

00377
17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“ORGANIZACION CELULAR DE FACTORES DE *SPLICING*
EN VERTEBRADOS PRIMITIVOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

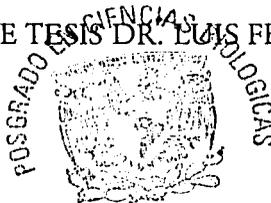
P R E S E N T A

REYNA LARA MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2003



COORDINACIÓN
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

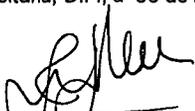
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de octubre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Lara Martínez Reyna, con número de cuenta 91603195, con la tesis titulada: "Organización celular de factores de Splicing en vertebrados primitivos", bajo la dirección del(a) Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dr. Alfonso Cárabez Trejo
Secretario:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. Sara Frias Vázquez
Suplente:	Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de noviembre de 2003.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por permitirme integrar a su laboratorio, por su paciencia, sus enseñanzas, por dirigir la tesis y decidido apoyo durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Lourdes Segura Valdez por su apoyo incondicional y enseñanzas durante mi estancia en el Laboratorio de Microscopía Confocal.

A la Dra. Sara Frías Vázquez y al Dr. Alfonso Carabez Trejo por aceptar formar parte de mi comité tutorial, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo y por revisar el manuscrito final.

A la Dra. Annie Pardo Semo y la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por revisar el manuscrito y por sus sugerencias para mejorarlo.

Al Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola del Laboratorio de Morfología del INER por permitirme usar su analizador y procesador de imágenes para la captura de las imágenes histológicas.

A Guadalupe Hirriart del Laboratorio de Morfología del INER por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras y por su amistad.

A la Dra. Julia Pérez y al M. en C. José Cisneros por su valiosa ayuda en la realización del Western blot.

Al Dr. Genrdo Hebert Vázquez-Nin y a la Dra. Olga Echeverría del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM por permitirme el uso de la infraestructura del laboratorio.

A Juan Lara por el diseño e impresión de la tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A todos mis compañeros del laboratorio de Microscopía confocal y del laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión por su amistad y compañerismo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México donde me he formado profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. Reg. 158332) por otorgarme una Beca de maestría durante el desarrollo de este trabajo.

Esta tesis fue parcialmente apoyada por el proyecto PAPIIT / DGAPA-UNAM IN221202.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias por apoyarme en la asistencia al VI Interamerican Congress on Electron Microscopy.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A Silvia y Juan que siempre están contigo, brindandome su apoyo y cariño,
que es algo que no tengo muchas palabras para agradecerles sólo, ¡mil gracias!*

*A esas personas con quienes las circunstancias me han unido
y se han vuelto parte importante de mi vida.*

A mis amigos, a los que tuve y aún más a lo que cuento

A Dios que me permite continuar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

S

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	9
RESUMEN	11
SUMMARY	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	14
ANTECEDENTES	
1. Transcripción	15
2. Procesamiento del pre-mRNA	16
2.1 <i>Capping</i>	16
2.2 Poliadenilación	17
2.3 <i>Splicing</i>	18
2.3.1 Reacciones catalíticas del <i>Splicing</i>	18
2.3.2 Ciclo del <i>spliceosoma</i>	19
2.3.3 Biogénesis de las UsnRNPs	20
2.3.4 Proteínas SR	22
2.3.5 Proteínas de caja DEAD y DEAH	26
3. Dominios intranucleares del <i>splicing</i> (patrón moteado)	27
3.1 Gránulos intercromatinianos	29
3.2 Fibras pericromatinianas	31
3.3 Cuerpos espiralados o Cuerpos de Cajal	32
4. Evolución de los Cordados	33
5. Evolución de los Vertebrados	34
5.1 Características Generales de los Vertebrados	34
6. Evolución de las Lampreas	35
6.1 Posición en el Reino Animal de las Lampreas	36

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Página
6.2 Características Generales de las Lampreas	37
6.3 Biología de <i>Lampetra geminis</i>	40
6.3.1 Diagnósis	
6.3.2 Distribución	
6.3.3 Aspectos Biológicos	
6.3.4 Aspectos Ecológicos	41
6.4 Estudios Moleculares	42
METODOLOGÍA	43
Colecta de Organismos	
Western Blot	
Microscopía óptica	44
Hematoxilina-Eosina	
Inmunofluorescencia	45
Inmunolocalización Cromogénica	
Microscopía Inmunofluorescente Confocal	46
Cuantificación de Motas	
Microscopía Electrónica de Transmisión	
Técnica convencional y preferencial para ribonucleoproteínas	47
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFÍA CITADA	67

LISTA DE ABREVIATURAS

CBs	Cuerpos de Cajal
CHAPS	3[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-Propanosulfato
CF-I	Factor de especificidad de rompimiento
CMP	Monofosfato de citidina
CPSF	Factor de especificidad de rompimiento y poliadenilación
CstF	Factor de rompimiento y estimulación
CTD	Dominio Carboxilo terminal
DNA	Acido desoxirribonucleico
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	N-12-Hidroxietilpiperazina-N-1 butano-ácido sulfónico
hnRNAs	RNAs heterogéneos nucleares
IGC	Gránulos intereromatínicos
IgG	Inmunoglobulinas G
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
PAP	Poly(A) polimerasa
PFC	Fibras perieromatínicas
pre-mRNA	Precursor del RNA mensajero
RRMs	Motivos de reconocimiento al RNA
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
RNAP	RNA polimerasa
scRNAs	Acido ribonucleico pequeños citoplásmicos
SR ó RS	Dominios ricos en serina/arginina
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

	Página
Figura 1. Mecanismo del <i>splicing</i> del pre-mRNA.	19
Figura 2. Ensamblaje del <i>spliceosoma</i> .	20
Figura 3. Vía de Biogénesis de las U1snRNPs.	21
Figura 4. Estructura de la proteína SF2/ASF, proteína SR del tipo II.	23
Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína SF27ASF.	25
Figura 6. Imágenes de inmunofluorescencia mostrando los diferentes dominios nucleares, observados por diversos investigadores.	27
Figura 7. Compartimentos de factores de <i>splicing</i> visualizados por microscopía de fluorescencia con rodamina.	28
Figura 8. Reclutamiento de los factores de <i>splicing</i> por las motas.	29
Figura 9. Micrografía electrónica de Transmisión de un núcleo de hepatocito de conejo.	30
Figura 10. Representación de la organización ultraestructural del núcleo celular interfásico de mamíferos.	31
Figura 11. Tres posibles modelos para las funciones de los CBs.	33
Figura 12. Filogenia del phylum Chordata.	33
Figura 13. Boca succionadora de la lamprea <i>Petromyzon</i> , mostrando los dientes epidérmicos.	37
Figura 14. Esquema representativo del sistema Río Lerma, Lago de Cuitzeo-Río Grande de Morelia en el Centro de México, mostrando las localidades donde se han capturado Lampreas, incluyendo el Parque Nacional Insurgente José María Morelos y el Arroyo Irapeo.	39
Figura 15. Imágenes de <i>Lampetra geminis</i> en uno de sus habitats naturales, el Parque Nacional Insurgente José María Morelos, Morelia, Mich.	48
Figura 16. Reconstrucción topológica de <i>L. geminis</i> a nivel de ojos, encéfalo y abertura bucal donde se pudieron reconocer algunas otras estructuras.	50
Figura 17. Reconstrucción topológica de <i>L. geminis</i> a nivel de notocorda, esófago y sacos branquiales, donde estos últimos ocupan más del 50% de la cavidad.	51
Figura 18. Reconstrucción topológica de <i>L. geminis</i> a nivel de corazón y sacos branquiales.	52
Figura 19. Reconstrucción topológica de <i>L. geminis</i> a nivel de ovarios.	53

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 20. SDS-PAGE de proteínas totales de <i>L. geminis</i> (Lg) en gel de acrilamida/bis al 12.5% en condiciones reductoras y teñido con azul de Coomassie.	54
Figura 21. Detección de proteínas SR mediante inmunoblotting.	54
Figura 22. Localización inmunofluorescente de núcleos celulares de varios tejidos de <i>L. geminis</i> , visualizados previa inmunolocalización con el anticuerpo anti-3C5.	55
Figura 23. Inmunolocalización de proteínas SR en núcleos celulares individuales de varios tejidos de <i>L. geminis</i> .	56
Figura 24. Diez cortes óptimos meridianos de 100 nm y su respectiva reconstrucción de una región del cordón espinal de <i>L. geminis</i> , observados por microscopía confocal (reacción cromogénica) donde se aprecian varias neuronas.	57
Figura 25. Cortes óptimos meridianos de 100 nm de grosor de una neurona y su respectiva reconstrucción posterior a una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-3C5 y observados por microscopía confocal, donde se observan motas de diferentes tamaños y diferentes formas (redondas y circulares).	58
Figura 26. Inmunolocalización de proteínas SR por reacción cromogénica (AP-FastRed) en neuronas de <i>L. geminis</i> .	59
Figura 27. Micrografías electrónicas de transmisión de núcleos de hepatocitos de <i>L. geminis</i> .	60
Figura 28. Núcleos celulares individuales amplificados, visualizados con la técnica de inmunolocalización cromogénica.	62
Tabla 1. Aparición de los ancestros de las lampreas (Ostracodermos), representado en la escala del tiempo geológico.	35
Tabla 2. Posición Taxonómica de los Agnatos en el Reino Animal.	36
Gráfica 1. Cuantificación del número de motas por núcleo de células de diferentes tejidos.	61

RESUMEN

El núcleo celular es una estructura molecular muy compleja, altamente dinámica y organizada en compartimientos relacionados con la expresión génica. Uno de estos compartimientos son las *speckles* que también son conocidas como compartimientos de factores de *splicing* o patrón moteado cuando se analiza por microscopía de fluorescencia. El patrón moteado está constituido de 20 a 50 manchas brillantes en donde se concentran las moléculas de *splicing*. Este patrón moteado se ha observado en células de mamífero en cultivo y recientemente en diferentes células de varios tejidos de rata. En ambos, su morfología se modifica dependiendo de la actividad fisiológica. También se ha observado que el número y la distribución de motas parecen variar entre tejidos, lo que sugiere que su organización depende de la diferenciación celular y por ello parece estar determinado genéticamente.

El presente estudio se enfocó a analizar si la distribución de los factores de *splicing* en vertebrados primitivos es similar a la observada en células en cultivo y en tejidos de mamíferos. Se estudiaron varios tejidos de la lamprea *Lampetra geminis*, realizando un reconocimiento histológico de esta especie por medio de la tinción hematoxilina-eosina, pues la información bibliográfica es escasa. Se llevó a cabo un análisis por Western Blot con el uso de anticuerpos contra la familia de proteínas SR, un factor de *splicing* rico en el dipéptido serina-arginina, para determinar la presencia de estas proteínas en la

lamprea. Se realizaron inmunofluorescencias y microscopía confocal de diferentes tejidos para un análisis de mayor resolución sobre la morfología de las motas, realizando cortes ópticos de neuronas, hepatocitos y células de la notocorda, que por su tamaño facilita el análisis. Con la técnica de inmunolocalización cromogénica se contó el número de motas presentes por núcleo. Además, fragmentos de hígado de *L. geminis* se procesaron para microscopía electrónica de transmisión.

Al mismo tiempo que se realizó el análisis histológico general de la especie, se comprobó la existencia de epítomos de las proteínas SR en extractos de proteínas totales de lamprea que fueran reconocidos por el anticuerpo heterólogo utilizado. Se observaron patrones moteados en todas las células de corazón, cerebro, branquias, piel, músculo, cartilago, cordón espinal, notocorda e hígado. El análisis confocal y la inmunolocalización cromogénica mostró que el número de motas varía entre los diferentes tipos celulares, siendo más abundante en neuronas y menos en notocorda. Ultraestructuralmente en hepatocitos no se observan cumulos de gránulos intereromatinianos, sino una red fibrogranular dispersa en el nucleoplasma.

Los resultados indican la presencia de patrón moteado en núcleos de células de diferentes tejidos de lamprea y sugieren que este patrón se originó hace más de 400 millones de años.

SUMMARY

The cell nucleus is a very complex molecular structure, highly dynamic and organized in compartments related to gene expression. One of these compartments is the so called speckles also known as splicing factor compartments or speckled pattern, when analyzed by fluorescence microscopy. The speckled pattern is composed of some 20-50 bright spots where the splicing molecules are concentrated. This pattern has been observed in cultured mammalian cells and recently in different cells of several rat tissues. In both cases, its morphology changes depending upon the physiological activity. It has also been observed that the number and distribution of speckles seems to vary among tissues, suggesting that its organization depends on cellular differentiation and therefore seems to be genetically determined.

This work was conducted to see whether or not the splicing factor distribution in primitive vertebrates is similar to that observed in cultured cells and in mammalian tissues. We studied several tissues of the lamprey *Lampetra geminis*, performing as a first step a histological recognition of the species by hematoxylin-eosin, due to the absence of bibliography on this species. A western blot was conducted by using antibodies against the SR protein family, a serine-arginine rich splicing factor, to determine the presence of these pro-

teins in lamprey. Immunofluorescence and confocal microscopy was performed in different tissues to a better resolution analysis on the morphology of speckles, making optical sections of neurons, hepatocytes and notochord cells, that because of their size, make the analysis easier. By chromogenic immunolocalization, we count the number of speckles per cell nucleus. Moreover, fragments of *L. geminis* liver were processed for transmission electron microscopy.

At the same time of the general histological study of the species, we monitored the presence of epitopes of the SR protein of lamprey by using the heterologous antibody. Speckled pattern were observed in heart, brain, branchias, skin, muscle, cartilage, spinal cord, notochord and liver cells. Confocal analysis and chromogenic immunolocalization showed that the number of speckles varies among the different cell types, being more abundant in neurons and to a lesser extent in notochord. Ultrastructurally, in hepatocytes no aggregates of interchromatin granules, but a dispersed fibrogranular network in the nucleoplasm was observed.

The results indicate the presence of speckled pattern in cell nuclei of different tissues of lamprey and suggest that this pattern was originated more than 400 million years ago.

INTRODUCCIÓN

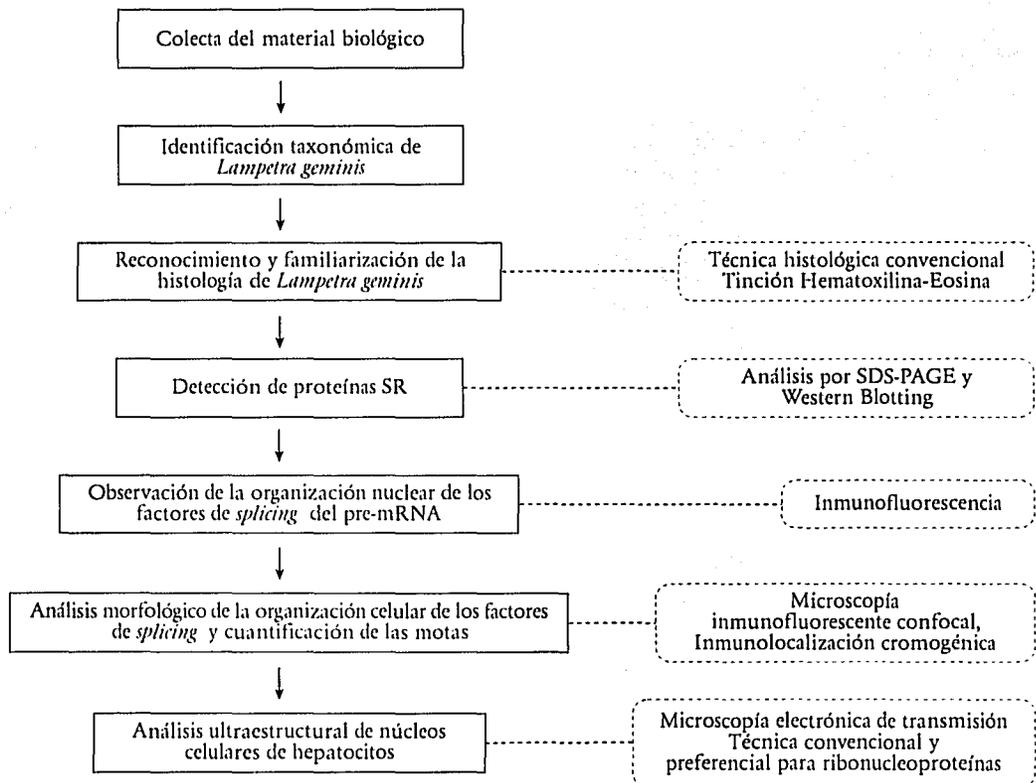
En el núcleo celular de las células de mamífero en cultivo los factores de *splicing* están distribuidos en dominios nucleares conocidos como patrón moteado o compartimientos de factores de *splicing*, estos compartimientos eran considerados artefactos propios de los cultivos. Sin embargo, se ha demostrado que en el núcleo celular de varios tejidos

diferenciados de mamíferos se mantienen estos dominios, además son dinámicos y reflejan la actividad transcripcional y del *splicing*. Por lo tanto, el presente estudio se enfocó a explorar como es la organización celular de los factores de *splicing* en distintos tejidos de vertebrados primitivos y si su morfología cambia de un tejido a otro.

OBJETIVOS

1. Conocer la distribución celular de los factores de "splicing" en células de tejidos de vertebrados primitivos (*Lampetra geminis*).
2. Describir la histología de *Lampetra geminis* a tres diferentes niveles como una contribución a la biología de la especie.

DISEÑO EXPERIMENTAL



ANTECEDENTES

1. TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es el primer evento de la expresión génica y los pasos generales para que se lleve a cabo son: inicio de la transcripción, alargamiento y terminación. La síntesis de RNA (rRNA, mRNA, tRNA) a partir de un molde de DNA es mediada por la RNA polimerasa (RNAP). En eucariontes existen tres RNAPs que difieren en su composición de subunidades, en su sensibilidad hacia *amanitina* y en el grupo de genes que transcriben:

- a. RNA polimerasa I. Transcribe los genes del RNA ribosomal (rRNA).
- b. RNA polimerasa II. Transcribe los genes del RNA mensajero (mRNA) y algunos de los genes de los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) como los U1, U2, U3, U4 y U5.
- c. RNA polimerasa III. Transcribe genes de los RNAs pequeños citoplásmicos (scRNAs), los genes del RNA de transferencia (tRNA), los genes de otros snRNAs como el U6 y el 7SLRNA. También transcribe los genes del rRNA 5S.

La transcripción requiere de regiones promotoras que generalmente contienen las siguientes señales: la caja TATA, localizada 19-27 bp corriente arriba del punto de inicio de la transcripción, la caja CAAT cor-

riente arriba, y una o más copias de la GC, consistente de las secuencias GGGCGG o sus variantes y rodeada de cajas CAAT. La caja TATA generalmente está rodeada por secuencias ricas en GC y controla la elección del punto de inicio de la transcripción. Las cajas GC y CAAT pueden funcionar en cualquier orientación y controlan la unión de la RNAP al DNA. Sin embargo ninguna de las dos señales son esenciales para que el promotor funcione, pues algunos genes no poseen una caja TATA y aún así pueden iniciar la transcripción (Graur & Li, 2000).

La RNAP no inicia la transcripción por sí misma. Depende de los factores generales de transcripción TFIID (que reconoce la caja TATA por delante del punto de iniciación), TFIIF, TFIIA, TFIIB y TFIIH, que se ensamblan secuencialmente para formar el complejo de transcripción.

Además de las señales en la región promotora, hay otro tipo de señales llamadas intensificadoras ("enhancers"), que se localizan fuera de la región promotora pero pueden intensificar la iniciación de la transcripción (Lewin, 2000). Un intensificador puede consistir de varios elementos moduladores, pueden funcionar en cualquier dirección y pueden ser regiones flanqueadas 5' o 3' de un intrón.

Después de unirse al promotor, la RNAP abre una región localizada del molde de DNA, de forma que quedan expuestos los nucleótidos de ambas cadenas de una pequeña zona de DNA. Una de las dos cadenas expuestas del DNA actúa como patrón para el apareamiento de bases complementarias con monómeros de ribonucleósido trifosfato entrantes, dos de los cuales se unen entre sí por la RNAP y se inicia una cadena de RNA. Entonces, la molécula de RNAP se mueve progresivamente a lo largo del DNA, desenrollando la hélice de DNA lo necesario para exponer una nueva región de la cadena patrón para el apareamiento de bases. De esta forma, la cadena de RNA va creciendo nucleótido a nucleótido en dirección 5'-3'. El proceso de elongación de la cadena continua hasta que la enzima encuentra una segunda secuencia especial del DNA, la señal de terminación, en cuyo momento la RNAP se separa tanto del DNA patrón como de la cadena de RNA recién formada dando como resultado el transcrito primario o pre-RNA (ribosomal, transferencia o mensajero).

2. Procesamiento del mRNA.

Los transcritos producto de la RNAP II se conocen con el nombre de RNAs heterogeneos nucleares (hnRNAs) pues una de las primeras características utilizadas para distinguirlos de otros RNAs del núcleo fue la variedad de sus tamaños. Muchos de estos transcritos están destinados a abandonar el núcleo como moléculas de mRNA y a medida que son sintetizados, son modificados covalentemente en ambos extremos, 5' y 3', de manera que se diferencian claramente de los transcritos producidos por las otras RNA polimerasas. Posteriormente, estas modificaciones (*capping*, *splicing* y poliadenilación) serán útiles para su función como moléculas de mRNA en el citoplasma (Alberts, 1994).

2.1 Capping del extremo 5'

En todas las células de eucariontes, el extremo 5' de todos los pre-mRNAs es modificado covalentemente por la estructura llamada *cap* (m⁷GppN), la cual es requerida para el *splicing*, la exportación del mRNA del núcleo al citoplasma, la iniciación de la traducción y la protección del mRNA contra exonucleasas 5'3' (Wahle y Keller, 1997). Esta estructura es esencial para el crecimiento celular (Ho *et al.*, 1998a).

La estructura *cap* m⁷GppN del mRNA eucariote se forma cotranscripcionalmente por tres reacciones enzimáticas: (i) el trifosfato (pppN) del extremo 5' del RNA naciente es hidrolizado a un difosfato (ppN) por la RNA trifosfatasa; (ii) el extremo del difosfato es protegido por un capuchon con una guanosina monofosfatada (GMP) por GTP:RNA guanililtransferasa; y (iii) el cap GppN es metilado por S-adenosilmetionina (AdoMet):RNA (guanina-N⁷) metiltransferasa (Shuman, 1995).

El mecanismo de la guanilación del *cap* se da por la transferencia de GMP desde GTP al difosfato 5' terminal del RNA ocurre en una reacción de dos fases que involucra a la enzima GMP. La GMP se une a la enzima a través de un enlace iónico-amida (PN) a el grupo-amino de un residuo de lisina dentro de un motivo conservado KxDG (motivo I). La proteína consiste de dos dominios con una hendidura profunda entre ellos. El sitio de unión de la GTP esta compuesta por motivos I y otros cinco motivos (III, IIIa, IV, V y VI). El grupo-amino del sitio activo de Lys en el motivo I se posiciona cerca del fosfato de GTP. La estructura cristalina revela un gran cambio conformacional en la enzima enlazada a

GTP, de un estado abierto a uno cerrado, que une el motivo VI entra en contacto con las fosfatasa y de GTP y reorienta los fosfatos para en línea atacar por el sitio activo de la Lys. Cuando el cristal se baña en manganeso se forma la enzima covalente intermediaria CMP (monofosfato de citidina). Sin embargo, sólo la enzima en la conformación cerrada es activa. Los cambios conformacionales coordinan la entrada del sustrato, la reacción química y la salida del producto durante la catálisis (Ho *et al.*, 1998a).

En el *capping* existen varios eventos con potencial regulador incluyendo (i) aquellos que influyen el objetivo de la enzima *capping* para la maquinaria de transcripción y (ii) aquellos que afectan la actividad de la enzima *capping* (Ho *et al.*, 1998a). Los estudios realizados sugieren que la guaniltransferasa de mamíferos y levaduras, se enlazan por unión directa al dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mas grande de la RNAP II. La interacción guanil transferasa-CTD es eventual en la fosforilación del CTD; posteriormente, el *capping* puede ser regulado por la fosforilación y desfosforilación del CTD durante la elongación transcripcional (Ho *et al.*, 1998b).

La transferencia de un grupo metilo de S-adenosilmetionina a la N7 de la base guanina resulta en m⁷GpppN, también llamado *cap 0*, que se encuentra en el extremo 5' del pre-mRNA de las levaduras y plantas. El *cap 0* puede ser modificado por tres metiltransferasas adicionales a la Sadenosilmetionina. La metilación del grupo OH-2' de la ribosa del primer nucleótido codificado genera el *cap 1*, la metilación adicional del grupo OH-2' del segundo nucleótido genera el *cap 2*. El *cap 1* y 2 se encuentran en células de mamíferos. Las metilaciones son catalizadas por dos distintas 2'-O-metiltransferasas (Ho *et al.*, 1998a).

2.2 Poliadenilación

El otro tipo de modificación covalente se realiza en el extremo 3' de casi todos los mRNAs eucariotes donde se adiciona una cola de poly(A) de hasta 200 residuos de adenosina, previo rompimiento del mRNA. La poliadenilación está involucrada en todos los aspectos del metabolismo del mRNA (Varani y Nagai, 1998), se ha propuesto que esta estructura proporciona estabilidad al mRNA pues su remoción provoca la degradación de ciertos mRNAs. Además está involucrada en el transporte de los mRNAs maduros del núcleo hacia el citoplasma y promueve la eficiencia en la traducción de los mRNAs (Bentley, 1999). Aunque el tallo de poly(A) no está involucrado directamente en el *splicing*, se ha observado *in vivo* que la poliadenilación y el *splicing* están ligados (Wahle y Keller, 1997).

La reacción de poliadenilación inicia con el reconocimiento de una secuencia señal representada por el hexanucleótido AAUAAA (necesaria para el rompimiento y la poliadenilación) que es reconocida por un CPSF (factor de especificidad de rompimiento y poliadenilación); la unión al pre-mRNA se realiza por un complejo multiproteico adicional, el CstF (factor de rompimiento y estimulación). El rompimiento del pre-mRNA se realiza 10 a 30 nucleótidos corriente abajo de la señal AAUAAA y posteriormente es poliadenilado por la enzima poly(A) polimerasa (PAP) asociada con el complejo CPSF. El CstF interactúa directamente con el elemento "enhancer" rico en GU corriente abajo, a través del componente CstF-64 y la unión del factor de especificidad de rompimiento (CF-I) a la señal AAUAAA (Varani y Nagai, 1998).

La reacción de poliadenilación se realiza en dos etapas: en la primera una secuencia corta oligo(A) (~10 residuos) se adiciona en el extremo 3' catalizada por la enzima poly(A) polimerasa después del rompimiento endonucleolítico en un sitio específico, en la segunda etapa la poly(A) elonga la cola oligo(A), creciendo progresivamente en presencia de CPSF y PABP (Wahle, 1995; Lewin, 2000).

2.3 *Splicing* (corte y empalme)

En 1977 mediante la técnica de los "bucles R" se descubrió que la mayoría de los genes de eucariontes están interrumpidos, se visualizaron al microscopio electrónico complejos de mRNA y DNA apareados que permitieron comparar las secuencias de nucleótidos entre ambas moléculas de tal forma que las regiones del DNA que no hibridaban con las secuencias del RNA se visualizaron en forma de bucles de DNA. Este método primero se aplicó para el análisis de las secuencias de DNA y mRNA del adenovirus humano, observándose que el DNA viral contenía secuencia que no se encontraban en el mRNA maduro. Estudios similares dieron los mismos resultados para el gen de la globina y de la ovoalbúmina de vertebrados, entonces a las secuencias presentes en el DNA pero no en el mRNA se les llamó intrones y a las secuencias presentes tanto en el DNA como en el mRNA se les denominó exones (Alberts, 1994).

Entonces, el transcrito primario del RNA mensajero o pre-mRNA contiene exones e intrones (secuencias codificantes y no codificantes); los intrones deben ser cortados y los exones empalmados para completar la maduración del mRNA, este proceso es un evento post-transcripcional y se le conoce como corte y empalme o

splicing. En lo sucesivo nos referiremos a este proceso como *splicing*. Existen dos grupos de intrones caracterizados por el mecanismo específico por el cual son cortados del transcrito primario. Los intrones del grupo I se caracterizan por no mostrar conservación de secuencias en los sitios de *splicing* y se autoeliminan por reacciones de transesterificación; mientras que los intrones que son transcritos por RNAP II son llamados intrones *spliceosomales* o del grupo II por presentar la secuencias conservadas en los sitios de cortes 5' (GU) y 3' (AG) (Lewin, 2000).

El *splicing* es una etapa integral en el proceso global de la expresión génica y es un nivel en la que puede ser regulada. La eliminación de las secuencias intrónicas de los transcritos del pre-mRNA y la unión de exones es un proceso dinámico muy ordenado que involucra el ensamble de un gran complejo ribonucleoproteico conocido como *spliceosoma* (Kambach *et al.*, 1999). El *spliceosoma* cataliza el reconocimiento preciso y corte del intrón, así como la unión de los exones. El fracaso en la remoción de los intrones o alguna inexactitud en su corte podría alterar el inicio del marco de lectura del mRNA conduciendo a una alteración de la secuencia de aminoácidos y por lo tanto en su función. El *splicing* inexacto puede afectar la estabilidad del mRNA o el transporte. El correcto *splicing* está mediado por secuencias conservadas del pre-mRNA, por las snRNPs *spliceosomales* tipo U y numerosos factores proteicos no-snRNPs como proteínas hnRNP, proteínas SR y las proteínas que contienen las cajas DEAD o DEAH (RNA-dependientes de ATPasas o RNA helicasas dependientes de ATP) (Brown y Simpson, 1998).

2.3.1 Reacciones catalíticas del *splicing*. El *splicing* se realiza mediante un mecanismo de transes-

terificación en dos pasos, uno de ruptura y otro de ligado (Fig. 1) (Adams *et al.*, 1996). En el primer paso catalítico, el pre-mRNA se corta en el enlace fosfodiéster, en el sitio de corte del extremo 5' del pre-mRNA, que une al primer exón con el intrón y se crea una estructura molecular en forma de reata de vaquero (*lariat*) entre el intrón y el segundo exón, con la producción de un extremo 3' libre en el primer exón. En la segunda reacción, se rompe el sitio de corte en el extremo 3' del pre-mRNA, se libera el intrón en forma de *lariat* y se ligan los dos exones resultantes. El *lariat* se forma por la producción de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' libre del intrón y el grupo 2'OH de un residuo de adenina (A), localizado en el mismo intrón en una posición que es similar en los diferentes eucariontes y que se denomina el sitio de empalme o *branchpoint* (Newman, 1994; Adams *et al.*, 1996; Hastings, 2001; Lührmann *et al.*, 1990).

2.3.2 Ciclo del *spliceosoma*. El transcrito del pre-mRNA se asocia con proteínas hnRNPs, con las cuales puede definir las regiones intrón/exón en virtud de las secuencias de unión específicas, además auxilian la asociación y estabilidad de otros factores de *splicing*. Para determinar el ensamblaje y el ciclo del *spliceosoma* se han usando principalmente sistemas de vertebrados y levaduras (Brown y Simpson, 1998). El *spliceosoma* consiste de cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares U1, U2, U4, U5 y U6, además de aproximadamente 145 proteínas *spliceosomales* distintas (Zhou *et al.*, 2002). El *spliceosoma* actúa a través de una multitud de interacciones RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína para un corte preciso de cada intrón y la unión de los exones en un correcto orden (Ozawa y Umezawa, 2001; Hastings y Krainer, 2001).

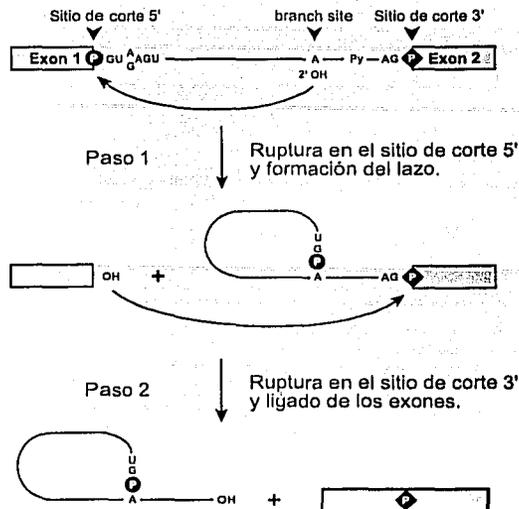


Figura 1. Mecanismo del *splicing* del pre-mRNA. Representación esquemática de los dos etapas de la reacción de *splicing*. (Modificada de Lührmann *et al.*, 1990).

La U1snRNP se recluta para el sitio de corte 5' donde el extremo 3' de la U1snRNA interactúa con el sitio de corte 5' por medio del apareamiento de bases, entre el primer exón y el intrón en ausencia de ATP (complejo de *pre-splicing*). El tracto de polipirimidina (situado entre el *branchpoint* y el sitio de corte 3') es limitado por el U2AF (vertebrados) Mud2p (levaduras) e interactúa con el sitio de corte del complejo U1-5'. El *spliceosoma* se constituye de la siguiente manera: primero el U1snRNP reconoce secuencias en el sitio de *splicing* 5' en el pre-mRNA, posteriormente U2snRNP se une al sitio de ramificación (Fig. 2). Una vez ocurrida dicha unión, el complejo pre-ensamblado U4/U6/U5 se asocia a los snRNPs ya unidos y al pre-mRNA con el U5 e interactúa con las secuencias exónicas 5' y 3'. Posteriormente la asociación de U1 se desestabiliza, U5 se une al extremo 5' del intrón y la hélice U4/U6 se desparea parcialmente permitiendo la asociación de U6 con

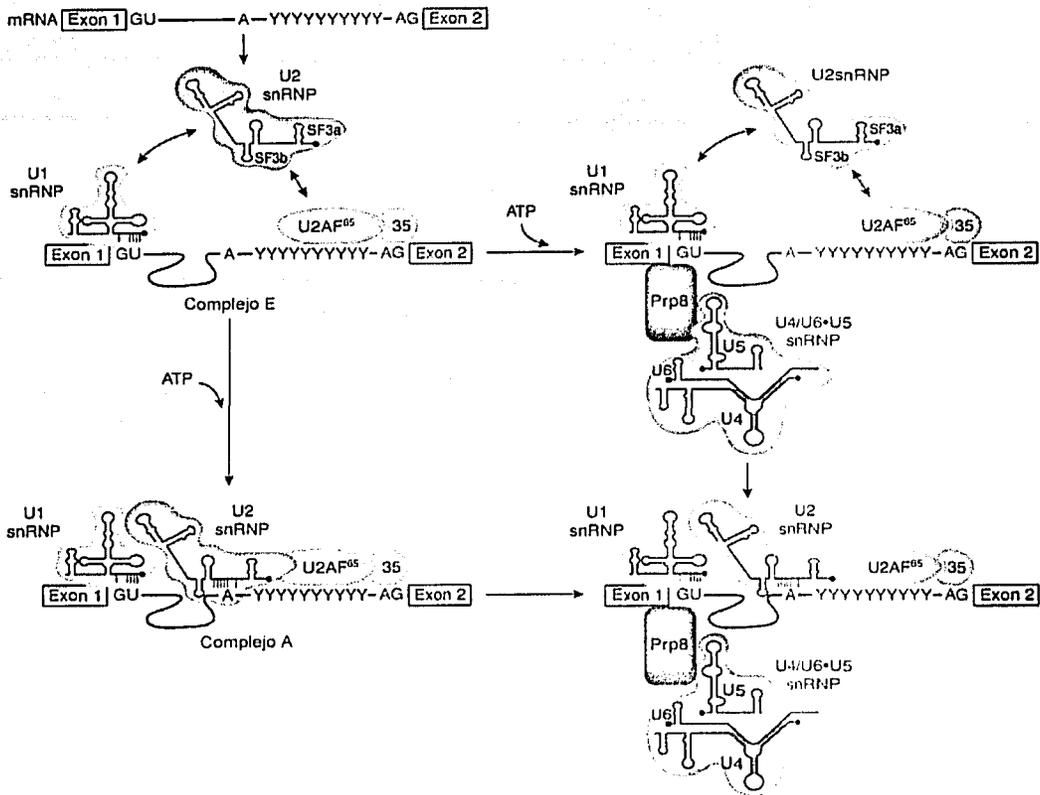


Figura 2. Ensamble del *spliceosoma*. En el complejo E, U1snRNP se une en el extremo 5' (GU), y U2snRNP se une debilmente a la pre-mRNA cerca del extremo 3' (AG) en via independiente de ATP, tal vez via interaccion entre SF-3b y el tetradimero U2AF y/o U1snRNP. En presencia de ATP, el tri-snRNP U4-U6-U5 se une a la region 5', en parte a traves de las interacciones entre Prp8 y el pre-mRNA, y U2snRNP que establemente se une al BPS. Estos dos eventos pueden ocurrir aparentemente de forma independiente (Modificado de Hastings y Krainer, 2001).

U2 para la formación del complejo U2-U4-U6. Finalmente la U4 sale dejando un complejo U2-U6 con U2 unido al punto de ramificación y U6 asociado al extremo 5' del intrón. Esta interacción altamente organizada de los RNAs y proteínas es lo que permite a la maquinaria celular del *splicing*, que los intrones del pre-mRNA sean eliminados de forma correcta (Lührmann *et al.*, 1990; Reed, 2000; Hastings y Krainer, 2001).

2.3.3 Biogénesis de las UsnRNP. La biogénesis

de las UsnRNPs es un proceso complejo y muchos aspectos aún no están del todo entendidos, pero en general, cada partícula UsnRNP es una molécula compleja que consiste de un UsnRNA más un conjunto de siete proteínas Sm que forman una estructura core, más otras partículas específicas.

Los UsnRNPs U1, U2, U4 y U5 son transcritos por la RNAP II como un precursor snRNA (pre-UsnRNA) que es monometilado por la estructura *cap* m7GpppG

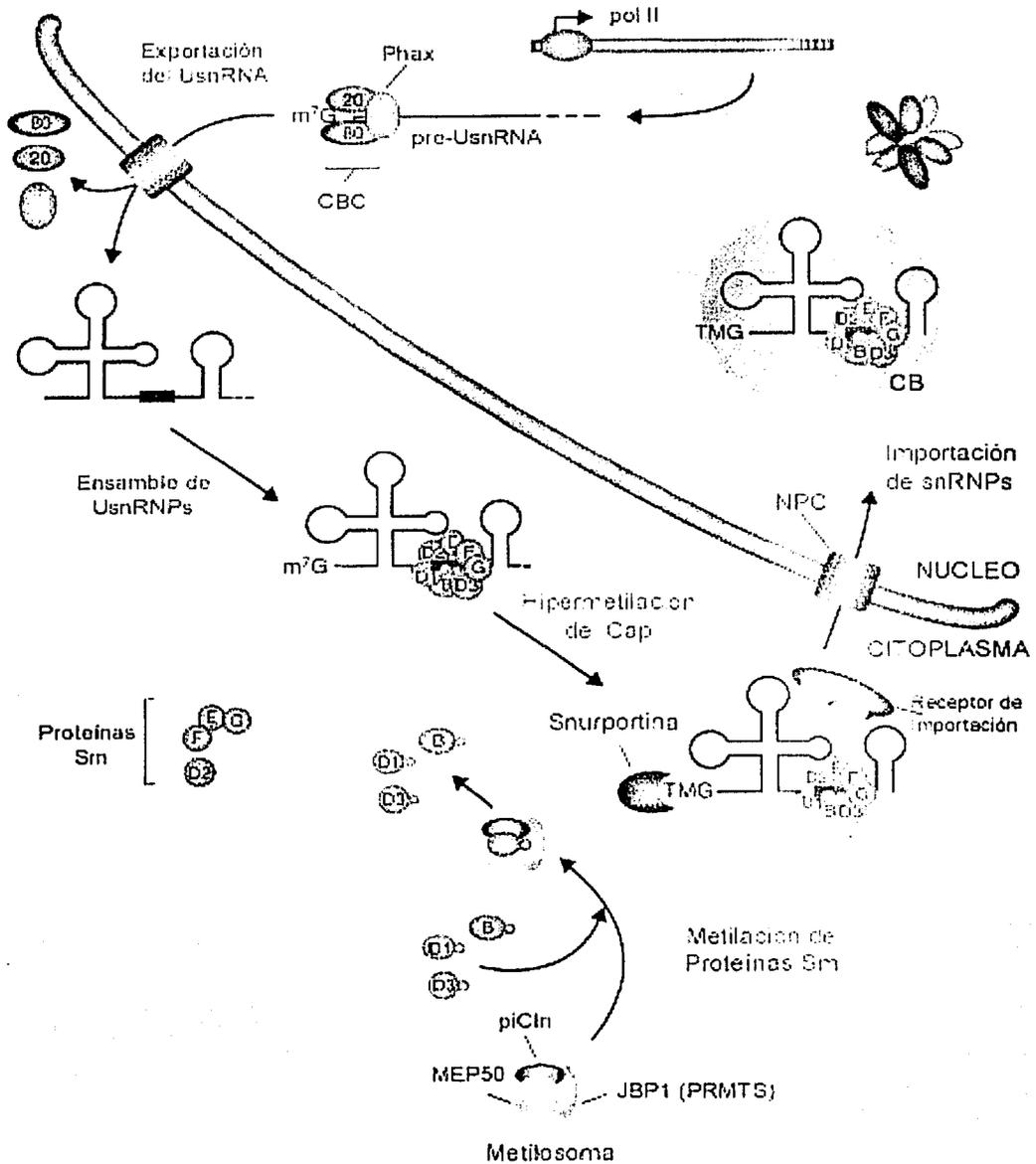


Figura 3. Vía de biogénesis de U1. Esta vía es similar para las moléculas UsnRNPs U1, U2, U4 y U5. La excepción es U6, ya que sigue una vía de biogénesis diferente. Las cajas negras indican los sitios Sm de las UsnRNA's (Modificada de Paushkin *et al.*, 2002).

(m⁷G). El pre-U1snRNA primero se exporta al citoplasma en forma de complejo donde se inicia el ensamble a

snRNP. La exportación depende de factores como: el *cap* y su complejo CBC (complejo de unión al *cap*), el

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

receptor de exportación CRM1/Xpo1 y RanGTP, además de PHAX (adaptador fosforilado para la exportación de RNA). Una vez en el citoplasma PHAX es desfosforilado y el complejo se desensambla. La desfosforilación es dirigida por la hidrólisis de GTP (Will y Lührmann, 2001).

El precursor UsnRNA interactúa en forma ordenada con siete proteínas Sm: B/B', D3, D2, D1, E, F y G para formar la estructura *core* Sm snRNP. alguna mutación en esta estructura *core* puede conducir a la enfermedad de atrofia muscular espinal (Paushkin *et al.*, 2002). Estas proteínas forman tres complejos heterodiméricos distintos (D1D2, BD3 y FEG), unidos por la interacción de secuencias altamente conservadas llamadas sitios Sm, 5'-PuAu+4-6Gpu-3' (Will y Lührmann, 2001).

Después del ensamble con el *core* Sm UsnRNP, el *cap* m7G del snRNA se hipermetila a la forma 2,2,7-trimetilguanosina (m3G) por una metiltransferasa. La maduración del extremo 3' del UsnRNA involucra la ruptura con la RNasa III seguida de un recorte por la exosoma, un complejo de múltiples exoribonucleasas 3', y/o por miembros de la familia de exonucleasas como la RNasa D (Fig. 3).

La importación de la UsnRNP requiere una señal de localización nuclear (NLS) que se ensambla en la estructura *core* Sm, específicamente con los complejos D1D2 y B. El *cap* es reconocido por la Snurportina-1 que interactúa con la importina que es el factor general de importación. Ya en el núcleo: la señal de localización nuclear, la importina y la snurportina-1 son desensamblados mediante RanGTP (Lührmann *et al.*, 1990; Will y Lührmann, 2001; Paushkin *et al.*, 2002). Estas estructuras UsnRNPs inicialmente quedan almacenadas en los cuerpos de Cajal (CBs) donde se ensamblan

con otras proteínas y finalmente se concentran en las *speckles* nucleares o cúmulos de gránulos intercromatinianos donde serán reclutados por el *spliceosoma* (revisado en Tollervey y Cáceres, 2000).

La biogénesis de la U6snRNP es diferente a las demás UsnRNPs, ya que es transcrita por la RNAP III, adquiere una estructura *cap*-monometil y todo el ensamble se realiza en el núcleo. Posteriormente es modificada por la pseudoridilación y 2'-O-metilación, procesos catalizados por snoRNPs que se encuentran en el nucléolo. La U6snRNA carece de un sitio Sm y la formación de la U6snRNP involucra la asociación con 7 proteínas semejantes a las Sm (LSm2, LSm3, LSm4, LSm5, LSm6, LSm7 y LSm8) con el trazo de U en el extremo 3' que además le proporcionan estabilidad para el ensamble del U6snRNP (Will y Lührmann, 2001).

2.3.4 Proteínas SR. Las proteínas SR son factores de *splicing* no snRNPs, que presentan repetidos del dipéptido serina-arginina y constituyen una familia de fosfoproteínas nucleares esenciales para el *splicing* constitutivo, también pueden regular el *splicing* alternativo (Hastings y Krainer, 2001). Estas proteínas pueden ser divididas con base en su estructura en:

1) Las proteínas SR (20-75 kDa) que contienen uno o dos motivos de reconocimiento al RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal. Estas proteínas se subdividen en dos grupos: proteínas SR de tipo I (Fig. 4). Las de tipo II se caracterizan por la presencia de dos RRMs y un dominio carboxilo terminal rico en el dipéptido arginina/serina conocidos como dominios RS. Las proteínas SR de tipo I presentan un solo RRM y su dominio RS.

2) Proteínas relacionadas a las SR, que tienen una estructura del motivo distinta al de la familia de proteínas SR y

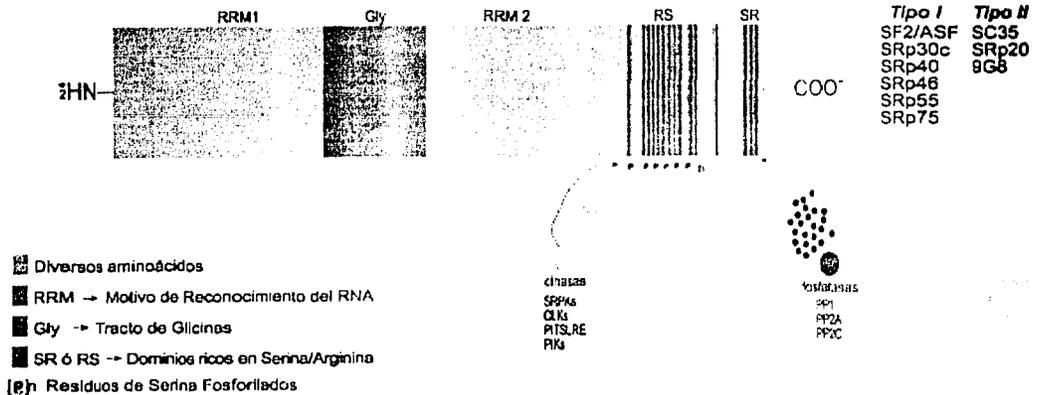


Figura 4. Estructura de la proteína SF2/ASF, proteína SR de tipo II. Esta proteína posee 248 aa, 744 nucleótidos de marco de lectura abierta.

pueden o no contener un RRM (Cáceres y Krainer, 1997).

Las proteínas SR interactúan y median la formación de la red proteína-intrón cruzado-exón cruzado, que es importante para la selección del sitio de corte, así como las interacciones que funcionan en etapas posteriores en el ensamble del *spliceosoma* (Cáceres y Krainer, 1997).

Los dominios SR funcionan como activadores del *splicing*, mediante la fosforilación y desfosforilación (Hastings y Krainer, 2001). La fosforilación es mediada por cinasas específicas como la SRPKs, CLKs, PITS,RE, PKs; mientras que la desfosforilación es mediada por fosfatasa como la PP1, PP2A, PP2C (Misteli *et al.*, 1998; Yeakley *et al.*, 1999; Misteli, 2000).

Aunque el estado de fosforilación de las proteínas SR influye en su localización subcelular, el mecanismo por el que se lleva a cabo no es claro. Se han identificado dos transportadores específicos para proteínas SR, TRN-SR y TRN-SR2, pertenecientes a la familia de las importinas de proteínas transportadoras nucleares, que

interactúan con el dominio RS de SF2/ASF, se ha observado que la fosforilación de los dominios RS es requerida para la interacción entre las proteínas SR y TRN-SR2 (Lai *et al.*, 2000). En levaduras se observó que la fosforilación de sitios específicos puede influenciar la localización celular y la actividad de las proteínas SR. Existen numerosos sitios de fosforilación potencial reconocidos por varias cinasas de actividad distinta, por ejemplo, cuando una proteína SR se localiza en citoplasma y es fosforilada basalmente, es importada al núcleo y su blanco son las *speckles* nucleares. También se conoce que la fosforilación de las proteínas SR es antagonizada por la metilación de argininas (Yun y Fu, 2000).

Estudios recientes indican que estos factores funcionan en múltiples etapas durante el ensamble del *spliceosoma*. También están involucradas en el reclutamiento de las snRNPs *spliceosomales* y en la mediación de las interacciones entre los componentes *spliceosomales* para sitios de corte específicos y define los exones e intrones (Newman, 1991; Hastings y Krainer, 2001), por ejemplo, facilitan el reclutamiento de las U1snRNP

para el sitio de corte 5'. También forman un puente entre los sitios de corte 5' y 3' vía interacciones mediante dominios SR involucrando U1snRNP asociado a la proteína U1-70K en el sitio de corte 5' y la subunidad de 35kDa del factor de *splicing* heterodimérico U2AF-65/35, que se une en el sitio de corte 3' (Wu y Maniatis, 1993). La familia de proteínas SR también participa en todas las etapas de la reacción del *splicing*, facilitando el reclutamiento del complejo tri-snRNP U1/U6.U5.

Se han encontrado dominios SR en varios factores asociados con componentes de la transcripción, incluyendo los factores asociados al CTD y en el factor de rompimiento m(CF-Im) del extremo 3', esto ha sugerido la existencia de comunicación entre el *splicing*, la transcripción y el procesamiento del extremo 3', la cual es mediada por interacciones que involucran proteínas con dominios SR (Cáceres y Krainer, 1997; Maniatis y Reed, 2002).

Las proteínas SR son altamente conservadas, que se encuentran en metazoarios y en plantas (Fig. 5). Miembros individuales de esta familia de proteínas muestra una mayor homología a través de las especies que a otros miembros de la familia dentro de la misma especie. Además de la familia de proteínas SR de reguladores de *splicing* existe una clase de proteínas que contienen dominios parecidos a los RS, llamados polipéptidos relacionados a las proteínas SR (SRrps) o proteínas semejantes a las SR, y también están involucradas en la regulación del *splicing* (ver Longman *et al.*, 2000).

Algunos experimentos bioquímicos sugieren

que las proteínas SR son funcionalmente redundantes, sin embargo otros estudios sugieren que cada proteína probablemente desempeña al menos una función no redundante. Tal es el caso de la proteína SR SRp55/B52, que es esencial para el desarrollo apropiado de *Drosophila* y la proteína Tra2 que determina el sexo del individuo, además de regular el *splicing* alternativo (Ring y Lis, 1994). Otro ejemplo es la proteína ASF/SF2, que es esencial para la viabilidad de las células B de pollo (Wang *et al.*, 1996).

Las mutaciones en los genes de alguna proteína SR pueden provocar defectos en el desarrollo o en el peor de los casos la muerte de algunos organismos. Por ejemplo, en los nematodos *Caenorhabditis elegans* y *Ascaris lumbricoides*, se comprobó que alguna deficiencia en el estado de fosforilación de las proteínas SR producto de una mutación genética, provoca inhibición de la función de la proteína que resulta crítico en su desarrollo embrionario. Así mismo, mutaciones o deleciones de una cinasa que fosforila proteínas SR, conlleva a deficiencias en la fosforilación, lo que provoca igualmente defectos en el desarrollo o la muerte del individuo. Por lo tanto, las proteínas SR en algunos casos determinan la actividad de *splicing* en estados discretos del programa de desarrollo embrionario (Longman *et al.*, 2000). En *A. lumbricoides* se observó que las proteínas SR durante el desarrollo embrionario se localizan en el citoplasma junto con la RNAP II antes de la activación genética del cigoto, y conforme se va desarrollando, hay disminución de proteínas en el citoplasma y aumento en el núcleo celular; también se observó que cuando se activa el desarrollo, se activa la fosforilación de los dominios SR (Sanford y Bruzik, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.5 Proteínas con caja DEAD y DEAH. Las proteínas con cajas DEAD- y DEAH son enzimas conocidas como RNA helicasas que desenrollan el pre-mRNA. Esta actividad de desenrollamiento está asociado con la hidrólisis de un nucleosido trifosfato (NTP), preferencialmente ATP. De la Cruz y colaboradores (1999) sugieren que estas proteínas actúan en diferentes etapas durante el ensamble y desensamble del *spliceosoma*, lo que les confiere velocidad, precisión y direccionalidad, además actúan en diferentes sistemas como lo han corroborado en *Saccharomyces cerevisiae*.

Las proteínas Prp5p y Prp28p de caja DEAD, y las proteínas Brr2p de caja DEAH, conducen el ensamble de los componentes del *spliceosoma*. Prp5p activa U2snRNP en las etapas tempranas del *splicing*. U2snRNP sustituye el *branchpoint* que une a la proteína. Prp5p puede, por tanto, tener actividad RNA helicasa y/o actividad de disociación RNA-proteína. Prp28p se requiere para la disociación dependiente de ATP de U1 y el reemplazo de U1 por U6 en el sitio de corte 5'. Raghunathan y Guthrie (1998) demostraron que Brr2p está involucrada en la disociación de U1snRNA por U6snRNA y el *spliceosoma* que ocurre previo a la primera reacción catalítica. Otras dos proteínas de caja DEAH, Prp2p y Prp16p, están involucradas tanto en la primera como en la segunda etapa de transesterificación. Finalmente, las proteínas de caja DEAH Prp22p y Prp43p son requeridas para liberar el mRNA maduro y desensamblar el *spliceosoma* (De la Cruz *et al.*, 1999; Will y Lührmann, 2001).

3. DOMINIOS INTRANUCLEARES DEL *SPLICING* (PATRÓN MOTEADO)

El núcleo fue la primera estructura intracelular

descubierta y originalmente descrita por Franz Bauer en 1802 (Harris, 1999) y después popularizada por Robert Brown. El análisis de las subestructuras nucleares se dificultó a causa de las limitaciones tecnológicas, pero en los años 1980's el uso de la microscopía de fluorescencia para el estudio de proteínas del núcleo de células químicamente fijadas utilizando dyes cromógenos como fluoresceína, rojo Texas, rodamina, etc., permitió observar detalles en la arquitectura nuclear, estableciendo la existencia de varias estructuras intranucleares morfológicamente distinguibles y relacionadas especialmente con la expresión génica (Dundic y Misteli, 2001; Spector, 2001). En algunos casos los dominios mostraron ser estructuras dinámicas que presentaban un rápido intercambio de proteínas con el nucleoplasma (Misteli, 2001). Entre los compartimentos nucleares mejor estudiados se encuentran el nucleolo, el compartimiento perinuclear, los cuerpos de la oncoproteína de la leucemia promielocítica (PML) los cuerpos de Cajal y los compartimentos de factores de *splicing* (SFCs) también conocidos como *speckles* o patrón moteado, que en lo sucesivo nos referiremos a ellos como patrón moteado (Fig. 6, Spector, 2001). Todos estos compartimentos nucleares no están definidos por membranas y el análisis de la dinámica de estos compartimentos demostraron que sus proteínas residentes están continuamente en intercambio con el nucleoplasma (Misteli, 2001).

Las motas nucleares fueron descritas en base a su distinta morfología antes del descubrimiento del *splicing* del pre-mRNA (Suzuki, 1978). La naturaleza de estos dominios ha sido controversial, sin embargo, su relevancia fisiológica está ahora bien establecida (Misteli y Spector, 1998). Ocupan aproximadamente 20% del volumen total nuclear y presentan altas concentraciones de factores de *splicing* y snRNAs. Además, contienen

1991b). Sin embargo la mayoría de los factores de *splicing* del pre-mRNA no son localizados en sitios de transcripción activa, pero sí están enriquecidos en el patrón moteado (Fig. 7).

Una de las funciones del patrón moteado fue sugerida del trabajo con células infectadas con adenovirus. Durante el estado intermedio de la infección, los transcritos virales se acumularon en el espacio intercompartimentario y se observó que los factores de *splicing* también se acumularon en estos sitios de transcripción, resultando en la reducción de las motas nucleares. Esto llevó a proponer que los factores de *splicing* son reclutados de las motas a los sitios de transcripción activa (Jiménez-García y Spector, 1993).

Para apoyar esto, en varios sistemas experimentales los factores de *splicing* se encontraron asociados con genes activos, pero estuvieron ausentes de loci inactivos, sugiriendo una organización dinámica de los factores de *splicing* *in vivo* (Huang y Spector, 1996). Tomando ventaja de la autofluorescencia de la GFP (proteína verde fluorescente), este modelo de reclutamiento fue directamente probado para la visualización de las propiedades dinámicas del factor de *splicing* SF2/ASF en células vivas por microscopía de lapsos de tiempo. Un mecanismo de reclutamiento nuclear se mostró sobre la activación de transcripción de un gene *in vivo*, los factores de *splicing* del pre-mRNA son reclutados de las motas nucleares donde se concentran, a sitios de transcripción (Misteli *et al.*, 1997). Este proceso de reclutamiento parece coordinar espacialmente la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA dentro el núcleo celular.

En células interfásicas en crecimiento, los factores de *splicing* parecen disociarse continuamente de las motas en una forma de transcripción-dependiente de

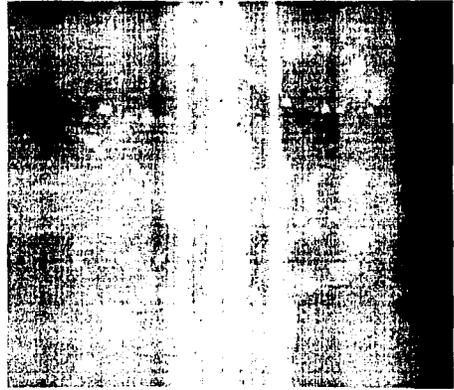


Fig. 7. Localización de factores de *splicing* en motas nucleares y sitios de transcripción activa (Misteli *et al.*, 2001).

la RNAP II, posiblemente como resultado de un suministro continuo de factores de *splicing* a genes constitutivamente activos. Así una función del patrón moteado es suministrar factores de *splicing* a los sitios de transcripción (Misteli *et al.*, 1997).

Las motas no son sitios de *splicing* del pre-mRNA. La mayoría de los genes activos se encuentran en la periferia de las motas, o más bien dentro de los compartimentos. La función del patrón moteado parece ser el almacén ensamblado de los componentes del *spliceosoma*. En la sobreexpresión de genes que contienen intrones o sobreexpresión de los factores de *splicing* son redistribuidos de la mota a nuevos sitios de expresión. Sin embargo, estas observaciones sugieren que los factores de *splicing* generalmente se mueven hacia un gen, siendo probable que el pre-mRNA también se mueva hacia las motas (Misteli *et al.*, 2000).

En el reclutamiento de los factores de *splicing* desde las motas a sitios de transcripción está involucrado un ciclo de fosforilación y desfosforilación (Fig. 8). Además la acumulación de factores de *splicing* en sitios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

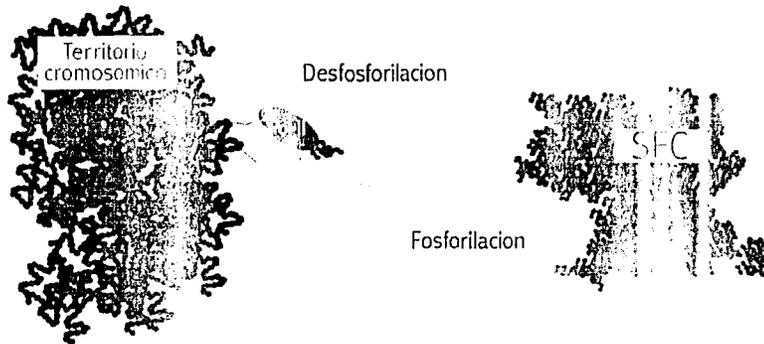


Figura 8. Reclutamiento de factores de *splicing* por los motivos o compartimientos de factores de *splicing*. El reclutamiento de fosforilacion, desfosforilacion y fosforilacion con la asociacion de factores de *splicing* con el patrón moteado. La formación del SFC (factores de *splicing* es promovida por la fosforilacion. La regulación de factores en genes activos es facilitada por el reclutamiento al dominio carboxilo terminal de la RNAP II (tomado de Dundr y Misteli, 2001).

de transcripción es dependiente del dominio carboxilo terminal de la subunidad más grande de la RNAP II. También se ha observado que toda la maquinaria de procesamiento del RNA está unida fisiológicamente a la maquinaria de transcripción (Dundr y Misteli, 2001).

Aunque en células en cultivo se ha estudiado el comportamiento del patrón moteado en experimentos en los que se abate la transcripción, recientemente se ha estudiado la distribución espacial de los factores de *splicing* en células de tejidos obtenidos de muestras de útero de ratas. En este órgano ha sido posible determinar la presencia de una organización similar en motas tanto en tejido de epitelio endometrial y glandular, así como en muscular y de estroma. En el útero este patrón se modifica cuando la actividad transcripcional cambia durante el ciclo estral. También se modifica en experimentos en donde la castración produce reducción de los niveles de estradiol y por lo tanto los niveles de transcripción cambian. En ratas castradas que reciben inyecciones intraperitoneales de estradiol, indican que el patrón moteado se recupera cuando se recupera la actividad transcripcional (George-Téllez *et al.*, 2002).

En *Drosophila melanogaster* se han descrito las omega *speckles* distribuidas en los espacios intereromatianos; sin embargo, son diferentes a las *speckles* nucleares pues no corresponden a acumulos de gránulos intereromatianos, además los motas nucleares contienen proteínas SR ricas en serina arginina como la SC35 y la SRp55, las cuales no se han localizado dentro de las omega *speckles*. Estas omega *speckles* contienen transcritos relacionados con el tráfico y eficiencia de las hnRNPs y otras proteínas relacionadas con la unión al RNA en el núcleo celular (Prasanth *et al.*, 2000).

3.1 Granulos Intereromatianos

Swift en 1959 (Jiménez-García *et al.*, 1989) observó por primera vez los gránulos intereromatianos (GICs) como estructuras esféricas con un diámetro que va de 200 a 250 Å. Frecuentemente se encuentran formando agregados en el nucleoplasma y se interconectan con fibrillas delgadas que forman una fina red en el espacio intereromatiano (Muller-Hill y Bernhard, 1969) (Fig. 9). Los GICs son abundantes en núcleos de corda-

dos y tienden a agruparse en cúmulos; en otros animales (artrópodos, anélidos, cnidarios, etc.) estos gránulos son escasos y dispersos; mientras que en plantas no forman cúmulos y también son escasos y dispersos (Jiménez-García *et al.*, 1989).

Los GICs fueron estudiados durante el ciclo celular en células animales usando contrastes preferenciales para ribonucleoproteínas, plata amoniacal y anticuerpos dirigidos contra snRNPs, reportándose que durante la mitosis se dispersan en el citoplasma, desaparecen a finales de la telofase y reaparecen en las células hijas (Ferreira *et al.*, 1994; Thiry, 1995). En plantas como *Allium cepa* y *Lycopersicon esculentum*, por medio de contraste con oxinitrato de bismuto se ha observado que los GICs tienen una serie de características comunes a los GICs de animales, son sensibles al tratamiento de pronasa seguido de RNasa y poseen un alto contenido de fosfoproteínas (Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1992).

Los GICs son claramente reconocibles dentro del componente nucleoplásmico llamado "la matriz nuclear interna", esto fue observado mediante nucleasas y extracción de núcleos con detergentes y amor-

tiguadores con alto y bajo contenido de sales (Berenzney y Coffery, 1977).

En cortes finos de hígado de ratón marcados con anticuerpos específicos contra snRNPs, se observó que los GICs contienen altas cantidades de snRNPs, sugiriendo una función de almacén y/o ensamble de factores de *splicing* (Fakan *et al.*, 1984). Estudios cinéticos previos muestran un bajo nivel de marcaje con uridina tritiada lo que sugiere la presencia de RNA más bien estable o de vida media larga (Fakan y Bernhard, 1971).

Se sabe que otros componentes esenciales para el *splicing* están presentes en los cúmulos de GICs o asociados a ellos, estos incluyen a hnRNPs (Fakan *et al.*, 1984), los snRNAs U1 y U2 (Huang y Spector, 1992; Carmo-Fonseca *et al.*, 1992), y el factor de *splicing* SC35 (Fu y Maniatis, 1990). Además, las proteínas SR se asocian fuertemente a los GICs cuando se realiza el ensamble del *spliceosoma in vitro* (Neubauer *et al.*, 1998). Posteriormente se observó un movimiento de estos factores de procesamiento y maduración del pre-mRNA desde los GICs hacia las FPCs, en donde realizan su función (Jiménez-García y Spector, 1993).



Figura 9. Micrografía electrónica de Transmisión de un núcleo de hepatocito de conejo (x35,000), teñida con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas que se observan como partículas más oscuras. c, cromatina compacta; f, fibras pericromatinianas; n, nucléolo; ne, envoltura nuclear; i, cúmulos de gránulos pericromatinianos; flechas, gránulos pericromatinianos; r, ribosomas. (Tomada de Jiménez-García *et al.*, 1989).

Recientemente se purificaron los GICs de hepatocitos de ratón por espectrometría de masas, donde se identificaron 33 proteínas conocidas y relacionadas con la maduración del pre-mRNA y tres proteínas nuevas (POP, KIAA0324 y KIAA0017) de las que se desconoce su función (Mintz *et al.*, 1999).

3.1 Fibras Pericromatinianas.

Las fibras pericromatinianas fueron descritas en 1969 por Monneron y Bernhard en cortes ultrafinos utilizando el contraste preferencial para ribonucleoproteínas. Son fibras que aparecen enrolladas irregularmente, concentradas en el límite de la heterocromatina y en el espacio intercromatiniano, tienen un diámetro que varía de 30 a 50 Å y hasta 200 Å de largo, aunque se pueden encontrar fibras entremezcladas con gránulos pericromatinianos y transiciones de fibras a gránulos (Monneron y Bernhard, 1969). Las FPCs son fuertemente marcadas después de pulsos cortos de uridina tritiada y son sensibles a inhibidores de la RNAP II, por lo que se considera representan transcritos nacientes (Fakan, 1994). Se ha demostrado que contienen pre-mRNA protegido por un material proteico y RNAs relacionados con su maduración postranscripcional. Se les considera como estructuras presentes en eucariotes superiores (Jiménez García y Segura Valdez, 1993) (Fig. 10).

En experimentos realizados con hepatocitos de rata se observó que la cantidad de FPCs disminuye y posteriormente es restablecido por administración de cortisol (Petrov y Bernhard, 1971). También la síntesis de RNA es inhibida por medio de α -amanitina que induce una disminución en el número de FPCs (Petrov y Sekeris, 1971). Por el contrario, la densidad de fibras

pericromatinianas aumenta durante la preimplantación de embriones de ratón, correspondiendo a los cambios en la tasa de síntesis de RNA (Fakan y Oclartchenko, 1980).

Experimentos con autorradiografía de alta resolución, muestran que el mRNA se marca rápidamente y se encuentra asociado a las FPCs en la cromatina activa y en la periferia de la cromatina compacta (Fakan y Bernhard, 1971; Bachellerie *et al.*, 1975) lo mismo se encontró en cultivos primarios de hepatocitos, ambos bajo condiciones normales (Fakan *et al.*, 1976).

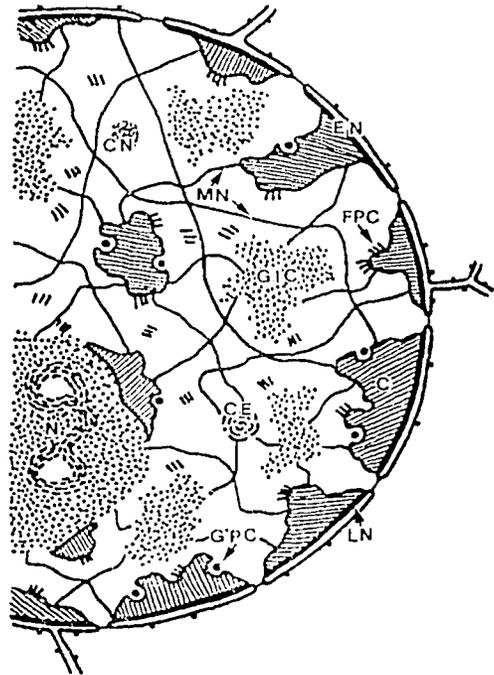


Figura 10. Representación esquemática de la organización ultraestructural del núcleo celular interfásico de mamíferos. Se muestran los principales componentes. EN, envoltura nuclear; LN, lamina nuclear; MN, matriz nuclear; C, cromatina; N, nucleólo; CN, cuerpo nucleares; CBs, cuerpos de Cajal; GPC, gránulos pericromatinianos; GIC, gránulos intercromatinianos; FPC, fibras pericromatinianas (Tomado de Jiménez-García y Segura-Valdéz, 1993; modificado de Monneron y Bernhard, 1969).

Monneron y Bernhard sugirieron que las FPCs pueden representar la expresión morfológica *in situ* de la transcripción del RNA extranucleolar, ya que se encuentran en las regiones pericromatinianas transcripcionalmente activas (Fakan, 1994), esto se corroboró con los experimentos realizados por Fakan y Puvion en 1980, quienes llegan a la conclusión de que las FPCs son los elementos estructurales que contienen el RNA transcrito de la región pericromatiniana.

En las FPCs se han localizado las snRNPs U1 y U2 (ribonucleoproteínas pequeñas nucleares ricas en uracilo) (Visa *et al.*, 1993), la proteína SC35 (componente del *spliceosoma*) (Spector *et al.*, 1991), así como poly(A)+RNA (Visa *et al.*, 1993), proponiendo que en estas estructuras ribonucleoproteicas son los sitios estructurales para el *splicing* del pre-mRNA (Jiménez-García y Spector, 1993). Finalmente, el hecho de que la RNAP II, las proteínas SR factores de *splicing* y el factor de rompimiento CstF puedan ser detectados en sitios de transcripción indica que todas las etapas de procesamiento nuclear ocurre, por lo menos parcialmente, en los sitios de transcripción, es decir, en las FPCs (Misteli y Spector, 1998).

3.3 Cuerpos de Cajal.

Inicialmente se describieron como cuerpos nucleolares accesorios por Santiago Ramón y Cajal y posteriormente fueron renombrados como Cuerpos de Cajal (CBs), aunque también suelen ser conocidas como cuerpos espiralados (Gall, 2000).

Los CBs son estructuras esféricas pequeñas con 1 a 5 copias por núcleo, el rango de su tamaño varía entre 0.1-1.0 μ m. Los CBs contienen un gran número de

componentes, incluyendo las snRNPs *spliceosomales*, los snoRNAs: U3, U7, U8 y U14, los factores de transcripción TFIIF y TFIIH, el factor de rompimiento-estimulación, el factor específico de rompimiento y poliadenilación, y componentes nucleolares como la fibrilarina, Nopp140 y la proteína B23 (Gall, 2000). Desafortunadamente se desconoce la función exacta de los CBs, sin embargo múltiples estudios han dado evidencia de sus posibles funciones.

Los CBs se encuentran dentro del nucleoplasma, pero se han detectado dentro del nucléolo de células de carcinoma mamario en humano, indicando que pueden pasar a través del nucléolo. Recientemente se ha mostrado que los CBs son estructuras muy móviles que pueden viajar por todo el nucleoplasma (Platani *et al.*, 2000).

Otros estudios sugieren que los CBs pueden estar involucrados en el transporte y maduración de snRNPs y snoRNAs (fig. 11). Sleeman y Lamond (1999) reportaron que las proteínas Sm de la estructura *core* marcadas con GFP y asociadas con UsnRNAs son reimportadas al núcleo, donde pasan directamente a los CBs, posteriormente lo atraviesan y alcanzan su destino final en los SFCs o patrón moteado. Cuando se inhibe la exportación de los snRNAs del nucleoplasma al citoplasma con leptomicina B, se provoca un agotamiento progresivo de las snRNPs en los CBs (Carvalho *et al.*, 1999).

Existe evidencia de que los CBs se asocian con *loci* cromosómicos específicos, pues frecuentemente se encuentran asociados con genes de histonas repetidos en tándem en cromosomas de anfibios y en genes repetidos en tándem que codifican para los snRNAs como el U1, U2, U4 U11 y U12 en núcleos interfásicos de

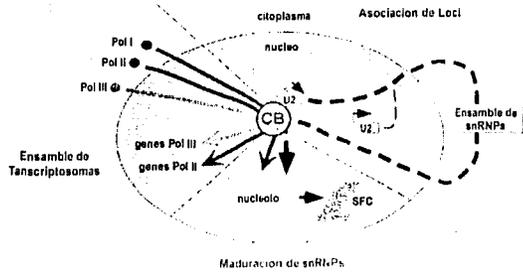


Figura 11. Tres posibles modelos de las funciones de los CBs. Los genes para snRNAs frecuentemente están asociados con los CBs. Estos organelos pueden jugar un papel en su actividad transcripcional. Los CB funcionan en la maduración de snRNPs que son exportados después de la transcripción al citoplasma, donde son ensamblados a partículas snRNPs y reimportados a los CBs, posteriormente pasan a través del nucléolo y alcanzan las motas. El preensamble de los transcriptosomas de la RNAP I, II y III de subunidades recién sintetizadas, puede realizarse en los CBs antes de que los transcriptosomas se involucren en la transcripción de genes específicos (tomada de Doudir y Aisteli, 2001).

mamíferos. Se ha observado que factores involucrados con la transcripción, el *capping*, el *splicing*, la poliadenilación y el rompimiento del pre-mRNA, inicialmente son encontrados en los CBs en ovocitos, permitiendo la posibilidad de que la maquinaria de la RNAP II sea preensamblada en los CBs con otros elementos de la maquinaria de procesamiento para formar complejos de multi-subunidades transcripcionalmente competentes, llamadas transcriptosomas de la RNAP II. Esto también puede ser aplicado para el ensamble de los transcriptosomas de la RNAP I y la III (Gall *et al.*, 1999; Gall, 2000).

4. EVOLUCIÓN DE LOS CORDADOS

En los cordados se han encontrado diversas afinidades con numerosos grupos de invertebrados, por ello hay múltiples teorías sobre su filogenia. Se les ha comparado con los anélidos y los artrópodos. Debido a la segmentación y por las semejanzas que muestra su aparato excretor con el de los anfibios, han sido señalados como próximos a un antecesor común con los cordados, sin embargo, estas semejanzas son superficiales puesto que la segmentación de unos y otros tiene diferencias fundamentales.

Existe una teoría que señala a los equinodermos como el punto de contacto más viable entre cordados e invertebrados, sobre todo a los equinodermos sedenta-

rios (cistoideos, blastoideos y crinoideos), ya que son las formas que presentan mayor semejanza y relaciones con Phoronis y Cephalodiscus, a los que se les considera como los cordados más primitivos. Aun en aquellos hemicordados que no pasan por el estado de tornaria, como en *Balanoglossus*, es notable que el origen y la distribución de las cavidades celómicas resultan muy parecidas a las de los equinodermos (fig. 12). Sin embargo, debido a la carencia de estructuras duras por parte del ancestro de los cordados, no hay restos fósiles que representen su historia evolutiva (Álvarez del Villar, 1977; Nelson, 1995).

Los animales que actualmente se conocen como procordados, son formas modificadas y aun regresivas. Algunos de ellos podrían representar estadios por los cuales pasó el phylum en su desarrollo filogenético a principios del paleozoico; pero se debe tener en cuenta que en estratos del Ordovícico, aparecen restos de vertebrados Agnatos (Álvarez del Villar, 1977; Nelson, 1995).

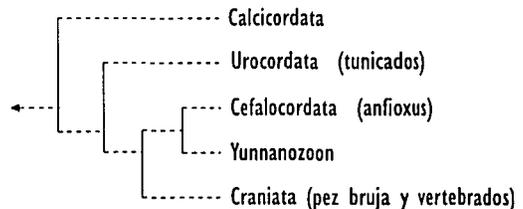


Figura 12. Filogenia del phylum Chordata (tomado de <http://www.phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/animals/chordata/chordata.html>).

5. EVOLUCIÓN DE LOS VERTEBRADOS

Los vertebrados surgieron de algún tipo de invertebrado ancestral, pero no se sabe con certeza a cual grupo. Los primeros fósiles que se conocen de los vertebrados son fragmentos de hueso del Ordovícico (440 a 505 millones de años), que con toda certeza representan un grupo de ciclóstomos, los Ostracodermos que están totalmente diferenciados de sus antecesores los invertebrados (Bockelie y Fortey, 1976). Estos peces primitivos presentan una armadura dérmica ósea bien desarrollada. No presentan aletas pares como tienen los peces más avanzados y su boca es muy pequeña, probablemente eran filtradores como el anfibio, que ingería el agua por la boca y la expulsaban por las hendiduras branquiales (Stahl, 1974). Los Ostracodermos se diversificaron y dieron lugar a los peces con mandíbulas y aletas pares, posiblemente los placodermos que aparecen en las rocas del Silúrico y el Devónico (ver tabla I). También se cree que dieron lugar a peces sin mandíbula pero tendieron a restringirse y junto con otros grupos desapareció (Stahl, 1974).

Otra hipótesis filogenética, sostenida sobre todo por Jeffries (1967, 1968), considera que los vertebrados proceden de los Carpoideos, organismos con simetría bilateral con un fuerte esqueleto calcáreo plano donde normalmente se incluyen en los Equinodermos. Los Carpoideos aparecen a comienzos del Cámbrico medio y desaparecen en el Devónico medio. Jeffries los considera como un grupo de transición entre los equinodermos y los cordados, asemejándose a los miembros más avanzados de las enormes larvas con armadura de los tunicados. No obstante, el primer cordado que se conoce carece de esqueleto y se encuentra también en el Cámbrico medio.

5.1 Características Generales de los Vertebrados.

Todos los cordados poseen alguna forma de cráneo y algún indicio de vértebras. La organización de un vertebrado es parecida a la del anfibio, pero con la adición de rasgos especiales:

1º. La extremidad anterior del sistema nervioso se diferencia para dar un cerebro complejo, asociado con órganos receptores especializados como son la nariz, el ojo y el oído. Por medio de estos receptores los vertebrados pueden responder a una mayor diversidad de aspectos ambientales que ningún otro animal.

2º. La organización del aparato locomotor permite efectuar movimientos complejos para adaptarse a las condiciones registradas por los órganos receptores. El proceso de la natación, consistente en principio en las ondulaciones que recorren hacia atrás el cuerpo del animal, se va perfeccionando gracias a las modificaciones en la forma del pez, que permiten los desplazamientos rápidos y los cambios bruscos de dirección. Junto a las aletas medias, que ya se encontraban en el anfibio, se desarrollan aletas pares cuya misión al principio es dar estabilidad y dirección pero que luego, con la aparición de los animales terrestres, se convierten en órganos de locomoción sobre suelo, en el aire y finalmente, con la adquisición de las manos, en un órgano capaz de alterar el medio ambiente en provecho del propio organismo.

3º. El cerebro, dedicado en un principio a la coordinación de las funciones motoras y sensitivas, se transforma progresivamente y llega a presidir todas las funciones orgánicas, otorgando a los vertebrados el impulso que constituye una de sus principales características.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4º. El sistema circulatorio presenta dos de las características fundamentales de los vertebrados: la existencia de un corazón dividido por lo menos en tres cámaras, asegurando una rápida circulación sanguínea y la posesión de hemoglobina en los glóbulos de la sangre, cuya función es llevar grandes cantidades de oxígeno a los tejidos. Este eficiente sistema circulatorio es uno de los factores principales en el éxito biológico que han obtenido los vertebrados.

5º. El sistema excretor consiste de una serie de embudos y túbulos derivados del mesodermo, cuya principal función es comunicar el celoma con el exterior (Alvarez del Villar, 1977).

6. EVOLUCIÓN DE LAS LAMPREAS

Las lampreas se han investigado por su tenacidad para la vida, su adaptabilidad, y su capacidad genética para responder exitosamente a los problemas que se han encontrado por millones de años.

Las lampreas pueden representar un linaje de Ostracodermos que ha conservado muchas características primitivas carecen de mandíbulas y aletas pares, por ejemplo, pero han perdido el esqueleto óseo. Es probabi-

le que en las lampreas y en algunos otros peces el cartílago sea una adaptación embrionaria que se ha conservado en el estado adulto, constituyendo por lo tanto una característica neotónica en dichas formas (Stahl, 1974). La información sobre Agnatos, data de por lo menos hace 450 millones de años (ordovícico) (Tabla 1). Fósiles de ostracodermos, cordados primitivos de agua, son comunes en depósitos de esa edad, encontrados principalmente en Inglaterra y Escocia. Estas formas mandibuladas alcanzan un alto nivel de abundancia y un desarrollo morfológico diversificado por el fin de la siguiente edad geológica (Silúrico). Los ostracodermos estaban cubiertos mas o menos por placas externas de hueso y algunos de ellos aparentemente estaban adaptados a una actividad de vida más bien para hábitos de madriguera. Poseían un nostrilo simple entre sus ojos y también ojos pineales o medios característicos de las lampreas y del pez bruja. Existen evidencias de que algunos ostracodermos tienen esqueletos de hueso, de los cuales ciertos investigadores concluyen que el esqueleto de cartílago de los ciclostomos modernos es una característica degenerativa. Los ostracodermos al parecer eran filtradores (parecidos a las larvas de las lampreas) y se extinguieron en el Devónico, aparentemente por la incapacidad de competir exitosamente con los vertebrados mandibulados (Moffett, 1966).

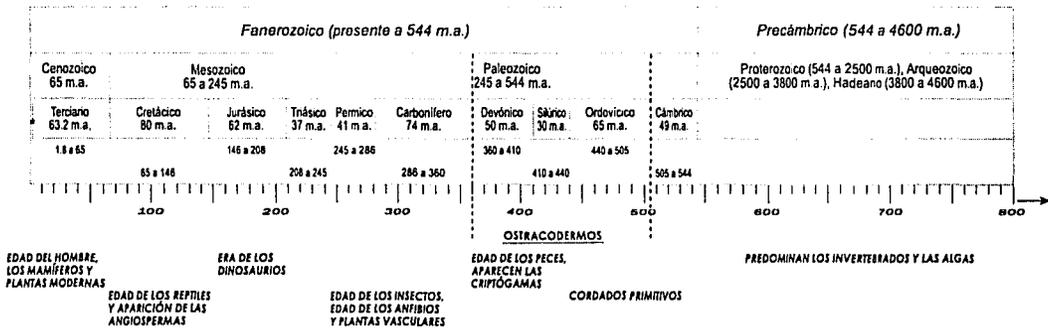


Tabla 1. Aparición de los ancestros de las lampreas (Ostracodermos), representado en la escala del tiempo geológico. *Carbonífero (1 m.a.; época actual); m.a. millones de años.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REINO	SUBREINO	RAMA	GRADO	SERIE	PHYLUM	SUBPHYLUM	SUPERCLASE	CLASE	ORDEN	FAMILIA
									Osteostraci Petromyzonida	Petromyzonidae Lampetra Petromyzon Caspiomyzon Ichthyomyzon Eudontomyzon Geotria Mordacia
					Chordata ⁷		Agnatha ⁹	Cephalaspides		
									Anaspida Heterostraci Coelolepida Mixinioida	
						Cranita ⁸ (Vertebrata)		Pteraspides		
								Pterichthytes Corrostei Aranthodii Elasmobranchii Holocephali Dipnoi Teleostomi Amphibia Reptilia Aves Mammalia		
							Gnathotoma			

- Organismos con una organización celular bien definida. Las células presentan un núcleo que contiene la mayor parte del DNA celular rodeado por una doble membrana; en el citoplasma se distinguen varios orgánulos característicos donde se llevan a cabo la mayoría de las reacciones metabólicas.
- Organismos con diferenciación celular que presentan dos o tres capas germinales; con cierto grado de desarrollo en órganos y sistemas. La circulación se lleva a cabo en una cavidad central. Poseen un tubo digestivo complejo abierto en cada uno de sus extremos. Sistema nervioso con un grado progresivo de especialización estructural y funcional.
- Presentan tejidos o conformaciones tisulares y sistemas de órganos.
- Poseen lado izquierdo y derecho. Celalización o concentración de estructuras sensoriales en la cabeza. Movimiento activo unidireccional, usando la cabeza para orientación.
- Cavidad del cuerpo limitada con mesodermo
- Desarrollo a partir de huevos de regulación. Segmentación radial o bilateral, formación del ano a partir del blastoporo. Formación del celoma por enterocelia (por separación del tubo digestivo primitivo).
- Notocordio, hendiduras branquiales en la faringe y un cordón nervioso dorsal; huevo presente sólo en las fases preadultas o durante toda la vida; celoma enterocélico; desarrollo mediante larvas provistas de cola o bien directo.
- Cráneo cartilaginoso u óseo en cuyo interior se aloja el cerebro; notocordio en el embrión y a veces también en el adulto. Posee una columna vertebral formada por cartilago o por huesos de sustitución; branquias o pulmones derivados de la faringe; celoma bien desarrollado; circulación cerrada; corazón con dos, tres o cuatro cámaras, excreción mediante pronefros, mesonefros o metanefros; sistema endocrino complejo; sexos normalmente separados; diversos sistemas de fecundación.
- Notocordio permanente durante toda su vida; esqueleto interno de naturaleza cartilaginosa, sin verdaderos dientes (dérnicos); una sola abertura nasal; poseen ojos pineales.

6.2 Características generales de las lampreas

Las lampreas carecen de mandíbula inferior y toda su boca está circundada por un disco redondo parecido a una ventosa dentro del cual, en los adultos, hay unos desarrollados dientes ásperos y córneos (fig. 13), estos varían en la posición y en el número entre las especies, y constituyen una ayuda valiosa para su identificación (Maitland, 1980).

Las lampreas también poseen algunos otros rasgos muy característicos y combinan caracteres primitivos (esqueleto cartilaginoso, carecen de mandíbulas, 7 arcos branquiales, ausencia de aletas pares, nostrilo dorsal medio u orificio nasohipofisial, hemoglobina

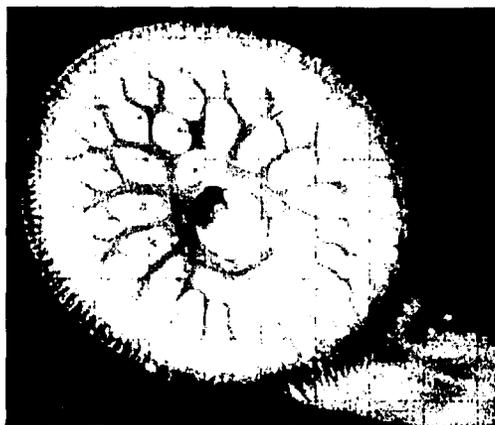


Figura 13. Boca succionadora de la lamprea *Petromyzon*, mostrando los dientes epidérmicos (tomada de <http://www.ucmp.berkeley.edu/vertebrates/basalfish/petro.html>).

monomérica) y caracteres altamente especializados (presencia de tiflocele, velo e hidroseno). A diferencia de sus ancestros directos, poseedores de una cubierta resistente, los agnatos actuales no poseen exoesqueleto alguno, es decir, su tegumento está totalmente desprovisto de escamas (Hubbs y Potter, 1971).

En la actualidad se reconocen alrededor de 40 especies de lampreas en el mundo. El patrón de distribución de estos organismos es antitropical; ya que se localizan al norte y al sur de la isoterma de los 20°, aproximadamente a partir de los 30° de latitud en ambos hemisferios, siendo la temperatura del agua el factor más importante que determina este patrón. De las 40 especies de lampreas reconocidas 20 son especies pareadas o satélite. Estas especies de lampreas son morfológicamente similares, pero no tienen diferentes historias de vida (Vladykov y Kott, 1979).

En la Mesa Central de México existen dos especies, *Lampetra spadicea* (especie parásita y migratoria) y *L. geminis* (especie no parásita), su distribución está restringida a las cuencas del río Duero-Lerma-Chapala y del río Grande de Morelia-Cuitzeo (Alvarez del Villar, 1966) (Fig. 14). Las lampreas mexicanas constituyen una excepción al patrón general de distribución, ya que se distribuyen alrededor de los 20° de latitud norte (Hubbs y Potter, 1971). En 1994, Lyons y col. (1994), plantearon que *L. spadicea* aparentemente había sido eliminada de la cuenca Lerma/Chapala/Santiago y debía ser considerada una especie en peligro de extinción; su descenso en abundancia y distribución se lo atribuyeron a la degradación ambiental. Sin embargo, al parecer ésta especie actualmente está extinta aunque no existe reporte oficial. En el caso de *L. geminis* estos mismo autores reportan que históricamente se conocía

de las cabeceras de los ríos Duero y Grande de Morelia y localmente era común en ambos ríos teniendo un área de distribución pequeña y que la contaminación y modificación del hábitat ponía en peligro algunas poblaciones. Recomendaron que debía considerarse como un caso de protección. Actualmente está considerada una especie en Peligro de Extinción, al igual que *L. spadicea* (Lyons *et al.*, 1994).

Las lampreas presentan dos tipos de ciclo de vida. Uno de ellos lo presentan especies parásitas, en las cuales la fase adulta dura entre tres y cinco años, estas especies pueden estar restringidas a sistemas fluviales. El otro tipo es llevado a cabo por lampreas no parásitas, cuya fase adulta es muy corta durante la cual no existe alimentación, se encuentran restringidas a agua dulce siendo más comunes en riachuelos y pequeños ríos (Hardisty y Potter, 1971), como es el caso de las especies mexicanas.

Young (1950) propuso que las formas no parásitas evolucionaron a partir de formas parásitas a través de un proceso de paedomorfosis parcial. Este proceso es un rasgo característico en la filogenia de las lampreas, único entre los vertebrados, que involucra una tendencia hacia la eliminación de la alimentación en los estadios postmetamórficos y una extensión en la duración del periodo larvario aunado a un rápido desarrollo gonádico previo a la metamorfosis.

Un mecanismo de aislamiento reproductivo que puede estar implicado en la diferenciación de las especies satélite, es la homogamia (Hardisty y Potter, 1971). Esta hipótesis sugiere que el acto del desove depende de la aplicación de presión por parte del macho en una posición precisa del aparato genital de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

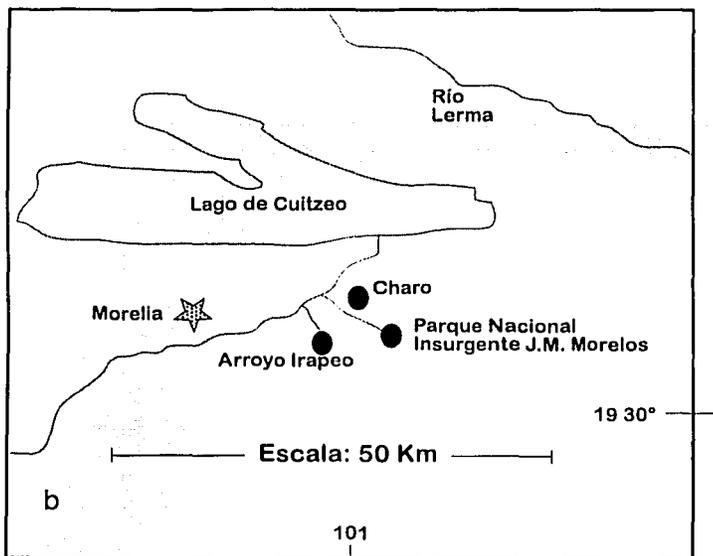


Fig. 14. Esquema representativo del sistema Río Lerma, Lago de Cuitzeo-Río Grande de Morelia en el Centro de México, mostrando las localidades donde se han capturado Lampreas, incluyendo el Parque Nacional Insurgente José María Morelos y el Arroyo Irapeo. La estrella indica registros de *Lampetra spadicea* (especie extinta) y los círculos de *L. geminis* (Tomado de Lyons et al., 1994).

hembra durante el amplexo, dado que las especies pareadas difieren en la longitud total, la presión ejercida por los machos de la otra especie durante el amplexo no ocurrirá en la posición precisa del aparato genital de la hembra, por tanto la homogamia puede ser un mecanismo asociado con el aislamiento reproductivo entre las especies satélite (Beamish y Neville, 1992).

En años recientes han declinado las poblaciones de lampreas de río, principalmente a causa de las presas, la contaminación y la pesca excesiva (Doolittle, 1994). En algunos lugares del mundo, las lampreas adultas de talla grande habían sido y todavía se usan como alimento para humanos, pues son consideradas como un manjar. Sin embargo, se han reportado algunas muertes por exceso en su consumo (Moffett, 1966).

6.3 Biología de *Lampetra geminis*

Lampetra geminis o lamprea de Jacona, es una especie endémica del centro de México (Fig. 14), (Lyons *et al.*, 1994) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL-059-94) se encuentra en peligro de extinción.

6.3.1 Diagnóstico. *Lampetra geminis* es una lamprea de tamaño pequeño con esqueleto cartilaginoso, no tiene hábitos parásitos y su longitud máxima es de aproximadamente 150 mm. La lámina lingual transversal por lo común está poco desarrollada, algunos de los dientes circumorales son rudimentarios o están ausentes y la lámina supraoral no lleva cúspides suplementarias.

6.3.2 Coloración. Cubre al cuerpo más o menos uniformemente, una pigmentación gris oscura que se extiende sobre el labio superior; se exceptúan las

aletas dorsales, la región ventral de toda la longitud, incluyendo el pedúnculo caudal y la región subbranquial que presentan tonos de color marfil. La mancha pigmentaria prebranquial es muy notable. La pigmentación de la región cefálica, no llega a los orificios branquiales. La segunda dorsal presenta algunas manchas oscuras en su base y no hay pigmento en la estructura precursora de la lengua (Álvarez del Villar, 1966).

6.3.3 Distribución. *Lampetra geminis* presenta una distribución no continua, con una población en el río Duero y sus afluentes y otra en algunos afluentes del río Grande de Morelia (Álvarez del Villar, 1966; Guerra-Magaña y Polaco, 1996).

6.3.4 Aspectos Biológicos. *Lampetra geminis* es una especie que puede completar su ciclo de vida en áreas próximas a los sitios en que se transforman. Los amocetos nacen en las cabeceras de los ríos Celio y Duero durante la temporada fría (meses de noviembre, diciembre y enero), aproximadamente en un lapso de tres semanas los huevecillos fecundados realizan su desarrollo, al final del cual las larvas alcanzan a medir aproximadamente un centímetro de longitud.

Las pequeñas larvas muy pronto buscan un lugar donde enterrarse, prefiriendo los fondos suaves o ligeramente arenosos, de donde apenas sobresale su porción anterior, cuando se perturba el fondo donde se encuentran protegidas, nadan rápidamente buscando un nuevo sitio donde instalarse. La estructura anatómica del embudo oral y de la faringe de las larvas revela sus hábitos filtradores; en esta etapa del ciclo de vida son organismos planctófagos, alimentándose principalmente de algas de los géneros: *Rbizolenia*, *Pleurosigma*, *Piularia*, *Stauroneis*, *Amphora*, *Cocconema*; clo-

rofeicas filamentosas, además de algunos rotíferos, ciliados y uno que otro flagelado euglenoidino, que se comprobó con exámenes del contenido intestinal (Álvarez del Villar, 1966).

El estadio de amocetos dura tres años (Álvarez del Villar y Guerra, 1971), al cabo de los cuales alcanzan tallas hasta de 150 mm de longitud, después atraviesan por una metamorfosis. Asimismo, desde que inician sus cambios metamórficos no se alimentan y sufren atrofia del intestino ya que toda la cavidad abdominal es ocupada por las gónadas, tres o cuatro meses después, están sexualmente maduros. Después de una especie de cortejo prenupcial que incluye el amplexo (abrazo sin cópula), hembras y machos descargan sus gónadas, siendo la fecundación externa. Estos organismos presentan un desarrollo gonádico sincrónico, lo que significa que todos los gametos tienen el mismo grado de madurez, resultando en un solo desove en la vida, seguido por la muerte de los reproductores.

Después del desove, los huevecillos quedan depositados en el fondo suave, éstos son esféricos con diámetro de 0.8 a 0.95 mm, de superficie lisa y sin filamentos adherentes. La metamorfosis ocurre entre abril y agosto de cada año. De manera paulatina la abertura oral va adoptando su forma circular suctora, al mismo tiempo que pierde las fimbrias características de la larva, primero desaparecen las del lado dorsal, luego las laterales y por último las del borde ventral; aparecen en el interior del embudo oral las cúspides precursoras de los dientes queratinosos, además de la lengua raspadora; se perfila también cierta independencia anatómica de los conductos faríngeo y esofágico; los ojos que estaban ocultos bajo los tegumentos, se hacen aparentes.

Las aletas impares, que en las larvas son pequeños pliegues, en los adultos sexualmente maduros forman verdaderas aletas dorsales notablemente ensanchadas. Es entonces que se puede notar el dimorfismo sexual, pues en la hembra se desarrolla un pliegue a manera de aleta anal y en los machos una papila "anal", semejando un órgano peniforme y en la región posterior del cuerpo, cierta curvatura hacia abajo.

En los amocetos se ha observado el fenómeno de disminución en la longitud, reducciones que ocurren en los meses de agosto y noviembre de los primero tres años de vida larvaria. Esta disminución es atribuida a la influencia de la temporada de lluvias, debido a que las larvas filtran mayores volúmenes de agua por la reducida concentración planctónica, aunado a que la corriente crecida remueve el sedimentos donde se alojan estos organismos, quienes al quedar al descubierto, nadan contra la corriente hasta enterrarse de nueva cuenta. La disminución de alimento junto con el excesivo consumo de energía, se traduce en el acortamiento de su longitud (Álvarez del Villar, 1966; Álvarez y Guerra, 1971). Durante la época de invierno sufren una segunda disminución, al bajar la temperatura del medio, disminuye su temperatura corporal y por lo tanto, su metabolismo se ve reducido, lo que se traduce en un acortamiento de la longitud (Álvarez del Villar y Guerra, 1971).

6.3.5 Aspectos Ecológicos. Se conoce muy poco acerca de los requerimientos ecológicos de esta especie; por sus hábitos filtradores al parecer no tolera aguas contaminadas. Durante la etapa larvaria y en un corto lapso del estado adulto, habita en arroyos con poca corriente, aguas cristalinas y frías, con substratos blandos y poco pedregosos cubiertos de limo y arcilla.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La temperatura del agua no parece ser un factor limitante para la reproducción ni para el desarrollo de la larva. Los datos disponibles con respecto a este parámetro, oscilan entre 16.2 y 22.5 C en el río Celio (Álvarez del Villar, 1966), en el río Duero a la altura de Etúcuaro es de 10.5 C y en el arroyo del Parque Nacional Insurgente Morelos es de 15 y 17.2 C en febrero y agosto respectivamente (Díaz-Prado *et al.*, 1993).

6.3.6 Estudios Moleculares. Debido a que las lampreas son el grupo de vertebrados más primitivos, han sido objeto de numerosos estudios moleculares. Entre ellos, podemos citar el trabajo de Shintani y colaboradores, quienes analizaron la presencia de respuesta inmune adaptativa. La principal evidencia encontrada fue a nivel histológico, pues observaron la presencia de linfocitos en tracto digestivo y en ovario. Además encontraron la expresión del gen PU.1 (= Spi-B), el cual pertenece a una familia génica involucrada en la diferenciación de linfocitos (Shintani *et al.*, 2000).

En otro estudio, Robson y colaboradores encontraron que las lampreas expresan el gen de la Lamprina, una proteína estructural de la matriz extracelular de varias estructuras cartilaginosa y de naturaleza no colágena y altamente hidrofóbica, que comparte características bioquímicas con la elastina de los

vertebrados superiores (Robson, 1993). Este gen presenta secuencias repetidas en tándem similares a las observadas en la elastina y en algunas proteínas estructurales de invertebrados, como por ejemplo, proteínas del corión de insectos y la seda de las arañas. Estas similitudes son un ejemplo de convergencia secuencial que resulta de la divergencia de una proteína ancestral común existente hace más de 500 millones de años (Robson, 2000).

Específicamente sobre *Lampetra geminis*, se realizó un estudio para describir su diversidad genética en cinco poblaciones. Para este fin, en cada población se utilizaron como estimadores: el índice de diversidad de Shannon, la diversidad nucleotídica y la heterocigosidad. Los tres estimadores indican que existe un grado de variabilidad considerable dentro de las poblaciones de *L. geminis*. Además se realizaron otras pruebas moleculares que indican que no existen diferencias significativas en los valores de diversidad genética entre poblaciones, los valores de divergencia nucleotídica y de la distancia genética de Nei indican que el grado de diferenciación genética entre las poblaciones es mínima (Mejía-Guerrero, 2000). Esto significa que se puede asegurar la existencia de esta especie en peligro de extinción, sin embargo, la transformación del ambiente realizada por el hombre puede provocar la extinción local de las poblaciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGÍA

COLECTA. El material biológico utilizado en este estudio consistió de 3 ejemplares de *Lampetra geminis* (Alvarez del Villar, 1969) colectado con la ayuda de coladeras o redes de acuario en el arroyo del Parque Nacional Insurgente José María Morelos (2 ejemplares) y el arroyo Irapeo (1 ejemplar), Morelia, michoacán (ver Fig. 14) (permiso otorgado por la SEMARNAT según oficio No. SGPA/DGVS-7478). Los organismos colectados se transportaron al laboratorio y se destinaron para diferentes técnicas siguiendo el diseño experimental.

WESTERN BLOT. El tejido se cortó en trozos pequeños y se homogenizó en un politron (Brinkman instruments) durante 5 minutos en una solución de CHAPS 10mM, HEPES 20 mM pH 7.5, NaCl 150mM y CaCl₂ 70 mg, utilizando 4ml de esta solución por g de tejido. El homogenizado se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue usado para determinar la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

La concentración de proteínas totales por μ l fue muy baja, por lo tanto, se tomaron alícuotas de 1000 μ l de muestras y se concentraron cuatro veces por liofilización en el speed-vac (Freeze Dryers) por aproximadamente 2 horas, y se resuspendieron en 40 μ l de

agua desionizada para obtener una concentración más elevada de proteínas totales (μ g/ μ l).

Las proteínas totales y los marcadores de peso molecular preteñidos (BenchMark™ Invitrogen) y se separaron por electroforesis en geles desgasificados de acrilamida bis-SDS al 12.5%, bajo condiciones reductoras utilizando -mercaptoetanol. Los geles se corrieron a 200 V/19mA, a 4°C (Towbin *et al.*, 1979). Finalizada la electroforesis los geles se bloquearon con agua destilada y solución de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) durante 10 minutos con cada solución. La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) se realizó en seco en un Trans-Blot SD (Bio-Rad laboratories) a 15V/62 mA por 15 minutos. Los sitios de unión no específica de las membranas se bloquearon con solución bloqueadora de membranas (Zymed Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-SR 3C5 (Turner y Franchi, 1987; donado por el Dr. D. Spector) y el anticuerpo individual anti-SC35 (Fu y Maniatis, 1990) en dilución 1:75 con solución bloqueadora, a 4°C durante

toda la noche en agitación constante. Después de cuatro lavados de 10 minutos cada uno con buffer de TBS-T (Tris base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, pH 8.0), las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Chemicon International, Inc) en dilución 1:5000 con TBST, una hora a temperatura ambiente y agitación constante. Después las membranas se lavaron cuatro veces con TBST y se revelaron con el sistema de detección para quimioluminiscencia (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cuarto oscuro la reacción de quimioluminiscencia se expuso a una película para rayos X (X-OMAT; Eastman Kodak Company) por tres minutos. La película se reveló en una máquina para procesamiento rápido de Kodak (RP-OMAT).

Algunos geles de electroforesis se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en una mezcla de metanol-ácido acético-agua (5.0%-7.5%-87.5%) durante 30 minutos y se destiñeron con una solución de metanol-ácido acético (5.0%-7.5%).

Tanto películas como geles, se digitalizaron con una cámara digital DC-120 de Kodak.

MICROSCOPIA ÓPTICA. La lamprea *Lampetra geminis*, fue decapitada previa anestesia con éter y fijada en paraformaldehído al 4% diluido en PBS (buffer de fosfatos 0.015 M y NaCl 0.15M, pH 7.3), a temperatura ambiente durante 24 hrs. Después se hicieron tres lavados con PBS de 5 minutos. Trozos pequeños del organismo se colocaron en canastillas de inclusión para continuar con el proceso de deshidratación utilizando alcohol etílico en concentraciones crecientes de 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90% por 15 minutos y dos lavados con etanol al 100%

(15 y 45 min). Se prosiguió con un baño de xilol por 45 minutos e impregnación con parafina por 1 hora; la preinclusión se realizó en paraplast durante toda la noche y se finalizó con la inclusión en paraplast fresco, todo este procedimiento se realizó en un procesador de tejido automático (Shandon) de acuerdo al procedimiento seguido por Ham y Cormack (1983).

Una vez obtenidos los bloques de inclusión se hicieron cortes de 2 a 3 μm de grosor que se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatina al 0.1%, sulfato de cromo y potasio 0.01%; Gall y Pardue, 1971). Para realizar las tinciones posteriores, los cortes se desparafinaron a 60°C por 20 minutos y se re-hidrataron con xilol y baños de etanol en concentraciones decrecientes (100, 96, 70 y 50%) por cinco minutos en cada uno y tres lavados con agua destilada por cinco minutos cada uno.

Tinción con Hematoxilina-Eosina. Primero se realizó la tinción con hematoxilina por 2 minutos, las laminillas se lavaron con agua de la llave para poder diferenciar rápidamente con alcohol-ácido. Este colorante se viró con agua amoniacal y las laminillas se lavaron dos veces con agua corriente durante 1 minuto.

La segunda tinción se realizó con eosina durante 1 minuto, seguida de lavados de un minuto con alcohol-acetona (1:1) y alcohol absoluto-xilol. Las laminillas teñidas se pasaron por xileno (3 veces, 1 minuto cada uno) y se montaron con medio de montaje acuoso Entellan (Merck Corporation) (Lynch *et al.*, 1992). Se realizaron las observaciones correspondientes en un microscopio Zeiss y para el digitalizado de imágenes se utilizó un sistema de circuito cerrado conectado al software Image Pro Plus versión 4.0.

Para las reconstrucciones topológicas de las imágenes capturadas se utilizó el programa computacional Adobe Photoshop versión 6.0.

Inmunofluorescencia. Los cortes desparafinados y re-hidratados se sometieron a una recuperación antigénica con proteinasa K lista para usar (Dako Corporation, 53020) a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con TBST (Tris base 0.05M, NaCl 0.3M y Tween 20 0.1%) por 5 minutos. Se realizó una incubación con solución bloqueadora (Bloqueador Universal, Vector Laboratories, Inc.) diluido en TBST, durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron dos lavados más con TBST por 5 minutos.

Las laminillas se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal 3C5 contra la familia de proteínas SR en dilución 1:20 en TBST durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, posteriormente las laminillas se lavaron dos veces con TBST por 5 minutos para la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón anti-IgG conjugado con FITC (Jakson ImmunoResearch Laboratories, Inc 41845) diluido 1:20 en TBST por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y cámara húmeda.

Los cortes se lavaron dos veces con TBST por 5 minutos y se realizó una contra tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Roche) diluido 1:20 en TBST, el exceso de DAPI se retiró y se realizó el montaje con medio para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, Inc.). Cada laminilla se selló cuidadosamente con esmalte de uñas (Spector y Smith, 1986).

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico con epifluorescencia Nikon eclipse E-800

con objetivo de 100X y las imágenes se registraron por medio de película fotográfica ektachrome ASA 400 de Kodak.

Inmunolocalización Cromogénica. Los cortes desparafinados e hidratados se sometieron a una recuperación antigénica con proteinasa K (Dako Corporation, 53020) a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con TBST (Tris base 1M, NaCl 3M y Tween 20 0.1%) por 5 minutos. Se realizó una incubación con solución bloqueadora (Bloqueador Universal, Vector Laboratories, Inc.) diluido en 2 ml de TBST, durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron dos lavados más con TBST por 5 minutos.

Las laminillas se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal 3C5 contra la familia de proteínas SR en dilución 1:20 en TBST durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda, pasado este tiempo las laminillas se lavaron dos veces con TBST por 5 minutos.

La detección se llevó a cabo incubando con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim Biochemica) diluido 1:20 con TBST durante una hora a temperatura ambiente y cámara húmeda. Se continuó con tres lavados con TBST por 5 minutos y el revelado con el sistema de sustrato para Fast Red (Dako Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se filtró y se usó inmediatamente después de preparada. El desarrollo del color se monitoreó bajo un microscopio óptico y la reacción se detuvo con lavados en agua corriente (Cox y Singer, 1999). Las laminillas se montaron con medio de montaje acuoso Faramount (Dako Corporation).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El precipitado de este cromógeno posee propiedades fluorescentes semejantes al rojo Texas (Cox y Singer, 1999), pero a diferencia del rojo Texas esta fluorescencia es permanente lo que nos permitió utilizar estas laminillas para el conteo de motas en campo claro y realizar cortes ópticos meridianos con el microscopio confocal.

Microscopía Inmunofluorescente Confocal. Se utilizaron las laminillas con inmunolocalización cromogénica. Las observaciones se realizaron con un microscopio confocal Noran acoplado a un microscopio invertido Nikon Diaphot 200 y se utilizó el objetivo 60X. A cada núcleo celular se le hicieron 10 cortes ópticos meridianos de 0.1 μ m a diferentes aumentos y las imágenes obtenidas se reconstruyeron tridimensionalmente con el software 3D de Intervision para la estación de trabajo Indigo de Silicon Graphics.

Cuantificación de las Motas. Para cuantificar el número de motas presentes por núcleo de células neuronales, hepatocitos y células del cordón espinal, se utilizaron las laminillas con inmunolocalización cromogénica. Los núcleos se observaron en un microscopio Zeiss con el objetivo 100X y las imágenes se digitalizaron utilizando un sistema de circuito cerrado conectado al software Image Pro Plus versión 4.0. A las imágenes capturadas se les modificó el fondo, el contraste y el brillo haciendo que las motas resaltaran, para lo cual se utilizó el programa computacional Adobe Photoshop versión 6.0. El conteo se realizó manualmente directamente en el monitor.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Técnica Convencional. El hígado se obtuvo

rápidamente después de haber decapitado a las lampreas previa anestesia con éter. El tejido se colocó en una gota de solución fijadora (paraformaldehído 4% / glutaraldehído 2.5%, diluidos en PBS pH 7.3) y se cortó en pequeños fragmentos, posteriormente se pasaron a solución fijadora fresca por 2 horas a temperatura ambiente.

Después de fijada la muestra, se siguió la técnica convencional de postfijación durante una hora con 1% de tetraóxido de osmio (OsO_4); deshidratación con concentraciones crecientes de etanol al 50, 70, 80, 90 y 96% durante 5 minutos cada uno y tres cambios con etanol al 100% durante 5 minutos. Como agente intermedio entre la resina epóxica y el etanol se realizaron tres baños en óxido de propileno por 5 minutos cada uno.

Las muestras se sometieron a preinclusión en óxido de propileno-resina epóxica en una relación 1:1 por toda la noche, continuando con la inclusión en resina epóxica fresca al 100% y la polimerización a 60 °C por 24 hrs.

De estas inclusiones, se realizaron cortes semifinos de 250 nm que se tiñeron con azul de toluidina y cortes finos de 60 nm empleando un ultramicrotomo Ultra Cut E tipo 701704 (Reichert-Jung). Los cortes finos se recogieron sobre rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo al 3% (20 minutos) y citrato de plomo al 0.3% (5 minutos) (Bozzola y Russell, 1992; Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Las rejillas fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión EM-10 de Zeiss operado a 80 kV, se obtuvieron micrografías que posteriormente se analizaron.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Técnica preferencial para ribonucleoproteínas.
Se siguió la técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión, pero se realizaron dos modificaciones:

1. Se omitió la osmificación.
2. El contraste se realizó con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas con EDTA de Monneron y Bernard (1969), utilizando acetato de uranilo al 3% durante 3 minutos, EDTA 0.2 M pH 6.8 durante 18 minutos y citrato de plomo al 0.3% durante 2 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Identificación taxonómica de *Lampetra geminis*, el vertebrado más primitivo viviente

La identificación taxonómica de *L. geminis* se realizó utilizando el artículo de Álvarez del Villar (1966) quien describe por primera vez esta especie, y el artículo de Lyons y col. (1996), quienes corroboran las diferencias entre las lampreas endémicas de México. Ambos trabajos coinciden en que las características observadas más evidentes que presenta *L. geminis*, son:

1) Estructuras bucales del disco oral:

a. la lámina lingual transversal es poco desarrollada,

b. algunos de sus dientes circumorales son rudimentarios o están ausentes (debido a sus hábitos no parásitos), y
c. la lámina supraoral que no lleva cúspides suplementarias.

2) Externamente:

a. se distingue por una mancha pigmentaria prebrancial, y
b. en la segunda aleta dorsal presenta manchas oscuras en la base.

Con estas características se determinó que los ejemplares colectados en el río del Parque Nacional Insurgente José María Morelos y en el arroyo Irapeo de Morelia Michoacán, corresponden a la especie *Lampetra geminis* (Fig. 15).



Figura 15. Imágenes de *Lampetra geminis* en uno de sus habitats naturales, el Parque Nacional Insurgente José María Morelos, Morelia, Mich. A) Ejemplar donde se puede comparar su tamaño con respecto a la hoja de un árbol. B) Organismo sosteniéndose fuertemente de una roca con la boca, para evitar que se la lleve la corriente del río. ad, aleta dorsal adyacente; ac, aleta caudal; b, boca; o, ojo; pb, poros branquiales; sad, segunda aleta dorsal.

Reconstrucción topológica de *Lampetra geminis*

Con el objeto de reconocer algunos tipos celulares de la lamprea, se llevó a cabo una reconstrucción topológica de la misma, ya que no existe información de la histología para esta especie. Aunque no se ha descrito la histología de *L. geminis*, se conoce la descripción para otras especies. Con ayuda de material bibliográfico donde describen la morfología de lampreas parásitas se logró realizar la reconstrucción topológica de cuatro cortes histológicos a diferentes niveles de la especie mexicana, reconociéndose las estructuras señaladas en las figuras 16, 17, 18 y 19 (Hardisty y Potter, 1971; Wischnitzer, 1972; Bracegirdle y Miles, 1978). Este reconocimiento y familiarización de la especie permitió distinguir con mayor facilidad diversas estructuras por microscopía de inmunofluorescencia y confocal, principalmente estructuras con tipos celulares grandes como el del cordón espinal.

Detección de proteínas SR en vertebrados primitivos

Para detectar la presencia de factores de *splicing* y la especificidad de los anticuerpos monoclonales 3C5 y SC35 en *L. geminis*, se realizó la detección de proteínas SR mediante SDS-PAGE y Western Blot.

Con el método de Bradford se determinó que la concentración de proteínas totales en el homogenizado de la lamprea era de 3.5 $\mu\text{g/ml}$. Para obtener un homogenizado más concentrado, la muestra se liofilizó obteniéndose una concentración final de 14 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas totales. En la figura 20 se muestra la separación de 70 y 80 μg de proteínas totales por medio de SDS-PAGE, donde se observan gran cantidad de bandas correspondientes a diversas proteínas.

Las bandas producto del Western blot se observan en la figura 21, donde los anticuerpos monoclonales 3C5 y SC35 pertenecientes a la familia de proteínas nucleares SR, reconocieron proteínas SR homólogas a las que reconocen en mamíferos, confirmando la monoespecificidad de los anticuerpos y a la vez la presencia de proteínas SR en tejidos de vertebrados primitivos.

El anticuerpo monoclonal 3C5 reconoció dos bandas principales muy evidentes, que corresponden a proteínas de 130 y 38 kDa. Con lo que respecta al anticuerpo monoclonal SC35 sólo se observó una banda muy conspicua que corresponde a una proteína de 35 kDa; sin embargo, se observa una banda poco evidente que puede corresponder a la proteína SC35 pero en estado desfosforilado.

Organización nuclear de los factores de *splicing*

Para estudiar la organización de los factores de *splicing* en los núcleos interfásicos, se realizaron experimentos de marcaje inmunofluorescente en cortes de tejidos de *L. geminis*, usando el anticuerpo monoclonal 3C5 contra proteínas de la familia SR y el anticuerpo secuenciarario contra inmunoglobulinas totales conjugado con FITC. Se observó que los factores de *splicing* en los núcleos celulares de tejidos como el cordón espinal, piel, notocorda, hígado, esófago, músculo, poros branquiales, cartilago y branquias de este vertebrado primitivo se organizan en un patrón moteado similar al de células en cultivo y células diferenciadas de mamíferos (Fig. 22).

Morfológicamente los diferentes tipos celulares observados no presentan un patrón moteado ca-

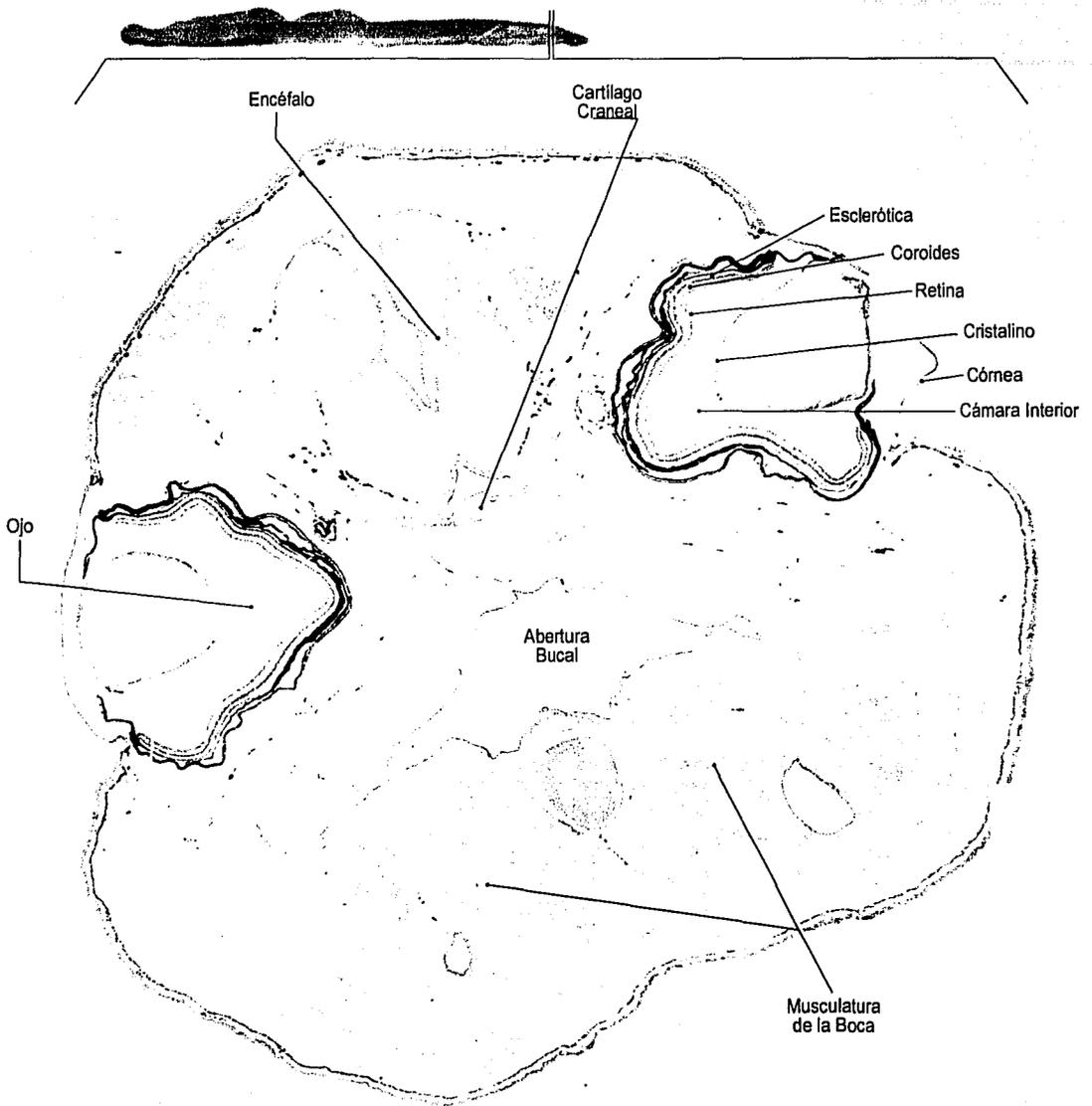


Figura 16. Reconstrucción topológica de *L. geminis* a nivel de ojos, encéfalo y abertura bucal donde se pudieron reconocer algunas otras estructuras (Hardisty y Potter, 1971; Wischnitzer, 1972; Bracegirdle y Miles, 1978).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

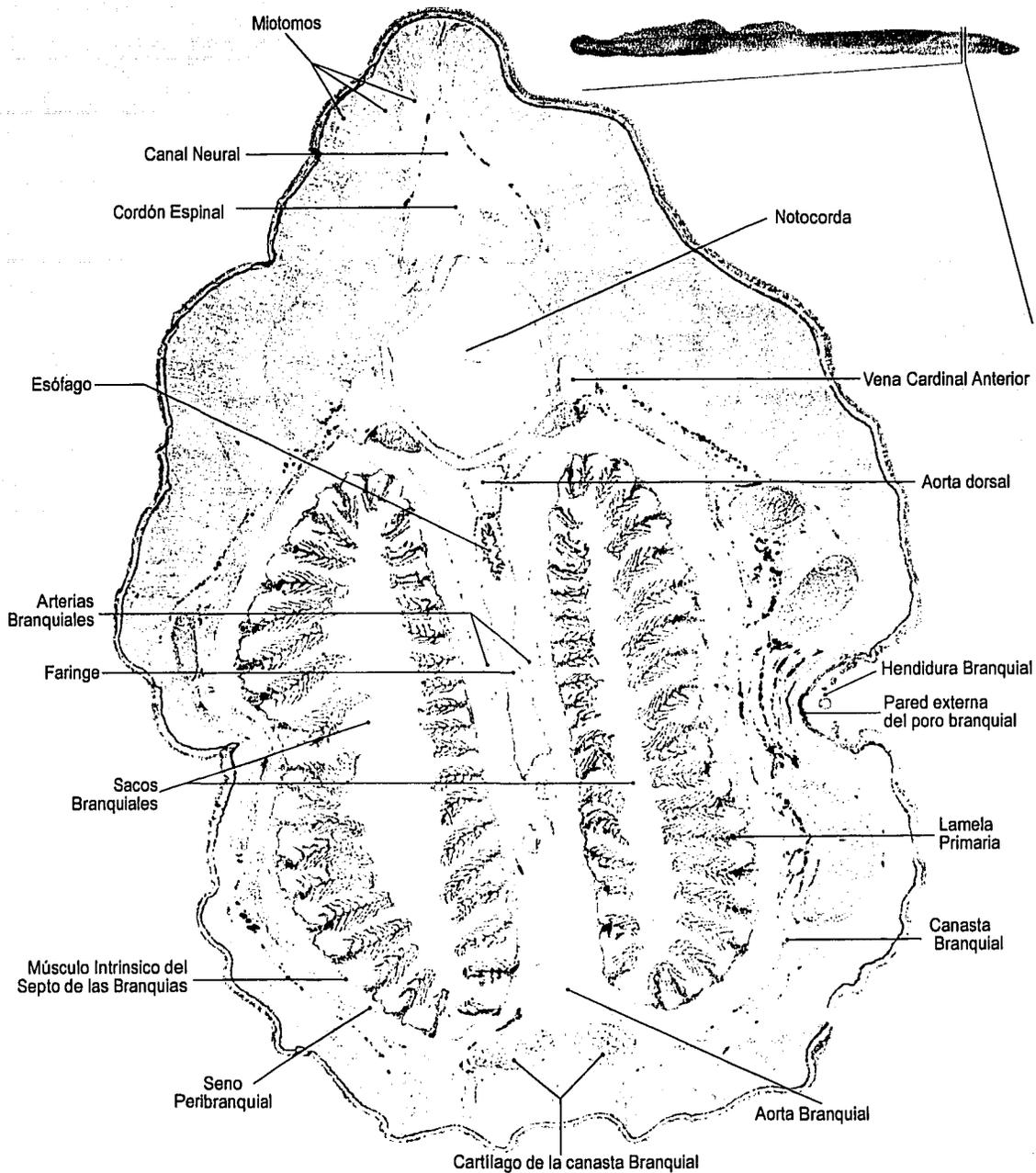


Figura 17. Reconstrucción topológica de *L. geminis* a nivel de notocorda, esófago y sacos branquiales, donde estos últimos ocupan más del 50% de la cavidad (Hardisty y Potter, 1971; Wischnitzer, 1972; Bracegirdle y Miles, 1978).

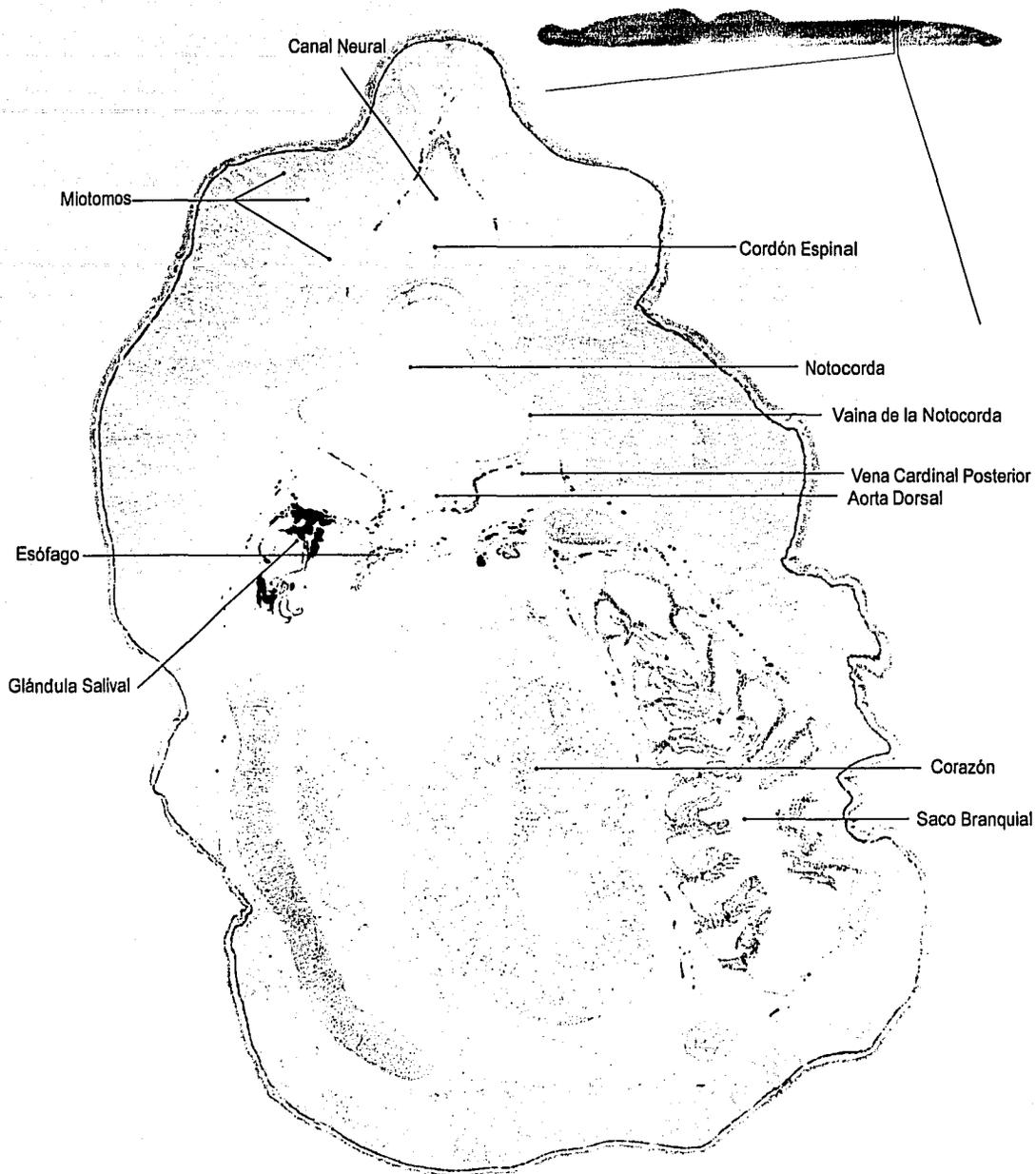


Figura 18. Reconstrucción topológica de *L. geninis* a nivel de corazón y sacos branquiales. A éste nivel solo se pudieron reconocer algunas estructuras (Hardisty y Potter, 1971; Wischnitzer, 1972; Bracegirdle y Miles, 1978).

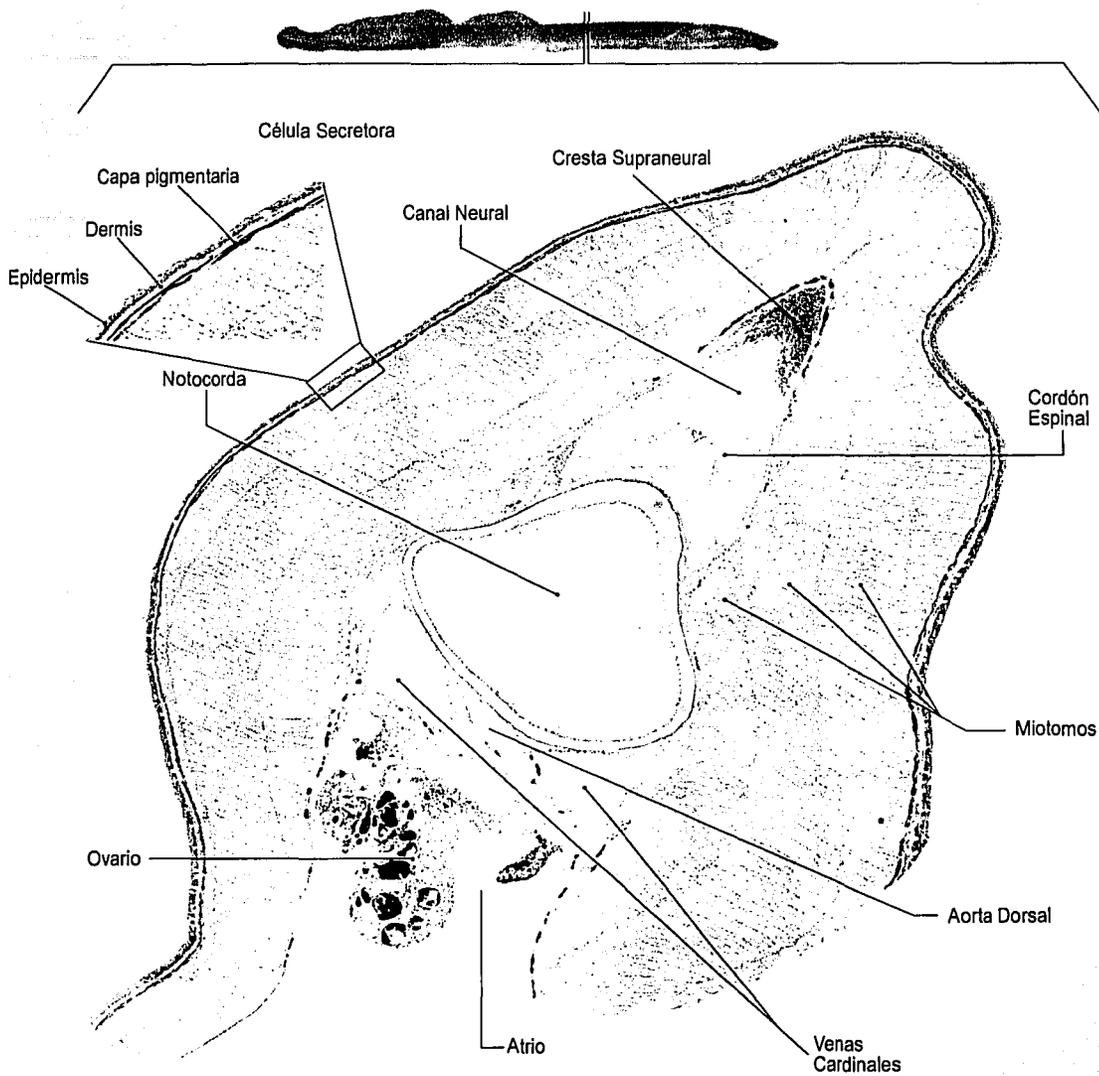


Figura 19. Reconstrucción topológica de *L. geminis* a nivel ovarios (Hardisty y Potter, 1971; Wischnitzer, 1972; Bracegirdle y Miles, 1978).

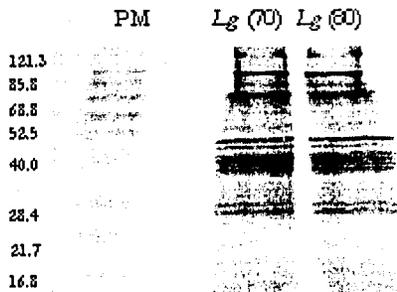


Figura 20. SDS-PAGE de Proteínas totales de *Lampeta geminis* (Lg) en gel de acilamida/bis al 12.5% en condiciones reductoras y teñido con azul de Coomassie. PM, marcadores de peso molecular.

característico, sin embargo, si se aprecia que el número de motas cambia de un tipo celular a otro (Fig. 23), lo cual se corroboró mediante un análisis cuantitativo de las motas.

Análisis Morfológico de la Organización celular de los factores de *splicing*

Con ayuda de la microscopía confocal se pudo realizar la reconstrucción de algunos núcleos de neuronas a partir de 10 cortes meridianos (Fig. 24 y 25) observándose que no existe un patrón específico en la organización de los factores de *splicing* dentro del mismo tipo celular. Sin embargo, es importante mencionar que con estas imágenes se pudo observar tanto motas redondas como de forma irregular en una misma célula (Fig. 26), lo cual nos indica que en vertebrados primitivos existe el mismo

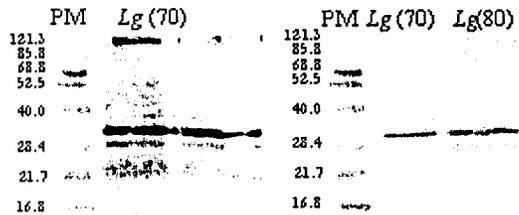


Figura 21. Detección de proteínas SR mediante inmunoblotting. a) con anti-3C5 y b) con anti-5C35.

patrón moteado de los factores de *splicing* que en las células en cultivo y células diferenciadas de tejidos de mamíferos y posiblemente se modifique con la actividad transcripcional.

Análisis Ultraestructural de hepatocitos

Con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas, se observó que el patrón moteado de los núcleos de *L. geminis*, al parecer no corresponden a cúmulos de gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas, sino más bien, a una red fibrogranular extendida por todo el nucleoplasma. Se observaron algunos gránulos intercromatinianos que fueron escasos, dispersos y no se agrupan en cúmulos como en los núcleos de las células animales (Fig. 27). También, esporádicamente se llegaron a observar algunos gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma.

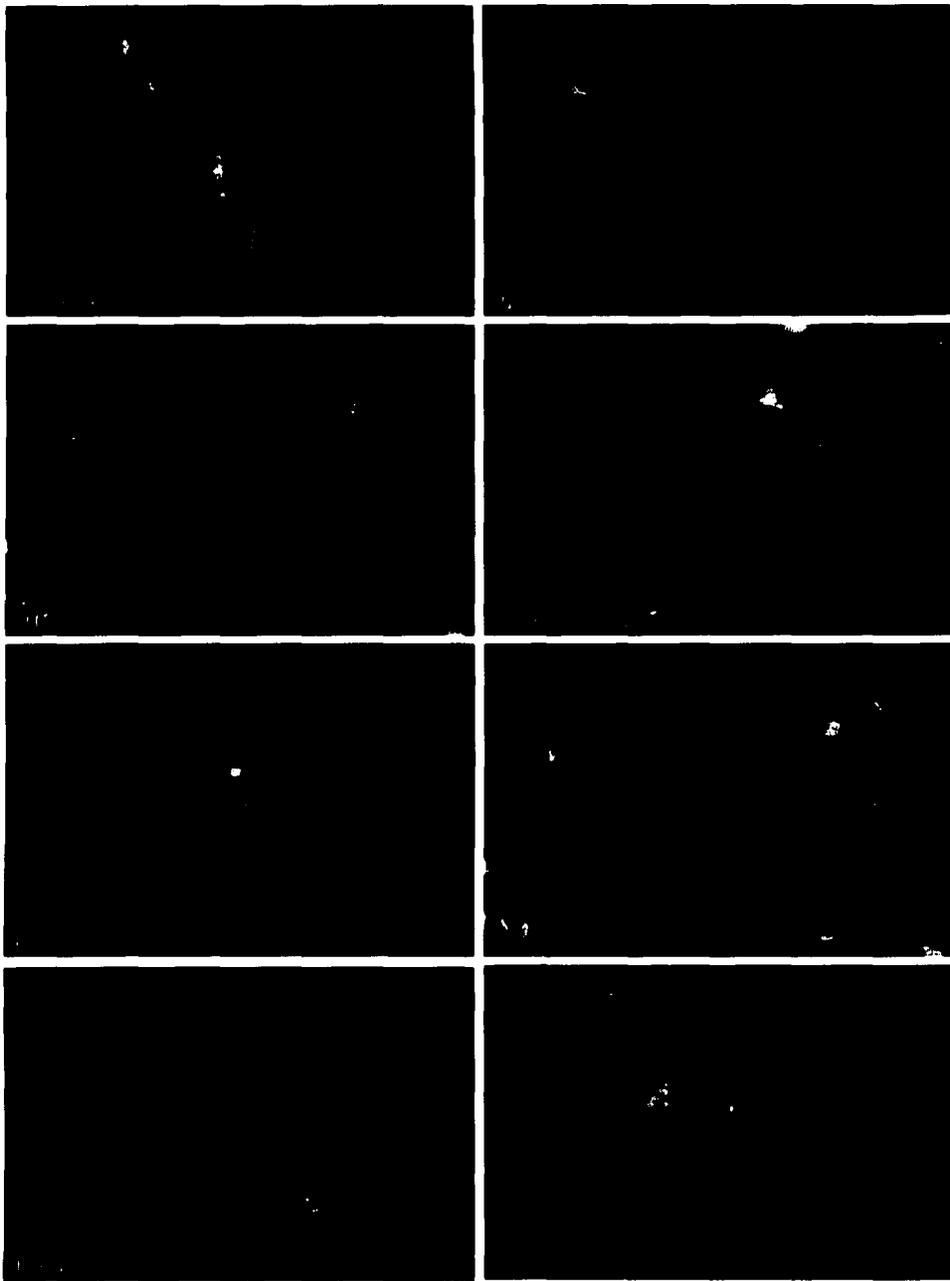


Figura 22. Localización inmunofluorescente de núcleos celulares de varios tejidos de *L. geminis*, visualizados por microscopía de inmunofluorescencia de proteínas SR. En los diferentes tejidos se observa el patrón moteado nuclear característico de células en cultivo y de células diferenciadas de mamíferos. Barra = 2 μ m.

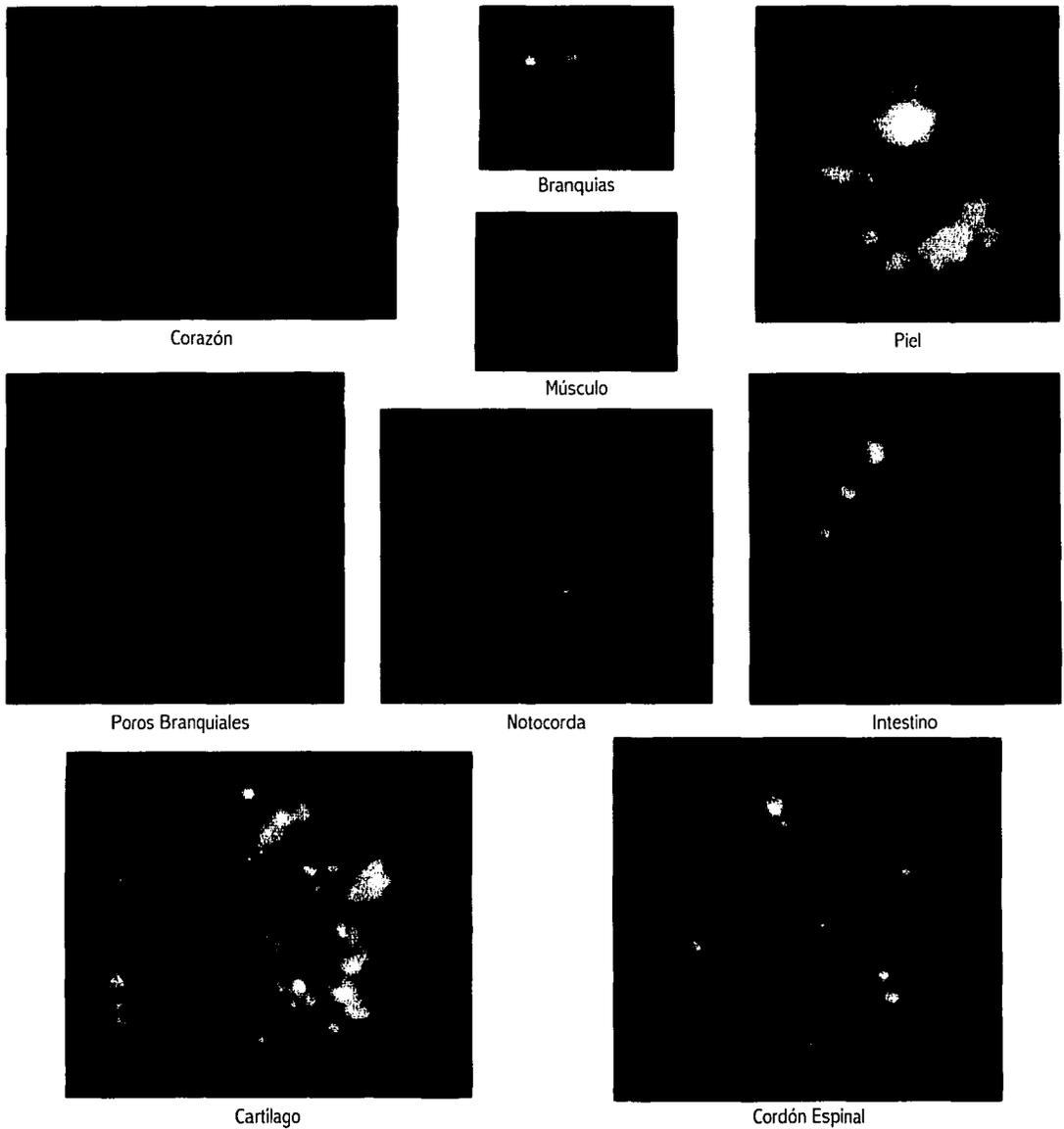


Figura 23. Inmunolocalización de proteínas SR en núcleos celulares individuales de varios tejidos de *L. geminis*. En cada núcleo se observa el patrón moteado nuclear y se observa que el número de motas difiere en cada tejido. Barra = 0.5 μ m.

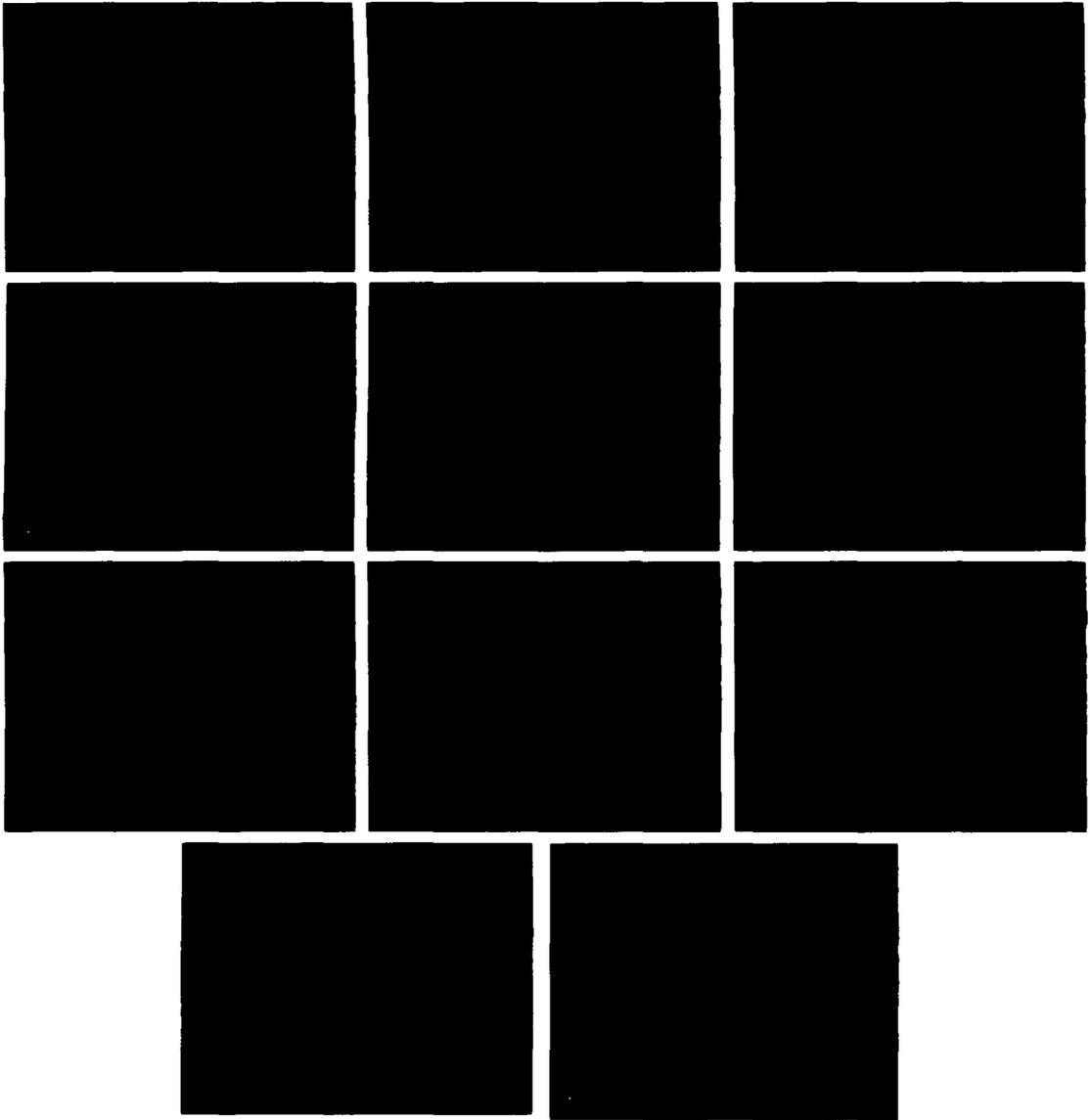


Figura 24. Diez cortes ópticos meridianos de 100 nm y su respectiva reconstrucción de una región del cordón espinal de *L. geminis*, observados por microscopía confocal (reacción cromogénica) donde se aprecian varias neuronas. Aumento 1X . Cada corte Barra = 2 μ m.

Figura 24. Diez cortes ópticos meridianos de 100 nm y su respectiva reconstrucción de una región del cordón espinal de *L. geminis*, observados por microscopía confocal (reacción cromogénica) donde se aprecian varias neuronas. Aumento 1X . Cada corte Barra = 2 μ m.

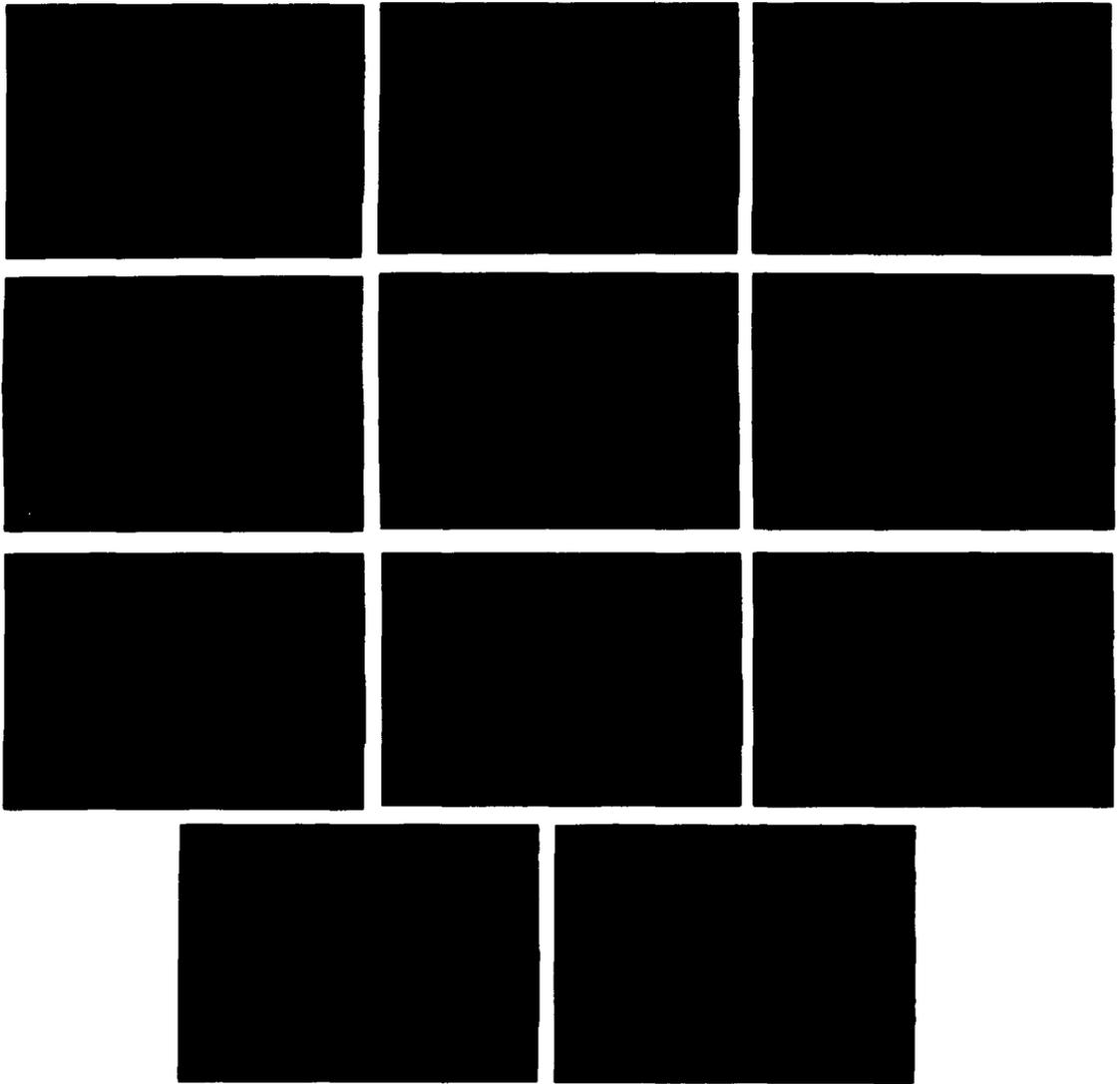


Figura 25. Cortes ópticos meridianos de 100 nm de grosor de una neurona y su respectiva reconstrucción posterior a una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-3C5 y observados por microscopía confocal, donde se observan motas de diferentes tamaños y diferentes formas (redondas y circulares). Aumento 5X. Barra = 1 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

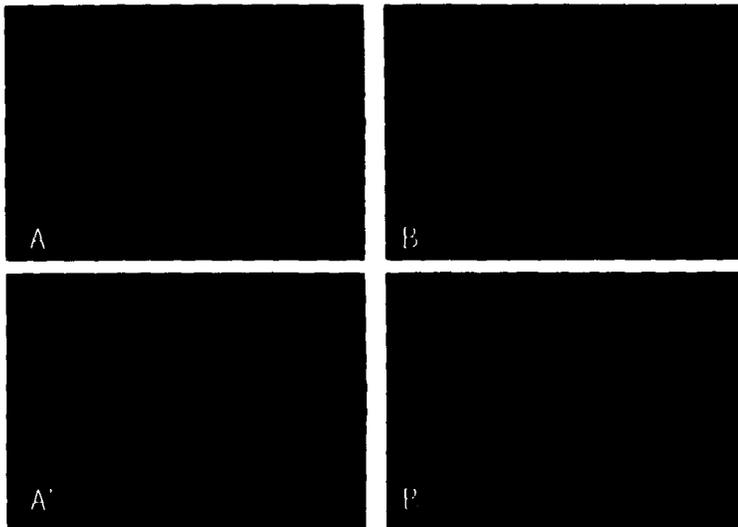


Figura 26. Inmunolocalización de proteínas SR por reacción cromogénica (AP-FastRed) en neuronas de *L. geminis*. (A) corte óptico meridiano de varias neuronas observado (1X), (A') reconstrucción con 10 cortes ópticos meridianos. (B) corte óptico meridiano observado de una sola neurona (5X), (B') reconstrucción con 10 cortes ópticos, donde se pueden observar motas redondas y de forma irregular además de un cuerpo de Cajal (CB).

Análisis Cuantitativo del Patrón Moteado

Con la técnica de inmunolocalización cromogénica se realizó el conteo de motas en 300 núcleos de neuronas, hepatocitos y células de la notocorda (Fig. 28) que al ser las células de mayor tamaño nos permitieron realizar un conteo más preciso. En los núcleos de las neuronas se contaron 26.95 motas en promedio, en hepatocitos 20.8533 y en los núcleos de las células de la notocorda 8.93 (gráfica 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

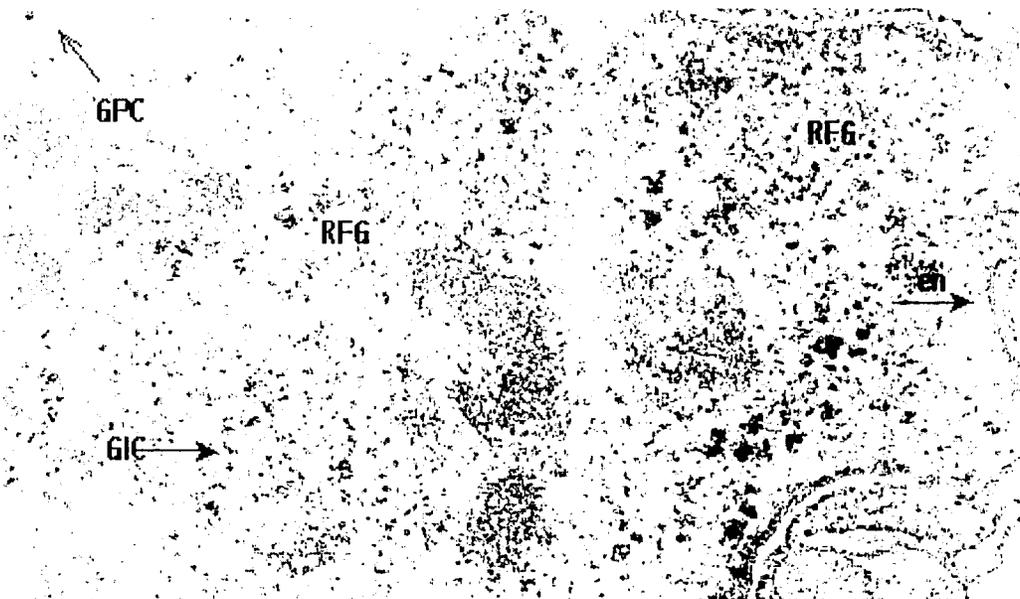
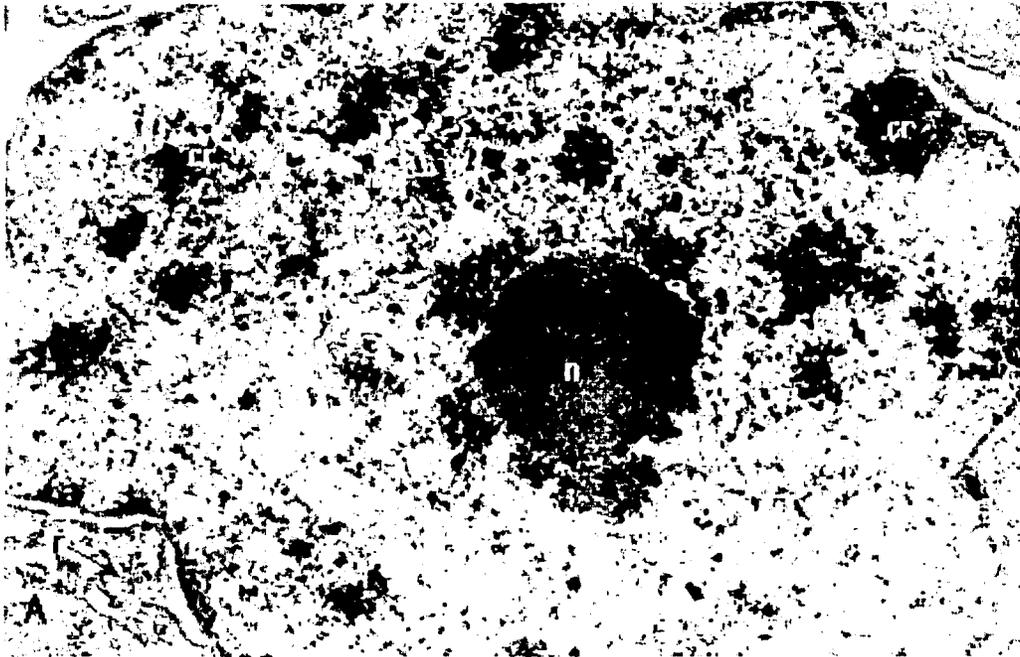
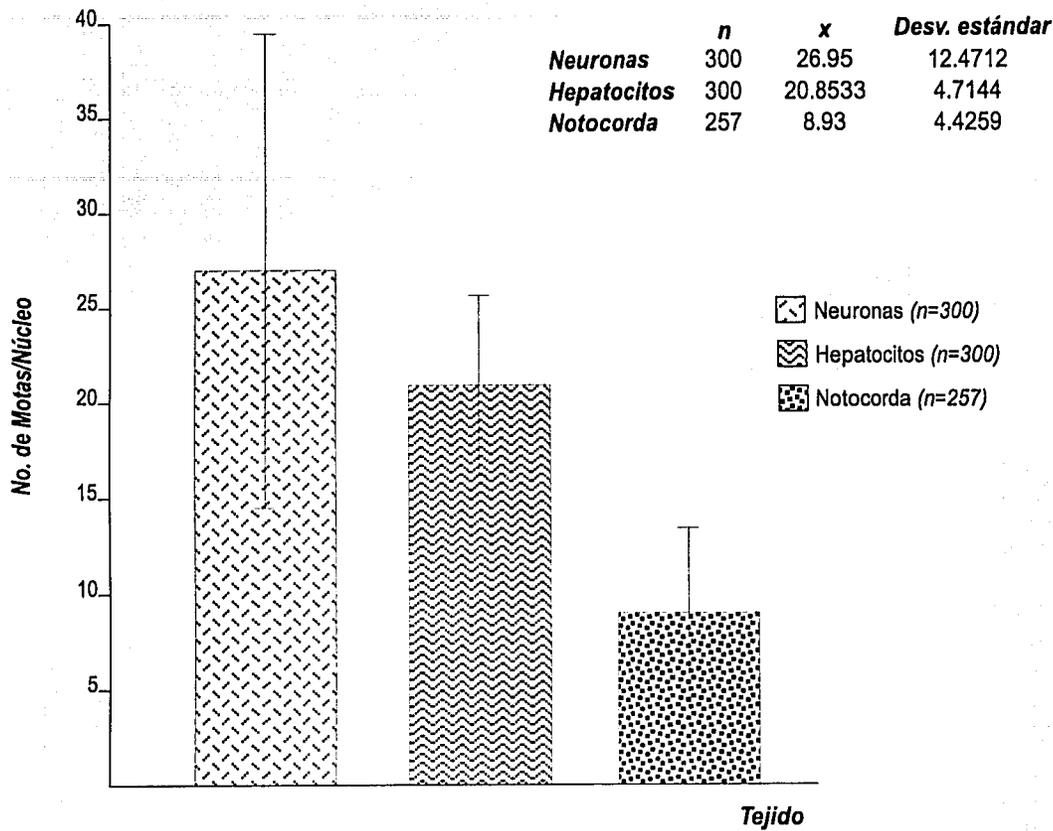
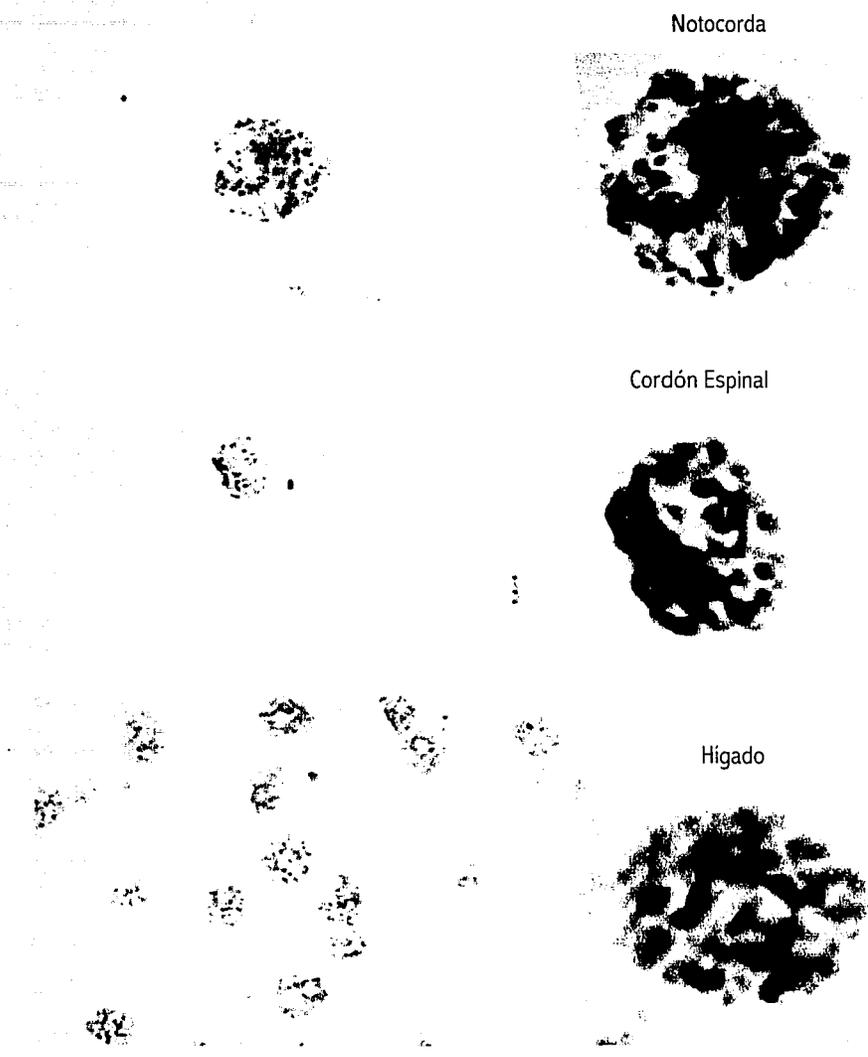


Figura 27. Micrografías electrónicas de transmisión de núcleos de hepatocitos de *L. geminis*. (A) Teñido con acetato de uranilo-citrato de plomo, donde se observa que la organización nuclear es similar a la de un hepatocito de mamífero. Barra = 2 μm (B) Núcleo teñido con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo; se observa la red fibrogranular (RFG), algunos gránulos intercromatinados (GIC) dispersos y un gránulo pericromatiniano (GPC). ct, cromatina; en, envoltura nuclear; n, nucléolo; r, ribosomas. Barra = 0.5 μm .



Gráfica 1. Cuantificación del número de motas por núcleo de células de diferentes tejidos. Se observa que en las neuronas existe mayor cantidad de motas, lo cual puede significar una mayor actividad transcripcional y por lo tanto de *splicing*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Notocorda

Cordón Espinal

Hígado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 28. Inmunolocalización de proteínas SR por reacción cromogénica (AP-FastRed) en diferentes tejidos de *Lampetra geminis* con sus núcleos individuales ampliados.

DISCUSIÓN

Lampetra geminis, especie endémica de México y representante de los vertebrados primitivos vivientes

Alvarez del Villar (1996) realizó una comparación morfológica y morfométrica entre amocetos y organismos adultos procedentes del río Duero y Jacona del Estado de Michoacán, así como del Lago de Chapala en el Estado de Jalisco. El autor encuentra diferencias significativas en la longitud total, y longitud relativa de muchos rasgos anatómicos externos, así como en la dentición y hábitos alimenticios, situación que lo lleva a describir una nueva especie (*Tetrapleurodon geminis*). En este mismo trabajo el autor realiza algunas observaciones importantes, entre las que destacan que *Lampetra spadicea* después de la metamorfosis adquiere hábitos hematófagos que mantiene aproximadamente 2 años antes de alcanzar la madurez sexual, mientras que los individuos postmetamórficos de *L. geminis* permanecen de 3 a 4 meses sin alimentarse hasta alcanzar la madurez sexual; la reproducción en ambas especies ocurre durante los meses de noviembre a enero, posterior a la cual sobreviene la muerte de los individuos.

Así mismo, Lyons y col. (1996) compararon ambas especies, resultando que *L. spadicea* es más grande que *L. geminis*. Proporcionalmente tiene más corta la altura de la primera aleta dorsal, la altura del cuerpo y las longitudes branquial, caudal y postorbital, y más grande la longitud del ojo. La relación entre la longitud total y las longitudes prebranquial, preorbital y del disco, también difieren entre *L. spadicea* y *L. geminis*. Por lo tanto se concluye que *L. spadicea* y *L. geminis* son morfológicamente distintas.

Desafortunadamente, no se colectó ningún ejemplar de *L. spadicea*. Sin embargo, se realizaron comparaciones con ejemplares pertenecientes a la colección de Ictiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Con estas comparaciones y las características distintivas observadas, se llegó a la conclusión de que los ejemplares colectados pertenecen a la especie *L. geminis*, pues las dos especies de lampreas endémicas de México son distintas en varios aspectos y no puede haber confusión.

El análisis histológico realizado confirma la estructura tisular básica de lampreas, que a su vez permitió llevar a cabo los estudios de inmunofluorescencia

en tejidos reconocibles.

Las proteínas SR están presentes en los vertebrados primitivos

Las bandas observadas producto del Western blot, donde los anticuerpos 3C5 y SC35 reconocieron proteínas SR homólogas a las que reconocen en mamíferos, confirman la presencia de estas proteínas en lamprea.

Las bandas observadas estuvieron en las posiciones esperadas. En cultivos celulares de mamíferos, el anticuerpo 3C5 reconoce bandas de 130, 73, 50, 38, 32 y 22 a 25 kDa. En el homogenizado de *L. geminis* se reconocieron 9 bandas de pesos moleculares semejantes a las de cultivos celulares. El anticuerpo SC35 reconoce una proteína de 35 kDa requerida para el *splicing* del pre-mRNA y el ensamble del *spliceosoma* (Fu & Maniatis, 1990).

Las proteínas SR son una familia de factores de *splicing* esencial las cuales evolutivamente son altamente conservadas (Longman *et al.*, 2000) y su presencia en tejidos de lamprea nos lo confirma.

Los resultados entonces nos permiten tener la certeza de que los anticuerpos utilizados reconocen un juego de proteínas homólogas en lamprea.

Organización Celular de Factores de *splicing* en Vertebrados Primitivos

Los análisis de inmunofluorescencia mostraron que las proteínas SR están presentes en el nucleoplasma de núcleos interfásicos de lamprea y se organizan en un patrón moteado. A pesar de presentar núcleos relativa-

mente pequeños, los patrones moteados en diferentes tejidos fueron observados claramente. Así, además de la concentración de factores en cúmulos, se observó también un patrón de tinción difuso en el nucleoplasma, exceptuando al nucleolo.

Diversos estudios indican que las proteínas SR se reclutan de las motas a sitios de transcripción y la fosforilación de serinas de los dominios SR es necesaria para el reclutamiento (Misteli *et al.*, 1997; Misteli *et al.*, 1998). Las motas son estructuras subnucleares que son ricas en factores de *splicing* para el pre-mRNA y están localizadas en las regiones intercromatinianas del nucleoplasma de células de mamíferos. A nivel de microscopía de fluorescencia se observan como estructuras irregulares que varían en tamaño y forma, y cuando se examinan por microscopía electrónica se observan como cúmulos de gránulos intercromatinianos. Las motas son estructuras dinámicas y sus componentes proteicos y RNA-proteína pueden ciclar continuamente entre las motas y otras localizaciones nucleares, incluyendo sitios de transcripción activa.

Análisis Ultraestructural de hepatocitos de un Vertebrado Primitivo

Como es bien sabido las estructuras nucleares de naturaleza ribonucleoproteica se encuentran en animales, plantas y hongos, sin embargo presentan variaciones en tamaño, abundancia y distribución (Jiménez García *et al.*, 1989). A nivel de microscopía de fluorescencia las partículas ribonucleoproteicas como cúmulos de gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas se observan como compartimientos nucleares conocidos como patrón moteado, *speckles* o compartimientos de factores de *splicing* (Misteli, 2000). En vertebra-

dos primitivos, ultraestructuralmente el patrón moteado corresponde a una red fibrogranular y no a estructuras bien definidas como las estructuras descritas por Monneron y Bernhard (1969).

En lampreas, existe la presencia de un patrón moteado con microscopía de fluorescencia, sin embargo la ausencia de cúmulos de gránulos intercromatinianos sugiere que las motas podrían tener una estructura fibrosa básica. Los gránulos intercromatinianos podrían ciclar entre una mota y otra, transportando las proteínas del *splicing*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. La reconstrucción topológica de los cortes histológicos de *Lampetra geminis*, revelan una organización tisular característica de otras especies de lampreas.
2. Los factores de *splicing* no snRNPs en tejidos diferenciados de lamprea se organizan en un patrón moteado, semejante al observado en los núcleos de células en cultivo y células de tejidos diferenciados de mamíferos. El patrón incluye zonas de alta intensidad incluida en un ambiente difuso de tinción.
3. El número de motas de los núcleos de vertebrados primitivos varía de un tejido a otro. Los núcleos celulares de las células de la notocorda presentaron menor número, el de los hepatocitos más y en las neuronas el mayor número.
4. En lampreas, ultraestructuralmente las motas parecen corresponder a una red fibrosa y no a cúmulos de gránulos inter-cromatinianos y fibras pericromatinianas.

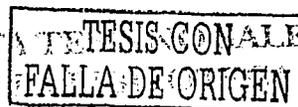
Las conclusiones mencionadas sugieren que el patrón moteado parece estar determinado filogenéticamente, pues están presentes desde mamíferos hasta vertebrados primitivos. Por ello la presencia de los factores de *splicing* en dominios nucleares conocidos como patrón moteado, *speckles* o compartimientos de factores de *splicing*, parecen haber sido seleccionados en un proceso que favoreció la compartimentalización intranuclear del procesamiento del RNA.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adams MD, Rudner D, Rio DC. 1996. Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8:331-339.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 1994. *Biología Molecular de la Célula*. 2ª. Ed., Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Alvarez del Villar J. 1966. Ictiología Michoacana IV. Contribución al conocimiento biológico y sistemático de las lampreas de Jacona, Mich. México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 13:107-144.
- Alvarez del Villar J, Guerra C. 1971. Estudio del crecimiento en amocetos de *Tetrapleurodon*. *Revista de Biología Tropical*. 18:63-71.
- Alvarez del Villar J. 1977. Los Cordados. Origen, Evolución y hábitos de los vertebrados. Consejo Nacional para la Enseñanza de la Biología, A.C. Compañía Editorial Continental, S.A. de México. 3ª. Edición.
- Bachelier JP, Puvion E, Zalta JP. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.*, 58:327-337.
- Barnes RD. 1985. *Zoología de los Invertebrados*. 3ª. Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.
- Beamish RJ, Neville CM. 1992. The importance of size as an isolating mechanism in lampreys. *Copeia*, 191-196.
- Bentley D. 1999. Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:347-351.
- Berenzney R, Coffery DJ. 1977. Nuclear Matrix. Isolation and characterization of framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell. Biol.*, 73:616-637.
- Bockelie T, Fortey RA. 1976. An early Ordovician Vertebrate. *Nature*, 260:36-38.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1992. *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Pub. Boston.
- Bracegirdle B, Miles PH. 1978. *An atlas of Chordate Structure*. Heinemann Educational books.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
- Brown JW, Simpson CG. 1998. Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:77-95.
- Cáceres JF, Krainer AR. 1997. Mammalian pre-mRNA splicing factors. In: *Eukaryotic mRNA Processing: Frontiers in Molecular Biology*. Edited by A.R. Krainer. IRL Press, 174-212.

- Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT, Lamond AI. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117:1-14.
- Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* 147:715-728.
- Cox WG, Singer VL. 1999. A High-resolution, Fluorescence-base Method for Localization of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity. *J. Histochem. & Cytochem.* 47:1443-1456.
- De la Cruz J, Kressler D, Linder P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.*, 24:5:192-198.
- Díaz-Prado E, Godínez-Rodríguez MA, López-López E, Soto-Galera E. 1993. Ecología de los peces del río Lerma, México, *An. Esc. Nac. Cienc. Biol., Mex.*, 39:103-127.
- Doolittle RF. 1994. Convergent evolution: the need to be explicit. *Trends Biochem. Sci.*, 19:15-18.
- Dundr M, Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.*, 356:297-310.
- Fakan SE, Bernhard W. 1971. Nuclear labelling after prolonged H³ uridine incorporation as visualized by high-resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.*, 79:431-444.
- Fakan S, Leser G, Spohr G. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, 99:155-164.
- Fakan S, Odarchenko N. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol. Cell.* 37(3):211-218.
- Fakan S, Puvion E. 1980. The ultrastructural localization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.*, 65:255-299.
- Fakan S, Leser G, Martin T. 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections. *J. Cell Biol.*, 98:358-363.
- Fakan S. 1994. Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.*, 4:86-90.
- Ferreira JA, Carmo-Fonseca M, Lamond AL. 1994. Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. *J. Cell Biol.*, 126:11-23.
- Fu XD, Maniatis T. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, 343:437-441.
- Gall JG, Pardue ML. 1971. Nucleic Acid Hybridization in Cytological Preparation. *Methods Enzymol.*, 21:470-475.
- Gall JG, Bellini M, Wu Z, Murphy C. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell*, 10:4385-4402.
- Gall JG. 2000. Cajal Bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16:273-300.
- George-Téllez R, Segura-Valdez ML, González-Santos L, Jiménez-García LF. 2002. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol. Cell*, 94:99-108.
- Graur D, Li WH. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2nd edition, Sinauer Asso.
- Guerra-Magaña C, Polaco OJ. 1996. Peces dulceacuicolas mexicanos XII: *Lampetra (Tetrapleurodon) geminis* (Alvarez del Villar, 1966) (Agnatha: Petromyzontidae). *Zoología Informa ENCB-IPN*, 33:33-40.

- Ham AW, Cormack DH. 1983. Tratado de Histología. 8ª. Edición. Editorial Interamericana.
- Harris H. 1999. The Birth of the Cell, Yale University Press, New Haven.
- Hardisty MW, Potter IC. 1971. The Biology of lampreys. Academic Press, New York, USA. Vol. II., 466 pp.
- Hastings ML, Krainer AR. 2001. Pre-mRNA splicing in the new millennium. Curr. Opin. Cell Biol., 13:302-309.
- Ho CK, Schwer B, Shuman S. 1998a. Genetic, Physical, and Functional Interactions between the Triphosphatase and Guanylyltransferase Components of the Yeast mRNA Capping Apparatus. Mol. Cell Biol., 18(9):5189-5198.
- Ho CK, Sriskanda V, MacCracken S, Benfley D, Schwer B, Shuman S. 1998b. The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. J. Biol. Chem., 273:9577-9585.
- Huang S, Spector DL. 1991. Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. Genes Dev., 5:2288-2302.
- Huang S, Spector DL. 1992. U1 and U2 snRNAs are present in nuclear speckles. PNAS, 89:305-308.
- Huang S, Spector DL. 1996. Dynamic Organization of pre-mRNA splicing factors. J. Cell Biochem., 62:191-197.
- Hubbs CL, Potter LC. 1971. Distribution, phylogeny and taxonomy. Pp:1-65. In: The biology of lampreys. Eds.: Hardisty, M.W. & Potter, C. Academic Press, New York, USA.
- Janvier P, Lund R. 1983. *Hardistiella montanensis* n. Gen. et sp. (Petromyzontida) from the Lower Carboniferous of Montana, with remarks on the affinities of the Lampreys. J. Verteb. Paleont., 2:407-413.
- Jeffries RPS. 1967. Some fossil chordates with echinoderm affinities. Symp. Zool. Soc. Condon. 20:163-208.
- Jeffries RPS. 1968. The subphylum Calcichordata, primitive fossil chordates with echinoderm affinities. Bull. Brit. Mus. Geol., 16:243-339.
- Jiménez-García LF, Elizundia JM, López-Zamorano B, Maciel A, Zavala G, Echeverría OM Vázquez-Nin GH. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists. BioSystems, 22:103-116.
- Jiménez-García LF, Spector DL. 1993. *In vivo* evidence that transcription and pre-mRNA splicing are coordinated by recruiting mechanism. Cell, 73:47-60.
- Jiménez-García LF, Segura-Valdéz ML. 1993. El origen y la evolución del núcleo celular. Un enfoque ultraestructural de la evolución del procesamiento postranscripcional del RNA premensajero. En: Núñez-Parfán, J. & Cordero, C. (eds.). Tópicos de Biología Evolutiva, Diversidad y Adaptación. Centro de Ecología, UNAM. Méx. Cap. 8:155-174.
- Kambach C, Walke S, Nagai K. 1999. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. Curr. Opin. Struct. Biol., 9:222-230.
- Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tam WY. 2000. A Human Importin- β Family Protein, Transportin-SR2, Interacts with the Phosphorylated RS Domain of SR Proteins. J. Biol. Chem., 275:7950-7957.
- Lewin B. Genes VII. 2000. Oxford University Press Inc., New York.
- Longman D, Johnstone IL, Cáceres JF. 2000. Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J., 19(7):1625-1637.
- Lührmann R, Kastner B, Bach M. 1990. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. Biochem. Biophys. Acta, 1087:265-292.



- Lyons J, Cochran PA, Polaco OJ, Merino-Nambo E. 1994. Distribution and abundance of the mexican lampreys (Petromyzontidae: *Lampetra*: subgenus *Tetrapleurodon*). Southwestern Naturalist. 39:105-113.
- Lynch MJ, Stanley SPR. 1992. Medical Laboratory Technology, vol. 11, 3a. edition, W. Sanders Co., USA.
- Maitland PS. 1980. Guía de peces de agua dulce de Europa. Ediciones Omega, S.A. págs. 66-73.
- Maniatis T, Reed R. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machincs. Nature, 416:499-504.
- Margulis L, Schwartz K. 1982. Five Kingdoms: An Illustrated Guide of the Phyla of Life in Earth (Freeman Co., San Francisco).
- Mejía-Guerrero O. 2000. Diversidad genética de la Lamprea de agua dulce *Lampetra (Tetrapleurodon) geminis* Alvarez del Villar, 1966. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.
- Melcak I, Cermanova S, Jirsova K, Koberna K, Malinsky J, Raska I. 2000. Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs. Mol. Biol. Cell, 11:497-510.
- Mintz PJ, Patterson SD, Neuwald AF, Spahr CS, Spector DL. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. EMBO J., 18:4308-4320.
- Misteli T, Cáceres JF, Spector DL. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. Nature, 387:523-526.
- Misteli T, Cáceres JF, Clement JQ, Krainer AR, Wilkinson MF, Spector DL. 1998. Serine Phosphorylation of SR Proteins Is Required for Their Recruitment to Sites of Transcription *In Vivo*. J. Cell Biol., 143(2):297-307
- Misteli T, Spector DL. 1998. The cellular organization of gene expression. Curr. Opin. Cell Biol., 10:323-331.
- Misteli T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. J. Cell Sci., 113:1841-1849.
- Misteli T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. Science, 291:843-847.
- Moffett JW. 1966. The biology of the cyclostomes with special reference to the lamprey. In: Phylogeny of Immunity. University of Florida Press. Chapter 24:255-262.
- Monneron A, Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res., 27:266-288.
- Moreno Díaz de la Espina S, Mínguez A, Vázquez-Nin GH, Echeverría OM. 1992. Fine structural organization of a non-reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. Chromosoma, 101:311-321.
- Newman AJ. 1994. Pre-mRNA splicing. Curr. Opin. Genet. Dev., 4:298-304.
- Neugebauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, Sleeman J, Lamond A, Mann M. 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. Nature Genet., 20:46-50.
- Nelsen C. 1996. Animal Evolution. Interrelationships of the living Phyla. Oxford University Press.
- Ozawa T, Umezawa Y. 2001. Detection of protein-protein interactions in vivo based on protein splicing. Curr. Opin. Chem. Biol., 5:578-583.
- Paushkin S, Gubitza A, Massenet S, Dreyfus G. 2002. The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. Curr. Opin. Cell Biol., 14:305-312.

- Petrov P, Bernhard W. 1971. Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.*, 35:386-402.
- Petrov P, Seckeris CE. 1971. Early actino of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins, as reveled by electron microscopic observation. *Exp. Cell Res.*, 69:393-401.
- Platani M, Goldberg I, Swedlow JR, Lamond AI. 2000. *In vivo* analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J. Cell Biol.*, 151:1561-1574.
- Prasanth KV, Rajendra TK, Lal AK, Lakhota SC. 2000. Omega speckles —a novel class of nuclear speckles containing hnRNPs associated with noncoding hsr-omega RNA in *Drosophila*. *J. Cell Sci.*, 113:3485-3497.
- Raghunathan PL, Guthrie C. 1998. RNA unwindingin U4/U6 snRNPs requieres ATP hydrolysis and the DeiH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.*, 8(15): 847-855.
- Reed R. 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12:340-345.
- Ring HZ, Lis JT. 1994. The SR protein B52/SRp55 is essential for *Drosophila* development. *Mol. Cell Biol.*, 14:7499-7506.
- Robson P, Wright GM, Sitarz E, Maiti A, Rawat M, Youson JH, Keeley FW. 1993. Characterization of lamprin, an unusual matriz protein from lamprey cartilage. Implications for evolution, structure, and assembly of elastin and other fibrillar proteins. *J. Biol. Chem.*, 268:1440-1447.
- Robson P, Wright GM, Youson JH, Keeley FW. 2000. The Structure and Organization of Lamprin Genes: Múltiple-Copy Genes with alternative splicing and convergent evolution with insect structural proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 17(11):1739-1752.
- Sanford JR, Bruzik JP. 2001. Regulation of SR protein localization during development. *PNAS*, 98(18):10184-10189.
- Sinclair GD, Brasch K. 1978. The reversible actino of α -amanitin on nuclear structure and molecular composition. *Exp. Cell Res.*, 111, 1-14.
- Shintani S, Terzic J, Sato A, Saraga-Babic M, O'hUigin C, Tichy H, Klein J. 2000. Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence. *PNAS*, 97(13):7417-7422.
- Shuman S. 1995. Capping enzyme in eucariotic mRNA síntesis. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 50:101-129.
- Sleeman JE, Lamond AI. 1999. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.*, 9:1065-1074.
- Spector DL, Smith HC. 1986. *Exp. Cell Res.*, 163: 87-94.
- Spector DL, Fu XD, Maniatis T. 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.*, 10:3467-3481.
- Spector DL. 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.*, 114:2891-2893.
- Stahl BJ. 1974. *Vertebrate History: Problems in Evolution*. McGraw-Hill, New, York.
- Thiry M. 1995. Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. *Eur. J. Cell Biol.*, 68, 14-24.
- Turner BM, Franchi L. 1987. Identification of protein and antigens associated with nuclear matrix and clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. Cell Sci.*, 87:269-282.
- Tollervey D, Caceres JF. 2000. RNA Processsing Marches on. *Cell*, 103:703-709.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose

sheets: procedure and some applications. PNAS, 76:4353-4354.

- Varani G, Nagai K. 1998. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 27:407-445.
- Vázquez-Nin GH, Echeverría OM. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, México.
- Visa N, Puvion-Dutilleul F, Harper F, Bachelier JP, Puvion E. 1993. Exp. Cell. Res., 208:19-34.
- Vladikov VD, Kott E. 1979. Satellite species among the holartic lampreys (Petromyzontidae). Canadian J. Zool., 57:860-867.
- Wahle E. 1995. 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. Biochim. Biophys. Acta, 1261:183-194.
- Wahle E, Keller W. 1997. Capping, methylation, and 3' -end formation of pre-mRNA. In: Eukaryotic mRNA Processing. Edit: A.R. Krainer. Irl Press, Oxford University Press. Pág. 281-309.
- Wang J, Takagaki Y, Manley JL. 1996. Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. Genes Dev., 10:2588-2599.
- Wischnitzer S. 1972. Atlas and Dissection Guide for Comparative Anatomy. 2a. ed. W.H. Freeman and company.
- Will CL, Lührmann R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr. Opin. Cell Biol., 13:290-301.
- Wu JY, Maniatis T. 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. Cell, 75:1061-1070.
- Young JZ. 1950. The life of vertebrates. Oxford University Press, London, UK.
- Yun CY, Fu XD. 2000. Conserved SR Protein Kinase Functions in Nuclear Import and Its Action Is Counteracted by Arginine Methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol., 150:707-718.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. Nature, 419:182-185.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS:

<http://www.ucmp.berkeley.edu/vertebrates/basalfish/petro.html>

<http://www.ucmp.berkeley.edu/help/timeform.html>

<http://www.phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/animals/chordata/chordata.html>

<http://www.phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/animals/chordata/vertebrata.html>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN