensó también que los GPC forman un almacén intranuclear de RNP en equilibrio entre la síntesis de RNA mensajero y su salida al citoplasma. Esto se confirmó experimentalmente cuando se diseñó un método para cultivo primario de células epiteliales endometriales de rata (38), que permitió estudiar la síntesis y transporte de RNA al citoplasma mediante marcado con uridina triada y autorradiografía ultraestructural cuantitativa (39). Con estas técnicas se demostró que la abundancia de GPC depende de la relación entre la velocidad de síntesis de RNA y su migración al citoplasma.

La observación de variaciones semejantes en células epiteliales endometriales durante el ciclo estral normal de la rata, demuestra que los resultados no se deben a efectos colaterales de la hormona ni a artefactos de la manipulación.

Teniendo en cuenta los conocimientos sobre la citofisiología de los GPC, que indicaban cambios reversibles en la síntesis de RNA producidos por diferentes concentraciones de estradiol, se ideó investigar las características estructurales y morfométricas de los GPC y de otras RNP durante la diferenciación celular, fenómeno que lleva consigo casi siempre cambios irreversibles de la expresión genética y por ésto, en el patrón de síntesis de RNA, en condiciones normales. Se tomó como modelo la diferenciación de célula matriz a neuroblasto, la de éste en neuronas y la maduración de la misma en médula espinal cervical de embrión de pollo, pues se conoce bastante sobre la citodiferenciación e histogénesis del sistema (40, 41). Los resultados fueron muy significativos pues se demostró que los GPC casi no existen en células matrices y en neuroblastos, y aumentan mucho en número cuando éstos ya se transforman en neuronas y establecen contactos sinápticos. Además, la existencia de GPC en neuronas motoras inmaduras, permitió compro-

bar con técnicas estereológicas, la hipótesis de que el tamaño de estas partículas podría variar con el tamaño de los diferentes genes (26).

Los datos morfométricos sugieren que en artrópodos y vertebrados, estos gránulos contienen RNA producto de la transcripción del gene al cual son adyacentes.

Recientemente se han aislado estas partículas con técnicas bioquímicas y al analizar el RNA de estas fracciones medianamente purificadas, se confirmó en parte esta hipótesis (25, 42).

II.1.1.1.2 FIBRAS PERICROMATINIANAS

Las fibras pericromatinianas (FPC) son estructuras RNP de 30 a 50 Å de grosor y hasta 1200 Å de largo. Fueron descritas por Monneron y Bernhard en 1969 (1). Cuando se aplica cortisol a ratas sin corteza adrenal aumenta el número de FPC (27). Sin embargo cuando se administra α -amanitina a ratas en ayuno antes de ser realimentadas, no se observan FPC (28). Las drogas que detienen la síntesis de RNA mensajero inmaduro o heterogéneo nuclear (pre-mRNA o hnRNA) disminuyen dramáticamente el número de FPC, como es el caso del ribósido de diclorobenzimidazol (DRB), un análogo de la adenosina, que inhibe la iniciación de la síntesis de hnRNA. Como se ve, existe una gran correlación entre la inhibición de la síntesis de pre-mRNA y la desaparición de FPC, lo que sugiere que éstas sean el sustrato morfológico de aquel (23).

Recientemente, mediante autorradiografía ultraestructural cuantitativa, en combinación con técnicas bioquímicas de electroforesis en gel, se mostró marca radiactiva en el borde de la cromatina compacta, después de un pulso con uridina tritiada; es decir, la marca apareció en la región rica en FPC. Estos resultados sugieren que las FPC representan el sustrato morfológico donde se localiza el hnRNA recién sintetizado (43, 44).

II.1.1.1.3 FIBRAS INTERCROMATINIANAS

Las fibras intercromatinianas (FIC) pueden representar el estado intercromatiniano de las FPC durante su migración por el nucleoplasma (44). Cuando se utilizan pulsos cortos de 5 minutos de

uridina tritiada y experimentos de caza de 2 a 4 horas, en el espacio intercromatiniano aparecen marcas de radiactividad asociadas a fibras ribonucleoproteicas por lo que se ha postulado que éstas podrían representar el sustrato morfológico de los hnRNAs libres en el nucleoplasma o de migración al citoplasma (23).

II.1.1.1.4 GRÁNULOS INTERCROMATINIANOS

Los gránulos intercromatinianos (GIC) son estructuras granulares de 200 a 300 Å de diámetro que se encuentran unidas por fibrillas delgadas y forman cúmulos de tamaño variable en el espacio intercromatiniano. Fueron descritas por Swift en 1959 (45) pero Monneron y Bernhard les dieron nombre y comprobaron su naturaleza ribonucleoproteica en 1969 (1).

En experimentos con preñasa seguida de RNasa en cortes, se logró obtener una reducción en el número y tamaño de los GIC; cuando se utiliza una sola de las enzimas, no hay alteración de estas estructuras (1).

Se ha logrado observar actividad de ATPasa y GTPasa en los GIC y se ha visto también que la infección por virus aumenta el número de cúmulos de GIC (46).

En 1970, utilizando lasiocarpina, se observó que aparecían más GIC de los normales. Debido a que esta droga inhibe la síntesis de RNA ribosomal se cree que esta correlación entre aumento de GIC y disminución de la síntesis indica que los GIC son estructuras con RNA ribosomal. Usando técnicas de bloqueo de grupos químicos, seguidas de una técnica de contraste especial, Wassef detectó proteínas fosforiladas en los granos (46).

Recientemente se ha investigado nuevamente el papel de estos cuerpos y se ha propuesto que están asociados espacialmente al nucleolo. Utilizando drogas que inhiben la síntesis del hnRNA, como el DRB, autorradiografía ultraestructural cuantitativa y drogas que inhiben la síntesis de RNA ribosomal, en combinación con experimentos de pulso y caza, se ha sugerido que los GIC son estructuras RNP con un RNA ribosomal bien protegido y de síntesis muy inicial en el ciclo celular, es decir, al inicio de G_1 (47,48).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha observado que cuando se utiliza una técnica de contraste con nitrato de plata amoniacal-formol para proteínas, se establece una relación citoquímica entre el nucleolo y los GIC, pues esta técnica contrasta las proteínas B23 y C23 nucleolares y también los GIC. Los mismos autores de este trabajo observaron que en células en división, los GIC se disgregan en telofase pues migran al citoplasma y ahí se desintegran. En las células hijas se forman *de novo* en un período muy temprano del ciclo celular (49).

II.1.1.1.5 CUERPOS ESPIRALADOS

Los cuerpos espiralados (CE) fueron vistos por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969; estas estructuras no han sido generalizadas a las células de otros organismos diferentes de mamífero y actualmente se acepta, no sin reservas, su naturaleza ribonucleoproteica (1). Son estructuras que alcanzan 0.5 μ m de diámetro, enrolladas sobre un eje. Se localizan en el espacio intercromatíniano.

Recientemente se ha postulado su origen nucleolar y su posible papel en el procesamiento de los RNAs ribosomales. Sin embargo, los estudios más actuales de estas partículas subnucleares son puramente morfológicos y no aportan ninguna prueba clara de su papel citofisiológico (50, 51).

II.1.1.1.6 NUCLEOLO

Felice Fontana en 1781 describe al nucleolo en anguilas diciendo que "la vesícula en a en la figura 10 representa una de las vesículas de la figura 9 en la cual uno observa un cuerpo oviforme (el núcleo) teniendo una "mancha" ("tache") en su interior". Esta "tache" es quizá la primera ilustración del nucleolo en los seres vivos (9, 10).

Fontana evidentemente nunca pensó en la complejidad que ya existía dentro del nucleolo, pero lo reconoció como una estructura digna de ser mencionada aunque fuera con el nombre de una "mancha". Desde la "tache" descrita por este autor, hasta el conocimiento actual que ya se tiene sobre el nucleolo, hay una serie

de eventos históricos que han sido revisados ampliamente en otros trabajos (14, 15, 52-54).

Se sabe que el nucleolo es el sitio de formación de los precursores moleculares de los ribosomas y en especial de la producción de RNAs ribosomales 18S, 5.8S y 28S, sintetizados a partir de algunos genes que forman parte de lo que se conoce como región del organizador nucleolar (NOR). Este fragmento de DNA sirve como molde a partir del cual se sintetiza un precursor de RNA ribosomal inmaduro o pre-rRNA de 45S.

Recientemente se ha postulado que el nucleolo consta de varios componentes estructurales y funcionales. a) Los centros fibrilares son regiones no nucleolonemales, poseen DNA ribosomal (rDNA) en el cual está codificado el precursor ribosomal 45S, poseen también RNA polimerasa I encargada de transcribir el rDNA y poseen además proteínas de la región nucleolar teñidas con técnicas de plata. Es rico en las proteínas B23 y C23. b) Los componentes fibrilares densos conforman lo que se conocía anteriormente como la *pars fibrosa* o región del nucleolo y representa la forma transcripcionalmente activa del nucleolo. c) Los componentes granulares o *pars granular* consta de partículas de 150 Å de diámetro, compuestas de pre-rRNA. d) La región del organizador nucleolar representa el sitio donde se localizan los genes rDNA y es a partir de él que se forma nuevamente el nucleolo después de telofase. e) El nucleolonema, descrito por Estable y Sotelo, es una región de fibras gruesas de unos 0.1 µm de espesor, formadas por granos y fibras nucleolares. f) Los espacios circundantes del organizador nucleolar son regiones que bordean las áreas cercanas a donde se localizan los rDNA. g) Las "vacuolas nucleolares" son espacios largos y ovalados, o esféricos, ricos en pre-rRNA y muestran la presencia de fibras dispersas, ricas también en pre-rRNA; también son llamados "intersticios" por carecer de membrana; se localizan en muchas ocasiones, entre zonas nucleolonemales. h) La cromatina asociada al nucleolo, o cromatina perinucleolar, rodea el cuerpo nucleolar sin formar parte del mismo pero penetrándolo mediante fibrillas. i) En el nucleolo se presenta una matriz nucleolar, compuesta de material amorfo donde

se observan fibras y granos después de una extracción salina (18, 54). Recientemente se ha localizado una proteína, la Mr 145 000, que se asocia a estructuras similares a cuerpos espiralados. Sin embargo, no se ha establecido su papel citofisiológico (55).

II.1.1.2 ESTRUCTURAS NO RIBONUCLEOPROTEICAS

II.1.1.2.1 MATRIZ NUCLEAR

La estructura nuclear residual denominada matriz o esqueleto nuclear, ha sido aislada de núcleo de diversas células por extracciones con alta concentración de sal y por digestión con nucleasas. Está representada por una red proteica y ribonucleoproteica que mantiene la integridad y forma del núcleo; consiste de una costra de lámina densa y proteínas del complejo del poro, de los residuos del nucleolo y de una red interna que conecta a estos dos elementos; además, presenta partículas que semejan a los GIC de núcleos intactos. Estos granos pueden ser observados tanto en matrices sin cromatina como en matrices sin RNA (18).

La matriz consiste de fibras de 50 a 60 Å de grosor y está formada por proteínas ácidas, además de que contiene poco DNA, RNA, carbohidratos y fosfolípidos (60).

A la matriz nuclear se le han asociado funciones de organización de la cromatina en interfase y un papel en la dirección del pasaje de moléculas hacia el citoplasma. La matriz no se tiñe con la reacción de Feulgen y tiñe ligeramente con azul de toluidina; sin embargo, con verde brillante toma un color fuerte. Es susceptible a pepsina pero resistente a RNasa (57-59).

Se ha demostrado que la matriz nuclear es continua con el citoesqueleto y está compuesta por filamentos internos de 20 a 220 Å de grosor, organizados en una red anastomosada tridimensional en la que están inmersos los nucleolos (61).

La electroforesis en gel bidimensional muestra que las proteínas del citoesqueleto, cromatina y matriz nuclear son muy diferentes, pero hay un componente común a todos, aunque es distinto bioquímicamente en cada uno de ellos: la actina. La actina o proteína BJ ha sido aislada a partir de hepatomas y analizada por cri-

terios bioquímicos. Se ha obtenido su secuencia primaria y se ha mostrado que esta actina es propia del núcleo pues es diferente de la actina muscular y de la citoplásmica (62).

Otros autores han encontrado miosina, actina y tropomiosina, todas como proteínas contráctiles nucleares. Algunos autores reportaron la presencia de α -actinina y de tubulina. Todas estas proteínas forman casi el 38% de las proteínas no histónicas del núcleo y pueden ser muy importantes en los fenómenos de transporte intranuclear de moléculas grandes (19, 63, 64).

Recientemente se ha visto que la matriz nuclear se asocia a una proteína de 70 000 daltones, inducida por calor en células cultivadas (5 minutos a 44°C). Esta proteína no se presenta en condiciones normales y no reacciona contra anticuerpos nucleares producidos a partir de extractos nucleares y puede ser contaminante (56).

II.1.1.2.2 LÁMINA DENSA

La lámina densa o lámina fibrosa fué descrita por Fawcett en 1966 en el núcleo de algunos vertebrados. La describió como una costra de material denso a los electrones que recubre la cara interna de la membrana interna de la envoltura nuclear (65).

Actualmente se piensa que está formada al menos por tres proteínas que conforman una red densa (23).

En experimentos de reasociación de membranas después de la mitosis, se ha observado que la lámina densa se origina a partir de proteínas asociadas a la envoltura nuclear (66). A pesar de esto, los componentes bioquímicos reales de esta estructura se conocen poco. Se cree que le da soporte y forma al núcleo pero esto no se ha demostrado experimentalmente.

II.1.1.2.3 CROMATINA

La cromatina representa el complejo desoxirribonucleoproteico a partir del cual se llevan a cabo los fenómenos de la síntesis de proteínas (indirectamente) y de la herencia en eucariotes. Bioquímicamente está formada por unidades repetitivas de DNA e histonas denominadas nucleosomas. Cada nucleosoma posee dos de cada una de las histo-

nas denominadas H2A, H2B, H3 y H4; posee además una histona de unión, la H1 (20, 67, 68). Al nucleosoma se asocian proteínas que constituyen un requisito para que ocurra la transcripción, como la HMG₁₄ y la HMG₁₇ (proteínas del Grupo de Alta Movilidad, High Mobility Group) (69). Cuando el DNA está asociado a las histonas formando los nucleosomas, es posible demostrar regiones hipersensibles al ataque por algunas endonucleasas. Estas regiones tienen un alto contenido de bases A y T y se unen a IMGs. El empaquetamiento del DNA en cromatina y cromosomas, por intervención del nucleosoma, hace posible que el DNA de eucariontes sea mantenido dentro de un volumen relativamente pequeño y que la función de éste a su vez, se conserve de manera coherente. Se ha postulado que la cromatina laxa o eucromatina y no la cromatina compacta o heterocromatina, es la que representa el estado morfológico transcripcionalmente activo del DNA. Esto ha sido confirmado en múltiples ocasiones y se ha establecido que quizá sólo la eucromatina de la región pericromatiniana, es decir, la que se encuentra en los bordes de cúmulos de cromatina compacta, es a partir de la cual se transcriben los RNAs asociados a las FPC (71).

Los complejos de transcripción no nucleolares también han sido visualizados ultraestructuralmente y muestran similitud con los del nucleolo (72, 73).

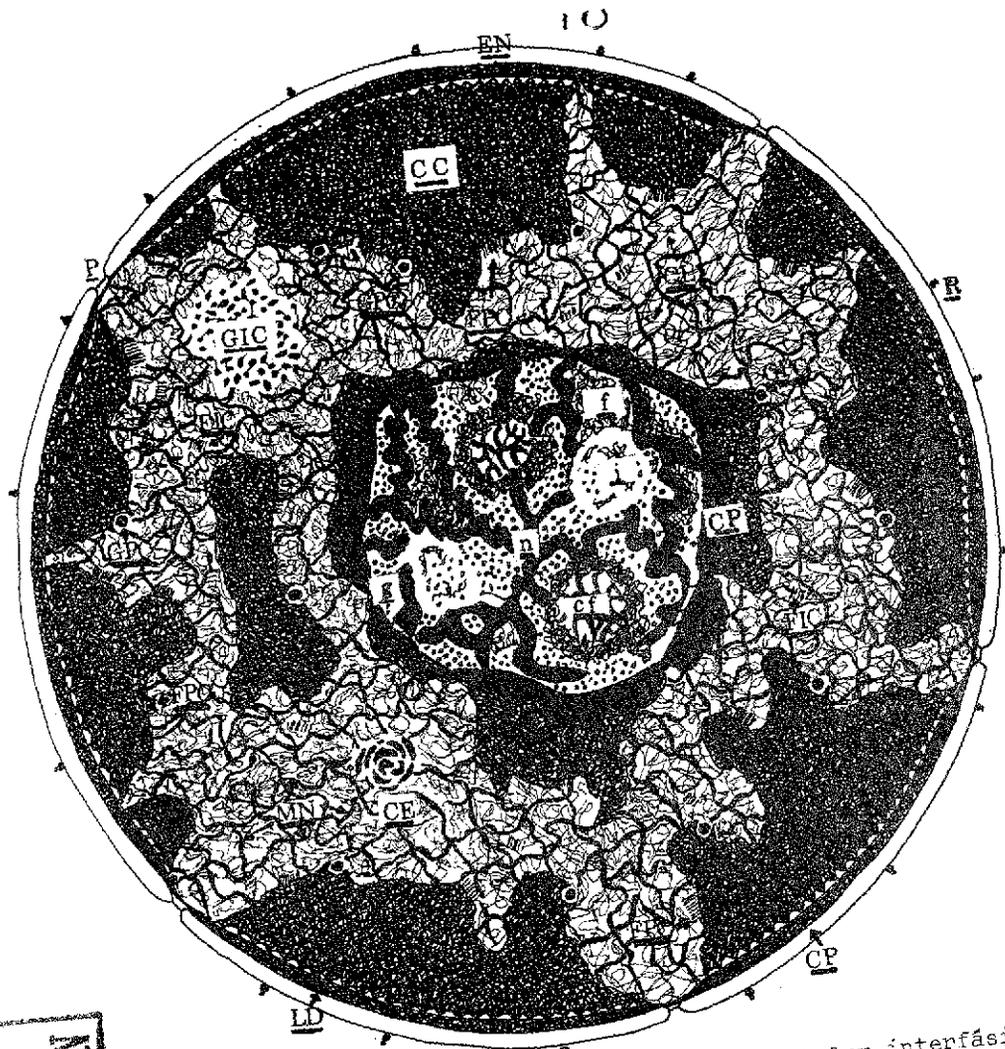
La estructura de la cromatina transcripcionalmente menos activa o casi inactiva, los cromosomas, ha sido estudiada en los últimos años y se ha establecido que cada cromosoma posee un esqueleto o "andamio" proteico de proteínas no histónicas. Estas proteínas dan forma al cromosoma. En preparados de cromosomas aislados y tratados con sulfato de dextran para eliminar las histonas y heparina para dispersarlos, se observa que los componentes esqueléticos constan de proteínas ácidas que dan forma a la estructura; el DNA está distribuido en asas individuales de 10 a 20 μ m de largo, unidas al esqueleto proteico (74).

La relación entre las partículas nucleares y los procesos metabólicos postranscripcionales llevaron a buscar algún tipo

dé convergencia entre estos dos aspectos. La convergencia directa encontrada entre los estudios bioquímicos y morfológicos llevó hasta los RNAs intranucleares de tamaño pequeño, ricos en residuos de Uridina (UsnRNAs).

La técnica específica que ha hecho posible detectar tal convergencia ha sido la inmunocitoquímica ultraestructural. Se ha encontrado que los UsnRNAs se asocian a diversas partículas intranucleares. Se sabe que de los varios tipos de UsnRNAs (U1 a U6), el U3 se asocia al nucleolo, el U2 se asocia a cromatina y se cree que puede intervenir en la estructuración de la misma. Los U1, U2, U4, U5 y U6 se unen estrechamente a las FPC, a los GIC, a los GPC y a las FIC, por lo que se ha postulado su posible papel dentro de la síntesis y procesamiento de los RNAs dentro del núcleo (75, 76, 77). Algunos autores han encontrado que los GPC sólo se asocian al U6; el U1 se asocia abundantemente a las FPC. Otros autores encontraron que en hepatomas y otros tipos celulares cultivados, la matriz nuclear y los GIC representan los sitios de mayor cantidad de UsnRNAs. Los mismos autores, usando DRB como inhibidor de la síntesis de hnRNA, encontraron que este tratamiento afecta la distribución de las partículas detectables por inmunocitoquímica ultraestructural, sugiriendo que hay una estrecha relación entre los UsnRNAs y las partículas RNP ricas en hnRNA (75).

El panorama mostrado indica que hay una relación íntima entre las partículas RNP intranucleares, los UsnRNAs y el procesamiento postranscripcional de los RNAs, en particular del hnRNA o pre-mRNA. Esto pudiera sugerir que el compartimiento nuclear ha evolucionado a partir de formas sencillas que puedan encontrarse en los grupos filogenéticamente más antiguos. En este trabajo se toca casi exclusivamente el componente RNP, dejando un poco de lado el de la cromatina. Es importante entonces hacer notar que el estudio integral del núcleo ayudaría a obtener correlación entre la morfología y la bioquímica con la filogenia. Quizá en este organelo se dieron los cambios que resultaron en la diversidad fenotípica eucarionte.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Esquema 1. El dibujo representa a un núcleo celular interfásico de una célula de mamífero. Se han incluido todas las partes, aún cuando no hay una técnica que permita verlas a un mismo tiempo. EN, envoltura nuclear; R, ribosomas adheridos a la envoltura nuclear; CP, cisterna perinuclear; LD, lámina densa; P, polirribosomas; CC, cromatina compacta; CL, cromatina laxa, que aquí aparece como hilachos grises; CP, cromatina perinucleolar; GPC, gránulos pericromatinianos; GIC, gránulos intercromatinianos; FPC, fibras pericromatinianas; FIC, Fibras intercromatinianas; CE, cuerpos esophageales; MN, matriz nuclear. Al centro, el nucleolo: f, región fibrilar; g, región granular, n, nucleolonema, cf, centros fibrilares; i, vacuolas o intersticios nucleolares.

II.1.2 PROCESAMIENTO POSTRANSCRIPCIONAL DEL m RNA

La presencia de envoltura nuclear en células eucariontes ha permitido la separación del material hereditario del citoplasma y ésto ha llevado a la división de los seres vivos en procariontes y eucariontes. Esta compartimentalización seguramente favorece los fenómenos de recombinación y posibilita en mayor grado la regulación de la expresión genética a nivel postranscripcional. En procariontes la traducción es casi simultánea a la transcripción y ésta regulación aún cuando se presenta, no es de la misma complejidad. La oportunidad de alteración de los transcritos primarios dentro del núcleo trae consigo eventos conocidos como procesamiento o maduración postranscripcional del RNA. Durante este proceso, se modifican cadenas grandes de RNA antes de salir al citoplasma para acoplarse a la síntesis de proteínas. Sin embargo, en procariontes se ha reportado también que hay un procesamiento postranscripcional de los RNAs de transferencia, ribosomal y mensajero (78). En estos organismos, si bien es más simple y de menos posibilidades, los transcritos primarios difieren de los funcionales en varias cosas, por ejemplo, el rRNA que posee la secuencia nucleotídica de los 23S, 16S y 5S, también posee la secuencia para algún tipo de tRNA, de tal manera que el RNA primario tiene que modificarse antes de hacer contacto con el aparato traduccional. Se sabe que los RNAs procariontes son procesados incluso durante la transcripción por las endorribonucleasas denominadas III, E, F y P y por una exonucleasa, la D.

El aparato transcripcional tiene mayor complejidad en eucariontes. En procariontes una sola RNA polimerasa cataliza la síntesis de RNA uniéndose a una secuencia específica de DNA conocida como promotor. A partir de este sitio de iniciación, la cadena crece en dirección 5' → 3' hasta alcanzar una señal de terminación donde se libera. En eucariontes hay tres RNA polimerasas, una para cada tipo de RNA. La RNA polimerasa II cataliza la formación de los RNA mensajeros, la RNA polimerasa I la formación de los rRNA 28S, 18S y 5.8S y la RNA polimerasa III la formación de los tRNA y del rRNA 5S (79).

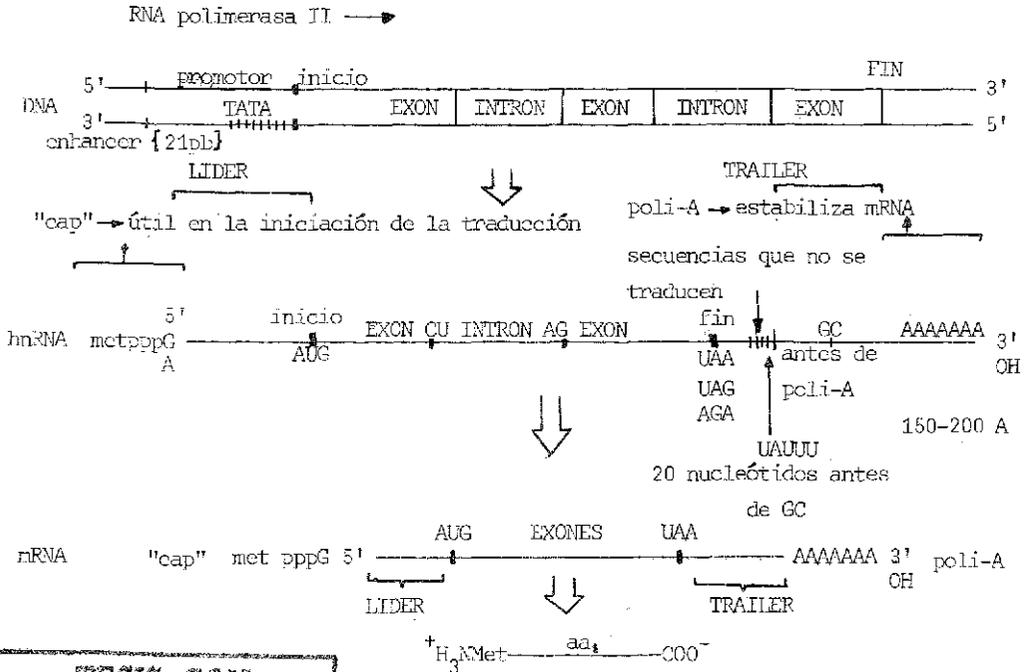
Los sitios de reconocimiento de las RNA polimerasas I y II hacia la molécula de ácido desoxirribonucleico son de alguna manera

similares a los de la RNA polimerasa bacteriana, esto es, existe una secuencia rica en bases A y T, aproximadamente unos 35 nucleótidos por detrás del sitio de iniciación de la transcripción, esencial para comenzarla, denominada TATA "box" o Goldberg-Hogness "box" (70), además de otras secuencias relevantes como el enhancer.

El RNA recién sintetizado es empacado casi inmediatamente en RNP (80). Estas partículas RNP representan sitios de almacén y/o transporte, degradación y procesamiento postranscripcional intranuclear de RNA (7).

En este estudio describiremos principalmente el procesamiento postranscripcional de los RNAs mensajeros que implican modificaciones covalentes.

El gene y las características universales de tipo molecular de su producto transcrito como RNA mensajero se ilustra a continuación y se detallan en el texto.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

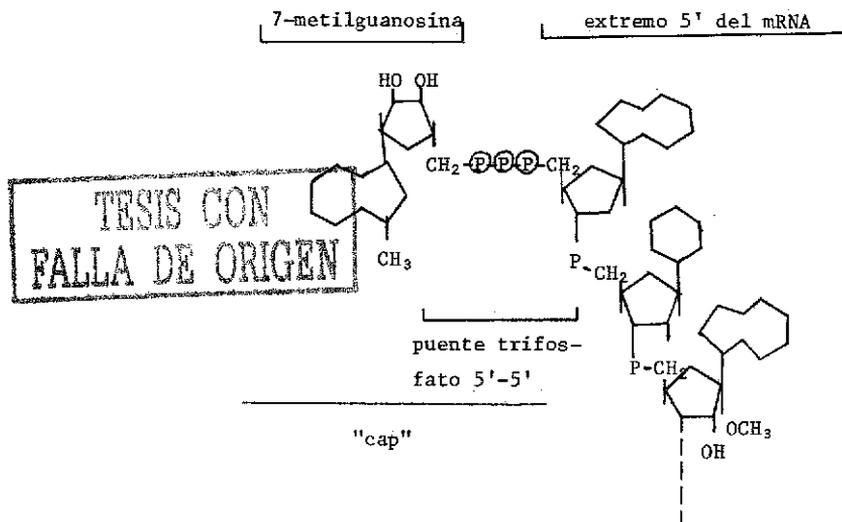
La formación de un RNA mensajero activo en la síntesis de proteínas, implica una serie compleja de eventos que incluyen la iniciación y terminación de la transcripción, "capping", metilación interna, poliadenilación, "splicing" y transporte citoplásmico. A continuación describiremos en más detalle el "capping", la poliadenilación y el "splicing".

II.1.2.1 "CAPPING" O METILACIÓN DEL EXTREMO 5'

Los transcritos primarios de mRNA intranuclear se denominan RNA heterogéneo nuclear o RNA premensajero, hnRNA o pre-mRNA respectivamente. Antes de dejar el núcleo se asocian a proteínas, conformando ribonucleoproteínas heterogéneo nucleares (hnRNP). Las modificaciones covalentes que sufre este RNA antes de salir al citoplasma son la adición de un "capuchón" o "cap" en el extremo 5' de la molécula, la adición de una "cola" de ácido poliadenílico (poli-A) en el extremo 3' y la eliminación de secuencias no codificantes o intrones ("splicing").

En 1974, Reddy estudió los RNAs 4S y 8S de bajo peso molecular en hepatomas. Al obtener la secuencia de nucleótidos de estas moléculas, encontraba un residuo nucleotídico de guanósina hipermetilada en el extremo 5' (2, 2, 7 trimetil guanósina), unido a adenosina metilada mediante un enlace 5'-5' pirofosfato(81). Actualmente se sabe que esta estructura molecular es probablemente de ocurrencia universal en eucariontes y se denomina como grupo 7-metilguanósina ($mGpppA^m pAp$). Este grupo metilado es interno en tRNA y no existe en rRNA. El grupo 7-metilguanósina le da estabilidad al mRNA en el citoplasma pues impide su degradación. El "encapuchamiento" o "capping" ocurre en el extremo 5' de la molécula y consiste en la adición de un grupo $m7G(5')ppp(5')N$ (aquí, N es un residuo nucleotídico cualquiera).

En el esquema a continuación, se muestra cual sería la estructura de el "cap" y como estaría unido al resto de la molécula de hnRNA



El extremo 5' es encapuchado antes de que se transcriba toda la cadena y se cree que ocurre antes de que se transcriban los primeros 20 nucleótidos; la reacción es catalizada por enzimas que se asocian a la RNA polimerasa II. El complejo enzimático consta de una guanidil transferasa de RNA mensajero que une el "cap" a GTP y la metiltransferasa de mRNA que metila el residuo de guanina en la posición 7 (81).

Se ha demostrado que el "cap" es necesario para la unión eficiente al ribosoma y para la iniciación de la síntesis de proteínas pues ésta comienza en el primer triplete AUG después del "cap" (21).

Se ha visto que la interacción entre el "cap" y la proteína receptora del ribosoma ocurre entre los electrones del aminoácido triptófano y los derivados de la 7-metilguanósina, en especial, de la guanina metilada en el nitrógeno de la posición 7. Se ha propuesto también que el "cap" impide la degradación nucleolítica del hnRNA y del mRNA (82).

II.1.2.2 ADICIÓN DE LA "COLA" DE POLI-A EN 3'

La poliadenilación o adición de la "cola" de ácido poliadenílico (poli-A) en el extremo 3' de la molécula de hnRNA, ocurre una vez que se ha sintetizado el precursor molecular del RNA mensajero. El proceso es mediado por una poliadenilasa que añade de 100 a 200 residuos de ácido adenílico, poli-A, en el extremo 3'.

No se conoce exactamente la función de esta estructura pero se ha postulado que le da estabilidad al RNA mensajero y que favorece la salida del mismo al citoplasma (21). Por ejemplo, en cepas celulares infectadas con mutantes virales de SV40, deficientes en el transporte de RNA, no se encuentra la "cola" de poli-A (83).

Las proteínas asociadas a la "cola" de poli-A son diferentes entre los mRNA y los hnRNA (84). Una vez en el citoplasma, la "cola" de poli-A puede seguir dos rutas: se reduce de tamaño si se asocia a polisomas o bien permanece de igual tamaño si se acopla a ribonucleoproteínas libres. Esto puede indicar que esta estructura juega un papel importante en la estructura y estabilidad del hnRNA (85).

La poliadenilación y el fenómeno mencionado a continuación ("splicing") ocurren dentro de partículas RNP; sin embargo, la formación de estas partículas no depende de esos fenómenos (80).

II.1.2.3 "SPLICING" O ELIMINACIÓN DE INTRONES

Los experimentos con uridina tritiada sobre transcritos primarios de hnRNA durante períodos cortos de tiempo, llevaron a establecer que éstos son inestables dentro del núcleo y que decrecen rápidamente en tamaño. Sólo el 5 % de este RNA abandona el organelo nuclear y el resto es degradado dentro del compartimiento (21). Este descubrimiento, junto con el de los genes partidos (split genes) en 1977, realizado al estudiar la biosíntesis de mRNA viral en células infectadas con adenovirus 2 y el uso de la tecnología de DNA recombinante llevaron a establecer que la mayoría de los genes estructurales de eucariotes no son colineales con sus productos sino que contienen secuencias de interrupción en las que no está codificado algún mensaje para proteínas (86, 87). Las re-

giones que tienen codificadas las secuencias de mRNA se denominan exones y están interrumpidas por secuencias en las que no está codificado algún mensaje para aminoácidos, denominadas intrones (88). Se han descubierto genes partidos en genomas virales, en cromosomas de eucariontes, en rRNA, tRNA, en genomas mitocondriales y de cloroplastos, pero no en procariontes. Actualmente se acepta que el genoma de eucariontes presenta genes partidos, a excepción de algunos casos, como el de los genes de histonas (89). Con este descubrimiento se hizo patente la existencia de otra reacción de procesamiento y se comenzó a especular sobre como es el fenómeno de la eliminación de los intrones o "splicing"

El fenómeno de "splicing" ayuda a explicar algunos hechos que parecían poco razonables. Uno de ellos era el por qué si el 7 o 10% del DNA es transcrito, sólo el 1 o 2% sale del núcleo. También explica por qué algunos transcritos de hnRNA mucho más grandes que sus productos maduros de mRNA son acortados significativamente (21).

Se ha postulado también que los genes partidos sean en realidad "minigenes" y que cada exón codifica para cierta parte funcional de la molécula proteica (88).

La importancia de los intrones o de los genes partidos aún está por aclararse en su totalidad, sin embargo, se ha intentado explicar el fenómeno de "splicing" por diferentes mecanismos.

El mecanismo de "splicing" debe tener dos fases como mínimo: una en la que se separan las uniones intrón-exón y otra en la que se unan los exones resultantes. Aún cuando no se conocen las enzimas que realizaran tales actividades, es posible, con los avances actuales, tratar de hacer modelos. En el estudio de las secuencias no codificantes, resaltan varios hechos importantes:

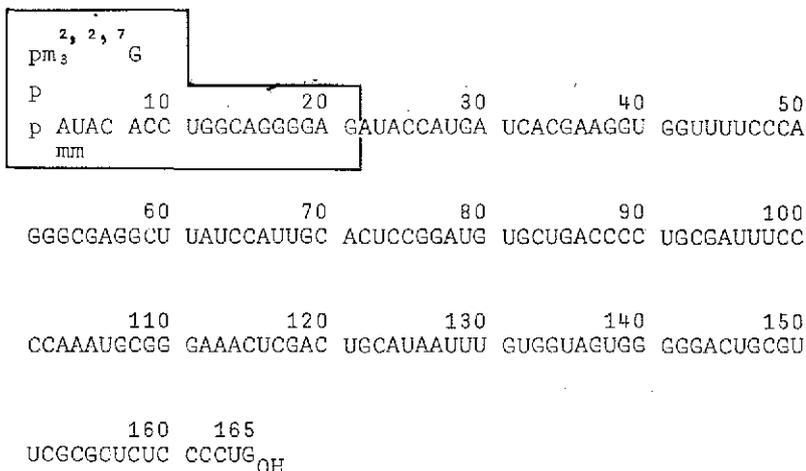
Parece que las secuencias nucleotídicas que unen un intrón a un exón son estructuras universales, conservadas en la evolución pues se presentan las bases GU del lado del extremo 5' de la molécula de hnRNA y las bases AG del lado 3'; el sitio de "splicing" se presenta en lugares de secuencias repetidas (89). Se ha visto que pacientes con una β -talasemia, enfermedad que consiste en la síntesis deficiente de β -globina en la hemoglobina de adulto, presen

tan una mutación en la secuencia conservada de unión exón-intron del lado 5', la cual impide el procesamiento adecuado de la molécula (90).

Los intrones fluctúan de 100 a 1000 nucleótidos de tamaño (21). También se ha observado que entre las bases de unión exón-intrón y algunas regiones de RNA de bajo peso molecular contenido en hnRNP hay complementariedad. Estos RNAs son los ya mencionados UsnRNAs.

Los U-snRNAs fueron estudiados por primera vez por Maramatsu en 1968. Los descubrió al aislar RNAs nucleolares con coeficientes de sedimentación 4S y 8S y observó que eran diferentes a los rRNA y a los tRNA. Por tener gran cantidad de ácido uridílico les llamó U-RNA y por ser pequeño y estar dentro del núcleo los denominó como sn (small nuclear). Los U-snRNAs pequeños, con alto contenido de ácido uridílico y que se presentan en virus, en procariontes y en eucariotes, poseen de 90 a 400 nucleótidos y se presenta cerca de un millón de copias por célula. Son moléculas estables que se localizan en compartimientos específicos: U3 en el nucleolo, U1, U2, U4, U5, U6 y La 4.5S en el nucleoplasma y en ocasiones en el citoplasma. Los U1 a U6 son sintetizados por la RNA polimerasa II; los otros por la RNA polimerasa III. Los U1 a U5 tienen un "cap" de trimetilguanosina; en el U6 es distinto. Todos se asocian a RNP y a precursores de hnRNA. La secuencia para cada uno de los U-snRNAs es casi universal entre las diferentes especies, es decir, se ha conservado en la evolución, quizá por su papel importante aún no esclarecido. Este hecho y el que sea el U1 el que se presente en mayor concentración dentro del núcleo ha llevado a pensar que tal vez exista una relación entre el U1 y el fenómeno de "splicing" ya que se ha visto que una parte de la cadena de U1-snRNA es complementaria a los sitios de unión exón-intrón (91-94).

En el esquema que se muestra a continuación se ilustra la secuencia de bases o estructura primaria de la molécula de U1-snRNA. En el extremo 5' se ve la estructura del "cap" trimetilado y se encierra en líneas negras a los primeros 21 residuos nucleotídicos que se aparean con los sitios de unión entre el exón y el intrón, como se verá en un esquema más adelante.



Secuencia de bases del U1-snrRNA. Hasta el nucleótido número 21 la secuencia es complementaria con la unión intrón-exón.

Al aislar algunos tipos de U-snrRNP se ha encontrado que hay alrededor de 10 proteínas distintas, dos de las cuales se unen estrechamente con el U1-snrRNA. La mayoría de los U-snrRNAs, salvo el U3, son inmunoprecipitables por antisueros de *lupus* eritematoso sistémico (95). Por esto, se representan dos antígenos, designados: RNP, que se asocia a U1 y tiene siete proteínas distintas. El otro es Sm y parece ser una proteína; se asocia a U1, U2, U4, U5 o U6.

Tenemos varias evidencias que apoyan la participación de la molécula de U1-snrRNA en la eliminación de intrones: a) el extremo 5' del U1 RNA es complementario a la secuencia conservada durante la evolución de los sitios de unión intrón-exón en el hnRNA, b) Cuando se incubaba el U1 RNA purificado, bajo condiciones de hibridización, con una secuencia de DNA de 16 nucleótidos que imita la secuencia conservada, se hibridiza una secuencia corta en el extremo 5' del U1, c) *in vivo*, el U1 está fuertemente unido a hnRNPs, d) la actividad estimuladora del "splicing" copurifica con snRNP en experimentos donde cierta fracción nuclear conocida como S100 es purificada por cromatografía sobre columna de intercambio iónico y columnas de filtración con gel, e) entre snRNA y

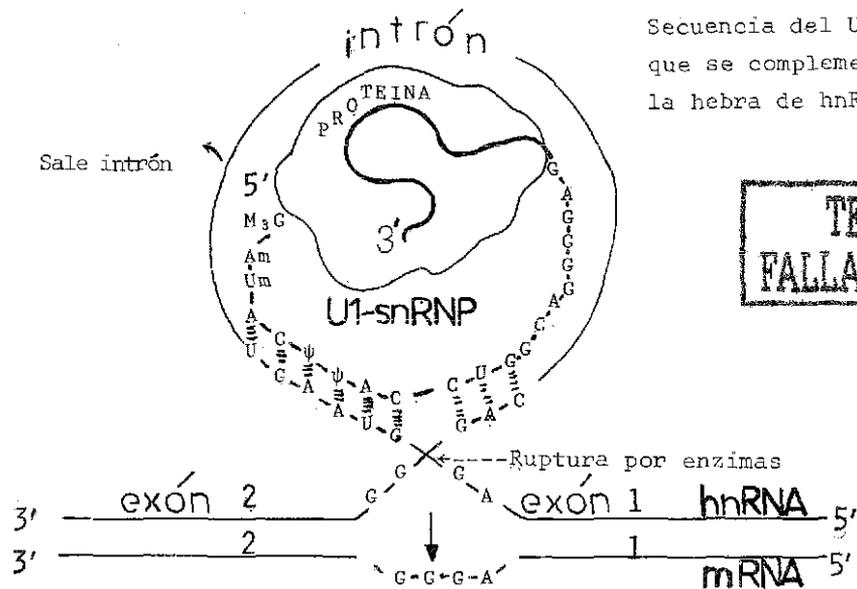
hnRNAs hay enlaces de hidrógeno, f) los U1 a los que se les ha cor-
tado un fragmento del extremo 5', no se unen a hnRNP, g) el "spli-
cing" es inhibido si se preincuba el hnRNA de adenovirus en célu-
las HeLa con anticuerpos para anti-Sm o anti-RNP (91-94).

Además de los U-snRNAs, en el "splicing" también participan
iones como el magnesio (Mg^{++}), el ATP y ciertas proteínas no caracte-
rizadas (96). A pesar de que no se han caracterizado estas pro-
teínas que intervienen en la eliminación de los intrones, hay evi-
dencias que apoyan el hecho de que sí intervienen proteínas en el
mismo. El "splicing" es abatido por calor o por tratamiento con
proteinasa (96).

Se ha propuesto que lo importante de la molécula de U1 es su
estructura secundaria puesto que en moléculas de U1 que difieren
en su secuencia de nucleótidos, se efectúa el "splicing". Esto su-
giere que su estructura secundaria puede ser similar.

Algunos autores han sugerido que el mediador del fenómeno de
la eliminación de los intrones es una "madurasa" que está codifi-
cada en los intrones mismos (97).

De acuerdo a lo anteriormente dicho, el modelo más aceptado
para el mecanismo de la eliminación de los intrones se muestra en
el esquema siguiente (21, 91).



En este modelo, el asa formada mantiene unidos los extremos de los exones adyacentes, facilitando el proceso de rompimiento y unión mediado por enzimas aún desconocidas. El U1-snRNA, de 165 nucleótidos se complementa con la unión exón-intrón en alguna parte del comienzo de la cadena. La complementaridad deja juntos el brazo aceptor (exón 2) y el brazo donador (exón 1), como parte preliminar del "splicing". No se sabe cómo un solo brazo aceptor se une a un solo brazo donador, pero debe ocurrir de esta manera; en caso de no ser así, las proteínas serían construídas bajo un caos total pues la recombinación de exones sería posible y no se mantendría un orden.

En experimentos con intermediarios del fenómeno de "splicing" se observa que el primer fenómeno detectable es el rompimiento de la unión exón-intrón cerca del extremo 5' (98). Otro estudio sugiere que la secuencia de eventos es: la modificación interna de los intrones, el rompimiento del extremo 5' y el rompimiento del extremo 3'. Posteriormente se ligan los extremos de los dos exones (99). Actualmente la investigación se centra en la búsqueda de las enzimas del "splicing".

II.1.2.4 PROCESAMIENTO DE OTROS RNAs

En los RNAs de transferencia y ribosomal no hay "cap", no hay poli-A ni intervienen, salvo en el nucleolo, los U-snRNAs.

En el tRNA, donde también hay intrones, la reacción de eliminación lleva dos pasos que requieren Mg^{++} y ATP (89,100-102).

En el rRNA no hay intrones pero interviene el U3-snRNA que actúa sobre ciertas secuencias para producir, a partir del precursor pre-rRNA 45S, los rRNAs maduros 28S, 18S y 5.8S. El U3 actuaría sobre el precursor 32S para originar el 28S, en un mecanismo similar a la eliminación de los intrones (91, 103).

En mitocondrias y cloroplastos, los RNAs sufren modificaciones similares a las de los eucariontes, salvo que no intervienen los U-snRNAs y las secuencias de unión exón-intrón no son GU ni AG. Sin embargo, se producirían las mismas ásas que se proponen para el U1 y el hnRNA. No se conoce mucho sobre el mecanismo ni los elementos involucrados en el "splicing" de estos tipos de RNA (89, 104).

II.1.3 FILOGENIA

La historia evolutiva de los eucariontes ha sido estudiada por muchos autores y la teoría más aceptada actualmente es la que considera que se originaron al mismo tiempo que divergieron las arqueobacterias y eubacterias, (105), a partir de procariontes no fotosintéticos de tipo ameboideo que por una serie de simbiosis produjeron un organismo ameboflagelado que se volvió sexual. Así, éstos originarían un protoctista holozoico que sería el ancestro de los metazoarios (106). El cloroplasto derivaría de una cianobacteria simbiótica en un protozoario fagotrófico en tanto que la mitocondria derivó quizá de bacterias aeróbicas simbióticas (107, 108, 109). Se piensa igualmente que los cilios y flagelos y las estructuras relacionadas con éstos se formaron a partir de endosimbiontes del tipo espiroqueta (107). El origen del núcleo es aún menos claro. La teoría más aceptada es la que postula que se originó por una serie de invaginaciones de la membrana plasmática que englobaron el material genético en un compartimiento como protegiéndolo del oxígeno venenoso que incrementaba su concentración en la tierra (109). El origen de la pluricelularidad seguramente trajo como ventajas a los organismos, el que la maquinaria celular estuviera repetida, lo que haría vivir más al organismo de tal forma que puede dejar mayor descendencia al haber células especializadas dedicadas a una actividad particular de síntesis (110).

De los 45 phyla de Protoctista considerados actualmente (111) los Chytridiomycota son los que más se relacionan con los posibles ancestros de los animales (108). No obstante, al parecer los Karyoblastea representan los eucariontes más primitivos en la actualidad pues poseen núcleo pero no tienen organelos sino bacterias perinucleares esenciales para la obtención de energía. No presentan mitosis pero almacenan glucógeno (108).

Se han postulado varias teorías para el origen de los animales:

La teoría Sincicial considera que un grupo de ciliados multinucleados representa al grupo ancestral que produjo una serie

de membranas que compartimentalizaron el material celular. La teoría se apoya en que algunos ciliados actuales presentan simetría que se puede considerar bilateral y tamaño semejante al de algunos platelmintos. Esta teoría presenta, entre otras objeciones, la falta de celularización en la ontogenia de grupos actuales de invertebrados y el que otros grupos presenten espermatozoides flagelados.

La teoría colonial acepta que un grupo de flagelados colonial originó un grupo multicelular por especialización e interdependencia de algunas células. Las evidencias que presenta son, por ejemplo, el que los metazoarios actuales poseen espermatozoides flagelados y el que grupos como las esponjas tienen células somáticas flageladas. La teoría además acepta que un metazoario ancestral del tipo de los fitoflagelados era de tipo colonial y formaba una esfera hueca que posteriormente dió lugar a un grupo de células flageladas superficiales, en el eje anteroposterior. Esto formaría células somáticas y reproductoras en diferentes sitios del organismo, conformando lo que se ha llamado la *blastea*, que posiblemente está representada ontogénicamente por la blástula embrionaria. La *blastea* pudo invaginarse y dar lugar a una gástrula que es similar en morfología a la de los organismos de los phyla Porifera y Cnidaria. De esta forma, el ancestro conformaba una esfera hueca bilateral que daba origen a una *gastrea* de tipo ovoide y de simetría radial, con las células del exterior flageladas y cumpliendo la función de nutrición y reproducción. Esto formó seguramente un ancestro planuloide similar a la larva plánula actual de los Cnidaria (112, 113) (ver esquema 2).

Recientemente se ha descubierto a *Trichoplax adhaerens*, que es un organismo colocado en el phylum 2 del grupo de los Parazoa (108, 112). Este organismo se considera actualmente el metazoario más primitivo debido a su organización corporal aplanada, a la presencia de dos capas externas, a la presencia de células epiteliales flageladas mezcladas con células estrelladas que semejan un mesénquima y a otras características como son la reproducción asexual por fisión y gemación y la presencia de la cantidad de DNA menor que en cualquier otro metazoario.

Desde la aparición de los primeros eucariontes hace aproximadamente 1400 millones de años (6, 108), la diversidad del mundo vivo se ha incrementado principalmente por fenómenos complejos de recombinación genética. Si hemos de considerar que la Tierra se originó hace unos 4500 millones de años y que los primeros seres vivos del tipo procarionte aparecen probablemente hace unos 3500 millones de años, bastaron sólo unos 1000 millones de años para la aparición de la vida en el planeta. Los primeros eucariontes aparecerían después de 2100 millones de años de evolución procarionte. La aparición de los primeros metazoarios se fecha en aproximadamente 700 millones de años atrás (6, 108, 110). Es interesante notar que en la Tierra pasaron 1000 millones de años, desde su origen, para que se produjeran seres vivos procariontes; a partir de éstos pasaron 2100 millones de años para que aparecieran los eucariontes; la evolución de los eucariontes fue de sólo 700 millones de años para que se originaran los animales pluricelulares. De aquí se observa que, para la aparición de los procariontes en la Tierra pasó relativamente poco tiempo pero para la aparición de los eucariontes tuvieron que pasar más años. Sin embargo, una vez que aparecieron éstos últimos, la diversidad del mundo vivo se incremento muy rápidamente (ver esquema 2).

Los 700 millones de años de evolución animal llevaron a la formación de los 32 phyla actuales y a su gran diversidad (108). Por esto, no es de extrañar que los organismos actuales presenten relaciones filogenéticas que señalen su posible historia evolutiva.

Los organismos utilizados en el presente estudio se relacionan filogenéticamente de acuerdo al esquema 2. Se han ordenado con base en caracteres filogenéticos clásicos como son la embriología, la morfología, la paleontología, etc. Se pretende con este esquema abarcar gran parte de los niveles de organización animal que permitan obtener alguna correlación con los aspectos nucleares estudiados.

Recientemente los estudios bioquímicos y moleculares con enfoque evolutivo nos llevan a pensar que hay rasgos universales en todos los seres vivos. Para su metabolismo, todos obtienen ener-

gía del sol o bien, indirectamente de éste a partir de moléculas alimenticias en forma de ATP. Los sistemas replicativos están basados en moléculas de DNA o RNA (114). Se observa poco cambio bioquímico en cuanto a procesos como la fermentación, la respiración, la fotosíntesis, así como en cuanto a las enzimas que intervienen en estos procesos. Además, se ha llegado a entender que los cambios moleculares ocurren principalmente en las partes que no alteran la función esencial de las moléculas (115-119). De esta manera, los cambios en dichas partes pueden ser útiles para establecer relaciones filogenéticas.

Este tipo de estudios, enfocados principalmente a la obtención de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas han llevado a proponer algún tipo de correlación con los árboles filogenéticos establecidos con base en caracteres tradicionales (115). Sin embargo, en ocasiones se presentan resultados distintos. Trabajando con RNA ribosomal 16S, se ha observado que dentro del grupo de los procariontes se presentan dos grandes grupos que divergen más entre ellos que cada uno con los eucariontes. Las arqueobacterias presentan más rasgos eucariontes que las eubacterias, como son, la presencia del rRNA 16S más parecido al 18S citoplásmico de eucariontes que al 16S bacteriano, la presencia de un citocromo b_6 similar al de retículo endoplásmico y al de la membrana plasmática de eucariontes, la presencia de una proteína tipo histona denominada HTa unida a DNA, con una homología del 89% con la H2A y H3 conformando una estructura de tipo nucleosoma, la presencia de una proteína de tipo actina que es inhibida por citocalasina B y que es reactivada por ATP, presencia de un glucopéptido similar al de la cubierta celular de eucariontes, una ruta para la síntesis de β -carotenoides como la que se presenta en vegetales, intervención de la metionina para el inicio de la síntesis de proteínas, la presencia de una proteína similar a alguna de los ribosomas de eucariontes. Además se ha postulado que las arqueobacterias podrían haber intervenido en la formación del núcleo puesto que éste presenta genes eubacterianos que provendrían de mitocondrias y cloroplastos y algunos genes arqueobacterianos (105, 107).

En estudios similares al presentado aquí, pero trabajando con la colágena desde el punto de vista bioquímico, se ha encontrado que la estructura básica de la molécula, como es por ejemplo, la triple hélice, el contenido de glicina y los pesos moleculares cercanos a 300 000, no cambia en la evolución pero sí en características particulares que posiblemente no alteren su función primordial dentro del tejido conectivo o de la cubierta cuticular. Aún así, se postula que la colágena presenta dos líneas evolutivas: una que formaría las de la cutícula y otra formaría la del tejido conectivo (120). Este tipo de estudios entonces muestra que la molécula se conserva en la evolución en cuanto a función pero no en cuanto a estructura molecular fina.

Estudiando la variación de los pesos moleculares de los rRNAs 18S y 28S entre protostomados y deuterostomados, se ha mostrado que el 18S no varía entre estos grupos y que el 26 S es de menor tamaño en los protostomados (121). Así, los ribosomas de un grupo y otro son diferentes.

El esquema 2 resume lo mencionado anteriormente y trata de integrar el conocimiento filogenético de una manera general, con base en diferentes autores (105, 108, 110, 122-124).

III. MATERIAL Y METODO

III.1 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA SU OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Algunos organismos de los phyla Porifera, Cnidaria, Nemertina, Annelida, Sipunculoidea, Hemichordata y Chordata (phyla A1, A4, A5, A19, A26, A28 y A29 según Margulis y Whittaker (108)) fueron procesados para microscopía electrónica de acuerdo al siguiente procedimiento:

Para el caso de los 6 primeros phyla, se realizaron 4 colectas en la zona arrecifal de la Isla Sacrificios, Veracruz. Para su observación al microscopio electrónico, se procesó la pared corporal de los diferentes animales con el objeto de conservar células de los tejidos epitelial, conjuntivo y muscular. Los cortes fueron fijados durante 2 o 3 horas a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2.5% amortiguado en agua de mar filtrada o en fosfatos 0.16M, pH 7.2. Algunas muestras fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% después del enjuague con amortiguador. Posteriormente todas las muestras fueron colocadas en alcohol etílico al 70% durante 24 horas con el objeto de iniciar la deshidratación y conservar los cortes para su procesamiento posterior en el laboratorio.

La deshidratación se realizó en una serie de alcoholes etílicos graduales de 70%, 80%, 96% y 100%, durante 20 minutos cada uno, a excepción del alcohol de 100%, el cual llevó tres cambios. Algunas muestras fueron deshidratadas comenzando con alcoholes de 30% y 50%. Después de la deshidratación se utilizaron tres cambios, de 20 minutos cada uno, con óxido de propileno como agente intermedio.

La preinclusión se llevó a cabo por el procedimiento rápido para tejidos blandos, es decir, con una mezcla de óxido de propileno-glicideter 100, en proporción 1:1 durante 24 horas a temperatura ambiente. La inclusión se efectuó en una mezcla dura de resina epóxica (glicideter 100) durante 24 horas a 60°C.

Del phylum Chordata se procesaron organismos de los subphyla

Cephalochordata y Vertebrata. De éstos últimos se procesaron peces y anfibios. Los cefalocordados fueron proporcionados por el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. Estos fueron colectados en Bahía de Platanitos, Nayarit y fijados en formol al 10% (formalina) durante una semana. Posteriormente se refijaron en glutaraldehído al 2.5% amortiguado en fosfatos 0.16M, pH 7.2 durante 2 horas. De estos organismos se utilizaron células del intestino y del tejido conjuntivo.

Los peces fueron colectados en una granja de truchas y se procesaron de la misma forma que los cefalocordados, pero no fueron fijados en formol. Se utilizó tejido hepático por su facilidad de trabajo y porque se puede comparar con el núcleo de mamíferos, el cual es bien conocido.

Para el caso de los anfibios, las ranas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. También se utilizó hígado y se procedió igual que en cefalocordados y peces.

Todas las muestras de Chordados fueron deshidratadas e incluidas de acuerdo a lo descrito antes para los invertebrados.

Una vez incluidas las muestras en resina, todas fueron cortadas en un ultramicrotomo MT-1 o MT-2. Los cortes semifinos de aproximadamente 0.5 μm de espesor, fueron teñidos con una solución de azul de toluidina y bórax, ambos al 1%. Una vez localizados los núcleos de las células, se realizaron cortes ultrafinos de 60 a 100 nanómetros de grosor. Estos fueron colocados en rejillas de cobre cubiertas de formvar al 0.3% y contrastadas de acuerdo a la técnica de contraste regresivo preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (3). Se utilizó un contraste con acetato de uranilo al 3% durante 1 a 5 minutos. Posterior al enjuague se aplicó la solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) durante 5 a 22 minutos. Finalmente se utilizó una solución de citrato de plomo al 3% durante 1 a 2 minutos.

Los cortes postfijados con tetraóxido de osmio se contrastaron con la técnica habitual de doble tinción con uranilo-plomo, durante 20 y 10 minutos, respectivamente.

Las electromicrografías fueron tomadas a diferentes aumentos en un microscopio electrónico EM-9 o EM-10, Carl Zeiss, a 60kV. Las fotografías fueron analizadas morfométricamente utilizando vernier y planímetro (125). Los datos se procesaron estadísticamente.

III.2 MORFOMETRÍA

Una vez localizadas las estructuras ribonucleoproteicas intranucleares, se midió el diámetro de los GPC, de su halo circundante considerando la medida desde el borde del mismo halo y se midió también el diámetro de los GIC. La conversión numérica a Angstroms(Å) se efectuó realizando la medida en milímetros y dividiéndola entre el aumento final de la foto. Después este resultado se multiplicó por el factor de conversión (en este caso, para convertir milímetros a Å, es de 10^7). Los datos para los GPC, su halo y para los GIC fueron comparados, en cada caso, por el método del análisis de varianza.

Se midieron también áreas nucleares, nucleolares y cromatínicas utilizando un planímetro. El factor de conversión fue similar al usado en la medición de los diámetros, pero el valor en centímetros cuadrados fué dividido entre el aumento final elevado al cuadrado. Este análisis, debe mencionarse, para el caso de la cromatina, se llevó a cabo sobre los manchones blanqueados por el uso de la técnica de contraste preferencial para RNP.

IV. RESULTADOS

Todos los núcleos observados en el presente estudio tienen varias características ultraestructurales en común con el núcleo celular interfásico estudiado previamente en mamíferos; difieren por lo tanto, de los núcleos de algunos protoctistas ya analizados. Tales características son: a) la presencia de una estructura nucleolar con regiones fibrilares y granulares, aún cuando es evidente que en los invertebrados estudiados en el presente trabajo este organelo es compacto y pequeño; en los vertebrados es de tipo nucleolonemal, b) la presencia de partículas ribonucleoproteicas como fibras y gránulos pericromatinianos (FPC, GPC), fibras y gránulos intercromatinianos (FIC, GIC) y una matriz ribonucleoproteica en el espacio nuclear (Tabla 1).

Los GIC no se presentan en cúmulos en los invertebrados y aparecen individualmente en el espacio intercromatiniano, en medio de una red de RNP; presentan un diámetro característico de entre 200 y 300 Å (Gráfica 3) sin diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados ($p > 0.05$) (Tabla 4). Los GPC oscilan entre 400 y 500 Å de diámetro y tampoco muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p > 0.05$) (Gráfica 1, Tabla 2). El diámetro para el halo de los GPC va de 168 a 209 Å (Gráfica 2) y no muestra diferencias significativas entre los diferentes grupos (Tabla 3).

Con el objeto de correlacionar el tamaño de los diferentes gránulos y del nucleolo con el área nuclear, área nucleolar y área ocupada por cromatina compacta, se realizaron mediciones que permitieron saber que en los diferentes grupos, el área nuclear ocupada por nucleolo es del 2 al 12 % y el área ocupada por cromatina compacta es de un 26 a un 76 % (Tabla 1, Gráficas 4 y 5).

Aún cuando este trabajo se enfoca en el estudio de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares no nucleolares, fué posible observar ciertas características en cuanto a la arquitectura nuclear en general. Estas características son, como se observan por

la técnica convencional de contraste con uranio y plomo y ocasionalmente por la técnica del ácido fosfotúngstico (PTA), la presencia de una doble membrana nuclear conformando la envoltura nuclear la presencia de una lámina densa, muy notoria en esponjas, la presencia de ribosomas unidos a la cara externa de la membrana externa de la envoltura nuclear.

A continuación se describen con más detalle los núcleos de los diferentes organismos. En la Tabla 1 se resumen estos datos.

IV.1 PORIFERA

Presenta nucleolo pequeño y compacto, rodeado de cromatina perinucleolar y compuesto principalmente por estructuras granulares; ocupa un 6% del área nuclear. Las FPC y las FIC están presentes; los GPC presentan un diámetro promedio de $439 \pm 119 \text{ \AA}$ y están rodeados por un halo claro cuyo diámetro promedio es de $199 \pm 53 \text{ \AA}$. Los GIC son de aproximadamente $279 \pm 54 \text{ \AA}$ y se presentan individuales y mezclados con una red ribonucleoproteica que llena el espacio nuclear. El área ocupada por cromatina compacta dentro del núcleo es de un 26%. Se observan ribosomas adosados a la periferia externa de la envoltura nuclear, así como la presencia de una lámina densa adherida a la cara interna de la membrana interna de la envoltura (Figura 1).

IV.2 CNIDARIA

Nucleolo pequeño y compacto, con cromatina perinucleolar y ocupando un 6% del área nuclear. Presenta FPC y FIC. Los GIC, que se encuentran aislados, miden aproximadamente 286 \AA de diámetro y están mezclados con una red de RNP. Los GPC miden $440 \pm 82 \text{ \AA}$ de diámetro y presentan un halo claro circundante de unos $197 \pm 29 \text{ \AA}$ de diámetro. El área ocupada por cromatina compacta es de casi 36% (Figura 2).

IV.3 NEMERTINA

Nucleolo pequeño, compacto y de forma irregular; de estructura granular principalmente, ocupando un 5% del área nuclear. Se

presentan FPC y FIC. Los GPC miden $460 \pm 80 \text{ \AA}$ de diámetro. La talla promedio para el diámetro de los GIC es de $231 \pm 35 \text{ \AA}$; se encuentran mezclados con una red RNP abundante. El área ocupada por cromatina compacta en el núcleo es de un 59%. También se observan grupos grandes de RNP, mezclados con la red RNP (Figura 3).

IV.4 SIPUNCULOIDEA

Presentan nucleolo compacto, pequeño, granular y de forma irregular, ocupando casi el 6% del área nuclear total. También presenta FPC y FIC. Los GPC tienen un diámetro promedio de $450 \pm 73 \text{ \AA}$; el halo claro que los rodea mide aproximadamente $168 \pm 21 \text{ \AA}$ de diámetro. Los GIC se encuentran dispersos e individuales entre una matriz de RNP fibrogranular; su diámetro es de $231 \pm 23 \text{ \AA}$. El área ocupada por cromatina compacta es de aproximadamente un 37%. Igual que en los grupos anteriores, no se observan cuerpos espiralados (figura 4).

IV.5 ANNELIDA

Como en los grupos anteriores, su nucleolo es compacto, pequeño y granular y ocupa aproximadamente un 2% del área nuclear total, es decir, es muy pequeño. Se observa la presencia de FPC y de FIC. No presentan cuerpos espiralados. Los GPC miden $413 \pm 69 \text{ \AA}$ de diámetro promedio; el halo claro que los circunda tiene un diámetro promedio de $209 \pm 56 \text{ \AA}$. La distribución de los GIC es similar a los otros grupos descritos y tienen en promedio un diámetro de $298 \pm 43 \text{ \AA}$. El área ocupada por la cromatina compacta es de aproximadamente un 39% (Figura 5).

IV.6 HEMICHORDATA

Nucleolo pequeño, compacto y de forma regular, redondo. Ocupa un 3% del área nuclear total y tiende a estar desplazado a un costado del núcleo. Con FPC y FIC. Los GPC miden $445 \pm 64 \text{ \AA}$ de diámetro; su halo circundante tiene unos $187 \pm 40 \text{ \AA}$ de diámetro. Los GIC están aislados pero se encuentran asociados a una matriz RNP; presentan un diámetro promedio de $215 \pm 54 \text{ \AA}$. El área nuclear está ocupada por un 76% de cromatina compacta (Figura 6).

IV.7 CHORDATA

IV.7.1 CEPHALOCHORDATA

Nucleolo relativamente grande, de consistencia más laxa que en los grupos anteriores; ocupa un 10% del área nuclear. Con FPC y FIC. Los GPC presentan un diámetro promedio de $393 \pm 32 \text{ \AA}$. El halo que los circunda mide en promedio $192 \pm 45 \text{ \AA}$ de diámetro. Los GIC tienen una distribución similar a la que presentan los grupos anteriores; su diámetro promedio es de $229 \pm 30 \text{ \AA}$. El porcentaje de área nuclear ocupada por cromatina compacta es de un 48% (Figura 7).

IV.7.2 VERTEBRATA

IV.7.2.1 PISCES

En hepatocitos de peces, el nucleolo es grande y de estructura nucleolonemal, rodeado de cromatina compacta perinucleolar; aproximadamente un 12% del área nuclear está ocupada por nucleolo; se observan bien las zonas fibrilar y granular. Se presentan FPC y FIC. Los GPC tienen un diámetro promedio de $428 \pm 78 \text{ \AA}$; el halo que los rodea mide $195 \pm 28 \text{ \AA}$ de diámetro promedio. Los GIC se observan en ocasiones en cúmulos pero su talla individual es de $226 \pm 35 \text{ \AA}$. No se observan cuerpos espiralados pero sí unas estructuras que parecen ser nucleolos pequeños, pues son de naturaleza RNP y tienen cromatina periférica. El área ocupada por cromatina compacta dentro del núcleo es de un 35% (Figura 8).

IV.7.2.2 AMPHIBIA

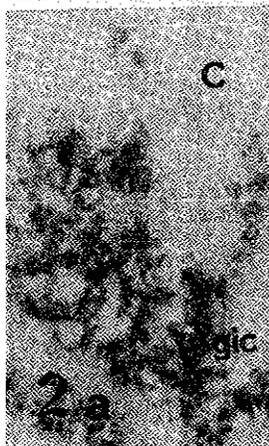
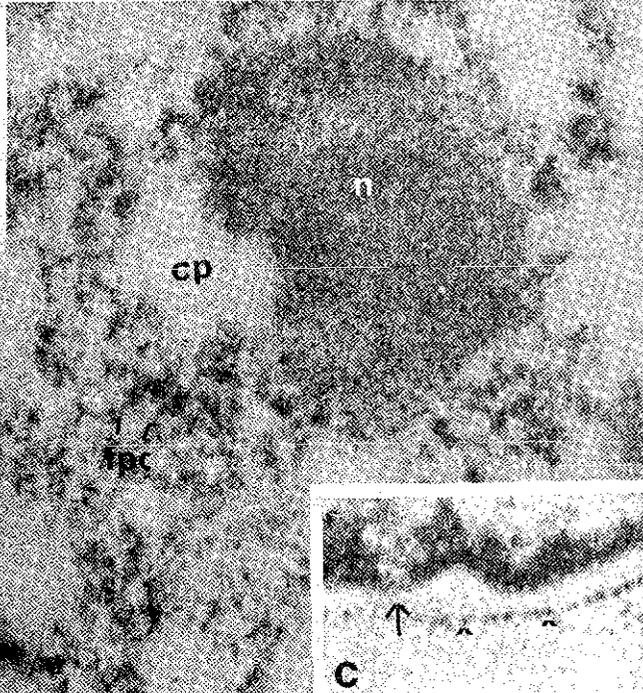
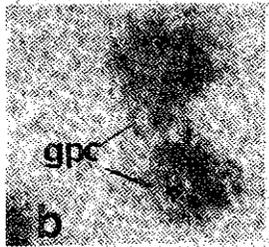
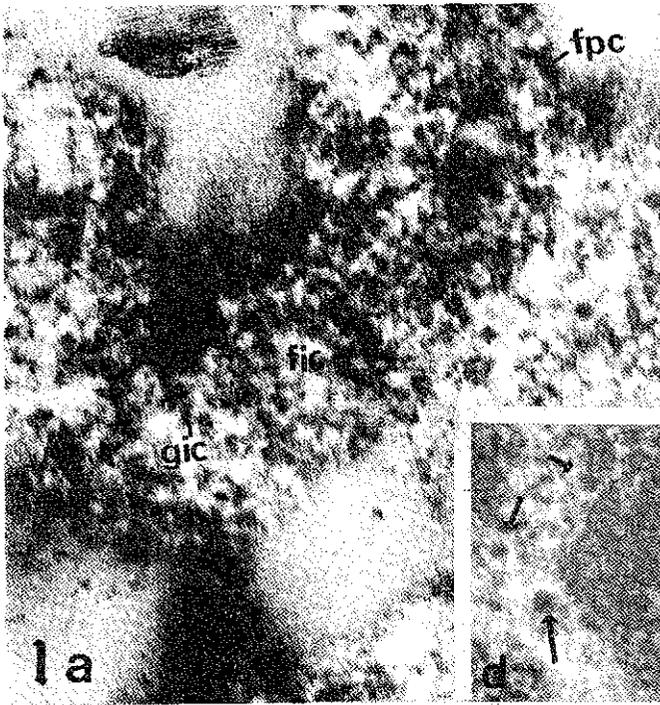
En *Rana*, el nucleolo es similar al de peces y al de mamíferos. Presenta estructura nucleolonemal y regiones fibrilares y granulares; el área ocupada dentro del núcleo es de un 5%. Se observan FPC y FIC. Los GPC tienen un diámetro promedio de $387 \pm 63 \text{ \AA}$ y el halo que los circunda es de $192 \pm 61 \text{ \AA}$. Los GIC aparecen en cúmulos en ocasiones pero su talla individual es de $292 \pm 74 \text{ \AA}$. El área que ocupa la cromatina compacta dentro del núcleo es de un 29% (Figura 9).

Debe mencionarse que ocasionalmente llegan a observarse lo que puede corresponder a cúmulos de GIC en esponjas y nemertinos (Figs. 1,3).

También se debe mencionar la semejanza cualitativa entre los núcleos de los animales estudiados. En particular, los núcleos de los invertebrados se parecen entre sí y los núcleos de las células de los vertebrados son semejantes entre ellos.

FIGURA 1. Núcleo celular interfásico de Porifera (especie sin determinar). En a) se observa el núcleo de una célula disgregada no determinada que ha sido tratada con la técnica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se observa la cromatina blanqueada (c) y ribonucleoproteínas como fibras pericromatinianas, fibras intercromatinianas, gránulos pericromatinianos e intercromatinianos. En b) se observa el nucleolo (n) pequeño y compacto, con cromatina perinucleolar (cp). También se nota lo que parece ser un cúmulo de gránulos intercromatinianos. En c) se observa, con la técnica de doble tinción con uranio y plomo, la envoltura nuclear (flechas) y la lámina densa (cabezas de flecha). En d), también con la técnica de doble tinción, se observan gránulos pericromatinianos con su halo claro alrededor (flechas). a) aprox. 74 000 X; b) aprox. 32 500 X; c) aprox. 88 000 X; d) aprox. 91 000 X. FPC, fibras pericromatinianas, FIC, fibras intercromatinianas, GPC, gránulos pericromatinianos, GIC, gránulos intercromatinianos.

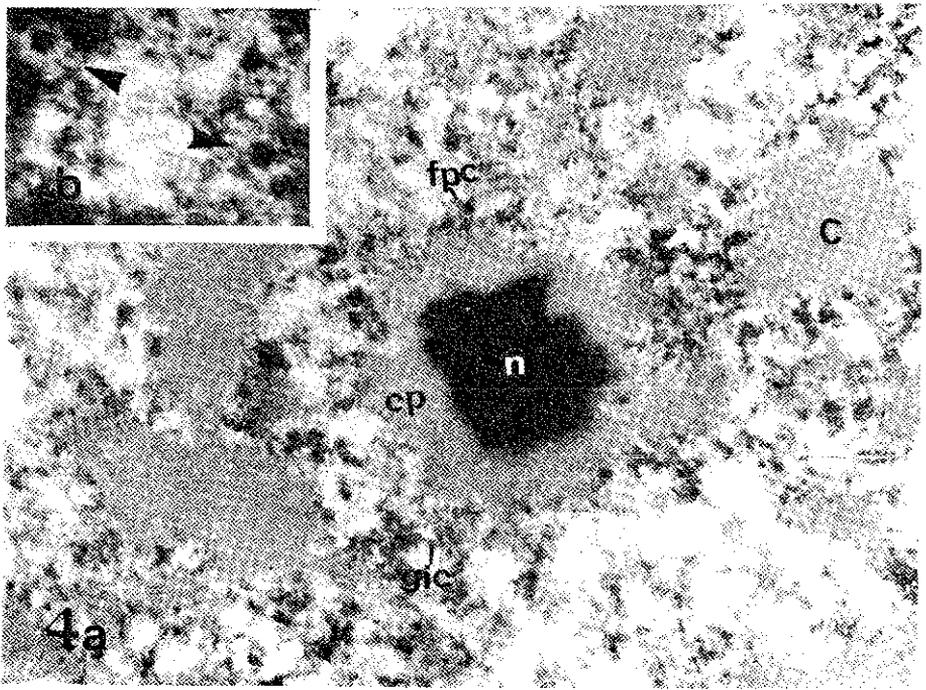
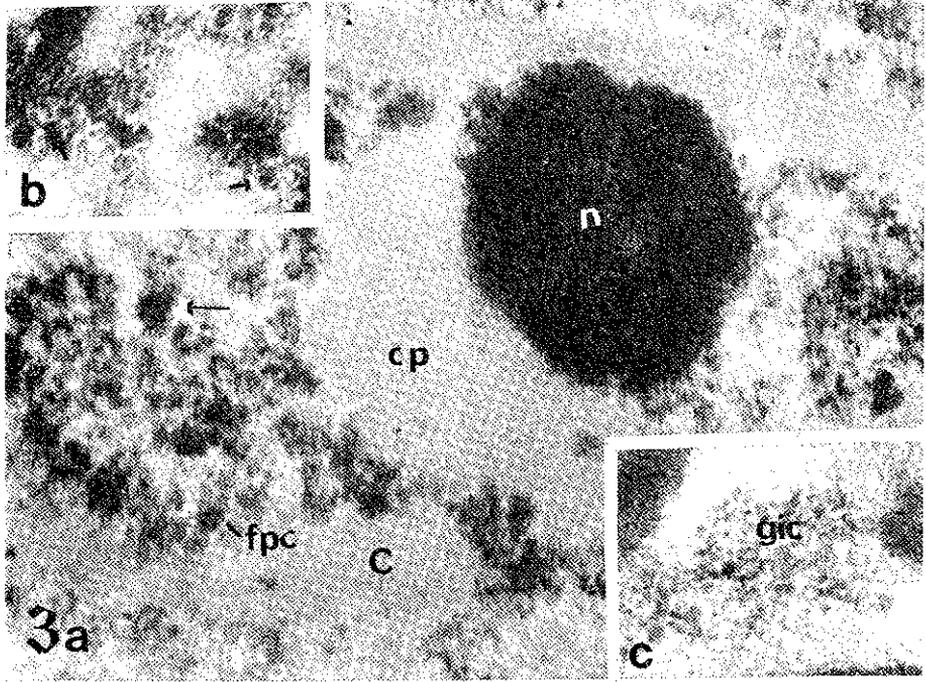
FIGURA 2. Núcleo celular interfásico de una célula intersticial de Cnidaria (especie sin determinar). En a) se observa la cromatina (c) desteñida con la técnica del EDTA. El nucleolo (n) se ve rodeado de cromatina perinucleolar (cp). Se muestra lo que parecen ser GIC. También se aprecian FPC. En b) se ilustra un gran aumento de los GPC. En c) se observa, con la técnica de doble tinción, la envoltura nuclear (flecha) con ribosomas perinucleares (cabezas de flecha); se nota la cisterna perinuclear. a) aprox. 74 000 X, b) aprox. 74 000 X, c) aprox. 88 000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 3. Núcleo celular interfásico de una célula de tejido conjuntivo de Nemertina (*Carinoma* sp.). En a) se nota la cromatina (c) desteñida por el EDTA; FPC, nucleolo (n) pequeño y compacto, rodeado de cromatina perinucleolar (cp) y grumos grandes de RNP (flecha) en el espacio intercromatíniano. En b) se usa la técnica de EDTA para RNP con el objeto de mostrar los GPC y su halo circundante característico (flechas). En c) se observa lo que parece ser un cúmulo de GIC (doble tinción). a) 65 000 X, b) 44 000 X, c) 38 000 X.

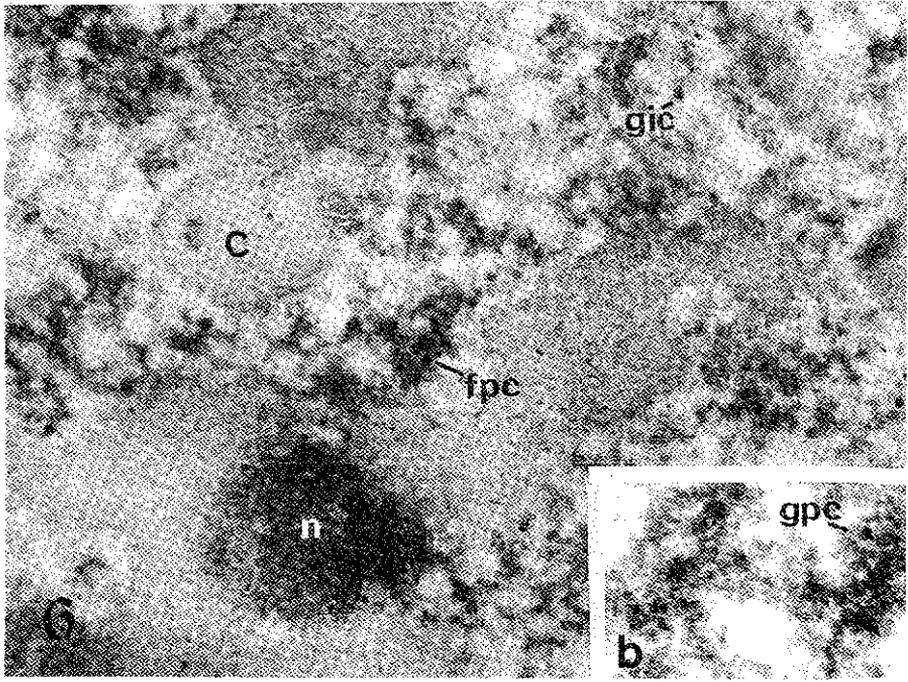
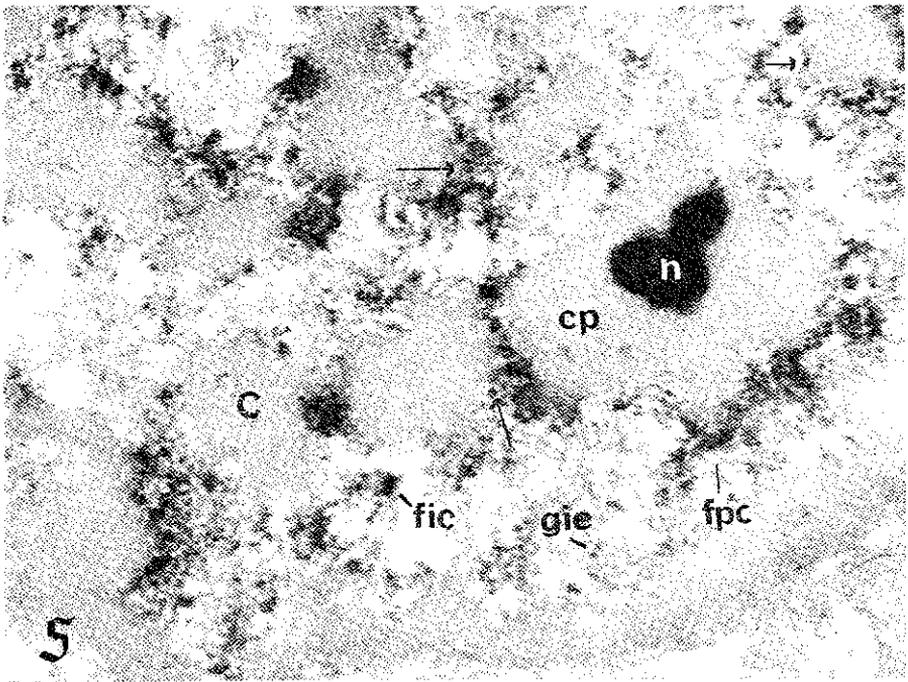
FIGURA 4. Núcleo celular interfásico de una célula del epitelio de recubrimiento de Sipunculoidea (*Phascolosoma antillarum*). En a) se observa, con la técnica del EDTA, la cromatina compacta desteñida (c), FPC y lo que parecen ser GIC dispersos. Se observa el nucleolo (n) como una estructura compacta y pequeña rodeada de cromatina perinucleolar (cp). En b), utilizando la técnica de doble contraste, se notan claramente los GPC rodeados de su halo claro característico (cabezas de flecha). a) aprox. 37 000 X, b) aprox. 70 500 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 5. Núcleo celular interfásico de una célula muscular de Annelida Polichaeta (*Nereis* sp.). Técnica regresiva de contraste preferencial para RNP a base de EDTA. Se nota bien la cromatina compacta desteñida (c), el nucleolo (n) pequeño y compacto con cromatina perinucleolar circundante (cp). Se observan los GPC con su halo claro característico (flechas), FPC en los bordes de la cromatina compacta y lo que parecen representar GIC dispersos. Aprox. 34 000 X.

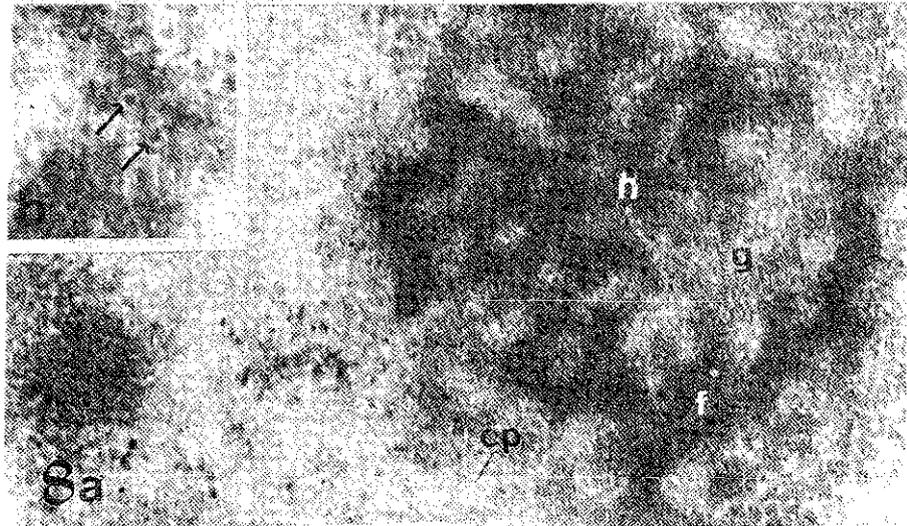
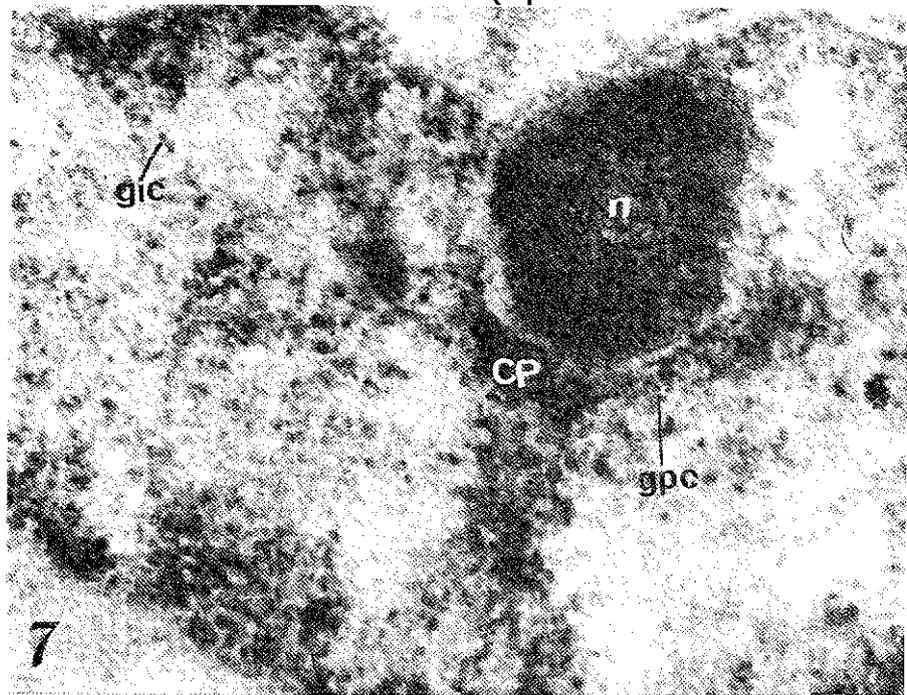
FIGURA 6. Núcleo celular interfásico de una célula epitelial de la pared corporal de recubrimiento de Hemichordata (*Dolichoglossus kowalevsky*). En a) se observa la cromatina desteñida (c), FPC, FIC, lo que parecen ser GIC y nucleolo (n) pequeño. En b) se notan algunos GPC en cortes tratados con la doble tinción de uranio-plomo. a) aprox. 55 000 X, b) aproximadamente 64000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 7. Núcleo celular interfásico de una célula de tejido conjuntivo de Cephalochordata (*Branchiostoma sp.*). La cromatina no ha sido bien desteñida por el método del EDTA, pero se aprecia bien el nucleolo (n), las FPC, las FIC, lo que parecen ser GIC y GPC. También se ve la cromatina perinucleolar (cp). Aprox. 56 500 X.

FIGURA 8. Núcleo celular interfásico de una célula hepática de Písces (*Salmo gairdneri*). El nucleolo (n) presenta una estructura nucleolonemal con fibras gruesas y granos (f y g respectivamente). Es grande y se encuentra rodeado por cromatina perinucleolar (cp). En b) se notan, por la técnica de doble tinción, los GPC con su halo característico (flechas). En c) se observa un fragmento de la doble membrana nuclear (en), con su cisterna perinuclear. También se observa un poro (p). En d) se muestran dos nucleolos pequeños, rodeados de cromatina perinucleolar. a) aproximadamente 21 465 X, b) unos 21 000 X, c) aprox. 46 000 X, d) aprox. 40 000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

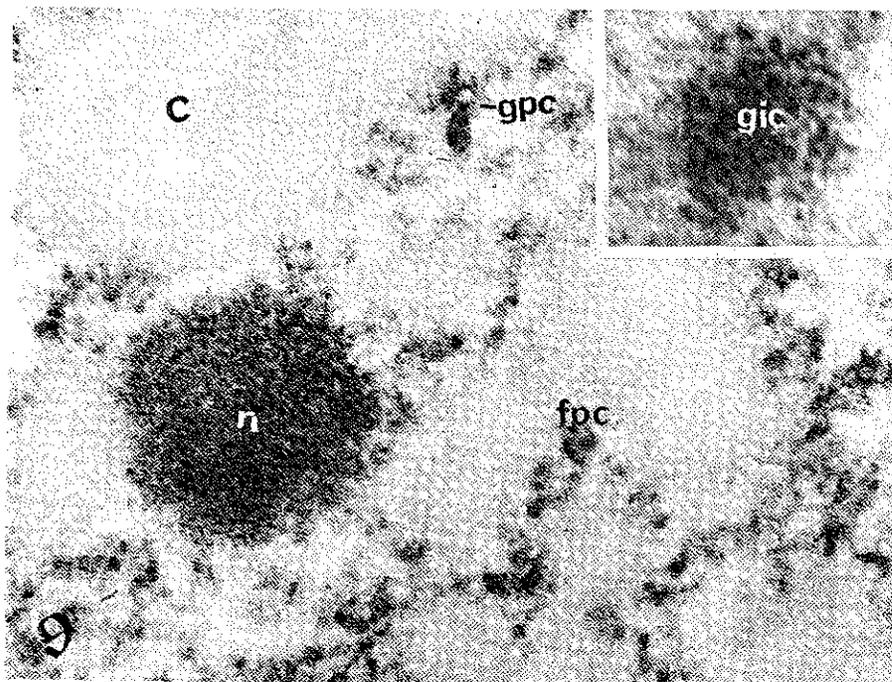


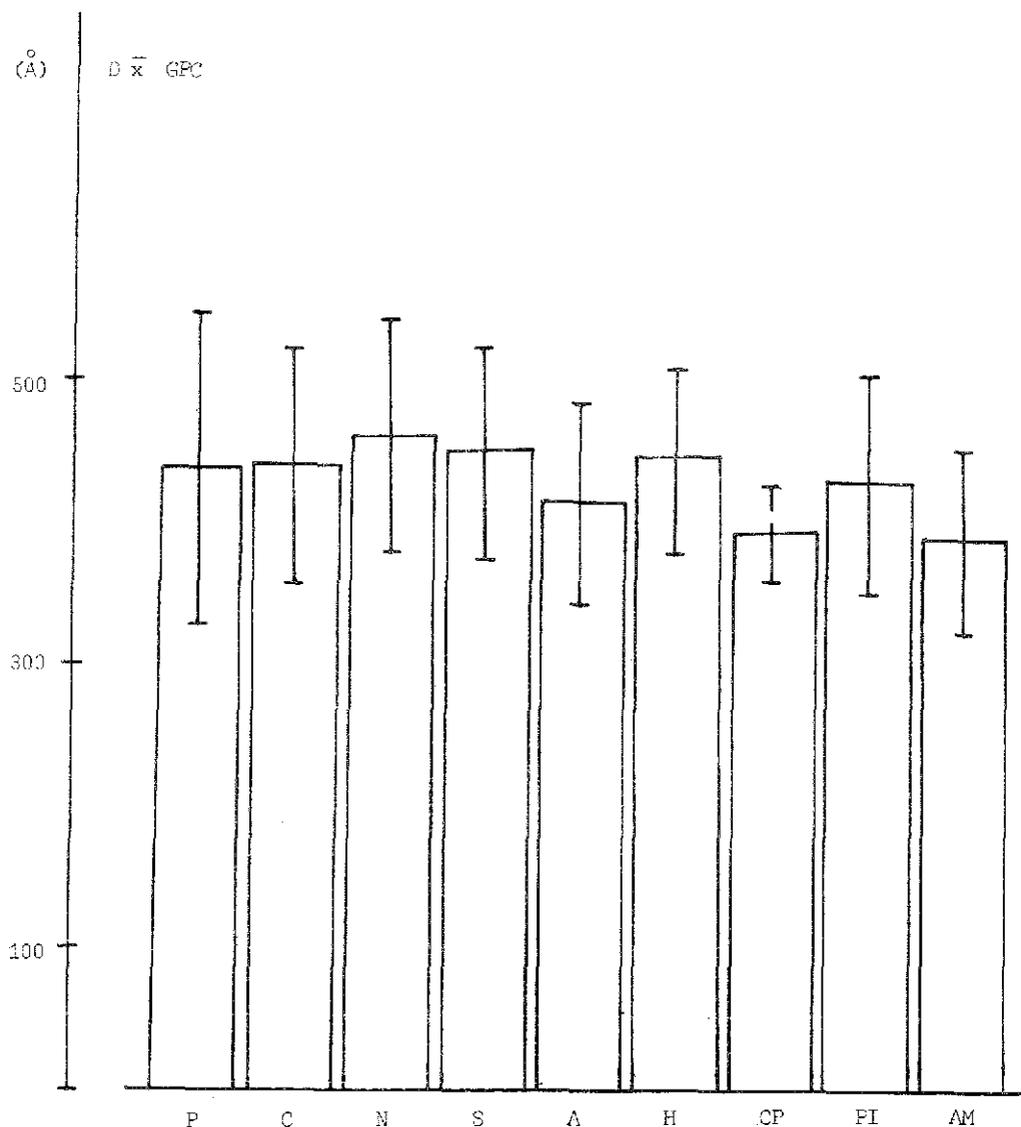
FIGURA 9. Núcleo celular interfásico de hepatocito de *Amphibia (Rana pipiens)*. Contraste con uranio-EDTA-plomo. Se observan GPC y grumos de cromatina compacta (c) desteñidos. En el recuadro se observan GIC en cúmulos. Aprox. 63 500 X, en el recuadro, aprox. 98 000 X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	An/AN \bar{X}	Ac/AN \bar{X}	DGPCs \bar{X} (A)	Dháló GPCs \bar{X} (A)	DGICs \bar{X} (A)	FPCs	FICs	CEs
PORIFERA	0.06 ± 0.02	0.26 ± 0.08	439 ± 119	199 ± 53	279 ± 54	✓	✓	-
CNIDARIA	0.06 ± 0.03	0.36 ± 0.06	440 ± 82	197 ± 29	286 ± 68	✓	✓	-
NEMERTINA	0.05 ± 0.02	0.59 ± 0.16	460 ± 80	190 ± 53	291 ± 35	✓	✓	-
SIPUNCULOIDEA	0.06 ± 0.04	0.37 ± 0.15	450 ± 73	168 ± 21	231 ± 23	✓	✓	-
ANNELIDA	0.02 ± 0.01	0.39 ± 0.06	413 ± 69	209 ± 56	298 ± 43	✓	✓	-
HEMICHORDATA	0.03 ± 0.01	0.76 ± 0.14	445 ± 64	187 ± 40	215 ± 54	✓	✓	-
CHORDATA								
CEPHALOCHORDATA	0.10 ± 0.03	0.48 ± 0.05	393 ± 32	192 ± 45	229 ± 30	✓	✓	-
VERTEBRATA								
PISCES	0.12 ± 0.04	0.35 ± 0.14	428 ± 78	195 ± 28	226 ± 35	✓	✓	-
AMPHIBIA	0.05 ± 0.02	0.29 ± 0.05	387 ± 63	192 ± 61	292 ± 74	✓	✓	-

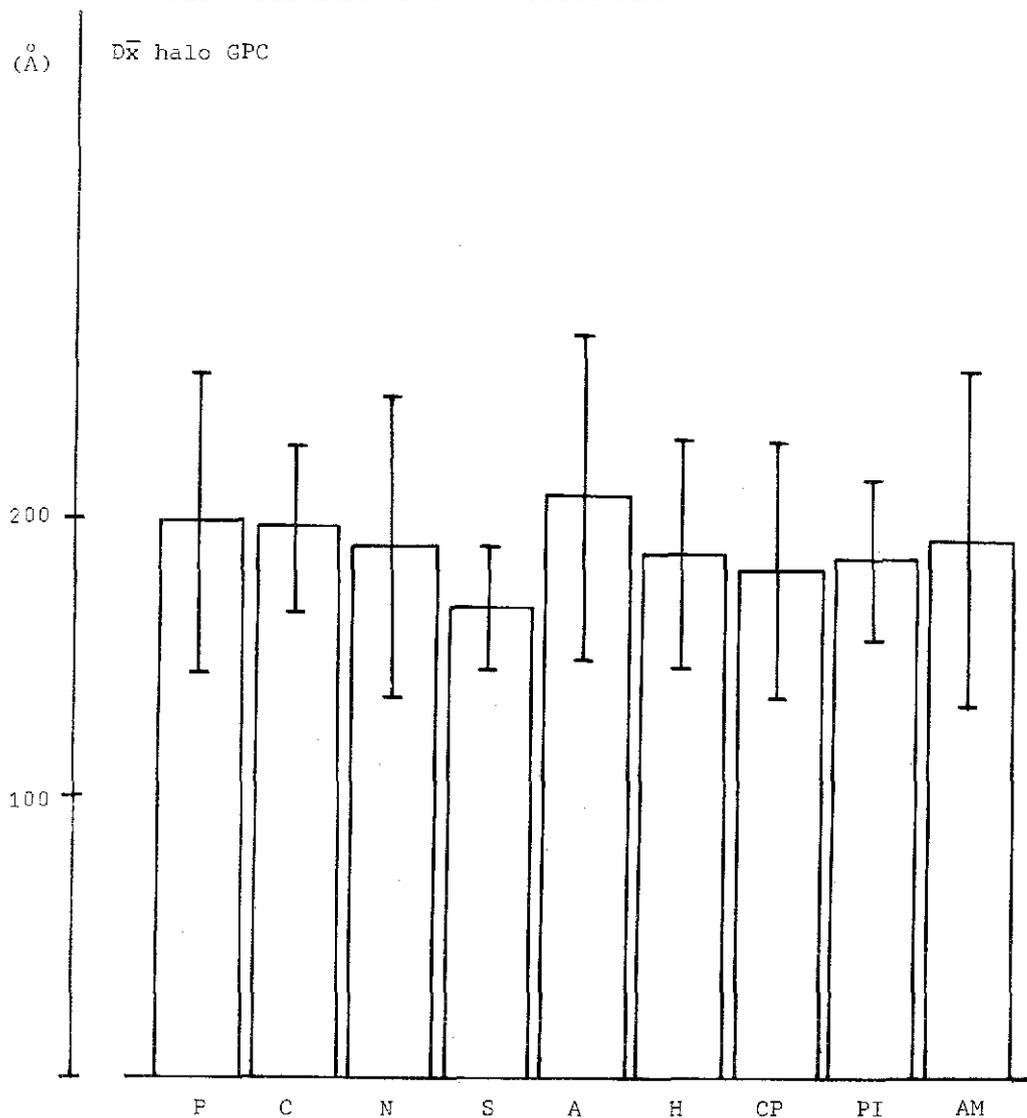
Tabla 1. Características nucleares de los diferentes grupos estudiados. An/AN, fracción del área nuclear ocupada por nucleolo; Ac/AN, fracción del área nuclear ocupada por cromatina compacta; DGPCs, diámetro promedio de los gránulos pericromatinianos; Dháló GPCs, diámetro promedio del halo de los gránulos pericromatinianos; DGICs, diámetro promedio para los gránulos intercromatinianos; (✓), presencia; (-), ausencia; \bar{X} , media. Las medidas corresponden a la media y a la desviación estándar.

DIAMETRO DE LOS GRANULOS PERICROMATINIANOS



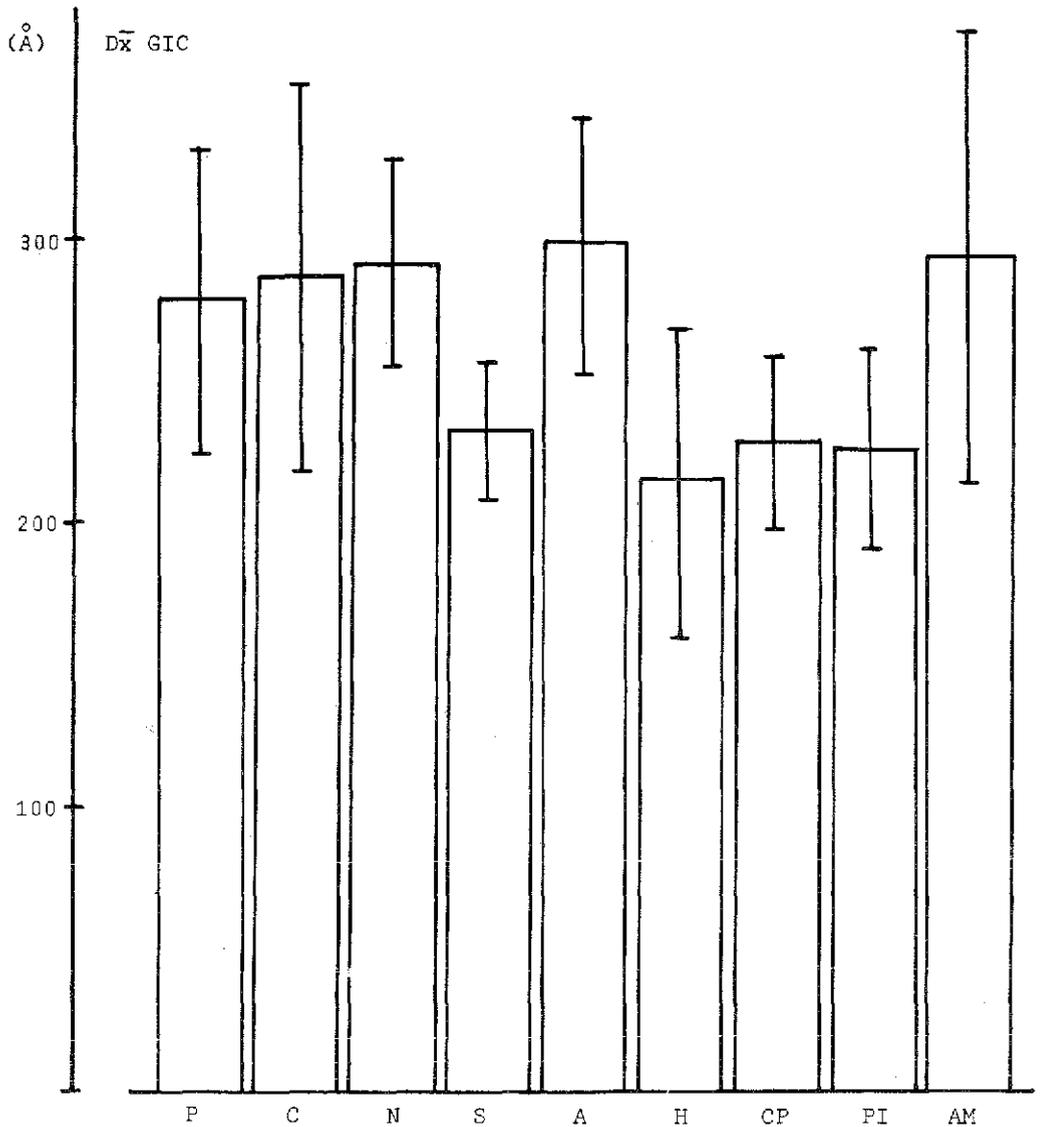
Gráfica 1. Histograma que representa el diámetro medio de los GPC para los distintos grupos de animales estudiados. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$). P, Porifera; C, Cnidaria; N, Nemertina; S, Sipunculoidea, A, Annelida; H, Hemichordata; CP, Cephalochordata; PI, Pisces; AM, Amphibia.

DIAMETRO DEL HALO DE LOS GRANULOS PERICROMATINIANOS



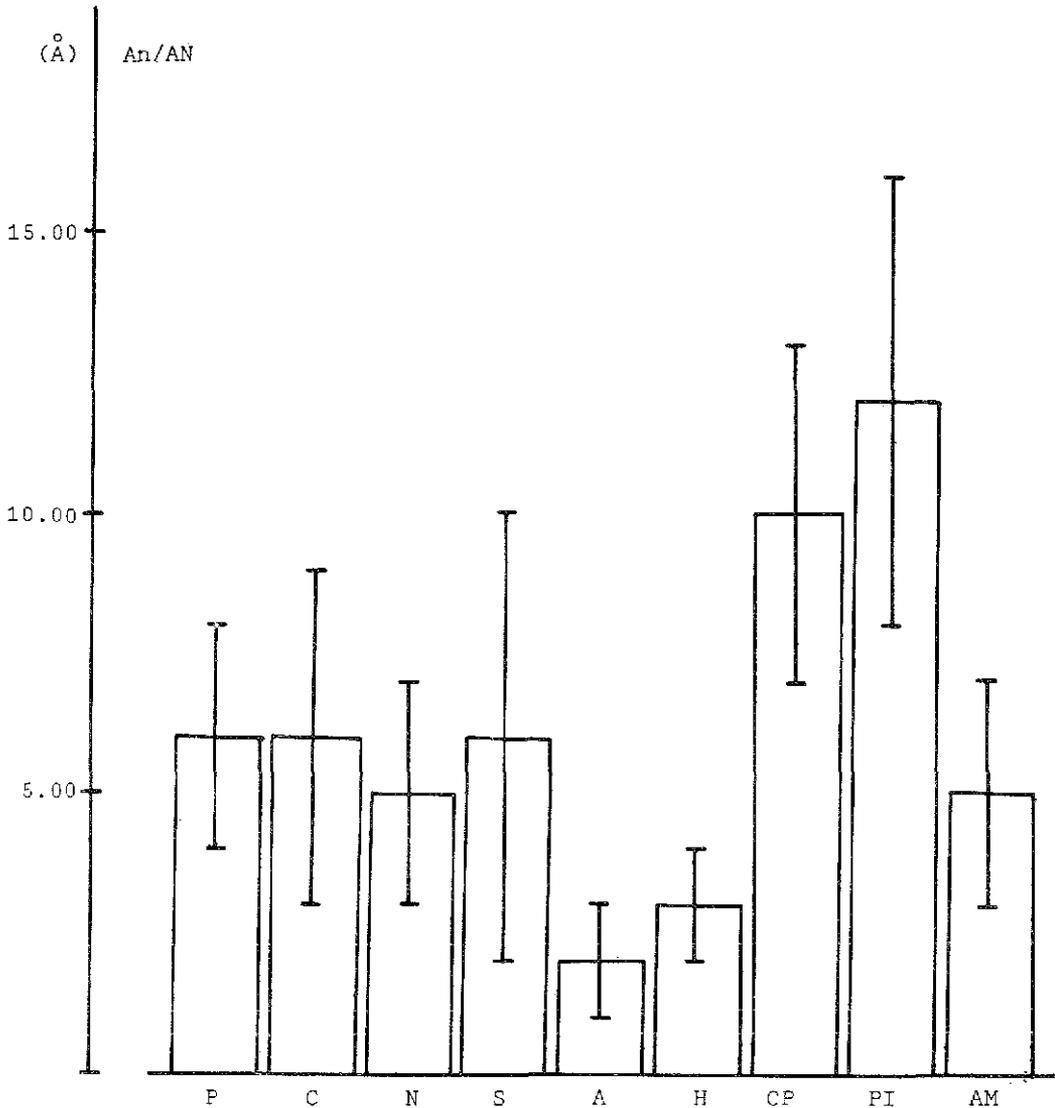
Gráfica 2. Histograma que representa el diámetro medio del halo de los gránulos pericromatinianos en los distintos grupos de animales estudiados. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)

DIAMETRO DE LOS GRANULOS INTERCROMATINIANOS



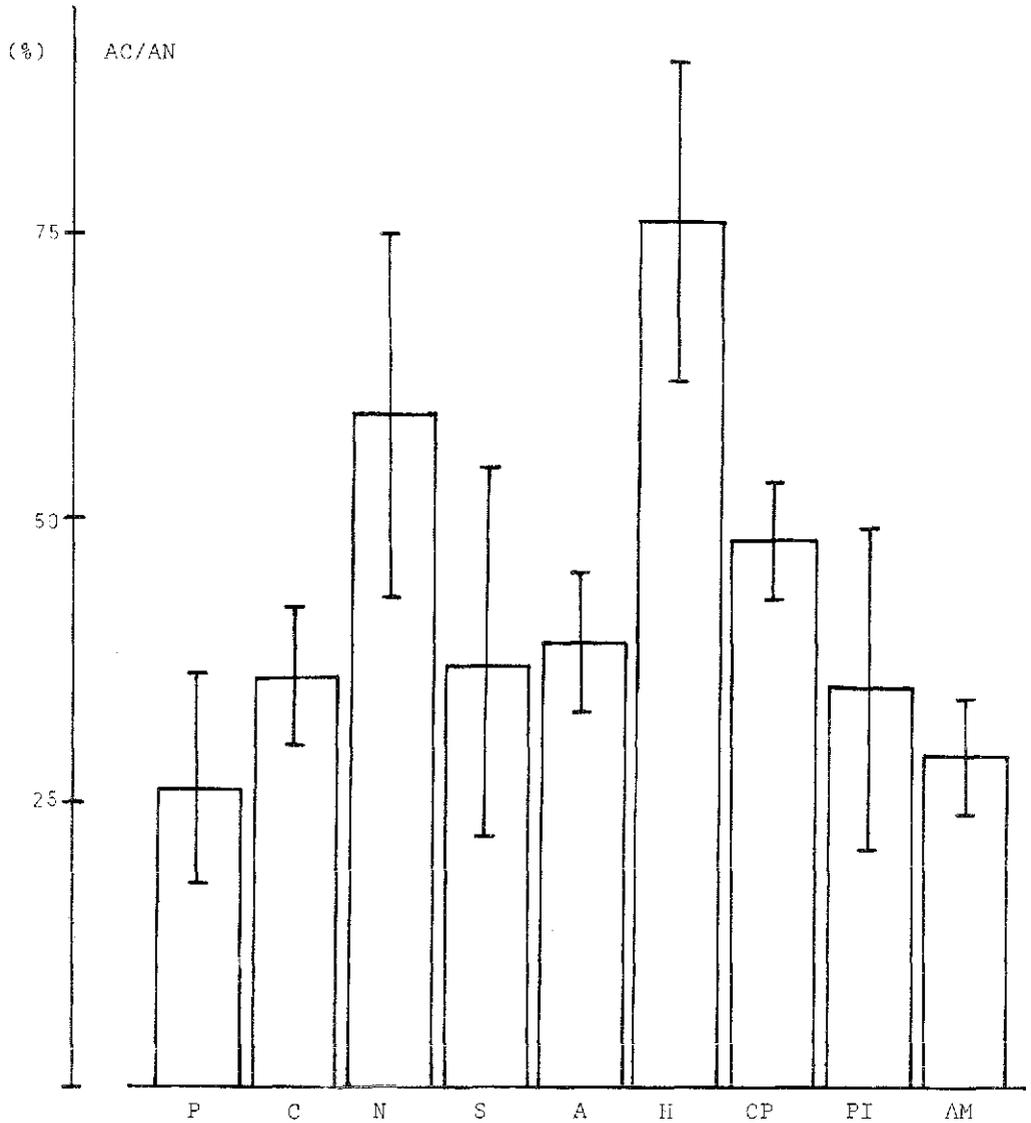
Gráfica 3. Histograma que representa el diámetro medio para los grá nulos intercromatinianos en los diferentes animales estu diados. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$)

FRACCIÓN DEL AREA NUCLEAR OCUPADA POR NUCLEOLO



Gráfica 4. Histograma que representa la fracción del área nuclear ocupada por nucleolo en los distintos grupos de animales estudiados. Ninguno llega a ocupar el 15% del área nuclear total. An, área nucleolar; AN, área nuclear.

FRACCIÓN DEL AREA NUCLEAR OCUPADA POR CROMATINA



Gráfica 5. Histograma que representa la fracción del área nuclear ocupada por cromatina compacta en los diferentes grupos de animales estudiados. En cualquier grupo, el área rebasa el 25% del área nuclear total pero no excede el 80%. AC, área de cromatina compacta.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	Varianza	Razón de Varianzas
Diferentes animales	10511.9	8	1313.9	0.18 ⁻
Error	258268.2	36	7173.9	
Total	268774.1	44		

Tabla 2. Análisis de Varianza para el diámetro de los gránulos pericromatinianos en los diferentes organismos estudiados. No hay diferencias significativas desde el punto de vista biológico ($p > 0.05$).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	Varianza	Razón de Varianzas
Diferentes animales	4911.8	8	613.9	0.45 ⁻
Error	49416.2	36	1372.6	
Total	54328.0	44		

Tabla 3. Análisis de Varianza para el diámetro del halo de los gránulos pericromatinianos en los diferentes animales estudiados. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	Varianza.	Razón de Varianzas
Diferentes animales	47150.8	8	5893.8	1.92 ⁻
Error	110430.4	36	3067.5	
Total	157581.4	44		

Tabla 4. Análisis de Varianza para el diámetro de los gránulos intercromatinianos en los diferentes grupos. No hay diferencias significativas entre GIC individuales o en grupos, en cuanto a su diámetro ($p > 0.05$).

V. DISCUSION

En el presente estudio se muestra que la técnica regresiva de contraste preferencial para RNP es aplicable a múltiples tejidos de invertebrados y vertebrados. Los diferentes tiempos utilizados para blanquear a la cromatina con EDTA seguramente se deben a que los cortes tenían distintos grosores y a las características tisulares de cada organismo, como se ha propuesto (3).

Los resultados del presente trabajo también muestran que, por su ultraestructura, los núcleos celulares interfásicos en los animales son similares. Aunque se ha trabajado con una técnica de contraste preferencial para RNP, es posible detectar la disposición de la cromatina como cúmulos blanqueados. Algunos de los componentes del núcleo, como la envoltura nuclear, la lámina densa y los ribosomas adosados a la cara externa de la envoltura nuclear, fueron visualizados por el uso de la técnica de doble contraste con uranio y plomo. La cromatina en todos los grupos muestra una disposición similar a la de los mamíferos, es decir, formando agregados heterocromatínicos de forma irregular, en ocasiones en contacto con la envoltura nuclear o rodeando al nucleolo. También es común encontrar que este material, denso a los electrones con la técnica de contraste con uranio y plomo, esté ausente en la región del poro.

El nucleolo, a pesar de estar presente en todos los organismos estudiados, no muestra la estructura nucleolonemal típica de los mamíferos, salvo en los otros vertebrados (peces y anfibios). La carencia de esta forma nucleolar en los invertebrados se puede deber a la escasa actividad transcripcional de los núcleos estudiados; esto se puede ver porque el nucleolo ocupa un área muy pequeña dentro del núcleo y por la abundante cantidad de cromatina compacta. Sin embargo, la presencia de nucleolos pequeños y granulares en los diferentes animales se puede deber a que tienen estados metabólicos similares, provocados por el ambiente marino al que están sometidos.

Los GPC y las FPC parecen ser estructuras muy similares en todos los grupos y esto sugiere que en ellos ocurran procesos bioquí-

micos universales en los animales, como son el almacenamiento, transporte y procesamiento de los hnRNA. Cabe mencionar que en los vegetales, un estudio reciente muestra que estas partículas son muy parecidas a las de los animales (datos no mostrados, tesis en preparación). Esto sugiere que la función en la que están involucradas estas estructuras es similar en los eucariontes multicelulares.

Parece que los GIC son poco comunes en los invertebrados, en donde hasta ahora no se ha observado que formen cúmulos. La poca claridad en cuanto a la función de los GIC impide dar por ahora una explicación de su escasez en estos animales. Tal parece, sin embargo, que la presencia de los GIC es indicativa de un procesamiento, almacén y transporte de los RNA ribosomales 28S, 18S y 5.8S (48) y quizá el hecho de no presentarse quiera decir que estos procesos ocurren en proporción tal que no lleguen a formar conglomerados grandes de GIC. Podrían realizarse estudios con inhibidores de la síntesis de hnRNA que provoquen la acumulación de GIC en los invertebrados, como el análogo de la adenina DRB, con el objeto de observar si es que no ocurren normalmente o su ausencia se debe a un tipo de metabolismo especial de las células que no han sido sometidas a condiciones de laboratorio. Esto no parece ser el caso pues recientemente se han observado cúmulos de GIC en el conejo de los volcanes *Romerolagus diazi* silvestre (datos no mostrados, tesis en preparación). También se han visto en células del parénquima clorofiliano de vegetales superiores.

Los cuerpos espiralados son más raros todavía y en el presente trabajo no han sido detectados para alguno de los animales.

La poca frecuencia o ausencia de los GIC y de los CE sugiere la presencia de vías alternas o complementarias para el procesamiento, almacén y transporte de los RNA ribosomales, si es que se prueba el papel de estas estructuras. No se puede descartar la posibilidad de que los GIC y los CE representen una adaptación metabólica intranuclear desconocida o una especialización de tejidos altamente diferenciados en los mamíferos y en las plantas superiores.

Este trabajo nos lleva a la conclusión de que a nivel ultra-

estructural no es posible observar cambios que pudieran indicar relaciones filogenéticas en los animales o que sugieran las causas de la diversidad en el reino animal. Nos lleva en cambio, a postular que a este nivel, los fenómenos relacionados con el procesamiento postranscripcional del RNA mensajero son comunes en los animales. No obstante, bioquímicamente pueden o deben existir diferencias tan marcadas que nos podrían dar algún indicio de cómo ocurre este proceso dentro de las diversas RNP.

Recientemente se han localizado dentro de homogenados de RNP intranucleares, actividades enzimáticas como la de ATPasa, poliadenilasa, metilasa (126). Utilizando inmunocitoquímica se sabe que en el nucleolo hay un tipo de RNA pequeño, el U3-snrRNA. En otras estructuras, como en las FPC y en los GIC se encuentran los U1 y U5 snRNAs y los U1, U2, U4, U5, U6 respectivamente. En los GPC se encuentra el U6-snrRNA. Estos hechos sugieren que en estas partículas ocurren fenómenos que se relacionan con los mecanismos postranscripcionales mencionados anteriormente. No obstante, los estudios no son definitivos y actualmente la investigación se centra en el aislamiento bioquímico y en la localización ultraestructural de las enzimas o factores que intervienen en el "capping", en la poliadenilación y en el "splicing". La posibilidad de conocer los mecanismos enzimáticos de la eliminación de los intrones y de localizar topográficamente cada uno de los procesos que traen consigo modificaciones covalentes postranscripcionales de los RNAs, resulta una perspectiva muy importante a la luz de los procesos evolutivos y de la regulación de la expresión genética en eucariotes.

El comportamiento de las estructuras RNP cuando se aplican drogas y hormonas y que implican cambios reversibles en la transcripción y el comportamiento de las RNP durante la diferenciación celular, fenómeno que implica cambios irreversibles en la transcripción, indica que estas partículas varían cuantitativamente en cuanto a número de las mismas pero no varían cualitativamente de acuerdo al estado metabólico de la célula. Este trabajo sugiere que a lo largo de la evolución animal, el comportamiento ultraestructural de las RNP intranucleares ha sido similar.

La conservación de la estructura descrita en este estudio nos hace pensar que ésta ha sido favorecida por la selección natural como un estado morfológico que es visible por las técnicas de microscopía electrónica. Esto significaría que la estructura nuclear relacionada con los eventos postranscripcionales intranucleares, es similar en los animales.

La morfología nuclear compleja de los mamíferos puede tener muchas causas. Una podría ser quizá explicada por el hecho de que en organismos superiores, el aumento en la talla celular ha significado un aumento en la talla nuclear (127). Esto tal vez trae consigo un aumento en el número o en la heterogeneidad de los procesos de maduración de los RNAs dentro del núcleo.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que el ancestro o ancestros de los animales tuvieron una ultraestructura similar o quizá parecida a la de los organismos actuales. Podría quedar descartada la idea de que esta disposición de componentes intranucleares se deba a la interacción de células a través de uniones comunicantes, fenómeno inherente a la multicelularidad, puesto que el cigoto es producido por dos células con núcleos morfológicamente similares y porque durante la embriogénesis aparecen progresivamente las RNP intranucleares conocidas (41, 128). Además, en algunos miembros del reino Protocista, del tipo unicelular, esta estructura es muy similar (datos no mostrados, tesis en preparación). Es necesario, sin embargo, estudiar más sobre este aspecto. Por ejemplo, se puede estudiar el núcleo celular interfásico en organismos que presenten un grado de organización colonial en donde la interacción celular sea incipiente o de tipo colonial, como en *Volvox* y en *Gonium*. También se hace necesario estudiar los tejidos de organismos que se consideran los eucariontes más primitivos, como *Pelomixa*, o que se consideran los metazoarios más primitivos, como *Trichoplax adhaerens* (108) ya que probablemente sus núcleos presentan rasgos de los eucariontes ancestrales.

La expresión fenotípica del material genético se debe tal vez a la velocidad y a la actividad de síntesis de proteínas y a la forma en como éstas se agnegan extranuclear y extracelularmente, y

a la velocidad de división celular, entre otros factores. En ocasiones una sola mutación puntual produce alteraciones fenotípicas notables. A nivel ultraestructural, dentro del núcleo, no es posible detectar variabilidad sino uniformidad o unidad en los seres vivos. Las causas que hacen que sean diferentes dos núcleos, deben encontrarse en otro nivel de organización más fino, como podría ser la disposición, secuencia o abundancia de las moléculas y de los factores que las afectan.

Los eventos transcripcionales y traduccionales parecen ser universales en cuanto al fenómeno bioquímico que llevan a cabo, pero presentan diferencias marcadas entre procariontes y eucariontes. En los eventos postranscripcionales encontramos este mismo fenómeno.

Los pequeños cambios cuantitativos de la materia, en continuo cambio y movimiento, se traducen en cambios cualitativos manifiestos. Esos cambios cuantitativos posiblemente no alteran en gran medida los procesos y estructuras favorecidas por la evolución. Por ejemplo, aún cuando los GPC son similares en estructura en los animales, se puede pensar que sus componentes moleculares sean diferentes; a pesar de esto, su función debe ser igual. La diversidad molecular encontrada en los seres vivos generalmente implica porciones que no alteran la función primordial de las moléculas.

Los efectos que traen consigo los cambios celulares finos sólo son importantes si se toman en cuenta los posibles efectos que provoca en su ambiente vivo e inanimado. La relación recíproca entre los seres vivos y su ambiente explica, en principio, la concepción evolutiva. Las diferencias moleculares, morfológicas, embriológicas, citológicas, etc., ocurridas en la materia viva y con las cuales se trata de explicar la diversidad fenotípica de los organismos, resulta un problema coyuntural de la Biología y en este estudio se intentaron dar elementos que podrían ayudar a confirmar las concepciones evolutivas basadas en otros caracteres.

La ultraestructura del núcleo no explica los cambios fenotípicos de los organismos. Estos cambios pueden quedar explicados por la asociación de una serie de factores que determinan, en concordancia con el ambiente, cómo ha de ser un ser vivo en su nicho.

Se sugiere, con base en estos datos, que la diversificación del reino animal fue posterior a la aparición del núcleo y logró su máxima complejidad (entendiendo ésto como las diferencias respecto de un ancestro común) en vertebrados.

La diferencia entre protoctistas y animales podría explicarse por los mecanismos de la división celular puesto que mientras que en los primeros son muy heterogéneos, en los segundos se presenta un solo tipo: la ortomitosis.

Lo expuesto anteriormente nos lleva a postular que los componentes moleculares que se ha propuesto que intervienen en los procesos de transporte, almacén y procesamiento de los RNA premensajero y prerribosomal, se asocian en agregados multimoleculares (similar a como lo hacen los ribosomas y otros organelos celulares) con formando partículas ribonucleoproteicas intranucleares que son estructuras constantes y universalmente presentes en los animales. De esta forma, la variabilidad morfofuncional de este reino se propone que ocurre a un nivel supracelular (o al menos supranuclear) y a nivel molecular, es decir, la variabilidad celular se puede producir tanto durante la diferenciación celular como durante las etapas posteriores del desarrollo de los animales, hasta conformar la expresión de un genoma en cierta medida estable en cuanto a su juego genético expresado en etapa adulta.

VI. CONCLUSIONES

- El uso de la técnica de doble contraste con uranio y plomo nos indica que la ultraestructura nuclear general en las células de los animales es similar en todos ellos.
- La técnica regresiva de contraste preferencial para ribonucleoproteínas es aplicable a diversos tejidos de animales invertebrados y vertebrados.
- Todos los organismos de este estudio presentan nucleolo, fibras y gránulos pericromatinianos y fibras y gránulos intercromatinianos.
- En todos los organismos analizados, el diámetro de los gránulos pericromatinianos, del halo que los circunda y el de los gránulos intercromatinianos, es igual al de los mamíferos.
- Las ribonucleoproteínas intranucleares descritas en este trabajo son partículas ultraestructurales universalmente presentes en células de organismos animales.

Por ésto, se postula que:

- En los animales se presenta un patrón ultraestructural común para el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA y del pre-rRNA.

Lo que nos lleva a decir que:

- Se sugiere un ancestro común para la estructura nuclear en el reino animal.

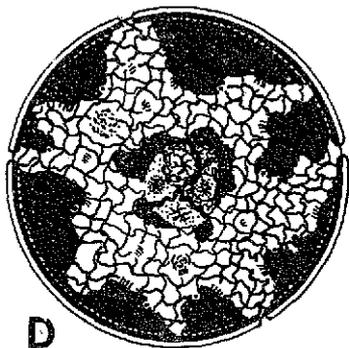
Lo anteriormente expuesto nos permite afirmar que:

- El análisis comparativo de la ultraestructura nuclear, desde el punto de vista ribonucleoproteico, no es un parámetro que nos ayude a esclarecer las posibles relaciones filogenéticas entre los animales.

VII. EPILOGO

El esquema resume las variaciones en la ultraestructura nuclear entre diferentes grupos de organismos animales y protoctistas. A) Núcleo celular interfásico de Euglenophyta (*Euglena gracilis* Z.) en donde se aprecian los cromosomas condensados interconectados por fibrillas de cromatina (c); se observa al núcleo formado por estructuras anulares de donde salen fibras (n). En ocasiones, los cromosomas hacen contacto con el nucleolo mediante una conformación más laxa que incluso entra en el cuerpo nucleolar. La matriz ribonucleoproteica (RNP) intranucleolar es de tipo fibrogranular (m). En el nucleoplasma se notan algunas estructuras RNP como son, una matriz fibrilar difusa (mf), fibras en forma de U y gránulos densos (g) (2). B) Núcleo celular interfásico de Ciliophora (*Remanella multinucleata* Kahl). Se observa al núcleo rodeado por membranas del retículo endoplásmico liso. En el interior del núcleo se nota un nucleolo fibrogranular (n) interrumpido en ocasiones por intersticios (i). También se observa a los cromosomas fragmentados en pequeños cúmulos (c) o conformando manchas oscuras y grandes que son los cromocentros (C). El componente RNP está formado por una matriz difusa de fibras (f). La esfera granular (e) también es visible y no se conoce su naturaleza bioquímica ni su función (129). En C) se muestra el núcleo celular interfásico que resume lo observado en el presente trabajo. Es similar al representado en el esquema 1. Se observan cúmulos de cromatina compacta (c); el nucleolo es granular (n) y está rodeado por cromatina compacta perinucleolar. Se observan fibras y gránulos pericromatinianos así como fibras y gránulos intercromatinianos; éstos se presentan dispersos y aislados. También se observa a la lámina densa y la envoltura nuclear interrumpida por poros. En D) se observa el núcleo celular interfásico de mamíferos, como se describió en el esquema 1.

La diferencia en cuanto a disposición, presencia o ausencia y tamaño de las estructuras entre los diferentes grupos, se aprecia más comparando a los protoctistas con los animales que a los invertebrados con los vertebrados. Entre éstos últimos, las diferencias se pueden deber a la falta de estudios con técnicas complementarias a la del EDTA y a la de uranio-plomo y a la falta de un muestreo en mayor número de tejidos por organismo y mayor número de especies por phylum.

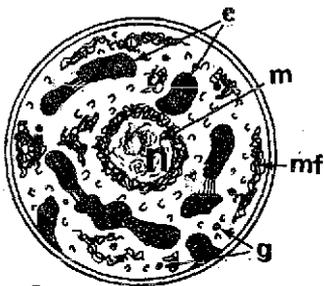


D

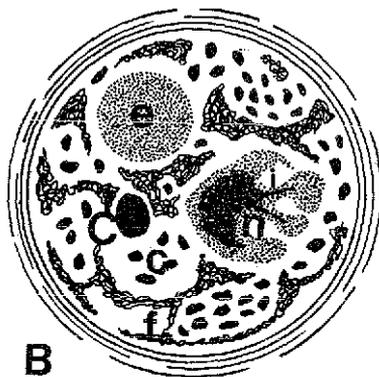


C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A



B

VIII. REFERENCIAS

- 1.- Monneron, A. and W. Bernhard (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res., 27:266-288.
- 2.- Moyne, G., O. Bertaux and E. Puvion (1975). The nucleus of *Euglena*. I. An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis* Z. J. Ultrastruct. Res., 52: 362-376.
- 3.- Bernhard, W. (1969). A new procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., 27: 250-265.
- 4.- Vázquez-Nin, G.H., B. Chávez and M.C. Tomas-Martin (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. J. Microscopie, 16: 243-246.
- 5.- Moyne, G. (1973). Feulgen-derived techniques for electron microscopical cytochemistry of DNA. J. Ultrastruct. Res., 45: 102-123.
- 6.- Vidal, G. (1984). The oldest eukaryote cells. Sci. Am., 250: 32-41.
- 7.- Vázquez-Nin, G.H., O. Echeverría y L.F. Jiménez (1983). Los gránulos pericromatínicos, partículas relacionadas con la expresión genética en eucariontes. Memorias del Primer Simposio-Ciencias, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 8.- Gould, S.J. (1980). Is a new and general theory of evolution emerging? Paleobiology, 6: 119-130.
- 9.- Baker, J.R. (1949). The cell-theory: a restatement, history and critique. Quart. J. micr.Sci., 90: 87-108.
- 10.- Albarracín-Teulón, A. (1983). La teoría celular. Alianza Universidad, México.
- 11.- Tomás-Martin, M.C. (1976). Citoquímica estructural de la cromatina sexual en núcleo interfásico de células animales y vegetales. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 12.- Zavala-Padilla, G. (1980). Cambios de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares de las células epiteliales endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 13.- Molina-Gómez, M.E. (1977). Efectos de los estrógenos sobre la cromatina en el núcleo interfásico de las células endometriales. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.

- 14.- Benítez-Gutiérrez, A.Y. (1982). Cambios en la disposición de la cromatina de los núcleo de las células endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 15.- Jiménez-García, L.F. (1983). Estudio de las variaciones cuantitativas de la cromatina durante la diferenciación y maduración neuronal. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 16.- Barbosa-Salazar, F.R. (1984). Variaciones en el volumen nuclear y nucleolar en células endometriales de rata (*Rattus rattus*) durante los primeros días de la preñez. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.
- 17.- González-Jiménez, M.A. (1985). Estudio morfométrico y citoquímico del núcleo interfásico en células meristemáticas de *Allium cepa*. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- 18.- Hancock, R. and T. Boulikas (1982). Functional organization in the nucleus. Int. Rev. Cytol., 79: 165-213.
- 19.- Lewin, B. (1980). Gene expression 2. 2nd. Ed. Eukaryotic chromosomes. J. Wiley & Sons, New York, 283-958.
- 20.- De Robertis, E.D.P. y E.M.F. De Robertis (1981). Biología Celular y Molecular. El Ateneo, México.
- 21.- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson (1983). Molecular Biology of the cell. Garland, New York.
- 22.- Brachet, J. and A.E. Mirsky (1961). The Cell. Vol. II. Ac. Press, New York, 677-763.
- 23.- Busch, H. Ed. (1983). The Cell Nucleus. Nuclear particles. Vol.I. Ac. Press New York.
- 24.- Watson, M.L. (1962). Observations a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. J. Cell Biol., 14: 162-167.
- 25.- Daskal, Y. (1981). Perichromatin granules. En: The Cell Nucleus, vol.VIII. Acad. Press, Inc., New York, U.S.A. 117-137.
- 26.- Vázquez-Nin, G.H. and W. Bernhard (1971). Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. J. Ultrastruct. Res., 36: 842-859.
- 27.- Moyne, G., R.E.Nash and E. Puvion (1977). Perichromatin granules in isolated hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. J. Micr. Biol. Cell, 30: 5-16.

- 28.-Petrov, P. and L.E. Sekeris (1971). Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation. Exptl. Cell Res., 69: 393-401.
- 29.- Daskal, Y., A. Merski, A.B. Hughes and H. Busch (1975). The effects of cycloheximide on the ultrastructure of rat liver cells. Exptl. Cell Res., 93: 395-401.
- 30.- Daskal, Y., R. Komaromy and H. Busch (1978). Perichromatin granules. Supercoiled juxtachromatin structures containing nucleosomes. J. Cell. Biol., 79: 122.
- 31.- Puvion, E. and M. Lange (1980). Functional significance of perichromatin granules accumulation induced by cadmium chloride in isolated rat liver cells. Exptl. Cell. Res., 128: 47-58.
- 32.- Vázquez-Nin, G.H., O. Echeverría and J. Pedron (1979). Ultrastructural and autoradiographic study of the effects of bleomycin on the interphase nucleus of cultured cells. Cancer Res., 39: 4218-4223.
- 33.- Petrov, P. and W. Bernhard (1971). Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoproteins components of the interphase nucleus. J. Ultrastruct. Res., 35: 385-402.
- 34.- Cervera, J. (1979). Effects of thermic shock on Hep-2 cells. J. Ultrastruct. Res., 66: 182-189.
- 35.- Puvion, E., A. Viron and W. Bernhard (1977). Unusual accumulation of ribonucleoprotein constituents in the nucleus of cultured rat liver cells after hypothermal shock. Biol. Cell., 29: 81-88.
- 36.- Vázquez-Nin, G.H., J.A. Ortega and O.M. Echeverría (1980). Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. Biol. Cell., 39:143-146.
- 37.- Hamilton, T.H. (1968). Control by estrogen of genetic transcription and translation. Science, 161: 649-660.
- 38.- Echeverría, O.M., G.H. Vázquez-Nin and J. Pedron (1980). A rapid method for the isolation and culture of endometrial epithelial cells responsive to estradiol. Acta Anat., 106: 45-56.
- 39.- Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedron (1979). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. Biol. Cell., 35: 221-228.
- 40.- Langman, J. and C. Hadden (1970). Formation and migration of neuroblasts in the spinal cord of the chick embryo. J. Comp. Neurol., 138: 419-432.

- 41.- Vázquez-Niñ, G.H., J.A. Ortega-Rangel, O.M. Echeverría, M.R. Parra and L. F. Jiménez-García (1983). Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. Biol. Cell, 48: 17-24.
- 42.- Heinrich, P.C. and W. Northemann (1981). The structure of ribonucleoprotein particles from rat liver nuclei. Molec. Biol. Rep., 7: 15-24.
- 43.- Fakan, S., E. Puvion and G. Spohr (1976). Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. Exptl. Cell Res., 99: 155-164.
- 44.- Puvion, E. and G. Moyné (1978). Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. Exptl. Cell Res., 115: 79-88.
- 45.- Swift, H. (1963). Cytochemical studies on the nuclear fine structure. Exptl. Cell Res., suppl. 9: 54.
- 46.- Wassef, M. (1979). A cytochemical study of interchromatin granules. J. Ultrastruct. Res., 69: 121-133.
- 47.- Puvion, E. (1982). Presence of RNA in the interchromatin granules of cells treated with dichlorobenzimidazole riboside (DRB). Biol. Cell., 43: 143-150.
- 48.- Puvion, E., A. Viron and X. Xu (1984). High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB-treated cells. Exptl. Cell Res., 152: 357-367.
- 49.- Takeuchi, I.K. and Y.K. Takeuchi (1984). Interchromatin granules in the dividing embryonic ectoderm cells of postimplantation rat embryos. An electron microscopic silver-staining study. J. Electron Microsc., 33: 151-159.
- 50.- Hervas, J.P., J. Villegas, D. Crespo and M. Lafarga (1980). Coiled bodies in supraoptic nuclei of the rat hypothalamus during the postnatal period. AM. J. Anat., 159: 447-454.
- 51.- Lafarga, M., J.P. Hervas, M.C. Santa-Cruz, J. Villegas and D. Crespo (1983). The "accessory body" of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. Anat. Embriol., 166: 19-30.
- 52.- Parra-Luna, M.R. (1983). Efectos de la progesterona sobre algunas estructuras nucleares de células endometriales de rata. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, México.
- 53.- Ghosh, S. (1976). The nucleolar structure. Int. Rev. Cytol., 44: 1-28.
- 54.- Jordan, E.G. (1984). Nucleolar nomenclature. J. Cell Sci., 67: 217-220.

- 55.- Benavente, R., G. Krohne, R. Stick and W.W. Franke (1984). Electron microscopic immunolocalization of a karyoskeletal protein of-molecular weight 145 000 in nucleoli and perinucleolar bodies of *Xenopus laevis*. Exptl. Cell Res., 151: 224-235.
- 56.- Pouchelet, M., E. St-Pierre, V. Bibor-Hardy and R. Simard (1983). Localization of the 70 000 dalton heat-induced protein in the nuclear matrix of BHK cells. Exptl. Cell Res., 149: 451-459.
- 57.- Barrack, E.R. and D.S. Coffey (1982). Biological properties of the nuclear matrix:steroid hormone binding. Recent Progress in Hormone Research, 38: 133-195.
- 58.- Krzyzowska-Gruca, S., A. Zborek and S. Gruca (1983). Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation. Cell Tissue Res., 231: 427-437.
- 59.- Ghosh, S., N. Paweletz and I. Ghosh (1978). Cytological identification and characterization of the nuclear matrix. Exptl. Cell Res., 111: 363-371.
- 60.- Berezney, R. and D.S. Coffey (1977). Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol., 73: 616-637.
- 61.- Capco, D.G., K.M. Wan and S. Penman (1982). The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition. Cell, 29: 847-851.
- 62.- Bremer, J.W., H. Busch and L.C. Yeoman (1981). Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscle actins. Biochem., 20: 2013-2017.
- 63.- Douvas, A.D., C.A. Harrington and J. Bonner (1975). Major non-histone proteins of rat liver chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3902-3906.
- 64.- LeStourgeon, W.M. (1978). The occurrence of contractile proteins in nuclei and their possible functions. En: The Cell Nucleus, Vol. VI, H. Busch(Ed). Acad. Press, New York. 305-326.
- 65.- Fawcett, D.W. (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. Am. J. Anat., 119: 129-146.
- 66.- Stick, R. and H. Schwarz (1983). Disappearance and reformation of the nuclear lamina structure during specific stages of meiosis in oocytes. Cell, 33: 949-958.

- 67.- Kornberg, R.D. and A. Klug (1981). The nucleosome. Sci. Am., 244: 52-64.
- 68.- Felsenfeld, G. (1978). Chromatin. Nature, 271: 115-122.
- 69.- Weisbrod, S. (1982). Active chromatin. Nature, 297: 289-295.
- 70.- Bari Kolata, G. (1981). Genes regulated through chromatin structure. Science, 214: 775-776.
- 71.- Derenzini, M., F. Novello and A. Pession-Brizzi (1978). Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural pattern. Exptl. Cell Res., 112: 443-451.
- 72.- Fakan, S. (1980). Ultrastructural visualization of transcription at the cellular and molecular level. Biol. Cell., 39: 113-116.
- 73.- Villard, D. et S. Fakan (1978). Visualisation des complexes de transcription dans la chromatin et alée de cellules de mamiférés: étude en autoradiographie à haute resolution. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 286: 777-778.
- 74.- Paulson, J.R. and U.K. Laemmli (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. Cell, 12: 817-828.
- 75.- Spector, D.L., W.H. Schrier and H. Busch (1983). Immunoelectron microscopic localization of SnRNPs. Biol. Cell, 49: 1-10.
- 76.- Puvion, E., A. Viron, C. Assens, E.M. Leduc and Ph. Jeanteur (1984). Immunocytochemical identification of nuclear structures containing SnRNPs in isolated rat liver cells. J. Ultrastruct. Res., 87: 180-189.
- 77.- Raj, N.B.K., T.S. Ro-Choi and H. Busch (1975). Nuclear ribonucleoprotein complexes containing U1 and U2 RNA. Biochem., 14: 4380-4385.
- 78.- Apirion, D. and P. Gegenheimer (1984). Molecular biology of RNA processing in prokaryotic cells. En: Processing of RNA, D. Apirion (Ed.). CRC, Florida. 35-63.
- 79.- Lehninger, A. (1975). Biochemistry. Worth Publ., Inc. New York. 1059.
- 80.- Economidis, I. and T. Pederson (1983). *In vitro* assembly of a pre-messenger ribonucleoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 4296-4300.
- 81.- Banerjee, A.K. (1980). 5'-terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. Microbiol. Rev., 44: 175-205.
- 82.- Ishida, T. *et al.* (1983). The stacking interactions in 7-methylguanine-tryptophan systems; a "cap" structure of mRNA and its binding protein. Biochem. Biophys. Res. Comm., 115: 849-854.
- 83.- Villareal, L. and R. Tyler (1983). A splice junction deletion deficient in the transport of RNA does not polyadenylate nuclear RNA. Mol. Cell Biol., 3: 1381-1385.

- 84.- Seryono, B. and J. Greenberg (1981). Proteins associate with poli A and other regions of mRNA and hnRNA molecules as investigated by crosslinking. Cell, 24: 775-783.
- 85.- Jeffery, W. *et al.* (1981). Cytoplasmic processing events in the polyadenylate region of *Physarum* messenger RNA. Molec. Biol. Rep., 7: 63-70.
- 86.- Berget, S. *et al.* (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3171-3175.
- 87.- Chowg, L. *et al.* (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' end of adenovirus 2 messenger RNA. Cell, 12: 1-8.
- 88.- Crick, F.H.C. (1979). Split genes and RNA splicing. Science, 204: 264-271.
- 89.- Abelson, J. (1979). RNA processing and the intervening sequence problem. Ann. Rev. Biochem., 48: 1035-1069.
- 90.- Ley, T. *et al.* (1982). RNA processing errors in patients with β -thalassemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4775-4779.
- 91.- Busch, H. *et al.* (1982). SnRNAs, SnRNPs and RNA processing. Ann. Rev. Biochem., 51: 617-654.
- 92.- Busch, H. *et al.* (1984). SnRNA, nuclear proteins and gene regulation. Third Int. Cong. Cell Biol., Japan. Abstracts.
- 93.- Forbes, D. (1983). SnRNA transcription and ribonucleoprotein assembly: early *Xenopus* development. J. Cell Biol., 97: 62-72.
- 94.- Lacoste-Royal, G. and R. Simard (1983). Localization of small nuclear RNA by EM autoradiography in chinese hamster ovary (CHO) cells. Exptl. Cell Res., 149: 311-323.
- 95.- Lerner, M. *et al.* (1979). Antibodies to snRNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5495-5499.
- 96.- Hernández, N. and W. Keller (1983). Splicing of *in vitro* synthesized messenger RNA precursors in HeLa cells extracts. Cell, 35: 89-99.
- 97.- Kolata, G. (1980). Genes in pieces. Science, 207: 392-393.
- 98.- Ruskiñ, B. *et al.* (1984). *In vitro* splicing of human β -globin pre-mRNA: excision of an intact intron as a novel lariat structure. Third. Int. Cong. Cell Biol., Japan. Abstracts.
- 99.- Sharp, P. *et al.* (1984). Processing of precursors of mRNAs: splicing and polyadenylation. Third Int. Cong. Cell Biol., Japan. Abstracts.

- 100.- Peebles, G. *et al.* (1979). Splicing of yeast tRNA precursors: a two stage reaction. Cell, 18: 27-35.
- 101.- De Robertis, E. and M. Olson (1979). Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes. Nature, 278: 137-143.
- 102.- De Robertis, E. *et al.* (1981). Intranuclear location of the tRNA splicing enzymes. Cell, 23: 89-93.
- 103.- Bachellerie, J. *et al.* (1983). Recognition signals for mouse pre-rRNA processing. A potential role for U3 nucleolar RNA. Molec. Biol. Rep., 9:79-86.
- 104.- Waring, R. *et al.* (1983). Close relationships between certain nuclear and mitochondrial introns. Implications for the mechanism of RNA splicing. J. Mol. Biol., 166: 000-000.
- 105.- Woese, C.R. (1981). Archaeobacteria. Sci. Am., 244: 94-107.
- 106.- McQuade, A.B. (1983). Origins of the nucleate organisms II. BioSystems, 16: 39-55.
- 107.- Gray, M.W. and W.F. Doolittle (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microbiol. Rev., 46: 1-42.
- 108.- Margulis, L. (1981). Symbiosis in cell evolution. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- 109.- Margulis, L. (1971). Symbiosis and evolution. Sci. Am., 225: 48-61.
- 110.- Valentine, J.W. (1978). La evolución de las plantas y los animales pluricelulares. Inv. y Ciencia, No. 26 (noviembre): 77-89.
- 111.- Corliss, J.O. (1984). The kingdom Protista and its 45 phyla. BioSystems, 17: 87-126.
- 112.- Barnes, R.D. (1977). Zoología de los invertebrados. Interamericana. 3a. ed. México.
- 113.- Meglitsch, P.A. (1981). Zoología de Invertebrados. H. Blume Ed. México
- 114.- Piechocki, R. and T. Börner (1981). Die evolutionäre verwandtschaft pro- und eukaryotischer 5S rRNA. Biol. Zbl., 100: 129-153.
- 115.- Dickerson, R.E. (1980). El citocromo c y la evolución del metabolismo energético. Inv. y Ciencia, No. 44 (mayo): 77-88.
- 116.- King, G.A.M. (1984). Evolution of structure in RNA. BioSystems, 16:183-202.
- 117.- Tani, T., N. Watanabe, N. Okada and Y. Oshima (1983). Molecular cloning and characterization of a gene for rat U2 small nuclear RNA. J. Mol. Biol., 168: 579-590.

- 118.- Kumasaki, T., H. Hori and S. Osawa (1983). The nucleotide sequences of 5S rRNAs from two ribbon worms: *Euplectonema gracile* contains two 5S rRNA species differing considerably in their sequences. Nucleic Acids Res., 11: 7141-7144.
- 119.- Dickerson, R.E. (1972). The structure and history of an ancient protein. Sci. Am., 226 (April): 82-95.
- 120.- Torre-Blanco, A. (1982). The collagen of *Cysticercus cellulosae*: a study in the comparative biochemistry of collagen. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Acad. Press Inc, 423-436.
- 121.- Collier, J.R. (1983). The molecular weight of ribosomal ribonucleic acids among the Protostomia. Biol. Bull., 164: 428-432.
- 122.- Whittaker, R.H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. Science, 163: 150-158.
- 123.- Barghoorn, E.S. (1971). The oldest fossils. Sci. Am., 224(5): 30-42.
- 124.- Margulis, L. and K. Schwartz (1982). Five kingdoms, an illustrated guide of the phyla of life in Earth. Freeman Co., San Francisco.
- 125.- Rohr, H.P., G. Bartsch, M. Oberholzer, A. Reith and O. Holliger (1978). Stereology. En: Electron microscopy in human medicine, Vol. I, Johannerer S.V. Ed. McGraw-Hill, London. 285-310.
- 126.- Knowler, J.T. and A.F. Wilks (1980). Ribonucleoprotein particles and the maturation of eukaryote mRNA. TIBS, oct.: 268-281.
- 127.- Nicholas, W.L. (1970). The evolutionary origins of the Acanthocephala. 2nd. Int. Cong. Parasitol.: 84-87.
- 128.- Fakan, S. (1976). Localization of paternal genome in early mouse embryos by electron microscope autoradiography. J. Microscop. B., 27: 19-24.
- 129.- Raikov, I.B. (1979). Fine structure of the nuclear apparatus of *Remanella multinucleata* Kahl (Ciliophora, Gymnostomata). Arch. Protistenk., 121: 1-19.

J161F '83-85

