

00322

207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

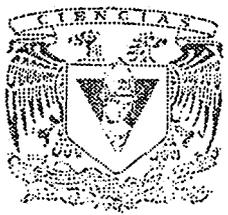
FACULTAD DE CIENCIAS

“El nucléolo de la amiba Entamoeba histolytica”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :

CITLALI VÁZQUEZ ECHEVERRÍA

DIRECTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
2003  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México  
México

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"El nucléolo de la ameba Entamoeba histolytica"

realizado por Citlali Vázquez Echeverría

con número de cuenta 9954920-6, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Acentuamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario

Dr. Adolfo Martínez Palomo

Propietario

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Suplente

Dra. Bibiana Chávez Munguía

Suplente

Dra. Patricia Rivas Manzano

*[Handwritten signatures of the members of the Departmental Council]*

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature]*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO DE  
DE BIOLOGÍA

8

**Le dedico esta tesis a mis padres,  
que son los que me inculcaron el gusto por la vida.**

**Al Laboratorio:  
Gracias a Luis Felipe, Lourdes, Silvia, Guadalupe,  
Rosario y Ernestina por su atención y paciencia.**

**A mi hermana, por enseñarme, cuidarme y quererme.**

*María del Mar*; por la amistad de tantos años  
*Irma*; por salvarme siempre  
*Andrea*; por el básquet, los poemas y el  
pozole  
*Barbara*; por tu confianza y críticas  
*Lore*; por el baile, la ciencia y tus risas  
*Mariana*; por tu apoyo y presencia  
*Marisa*; por anécdotas compartidas  
*Mauricio*; por tu felicidad y tu cariño  
*Ernesto*; por tu amistad  
*Erica y Elaine*; por temas selectos y su  
rebeldía  
*Rich*; por ser tan lindo  
*Erick*; ser buen amigo  
*Alexandra*; tu sonrisa y cariño  
*Daniel*; por tus ojos, tu cariño y Pumas

*Sergio*; por ser como mi hermano  
*Ray*; por tu pasión por vivir  
*Humberto*; por la vida  
*José Manuel*; por la música y Cuba  
*Jesús*; por tu hermandad  
*Jorge Luis*; por escuchar a los demás

*Amanda y Alpha*; por su amor y sacarme de  
mi soledad

*Miguel, Pinky, Hugo, Daniel y Paul*; por que  
siempre seremos la "family"

*Kamaid*; por la magia que hay en tus ojos  
*Pochi*; por compartir tu sonrisa y un poquito  
de Brasil

*Ricard*; por abrir un poquito más mis ojos y  
contarme de Cataluña  
*Alex*; por el gusto de conocer a un ruso tan  
simpático

*Luisra*; por el Caribe  
*Ismael*; por que compartimos el mismo gusto  
por dos países

*Paola*; por tu amistad desde el 1er semestre  
*Elia*; por tu ternura y cariño  
*Liz*; por tu confianza y tiempo  
*Aixel*; por las risas y lágrimas paralelas  
*Carlina*; por tu confianza y ternura  
*Sandra*; por tu felicidad y tu locura  
*Rosa*; por tu complicidad y apoyo  
*Abraham*; por ser tan lindo  
*Fernando*; por estar ahí cuando más te  
necesité  
*Rodrigo*; por tu apoyo  
*Abraham H.*; por estar conmigo en todo  
*Roberto*; por escucharme y alentarme  
*Salvador*; por tu cercanía e incondicionalidad  
*Jorge Moisés*; tus ojos y tu ternura  
*Beto*; por tu altruismo, energía y cariño  
*Bernardo*; por el baile y la soledad  
compartida  
*Angel*; por compartir tu felicidad conmigo

*A mi familia uruguaya que tanto quiero.  
A mi familia mexicana que cada vez somos  
más.*



*Los ideales son como las estrellas, nunca  
podremos alcanzarlos, pero igual que los  
marinos, trazamos nuestro camino guiándonos  
por ellos.*

*Philips Brooks*

**Esta tesis se elaboró en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y en el Laboratorio de Microscopía Confocal, del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM, durante los años 2001-2003 bajo la asesoría de los doctores Luis Felipe Jiménez García, Olga M. Echeverría Martínez y Gerardo Hebert Vázquez Nin.**

## Índice

<b>Resumen</b>	5
<b>Introducción</b>	
* Amiba, <i>Entamoeba histolytica</i>	6
* Ancestría amibiana	9
* Estructura microscópica del trofozoíto	9
● Sistema vacuolar	10
● Otros componentes citoplásmicos	10
* Ciclo de vida	11
● Ciclo mitótico	11
* Genómica	12
* Metabolismo	13
* Composición de membranas	13
* Motilidad	14
* Adhesión	14
* Determinantes bioquímicos de la virulencia	14
* Cultivo	15
* Nucléolo	
* Datos históricos	15
* Estructura nucleolar	16
* Generación de la estructura nucleolar	21
● Ensamblaje	22
● Desensamblaje	23
* Movimiento de proteínas nucleolares	23
● Función de algunas proteínas nucleolares	23
- B23 (Numatrina, NO38, Nucleofosmina)	25
- Nucleolina (C23)	25
- Fibrilarina (B36, NOP1)	26
- RNA Polimerasa I y UBF (upstream binding factor)	26
* Partículas relacionadas con el nucléolo	
● Función de los snoRNAs	27
● Speckles	29
* Pequeños cuerpos nucleares	29
● Cuerpos de Cajal	30
● Cuerpos PML	32
● Dominios OPT (Oct1, PTF transcription)	33
● Compartimiento Perinucleolar (PNC)	33
* Producción de ribosomas	34
* Modulación de la función nucleolar	35
* Regiones del organizador nucleolar	36
* Estructura del nucléolo	36
* Multifuncionalidad del nucléolo	37
<b>Objetivos</b>	39
<b>Metodología</b>	39

❖ <b>Cultivo</b>	<b>39</b>
❖ <b>Fijaciones:</b>	
↓ <i>Glutaraldehído al 2.5 % :</i>	
- Inclusión en Epón (resina epóxica)	40
- Postfijación y primer contraste con tetraóxido de osmio e inclusión en Epón	40
- Tinción con plata amoniaca (AgNOR) antes de la deshidratación, e inclusión en LR White (London Resin White; resina acrílica)	41
↓ <i>Paraformaldehído al 4 % :</i>	
- Inclusión en LR White (resina acrílica)	41
- Inclusión en Lowicryl (resina acrílica)	41
- Inclusión en Parafina	42
<b>Metodología post-inclusión en parafina realizada para la observación en microscopio óptico (fluorescente o campo claro):</b>	
↓ Tinción de DAPI (DNA)	43
↓ Reacción de Feulgen (DNA)	43
↓ Azul de Toluidina Ácido para rRNA	43
↓ Tinción de las regiones del Organizador Nucleolar (AgNOR)	44
❖ <b>Metodología post-inclusión realizada para la observación en el microscopio electrónico de transmisión:</b>	
↓ Tinción para RNPs (EDTA)	44
↓ Tinción para DNA (PTA)	44
↓ Procedimiento con amina de osmio para DNA	45
↓ Inmunolocalizaciones, anti-DNA	45
↓ Tinción general	45
<b>Resultados</b>	
❖ <b>Microscopía óptica:</b>	
↓ Metodologías de tinción de DNA, Feulgen y DAPI	46
↓ Metodologías de tinción de rRNA (Azul de toluidina ácido) y proteínas nucleolares (tinción de plata amoniaca)	47
❖ <b>Microscopía electrónica de transmisión:</b>	
↓ Tinción general de acetato de uranilo y citrato de plomo	48
↓ Contraste preferencial para RNPs (EDTA)	50
↓ Contraste preferencial para DNA (PTA)	50
↓ Contraste específico de DNA (amina de osmio)	50
↓ Inmunolocalización para DNA	52
↓ Contraste específico de proteínas nucleolares (tinción de plata amoniaca)	53
<b>Discusión</b>	<b>55</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>Referencias</b>	<b>60</b>

## Resumen

Los protistas son considerados como ancestrales dentro del grupo de los eucariontes y presentan características únicas que muchas veces no son compartidas ni entre ellos mismos. Este es el caso de la amiba *E. histolytica*, la cual ha sido muy estudiada por ser la responsable de la amibiasis humana. Nuestro interés en ella se debe a que es considerada como ancestral y hasta ahora no se había hecho un estudio en donde se detectara y se describiera específicamente su nucléolo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura nuclear periférica, usando procedimientos citoquímicos, para conocer si este material corresponde a elementos nucleolares, como se sugiere desde 1977, pues existen datos para considerar que el nucléolo pudo haber surgido periféricamente dentro del núcleo en los eucariontes.

Se prepararon trofozoítos de *E. histolytica*, para su observación en microscopía óptica y electrónica. Para el primer caso se hicieron tinciones con azul de toluidina ácida para teñir RNA, Feulgen y DAPI para localizar DNA, y tinción de plata (Goodpasture y Bloom, 1975) para mostrar las regiones del organizador nucleolar. En el segundo caso se siguió la técnica de Bernhard (1969) para visualizar ribonucleoproteínas (RNPs), el procedimiento de Vázquez-Nin y col. (1973) y Cogliati y Gautier (1973; modificada por Vázquez Nin y colaboradores, 1995), para DNA, tinción de plata (Goodpasture y Bloom, 1975) para regiones del organizador nucleolar e inmunolocalizaciones para detectar DNA con anticuerpos secundarios acoplados a partículas de oro de 18 nm de diámetro.

Al interior del núcleo de *E. histolytica*, se observa una tinción homogénea con colorantes para DNA y una tinción periférica intensa con colorantes para RNA e impregnación argéntica para organizador nucleolar. Ultraestructuralmente se observó una región fibrogranular también periférica que fue positiva para ribonucleoproteínas y para la tinción de plata, pero negativa para DNA, con excepción de pequeños grumos.

Los resultados expuestos indican que el material intranuclear periférico de *E. histolytica* corresponde a elementos nucleolares, lo que sugiere que el nucléolo se originó en eucariontes como un compartimiento relacionado con la periferia nuclear.

## Introducción

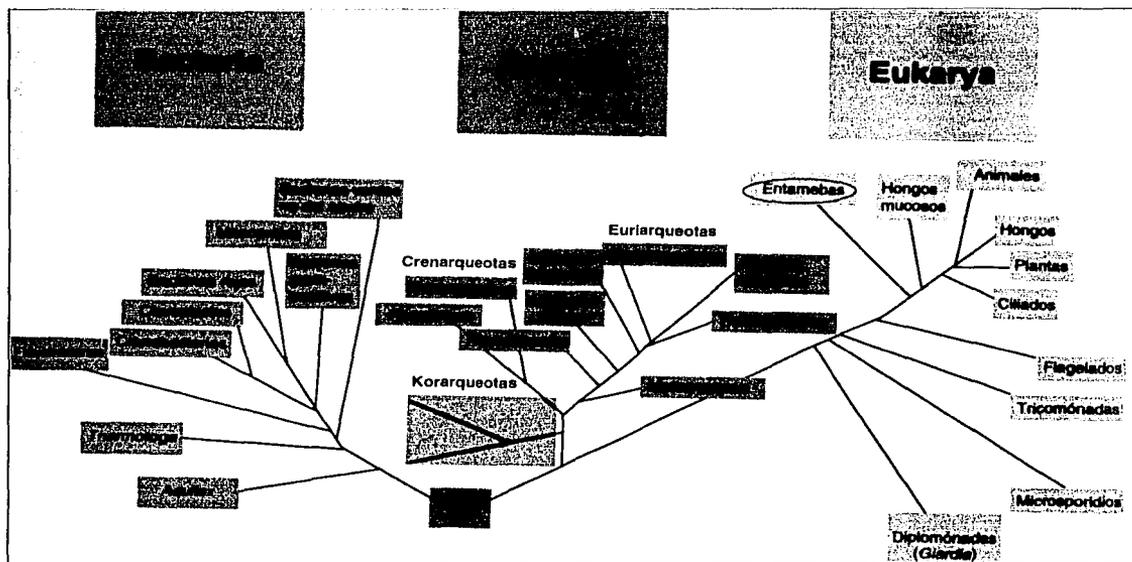
### ❖ Amiba, *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es el protozoo causante de la amibiasis en humanos, pertenece al Phylum Sarcocystophora (Báez-Camargo y col., 1997). Es un organismo aparentemente sencillo cuyo fenotipo corresponde al de un eucarionte primitivo [Esquema 1] (Edlind y col., 1996; Martínez-Palomo, 1989). Carece de organelos como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias (Martínez-Palomo, 1989). Normalmente presenta un solo núcleo cuya membrana no se dispersa durante la mitosis (Injeyan y col., 1979). Estructuras semejantes a cromosomas han sido vistas por diferentes autores, al respecto existe controversia en cuanto al número. Estudios de microscopía óptica reportan de 5 a 6 cromosomas (Solís y Adams, 1997), por microscopía electrónica de transmisión y por electroforesis en gel de pulso de campo (PFGE) oscila el número entre 12 y 16 cromosomas (Orozco y col., 1988; Valdes y col., 1990; Argüello y col., 1992; Flores y col., 1997). El parásito curiosamente presenta DNA circular en el citoplasma, en una estructura llamada EhkO (*E. histolytica* cytoplasmic DNA carrying structure), la cual fue descrita por el grupo de Báez-Camargo y col. en 1997. Flores y colaboradores (1997), observaron que en el núcleo puede presentarse moléculas de DNA lineal, en círculos concatenados y enroscados, todo mezclado en el nucleoplasma. Además se encontró que el tamaño de las moléculas circulares de DNA varía, incluyendo al episoma ribosomal de 25 kb, el cual está presente en más de 200 copias (Lioutas y col., 1995; Dhar y col., 1995; Flores et al., 1997). La arquitectura molecular del gene ribosomal es similar al de otros eucariontes. Las secuencias de rDNA, empiezan con un espaciador transcrito externo de alrededor de 522 nucleótidos, seguido por el rRNA 18S de 1946 nucleótidos, el rRNA 5.8S de 149 nucleótidos y el 28S de cerca de 3466, y están separados por dos espaciadores transcritos internos de aproximadamente 124 nucleótidos cada uno [Esquema 2] (Sehgal y col., 1994; Dhar y col., 1996). Albach et al. en 1977 fueron los primeros en demostrar que la localización del RNA y del DNA durante la interfase ocurre cerca de la membrana nuclear y que el DNA tiene una distribución preferencial en las cercanías del endosoma (estructura central electrónica). Estas observaciones han sido apoyadas por otros autores (Orozco y col., 1988; Argüello y col., 1992; Gómez-Conde y col., 1998), pero Albach et al. (1977) propusieron que el RNA periférico podría corresponder al rRNA. Por otro lado, Huber et al. en 1989

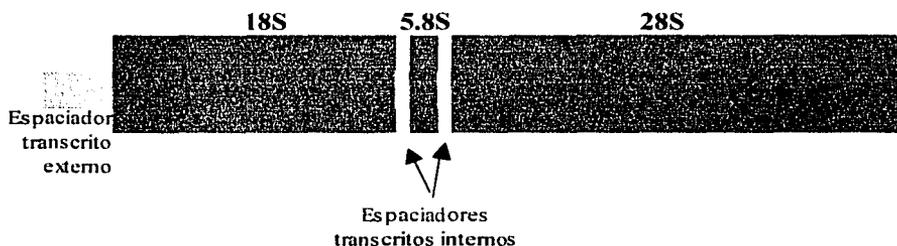
proponen que el DNA condensado en la periferia, podría corresponder al rDNA formado por moléculas de DNA circular extracromosomal.

Existen reportes de esférulas intranucleares periféricas, se cree que aumentan en cantidad durante la división celular, aunque todavía no se conoce su función (Chávez y col., 1972).

Se entiende todavía poco del ciclo celular regulatorio y la transducción de señales en *Entamoeba histolytica* (Ramos y col., 2002). No obstante, algunos factores potenciales de virulencia, como la lectina galactosa-inhibitoria, péptidos formadores de poro y proteasas de cisteína, han sido estudiados en diversas ocasiones (Ramos y col., 2002). Sin embargo, es difícil conocer la función de una proteína bajo patogénesis, sin un sistema genético reversible (Ramos y col., 2002).



Esquema 1. **Árbol filogenético universal** establecido a partir de la secuenciación de rRNA. Tomado de Brock, Madiagn M. T., Martinko J. M., Parker J. (1998). **Biología de los Microorganismos**. 8a edición. Prentice-Hall. Madrid. p. 623, modificado.



Esquema 2. **rDNA de *E. histolytica***. La unidad de transcripción comienza con un espaciador transcrito externo de alrededor de 522 nucleótidos, seguido por el rRNA 18S de 1946 nucleótidos, el rRNA 5.8S de 149 nucleótidos y el 28S de cerca de 3466. Estos segmentos están separados por dos espaciadores transcritos internos de aproximadamente 124 nucleótidos cada uno. Esquema basado en los artículos de Sehgal y col., 1994 y Dhar y col., 1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### ✦ Ancestría amibiana

En la publicación de Jiménez-García y colaboradores de 1989, se llevó a cabo una comparación de estructuras nucleares entre plantas, hongos, animales y protistas. Los resultados obtenidos indican que existe una gran semejanza morfológica de las partículas ribonucleoproteicas y del arreglo de la cromatina, entre los animales, plantas, hongos y algunas clases de protistas, sugiriendo una ancestría común. Pero en el caso del Phylum Sarcomastigophora, son tan importantes las diferencias de las estructuras nucleares entre sus miembros, que se concluye que es un taxón polifilético, como muchos otros autores coinciden. Las diferencias nucleares entre los protistas pueden deberse a su gran antigüedad, si se compara con el grupo de plantas, hongos y animales, sugiriendo divergencias en la organización nuclear del propio reino en épocas tempranas.

En un estudio realizado sobre análisis filogenético de protozoarios mitocondriales, comparando secuencias de  $\beta$ -tubulina por métodos de parsimonia y de matriz de distancia, se tuvieron resultados diferentes a los que se obtienen comparando secuencias de rRNA (Edlind y col., 1996). Lo sorprendente fu que *E. histolytica* resultó estar en la base del árbol evolutivo, siendo que por métodos de rRNA son protozoarios de los géneros *Giardia* y *Trichomonas* los que normalmente ocupan dicho sitio. La explicación ofrecida indica que probablemente las secuencias de tubulina divergieron a una tasa mayor porque la tubulina no es necesaria en esta amiba para la formación del citoesqueleto pero sí para la división nuclear y de los axonemas, por lo que no puede usarse como buen marcador evolutivo. Pero no rechazan las ideas de Margulis (1981), cuando propone el origen de la tubulina así como de la mitocondria por endosimbiosis. Por el contrario, mencionan que es posible que el ancestro de *E. histolytica* adquiriera sus microtúbulos y proteínas asociadas independientemente de otros eucariontes. Lo anterior no descarta que es un organismo ancestral, aunque no pertenezca a la base del árbol filogenético eucarionte.

### ✦ Estructura microscópica del trofozoíto

En el libro de Amibiasis, Martínez Palomo (1989) describe la forma de las amibas de trofozoítos de cepas patógenas, por medio del microscopio electrónico de barrido, como pleomórficas, es decir que cada célula tiene forma distinta, aunque generalmente las amibas fijadas en cultivo son alargadas, con lobopodios y un uroide en la parte posterior. Por el

contrario, las células menos activas tienden a ser esferoidales, carentes de uroides y lobopodios. La zona que participa en la adhesión y en la citólisis, menciona dicho autor, es la superficie basal de los trofozoítos, la cual tiene como única característica peculiar la presencia de filopodios cortos y escasos en su borde externo. Cabe mencionar que el número de especializaciones de la membrana aumenta con la asociación de bacterias.

Sin embargo, los quistes vistos al microscopio electrónico de barrido, aclara Martínez Palomo, son casi siempre esferas de superficie rugosa, de diámetro de entre 8 a 20  $\mu\text{m}$ . En microscopía óptica y electrónica de transmisión se observa que los quistes presentan de uno a cuatro núcleos, dependiendo el estado de maduración, cuerpos cromidiales grandes en el citoplasma y una pared de 125 a 150 nm de grosor, compuesta por elementos fibrilares de 2 a 3 nm de diámetro, que forman una red de varias capas concéntricas (Chávez y col., 1978).

#### ● Sistema vacuolar

Se han identificado varios tipos de vacuolas citoplásmicas en trofozoítos de amiba. Martínez Palomo las define como: vacuolas fagocíticas, de macropinocitosis, de micropinocitosis, lisosomas primarios, lisosomas secundarios, cuerpos residuales y vacuolas autofágicas. Observó además que los lisosomas no tienen enzimas solubles como muchos eucariontes complejos, sino integrales a la membrana. La mayoría de las vacuolas son redondas en cortes transversales y con un diámetro variable de entre 0.5 a 9  $\mu\text{m}$ . Pueden contener fragmentos de almidón y de bacterias si las células provienen de un cultivo mixto, pero si son de heces disintéricas, se ven restos de eritrocitos (Martínez Palomo, 1989).

#### ● Otros componentes citoplásmicos

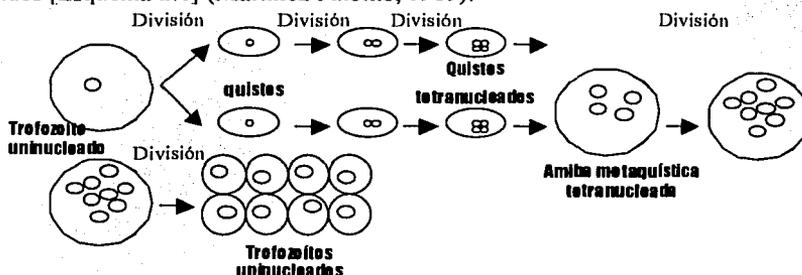
A los ribosomas se les puede ver en cúmulos helicoidales, como bien dice Martínez Palomo, de unos 300 nm de longitud y 40 nm de diámetro, formando los llamados "cuerpos cromidiales", que son inclusiones cristalinas visibles al microscopio de campo claro, presentes tanto en trofozoítos en reposo como en quistes.

La observación por medio de microscopía electrónica de transmisión, revela la presencia de virus filamentosos y poliédricos en el citoplasma de los trofozoítos, así como también inclusiones de naturaleza desconocida, como cuerpos cilíndricos de hasta 250 nm de largo y

90 nm de diámetro. La membrana plasmática tiene alrededor de 10 nm de espesor y una delgada cubierta celular de donde se liberan posibles antígenos solubles (Martínez Palomo, 1989).

### ♣Ciclo de vida

Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria produciendo dos células uninucleadas, que bajo condiciones aún desconocidas pueden enquistarse. En cada quiste ocurren dos divisiones nucleares sucesivas, dando lugar a quistes tetranucleados. Durante el desenquistamiento, de cada quiste surge una sola amiba metaquistica tetranucleada, que después de una división produce ocho trofozoítos uninucleados [Esquema 2.1] (Martínez Palomo, 1989).



Esquema 2.1. Ciclo de vida de *E. histolytica*, basado en el libro: Martínez-Palomo A. (1989). Amibiasis. Médica Panamericana. México. p. 206.

### ●Ciclo mitótico (descrito por Solís y Barrios en 1991)

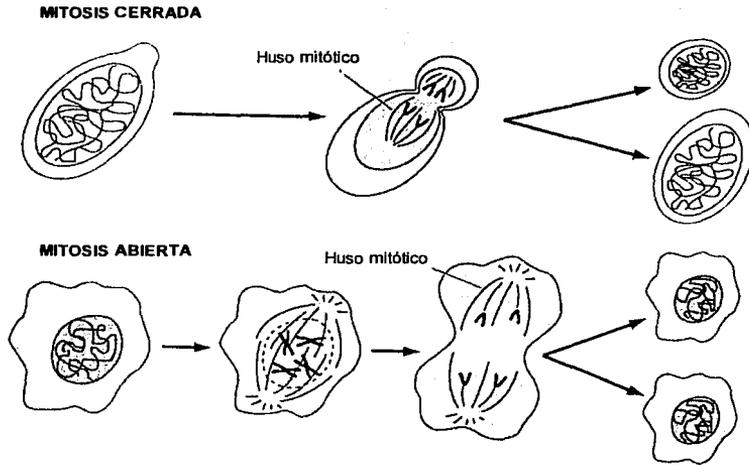
En la **profase**, se lleva a cabo la condensación del material cromático de la periferia del núcleo, aparecen los microtúbulos (MTs) en un arreglo radial unidos a un cuerpo central, el cual pudiera ser el centro organizador de microtúbulos (MTOC).

En **metafase**, el material cromático condensado es llevado al centro del núcleo por los microtúbulos.

En **anafase**, la cual se divide en A y B, los cromosomas son llevados a los polos por el huso mitótico.

Durante la **telofase**, se presenta la cariocinesis y la descondensación del material genético.

La mitosis de *E. histolytica* es identificada como "cerrada", ya que la envoltura nuclear permanece durante todo el evento de división, además es del tipo pleuromitosis, en donde el huso mitótico es bilateral en cualquier etapa mitótica. Muchos protozoarios relacionados con la amiba, como el caso de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria*, llevan a cabo una ortomitosis abierta o cerrada [Esquema 3], presentando un huso mitótico siempre axial (Solís y Barrios, 1991).



Esquema 3. En la **mitosis cerrada**, la envoltura nuclear permanece intacta y los cromosomas migran hacia los polos contrarios, gracias a un huso mitótico. En la **mitosis abierta**, la envoltura nuclear se rompe y se reforma alrededor de los cromosomas migrados hacia los polos. Tomado de Cooper G. M. (2000). *The Cell a Molecular Approach*. 2a ed. ASM Press. Washington. p. 338, modificada.*et*

### ↓ Genómica

El genoma de *Entamoeba histolytica* se caracteriza por el bajo contenido de secuencias intrónicas. A partir de la pequeña lista de genes reportados que contienen intrones, se ha especulado que no más del 3% de los genes de la amiba presentan esta clase de secuencias (Bhattacharya y col., 2000). Debido a que el genoma de la amiba es de tamaño pequeño, se ha sugerido que sus secuencias codificantes están densamente empaquetadas (Bhattacharya y col., 2000). Gracias al análisis de la organización genómica de algunos genes ligados, se vio que los genes son transcritos en la misma dirección y presentan cortas regiones intergénicas, de 0.4 a 2.3 kb (Ramos y col., 2002). Además, se ha observado que los transcritos de dos genes ligados se sobrelapan con una cercanía de 40 pb, mostrando regiones intergénicas no transcritas entre ellos (Ramos y col., 2002).

Se localizaron diferentes genes de la amiba, en sitios de bajo contenido de G+C. Por el contrario, hay muchos codones con tendencia de A/T en la tercera posición, que representan más del 67% (Bhattacharya y col., 2000).

Ramos y col. (2002) demuestran que genes estructurales y de alta expresión están empaquetados, formando agrupaciones de genes, como se ha observado en otros parásitos. Además, las secuencias codificadas en este arreglo genómico son proteínas involucradas en funciones muy conservadas y en procesos celulares, presentando sistemas reguladores equivalentes a los que se encuentran en eucariontes superiores.

### ↓ **Metabolismo**

Los trofozoítos de la amiba son aerobios facultativos, es decir que son capaces de consumir oxígeno a pesar de carecer de mitocondrias y pueden crecer en un ambiente con una concentración de hasta 5% de oxígeno. El intestino grueso tiene una baja tensión de oxígeno, pero al invadir órganos sólidos con una oxigenación abundante, es fundamental que sean capaces de destoxificar los productos de reducción del oxígeno (Martínez Palomo, 1989).

Su principal fuente de energía son los carbohidratos, pero el catabolismo de la glucosa es distinto al de la gran mayoría de los eucariontes, ya que la amiba presenta enzimas glucolíticas inusuales y carece de mitocondrias, de citocromos y del ciclo del ácido cítrico. La glucosa es degradada a piruvato por medio de la vía Embden-Meyerhof. El lactato no es un producto terminal y no parecen tener la enzima lactato deshidrogenasa. El pirofosfato inorgánico no es tampoco un producto terminal sino que lo utilizan como fuente de energía reemplazando al ATP en varias reacciones glucolíticas y los principales productos terminales son el etanol y el bióxido de carbono (Martínez Palomo, 1989).

Por otro lado, en la vía aerobia se transfieren electrones de sustratos reducidos a oxígeno molecular a través de acarreadores sucesivos, como flavinas y hierro, puesto que carecen de catalasas, peroxidasas u otras enzimas que contengan grupos hemo (Martínez Palomo, 1989).

### ↓ **Composición de membranas**

Martínez Palomo explica que en general es distinta la composición lipídica de las membranas de estas amibas, ya que predominan los lípidos que contienen etanolamina sobre los que contienen colina. Se encuentra un fosfolípido poco usual llamado ceramida aminoetil fosfonato (CAEP) y la fosfatidilcolina se encuentra en grandes cantidades. En las

vesículas internas, los niveles de fosfatidilcolina son menores y mayores en la CAEP, a diferencia con la membrana plasmática. Por otro lado, se encuentran carbohidratos en la membrana plasmática, tales como residuos de glucosa y manosa, y 12 péptidos principales que corresponden a glucoproteínas (Martínez Palomo, 1989).

### ✦ **Motilidad**

Los trofozoítos que se encuentran a una temperatura alrededor de 37° C muestran gran actividad, moviéndose en una sola dirección sin que se distinga el ectoplasma ni el endoplasma, a velocidades de 50  $\mu\text{m}$  por segundo (Martínez Palomo, 1989).

Los principales parámetros que modifican la velocidad de desplazamiento y la velocidad de cambio de dirección en el medio de cultivo son el pH, la temperatura, la concentración de cisteína y de bilis (Martínez Palomo, 1989). La principal proteína contráctil, que corresponde a alrededor del 15% de las proteínas amibianas, es la actina.

### ✦ **Adhesión**

Martínez Palomo (1989), explica que los trofozoítos se adhieren a todas las células en cultivo, incluso entre ellas, y a la mayoría de los sustratos, como plástico, vidrio, colágeno y albúmina. Durante la adhesión se concentra un material fibrogranular, probablemente actina, en la región basal, asemejando un estoma fagocítico. Además, el grado de adhesión varía conforme la célula envejece, perdiendo así su adhesividad.

### ✦ **Determinantes bioquímicos de la virulencia**

Se sabe que *E. histolytica* contiene y en ocasiones libera al medio de cultivo proteasas que rodean las células en cultivo, proteínas formadoras de poros que se insertan en membranas naturales y artificiales creando un desequilibrio iónico (Lynch y col., 1982; Young y col., 1982), enzimas que degradan colágeno y oligosacáridos de la matriz extracelular (Muñoz y col., 1984), y neurotransmisores capaces de inducir secreción de agua en el intestino, como serotonina, sustancia P y neurotonina (Martínez Palomo, 1989).

## ✦ Cultivo

Explica Martínez Palomo (1989) que la preservación de estas amibas patógenas se logró gracias a que Diamond diseñó en 1968 un medio de cultivo axénico monofásico llamado TP-S-1, que contiene tripticasa y Panmede-suero. Pasaron 10 años para que Diamond publicara un nuevo medio de cultivo, el TYI-S-33, compuesto por tripticasa, extracto de levaduras, hierro y suero, dando también excelentes resultados, además de que puede ser usado para el cultivo de *Giardia lamblia*. Las amibas pueden crecer en recipientes de vidrio o de plástico, de cierre hermético (para bajar la tensión de oxígeno) llenos casi por completo con su medio, el cual debe contener además agentes reductores como la L-cisteína (ayuda a las células a adherirse al sustrato), y ser mantenidos a una temperatura de entre 35.5 a 37° C (Martínez Palomo, 1989). Las amibas pueden también crecer en suspensión en agar semisólido, método muy útil al querer obtener clonas, según dice Martínez Palomo, el cual debe incluir cisteína, ácido ascórbico, albúmina de suero de bovino y ciertas vitaminas, porque se ha comprobado que son requerimientos indispensables. Pero no se ha logrado que *E. histolytica* se enquiste en ningún tipo de medio axénico. Los que crecen y proliferan son los trofozoitos. La mayoría de las investigaciones realizadas en el mundo con *E. histolytica*, incluyendo la presente, provienen de una cepa aislada por de la Torre en 1971 de un caso de disentería amibiana en México, llamada HM1:IMSS.

## ✦ Nucléolo

### ✦ Datos históricos

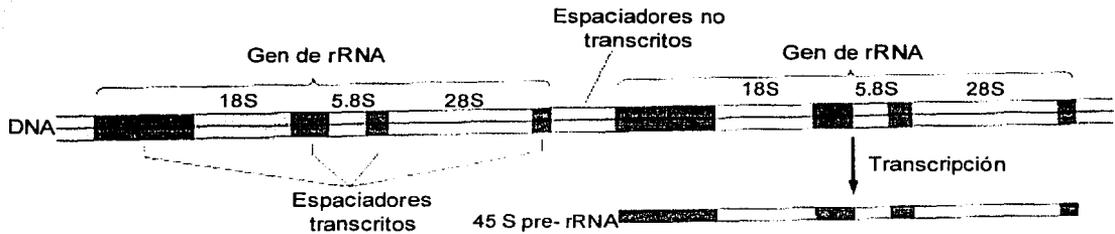
Debido a que en la mayoría de las células el nucléolo es denso y visible con microscopía óptica, fue una de las primeras estructuras subcelulares descritas. Ocupa una porción grande en el núcleo, pero su tamaño y cantidad varía mucho dependiendo de la especie, tipo celular y estado fisiológico. Rodffredi en 1775 publicó la existencia de “manchas” dentro de los núcleos, y más tarde, en 1781, Fontana describe al núcleo como un cuerpo oviforme y al nucléolo como una “mancha” central. Por su parte, Brown en 1833 se refiere a él como una areola hasta que Valentin en 1836 introdujo el término de nucléolo (nuececilla), aunque posteriormente se le asignaron otros nombres como “Kernchen”, por Schleiden, y “Kernkörperchen”, por Schwann, que quedaron en desuso (Jiménez-García, 1988).

Entrado el siglo veinte, Heitz y McClintock observaron que el nucléolo se forma a partir de un segmento específico cromosomal, al que le dieron el nombre de región del organizador nucleolar o NOR (Echeverría y Ontiveros, 2001). En los años cuarentas los citoquímicos Casperson y Brachet demostraron que el nucléolo contiene RNA y proteínas (Echeverría y Ontiveros, 2001). En los años sesenta se determinó que era una “maquinaria de ribosomas”. En los años noventa se consideró como plurifuncional porque se vio que participaba en la biosíntesis y procesamiento de componentes del RNA y de complejos ribonucleoproteicos. En el nuevo milenio se vio que el nucléolo además conserva proteínas reguladoras del ciclo celular, evitando que lleguen a su sustrato fuera de tiempo (Visintin y Amon, 2000).

### ✦ Estructura nucleolar

La estructura más prominente en el núcleo de eucariontes es generalmente el nucléolo, lugar de transcripción y procesamiento del RNA ribosomal, así como del ensamble de las subunidades del ribosoma. Las células requieren de grandes cantidades de ribosomas para satisfacer sus requerimientos de síntesis de proteínas, por lo tanto, el volumen del nucléolo está relacionado con la actividad celular (Cooper, 2000).

El nucléolo se organiza alrededor de las regiones cromosomales que contienen los genes del RNA ribosomal 5.8S, 18S y 28S, lugar conocido como regiones del organizador nucleolar. Estos genes están arreglados en “tandem” (en largas cadenas unos atrás de los otros) y separados por espaciadores no transcritos de DNA. Los ribosomas eucarióticos contienen cuatro tipos de RNA: el 5S, 5.8S, 18S y 28S. Los tres últimos se transcriben en el nucléolo como una sola unidad por la RNA Polimerasa I, formando el precursor del RNA ribosomal 45S, lo que corresponde a cuatro espaciadores transcritos (dos externos y dos internos) con las secuencias para los rRNAs 18S, 5.8S y 28S intercaladas [Esquema 4] (Cooper, 2000).



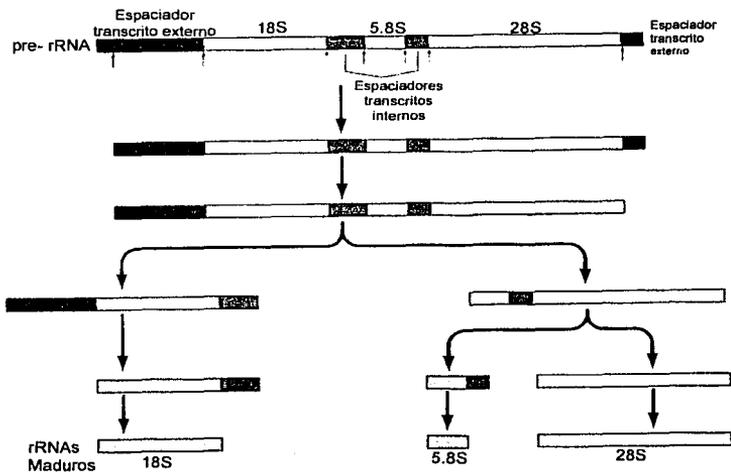
Esquema 4. Cada **gen de rRNA** es una unidad de transcripción conteniendo los rRNAs 18S, 5.8S, 28S y las secuencias de los espaciadores transcritos. Los genes ribosomales están organizados unos atrás de los otros, separados por espaciadores no transcritos de DNA. Tomado de Cooper G. M. (2000). *The Cell a Molecular Approach*. 2a ed. ASM Press. Washington. p. 333, modificado.

El procesamiento del pre-rRNA 45S consiste en cortes sucesivos para dar lugar a las formas de rRNA maduras [Esquema 5] (Cooper, 2000).

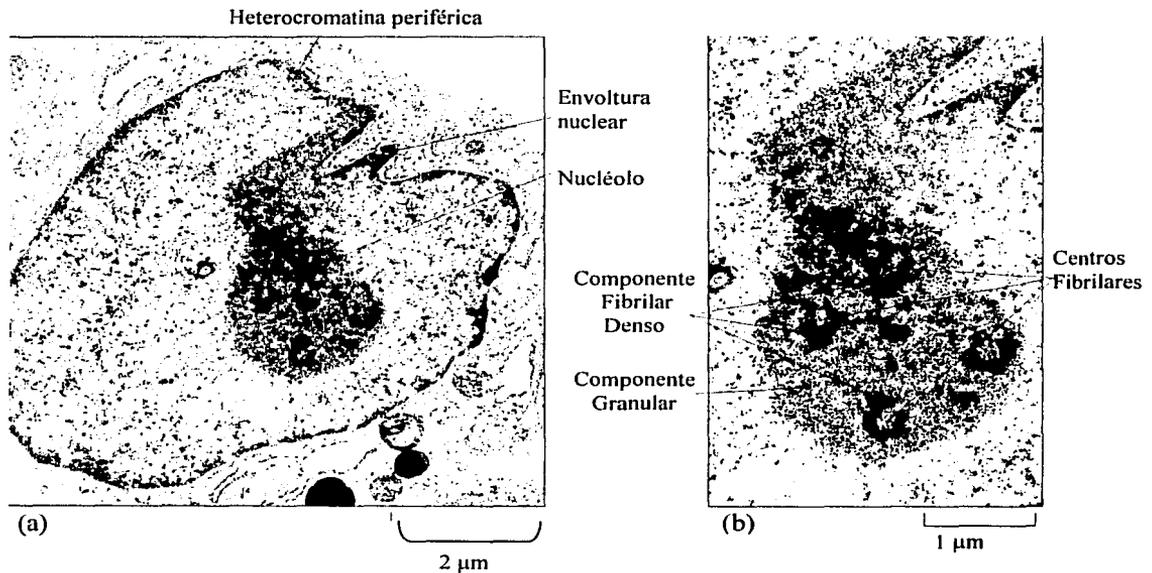
La transcripción del rRNA 5S se lleva a cabo fuera del nucléolo, en un cromosoma distinto al de los otros rRNA. En humanos se encuentra en múltiples copias cerca del telómero del brazo largo del cromosoma 1. Dicha transcripción es catalizada por la RNA Polimerasa III (Cooper, 2000).

En el nucléolo se distinguen tres regiones morfológicas distintas: los centros fibrilares, el componente fibrilar denso y el componente granular [Esquema 6a, 6b y 6c] (Alberts y col., 2002). Se piensa que corresponden a sitios de estados progresivos de transcripción y procesamiento de rRNA y de ensamblaje del ribosoma (Cooper, 2000).

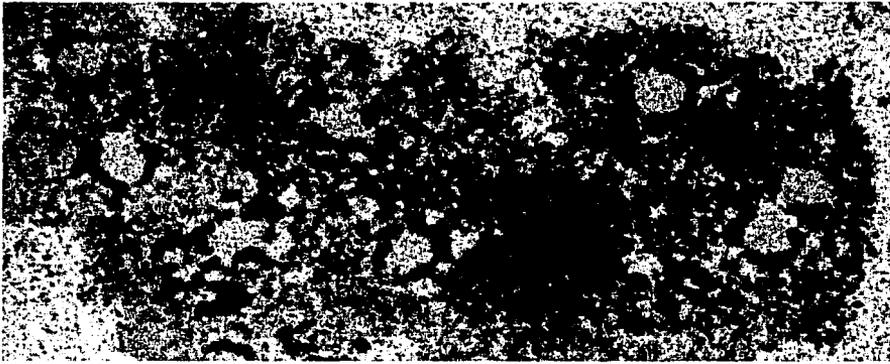
Los genes del rRNA se localizan en el componente fibrilar denso y la transcripción se lleva a cabo ahí mismo, aunque puede extenderse a la vecindad con los centros fibrilares dependiendo del tipo de célula y su estado fisiológico (Jiménez-García y col., 1993). El procesamiento temprano del pre-rRNA es iniciado en el componente fibrilar denso y continúa en el componente granular, donde el rRNA es unido a proteínas ribosomales formando casi por completo a las subunidades pre-ribosomales, las cuales pueden ser exportadas al citoplasma (Jiménez-García y col., 1993).



Esquema 5. **Procesamiento del pre-rRNA.** El transcrito 45S pre-rRNA contiene espaciadores transcritos externos en ambos extremos y espaciadores transcritos internos entre las secuencias 18S, 5.8S y 28S. El procesamiento consiste en una serie de cortes que llevan a madurar cada rRNA. Tomado de Cooper G. M. (2000). *The Cell a Molecular Approach*. 2a ed. ASM Press. Washington. p. 335, modificado.



Esquema 6a y 6b. **Partes del nucléolo.** En la micrografía electrónica (a) se observa el núcleo entero. En la micrografía (b) se ve a mayor aumento el nucléolo y sus componentes. Tomada de Alberts B, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. 4a ed. Garland Science. Nueva York. p. 331, modificado.



3  $\mu\text{m}$

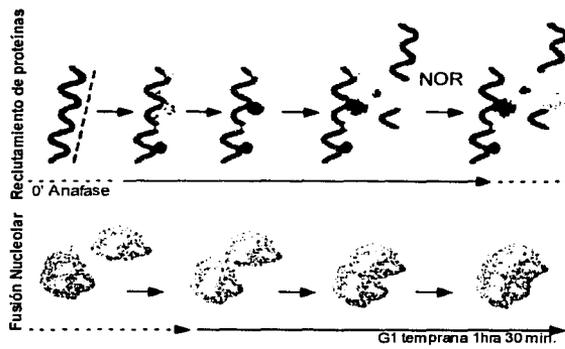
Esquema 6c. **Estructura del nucléolo.** Micrografía electrónica ilustrando los centros fibrilares (FC), los componentes fibrilares densos (DFC) y el componente granular (GC) del nucléolo. Tomado de Cooper G. M. (2000). *The Cell a Molecular Approach*. 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press/ Sinauer Ass. Inc. Washington, USA. pág. 334 y modificado.

Después de cada división celular el nucléolo se forma alrededor de las regiones del organizador nucleolar [Esquema 7] (Jiménez-García y col., 1993). La formación del nucléolo requiere de la transcripción del pre-rRNA 45S, lo que parece guiar a la fusión de cuerpos prenucleolares pequeños (PNB) que contienen, entre otros componentes del nucléolo, a los factores de procesamiento (Jiménez-García y col., 1989).

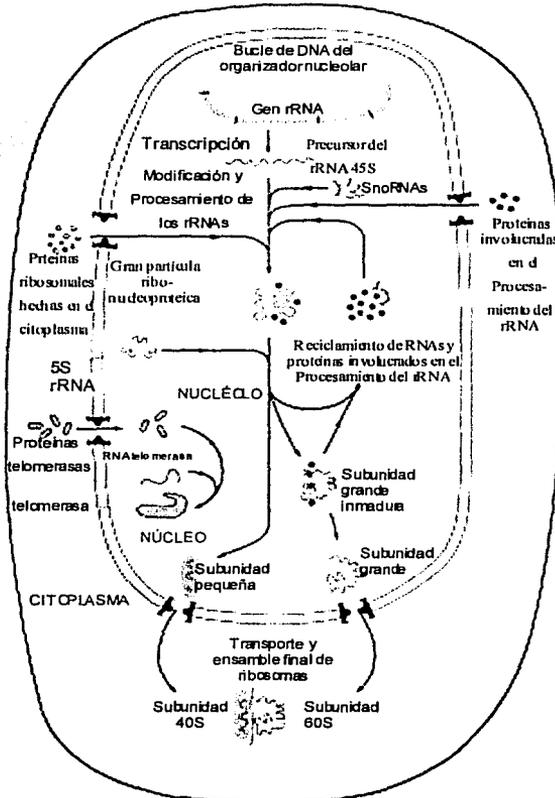
El procesamiento del pre-rRNA, requiere de la acción de proteínas y de RNAs que se encuentran en el nucléolo, formando una maquinaria de RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs) y proteínas [Esquema 8] (Alberts y col., 2002).

La transcripción primaria de los genes del rRNA, como ya se había mencionado, es el pre-rRNA 45S. Los espaciadores transcritos externos (ETS) que contiene, se presentan en los extremos 5' y 3' del pre-rRNA, y los espaciadores transcritos internos (ITS), se localizan entre las secuencias 18S-5.8S, uno y 5.8S-28S, el otro (Alberts y col., 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Esquema 7a. **Reconstrucción del nucléolo.** Las proteínas unidas a la cromatina (en azul) se ensamblan en PNBs, coexistiendo diferentes tipos de cuerpos nucleolares en el nucleoplasma (grises y negros). Cuando la cromatina se descondensa los PNBs quedan en contacto con nuevos nucléolos en formación (NOR) y se van fundiendo. Un cierto tiempo es necesario para que los componentes nucleolares se reorganicen después de la fusión. Tomado de Savino T. M., Gébrane-Younès J., De Mey J., Sibarita J. B., Hernández-Verdun D. (2001). Nucleolar Assembly of the rRNA Processing Machinery in Living Cells. *Journal of Cell Biology* 153:5, 1108, modificado.



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Esquema 8. **La función del nucléolo al sintetizar ribosomas y otras ribonucleoproteínas.** El precursor de rRNA 45S sufre modificaciones y procesamientos, y son los snoRNAs los que juegan un importante papel en estos pasos. Diversas proteínas son importadas al nucléolo para el ensamblaje ribosomal, así como el rRNA 5S. Otros complejos ribonucleoproteicos son ensamblados también en el nucléolo, como la telomerasa. La subunidad grande y la pequeña son transportadas al citoplasma a través de los poros nucleares, para su unión y activación. Tomado del Alberts B, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. 4a ed. Garland Science. Nueva York. p. 331, modificado.

El primer paso del procesamiento es un corte en el extremo 5' del espaciador transcrito externo por la partícula ribonucleoproteica (RNP) nucleolar pequeña, "U3". Seguido de varios otros cortes, los cuales comprenden a la separación del ETS 3'; luego fragmentan en dos al pre-rRNA, el que tiene a la secuencia 18S más sus espaciadores y el que se forma con el 5.8S, el ITS y el 28S; para que a través de la extracción de los espaciadores no transcritos queden las subunidades maduras [Esquema 5] (Cooper, 2000).

Algunos snoRNAs son responsables de los cortes del pre-rRNA en sus tres productos. Como es el caso de U8, el cual parte al pre-rRNA en 5.8S y 28S, así como el U22 parte al pre-rRNA y separa al 18S (Cooper, 2000).

Pero la mayoría de los snoRNAs, dirigen las modificaciones del pre-rRNA que son base específicas, como la metilación de residuos de ribosa específicos y la conversión de uridina a pseudouridina (Cooper, 2000).

Generalmente los snoRNAs, contienen secuencias cortas de aproximadamente 15 nucleótidos que son complementarios a los rRNA 18S y 28S, incluyendo los sitios de modificación de bases en el rRNA. Los snoRNAs funcionan como guías de enzimas por el apareamiento de bases en regiones específicas, favoreciendo la ubicación de los sitios a modificar (Cooper, 2000).

#### **✦ Generación de la estructura nucleolar**

Durante la mitosis "abierta" (mitosis donde desaparece la envoltura nuclear) en los eucariontes "superiores", el nucléolo se desintegra y la transcripción por la RNA polimerasa I cesa. El silenciamiento de los genes ribosomales es acompañado por la fosforilación inhibitoria del factor de transcripción SL1 dirigida por cdc-2 ciclina B. El nivel de regulación ocurre al inicio de la transcripción. Durante la mitosis, no se observan transcritos nacientes de las regiones del organizador nucleolar (NORs), sin embargo permanecen firmemente unidos a estas regiones los factores de transcripción UBF y SL1, así como la polimerasa I. Por el contrario, otros componentes nucleolares se dispersan a varios subcompartimientos nucleares, como rRNA parcialmente procesado, proteínas y pequeños nucleolares ribonucleoproteicos (snoRNPs), lo que lleva a pensar que no se desintegran completamente ciertas unidades funcionales del nucléolo durante la mitosis, pudiendo así la célula transmitir las a las siguientes generaciones (Scheer y Hock, 1999).

Sin embargo, existen seres vivos en los que no se desintegra el nucléolo durante la mitosis, como en levaduras, en las que la estructura permanece intacta hasta que es separada por el huso mitótico durante las últimas etapas de división (García y Pillus, 1999).

La formación del nucléolo durante el desarrollo temprano involucra estructuras preformadas, generalmente prominentes, que gradualmente se transforman en un nucléolo funcional por la interacción de los genes nucleolares (García y Pillus, 1999).

### ● Ensamblaje

El ensamblaje nucleolar consiste de dos pasos. El primero es la activación de la maquinaria de transcripción, la cual depende del decremento en la actividad de Cdk1-ciclina B. La maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa I, permanece durante la mitosis asociada a los genes de la región del organizador nucleolar. El segundo paso es la agrupación de la maquinaria de procesamiento en el nucléolo, pasando por la formación de cuerpos prenucleolares (PNBs). Estos cuerpos son descritos como cuerpos nucleares poco móviles, participantes en el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento en los sitios de transcripción del rDNA (Savino y col., 2001). Según Benavente (1991), el movimiento de los PNBs se debe probablemente a la activación de la transcripción, no a su formación en sí (Savino y col., 2001). Por otro lado, Olson y col. (2000) explican que la transferencia de componentes de estos cuerpos al nucléolo en formación es principalmente a través de mecanismos de difusión. Algunos autores proponen que el ensamblaje de RNAs nucleares pequeños se da por una vía nuclear específica.

La fibrilarina y el Nop52, son proteínas nucleolares asociadas con los PNBs. Se pueden encontrar ambas en la periferia cromosómica durante la mitosis, siendo su blanco el nucléolo. La fibrilarina participa en el procesamiento temprano del rRNA, es decir, en el procesamiento del espaciador transcrito externo 5'; se localiza en el componente fibrilar denso (DFC) del nucléolo. En cambio, la proteína Nop52 se asocia con eventos tardíos en el corte del segundo espaciador transcrito interno (ITS2), en el componente granular (GC). Savino *et al.* (2001), demostraron por análisis de microscopía electrónica, que varios PNBs formados en la superficie cromosómica, están involucrados en el tráfico de fibrilarina y Nop52. Además sugieren, que durante la telofase y G1 temprana, los PNBs sirven como sitios de tránsito para los componentes nucleolares, sin ser los PNBs en sí móviles.

### ● **Desensamblaje**

Durante la mitosis se separan ciertos componentes nucleolares del aparato transcripcional de la RNA polimerasa I, el cual permanece unido a las regiones del organizador nucleolar (NORs) (Olson y col., 2000). Componentes del procesamiento del pre-rRNA están inicialmente asociados con las regiones pericromosomales en profase. Sin embargo, durante anafase y telofase estos componentes también son encontrados en grandes partículas citoplásmicas de algunas células, llamadas focos derivados del nucléolo (NDF) (Olson y col., 2000). Estas partículas contienen además pre-rRNA parcialmente procesado (una mezcla entre rRNA 45S y 46S) (Olson y col., 2000).

Algunos componentes del procesamiento regresan al núcleo durante telofase y se asocian con cuerpos prenucleolares (PNBs), en donde también hay pre-rRNA que parece provenir de la célula madre (Olson y col., 2000).

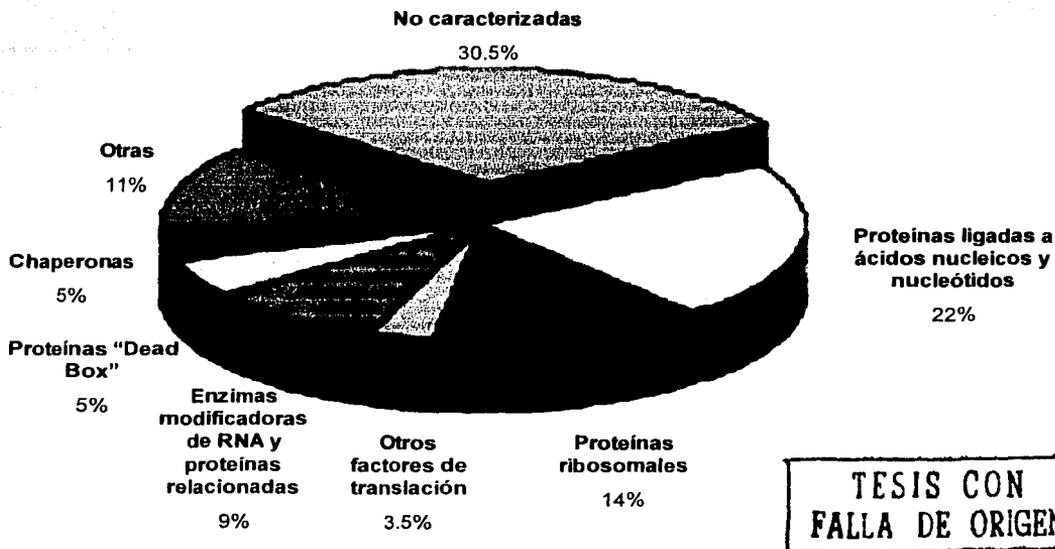
### ◆ **Movimiento de proteínas nucleolares**

Muchas proteínas nucleolares deben de ser transportadas del citoplasma al núcleo, así también partículas pre-ribosomales deben de ser exportadas al citoplasma (Shaw y Jordan, 1995). Varios experimentos han mostrado que B23 y nucleolina migran en ambas direcciones, así como Nopp 140, NAP 57 y NSR1, pudiéndose deber a secuencias cortas que señalan la localización nuclear, interacción con otros componentes que se acumulan específicamente en ciertos sitios o que presenten señas positivas de exportación (Shaw y Jordan, 1995).

### ● **Función de algunas proteínas nucleolares**

Existen muchas proteínas nucleolares que no forman parte de los ribosomas y no se conoce su función. De las proteínas caracterizadas se incluyen topoisomerasas, metilasas, nucleasas, proteína-cinasas, fosfatasas, etc. [Esquema 9].

## Clasificación de Proteínas nucleolares



Esquema 9. Clasificación de proteínas nucleolares. Análisis proteómico de nucléolos humanos. Tomado de Andersen J. S. Lyon C. E., Fox A. H., Leung A. K. L., Lam Y. W., Steen H., Mann M., Lamond A. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current Biology* 12, p. 6.

Varias de las proteínas nucleolares tienen una gran afinidad por la plata, lo cual es la base de la tinción de Ag-NOR, siendo unas de las responsables la proteína RNA polimerasa I, la nucleolina, la B23 y la proteína nucleolar de levaduras SSB-1 (Shaw y Jordan, 1995).

Se han encontrado dominios ricos en arginina y glicina conocidos como GAR, que son compartidos por varias proteínas como la fibrilarina y la nucleolina, pareciendo servir como sitios de unión a ácidos nucleicos de cadena sencilla. Los dominios GAR pueden encontrarse en cualquier lugar, pero se distinguen por estar flanqueados por residuos de prolina que le dan una independencia estructural del resto de la proteína (Shaw y Jordan, 1995).

Por otra parte, se ha visto que en el dominio N- terminal de las proteínas, en particular las que se unen a la señal de localización nuclear, tienen residuos ácidos y de serina entremezclados con regiones básicas, así como sitios de fosforilación (Shaw y Jordan, 1995).

### **B23 (Numatrina, NO38, Nucleofosmina)**

Es la fosfoproteína ácida más abundante en el nucléolo, está muy conservada, tiene 294 residuos de aminoácidos en secuencias humanas, parece involucrada en la maduración de partículas pre-ribosomales, en procesos de transporte entre el núcleo y el citoplasma pues se une a la señal de localización nuclear, y que tiene función de chaperona en el ensamblaje del ribosoma (Shaw y Jordan, 1995). Se encuentra en el componente granular, en el componente fibrilar denso y en la periferia cromosomal durante la mitosis (Shaw y Jordan, 1995). Es fosforilada por complejos cdc2 cinasa y en algunas células puede tener isoformas con diferentes funciones (Shaw y Jordan, 1995). Durante la mitosis la proteína cambia de localización, se distribuye en el nucleoplasma en la profase, en metafase y anafase se asocia con los cromosomas para que en telofase aparezca en los cuerpos prenucleolares (PNBs) y posteriormente en el nucléolo en formación (Jiménez-García, 1988).

### **Nucleolina (C23)**

La nucleolina tiene 706 residuos de aminoácidos en secuencias humanas, es una fosfoproteína ácida muy abundante, localizada en el componente granular y en el componente fibrilar denso (Shaw y Jordan, 1995). Contiene muchos módulos funcionales y estructurales distintos e inciertos, pero se sabe que por lo menos es indispensable para el corte inicial del pre-rRNA en su proceso de maduración (Scheer y Hock, 1999). Su dominio N-terminal muestra homología con el grupo de proteínas de alta movilidad e interactúa con la cromatina nucleolar, modulando su condensación junto con la histona H1 en pasos dependientes de fosforilaciones; a su vez, dependiendo del nivel de fosforilación de la nucleolina es la actividad transcripcional del nucléolo, o por lo menos la tasa de producción ribosomal (Shaw y Jordan, 1995). Se ha visto presente tanto en el citoplasma como en el núcleo y esto se debe a que su dominio N-terminal reconoce a un tipo de señal de localización nuclear; por otro lado, tiene actividad autoproteolítica, por lo que puede regular su funcionamiento (Shaw y Jordan, 1995). Durante la mitosis se asocia con las regiones del organizador nucleolar, de donde se condensa en los cuerpos prenucleolares (PNBs) y se fusiona con las regiones del organizador en telofase (Jiménez-García, 1988).

### **Fibrilarina (B36, NOP1)**

Es una proteína de 321 residuos de aminoácidos en secuencias humanas, está presente en la mayoría de los eucariontes de manera muy conservada, se encuentra en el componente fibrilar denso y en los centros fibrilares; parece estar involucrada directamente en diferentes pasos de la biosíntesis ribosomal, o indirectamente actuando con componentes necesarios para el procesamiento del pre-rRNA (Shaw y Jordan, 1995). En invertebrados, la fibrilarina se asocia con los snoRNAs U3, U8, U13, U14, U15, U16, U20 y U21, siendo que en levaduras se asocia con todos los snoRNAs conocidos, volviéndose esencial para la viabilidad celular, ya que si se muta, los pasos como la metilación en el procesamiento del pre-rRNA no se pueden llevar a cabo en dichos hongos (Shaw y Jordan, 1995). Parece ayudar a desestabilizar y desenrollar el rDNA, permitiendo a la RNA polimerasa I su transcripción, así como también unirse a pre-rRNA recién sintetizado para empacarlo en partículas pre-ribosómicas (Jiménez-García, 1988). En mitosis, se localiza en las regiones del organizador nucleolar metafásicos y en telofase se distribuye en los cuerpos prenucleolares (Jiménez-García, 1988).

### **RNA Polimerasa I y UBF (upstream binding factor)**

La RNA polimerasa I es única entre las polimerasas de eucariontes por transcribir sólo una secuencia, la del rDNA, y es exclusivamente activa en el nucléolo. Es un complejo de muchos polipéptidos, arriba de 13 en levaduras, que parecen concentrarse en los centros fibrilares, así como en el componente fibrilar denso, siendo que en metafase, en las regiones del organizador nucleolar (Shaw y Jordan, 1995). El factor de transcripción mejor estudiado es el UBF, de 764 residuos de aminoácidos en secuencias humanas, se localiza preferencialmente en la periferia de los centros fibrilares, pero también sobre el componente fibrilar denso. El factor UBF tiene un dominio N-terminal responsable de la dimerización y un dominio C-terminal muy ácido que es el blanco de fosforilación de la casein cinasa II, y se une a dos regiones promotoras del rDNA (Shaw y Jordan, 1995). Durante la mitosis, dicho factor se concentra en las regiones del organizador nucleolar. Puede actuar tanto como de *trans*-activador como de anti-represor, seguramente al competir con un represor por los sitios promotores (Shaw y Jordan, 1995).

## Proteínas nucleolares implicadas en el procesamiento del pre-rRNA y en el ensamblaje ribosomal

<b>Ribonucleasas</b>	
<b>Endonucleasas</b>	B23, Rnasa P, Rnasa MRP, PR1, Rnt1p
<b>Exonucleasas</b>	Mtr3p, Rat1p, Rrp40p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p/ Dis3p, Rrp46p, Rrp6p, Rrp4p, Xrn1p
<b>Proteínas implicadas en el procesamiento del pre-rRNA</b>	Fibrilarina, Gar2, Gar1p, Imp3p, Imp4p, Mpp10p, Nip7p, Nop1p, Nop2p, Nop4p (Nop77p), Nop5p, Nop8p, Nop56p, Nop58p, Nucleolina/ Nsr1p, p120, Rrp5p, snR10, Sof1p
<b>Helicasas</b>	Dbp3p, Dbp4p, Dbp6p, Dbp7p, Dbp8p, Dbp9p, Dbp10p, Dob1p, Drs1p, Fa/1p, Mak5p, Rrp3p, RHII/Gu, Rok1p, Sbp4p, Sen1p
<b>Chaperonas Moleculares</b>	B23, Hsp70, Hsp72, Hsp32
<b>Enzimas modificadoras del rRNA y proteínas asociadas</b>	Cbf5p, NAP57, Nop60Bp, Nopp140, disquerina humana

Tomada: Olson M. O. J., Dundr M., Szbeni A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. Review. *Trends in Cell Biology* 10: 4, p. 193.

### ↓ Partículas relacionadas con el nucléolo

#### ● Función de los snoRNAs

En el nucléolo hay una gran cantidad de RNAs metabólicamente estables, de 60 a 300 nucleótidos de largo, llamados pequeños nucleolares de RNAs (snoRNAs), cuya asociación con proteínas forma a los pequeños nucleolares RNPs (snoRNPs) (Kiss, 2002). Los snoRNAs se pueden dividir en dos grupos basándose en las secuencias conservadas de sus genes y en la forma en que se doblan para adquirir su estructura secundaria definida. El primer grupo está formado por la caja C/D, cuyos miembros son principalmente guías de la síntesis post-transcripcional de nucleótidos 2'-O-metilados en el rRNA. Por vía de interacciones entre pares de bases con el pre-rRNA, dirigiendo la metilación de residuos de ribosa de nucleótidos específicos del pre-rRNA. Unas pocas cajas C/D, están también

involucradas en procesos de maduración de pre-RNAs, como U3, U8, U14 y U22. El segundo grupo es llamado caja H/ACA, y están involucrados principalmente en la formación de pseudouridina en sitios específicos de los rRNA, como los son los U17, U19, U64. Estos dos grupos parecen estar involucrados en la post-transcripción de otros RNAs como los snRNAs y los mRNA. En los vertebrados existe un RNA que parece snoRNA, llamado RNA telomerasa, el cual dirige la síntesis del DNA telomérico, que provee de estabilidad a los cromosomas. Kiss (2002) dice que es de hecho un snoRNA, perteneciente a la caja H/ACA, que tiene función de transcriptasa reversa, al mantener el tamaño de los telómeros añadiendo repeticiones teloméricas de DNA al final de los cromosomas.

En la biogénesis, se transcriben de genes independientes y en muchos vertebrados los snoRNAs son procesados de intrones de pre-mRNA, mostrando que los intrones pueden codificar para RNAs funcionales. Todas las cajas tienen una secuencia corta característica de bases, que constituye el lugar específico de unión a dos clases de proteínas distintas. Kiss en su artículo del 2002, menciona que para la caja C, la secuencia característica es RUGAUGA; para la caja D es la CUGA; para la caja H es la ANANNA y para la caja ACA es ACA. La caja C/D se une a las proteínas snoRNP: Fibrilarina, Nop56p, Nop58p y la 15.5 kDa/Snu13p. La caja H/ACA está asociada a las proteínas disquerina/ Cbf5p, Gar1p, Nhp2p y Nop10p.

Ambas clases de guías de snoRNAs, describe dicho autor, especifican los sitios de modificación por la formación de interacciones de bases apareadas con el sustrato de RNA. La guía de metilación establece una hélice larga de 10 a 21 pares de bases, mientras que la guía de pseudouridinación establece dos hélices dobles cortas, como de 3 a 10 pares de bases cada una.

Kiss recalca que el nucleótido destinado a ser modificado, debe tener una posición invariante con respecto a las secuencias conservadas de las cajas de los snoRNAs. Como en el caso de los nucleótidos para metilar, siempre se encuentran 5 nucleótidos hacia el extremo 5' de la caja D o D' de los snoRNA, en cambio los residuos que se requieren cambiar a pseudouridina, se encuentran 15 nucleótidos por arriba de la caja H o ACA. Las proteínas snoRNPs utilizan esta información estructural para seleccionar al correcto nucleótido blanco.

Además, Kiss basándose en otros autores, sugiere que las reacciones de metilación y de pseudouridinación, están catalizadas por las proteínas fibrilarina y disquerina/ Cbf5, respectivamente.

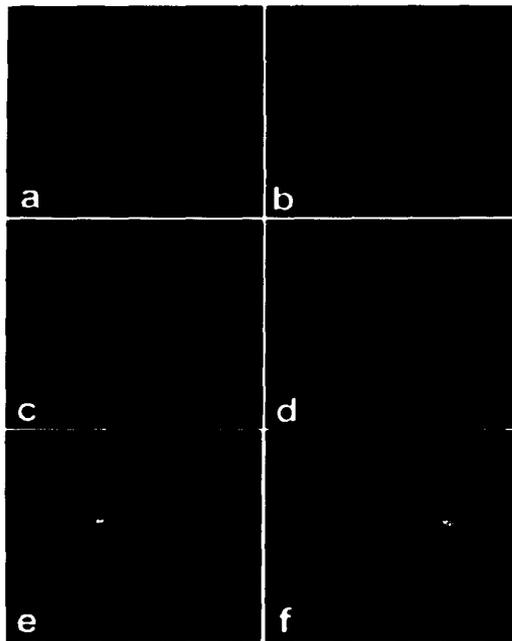
### ●Speckles

Son dominios enriquecidos en factores de “splicing” del pre-mRNA. Se forman por la asociación de snRNPs con los gránulos inter cromatinianos, partículas densas que contienen snRNPs y otros factores de “splicing” (Lamond y Earnshaw, 1998). Se dispersan las “speckles” durante la mitosis, pero en telofase se comienzan a formar estructuras parecidas con la misma composición antes de ser distribuidas a los núcleos de las células hijas (Lamond y Earnshaw, 1998). Son más abundantes las “speckles” en células de baja transcripción, pero parecen ubicarse cerca de genes que se transcriben mucho, sugiriendo un posible papel en la maduración de los mRNA (Lamond y Earnshaw, 1998). Además se ha detectado mRNA poliadenilado, para lo que han propuesto como indicativo de que tiene función de exportación de mensajeros al citoplasma (Lamond y Earnshaw, 1998). Pero todavía queda por demostrar si son sitios de almacenamiento o tienen una participación activa en la maduración y transporte del mRNA.

### ✦Pequeños cuerpos nucleares

Los cuerpos nucleares son estructuras intranucleares esféricas de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$ . Dichos cuerpos se encuentran tanto en células normales como patológicas, siendo agrupados por Bouteille (1967), en 5 tipos basados en su tamaño así como en su distribución de componentes granulares y fibrilares (González-Oliver *et al.*, 1997).

A continuación se mencionan los cuerpos nucleares más conocidos [Esquemas 10a y 10b].



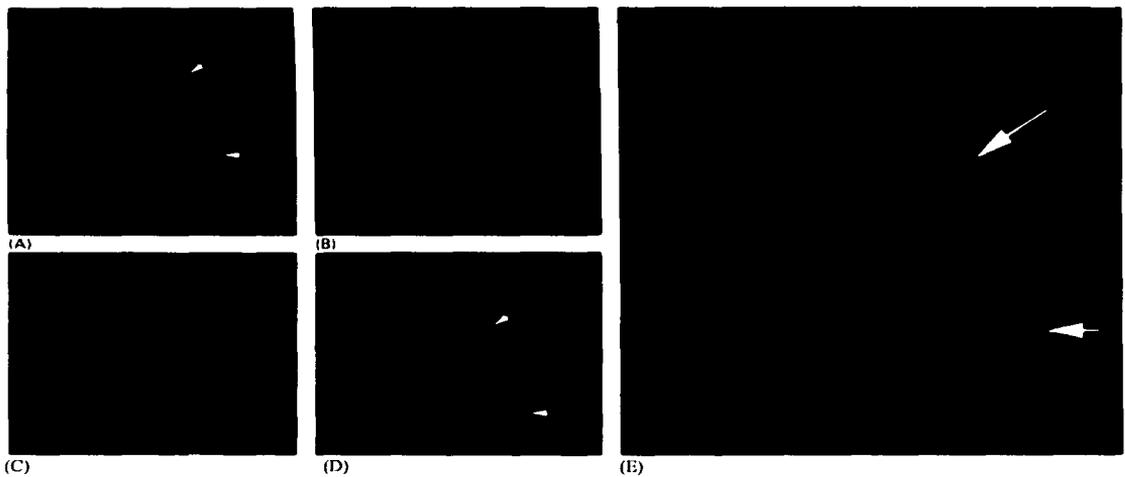
10a

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

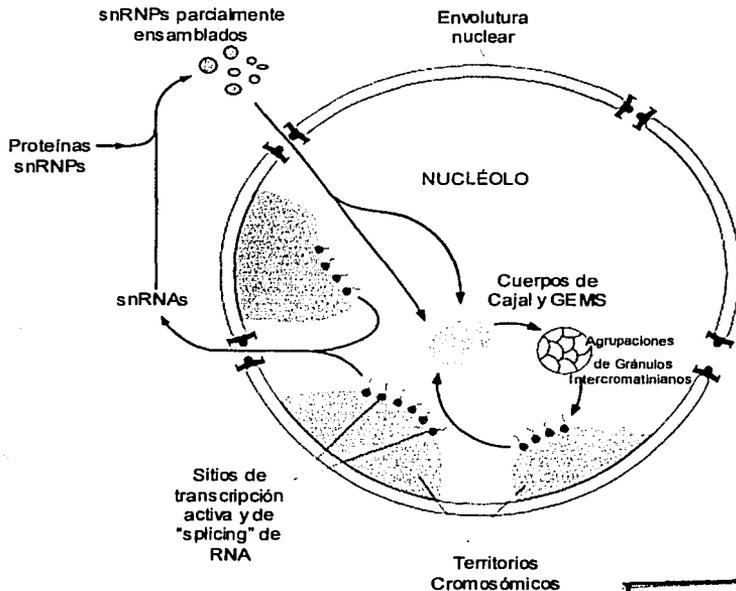
Esquema 10a. **Compartimentos nucleares vistos por microscopía de fluorescencia.** En la micrografía (a) se muestra en rojo a las “speckles”, en (b) el nucléolo en verde, en (c) los cuerpos de Cajal en “verde” y el nucléolo en rojo, en (d) los cuerpos PML en rojo y los cuerpos de Cajal en verde, en (e) se ven cromosomas metafásicos de ratón, el 13 en azul, el 14 en rojo y el 15 en verde, en (f) se ven los territorios cromosomales en interfase. Tomado de Dundr M. y Misteli T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. Review. *Biochem. J.* 356, p. 298.

### ●Cuerpos de Cajal

Son estructuras subnucleares que fueron originalmente llamadas cuerpos nucleares accesorios o cuerpos espiralados y que están frecuentemente asociados con la periferia nucleolar, o incluso se pueden localizar dentro del nucléolo [Esquema 11] (Leung y Lamond, 2002). Según Leung y Lamond (2002), en su interior se pueden localizar proteínas nucleolares como la fibrilarina, y la Nopp140, como también snoRNPs, una proteína específica de este cuerpo que es autoantigénica humana llamada p80 coilina, así como snRNPs de “splicing” y algunos factores de transcripción, pero no se han visto pre-mRNA nacientes ni otras proteínas de “splicing” además de los snRNPs, que cabe mencionar que éstos últimos son partículas recién ensambladas.



Esquema 10b. Visualización de la cromatina y de los cuerpos nucleares. De (A)-(D) muestran el mismo núcleo humano, cada una procesada diferente para mostrar estructuras particulares. La (E) es la superposición de las anteriores. En la (A) se localiza la fibrilarina (componente de muchos snoRNPs) que puede estar en los cuerpos de Cajal (flechitas) o en el nucléolo. En (B) se observan cúmulos de gránulos intercromatinianos o "speckles" detectados por anticuerpos contra una proteína involucrada en el "splicing". En (C) tiñeron la cromatina. En (D) localizaron la proteína coilina, perteneciente a los cuerpos de Cajal (flechitas). Tomado de Alberts B, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). Molecular Biology of The Cell. 4a ed. Garland Science. Nueva York. p. 331, modificado.



Esquema 11. Estructuras subnucleares. Un núcleo típico de vertebrado tiene varios cuerpos de Cajal, donde se propone que los snRNPs y los snoRNPs tienen sus modificaciones finales. Los cúmulos de gránulos intercromatinianos parecen almacenar a los snRNPs maduros. El snRNP U6 requiere de modificaciones químicas por los snoRNAs en el nucléolo. Los sitios de transcripción activa y de "splicing" corresponden a las fibras pericromatinianas. Tomado de Alberts B, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). Molecular Biology of The Cell. 4a ed. Garland Science. Nueva York. p. 331, modificado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los snRNAs que son exportados al citoplasma para su maduración son los U1, U2, U4 y U5, en donde se asocian con proteínas Sm, sufren procesamientos en el 3' terminal y de "cap" hipermetilación; para conducirlos de nuevo al núcleo, y antes de acumularse en "speckles", se asocian transitoriamente con los cuerpos de Cajal, en donde se han detectado snoRNAs (que normalmente residen en el nucléolo), que dirigen modificaciones a dichos snRNAs. Kiss (2002) sugiere que en los cuerpos de Cajal se lleva a cabo la maduración por parte de los snoRNAs de los snRNAs específicos a la polimerasa II (encargada del corte y empalme del mRNA). Leung y Lamond (2002) sugieren que los cuerpos de Cajal transportan y maduran tanto a los snRNAs como a los snoRNAs, ya que por pruebas de marcaje fluorescente, se han observado snoRNAs migrando de los cuerpos de Cajal hacia el nucléolo. Los cuerpos de Cajal se desensamblan durante la mitosis, reensamblándose en la fase G1, después de que la transcripción es reiniciada (Lamond y Earnshaw, 1998). El número de estos cuerpos, así como su composición de proteínas, varía en diferentes tipos celulares; son más evidentes en células de rápido crecimiento (Lamond y Earnshaw, 1998). Cuando la transcripción y el "splicing" son bloqueados, los cuerpos de Cajal se dispersan y los snRNPs se concentran en las "speckles".

### ●Cuerpos PML

Estos cuerpos son dominios esféricos pequeños, conocidos por una gran variedad de nombres, como PODs (dominios oncogénicos PML), cuerpos Kremer y ND10 (dominio nuclear 10). Se encuentran esparcidos por el nucleoplasma y en los núcleos de células mamíferas típicas pueden contarse de 10 a 30 por cada núcleo con un tamaño de 0.2 a 1 µm, dependiendo de la etapa del ciclo celular en que se encuentren (Dundr y Misteli, 2001). Su nombre deriva de su componente proteico más estudiado, el PML, que es una proteína "de dedo de anillo" que fue descubierta a través de análisis del dominio oncogénico responsable de la APL (leucemia promielocítica) (Lamond y Earnshaw, 1998). Frecuentemente se encuentran asociados con cuerpos de Cajal y cuerpos de corte, formando algunas veces tripletes (Dundr y Misteli, 2001). Ultraestructuralmente asemejan anillos densos, que son positivamente teñidos con anti-PML, además de contener Sp 100, proteína retinoblastoma Rb, Daxx, etc. (Dundr y Misteli, 2001). Han sido implicados en procesos de

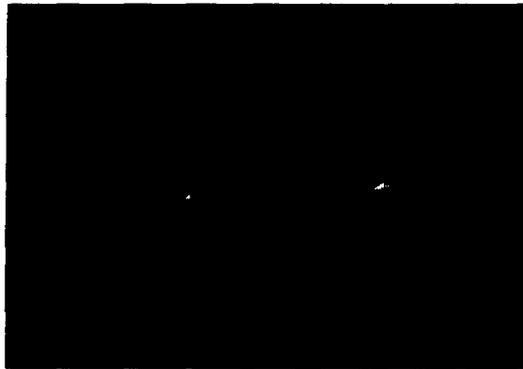
diferenciación terminal, regulación transcripcional, control del crecimiento, apoptosis y como lugar de almacenaje nuclear (Dundr y Misteli, 2001).

#### ●Dominios OPT (Oct1, PTF transcription)

Estos dominios tienen un diámetro por arriba de 1.5  $\mu\text{m}$ , su número es muy bajo y se ensamblan durante  $G_1$  para desaparecer en la fase S temprana. Sus dominios son transcripcionalmente activos y se asocian preferencialmente con los cromosomas 6 y 7, sugiriendo que su formación está relacionada con genes particulares de estos cromosomas, pero su función se desconoce (Dundr y Misteli, 2001).

#### ●Compartimiento Perinucleolar (PNC)

Es un dominio nuclear único de forma irregular localizado en la superficie del nucléolo [Esquema 12]. Consiste en múltiples fibras electrón-densas en donde se han detectado varios snRNAs, transcritos por la RNA polimerasa III (Dundr y Misteli, 2001). La presencia de RNA naciente y de factores de procesamiento de RNA, sugieren que juega un papel en la transcripción y procesamiento del RNA. Durante la mitosis, el PNC se disocia en la profase y se reformula en la telofase tardía, cuando el nucléolo ya ha sido reensamblado (Dundr y Misteli, 2001). Es importante destacar que el PNC está estrechamente relacionado con la transformación oncogénica.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esquema 12. Se ve el **compartimiento perinucleolar** (en verde) en la periferia del **núcleolo** en rojo (marcada la fibrilarina) y la **lámina nuclear** en azul (marcada la lamina). Tomado de Huang S. (2000). Perinucleolar structures. Review. *Journal of Structural Biology* 129, 234, modificada.

## ⚡Producción de Ribosomas

Según Scheer y Hock (1999), los ribosomas requieren de aproximadamente 80 diferentes proteínas ribosomales que provienen del citoplasma y se importan al núcleo gracias a las importinas (carioferinas) beta, para luego concentrarse en el nucléolo. Una vez ensamblados se exportan como subunidades al citoplasma.

Kiss (2002) menciona que los snoRNAs esenciales para la producción del rRNA 18S, son los de la caja C/ D U3, U14, U22, y el snR30 de la caja H/ ACA. Por otro lado, explica que el U8 de la caja C/ D es necesario para el corte entre el rRNA 5.8S y el 28S, que forman parte aún del pre-rRNA para ese momento. Sin embargo, Kiss (2002) aclara que a ninguno de los snoRNAs anteriormente citados, se les ha demostrado poseer actividad endonucleótida ni exonucleótida, por lo que se asume que sólo dirigen la reorganización estructural apropiada del rRNA durante su procesamiento.

Para el inicio de la transcripción del rDNA, se requiere del factor de selectividad 1 (SL-1), el factor de unión al extremo 5' (UBF), RRN3, subunidades de la polimerasa I y otros cofactores (Leary y Huang, 2001). Los factores SL-1 y UBF permanecen unidos al promotor, siguiendo a la polimerasa I que les abre el paso y parece ser este paso el limitante para la transcripción (Leary y Huang, 2001).

La síntesis de ribosomas es regulada negativamente, cuando la célula carece de nutrientes, se está diferenciando o se inhibe la síntesis de proteínas (Leary y Huang, 2001). En cambio, es regulada positivamente cuando se añaden nutrientes, se estimula la proliferación y el crecimiento celular (Leary y Huang, 2001). La regulación se lleva a cabo en múltiples etapas del proceso; por ejemplo, existe una gran cantidad de factores transcripcionales de la polimerasa I, pero no todos están activos todo el tiempo gracias a que son fosforilados, acetilados o porque interaccionan con otras proteínas (Leary y Huang, 2001).

Para el caso de la transcripción de rDNA, la mayoría de los factores involucrados son fosfoproteínas (Leary y Huang, 2001). Este es caso de la nucleolina, una proteína multifuncional que interviene en el procesamiento del pre-rRNA, además de unirse a regiones espaciadoras entre repeticiones de rDNA para incrementar la especificidad de su transcripción, aparentemente por reacomodo de la cromatina (Leary y Huang, 2001). Lo que lleva a cabo gracias a que es fosforilada por la casein cinasa II (CKII) durante el crecimiento celular (Leary y Huang, 2001). La CKII también fosforila a UBF para

augmentar la transcripci3n en interfase, al promover la interacci3n de UBF con SL-1 (Leary y Huang, 2001). Pero al ser fosforiladas UBF y SL-1 durante la mitosis y G1 temprana, por la cinasa cdc2, se consigue un efecto contrario; ya que se inhibe la transcripci3n del rDNA (Leary y Huang, 2001). La cinasa cdc2 fosforila tambi3n al factor de inicio y t3rmino de transcripci3n (TTF-1), reduciendo su afinidad por la cromatina para contribuir al silenciamiento mit3tico del rDNA (Leary y Huang, 2001).

Modificaciones covalentes, a trav3s de acetilaciones y metilaciones, pueden regular la transcripci3n del rDNA en m3ltiples niveles. En la cromatina el silenciamiento del DNA se produce por su hipermetilaci3n, as3 como la desacetilaci3n de histonas; por lo que la acetilaci3n y la hipometilaci3n de histonas lleva a la activaci3n de la transcripci3n (Leary y Huang, 2001).

Tanto la prote3na “retinoblastoma supresora de tumores” (pRb), como el regulador del silenciamiento nucleolar y de salida de telofase (RENT) son componentes del complejo Net1. Por asociaci3n directa con componentes de la maquinaria de la polimerasa I, unen y reclutan histonas desacetiladas a repeticiones de rDNA para su silenciamiento (Leary y Huang, 2001).

Por el contrario, la transcripci3n se estimula por acetilaci3n de los factores de transcripci3n de la polimerasa I, as3 como por la sobreexpresi3n de varias transacetilasas (Leary y Huang, 2001).

#### **✦Modulaci3n de la funci3n nucleolar**

Scheer y Hock (1999) se3alan que a trav3s de la estimulaci3n de c3lulas de mam3feros, con el factor de crecimiento epid3rmico (EGF), la prote3na “dedos de zinc” ZPR1 migra del citoplasma hacia el n3cleo y se acumula en el nucl3olo. Por otro lado, al inducir a apoptosis por medio de CD95, la prote3na DEDD viaja del citoplasma hacia el n3cleo, en donde parece detener la transcripci3n del rDNA.

Visintin y Amon (2000) mencionan que la prote3na fosfatasa Cdc14, cuya funci3n es cr3tica para promover la salida de la mitosis, es captada en el nucl3olo y mantenida inactiva hasta el arranque de la anafase, previniendo la salida precoz de la mitosis. Indican que la prote3na Mdm2 es un inhibidor de la prote3na supresora de tumores p53<sup>1</sup>, y que al ser captada

---

<sup>1</sup>p53 induce paro del ciclo celular en respuesta a da3o en el DNA.

también en el nucléolo en respuesta a la oncoproteína Myc, permiten que la p53 quede libre y activa. Por otro lado, la proteína Pch2, requerida para parar la progresión del ciclo meiótico en respuesta a defectos en la recombinación o en la sinapsis de cromosomas, también se localiza en el nucléolo, sugiriendo alguna función de las proteínas nucleolares y del nucléolo en el señalamiento de inspección del funcionamiento celular.

#### ✦ **Regiones del organizador nucleolar**

Leung y Lamond (2002), reiteran que a las unidades de transcripción múltiple de rDNA, junto con los espacios intergénicos sin transcripción, forman las regiones del organizador nucleolar (NORs), encontrados en los cromosomas humanos 13, 14, 15, 21 y 22. El nucléolo se forma alrededor de estas NORs después de cada mitosis, aunque normalmente no se requieren de todos los cromosomas. Existe un método de tinción de dichas regiones, la tinción de plata amoniacal o AgNOR, debida a proteínas nucleolares afines a la plata que se encuentran en los FC y DFC. Estas proteínas tienen funciones importantes en la transcripción del DNA, en la biogénesis y procesamiento del RNA ribosomal. Las más abundantes son la B23 (nucleofosmina, numatrina o NO38) y la C23 (nucleolina). Al parecer, para la primera proteína, el dominio que se une a la plata es un residuo de ácido aspártico, mientras que para la segunda, es un dominio rico en residuos de glutamato (Valdez y col., 1995).

#### ✦ **Estructura del nucléolo**

La transcripción de los genes ribosomales, los cuales están repetidos en grandes pedazos de cromosomas, generan tres estructuras nucleolares: El componente fibrilar denso (DFC), el componente granular (GC) y los centros fibrilares (FC). Según Olson y col. (2000), el primero contiene RNA pre-ribosomal recién sintetizado y proteínas, mientras que el segundo está compuesto de partículas pre-ribosomales completas listas para exportarlas al citoplasma. Los DFCs son regiones de fibrillas finas altamente empaquetadas, de un grosor de alrededor de 3 a 5 nm (Schwarzacher y Mosgoeller, 2000), electrón densas y se pueden localizar con anticuerpos específicos contra factores de transcripción y factores de procesamiento del RNA pre-ribosomal incluyendo a la fibrilarina, un factor del complejo U3 que está involucrado en pasos tempranos del procesamiento pre-ribosomal (Huang,

2002). El GC, consiste en gránulos pequeños, de 10 a 20 nm de diámetro (Schwarzacher y Mosgoeller, 2000), que envuelven a las otras dos estructuras y es rico en factores de ensamblaje y proteínas ribosomales (Huang, 2002), por lo que Schwarzacher y Mosgoeller (2000) hablan de que es un lugar de almacenamiento de pre-ribosomas. El tercer componente, el centro fibrilar (FC) está rodeado por el DFC, es una región fibrilar pálida globular, consiste en un enrejado de fibrillas de 4 a 5 nm (Schwarzacher y Mosgoeller, 2000), que está enriquecido con RNA polimerasa I además de otros factores específicos de transcripción como la DNA topoisomerasa I y UBF (Huang, 2002).

Huang (2002) explica que no se sabe aún el sitio exacto en donde se lleva a cabo la transcripción del rDNA, existe controversia entre si se realiza en los centros fibrilares, en los componentes fibrilares densos o en la vecindad de ambos, ya que muchos autores han realizado varios experimentos que apoyan sus teorías, pero hasta ahora no se ha llegado a un acuerdo.

#### ✚ Multifuncionalidad del nucléolo

Es también un sitio de ensamblaje de varias maquinarias ribonucleoproteicas, muchas de las cuales están involucradas en la síntesis de proteínas (Dundr y Misteli, 2001). Entre ellas se encuentra la partícula de reconocimiento de señal (SRP). Tres proteínas (SRP19, SRP68 y SRP72) de las seis SRP están localizadas en el nucléolo, lo que sugiere que el pre-ensamblaje de SRP se realiza durante su pasaje a través del nucléolo (Dundr y Misteli, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que ocurren modificaciones postranscripcionales de U6 snRNA en el nucléolo, llevado a cabo por 3 cajas C/D de snoRNAs al metilar a la ribosa y pseudouridinizar, madurándolo antes de dejar el nucléolo para dirigirse al nucleoplasma (Dundr y Misteli, 2001). Lo que también parece suceder con U5 snRNA.

Se ha visto que el nucléolo juega un papel importante en la maduración de algunos tRNA de levaduras, ya que se han encontrado endonucleasas requeridas para dichos procesos principalmente en el nucléolo (Dundr y Misteli, 2001). A su vez, el nucléolo interviene en funciones regulatorias, ya que las proteínas regulatorias HIV, conocidas como Tat y Rev, se localizan en el nucléolo, en donde Rev es capaz de recluir proteínas en su vía de exportación, y debido a que Rev se une al mRNA de HIV-1, facilita el transporte de RNAs procesados y sin procesar al citoplasma, involucrando al nucléolo en la exportación del

mRNA de HIV-1 (Dundr y Misteli, 2001). También se involucra el nucléolo en la regulación de la proteína supresora de tumores (p53), ya que retiene el nucléolo a la proteína MDM2 para que no sea exportada al citoplasma para degradar a p53 (Dundr y Misteli, 2001).

## Objetivos

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la estructura nuclear periférica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* usando procedimientos citoquímicos y de alta resolución, para conocer si esta estructura corresponde a elementos nucleolares dispuestos de manera atípica con respecto a los nucléolos eucariontes filogenéticamente más recientes.

## Metodología

Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa silvestre HM1: IMSS, cultivados en medio Diamond TYI-S-33 y recolectados durante la fase de crecimiento logarítmico. Las amibas fueron donadas por la Dra. Bibiana Chávez, del Departamento de Patología Experimental, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN.

A partir de esa recolección en tubos de ensaye con tapa, se centrifugan formando un botón de células, se elimina el medio de cultivo, se agrega el fijador y se resuspenden.

Se utilizaron dos fijaciones:

### *Glutaraldehído al 2.5 % :*

- Inclusión en Epón (resina epóxica)
- Postfijación y primer contraste con tetraóxido de osmio e inclusión en Epón
- Tinción con plata amoniacal (AgNOR) previa a la deshidratación, e inclusión en LR White (London Resin White; resina acrílica)

### *Paraformaldehído al 4 % :*

- Inclusión en LR White (resina acrílica)
- Inclusión en Lowicryl (resina acrílica)
- Inclusión en parafina

Se utilizan tubos de ensaye o ependorfs de manera que en cada cambio de solución, se centrifugue primero para formar un botón de células, se elimine la mayor cantidad posible del producto anterior sin modificar el botón, se agregue la siguiente solución y se resuspenda para que todas las células estén sometidas a las mismas condiciones.

Fijación con glutaraldehído al 2.5%

Inclusión en:

❖ *Postfijación y primer contraste  
Tetraóxido de osmio-Epón*

Epón	
- Glutaraldehído 2.5 % + Amortiguador PBS, durante hora y media a temperatura ambiente	- Glutaraldehído 2.5 % + Amortiguador PBS, durante hora y media a temperatura ambiente
- 3 lavados de 10 minutos cada uno, con amortiguador PBS	- 3 lavados de 10 minutos cada uno, con amortiguador PBS
- Deshidratar con alcohol (etanol) al 30% 2 cambios de 10 minutos	- Se agrega tetraóxido de osmio 1 hora
- Dos cambios de alcohol al 50% por 10 minutos cada uno	- 3 lavados de PBS de 10 minutos cada uno
- Alcohol al 70%, dos cambios de 10 minutos	- Deshidratar con alcohol (etanol) al 30% 2 cambios de 10 minutos, luego al 50% dos cambios por 10 minutos cada uno
- Dos cambios de alcohol al 80% por 10 minutos cada uno	- Alcohol al 70%, dos cambios de 10 minutos, luego al 80% dos cambios por 10 minutos cada uno
- Alcohol del 96% dos cambios de 10 minutos cada uno	- Alcohol del 96% dos cambios de 10 minutos cada uno
- Dos cambios de alcohol absoluto de 15 minutos cada uno	- Dos cambios de alcohol absoluto de 15 minutos cada uno
- Dos cambios de óxido de propileno de 15 minutos cada uno	- Dos cambios de óxido de propileno de 15 minutos cada uno
- Epón 1: 1 óxido de propileno, toda la noche a temperatura ambiente	- Epón 1: 1 óxido de propileno, toda la noche a temperatura ambiente
- Epón 2: 1 óxido de propileno una hora o 24 horas	- Epón 2: 1 óxido de propileno una hora o 24 horas
- Incluir en bastidores con Epón o en los ependorfs mismos deshaciendo un poco el botón, polimerizar por 3 días a 60°C	- Incluir en bastidores con Epón o en los ependorfs mismos deshaciendo un poco el botón, polimerizar por 3 días a 60°C

❖ *Tinción antes de la deshidratación*  
*AgNOR-Epón (Goodpasture y Bloom, 1975, en Spector y col., 1997)*

- Glutaraldehído 2.5 % + Amortiguador PBS, durante hora y media a temperatura ambiente.
- Solución A de Carnoy por 5 minutos
- Rehidratar con alcohol al 70% por 10 min, después al 50% por 10 min, Agua bidestilada por 10 min
- Adicionar AgNO <sub>3</sub> , calentar por 10 minutos entre 40 a 50 °C (a baño María) en placa caliente
- Lavar con Agua bidestilada HELADA 10 veces
- Revelar adicionando 4 gotas de NH <sub>4</sub> As, más 4 gotas de revelador (formaldehído al 3% neutralizado con acetato de sodio, para luego bajar el pH entre 5-6 con ácido fórmico), dejar 15 segundos y lavar 10 veces con agua bidestilada helada.
- Deshidratar como en el método de LR White a 4° C
- Alcohol absoluto 2 : 1 LR White por 3 horas o toda la noche a 4°C
- Alcohol absoluto 1 : 2 LR White por 3 horas o toda la noche a 4°C
- 3 cambios de LR White a 4° C por una hora cada uno
- Polimerizar en cámara de UV a -20-25°C en cápsulas de gelatina 2 días y otros 2 a temperatura ambiente

*Fijación con Paraformaldehído al 4%*

Inclusión en:

LR White

Lowicryl

- Paraformaldehído 4% + Amortiguador PBS, durante hora y cuarto a 4°C	- Paraformaldehído 4% + Amortiguador PBS, durante una hora a 4°C
- 3 lavados de 10 minutos cada uno, con amortiguador PBS a 4°C	- 3 lavados de 5 minutos cada uno, con amortiguador PBS a 4°C
- Deshidratar con alcohol (etanol) al 30% 2 cambios de 15 minutos, luego 2 cambios de alcohol al 50% por 15 min cada uno a 4°C	- Alcohol (etanol) al 30% a 0°C por 30 minutos

- Dos cambios de alcohol al 70% de 15 min cada uno o de toda la noche a 4°C	- Alcohol al 50% a -20°C por 1 hora
- Un cambio al 80% por 30 min a 4°C	- Alcohol al 70% a -35°C toda la noche (o una hora)
- Un cambio de alcohol al 90% por una hora a 4 °C	- Alcohol al 90% a -35°C por 1 hora
- 3 cambios al 100% de 30 min cada uno a 4°C	- K <sub>4</sub> M Lowicryl diluido 1:1 en alcohol absoluto, una hora a -35°C
- Absoluto 2 : 1 de LR White por 3 horas o toda la noche, a 4 °C	- K <sub>4</sub> M diluido 2:1 en alcohol absoluto una hora a -35°C
- Absoluto 1 : 2 LR White por 3 horas o toda la noche, a 4°C	- 100% de K <sub>4</sub> M una hora a -35°C
- 3 cambios de LR White una hora cada uno a 4°C	- 100% de K <sub>4</sub> M a -35°C toda la noche
- Polimerizar en cápsulas de gelatina en cámara UV al congelador 2 días y otros 2 a temperatura ambiente; o en cápsulas de gelatina en estufa de 60°C una noche	Cambio de 100% de K <sub>4</sub> M en cápsulas de gelatina y Polimerizar en cámara de luz UV a -35°C de 24 a 48 horas, seguido de otros 2 días a temperatura ambiente.

#### Parafina

- Paraformaldehído 4% + Amortiguador PBS, durante 2 horas a 4°C
- Enjuagar 10 min en PBS 3 veces
- Deshidratar con Alcoholes graduales hasta llegar a 100%, durante 1 hora en cada solución
- Aclaramiento en xilol al 100% durante 1 hora
- Inclusión en bloques de parafina
- Se hacen cortes de 3 μm de espesor, montados sobre portaobjetos tratados con silano para asegurar su adherencia
- La desparafinación se lleva a cabo a 60° C durante 15 min, se escurre la parafina y se deja 5 min en un baño con xilol puro.
- La rehidratación consiste en baños de 5 min de alcoholes graduales, de 100% a 50%, terminando con 2 baños de agua destilada
- Se enjuaga en amortiguador TRIS (0.01M, pH 7.6) por 10 min
- Se tiñe y se monta

*Metodología post-inclusión en parafina realizada para la observación en microscopio óptico (fluorescente o campo claro)*

**Tinción de DAPI (DNA)**

(en Spector y col. 1997)

Se prepara una solución de 10 mg/ml de DAPI en agua bidestilada, para luego tomar 3 gotas y esparcirlas por el porta objetos con cortes desparafinados y rehidratados de la amiba.

- Se enjuagan las células con PBS y se secan al aire
- Se agregan unas gotas de la solución de DAPI
- Se drenan los portaobjetos verticalmente, se montan y se observan sin enjuagar.

**Reacción de Feulgen (DNA)**

(en Pearse, 1968)

**I.- Solución de Schiff o Feulgen**

Disolver 1 g de fucsina básica en 200 ml de agua destilada caliente; se coloca al fuego hasta ebullición y se deja enfriar a 50°C, se filtra y se añaden 20 ml de HCl 1 N. Se deja enfriar un poco más y se añade un gramo de metabisulfato de sodio, se guarda en un lugar oscuro durante 48 horas. Debe tomar un color paja después se añaden 0.5 g de carbón vegetal (norita) se agita y se filtra hasta que quede completamente cristalina.

Almacenar en el refrigerador en frasco color ámbar.

**II.- Solución de Acido Clorhídrico 5 N**

**III.- Solución sulfurosa**

Metabisulfito de sodio al 10%	6 ml
HCl 1 N	5 ml
Agua destilada	100 ml

**Procedimiento:**

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
2. HCl 5 N a temperatura ambiente una hora
3. Lavar en agua destilada
4. Solución de Schiff por una hora
5. Solución sulfurosa 3 minutos, tres veces
6. Agua corriente 10 minutos
7. Deshidratar, aclarar y montar.

**Azul de toluidina ácido para RNA**

(Smetana, 1967)

El procedimiento de azul de toluidina alcohólico ácido para RNA, se realizó en cortes de células desparafinadas y rehidratadas. La solución consiste en azul de toluidina al 0.025% en etanol al 10%, diluida 10 veces con una solución de ácido cítrico 0.1 M y fosfato disódico 0.2 M, amortiguada a pH 5-5.4.

- Se enjuagan las células con PBS y se secan al aire
- Se agregan unas gotas de la solución de azul de toluidina alcohólico ácido por 30 min
- Se drenan los portaobjetos verticalmente y se observan sin enjuagar.

### **Tinción de las regiones del organizador nucleolar (AgNOR)**

(Goodpasture y Bloom, 1975; en Spector y col. 1997).

Se utilizaron cortes montados en portaobjetos desparafinados e hidratados y se utilizó el siguiente procedimiento:

- Solución A de Carnoy por 5 minutos
- Rehidratar con alcohol al 70% por 10 min, después al 50% por 10 min, Agua bidestilada por 10 min
- Adicionar $\text{AgNO}_3$ , proteger con cubreobjetos y calentar las preparaciones por 10 minutos entre 40 a 50 °C en placa caliente
- Lavar con Agua bidestilada HELADA 10 veces
- Revelar adicionando 4 gotas de $\text{NH}_4\text{As}$ , más 4 gotas de revelador (formaldehído al 3% neutralizado con acetato de sodio, para luego bajar el pH entre 5-6 con ácido fórmico), dejar 15 segundos y lavar 10 veces con agua bidestilada helada.
- Secar exceso de agua y montar

*Metodología post-inclusión realizada para la observación en el microscopio electrónico de transmisión*

### **Tinción para RNPs (EDTA)**

(Bernhard, 1969)

Se realizaron cortes ultrafinos de bloques con LR White y se contrastaron con:

- Acetato de Uranilo 5 min
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min
- Etilendiamino-tetra-acético (EDTA) por 10 segundos
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min
- Citrato de Plomo por minuto y medio
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min

### **Tinción para DNA (PTA)**

(Vázquez-Nin y col., 1973)

Se necesita ajustar el pH del ácido fosfotúngstico (PTA), con HCl 0.1 N a pH 2, colocar la rejilla con cortes ultrafinos en una gota de PTA. Dependiendo de si los cortes están incluidos en resinas acrílicas, la duración será de 30 minutos y después se enjuaga, o si son de resinas epóxicas, la duración será de 1 hora seguida de lavados con agua desionizada.

**Procedimiento con amina de osmio para DNA**  
(Cogliati y Gautier, 1973 modificada por Vázquez-Nin y col., 1995)

Las rejillas de oro con los cortes, se colocan en HCl 5N por 45 minutos, después se lavan con agua desionizada, se dejan 2 horas (si se usan resinas acrílicas) en amina de osmio protegidas de la luz -si se usan resinas epóxicas se recomienda dejarlas 3 horas-, y por último se enjuagan en agua desionizada.

**Inmunolocalizaciones, anti-DNA**

Se utilizaron rejillas de níquel con cortes ultrafinos de resinas acrílicas, en especial lowicryl, y se continuó de la siguiente manera:

- Se flotan las rejillas en suero normal de cabra (NGS), diluido 1:100 en el amortiguador PBS, por 3 minutos. Este paso constituye una pre-incubación para el bloqueo de sitios inespecíficos.
- Se incuba toda la noche a 4° C, en una cámara húmeda, flotando cada rejilla en una gota de 20 µl del anticuerpo primario diluido 1:50 ó 1:100, en PBS-BSA (albúmina de suero de bovino)-Tween. Se utilizó un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón, el cual se une a DNA, producido por la compañía Progenie, de Heidelberg Alemania.
- Al otro día se lava las rejillas con PBS-Tween con piseta.
- Después se lavan con PBS por goteo.
- Se flotan 15 minutos en PBS.
- Se flotan 3 minutos en NGS diluido en PBS 1:100.
- Se incuban 1 hora en cámara húmeda y a temperatura ambiente en el segundo anticuerpo, diluido 1:10 ó 1:20 en PBS. El segundo anticuerpo es un anti-ratón IgM asociado a partículas de oro de 18 nm de diámetro, de la compañía Aurion, Wageningen, The Netherland.
- Lavados con PBS goteado, luego se flotan las rejillas en PBS 15 minutos y se gotean nuevamente.
- Se gotea agua bidestilada a las rejillas y se flotan 15 minutos en agua bidestilada.
- Después de dejar secar las rejillas, se contrastan con acetato de uranilo (durante 2 minutos) y citrato de plomo (durante 1 min), para una tinción general muy suave.

**Tinción general**

De cortes ultrafinos soportados en rejillas de cualquier tipo e incluidos en resinas acrílicas:

- Acetato de Uranilo 5 min
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min
- Citrato de Plomo por minuto y medio
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min

De cortes ultrafinos soportados en rejillas de cualquier tipo e incluidos en resinas epóxicas:

- Acetato de Uranilo 20 min
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min
- Citrato de Plomo 10 min
- Enjuagues con piseta con agua desionizada por 1 min

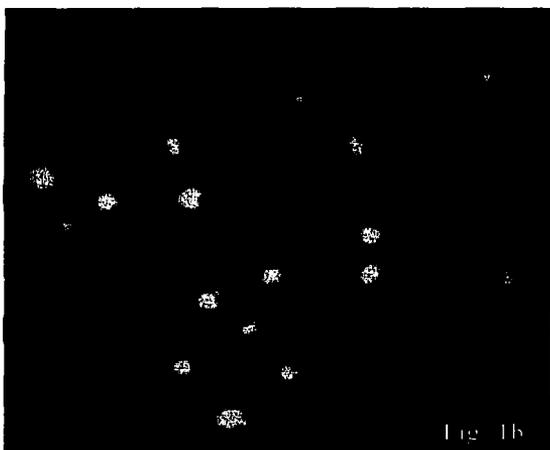
## Resultados

### Microscopía óptica

Las metodologías de tinción de DNA, Feulgen y DAPI, confirmaron la presencia de DNA en el núcleo y en el citoplasma con una reacción más ligera, aunque no es posible diferenciar su localización en regiones conspicuas (Fig. 1a, Fig. 1b).



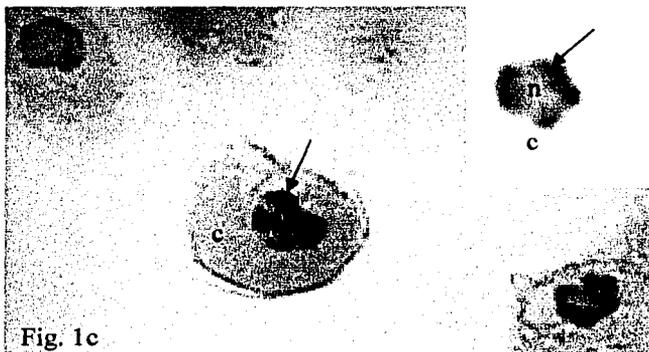
Fig. 1a, **Feulgen**. Los círculos rojos magenta más luminosos corresponden a los núcleos y alrededor se percibe difuso el citoplasma. En los dos sitios la reacción resulta positiva para DNA. 40x



TESIS CON  
FALSA LE ORIGEN

Fig. 1b, **DAPI**. Se distinguen los núcleos al ser las estructuras más brillantes. El citoplasma está bien delimitado. 60x

El procedimiento de azul de toluidina evidenció una tinción intensa en la periferia del núcleo (Fig.1c). Así mismo, la tinción de plata impregnó fuertemente zonas nucleares periféricas, como también algunos grumos céntricos (Fig. 1d).



**Fig. 1c, Azul de toluidina.** La zona más teñida (flecha) localizada en la periferia nuclear corresponde a RNA. c, citoplasma; n, núcleo. 60x, recuadro 100x.

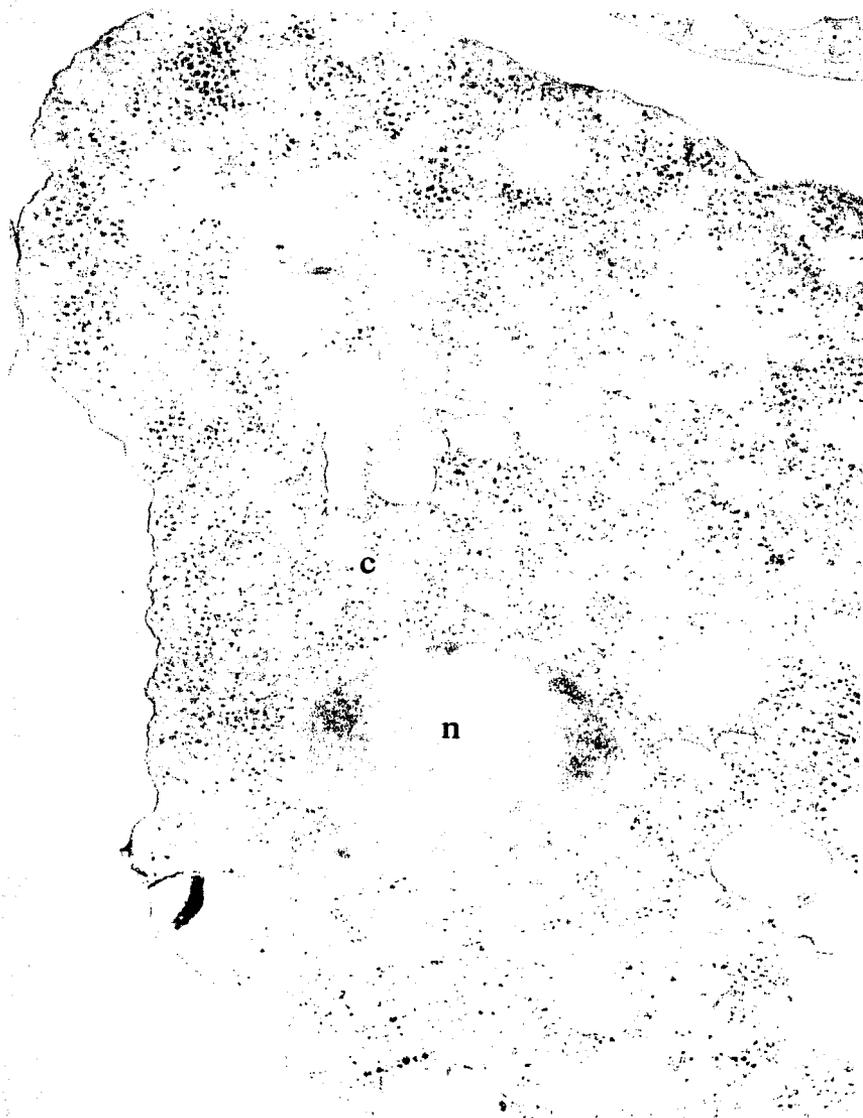


**Fig. 1d, Tinción de plata amoniacal.** El color café indica las regiones de material nucleolar en la periferia y en motas céntricas. No se diferencia con claridad los límites del núcleo (n) ni los límites de la membrana plasmática porque es una prueba específica para material nucleolar. c, citoplasma. 60x, recuadros a 40x.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

La tinción de acetato de uranilo y citrato de plomo muestra al trofozoíto como una célula de alrededor de 10 a 40  $\mu\text{m}$ , amorfa, rica en vacuolas citoplásmicas y esférulas nucleares de diferentes tamaños (Fig. 2a). En la Fig. 2b se ve un acercamiento del núcleo, que generalmente es esférico, tiene material electrón-denso y fibrogranular en la periferia, mientras que el resto del nucleoplasma posee una menor densidad electrónica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2a, **Micrografía electrónica de transmisión.** La célula es amorfa, con vacuolas de múltiples tamaños en el citoplasma (c) y esférulas variables en el núcleo (n). El volumen nuclear ocupa aproximadamente la décima parte del volumen total celular. No presenta organelos citoplásmicos como mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico. 10,800x.

En la Fig. 2c se advierte a mayor aumento una parte del núcleo de la figura anterior, para observar el material fibrogranular mencionado en la vecindad de la envoltura nuclear (Fig. 2b, Fig. 2c).

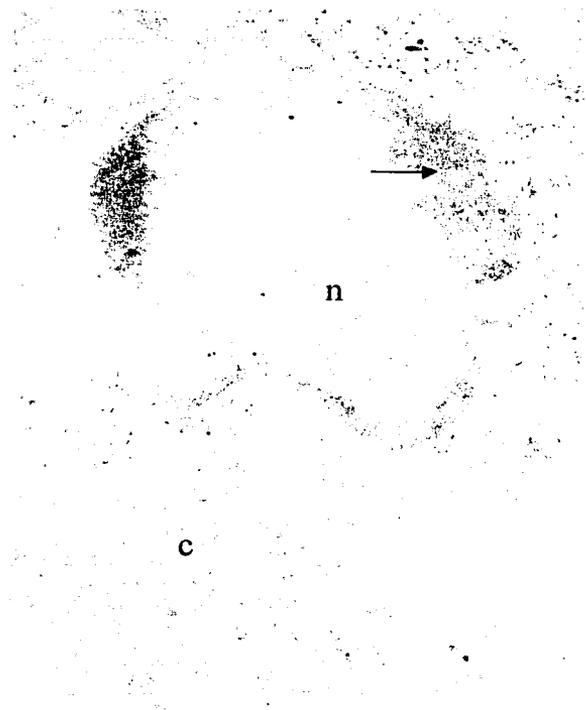


Fig. 2b

Fig. 2b, Micrografía electrónica de transmisión. El núcleo (n) es amorfo, con esférulas y material fibrogranular en la periferia (flecha). El nucleoplasma es uniforme y menos contrastado. 23,940x.

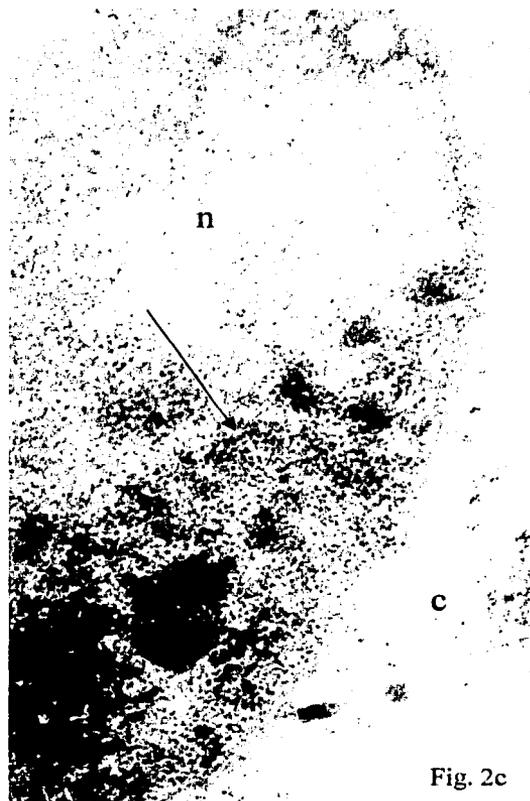


Fig. 2c

Fig. 2c, Micrografía electrónica de transmisión. Acercamiento del material electrón-denso periférico (flecha) en el núcleo (n), mostrando su composición fibrogranular. c, citoplasma. 69,300x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La tinción preferencial para RNPs, "EDTA", muestra que el material fibrogranular periférico se contrasta fuertemente con esta técnica (Fig. 3a). La tinción preferencial para DNA, "PTA", (Fig. 3b) así como el método de amina de osmio (Fig. 3c), muestran una banda clara

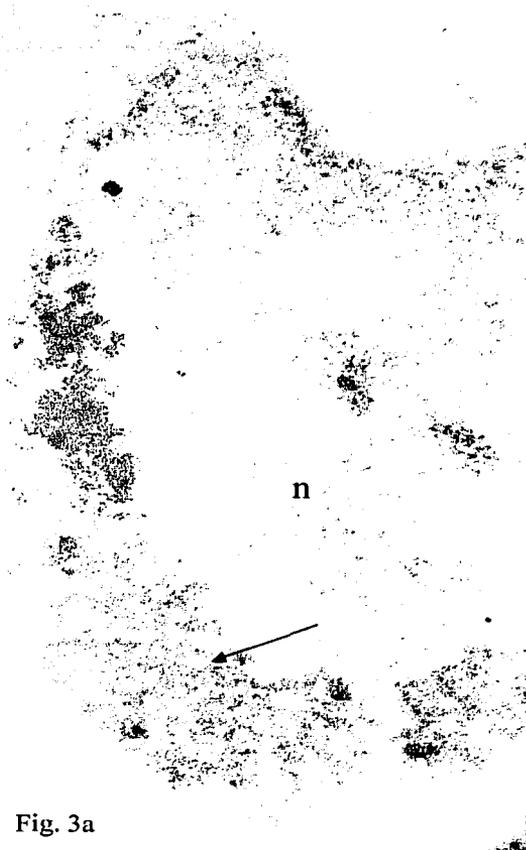


Fig. 3a



Fig. 3b

Fig. 3a, Tinción para RNPs (EDTA). El material contrastado en el núcleo (n) corresponde a RNPs, ya que esta técnica quita el contraste a la cromatina. El material fibrogranular periférico (flecha) está compuesto de RNA y proteínas. 36,800x.

Fig. 3b, Tinción para DNA (PTA). En el núcleo (n), la periferia (flecha) es más clara que el nucleoplasma y la cromatina compacta está excluida de esa zona. Hay mayor presencia de DNA hacia el interior nuclear (cabeza de flecha). 45,000x.

Por otro lado, se observaron fibras de cromatina laxa dispersas en el nucleoplasma (Fig. 3b; Fig. 3c).



Fig. 3c

Fig. 3c, **Tinción para DNA (amina de osmio)**. Se encuentra teñido el endosoma (E), estructura con forma de estrella que contiene la mayor parte del DNA nuclear. También pueden verse motas de cromatina cerca de la periferia (flecha), pero no adosadas a la envoltura nuclear (cabeza de flecha). 98,000x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La inmunolocalización ultraestructural para DNA confirma la ausencia de DNA en el material periférico (Fig. 4a); con excepción de pocos cuerpos densos de DNA localizados en esta zona (Fig. 4b). También se destaca un cuerpo central en forma de estrella (endosoma), el cual tiene extensiones de DNA (Fig. 4b), y es evidente la presencia de DNA en el citoplasma (Fig. 4a).

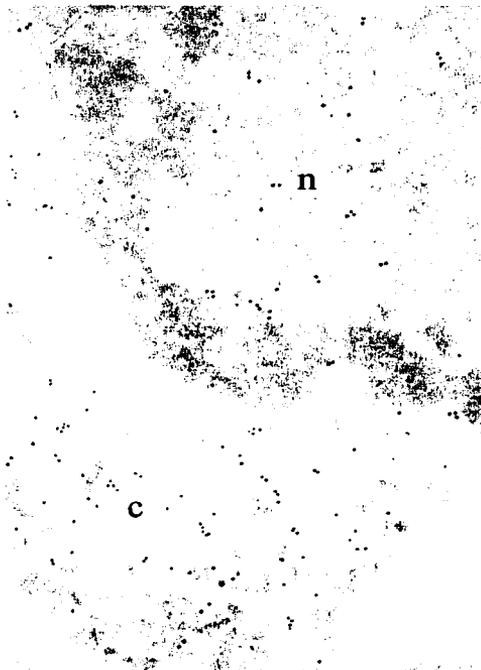


Fig. 4a, **Anti-DNA**. Las partículas de oro muestran la localización del DNA. El citoplasma (c) y el interior del núcleo (n) se marcan abundantemente. El material fibrogranular periférico (flecha) presenta escaso marcado. 60,000x.

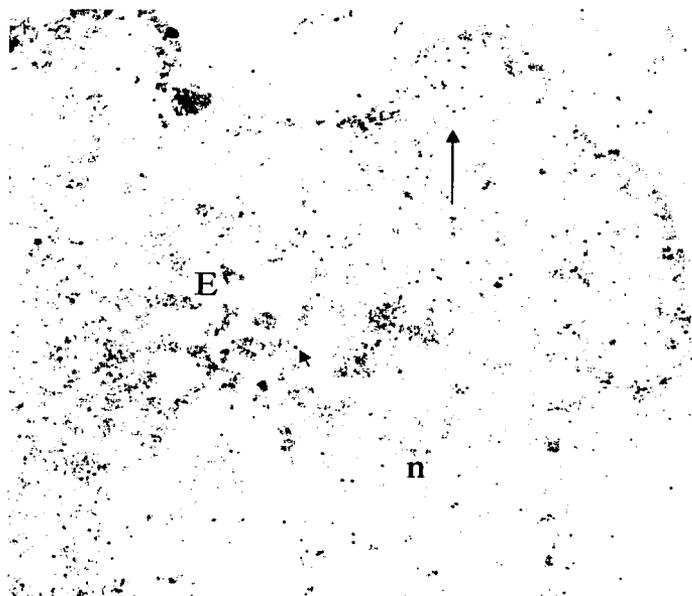


Fig. 4b, **Anti-DNA**. El endosoma (E) presenta partículas de oro, confirmando su componente de DNA (cabeza de flecha). El marcaje aparenta distribuirse uniformemente por el nucleoplasma. Existe una zona de agrupación muy conspicua (flecha) en la periferia del núcleo (n). 47,500x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con la aplicación de la técnica de plata amoniacal para organizador nucleolar en microscopía electrónica, se contrastan estructuras intranucleares (Fig. 5a). Este material es abundante en la periferia nuclear, formando un anillo granular con algunos cúmulos esferoides densos (Fig. 5b), además de estar presente en algunas extensiones del endosoma (Fig. 5b; Fig. 5c).

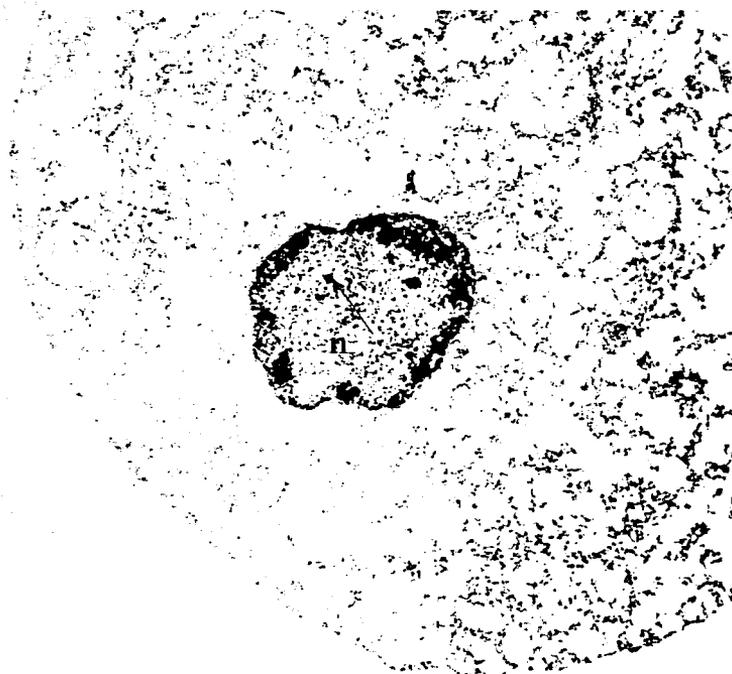


Fig. 5a, **Tinción de plata amoniacal**. La micrografía electrónica muestra un gran contraste en la periferia del núcleo (n), y en zonas centrales bien definidas (flecha). 12,800x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

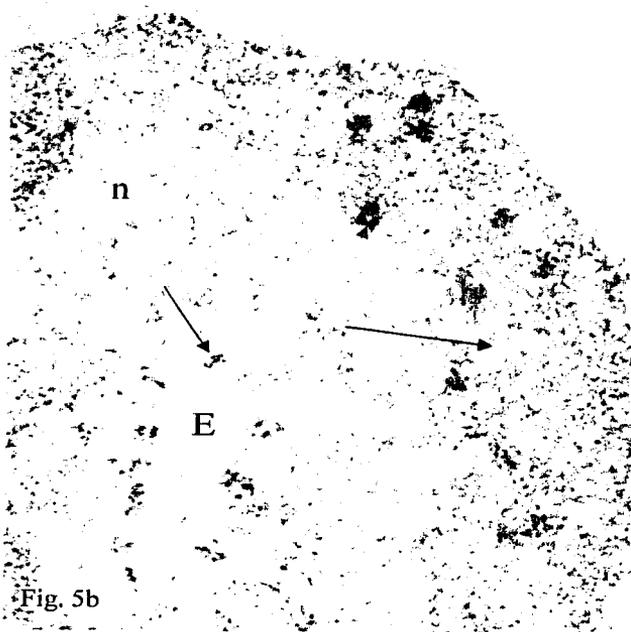


Fig. 5b

Fig. 5b, **Tinción de plata amoniacal.** En el núcleo (n) se contrasta la periferia (flecha) uniformemente, con excepción de unas motas muy electrón-densas (cabeza de flecha). Hacia el interior del núcleo se pueden ver teñidas algunas extensiones (flecha verde) del endosoma (E). 26,750x.

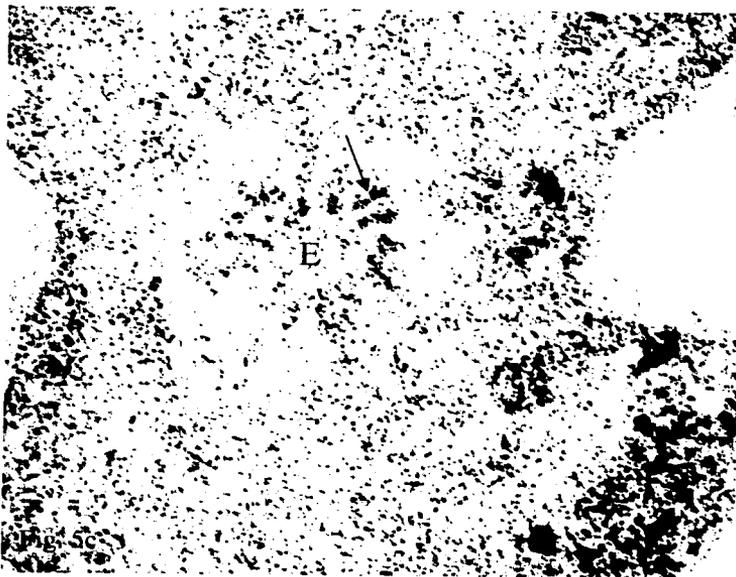


Fig. 5c

**TESIS CON FALLA LE ORIGEN**

Fig. 5c. **Tinción de plata amoniacal.** Se aprecian mejor las extensiones del endosoma (E) con material impregnado con plata (flecha). La periferia presenta mayor contraste, concentrándose en algunas motas oscuras (cabeza de flecha). 29,900x.

## Discusión

*Entamoeba histolytica* ha sido estudiada desde muchos puntos de vista, con objetivos frecuentemente patológicos y de biología molecular, pero aunque hay abundantes datos no se ha completado el estudio de su biología celular. En el presente trabajo se determinó la localización y morfología del nucléolo, basándonos en el empleo de métodos de citoquímica ultraestructural cuya validez ha sido comprobada por diversos autores.

Vázquez Nin y col. (1973) demostraron que el ácido fosfotúngstico a pH 2 contrasta únicamente el DNA en el ámbito nuclear pues tiñeron cromatina tratada con proteasas y el DNA de procariontes que carece de histonas.

La amina de osmio es un procedimiento específico de DNA que, como el método de Feulgen, se basa en la hidrólisis ácida de las purinas, que produce un aldehído en el carbono 1 de la desoxirribosa. Este carbonilo se detecta con una amina que es la fucsina decolorada (reactivo de Schiff) en la reacción de Feulgen y es la amina de osmio en la de Cogliati y Gautier (1973). Debido a este mecanismo de reacción, esta técnica tiene la misma especificidad por el DNA que su precursora, la reacción de Feulgen, cuya especificidad ha sido extensamente demostrada (Pearse, 1968). El osmio confiere al procedimiento de Cogliati y Gautier el contraste necesario en microscopía electrónica. Este método ha sido simplificado y hecho menos peligroso por Vázquez Nin y colaboradores (1995).

Lo que ocurre citoquímicamente en el procedimiento de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo (Bernhard, 1969), es que al contrastar primero con acetato de uranilo, éste se une a los ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos. Posteriormente el EDTA quela al uranilo y es retirado de la cromatina compacta rápidamente, quedando unido sólo a las ribonucleoproteínas. Por último, el citrato de plomo en los cortos tiempo empleados en este procedimiento sólo se une a los lugares en los que aún está presente el acetato de uranilo, que actúa este último como mordiente para el plomo reafirmando la tinción, que en este caso corresponde a las RNPs.

El azul de toluidina al estar en medio ácido se ioniza como una base, uniéndose a grupos fosfato, pero no se conoce el porqué se une preferencialmente a RNA y no a DNA. Sin embargo, se propone que en condiciones no desnaturizantes es más ávido por el RNA que por el DNA, que puede ser teñido llevando a cabo un procedimiento de despurinación previo (Smetana, 1967).

Como se había mencionado, el nitrato de plata, que comúnmente se ha nombrado como tinción de plata o AgNOR (Goodpasture y Bloom, 1975), tiñe a una gran variedad de proteínas nucleolares que son afines a la plata y se encuentran en los FC y DFC. Las más abundantes son la B23 (nucleofosmina, numatrina o NO38) y la C23 (nucleolina). Parece que para la primera proteína, el dominio que se une a la plata es un residuo de ácido aspártico, mientras que para la segunda, es un dominio rico en residuos de glutamato (Valdez y col., 1995).

El DAPI se usa para teñir DNA de doble cadena. Es 20 veces más fluorescente cuando se une a las bases A-T que cuando está libre en solución o uniéndose a bases G-C (en Spector y col., 1997).

El tetraóxido de osmio, postfijador y primer contrastante, se une a proteínas, ácidos nucleicos y principalmente a los lípidos polares de las membranas. Este último efecto permite la clásica visualización de las membranas biológicas como dos líneas oscuras separadas por una clara, lo que permitió distinguir claramente las vacuolas.

Estudios previos a este trabajo realizados empleando microscopía electrónica y técnicas preferenciales para poner de manifiesto la cromatina y las partículas ribonucleoproteicas (Jiménez-García y col., 1989), mostraron que la distribución del RNA y del DNA en el núcleo interfásico de algunas amibas es muy diferente al de plantas, hongos, animales y otros protistas. Este hecho ha llamado la atención de los autores que han estudiado a *E. histolytica*. Albach y col. (1977) desarrollaron una hipótesis sobre una posible presencia de rRNA en la periferia nuclear, dato que no había sido corroborado. En cambio, la ausencia de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear y la distribución preferencial del DNA en una estructura central (endosoma), han sido descritas varias veces (Albach y col., 1977; Orozco y col., 1988; Argüello y col., 1992; Gómez Conde y col., 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo empleando métodos de microscopía electrónica, contraste preferencial de DNA (PTA), contraste específico de DNA (amina de osmio) e inmunolocalizaciones del DNA sugieren que en el nucleoplasma de *E. histolytica* existe cromatina laxa que puede condensarse en el centro del núcleo formando parte de una estructura en forma de estrella llamada endosoma, de la cual salen extensiones que parecen

corresponder a regiones del organizador nucleolar, ya que son positivas al contraste con plata amoniacal que se asocia a dichas secuencias (Ag-NOR).

La presencia de cúmulos densos marcados con el contraste de plata para NOR en la periferia nuclear, hacen suponer que el DNA condensado cerca de la envoltura nuclear puede contener las regiones del organizador nucleolar; así se explicaría su presencia en dicha zona y la alta concentración de plata en ciertos puntos del anillo, vistos a alta resolución. Además, Huber y col. habían propuesto en 1989 la posible correspondencia del DNA periférico con el rDNA formado por moléculas circulares extracromosomales que ellos habían encontrado; lo que puede servir como apoyo a nuestros resultados. Cabe resaltar que no se había reportado que del endosoma salieran extensiones de DNA con la codificación de las regiones del organizador nucleolar, como se muestran en las micrografías electrónicas con tinción de plata amoniacal. Seguramente es rDNA cromosomal que contribuye a la transcripción del rRNA, además del rDNA circular extracromosomal encontrado (Huber y col., 1989). El conjunto de nuestras observaciones constituye la primera localización del organizador nucleolar en *E. histolytica*.

Por otro lado, gracias a la tinción preferencial de RNA (azul de toluidina en medio ácido) para microscopía óptica y el contraste preferencial de RNA (EDTA) para microscopía electrónica de transmisión, se observó que el material denso cercano a la membrana nuclear está compuesto principalmente de RNA, con excepción de grumos bien definidos que son positivos a procedimientos de localización de DNA para microscopía electrónica, ya mencionados. Además, los resultados obtenidos mediante la tinción de plata amoniacal llevada a cabo en este trabajo tanto en microscopía óptica como en electrónica, mostraron que junto al RNA periférico existen proteínas nucleolares, lo que demuestra que las estructuras fibrogranulares observadas en ese sitio corresponden a material nucleolar. Albach (1977) había sugerido la posible presencia de RNA ribosomal en la periferia del núcleo de amibas, pero no aportó ninguna prueba directa de ello, ni descartó la posibilidad de que se tratara de otro tipo de RNA intranuclear abundante como el mRNA.

Otros datos aportados por nuestras observaciones coinciden con muchos de los aspectos descritos en la literatura. Como lo es el caso del tamaño de los trofozoítos de la amiba *Entamoeba histolytica*, que miden aproximadamente de 10 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro (Martínez-

Palomo, 1989), dato que se pudo corroborar con tinciones generales como la de acetato de uranilo-citrato de plomo para microscopía electrónica.

Concordamos con Martínez-Palomo (1989) en que cada célula tiene forma distinta (pleomórfica), pero las modificaciones en la membrana plasmática como lobopodios, filopodios y uroide no pudieron ser distinguidos en los cortes realizados.

Todas las células observadas presentaban un sólo núcleo y como fueron estudiadas en interfase no se comprobó la permanencia de su membrana durante la división (Injejan y col., 1979).

En el citoplasma se pueden encontrar abundantes vacuolas de diferentes tamaños, con diámetros de entre 0.5 a 9  $\mu\text{m}$  vistas en el microscopio electrónico, que Martínez-Palomo (1989) diferenció en varios tipos. Verificamos que ninguno de los organelos estuvieran presentes en el citoplasma (Martínez-Palomo, 1989), en cambio los pequeños cuerpos que Martínez-Palomo (1989) describe como agregados ribosomales se ven claramente y en gran cantidad. La presencia de DNA en el citoplasma (Báez-Camargo y col., 1997) fue destacada con las tinciones para DNA con fluorescencia, DAPI y Feulgen, en donde claramente se ve luminiscencia en el citoplasma menos intensa que en el núcleo. A su vez, en las micrografías electrónicas de inmunolocalización de DNA, se distinguen partículas de oro en el citoplasma. El núcleo tiene esférulas periféricas (Chávez y col., 1972) que se pueden observar con contrastes generales para microscopía electrónica y a aumentos relativamente bajos.

Como *E. histolytica* presenta características de divergencia temprana dentro de los eucariontes, es probable que su núcleo encierre rasgos de un eucarionte ancestral como se piensa que sucede en *Trichomonas vaginalis*, organismo que presenta también un nucléolo periférico (Jiménez-García y colaboradores, datos no publicados).

## **Conclusiones**

Es claro que el trofozoito de *Entamoeba histolytica* no presenta un nucléolo esférico y central, con componentes fibrilares densos, componente granular ni centros fibrilares. Al contrario, el nucléolo es periférico, no está diferenciado en los componentes anteriores, no hay una clara delimitación entre el material fibroso del granular y no se identifican centros fibrilares. Los resultados sugieren que el material periférico y algunas extensiones del endosoma contienen material común.

Partiendo del entendido de que *E. histolytica* es un protista ancestral, los resultados sugieren que el nucléolo pudo originarse como un dominio periférico intranuclear. Por la arquitectura molecular del gen ribosomal de *E. histolytica*, que es similar al de otros eucariontes, resulta interesante especular que no es la organización molecular del rDNA la que determina la morfología y localización central del nucléolo. Así mismo, este trabajo no descarta la posible coexistencia de mRNA en dominios nucleolares y abre la posibilidad de explorar este aspecto de la organización nuclear en amibas.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## Referencias

- Albach R. A., Booden T., Boonlayangoor P. (1977). *Entamoeba histolytica*: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Experimental Parasitology* 42, 248-259.
- Alberts B, Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. 4a ed. Garland Science. Nueva York.
- Argüello C., Valenzuela B., Rangel E. (1992). Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Archives of Medical Research* 23:2, 77-80.
- Báez-Camargo M., Sánchez T., Solís F., Rodríguez M. A., Contreras G., Chávez P., Reverón A. M. Orozco E. (1997). Cytoplasmic DNA in *Entamoeba histolytica* : its biological significance. *Archives of Medical Research* 28: 1, 5-9.
- Bernhard W. (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. *Journal of Ultrastructural Research* 27, 250-265.
- Bhattacharya A., Satish S., Bagchi A., Bhattacharya S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Parasitology* 30, 401-410.
- Brock, Madiagn M. T., Martinko J. M., Parker J. (1998). *Biología de los Microorganismos*. 8a edición. Prentice-Hall. Madrid.
- Chávez B., Martínez Palomo A., de la Torre M. (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, y *E. coli*. *Archivos de Investigación Médica (Méx.)* 9, 113-116.
- Chévez A., Segura M., Corona D., Iturbe-Alessio I. (1972). Esférulas yuxtannucleares de *Entamoeba histolytica*, estudio morfológico y dinámico. *Archivos de Investigación Médica (Méx.)* 3:2, 257-264.
- Cogliati R., Gautier A. (1973). Mise en évidence de l'DNA et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *Comptes Rendues de la Academie de Science, Serie D*. 276, 3041-3044.
- Cooper G. M. (2000). *The Cell a Molecular Approach*. 2a ed. ASM Press. Washington.
- Dhar S. K., Choudhury N. R., Bhattacharaya A., Bhattacharya S. (1995). A multitude of circular DNAs exist in the nucleus of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 70, 203-206.
- Dhar S. K., Choudhury N. R., Mittal V., Bhattacharaya A., Bhattacharya S. (1996). Replication initiates at multiple dispersed sites in the ribosomal DNA plasmid of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Cell Biology* 16:5, 2314-2324.
- Dundr M., Misteli T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. Review. *Biochemical Journal* 356, 297-310.
- Echeverría O. M., Ontiveros F. Ll. (2001). *Biología del núcleo celular*. Las Prensas de Ciencias. UNAM. México.
- Edlind T. D., Li J., Visvesvara G. S., Vodkin M. H., McLaughlin G. L., Katiyar S. K. (1996). Phylogenetics analysis of  $\beta$ -tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 2, 359-367.
- Flores E., Reverón A. M., Báez-Camargo M., Orozco E. (1997). Identification of putative linear and circular DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* molecular karyotype. *Archives of Medical Research* 28, 5-7.

- García S. N., Pillus L. (1999) Net results of nucleolar dynamics. Minireview. *Cell* 97, 825-828
- Gómez-Conde E., Hernández-Jauregui P., González-Camacho M., Orozco E., Argüello L. C. (1998). Chromatin organization during the nuclear division stages of live *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Experimental Parasitology* 89, 122-124.
- González-Oliver A., Echeverría O. M., Hernández-Pando R., Vázquez-Nin G. H. (1997). Ultrastructural study of the nuclei of normal, dysplastic, and carcinomatous epithelial cells of the human cervix uteri. *Ultrastructural Pathology* 21, 379-392.
- Goodpasture C., Bloom S. E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53, 37-50.
- Gribaldo S., Philippe H. (2002). Ancient phylogenetic relationships. *Theoretical Population Biology* 61, 391-408.
- Huang S. (2000). Perinucleolar structures. Review. *Journal of Structural Biology* 129, 233-240.
- Huang S. (2002). Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus?. *Journal of Cell Biology* 157: 5, 739-741.
- Huber M., Koller B., Gitler C., Mirelman D., Revel S., Rozenblatt S., Garfinkel L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 32, 285-296.
- Injeyan H., Huebner E., Meerovitch E. (1979). Studies on a morphologically distinct colchicine resistant variant of *Entamoeba sp.* *Journal of Protozoology* 26, 253-259.
- Jiménez-García L. F. (1988). El Nucléolo: relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias, UNAM. 1-77 pp.
- Jiménez-García L. F., Elizundia J. M., López-Zamorano B., Maciel A., Zavala G., Echeverría O. M., Vázquez-Nin G. H. (1989). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists. *BioSystems* 22, 103-116.
- Jiménez-García L. F., Röthblum L. I., Busch H., Ochs R. L. (1989). Nucleologenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biology of the Cell* 65, 239-246.
- Jiménez-García L. F., Segura-Valdez M. de L. Ochs R. L., Echeverría O. M., Vázquez-Nin G. H., Busch H. (1993). Electron microscopy localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic *in situ* hybridization. *Experimental Cell Research* 207, 220-225.
- Kiss T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. Minireview. *Cell* 109, 145-148.
- Lamond A. I., Earnshaw W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.
- Leary D. J., Huang S. (2001). Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. Minireview. *FEBS letters* 509, 145-150.
- Leung A. K. L., Lamond A. (2002). In vivo analysis of NHPX reveals a novel nucleolar localization pathway involving a transient accumulation in splicing speckles. *Journal of Cell Biology* 157: 4, 615-629.
- Lioutas C., Schmetz C., Tannich E. (1995) Identification of various circular DNA molecules in *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 80, 349-352.

- López-Revilla R., Gómez R. (1978). *Entamoeba histolytica*, *E. invadens* and *E. moshkovskii*: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Experimental Parasitology* 44, 243-248.
- Lynch E. C., Rosenberg I. M., Gitler C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *E.M.B.O. Journal* 1, 801-804.
- Margulis L. (1981). Symbiosis in cell evolution. W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- Martínez-Palomo A. (1989). Amibiasis. Médica Panamericana. México.
- Muñoz M. L., Rojkind M., Calderón J., Tanimoto M., Arias-Negrete S., Martínez-Palomo A. (1984). *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *Journal of Protozoology* 31, 468-470.
- Olson M. O. J., Dundr M., Szebeni A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. Review. *Cell Biology* 10, 189-196.
- Orozco E., Solís F. J., Domínguez J., Chávez B., Hernández F. (1988). *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. *Experimental Parasitology* 67, 85-95.
- Pearse A.G.E. (1968). Histochemistry Theoretical and Applied. Churchill. London. vol. I.
- Pederson T. , Politz J. C. (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. Minireview. *Journal of Cell Biology* 148:6, 1091-1095.
- Pikaard C. S. (2000). The epigenetics of nucleolar dominance. Review. *Trends in Genetics* 16:11, 495-499.
- Ramos M. A., Sánchez-López R., Olvera F., Alagón A. (2002). *Entamoeba histolytica* genomic organization: identification, structure, and phylogenetic relationship of two serine-threonine protein kinases. *Experimental Parasitology* 100, 135-139.
- Savino T. M., Gébrane-Younès J, De Mey J., Sibarita J. B., Hernández-Verdun D. (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *Journal of Cell Biology* 153:5, 1097-1110.
- Scheer U., Hock R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 385-390.
- Schwarzacher H. G., Mosgoeller W. (2000). Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. *Cytogenetics and Cell Genetics* 91, 243-254.
- Sehgal D., Mittal V. Ramachandran S., Dhar S. K., Bhattacharya A., Bhattacharya S. (1994). Nucleotide sequence organization and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67:2, 205-214.
- Shaw P. J., Jordan E. G. (1995). The nucleolus. *Annual Review in Cell and Developmental Biology* 11, 93-121.
- Smetana K. (1967). Basic histochemical and cytochemical methods. In: Methods in Cancer Research (Busch H. Ed.). Academic Press Inc. Nueva York. vol. II.
- Solís F. J., Barrios R. (1991). *Entamoeba histolytica*: microtubule movement during mitosis. *Experimental Parasitology* 73, 276-284.
- Solís F. J., Adams H. P. (1997). New observation of the nuclear division in *Entamoeba histolytica*. The chromosomes. *Biology of the Cell* 89, 475-480.
- Spector D. L., Goldman B. O., Leinwand L. A. (1997). Cells: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Nueva York. vol. II.

- Valdés J., Hernández F, Ocadiz R., Orozco E. (1990). Molecular karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 537-541.
- Valdez B. C., Henning D., Le T. V., Busch H. (1995). Specific aspartic acidic-rich sequences are responsible for silver staining of nucleolar proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207:2, 485-491.
- Vázquez-Nin G. H., Chávez B., Tomás-Martín C. (1973). A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *Journal de Microscopie* 16, 243-246.
- Vázquez-Nin G. H., Biggiogera M., Echeverría O. M. (1995). Activation of osmium ammine by SO<sub>2</sub>-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *European Journal of Histochemistry* 39, 101-106.
- Vázquez-Nin G. H., Echeverría O. M. (2000). Introducción a la Microscopia Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. *Fac. Ciencias/Fondo de Cultura Económica*. México.
- Visintin R., Amon A. (2000). The nucleus: the magician's for cell cycle tricks. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 372-377.
- Young J. D. E., Young T. M., Lu L. P. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine* 156, 1677-1690.