



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA CELULAR DE LOS GRÁNULOS DE
LACANDONIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. ANA LUISA RAMÍREZ NÚÑEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F,

MAYO, 2007



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.

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 26 de febrero del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Ramírez Núñez Ana Luisa** con número de cuenta **93393197** con la tesis titulada: **"Biología celular de los gránulos de Lacandonia"** bajo la dirección del **Dr. Luis Felipe Jiménez García**.

Presidente:	Dra. Sandra Gómez Arroyo
Vocal:	Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Secretario:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. María Elena Calderón Segura
Suplente:	Dr. Omar Homero Pantoja Ayala

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 25 de abril del 2007


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

**RECONOCIMIENTO POR LOS APOYOS RECIBIDOS PARA LA
REALIZACIÓN DEL PROYECTO:**

Biología celular de los gránulos de *Lacandonia*

**Al CONACYT, mediante la beca otorgada durante mis estudios de maestría con
número de registro 190521.**

y

Este trabajo fue apoyado por DGAPA-UNAM (IN221202, IN206307)

A los

Miembros de mi comité tutoral:

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dra. Sandra Gómez Arroyo

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala

G R A C I A S

Agradecimientos

A *Dios*, por permitirme concluir una etapa más de la vida que él me da. Y brindarme la fuerza y la inteligencia para indagar sobre una pequeña parte de sus innumerables e inescrutables maravillas.

A mis padres David Fco. Ramírez Vilchis y Felicitas Núñez Díaz; y hermanas Diana, Lina y Caro y mis sobrinas Karen y Linda por darme ánimo y alegría en la vida.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por todo su apoyo y la oportunidad de elaborar este proyecto.

A los Doctores Luis Felipe Jiménez García y Lourdes Segura Valdez por su amistad, gran apoyo, paciencia y disposición para la realización de este trabajo. Así como, por su valiosa enseñanza en la materia y manejo del MET y MFA.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica y Confocal de la Facultad de Ciencias, UNAM, por facilitar el equipo, reactivos y demás materiales requeridos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Zavala, Mtra. Ernestina Ubaldo y Mtro. Marco Antonio González por su ayuda, dedicación y valiosos consejos en la enseñanza de la metodología en microscopía electrónica.

A la Mtra. Reyna Lara por su gran apoyo en el conocimiento, manejo, y toma de microfotografías electrónicas.

A la Mtra. Martha Salcedo, por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio de microscopía electrónica, de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A las Mtras. Margarita Ponce y Aurora Zlotnick y al laboratorio de anatomía vegetal de la Facultad de Ciencias, UNAM, por toda la ayuda facilitada en el procesamiento del material para el análisis anatómico y por la obtención de muestras del árbol del Tule, Oax., México.

A los Doctores, Sandra Gómez Arroyo y Omar Homero Pantoja Ayala, por su atenta disposición en cada evaluación y revisión del proyecto.

A las Doctoras. Ma. Elena Calderón Segura y Vilma Maldonado Lagunas por sus comentarios finales a la tesis.

A Carl-Zeiss de México por permitir el uso del microscopio APOTOME.

A la asociación civil mi amigo el árbol por facilitar la obtención de muestras del árbol del “Tule” Oaxaca y contribuir al estudio de este bello ejemplar símbolo nacional.

Al CONACYT por el apoyo económico durante la realización de mis estudios de maestría.

En fin, a todas las personas que me han apoyado en este camino, gracias.

“No soy más que una pequeña pieza de la naturaleza” *Albert Einstein*.

INDICE GENERAL	PAG.
ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	
3.1. Generalidades	6
3.2. Organización del núcleo vegetal	12
3.3. Organización de la cromatina compacta en vegetales	23
3.4. Metabolismo intranuclear de los ácidos nucleicos	25
3.5. Mitosis	42
3.6. Generalidades de la familia Taxodiaceae	52
3.6.1. Generalidades de las especies de <i>Taxodium</i>	53
3.6.2. Relaciones filogenéticas del género <i>Taxodium</i>	60
4. HIPÓTESIS	67
5. OBJETIVOS	67
6. MATERIALES Y MÉTODOS	68
6.1. Microscopía de luz.	68
6.2. Cortes en fresco.	69
6.3. Microscopía de epifluorescencia. ApoTome (Carl-Zeiss).	69
6.4. Microscopía electrónica de transmisión.	70
6.5. Microscopía de fuerza atómica.	71
6.6. Análisis de imágenes	71
7. RESULTADOS	
7.1. Reconocimiento anatómico	72
7.2. Estudio de la estructura de la cromatina por epifluorescencia, con el sistema APOTOME, MET y MFA.	76
7.3. Mitosis en <i>T. mucronatum</i>	107
8. DISCUSIÓN	138
9. CONCLUSIONES	144
10. REFERENCIAS	145
11. RELACIÓN DE FIGURAS E ÍNDICE DE FOTOMICROGRAFÍAS	159

ABREVIATURAS.

GL gránulos de *Lacandonia*

GB gránulos de Balbiani

GPC gránulos pericromatinianos

GIC gránulos intercomatinianos

FPC fibras pericromatinianas

RNPs ribonucleoproteínas

tRNAs RNAs de transferencia

rRNAs RNAs ribosómicos

mRNA RNA mensajero maduro

snRNA RNA nuclear

scRNA RNA citoplásmico

snoRNAs RNAs pequeños nucleolares

snRNPs ribonucleoproteínas pequeñas nucleares

pre-mRNA o hnRNA RNA heterogéneo nuclear

nt nucleótidos

pb pares de bases

RRM motivo de reconocimiento al RNA

BP punto de ramificación

3`SS sitio de *splicing* 3`

5`SS sitio de *splicing* 5`

MET microscopía electrónica de transmisión

MFA microscopía de fuerza atómica

1. RESUMEN

Los componentes del núcleo celular interfásico han sido motivo de estudio desde hace varias décadas. Actualmente se ha reconocido que la compartimentalización de este organelo tiene un papel importante en la organización de los procesos nucleares y en la expresión de los genes.

A diferencia del núcleo de mamíferos, en plantas poco se conoce sobre la compartimentalización de las maquinarias del procesamiento del RNA. El arreglo de su cromatina define los tipos de núcleo cromocéntrico y reticulado, sugiriendo una expresión genética conservada entre grandes grupos de vegetales. Asociados a estos núcleos reticulados, se ha descrito en *Lacandonia schimatica*, angiosperma no común, una novedosa partícula extranucleolar de naturaleza ribonucleoproteica, denominada gránulo de *Lacandonia*.

Estudios previos sugieren que estas partículas ribonucleoproteicas están involucradas en el metabolismo del mRNA y tienen una función semejante a los gránulos pericromatinianos y gránulos de Balbiani descritos en células de mamíferos e insectos, respectivamente. Los gránulos de *Lacandonia* se han encontrado en plantas tempranamente divergentes como *Ginkgo biloba*, no así en *Taxodium mucronatum*. Con el fin de explorar la ubicuidad de tales RNPs, se analizaron núcleos en hojas y brotes de una gimnosperma tardíamente divergente: el “Ahuehuete” (*Taxodium mucronatum*), mediante microscopía electrónica (MET) convencional usando contraste general y preferencial para RNPs. Un análisis anatómico previo permitió reconocer las regiones a estudiar, y determinar su contenido celular por diferentes técnicas de iluminación en microscopía fotónica.

Hojas y brotes de individuos jóvenes y de un ejemplar de aproximadamente 2 000 años de *T. mucronatum* (Oax., Mex.), fueron procesados para microscopía electrónica (MET) convencional y microscopía fotónica. En MET las muestras fueron fijadas de 24 a 36 h en glutaraldehído al 6% en amortiguador de PBS (pH 7.2). Algunas postfijadas con OsO₄ 1% toda la noche, posteriormente se deshidrataron en una serie gradual de etanoles y se embebieron en resina epon. Cortes ultrafinos fueron teñidos con uranilo-plomo o con EDTA. Las muestras preparadas para microscopía fotónica, emplearon FASSO como fijador y se incluyeron en paraplast.

Los cortes en paraplast mediante óptica Nomarski y polarización, revelan la abundancia de cristales de oxalato de calcio, en células del parénquima en empalizada de la cara adaxial y escasos taninos en células del mesófilo que rodean al canal resinífero. Al ser teñidos con DAPI y observados en microscopios de epifluorescencia (NIKON E-800) y con sistema APOTOME (Carl-Zeiss), fue posible demostrar el patrón reticulado en los núcleos de hoja en *T. mucronatum*, el cual es visualizado junto con su textura, *in situ*, por MFA (BioScope con un controlador NanoScope IIIa) en cortes no teñidos, operando el instrumento en modo de contacto, en áreas de escaneo de hasta 14.82 μm^2 .

Cortes ultrafinos con contraste general uranilo-plomo analizados en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010) evidenciaron partículas parecidas a GL, las cuales son positivas al EDTA y se encuentran entremezcladas con bandas de cromatina de arreglo reticulado. Su forma y tamaño (32 ± 2 nm diámetro) es similar al descrito en *L. schismática* y *Ginkgo biloba*. En *L. schismática* durante la floración su número varia, y disminuye conforme transcurre la mitosis. Esto último también se observó en células de hoja y brote de *T. mucronatum*. En conjunto los datos, morfológicos, morfométricos y citoquímicos señalan la presencia de GL en los núcleos de *T. mucronatum*, los cuales están asociados a un núcleo con morfología reticulada, y se encuentran ocupando los espacios inter y pericromatiniano. Estos gránulos representan un estado de carácter que está asociado a núcleos vegetales con cromatina reticulada, preservado en las gimnospermas por más de 246 m.a.

1. SUMMARY

Components of interphase cell nucleus have been studied since the last few decades. Currently, compartmentalization of the nucleus is accepted as an important feature for the organization of nuclear processes and gene expression.

Contrary to animal cells, the complexity of the interphase plant cell nucleus is just beginning to emerge and so far not much is known about the compartmentalization of RNA-processing machineries. In plants, heterochromatin arrangement could be chromocentric or reticulate; suggesting different conserved gene expression processes among large groups of plants. Associated to reticulate plant nuclei a novel extranucleolar RNP component named *Lacandonia* granules (LG) was described in the uncommon angiosperm *Lacandonia schismatica*.

Previous studies suggest that those RNPs have an important role in the mRNA processes, and they might be similar to structures described as Balbiani granules and perichromatin granules in insects and mammalian cells respectively. Besides *L. schismatica* such RNPs have been described in *Ginkgo biloba*, an early divergent gymnosperm, but not in lately divergent plants. With the aim to determine their ubiquity we explored leaf nuclei in a lately divergent gymnosperm the: "Ahuehuete" (*Taxodium mucronatum*) by conventional transmission electron microscopy (TEM) employing general and selective staining methods. Also a previous anatomical study was performed in order to identify leaf components, by bright-field microscopy and different illumination techniques.

Leafs and buds from young members and from the oldest living *Taxodium mucronatum* (2 000 years old) were subjected to TEM and anatomical procedures. TEM samples were fixed for 24 to 36 hours in 6% glutaraldehyde, buffered in PBS (pH 7.2). Some samples were postfixed in 1% osmium tetroxide overnight and subsequently dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in an epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, or with the EDTA procedure. Anatomical methods employed FASSO as fixer and paraplast as the embedded material.

Thick sections of the anatomical processed material by Nomarski and polarization illumination revealed the abundance of calcium oxalate crystals in mesophyll cells and tannins in resiniferous channel cells. When stained with DAPI and analyzed in epifluorescence (NIKON E-800) and with the APOTOME system (Carl-Zeiss) microscope, leaf nuclei showed a reticulate pattern as observed in other gymnosperms. The same pattern could be observed by Atomic Force Microscopy (BioScope with a NanoScope IIIa controller) at 14.82 μm^2 scanned area, working in contact mode.

Ultrathin sections of *T. mucronatum* were contrasted with conventional uranyl acetate-lead citrate and analyzed in an electron microscope (JEOL 1010). The reticulate pattern and structures alike LG were observed intermingled with chromatin bands. The EDTA procedure revealed the ribonucleoproteic nature of such elements; which occupy inter and perichromatinian space. LG are present in nuclei of *T. mucronatum*, associated and intermingled with reticulate nuclei, are similar in size, but not in number, to *L. schismatica*. The number of LG decreases as mitosis progress in *T. mucronatum* buds. Those RNPs are a state of character exclusively associated to reticulate plant nuclei, of gymnosperms which have remained beyond 246 million years.

2. INTRODUCCION.

El núcleo celular en interfase es un organelo muy organizado con dominios nucleares y regiones cromosómicas bien definidas. El estudio de sus componentes *in situ* mediante el marcaje con proteínas fluorescentes, y su seguimiento en tiempo real, denotan que es altamente dinámico, ya que se organizan y distribuyen en distintas regiones, durante el ciclo celular y el desarrollo embrionario.

Las maquinarias encargadas de la transcripción y procesamiento de los ácidos nucleicos, en consecuencia, obedecen a cada estado celular y su activación e inactivación se manifiesta en su organización.

Se ha caracterizado la función de algunos de estos subcompartimentos nucleares, que representan la expresión morfológica del metabolismo intranuclear de los ácidos nucleicos. Así por ejemplo, los gránulos intercromatinianos (GIC), son sitios de almacén de factores de *splicing*, los cuerpos de Cajal (CB), posiblemente participan en su reciclado y las ribonucleoproteínas ubicadas en la región pericromatiniana, son sitios de almacén de pre-mRNAs y mRNAs, como es el caso de los gránulos pericromatinianos (GPC) de mamíferos y gránulos de Balbiani (GB) de insectos. En vegetales, el conocimiento sobre la organización de la maquinaria del RNA es escaso, y posiblemente comparte muchas similitudes con los bien caracterizados núcleos de mamífero. No obstante, recientemente se describió una partícula ribonucleoproteica en una angiosperma excepcional, *Lacandonia schismatica*. Los gránulos de *Lacandonia* asociados a núcleos de estructura reticulada, presentan componentes de la maquinaria encargada del *splicing*, como las proteínas SR y almacenan pre-mRNA.

En la búsqueda de su posible función, ubicuidad y grado de conservación, en el procesamiento del mRNA, se ha comenzado la exploración en varios representantes del reino vegetal. Están presentes en *Ginkgo biloba*, gimnosperma con núcleo reticulado. Sin embargo, en linajes tardíos dentro del grupo monofilético de las gimnospermas se desconoce. Por lo anterior en el presente trabajo, se realizó una caracterización fina de los núcleos en interfase de *Taxodium mucronatum*, ejemplar de 2000 años de antigüedad símbolo nacional, con el fin de aportar datos sobre su citoquímica y posible función. La mayoría de las observaciones indican que tienen relación muy estrecha con el almacén y herencia temprana del mRNA.

2. INTRODUCCION.

El núcleo celular en interfase es un organelo muy organizado con dominios nucleares y regiones cromosómicas bien definidas. El estudio de sus componentes *in situ* mediante el marcaje con proteínas fluorescentes, y su seguimiento en tiempo real, denotan que es altamente dinámico, ya que se organizan y distribuyen en distintas regiones, durante el ciclo celular y el desarrollo embrionario.

Las maquinarias encargadas de la transcripción y procesamiento de los ácidos nucleicos, en consecuencia, obedecen a cada estado celular y su activación e inactivación se manifiesta en su organización.

Se ha caracterizado la función de algunos de estos subcompartimentos nucleares, que representan la expresión morfológica del metabolismo intranuclear de los ácidos nucleicos. Así por ejemplo, los gránulos intercromatinianos (GIC), son sitios de almacén de factores de *splicing*, los cuerpos de Cajal (CB), posiblemente participan en su reciclado y las ribonucleoproteínas ubicadas en la región pericromatiniana, son sitios de almacén de pre-mRNAs y mRNAs, como es el caso de los gránulos pericromatinianos (GPC) de mamíferos y gránulos de Balbiani (GB) de insectos. En vegetales, el conocimiento sobre la organización de la maquinaria del RNA es escaso, y posiblemente comparte muchas similitudes con los bien caracterizados núcleos de mamífero. No obstante, recientemente se describió una partícula ribonucleoproteica en una angiosperma excepcional, *Lacandonia schismatica*. Los gránulos de *Lacandonia* asociados a núcleos de estructura reticulada, presentan componentes de la maquinaria encargada del *splicing*, como las proteínas SR y almacenan pre-mRNA.

En la búsqueda de su posible función, ubicuidad y grado de conservación, en el procesamiento del mRNA, se ha comenzado la exploración en varios representantes del reino vegetal. Están presentes en *Ginkgo biloba*, gimnosperma con núcleo reticulado. Sin embargo, en linajes tardíos dentro del grupo monofilético de las gimnospermas se desconoce. Por lo anterior en el presente trabajo, se realizó una caracterización fina de los núcleos en interfase de *Taxodium mucronatum*, ejemplar de 2000 años de antigüedad símbolo nacional, con el fin de aportar datos sobre su citoquímica y posible función. La mayoría de las observaciones indican que tienen relación muy estrecha con el almacén y herencia temprana del mRNA.

1. ANTECEDENTES.

3.1. Generalidades.

El núcleo celular, descrito por primera vez por el botánico inglés Robert Brown en 1831 (Alberts *et al.*, 1996; Raven y Johnson, 1996; Lamond y Earnshaw, 1998), ocupa alrededor del 10 % del volumen celular. Está delimitado por una envoltura formada por una doble membrana, donde la externa tiene continuidad con el retículo endoplásmico rugoso. Y se fusiona con la interna en varios sitios a diferentes intervalos para formar los poros nucleares, a través de los cuales se produce un transporte activo de moléculas de elevado peso molecular entre el núcleo y el citoplasma (Alberts *et al.*, 1996; Stoffler *et al.*, 1999). Aunque muy conocido, aún quedan muchos aspectos de su funcionamiento y organización que requieren comprenderse (Grande *et al.*, 1997).

Los componentes finos del núcleo, han sido motivo de estudio desde hace ya varias décadas (Bernhard y Moneron, 1969). Estos primeros trabajos indicaban una organización morfológica estática en el núcleo celular en interfase, visión que ha cambiado recientemente; puesto que en este compartimiento ocurren los eventos más vitales, es de esperarse que se encuentre altamente organizado y que contenga regiones bien definidas, así como la infraestructura para llevar a cabo de manera ordenada la replicación, procesamiento, empaquetado y tránsito de los ácidos nucleicos entre el núcleo y el citoplasma (Zimber *et al.*, 2004).

Varias investigaciones recientes, en células vivas, indican que en efecto el núcleo celular interfásico, está altamente organizado en regiones subnucleares no membranosas que se han denominado microambientes nucleares, estructuras nucleares, agregados discretos, *foci*, dominios nucleares o simplemente “dominios”; donde ocurre un intercambio dinámico y un recambio veloz entre sus componentes (Spector, 1990, 1998, 2001; Young *et al.*, 2004; Zimber *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2005). El ejemplo más notable de ello lo constituye el nucléolo, el cual es el dominio subnuclear más prominente bien definido y muy especializado (Jiménez-García *et al.*, 1992; Louvet *et al.*, 2005).

Así, se han determinado en núcleos en interfase, principalmente en células de mamífero, territorios cromosómicos y dominios proteicos cuyo número y presencia

varían dependiendo del tipo celular en estudio (Tabla 1 y Fig. 1) (Verschure, 2004). Estas investigaciones han confirmado que poseen una organización similar a la existente en los organelos distribuidos en el citoplasma, donde contrario a ellos, los “dominios” nucleares con funciones especializadas no están rodeados por membranas. Pueden identificarse morfológicamente por microscopía electrónica de transmisión (MET) y fluorescencia, e inclusive algunos han sido purificados y analizados bioquímicamente, cuyos resultados corroboran una composición de proteínas altamente específica (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002; Lorković y Barta, 2004; Sayito *et al.*, 2004).

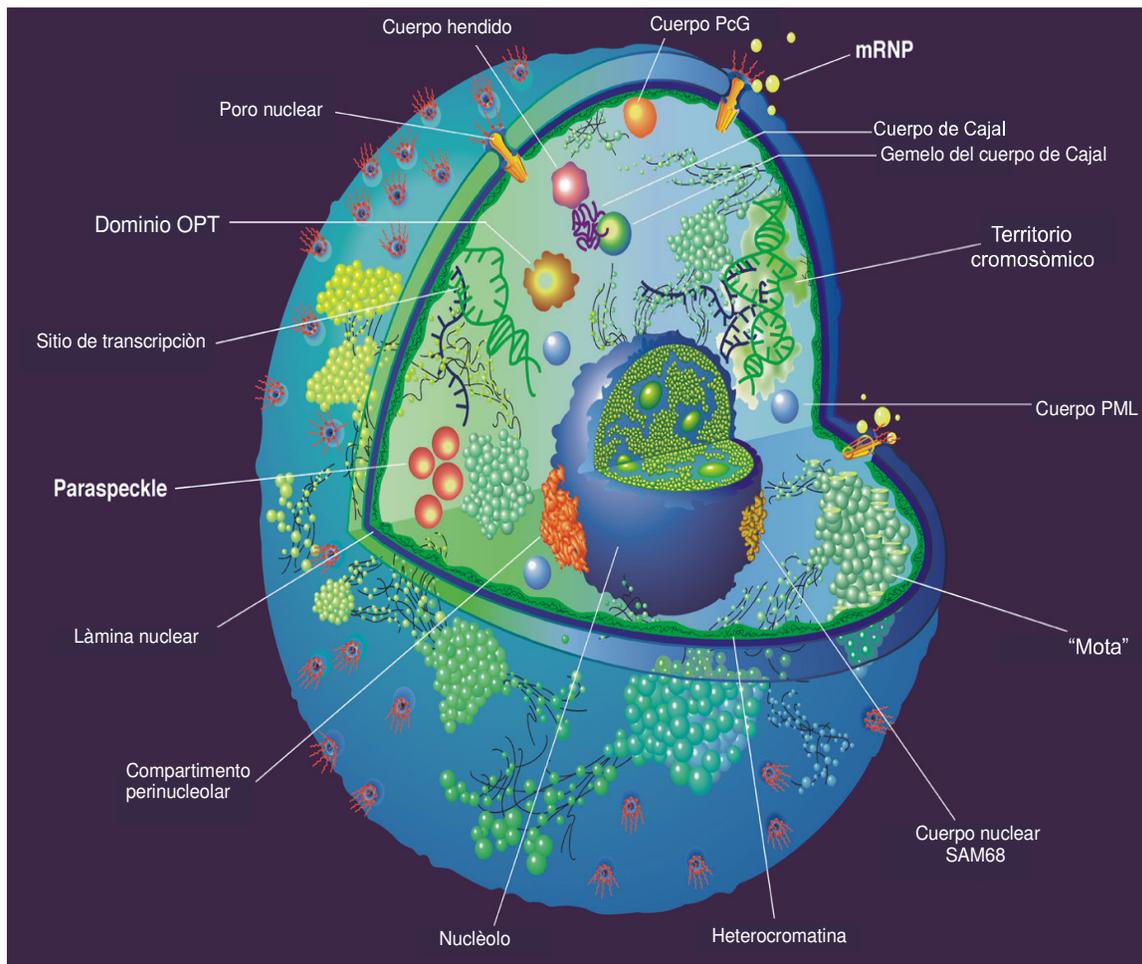


FIGURA 1. Dominios nucleares. Ilustración que muestra la organización intranuclear de compartimentos no membranosos o dominios nucleares, hasta la fecha identificados en un núcleo de mamífero (Spector, 2001). La tabla 1 resume algunas funciones propuestas para estos dominios.

TABLA 1. Dominios nucleares.

DOMINIO	DIÁMETRO (micrómetros μm)	NÚMERO POR CÉLULA	FUNCIONES ESTABLECIDAS O PROPUESTAS	REFERENCIAS
NUCLÉOLO ^{a,b}	0.5 a 5.0	1-5	<p>Estructura nuclear muy prominente, visible al microscopio fotónico.</p> <p>Sitio de síntesis del rRNA, procesamiento, modificación y ensamble de las subunidades ribosómicas.</p> <p>Organizado en diferentes regiones –en plantas y animales- las cuales reflejan la biogénesis y el procesamiento de los ribosomas.</p> <p>Otras posibles funciones son: biogénesis y transporte de mRNA y partículas ribonucleoprotéicas RNPs, control del ciclo celular (metabolismo de p53), control de la proliferación y respuesta al estrés.</p>	<p>Dundr y Misteli, 2001; Spector, 2001; Andersen <i>et al.</i>, 2002; Ideue <i>et al.</i>, 2004; Lorković y Barta., 2004; Zimber <i>et al.</i>, 2004.</p>
SPECKLES / DOMINIO SC35/ COMPARTIMENTO DE FACTORES DE SPLICING / MOTAS ^{a,c}	0.5 a 1.8	25 a 50 agregados c/u con cientos de gránulos	<p>Vistos al MET corresponden a los gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas.</p> <p>Sitios de localización, almacén y ensamble de la mayoría de la maquinaria de <i>splicing</i>.</p> <p>Asociados con bandas R de la cromatina.</p> <p>Otras proteínas encontradas en estos dominios: factores de transcripción, RNA polimerasa II, factores de procesado del extremo 3', lámina A y poly (A)⁺ RNA.</p>	<p>Clemson y Lawrence, 1996; Dundr y Misteli, 2001; Spector, 2001; Lamond y Spector, 2003; Shopland, <i>et al.</i>, 2003; Lorković y Barta., 2004; Zimber, 2004.</p>
PARASPECKLES	--	--	<p>Descritos únicamente en células de mamíferos.</p> <p>Adyacentes a los <i>speckles</i> y rodean al nucléolo formando una “gorra”.</p> <p>Transcripcionalmente inactivos, contienen RNA pol II.</p> <p>Interactúan con algunos factores de transcripción y <i>splicing</i>.</p> <p>Función posible: reciclado de la RNA pol II.</p>	<p>Sleeman, 2004; Xie <i>et al.</i>, 2006.</p>
CUERPOS DE CAJAL / CUERPOS ESPIRALADOS ^{a, b, c}	0.2-1.0 (mamíferos), y más de 2.0 (plantas)	0 a 10 (depende del tipo celular)	<p>Se localizan en el nucleoplasma o cercanos al nucléolo.</p> <p>En plantas generalmente asociados al nucléolo.</p> <p>Muy numerosos y prominentes en células metabólicamente activas (tumores y células en rápida división).</p> <p>Su función no es clara y puede ser múltiple como: ensamble del transcriptoma, proteínas relacionadas con la modificación del rRNA y snRNAs, ensamblaje y maduración de snRNPs; se piensa no están involucrados en el <i>splicing</i>.</p> <p>Tienen componentes de la maquinaria de <i>splicing</i> y posiblemente participan en su reciclaje.</p> <p>Dominios enriquecidos con la proteína coilina y fibrilarina.</p> <p>Se separa para formar dos cuerpos espiralados.</p> <p>La disminución de la energía metabólica incrementa su movimiento. En plantas su movilidad es mayor que en mamíferos, el significado de esto se desconoce.</p>	<p>Raska <i>et al.</i>, 1991; Brasch y Ochs, 1992; Andrade <i>et al.</i>, 1993; Beven <i>et al.</i>, 1995; Carmo-Fonseca, 2002; Gall, 2003; Sleeman, 2004; Zimber, 2004; Lorković y Barta., 2004.</p>

DOMINIO	DIÁMETRO (micrómetros µm)	NÚMERO POR CÉLULA	FUNCIONES ESTABLECIDAS O PROPUESTAS	REFERENCIAS
GEMS Ó GEMELO DE LOS CUERPOS DE CAJAL	0.1 a 2.0	0 a 10	Adyacentes a los cuerpos de Cajal (depende del tipo celular). Posiblemente participan en el ensamble y maduración de snRNPs. Enriquecido con la proteína de supervivencia de motoneuronas (SMN), de la enfermedad hereditaria neurodegenerativa de atrofia muscular espinal.	Liu <i>et al.</i> , 1997; Lamond y Spector, 2003.
CUERPOS HENDIDOS / CLEAVAGE BODIES	0.3 a 1.0	Forman agregados de 1-4	Presentan un patrón de distribución difuso en el núcleo. Algunos se traslapan o están adyacentes a los cuerpos de Cajal, la razón de esta asociación es desconocida. Los que no se traslapan con los cuerpos de Cajal tienen pre-mRNA Involucrados en la ruptura, poliadenilación y procesamiento del pre-mRNA.	Spector, 2001; Lamond y Spector, 2003; Zimmer <i>et al.</i> , 2004.
COMPARTIMIENTO PERINUCLEOLAR (PNC)	0.25 a 1.0	1 a 10	Asociados a la superficie del nucléolo. Función desconocida. Hallados en células cancerosas. Posible participación en el metabolismo del RNA. Contienen pequeños RNAs transcritos por la pol III y varias proteínas de unión al RNA.	Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997; Everett, 2001; Muratani <i>et al.</i> , 2002; Lamond y Spector, 2003; Zimmer <i>et al.</i> , 2004.
CUERPO NUCLEAR SAM 68	0.25 a 1.0	1 a 10	Localización frecuente cercana al nucléolo. Desempeño probable en el metabolismo del RNA. Tiene proteínas de unión al RNA con dominio STAR (señal de transducción y activación del RNA). Predominan en células cancerosas. Función desconocida.	Spector, 2001.
CUERPOS PML / ND10 /DOMINIO NUCLEAR 10 / PODs Ó DOMINIOS ONCOGÉNICOS PML ^c	0.2 a 1.0	10 a 30	Se distribuyen difusamente en el nucleoplasma. Sitios de acumulación de proteínas que modifican la cromatina. Posiblemente con un papel en la regulación de la transcripción. Al parecer regulados por el estrés celular (apoptosis, senescencia, infecciones virales). Presentan tres tipos de dinámica de desplazamiento: poco movimiento, localizado y rápido; que al reducir la energía metabólica su motilidad disminuye. Se fusionan y separan para formar uno y dos cuerpos, respectivamente. Blancos de infección viral. Típicos en células de mamífero. Forma de “dona”.	Spector, 2001; Muratani <i>et al.</i> , 2002; Zimmer <i>et al.</i> , 2004; Zink <i>et al.</i> , 2004; Ching <i>et al.</i> , 2005.

DOMINIO	DIÁMETRO (micrómetros μm)	NÚMERO POR CÉLULA	FUNCIONES ESTABLECIDAS O PROPUESTAS	REFERENCIAS
CUERPOS NUCLEARES	0.5 a 2	--	<p>Generalmente más pequeños que los <i>speckles</i> y de apariencia más esférica. Descritos en células de mamífero y plantas. Algunos tratamientos hormonales inducen su aparición. Otras estructuras que se incluyen como cuerpos nucleares son las parecidas a anillos. Papel citofisiológico desconocido.</p>	<p>Brasch y Ochs, 1992; Agredano-Moreno <i>et al.</i>, 2001; Pradhan y Liu, 2004; Sleeman, 2004; Zimber, 2004.</p>
DOMINIO OPT Ó Oct1 / PTF/TRANSCRIPCIÓN ^c	1.0 a 1.5	1 a 3	<p>Contienen transcritos nacientes Aparece durante G₁, cercano al nucléolo. Desaparece durante la fase S. Función desconocida. Tiene el factor TFHIIH (requerido para la transcripción basal por la RNA pol II).</p>	<p>Grande <i>et al.</i>, 1997. Spector, 2001.</p>

^a El número, tamaño e integridad de estos dominios depende de la actividad celular (por ejemplo: transcripcional), o del ciclo celular.

^b Dominios o cuerpos nucleares que predominan en células malignas en comparación con las normales.

^c La movilidad y dinámica de estas estructuras dentro del espacio nuclear, se ha determinado en células vivas mediante fluorescencia.

La extensa cantidad de experimentos empleando técnicas como la microscopía a intervalos (*time-lapse microscopy*), junto con el marcaje de componentes de estos dominios en células vivas, con diversas proteínas fluorescentes (GFP, CFP, RFP e YFP), y su seguimiento mediante FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*), demuestran los cambios dinámicos presentes en los diversos microambientes subnucleares; determinando que su número, tamaño y localización es generalmente variable y está relacionado con cambios en la actividad celular (Zink *et al.*, 1998; Belmont *et al.*, 1999; Simpson, 1999; Heun *et al.*, 2001; Marshall, 2002; Chubb y Bickmore, 2003; Janicki y Spector, 2003; Spector, 2003; Zimber *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, se ha precisado que el poli (A⁺) RNA se desplaza a través del nucleoplasma a una velocidad de 0.03 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ hacia otros dominios como los *speckles*, dependiendo de la temperatura y ATP (Cremer *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que los dominios nucleares tienen un papel importante en procesos de señalización celular, puesto que en enfermedades humanas (como procesos neurodegenerativos y cáncer), se acompañan de anomalías y desorganización funcional de algunos compartimentos subnucleares, y con cambios en las propiedades dinámicas de la cromatina (Grande *et al.*, 1997; Zimber *et al.*, 2004). Modificaciones en la organización de ésta última, pueden asociarse con patrones de expresión alterada de los genes que son importantes para el proceso de transformación maligna (Zink *et al.*, 2004).

A la luz de estos descubrimientos, la arquitectura de los microambientes subnucleares o compartimentalización, al parecer tienen un papel clave en la actividad nuclear, para regular el metabolismo del RNA, el silenciamiento de la cromatina y en consecuencia la expresión de los genes (Lorković y Barta, 2004; Verschure, 2004).

Gran parte de los estudios sobre la caracterización de estos dominios han sido realizados en células de mamífero, y en consecuencia la información de la morfología y dinámica nuclear vegetal es escasa (Lorković y Barta, 2004). Diferentes metodologías han demostrado la presencia de algunos dominios nucleares en células vegetales como: los “speckles” y los cuerpos de Cajal, los cuales también son estructuras dinámicas como en su contraparte, las células de mamífero. Aunque, aún no es claro el grado de organización estructural y conservación filogenética, entre los diversos grupos de plantas y su relación con metazoarios; por lo cual, el conocimiento de la compleja

compartimentalización de las maquinarias del procesamiento del RNA en vegetales, a diferencia de las células de mamífero, está en sus inicios (Jiménez-García *et al.*, 1992; Beven *et al.*, 1995; Majewska-Sawka y Rodríguez-García, 1996; Lorković y Barta, 2004).

3.2. Organización del núcleo vegetal.

Contrario al núcleo celular animal, cuya disposición ultraestructural es muy conservada entre los diversos *phyla*; en plantas, sus componentes en interfase, pueden variar.

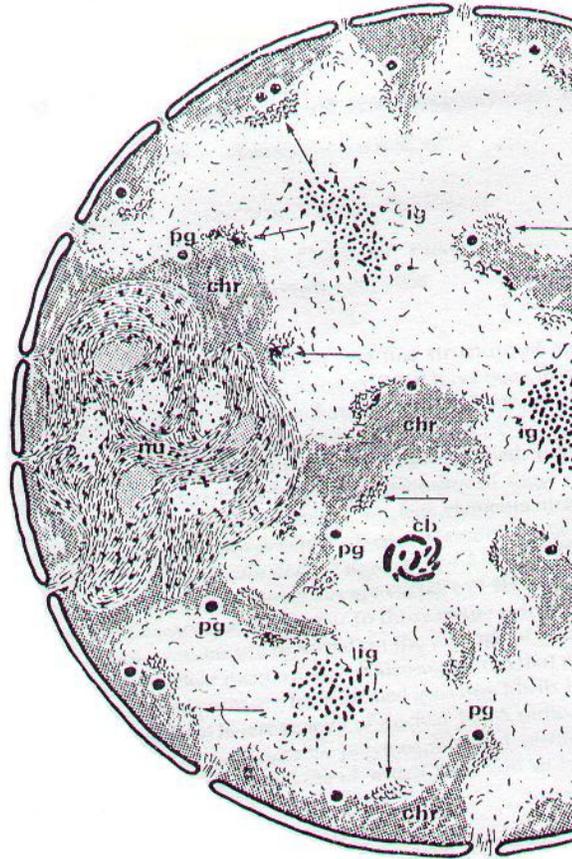
Entre las características distintivas de los núcleos vegetales encontramos: dos distribuciones distintas de la cromatina en el nucleoplasma, estructuras en forma de anillo, elementos ultraestructurales en el nucléolo (como los centros fibrilares heterogéneos) y a los gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García *et al.*, 1992, 1994; Agredano-Moreno *et al.*, 2001).

No obstante, también están presentes en la región intercromatiniana o pericromatiniana (espacio no ocupado por el nucléolo ni grumos de cromatina), estructuras muy características y ampliamente estudiadas de las células de mamífero; como son: las fibras pericromatinianas (FPC), los gránulos pericromatinianos (GPC) y sus análogos en insectos los gránulos de Balbiani (GB), y los gránulos intercromatinianos (GIC).

- Fibras pericromatinianas (FPC).

Descubiertas por Monneron y Bernhard (1969), fueron reveladas al diferenciarse de los grumos de cromatina, mediante el procedimiento de contraste preferencial para ribonucleoproteínas. Se extienden en la periferia de la cromatina condensada y en el nucleoplasma (Figura 2). Su apariencia es de una fibra irregular torcida, de 3 a 5 nm de diámetro. En ocasiones se observa una continuidad estructural entre las FPC y los gránulos pericromatinianos e intercromatinianos (Puvion y Moyne, 1981). En células con gran actividad de expresión génica se distribuyen homogéneamente en el nucleoplasma ocupando la mayor parte del espacio nuclear, excepto el nucléolo (Vázquez-Nin *et al.*, 2003). Estructuras similares a FPC se han identificado alrededor de cromosomas mitóticos en plantas y animales (Puvion y Moyne, 1981).

Figura 2. Esquema de un núcleo en interfase de mamífero. Donde se representan la distribución de estructuras ribonucleoproteicas. chr, cromatina; nu, nucléolo; ig, gránulos intercromatinianos; pg, gránulos pericromatinianos; flechas, fibras pericromatinianas; cb, cuerpo de Cajal (Monneron y Bernhard, 1969).



Sus descubridores las relacionaron con sitios de síntesis extra nucleolar muy activa de RNA. Esto fue corroborado por variaciones en su cantidad como respuesta a sustancias que inducen modificaciones en la síntesis del RNA (Petrov y Bernhard, 1971), y por la incorporación de uridina tritiada (Fakan y Bernhard, 1971). En éstos experimentos, realizados en hígado de rata, estudiaron la distribución de las FPC en condiciones de hambruna y posterior administración de alimento; donde observaron un rápido incremento de FPC al alimentarlas; otras ratas fueron adrenalectomizadas (disminuyendo su actividad metabólica de la glucogenólisis) y posteriormente inyectadas con cortisona, obteniendo el mismo efecto. Al administrar un inhibidor específico de la síntesis de mRNA (α -amanitina), evitaron la aparición de FPC considerablemente; y postularon que, su número y densidad varía de acuerdo al nivel de síntesis de RNA extranucleolar.

La demostración clara de la coincidencia de las FPC, con sitios de transcripción extranucleolar, se obtuvo mediante la combinación de técnicas como la autoradiografía ultraestructural y el contraste regresivo para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969). La administración de un precursor radiactivo ($[^3\text{H}]$ Udr) en tiempos cortos, su marcado rápido y posterior ubicación en zonas blanqueadas del borde de la cromatina, llevó a ésta correlación.

La obtención de fracciones de pre-mRNA y fibras pericromatinianas a partir de células de ovario de hámster chino permitió la ubicación definitiva de las FPC como sitios de síntesis de pre-mRNA (Bachelierie *et al.*, 1975). Después de separar el nucléolo, obtuvieron dos fracciones de la cromatina a 25,000 y 100,000 g (P₂₅ y P₁₀₀). La fracción P₂₅ con componentes ribonucleoproteicos, característicos de la organización *in situ* de la cromatina y de las FPC, fue tratada para aumentar su contenido de RNA; esta nueva fracción denominada P₂₅' marcada con timidina tritiada ([³H] timidina) y con un isótopo de carbono en la uridina ([¹⁴C] UdR), contuvo una mayor porción de RNA nuclear total. Posteriormente, la autoradiografía ultraestructural de P₂₅' ahora marcada con uridina tritiada ([³H] UdR), en células previamente tratadas con dosis bajas de actinomicina D, mostró radioactividad sobre la red de FPC. La electroforesis en poliacrilamida del RNA marcado, demostró la presencia de un RNA de elevado peso molecular, característico del hnRNA (RNA heterogéneo nuclear). Estos experimentos confirmaron que las FPC representan la expresión morfológica de la transcripción del pre-mRNA o hnRNA (Puvion y Moyne, 1981; Vázquez-Nin *et al.*, 2003).

- Gránulos Pericromatinianos (GPC).

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por primera vez por Watson en 1962, en hepatocitos de ratón y rata. Como se observaban próximos a la cromatina se denominaron “gránulos pericromatinianos” (Figura 2), sin implicar que estuviesen constituidos de ésta (Daskal, 1981).

Tienen una morfología muy peculiar, son gránulos muy electrodensos de 30 a 50 nm de diámetro, rodeados por un halo claro de 20 a 25 nm de grosor (Monneron y Bernhard, 1969); originados por el enrollamiento de una fibra pericromatiniana (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Se localizan en la periferia de la cromatina, en ocasiones en sus zonas centrales y algunos aislados en la región intercromatiniana en dirección y cercanos a los poros nucleares (Figura 2). Al examinarse en detalle los adyacentes a los poros nucleares parecen desintegrarse y originar fibrillas delgadas. Puvion y Lange (1980), sugirieron que aunque son un grupo muy homogéneo, es posible que funcionalmente existan dos subpoblaciones de estas partículas, aquellas asociadas al nucléolo y las extranucleolares.

Pocos son visibles durante la mitosis alrededor de los cromosomas (Puvion y Moyne, 1981). En células en metafase provenientes de un hepatoma, se han observado

GPC con un halo conspicuo (Daskal, 1981). No hay información sobre la naturaleza del halo que rodea a la partícula, y no está claro si representa una matriz proteica (Monneron y Bernhard, 1969) o si es formada por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas; posiblemente refleja algún requerimiento estructural necesario para su función óptima (Daskal, 1981).

Watson estimó que su número en un núcleo con un diámetro de 7 μm sería de 500 a 2000; se acepta que son componentes universales de las células animales, lo cual no ocurre en todos los vegetales (Daskal, 1981; Jiménez-García *et al.*, 1992). Se pueden identificar fácilmente por el método regresivo para ribonucleoproteínas (RNP) de Bernhard (1969). Su subestructura, consiste de finas fibrillas enrolladas (a lo que se atribuye su gran electrodensidad), con un diámetro aproximado de 10 a 30 Å. Al parecer no contienen DNA, su contraste disminuye después de tratamientos de pronasa seguidos de RNasa y son resistentes a la acción de ácidos como el perclórico (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Su composición exacta no está determinada, pero parecen contener RNA y proteínas no del tipo histonas (Daskal, 1981). Se ha sugerido que desempeñan un papel en el transporte y almacén de algunos tipos de RNA mensajero maduro (mRNA), del núcleo al citoplasma (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin *et al.*, 2003). Puesto que su cantidad es muy reducida en comparación con otros elementos nucleares como los GIC, se dificulta su aislamiento y purificación para un análisis detallado de sus componentes. Sin embargo, su número y distribución tiene relación con modificaciones del metabolismo celular. Su frecuencia varía dependiendo del estado fisiológico del organismo, por ejemplo; aumenta en condiciones de estrés de temperatura (0-4°C y 43°C), con hepatocarcinógenos (aflatoxina B), en carcinomas mamarios, después de infecciones virales y con inhibidores de la síntesis de proteínas (ciclohexamida) (Daskal *et al.*, 1975 y 1981; Moyne *et al.*, 1977), evidencia que en conjunto se ha interpretado como una persistencia de la síntesis extra nucleolar del RNA y el arresto de su transporte hacia el citoplasma (Puvion y Moyne, 1981). Disminuyen durante el envejecimiento en células del cerebelo (Daskal, 1981).

Por otro lado, experimentos en células de rata *in vivo* e *in vitro* usando hormonas esteroides (estradiol), permitieron estudiar el equilibrio entre la síntesis del mRNA y su transporte al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 1978). Marcando el RNA con uridina tritiada en organismos con ovariectomía y supresión de la hormona se observó que el contenido intranuclear de GPC se acrecentaba. Después de la administración de la

hormona, su número disminuyó a niveles muy por debajo de los normales. Estos resultados sugirieron a la hormona como un regulador postranscripcional de la expresión génica (Vázquez-Nin *et al.*, 1978). Conclusiones similares se obtuvieron con hormonas polipeptídicas. La incidencia en sus efectos por mecanismos de acción diferentes sugirió que es un sistema de control postranscripcional muy frecuente en la naturaleza, que puede ocurrir durante cambios en la expresión genética irreversibles.

La cantidad de GPC varía durante el desarrollo de las células animales (Vázquez-Nin *et al.*, 1980; Zavala *et al.*, 1992). En aves su densidad numérica incrementa durante la diferenciación y maduración morfológica funcional de los neuroblastos a neuronas (Zavala *et al.*, 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997). Existe una correlación en el aumento de GPC con la transformación de la célula matriz a neuroblasto bipolar y multipolar, es decir, durante los cambios que acontecen en el establecimiento de las sinapsis neuronales. Lo mismo sucede con la maduración de los mioblastos a células musculares estriadas (Zavala *et al.*, 1992).

Debido a que en células diferenciadas el contenido de GPC es mayor que en etapas tempranas del desarrollo, se sugiere que estos contienen mRNA de genes con elevada transcripción en la célula madura. Aunque, muchas de las FPC pueden no plegarse en forma de gránulos, ya que existen células muy activas metabólicamente, en las que son muy escasos los GPC (Puvion y Moyne, 1981).

La inmunolocalización ultraestructural *in situ* en los gránulos pericromatinianos, indica que contienen poly (A)⁺ RNA, característico del RNA mensajero maduro (Visa *et al.*, 1993).

En resumen, estas observaciones denotan que los GPC representan un almacén intranuclear de mRNA, que probablemente corresponde a genes muy activos, de proteínas muy abundantes en células diferenciadas, cuya regulación postranscripcional de la expresión de sus genes está asociado con la velocidad de exportación del mensajero del núcleo al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 2003).

-Gránulos de Balbiani (GB).

Comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas de los GPCs con otras RNPs bien caracterizadas conocidas como los gránulos de Balbiani, demostraron que ambos tipos de estructuras son esencialmente idénticas, siendo más fáciles de estudiar en insectos (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

Los gránulos de Balbiani, descritos por Beermann y Bahr en 1954, se producen en grandes cantidades en los “*puffs*” o anillos de Balbiani de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales en larvas de dípteros como: *Chironomus tentans* y *Drosophila melanogaster*; en zonas de elevada transcripción en bandas de cromatina extendida (Figura 3) (Beerman, 1962; Daneholt, 2001a). Son partículas esféricas de 30 a 50 nm de diámetro, constituidas por “cintas” ribonucleoproteicas de 25 a 60 nm de ancho y 10 a 15 nm de grosor, que se pliega sobre si misma, de forma no azarosa, para originar al gránulo y posteriormente se despliega en su paso a través del complejo del poro nuclear (Figura 3) (Daneholt, 2001a, b). En contacto con las bandas de cromatina activa o dispersos en el nucleoplasma, Beermann, Stevens y Swift sugirieron que podían estar involucrados en el transporte de mensajeros hacia el citoplasma (Daskal, 1981). Presentan gran semejanza morfológica y citoquímica con los GPC, comparten características comunes al procedimiento preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), e incorporan uridina tritiada (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

Cada núcleo de *Chironomus tentans* posee cuatro cromosomas politénicos gigantes, resultado de un proceso de endomitosis, donde el cromosoma original se ha duplicado de doce a trece veces, sin intervención de divisiones nucleares; son funcionalmente equivalentes a células en interfase y no a cromosomas mitóticos densos. Hay tres sitios de transcripción excepcionalmente expandidos en el cromosoma IV; denominados BR1, BR2 y BR3 (*Balbiabi ring*), y uno en los cromosomas I y III que corresponden al nucléolo. Los dos genes más grandes (con un tamaño de 30 a 40 kb) y muy activos son el BR1 y BR2, contienen cuatro intrones (tres cercanos al extremo 5' y uno hacia el extremo 3') muy cortos, por lo que el tamaño del transcrito se ve reducido mínimamente durante su procesamiento. Codifican para un polipéptido de la saliva de 1-MDa (un millón de daltons), que es secretado para formar parte del tubo proteínico donde vive la larva del mosquito (Beermann, 1962; Daneholt 2000a).

Los productos de la transcripción de los genes BR son óptimos para la visualización al MET, del ensamble y transporte de estas partículas en el espacio intercromosómico, para conocer el flujo del RNA desde su sitio de síntesis hasta el citoplasma (Daneholt y Hosick, 1973; Daneholt, 1999). Por MET convencional y en alta resolución, se observa que los transcritos incrementan en tamaño a lo largo del gen BR, al cual, se le asocian proteínas para formar una fina o delgada ribonucleoproteína (RNP), que se empaqueta en una estructura globular de elevado orden “el gránulo”

(Figura 3) (Danesholt, 2001b). En alta resolución se visualiza a la fibrilla delgada de RNP conformada de cuatro dominios funcionales de plegamiento (con el dominio 1 que posee el extremo 5' del RNA y el 3' en el dominio 4), durante el ensamble del gránulo, el dominio 1 es el primero en aparecer, subsecuentemente lo hacen el 2 y 3, mientras que el cuarto, no es formado hasta que es retraída la unión en el sitio de transcripción y el gránulo es liberado hacia el nucleoplasma (Skoglund *et al.*, 1986).

De acuerdo con esto, la morfología observada del proceso en MET convencional a bajos aumentos en cortes seriados es; la fibrilla RNP se enrolla ligeramente, y adopta una conformación de “listón corto”, el cual se dobla parcialmente en forma de “anillo” (Figura 3). Al liberarse la partícula del gen, la fibra se retrae y adquiere la conformación total de un “anillo” que se mueve azarosamente, y al parecer por difusión libre (Danesholt, 1999) en el espacio intercromosómico, hasta alcanzar el poro nuclear donde se desdobra y pasa a través de él (Danesholt, 2001b).

De forma similar, la translocación es un proceso altamente ordenado que involucra: la unión del GB a las fibras del poro nuclear, el acoplamiento del dominio 1 (extremo 5') en el poro, su entrada en el canal central, donde se elonga paulatinamente a su paso, y adquiere forma de bastón; para finalmente salir al citoplasma con el extremo 5' como líder durante el transporte. En el proceso el gránulo de Balbiani pierde algunas proteínas, mientras se añaden otras. Una vez desenrollado emerge hacia el citoplasma para iniciar su traducción en los polisomas (Figura 3) (Danesholt, 1997, 2001a; Soop *et al.*, 2005).

Se ha estimado que cerca de 400 a 500 proteínas conforman un GB. Su pre-mRNA se asocia con muchas proteínas, usualmente designadas proteínas hnRNP (proteínas heterogéneas nucleares o *core*), extensamente estudiadas en mamíferos (proteínas hnRNP) e insectos como *Drosophila* y *Chironomus* (proteínas hrp) (Danesholt, 2001b). En experimentos de reconstrucción *in vitro*, a cada especie diferente de RNA, se le asocia una combinación única de proteínas hnRNP, por lo que su unión no es al azar, aunque pueden adosarse a un amplio rango de secuencias con una afinidad selectiva. Es posible aislar proteínas de los GB de la fracción 300S, pero la cantidad no es suficiente para realizar su caracterización bioquímica (Danesholt, 2001a, b).

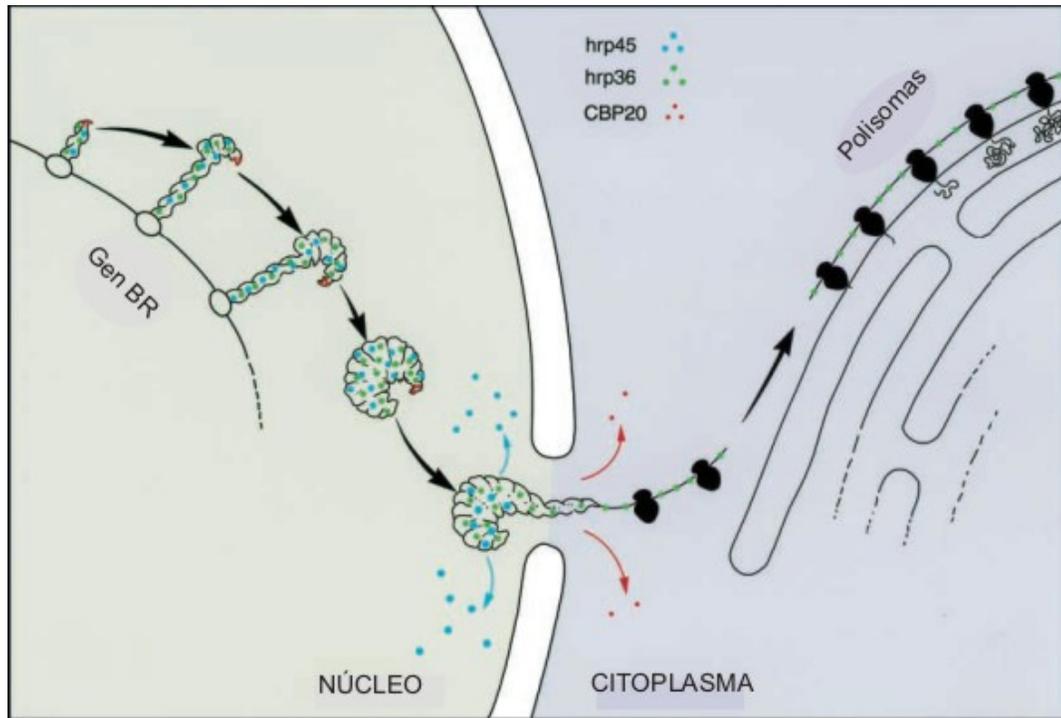


Figura 3. Empaquetamiento y transporte del transcrito de mRNA. Se muestran algunas proteínas (hnRNPs) que acompañan a la partícula ribonucleoproteica (gránulo de Balbiani), en *Chironomus tentans*. Las tres proteínas hrp45, hrp36 y CBP20 se añaden cotranscripcionalmente durante la síntesis del RNA. Hrp45 y hrp36 se unen a lo largo de la partícula ribonucleoproteica mientras que CBP20 solamente en un extremo. Hrp45 se libera antes de que el gránulo de Balbiani sea translocado a través del poro nuclear mientras que, CBP20 lo hace cuando el RNA llega al citoplasma y hrp36 acompaña al RNA hacia los polisomas (Daneholt, 2001b).

Algunas proteínas unidas cotranscripcionalmente al RNA mensajero permanecen con él, mientras que otras lo abandonan en diversas etapas durante su transporte del gen a los polisomas. Esta participación selectiva, en cada fase del proceso implica un papel específico durante la exportación del mensajero del núcleo al citoplasma. Se ha rastreado el destino de tres proteínas hrp del GB, que se asocian a la fibrilla: la proteína hrp36, añadida durante la transcripción a lo largo del RNA, permanece en el transporte del GB, en la translocación, y aún en los polisomas; la CBP20 (*cap binding protein*), se une al extremo 5' de manera cotranscripcional y continúa en el gránulo mientras ocurre su translocación, es liberada cuando el extremo guía alcanza el citoplasma y posiblemente regresa al núcleo; la proteína hrp45 (con una organización característica de la familia SR, de factores de *splicing*) y la hrp23 (de la familia SR, con un dominio

carboxilo terminal rico en glicina), se adosan al transcrito naciente a lo largo del exón y parecen participar en el establecimiento del *splicing* más que en el proceso como tal. Hrp23 se libera antes de que el GB se una al complejo de poro nuclear y hrp45 lo hace cuando la partícula entra al canal central del poro (Figura 3). Las proteínas que acompañan al gránulo hasta el citoplasma y los polisomas, son: la hrp36, hrp84 y la actina (Daneholt, 2001a).

Además, de proteínas *core*, otros complejos supramoleculares interactúan con el RNA para procesarlo. Los gránulos en formación se marcan en la periferia con el anticuerpo anti-snRNPS, mientras que los libres en el nucleoplasma no, lo que sugiere que éstos últimos representan sitios de RNAs mensajeros maduros (Vázquez-Nin, 1990).

- Gránulos intercromatinianos (GIC).

Son las subestructuras nucleares más estudiadas, fueron descritos por primera vez por Hewson Swift (1959), como agregados polimorfos en ocasiones continuos con fibrillas, ocupando el espacio intercromatiniano (Puvion y Moyne, 1981). Presentes en plantas, animales y hongos; son particularmente muy abundantes en todas las células de mamífero, donde se agrupan en cúmulos (Figura 2) (Jiménez-García *et al.*, 1989). Tienen un diámetro de 20 a 25 nm (Moneron y Bernhard, 1969). A elevados aumentos se observa que consisten de finas fibrillas enrolladas (Puvion y Bernhard, 1975; Wassef, 1979).

Mediante hidrólisis enzimáticas y químicas se demostró su composición de RNA y proteínas, siendo las estructuras más resistentes a la acción quelante del EDTA (Monneron y Bernhard, 1969), ya que por períodos prolongados permanecen altamente contrastados, mientras la cromatina y aún el nucléolo son completamente blanqueados. Pruebas bioquímicas indican que se trata de una clase de partículas ribonucleoproteicas donde el RNA está bien protegido y que proteínas muy fosforiladas, se encuentran involucradas en su reacción positiva al citrato de plomo, entre otras (Wassef, 1979). Con tratamientos de pronasa y RNasa su tamaño disminuye (Moneron y Bernhard, 1969), y el empleo de tinciones específicas para DNA no ha revelado su presencia en ellos. Son positivos a la técnica preferencial de oxinitrato de bismuto (Brown y Locke, 1978), que permite estudiarlos en vegetales (cebolla), donde son escasos y se encuentran esparcidos sin formar agregados o “clusters” (Medina *et al.*, 1989).

Contrario a los GPC, GB y las FPC (Figura 2), no ha sido posible relacionar las variaciones cuantitativas de los GIC con cambios específicos del metabolismo celular. Agentes químicos que tienen como blanco primario la cromatina extranucleolar, producen alteraciones morfológicas en la aparición de agregados de GIC o un incremento en el tamaño de los existentes. Infecciones virales inducen un aumento en su número (Singer, 1975; Dupuy-Coin *et al.*, 1978; Puvion y Moyne, 1981). El determinar su función ha sido una tarea muy difícil. En sus inicios fueron interpretados como ribosomas en proceso de formación, durante su transferencia del nucléolo al citoplasma, ya que parecían originarse del componente granular. Otra hipótesis los consideraba como productos de desintegración nucleolar, puesto que, infecciones virales provocaban su acumulación adyacente al nucléolo (Smetana *et al.*, 1963; Singer, 1975).

En células en cultivo, la marca en su periferia con uridina tritiada es muy leve, es decir, la incorporan escasamente, lo que indica un componente de RNA de larga vida media (Fakan y Bernhard, 1971). Los mejores candidatos son los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina (RNA_{bpmU}), ya que son los de vida media más larga (Puvion y Moyne, 1981), y están relacionados con el procesamiento del pre-mRNA. La inmunolocalización de las proteínas que se unen a los RNA_{bpmU}, se encontraron en los GIC así como su caperuza trimetilada (Fakan *et al.*, 1984; Puvion *et al.*, 1984), además contienen poly (A)⁺ RNA en cierto grado (Dundr y Misteli, 2001; Lamond y Spector, 2003; Lorkovič y Barta 2004; Saitoh *et al.*, 2004).

Es posible observarlos al microscopio fotónico, donde agregados de GIC y FPC corresponden a los *speckles* (Figura 1) (Beck, 1961; Sleeman, 2004; Zimmer *et al.*, 2004). Estudios recientes demuestran que estas estructuras son más dinámicas de lo que se pensaba; aunque enriquecidos con un gran número de factores de *splicing* del pre-mRNA y de la subunidad grande de la RNAPol II (Bregman *et al.*, 1995; Lorković y Barta, 2004; Saitoh *et al.*, 2004), la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA no ocurren en estas regiones subnucleares (Cmarko *et al.*, 1999; Misteli y Spector, 1999).

Al parecer los GIC funcionan como dominios de ensamble, modificación y almacenamiento de proteínas (del *spliceosoma*), involucradas en el procesamiento del pre-mRNA, que son transportadas a los sitios de transcripción (Saitoh *et al.*, 2004), y acoplan la transcripción y maduración del pre-mRNA, de tal modo que, promueven una expresión eficiente de los genes (Saitoh *et al.*, 2004).

La mayoría de los genes activos se ubican en la periferia de los *speckles*, y mediante recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado se sabe que

existe un flujo continuo entre los GICs y el nucleoplasma (Kruhlak *et al.*, 2000; Phair y Misteli, 2000); los factores de *splicing* en estos dominios son reclutados, ensamblados y transportados a los sitios cercanos de transcripción activa mediante un proceso que involucra un ciclo de fosforilación y desfosforilación (Misteli *et al.*, 1997; Janicki *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha determinado cuáles factores de *splicing* son dirigidos específicamente a un sitio particular de transcripción, y qué subcomplejos son necesarios durante los diferentes estadios de la maduración del pre-mRNA (Saitoh *et al.*, 2004).

La caracterización del proteoma de GICs purificados a partir de núcleos de hígado de ratón y su comparación con *spliceosomas* tienen una similitud del 63% en sus componentes proteicos. El elevado traslape entre ambos, GIC (sitios de modificación, ensamble y almacén) y el *spliceosoma* (sitios funcionales), señala la posibilidad que componentes de los GIC se desplacen hacia los sitios de transcripción activa en conjunto, más que cada proteína de forma individual; por microscopía a intervalos se observan “esferas” que parecen eclosionar de la superficie de los *speckles* cuando las células están transcribiendo activamente (Eils *et al.*, 2000) pero, permanece sin esclarecerse si corresponden a GIC individuales u agregados (Saitoh *et al.*, 2004).

En los GIC (Figura 2), además de las proteínas implicadas en el *splicing*, están involucradas otras de funciones nucleares como; la apoptosis, factores que modifican la condensación de la cromatina, proteínas de reparación del daño al DNA, chaperoninas, helicasas e isoformas de factores de inicio de la transcripción; y se especula que algunos procesos, como la apoptosis y modificaciones en la cromatina pueden estar ligados con cambios en el *splicing*. La chaperonina Hsp70, que colocaliza con un supresor de tumores de hígado en los *speckles*; en plantas (*Brassica napus*), se asocia con estructuras ribonucleoproteicas en la región intercromatiniana y el nucléolo, después de un tratamiento de estrés para inducir la embriogénesis de microsporas; aunque su localización en los GIC requiere ser confirmada, actualmente se abre la posibilidad de analizar las modificaciones en sus componentes proteicos, durante diferentes etapas del desarrollo, en la oncogénesis y en respuesta a cambios en el ambiente. A reserva de alcanzar el reto de precisar la composición específica de un solo GIC en cada estadio, determinar su función e integrarla en la totalidad del organismo (Schwerk *et al.*, 2003; Segui-Simarro *et al.*, 2003; Saitoh *et al.*, 2004).

3.3. Organización de la cromatina compacta en vegetales.

En un núcleo en interfase, parte de su expresión genética se refleja en la organización de su material nuclear y está ligado a la regulación, replicación, transcripción, procesamiento y reparación de los genes (Lemon y Tjian, 2000; Stein *et al.*, 2000 a, b; Dundr y Misteli, 2001; Lamond y Sleeman, 2003; Spector, 2003; Dundr y Misteli, 2004). Diversas investigaciones sobre la ultraestructura nuclear en plantas, muestran que la cromatina compacta de sus núcleos interfásicos presentan dos formas de arreglo; que define los tipos de núcleos: cromocéntrico (frecuente en dicotiledóneas) y reticulado (característico de monocotiledóneas, criptógamas, briofitas y algas clorofíceas) (Jiménez-García *et al.*, 1992; Vázquez-Nin *et al.*, 2003).

En la estructura cromocéntrica, la cromatina compacta se reparte en grupos adosados a la envoltura nuclear, delimita al nucléolo y se distribuye en unos cuantos cúmulos en el nucleoplasma. Mientras la forma reticulada se dispone a manera de una red, que abarca los grupos próximos a la envoltura nuclear desplegándose a lo largo del nucleoplasma; rodea y se conecta con el nucléolo (Jiménez-García *et al.*, 1992; Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000; Vázquez-Nin *et al.*, 2003). Este arreglo, no se encuentra relacionado con un hábito saprofita y posiblemente es característico de especies con un contenido elevado de DNA. Algunos vegetales con núcleos reticulados son: *Allium cepa* L., *A. porrum* L., *A. fistulosum*, y una monocotiledónea considerada muy primitiva (Alismatidae) (Jiménez-García *et al.*, 1992).

La disposición reticulada de la cromatina, también está presente en núcleos de una angiosperma totalmente excepcional, *Lacandonia schismatica*, con un carácter único, nunca antes descrito entre las angiospermas; donde su gineceo no es central, como el resto de las flores, sino que, presenta la inversión de los órganos reproductores, un gineceo partido en muchos carpelos rodeando a tres estambres (androceo) centrales (Cronquist, 1988; Márquez-Guzmán *et al.*, 1989; Martínez y Ramos, 1989; Álvarez-Buylla, 2001). Trabajos recientes y exploraciones en progreso, de otros grupos vegetales, señalan que el tipo reticulado también existe en pteridofitas (*Adiantum capillus-veneris*), en una gimnosperma relicto tempranamente divergente, *Ginkgo biloba* (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994; Jiménez-Ramírez *et al.*, 2002), y en otros miembros del orden Triuridales (*Soridium*) (Agredano-Moreno, 2001).

Asociado a núcleos reticulados, se describió por primera vez una nueva partícula ribonucleoproteica en *Lacandonia schismatica* (Jiménez-García *et al.*, 1992). Estructuras novedosas que fueron denominadas gránulos de *Lacandonia* (GL), se encuentran presentes entre las bandas de cromatina compacta (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994), en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano. Son particularmente abundantes en células de *Lacandonia schismatica*; tienen un diámetro de 32 nm, y resultan intermedias en tamaño y distribución a los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos de células animales (Watson, 1962; Bernhard y Monneron, 1969; Jiménez-García *et al.*, 1992; Vázquez-Nin, 1996).

De acuerdo a sus características citoquímicas, inmunocitoquímicas y por su comportamiento durante el desarrollo de la flor; se consideran estructuras relacionadas a los gránulos pericromatinianos y de Balbiani (Agredano-Moreno *et al.*, 1994; Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

Su naturaleza ribonucleoproteica fue demostrada por Jiménez-García *et al.* (1992), mediante el procedimiento preferencial de contraste para ribonucleoproteínas (RNPs) (Bernhard, 1969); y por tratamientos enzimáticos, con proteasa seguidos de RNasa, a los cuales son sensibles, ya que se tornan pequeños y deformes (Jiménez-García *et al.*, 1994). No contienen snRNPs, lo que es similar a los GPCs (Agredano-Moreno, 2001) y el oxinitrato de bismuto no contrasta GL como ocurre con los GIC (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994).

La evidencia sugiere que están relacionados con el metabolismo intranuclear del mRNA. Su número varía durante el desarrollo de la flor, aumenta en estados de gran actividad transcripcional (pre-antesis) y disminuye conforme las células proceden a estadios avanzados del desarrollo (post-antesis) (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000; Agredano-Moreno, 2001); como ocurre para los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación en células de mamíferos y aves (Vázquez-Nin *et al.*, 1980; Zavala *et al.*, 1992; Zavala y Vázquez-Nin, 1997).

Mediante hibridación *in situ* ultraestructural con sondas de oligo dt₂₀, se analizó la presencia de poly (A)⁺ RNA en los GL, encontrando que son dominios enriquecidos en mRNA, como algunos gránulos pericromatinianos (Visa *et al.*, 1993; Agredano-Moreno, 2001), lo que sustenta la idea que estas partículas pueden contener RNA mensajero maduro (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996).

Por inmunolocalización ultraestructural con el anticuerpo 3C5, se demostró que poseen proteínas SR (familia de proteínas relacionadas con el *splicing* y *post-splicing*) (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), similar a los gránulos de los anillos de Balbiani (Alzhanova-Ericson *et al.*, 1996).

Por lo anterior se ha sugerido que los gránulos de *Lacandonia* son equivalentes a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000).

Varios proyectos realizados en el laboratorio están encaminados a explorar la ubicuidad de tales ribonucleoproteínas en otros grupos vegetales. Se conoce su existencia mediante un análisis detallado de núcleos de hoja en *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez *et al.*, 2002), pero sin embargo su existencia, en gimnospermas tardíamente divergentes (Soltis *et al.*, 1999), como *Taxodium mucronatum* se desconoce.

3.4. Metabolismo intranuclear de los ácidos nucleicos.

Sin duda alguna, la compleja interacción de los dominios subnucleares, con los genes activos de los distintos territorios cromosómicos, participan en la transcripción, procesamiento y transporte de los diferentes ácidos nucleicos (mRNAs, tRNAs, rRNAs y UsnRNAs), para orquestrar una expresión coordinada del genoma. Algunos productos de estos genes son exportados como complejos ribonucleoproteicos mediante distintas vías definidas por señales específicas presentes en el RNA y proteínas adosadas (Zenklusen y Stutz, 2001). El proceso en conjunto, se denomina metabolismo intranuclear o dinámica intracelular de los ácidos nucleicos, aunque muy elaborado y con muchos aspectos por esclarecer, se puede esbozar un resumen de los factores que participan (Yoshihisa, 2006).

El RNA sintetizado se ubica en los dominios nucleares, en el citoplasma y organelos como mitocondrias y cloroplastos. Se han identificado fundamentalmente tres grandes clases de RNA, el RNA mensajero (mRNA), que representa de 3 a 5 % del RNA total celular; el RNA de transferencia (t-RNA), con un porcentaje de 5 a 7; el RNA ribosómico (rRNA), el más abundante en la célula, ocupa alrededor de 85 a 90 % y un grupo de RNAs pequeños con 1 % del RNA total celular; que pueden ser de localización nuclear (snRNA), nucleolar (snoRNA), citoplásmica (scRNA); y de reciente identificación, los originados a partir del procesamiento de RNAs de doble cadena (dsRNA), denominados pequeños-RNAs (Cortés, 2003; Finnegan y Matzke,

2003). Para su estudio, la dinámica intracelular de los ácidos nucleicos, se puede dividir en: procesamiento del pre-mRNA, pre-rRNA, pre-tRNA, de UsnRNAs, UsnoRNAs y de los muy ubicuos, pequeños-RNAs (Gerbi, 1995).

- Procesamiento del pre-mRNA.

En el metabolismo del pre-mRNA, la transcripción de los genes por la RNA polimerasa II sintetiza el RNA heterogéneo nuclear (hnRNA o pre-mRNA), en una zona estrecha entre la cromatina condensada en las bandas que se extienden en el espacio intercromatiniano, e identificadas morfológicamente como estructuras ribonucleo-proteicas, en las fibras pericromatinianas (FPCs).

La RNA polimerasa II reconoce sus promotores (caja TATA, CAAT, GC, entre otros) localizados (-25, -110 y -40 pb, respectivamente) río arriba del sitio de inicio de la transcripción, al interactuar con proteínas unidas al promotor (TBP), que promueven el ensamble del complejo de pre-inicio de la transcripción. Para su inicio preciso, se asocian factores a TBP (TAF) de la RNA pol II (TF II A, TF II B, TF II F y TF II E); cada uno con funciones específicas para formar un gran complejo molecular estable que permita la síntesis del pre-mRNA (Hampsey, 1998; Cortés, 2003; Gross y Oelgeschlager, 2006). Al hnRNA recién sintetizado se le adosan numerosas proteínas (hnRNPs) y factores de *splicing*, que llevan a cabo de forma secuencial su procesamiento mediante varias etapas que incluyen: el “capping” del extremo 5', *splicing*, ruptura del extremo 3' y poliadenilación, para finalmente construir un complejo maduro de RNA (mRNA) y proteínas, que será transportado hacia el citoplasma (Figura 3).

Al primer extremo sintetizado durante la transcripción (extremo 5'), se le añade una caperuza (*cap*) o casquete 5', casi inmediatamente después de la síntesis de 30 nt de RNA, que consiste de un nucleótido guanilato (G) metilado en orientación reversa al resto de los nucleótidos. La acción de la RNA-trifosfatasa o fosfohidrolasa, sobre el exón genera un extremo desfosforilado (ppNp), al que es añadido el nucleótido guanilato, reacción que requiere de GTP y la participación de la guanililtransferasa para formar un enlace 5',5-trifosfato (GpppNp). Posteriormente, se agrega el grupo metilo en la posición N-7 del residuo guanidil ($m^7GpppNp$), por la guanina-7-metiltransferasa, que emplea S-adenosilmetionina (AdoMet), como donadora de los grupos metilo y genera S-adenosilhomocisteína (AdoHcy). Este *cap* con un solo grupo metilo es

conocido como *cap 0* y ocurre en todos los eucariontes (Lehninger *et al.*, 1995; Lewin, 2000).

La caperuza puede ser monometilada o hipermetilada, ya que a menudo se añaden otros grupos metilo en la posición 2' de la ribosa del primero y segundo nucleótidos; en vertebrados, sólo se encuentra metilado el segundo nucleótido ($m^7GpppmNp$), acción catalizada por la 2'-O'-metiltransferasa. Este tipo de *cap* con dos grupos metilos se denomina *cap 1*. En pocas especies de eucariontes se añade otro grupo metilo en la posición N-6 cuando la base es una adenina y en otros se adiciona a la tercera base (*cap 2*) en 2'-O (Alberts *et al.*, 1996; Lehninger *et al.*, 1995; Lewin, 2000). Se piensa que al menos algunas de las enzimas que participan en la metilación se encuentran unidas a la RNA pol II, puesto que los transcritos de las RNA polimerasas I y III no se les añaden caperuzas (Alberts *et al.*, 1996; Cortés, 2003).

La función del *cap* en el extremo 5' del RNA al parecer protege al transcrito nascente de la degradación, es necesario para el transporte de ciertas especies de RNA, en particular de los RNAs pequeños nucleares; facilita el traslado del mRNA al citoplasma, y participa en el reconocimiento del transcrito maduro por el ribosoma para el inicio de la síntesis de proteínas (Jarmolowki *et al.*, 1994).

Los transcritos primarios generados por la RNA polimerasa II, en casi todos los eucariontes, contienen múltiples secuencias no codificantes (intrones), que precisan ser removidos, y secuencias codificantes (exones) que requieren ser ligados, antes de su traducción a proteína, acción que ocurre en el núcleo, en un proceso denominado *splicing* o corte y empalme; se lleva a cabo en un complejo ribonucleoproteico conocido como *spliceosoma* o *spliceosoma* (Figura 5), formado por la asociación de snRNPs y no-snRNPs (Graveley, 2000; Nilsen, 2003; Sanford y Caceres, 2004; Turner *et al.*, 2004).

Los snRNAs (RNAs pequeños nucleares), de menos de 300 nt se asocian estrechamente con múltiples proteínas para formar snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) denominados “snurps”. Los snRNPs, ricos en uridina nombrados arbitrariamente U1, U2, U12, etcétera; reconocen secuencias específicas de ácido nucleico mediante la complementariedad de bases RNA-RNA, y están implicados en la maduración del pre-mRNA, en sus extremos 5' y 3'. Las no-snRNPs, lo constituyen entre otras, las proteínas SR que se encuentran en casi todos los eucariontes, tanto metazoarios y plantas, excepto *Saccharomyces cerevisiae* (Lopato *et al.*, 1996; Gross *et*

al., 1998; Lutzelberger *et al.*, 1999). Por inmunolocalización generalmente se detectan en el patrón de *speckles* a dos de estas proteínas muy conservadas, SC35 y SF2/ASF2 (*splicing factor 2/ alternative splicing factor*) (Figura 4B) (Graveley, 2000; Sanford *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004).

Experimentos *in vivo* e *in vitro*, demuestran que la familia de proteínas SR, presentes de *Drosophila* a humano, participan en el *splicing* tanto constitutivo como alternativo, modulando la selección del sitio de corte (Figura 4B, modelo 3). Poseen de uno a dos motivos en el extremo N-terminal de reconocimiento al pre-mRNA (motivo RRM), y un dominio C-terminal de longitud variable rico en serina y arginina (dominio RS), que funciona como sitio de interacción para reclutar otros factores proteicos (Figura 4B, modelo 1, 2); su localización es nuclear o citoplásmica y su actividad es capaz de modificarse por fosforilación (Graveley, 2000; Sanford *et al.*, 2004). Actualmente, se reconoce que solo es necesario el contacto del dominio RS con una región de 10 nt que rodea al sitio de ramificación (BP) (Figura 5A), para promover el ensamble del *esplíceosoma* (Shen *et al.*, 2004).

La escisión de intrones y la unión de exones ocurre a través de dos reacciones consecutivas de trans-esterificación (reemplazo de un enlace fosfodiéster por otro) (Figura 5B), reacción relativamente sencilla, requiere de un arreglo muy elaborado de componentes ribonucleoproteicos (snRNPs) y no ribonucleoproteicos (no-snRNPs) (Figura 4A, B) (Nilsen, 2003).

Así, el *esplíceosoma* se constituye por la interacción coordinada de un grupo de snRNPs que contiene al menos cinco RNAs pequeños nucleares (snRNA U1, U2, U4/U6 y U5), y cientos de proteínas factores de *splicing* (Figura 4A) (Kramer, 1996). Su armado es un proceso cuidadosamente orquestado (Will y Luhrmann, 2001) y requiere del reconocimiento de secuencias conservadas en el pre-mRNA, que definen los sitios de *splicing* (SS), en sus extremos 5' y 3' (Figura 5A). En mamíferos, las secuencias consenso para su ensamble, en el extremo 5' SS es C o AAG/GUA o GAGU (donde / indica el sitio de corte exón-intrón y el subrayado los nucleótidos conservados), mientras que hacia el extremo 3', se encuentran al menos tres elementos de secuencia que son; el 3' SS (U o G₁₁NC o U/AGGA), el tracto de polipirimidinas y la región de ramificación o BP (*branch point*), usualmente localizada 20 ó 40 nt río arriba del sitio de *splicing* 3' (3' SS) (Graveley, 2000). Aunque se conoce gran parte del proceso de formación del *esplíceosoma*, todavía se desconocen los detalles de la

regulación del reconocimiento del sitio de *splicing* y más aún, por muchos años se pensó que el *espliceosoma* era originado por una serie de pasos; evidencia reciente indica que puede estar pre-ensamblado (Shen *et al.*, 2004).

En términos simples, el acoplamiento del *espliceosoma*, puede dividirse en dos fases: formación del pre-*espliceosoma* y la creación subsiguiente del *espliceosoma* completo. En el primero, la snRNP U1, se asocia con el pre-mRNA en el sitio de *splicing* 5'(5'SS), mediante un apareamiento de bases RNA-RNA, de tal modo que se origina un “complejo de compromiso” o “complejo temprano E” (Figura 4A), que lleva al pre-mRNA hacia la vía del *splicing*. La snRNP U2, se une con el punto de ramificación (generalmente adenosina), y las subunidades de 65 y 35 kDa del factor auxiliar de *splicing* (U2AF), al tracto de pirimidinas y 3'SS, respectivamente para constituir el “complejo A” (Figura 4A) (Shen *et al.*, 2004; Sanford y Cáceres, 2004). Las snRNPs U4 y U6 comparten muchas secuencias complementarias por lo que se encuentran generalmente apareadas creando una di-snRNP U4/U6, que interactúa con la snRNP U5 para originar una tri-snRNP U5·U4/U6, ésta se une con el pre-*espliceosoma* y dan lugar al “complejo B” (Figura 4A), mediante una serie de rearrreglos catalizados por NTPasas y proteínas que desenrollan el RNA, que involucra interacciones RNA-RNA y RNA-proteína, cambia entonces al complejo catalítico conocido como “complejo C” (Figura 4A), finalmente, U6 se une al extremo 5'SS (Figura 5A) y se liberan U1 y U4 para añadirse más factores proteicos (Figura 4A) (Jurica *et al.*, 2002; Nilsen, 2004; Grainger y Beggs, 2006).

El centro catalítico del *espliceosoma* no está del todo definido, y se sugiere que el *splicing* del pre-mRNA es llevado a cabo por catálisis del RNA asistido por proteínas, con Prp8 ocupando una posición central (Figura 4C) (Nilsen 2000; Grainger y Beggs, 2006). La proteína Prp8 (*pre-mRNA processing*) componente de la snRNP U5 (Figura 4, A), exhibe un alto grado de conservación entre los eucariontes, cerca del 61% de identidad en su secuencia de aminoácidos (<http://proteome.incyte.com>), forma parte fundamental del centro catalítico del *espliceosoma* y actúa como cofactor. Hace contacto con 5'SS, BP, 3'SS, U5, U6 (Figuras 5A y 4A, C), y posee un dominio RRM muy parecido al de las proteínas SR; de tal modo que provee de un sitio de unión para todos estos factores. Esta implicada en varios eventos cruciales de rearrreglos moleculares muy intrincados, y es la única proteína del *espliceosoma* hasta el momento descrita, con la cualidad de unión a las tres regiones requeridas para el *splicing* del pre-

mRNA. Mutaciones en el gen PRP8 en las secuencias de reconocimiento de proteínas que participan en el *splicing*, están asociados con la enfermedad autosómica dominante de degeneración de los fotorreceptores de la retina, denominada retinitis pigmentosa (Grainger y Beggs, 2006).

Una vez activado el “complejo C” del espliceosoma (Figura 4A), se lleva a cabo el *splicing* (Staley y Guthrie, 1998; Burge *et al.*, 1999). Éste ocurre en dos pasos o reacciones de trans-esterificación, en el primero, el hidroxilo de la posición 2' (2'OH) de la adenosina del punto de ramificación ataca la unión del sitio de *splicing* 5' (5'SS), rompe el enlace fosfodiéster y forma simultáneamente otro enlace fosfodiéster 2'-5' entre el sitio de ramificación y el nucleótido terminal del intrón (Figura 5B) (Turner *et al.*, 2004). Así, se generan un exón con el extremo 5' libre y un intrón en forma de lazo unido con el exón en el sitio de *splicing* 3' (3'SS). Después de otro cambio conformacional dentro del *espliceosoma*, el segundo paso se lleva a cabo; donde el 3'OH recién liberado del exón 5' creado en el primer paso, ataca la unión del sitio de *splicing* 3' (3'SS) lo rompe y origina un nuevo enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un exón y el extremo 3' del segundo exón. Los productos del segundo paso son el ligado de los exones y un intrón libre en forma de lazo (Figura 5B) (Nilsen, 2003; Turner *et al.*, 2004).

Concluida la reacción de *splicing*, se piensa que los *espliceosomas* se disocian y reensamblan en otros pre-mRNAs, para posteriores rondas de *splicing*, al menos esto ocurre *in vitro*. Sin embargo, el aislamiento de complejos pre-ensamblados de pentasnrNPs, sugiere que el *espliceosoma* no se ensambla de *novo* en el pre-mRNA y posiblemente existan vías alternativas de formación y reciclaje de sus elementos (Stevens *et al.*, 2002; Malca *et al.*, 2003).

La vasta evidencia indica que el *splicing* y la transcripción están estrechamente conectados (Proudfoot *et al.*, 2002; Nilsen, 2003), el mecanismo se lleva a cabo de manera constitutiva (*splicing* constitutivo) ya sea cotranscripcional o postranscripcional y de forma alternativa (*splicing* alternativo) (Kornblihtt *et al.*, 2006).

En el *splicing* cotranscripcional, su maquinaria se asocia físicamente con la de síntesis del mRNA (RNA pol II y sus factores) y requiere la participación de proteínas adaptadoras, identificadas en los análisis proteómicos, que añaden de por sí más complejidad al *espliceosoma*. Este tipo de *splicing* posiblemente asegura la exactitud

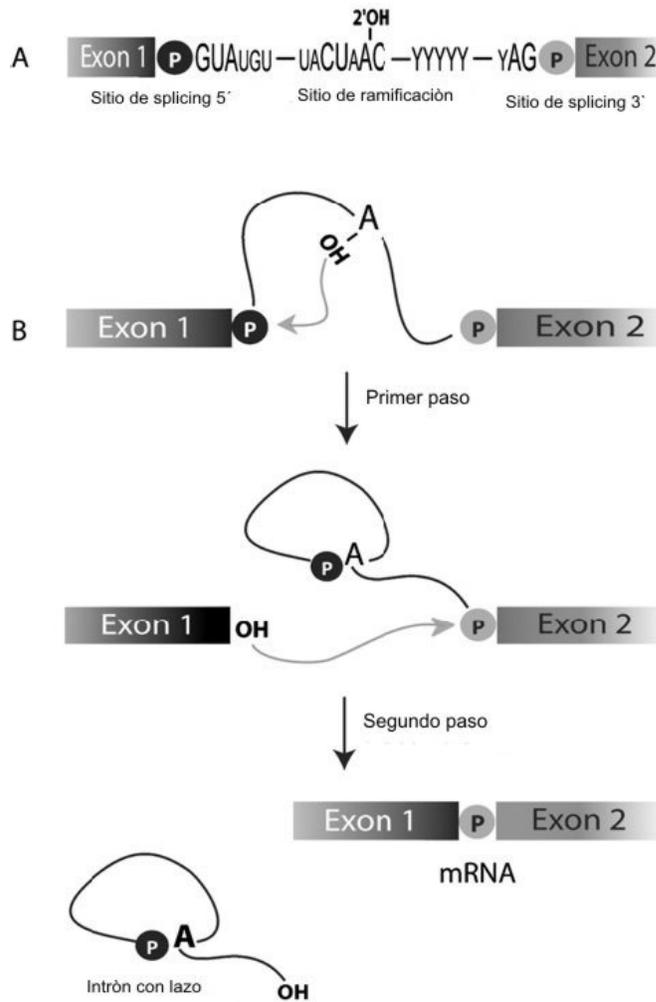


Figura 5. Dinámica y catálisis del *espliceosoma*.

(A) Secuencias conservadas de un pre-mRNA de levadura. Las secuencias consenso del intrón dirigen el ensamble del *espliceosoma* y definen los sitios de *splicing* y el sitio de ramificación o *branch point* (Y, significa pirimidina). El grado de conservación de la secuencia se indica por el tamaño de la letra.

(B) Los dos pasos de trans-esterificación en el *splicing* del pre-mRNA. En el primero, el sitio de *splicing* 5', es atacado por el grupo 2'-OH de la adenosina, generando un intermediario, el exón 1 y un lazo aún unido al exón 2. En el segundo paso, el sitio de *splicing* 3', es atacado por su grupo 3'-OH del exón 1 libre. Los productos finales son el mRNA sin intrones y el intrón removido en forma de lazo (Turner *et al.*, 2004).

del proceso, aunque no es obligatorio, hasta el momento, los factores identificados que influyen en un mecanismo u otro (cotranscripcional o postranscripcional) son; el tiempo de acción de la pol II y el tamaño del gen transcrito. El tiempo que le tome a la pol II sintetizar cada intrón y la longitud del gen determina la capacidad para reclutar los factores de *splicing* y formar el *espliceosoma* (Neugebauer, 2002). En genes largos algunos intrones pueden procesarse cotranscripcionalmente, y en otros de manera postranscripcional; se desconoce el patrón que sigue cada uno y más aún si alguno en particular siempre prefiere el mismo modelo de maduración. En otros casos, la posición del intrón a lo largo del gen parece ser relevante para la pauta de escisión, por ejemplo, para el gen BR1 el intrón 3 localizado a 3 kb del extremo 5' de un pre-mRNA de 40 kb, es eliminado cotranscripcionalmente, mientras que, el intrón 4 ubicado a 0.6 kb del extremo poli (A), lo realiza del mismo modo solo en el 10% de los casos y el resto es postranscripcional (Bauren y Wieslander, 1994). Estudios en el gen BR3, proponen que los *espliceosomas* son ensamblados rápidamente conforme aparecen los intrones, y el *splicing* cotranscripcional, se lleva a cabo al reconocer las secuencias del intrón, eliminando principalmente aquellos localizados en el extremo 5' del transcrito, mientras que es postranscripcional para los del extremo 3' (Wetterberg *et al.*, 1996). No necesariamente se completa la escisión del primer intrón, antes de la transcripción del segundo, ya que el *splicing* alternativo de exones simplemente no existiría.

El *splicing* alternativo, permite a un solo gen incrementar su capacidad de codificación, sintetizando isoformas de una proteína. Aunque existe poca información del mecanismo, es posible que su regulación sea específica de cada tejido o durante el desarrollo, y no a la diferencia de concentración de proteínas SR. Tanto exones como intrones con *splicing* alternativo, además de las secuencias consenso, participan otras señales importantes para su regulación, denominadas secuencias estimuladoras o de efecto positivo (ESE, *exonic splicing enhancer*; ISE *intronic splicing enhancers*) y silenciadoras o de efecto negativo (ESS, *exonic silencer elements*; ISS, *intronic splicing silencer*). Estas secuencias son blanco de las proteínas SR, que promueven el reclutamiento de otros factores, ya sea para favorecer el *splicing* alternativo y/o antagonizarlo (Buratti y Baralle, 2004; Sanford y Cáceres, 2004). Aquí, la velocidad de formación del *espliceosoma* tiene mucho que ver con la inclusión o exclusión de un exón; y aún no se determina si el acoplado entre la transcripción y el *splicing* alternativo

se debe al reclutamiento de factores por parte del dominio CTD de la pol II o por el intrón del transcrito (Kornblihtt *et al.*, 2006).

Se especula que el dominio carboxilo terminal característico de la RNA pol II, altamente conservado en eucariontes (con una secuencia consenso Try-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser o CTD), puede estar implicado en la maduración del pre-mRNA, se piensa que la forma hiper-fosforilada de la RNA pol II (HIO) negativamente cargada, facilita las interacciones electrostáticas de ciertos factores de *splicing*, ya que con anticuerpos anti-CTD se inhibe (Greenleaf, 1993; Hampsey, 1998; Kornblihtt *et al.*, 2006). El truncar el dominio ocasiona defectos en el *capping*, en la ruptura y poliadenilación, y en el *splicing*; posiblemente tiene un papel de acercamiento entre los exones y sirve de plataforma para el resto de los factores de *splicing*. Usualmente se fosforila en el residuo Ser-5 cuando se coloca en los sitios del promotor, pero su fosforilación en el residuo Ser-2, permite su ubicación en la región codificante, que puede ser relevante para el reclutamiento de los factores de *splicing* (Kornblihtt *et al.*, 2006)

El significado funcional de la presencia de los intrones se desconoce, y posiblemente su papel sea incrementar la velocidad de exportación del mensajero que fue sujeto a *splicing*. En metazoarios, los RNAs mensajeros generados a través de éste proceso, son exportados en mayor proporción que en construcciones de transcritos sin intrones; excepto en levaduras, donde solo un pequeño porcentaje de genes contiene intrones y sin embargo, son eficientemente expresados en vertebrados (Zenklusen, 2001). Esto sugiere que el *splicing* y el transporte al citoplasma están bioquímicamente acoplados. Sus bases moleculares comienzan a esbozarse. Durante el *splicing*, un complejo multiproteico conocido como: el complejo de unión de exones (EJC), se deposita 20 nt río arriba del exón en el punto de unión exón-exón. Este “marca” al mRNA como proveniente del proceso de *splicing* y tiene múltiples funciones; delimita el codón de paro en el mensajero, facilita la traducción del mRNA, y lo asiste para ser reconocido por la maquinaria de transporte del núcleo al citoplasma. Muchos de los componentes del *spliceosoma* identificados en los análisis proteómicos son componentes del EJC, así aparentemente mucha de su complejidad, también se debe a proteínas que son esenciales para la catálisis pero que tienen un papel en el post-*splicing* (Nilsen, 2003).

Seguidamente del *splicing*, el transcrito es poliadenilado en su extremo 3'. La secuencia de poli (A) no está codificada en el DNA, pero es añadida al RNA después de la transcripción por la enzima poli (A) polimerasa (PAP). Es necesaria la formación de un complejo proteico, para la generación correcta del extremo 3'; que consta de endonucleasas (CFI y CFII), de la poly (A) polimerasa, del componente de especificidad (CPSF) que reconoce la secuencia en el RNA (AAUAAA), ubicada río arriba del sitio de poli (A) a unos 10 a 30 nt, y del factor de estimulación, CstF, el cual se une a la secuencia rica en GU río abajo del sitio de corte. Las cuatro subunidades del CPSF interactúan entre sí para reconocer la secuencia consenso dentro del RNA, y requieren de CstF, para unirse fuertemente a ella, originan un complejo con la endonucleasa y la PAP y llevan a cabo el corte y posterior poliadenilación. Al combinarse con estos componentes la PAP se vuelve específica por la secuencia AAUAAA y la poliadenilación tiene lugar. Se lleva a cabo en dos etapas, en la primera, se añade un oligo de aproximadamente 10 residuos de ácido adenílico, reacción que es absolutamente dependiente de esta enzima y de la secuencia consenso en el RNA. En la segunda fase, la cola de oligo (A) es extendida de 100 a 200 residuos, con la ayuda de la proteína de unión o enlace a poli (A) (PABP), que se ubica cada 10 ó 20 pb a lo largo del tallo de poli (A), controla su longitud y permanece unida al poli (A)⁺ mRNA (Alberts *et al.*, 1996; Lewin, 2000).

En la mayoría de los casos la adición de la cola de poli-A, confiere estabilidad al mRNA en el citoplasma, permitiéndole una vida media promedio de aproximadamente 4 horas (Gallie 1991; Sachs, 1993). Aquellos que carecen de la cola de poli (A) son degradados, retenidos en la transcripción y no son exportados al citoplasma (Zenklusen y Stutz, 2001). Algunos mRNAs no se encuentran poliadenilados, como es el caso de los que codifican para histonas, donde la formación de una estructura secundaria de lazo en su extremo 3' sustituye el tracto de polipurinas, el significado de su ausencia es desconocido (Lewin, 2000).

Una vez terminado el proceso de maduración, algunas proteínas SR tienen un papel post-transcripcional, acoplado al *splicing* y el transporte al citoplasma, unas son liberadas de la fibra mientras que otras permanecen asociadas al mRNA durante su transporte y anclaje en el poro nuclear e inclusive en los polirribosomas (Daneshmandi, 2001).

Diversos mecanismos regulan tanto la entrada como la exportación de proteínas

al núcleo. Posiblemente el transporte del mRNA, está modulado por la metilación en residuos de arginina de las hnRNPs y por fosforilación y desfosforilación (por la vía de señalización de inositol fosfato cinasa C) (Zenklusen y Stutz, 2001).

Además de la síntesis del RNA mensajero, por parte de la RNAPol II, también transcribe los snRNAs o pequeños RNAs nucleares (Recillas y Zurita, 2003).

- Procesamiento del pre-rRNA.

El nucléolo, dominio rico en RNA, delimitado por cromatina perinucleolar es el sitio de síntesis, procesamiento del pre-rRNA y ensamble del pre-ribosoma. Se define como producto de la actividad genética, de regiones cromosómicas precisas, formado a partir del cuerpo adyacente a las constricciones secundarias en los cromosomas satélite, llamado cuerpo organizador del nucléolo (Jiménez-García, 1988).

Su volumen es indicador de la actividad celular y es un parámetro morfológico relacionado con la transcripción. La organización de su estructura, posiblemente se debe a su función principal de síntesis de ribosomas, aunque también retiene moléculas relacionadas con el ciclo celular y del procesamiento del t-RNA, por lo que actualmente parece más como el centro de una vía de tránsito para varias RNPs (Jiménez-García, 1988; Hernandez-Verdun, 2006). Desde la década de los setenta, está muy bien caracterizado ultraestructuralmente, a saber, un nucléolo típico de mamífero se constituye de tres regiones; los centros fibrilares (FCs), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC), así como por espacios nucleolares (intersticios y/o vacuolas) (Izaguirre, 2001). Donde los FCs, áreas claras, se encuentran parcial o totalmente rodeadas por el DFC ambos embebidos en el GC (Jiménez-García, 1988).

Los FCs, forman estructuras discretas que contienen genes de rDNA enrollados en fibrillas laxas de 40 a 80 Å de espesor, que al ser extendidos por la técnica ideada por Miller y Beatty (1969), se observan como unidades repetidas de transcripción (aunque no tan activa como en el DFC), que asemejan “árboles de Navidad” (Puvion y Moyne, 1981; Jiménez-García, 1988; Alberts *et al.*, 1996). Se localizan a diferentes niveles a lo largo del nucléolo y se conectan por una red con el DFC, su número es dos veces mayor en G₂ comparado con G₁ (Hernandez-Verdun, 2006).

El rDNA ubicado en los FCs, es uno de los genes en tándem más abundantes en la célula, existen del orden de 400 copias en humano (de 43 kb cada una), y miles en

anfibios, helechos y gimnospermas (Puvion y Moyne, 1981; Nathanson y Deutscher, 2000). Contiene los genes ribosómicos rDNA 18S, 5.8S y 28S, transcritos por la RNA polimerasa I, que al ensamblarse con proteínas ribosómicas (proteínas-r) conforman el precursor citoplásmico 40S y 50S. Generalmente su promotor no contiene la caja TATA y requiere en su región espaciadora intergénica (IGS), una serie de elementos que aseguren la expresión óptima de los genes ribosómicos, como son el factor UBF (*upstream binding factor*) y el factor selectivo 1 o SL1, que incluye a la proteína TBP, entre otros (Recillas y Zurita, 2003). En células humanas, este transcrito es sintetizado como parte de un precursor de aproximadamente 13 500 nt (47S) de pre-rRNA (en mamíferos 45S de 13 000 nt), que es procesado paso a paso para dar origen a las distintas moléculas maduras de rRNA en el nucléolo; esto implica, la remoción de las secuencias espaciadoras externas (ETS) e internas (ITS) del pre-RNA. Antes de extraerlas, los nucleótidos, tienen una extensa modificación postranscripcional, que incluyen la pseudouridinación (ψ) y metilación de la 2'-O-ribosa, guiadas por dos familias de snoRNAs que se describen posteriormente (Piñol-Roma, 1999).

Además de la Pol I, los FCs, contienen fibrilarina, la fosfoproteína C23 o nucleolina, proteínas Ag-NOR, UBF, sno-RNP U3 y a la región organizadora del nucléolo (NOR) en interfase (Jiménez-García, 1988). El NOR, es la región de ciertos cromosomas mitóticos, a menudo asociado a sus constricciones secundarias, a partir de las cuales se reconstituye el nucléolo en telofase (Hernandez-Verdun, 1979).

Goessens y Lepoint (1974), investigaron el comportamiento del FC durante la mitosis, encontraron que persiste a lo largo de ésta, en contacto siempre con los cromosomas, para ser reconstruido en telofase tardía o en G₁ temprana, alrededor del FC (primero en aparecer seguido del granular). No existe incorporación de uridina tritiada alrededor del FC durante la metafase, sino en anafase donde es más activo que en telofase. Con estas observaciones sugirieron que el FC, representa el aspecto ultraestructural del NOR y por lo tanto tiene un papel en la nucleogénesis, constituyendo el sitio de síntesis temprana del rRNA en su periferia (Puvion y Moyne, 1981). Jiménez-García (1988), sugiere que algunos de los FC no son en realidad la contraparte morfológica de los NORs en metafase. Sino que los NOR-PNBs contienen la mayoría e inclusive todo el rDNA y la RNA pol I.

El DFC o región fibrilar densa (DFR), se ordena por fibras de 40 a 80 Å de espesor y 200 a 400 Å de longitud, también tiene RNA pol I, fibrilarina, proteínas Ag-

NOR, C23, entre otras. Es el sitio donde puede estar ocurriendo la actividad transcripcional más abundante y procesamiento temprano del pre-rRNA. La zona donde se mezclan fibras del DFC con gránulos del GC, se conoce como región fibrogranular (F) o nucleolonema.

El GC, constituido principalmente de gránulos de 150 a 200 Å de diámetro, representa el sitio de procesado y almacén tardío de pre-ribosomas. Abundan la fosfoproteína B23 y productos intermedios de la maduración del pre-rRNA (Jiménez-García, 1988).

La cromatina perinucleolar aunque no es un componente del nucléolo, en ocasiones, se observa, penetra en él por fibras delgadas. Goessens (1979) demostró que tienen continuidad estructural con los FCs. Se considera como un tipo especial de cromatina con genes que probablemente intervienen en el funcionamiento nucleolar, cuyo papel en la actualidad es desconocida (Puvion y Moyne, 1981; Jiménez-García, 1988; Hernandez-Verdun, 2006). En vegetales además de los FCs, DFC y GC, se encuentran los centros fibrilares heterogéneos (HeFC) (Jiménez-García, 1992).

El mapeo de la biogénesis del ribosoma, en cada compartimiento morfológico, indica que los transcritos nacientes aparecen en la unión de los FCs y el DFC, para ser acumulados en el último. El procesamiento del pre-rRNA 45S, inicia en su sitio de transcripción (DFC) y la maduración continúa durante su migración hacia el GC. La distribución vectorial de la maquinaria involucrada, correlaciona con los distintos pasos de su maduración. Por ejemplo, la fibrilarina y nucleolina que participan en los estadios tempranos, se localizan en el DFC, junto con el snoRNA U3, mientras que las proteínas B23 y Nop52 involucradas en estadios intermedios de biogénesis del ribosoma se ubican en el GC. Estos hallazgos han conducido a postular funciones específicas a cada compartimiento nucleolar, cuya dinámica no solo es necesaria para el ensamble del ribosoma, sino también para su comunicación con otras regiones de la célula (Hernandez-Verdun, 2006). Debido a que su estructura es en último caso producto de la transcripción de los genes ribosómicos, ésta se ve afectada al inhibir la actividad de la RNA pol I, durante la entrada de la célula a mitosis (Prieto y McStay, 2005).

- Procesamiento del pre-tRNA.

Las modificaciones postranscripcionales no se limitan al pre-RNA ribosómico y mensajero, sino también ocurren en el pre-tRNA. La mayoría de las células tienen de 40

a 50 tRNAs diferentes, con una longitud de cadena que varía de 72 a 95 nt, cuya función principal es activar aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Cortés, 2003). En eucariontes existen múltiples copias de los genes de tRNA, algunos adyacentes a regiones espaciadoras no transcritas del pre-rRNA, se encuentran generalmente uno o dos para tRNA. Otros dispersos en el nucleoplasma, se identifican en sitios discretos (aproximadamente 2000) de transcripción de la RNA pol III, cada uno con un radio de 20 nm, contienen en promedio 5 moléculas activas de RNA pol III; a diferencia de los transcritos de las polimerasas I y II de las cuales, posiblemente, su maduración ocurre cercana a sus sitios de transcripción, y parte en el nucléolo. Experimentos de hibridación *in situ* revelan la presencia de pre-tRNA dentro del nucléolo de *Saccharomyces cerevisiae*, y más aún, la subunidad de la RNasa P se ha localizado tanto en el nucléolo y nucleoplasma de levaduras y mamíferos (Paule y White, 2000).

La mayoría de los promotores usados por la RNA pol III, requiere de elementos de secuencia ubicados dentro del sitio de inicio denominados tipo II; también existen las secuencias de la caja TATA y necesita de la participación de factores promotores de la transcripción TFIIIA, B y C. La RNA pol III, se ocupa de transcribir el pre-tRNA, así como al 5S RNA y algunos RNAs pequeños entre ellos al snRNA U6 que posee una caperuza gamma metilada (Lehninger *et al.*, 1995; Paule y White, 2000).

Los precursores de tRNA (pre-tRNA), son modificados en sus extremos 5' y 3', por la RNasa P y RNasa D, respectivamente; además de otros dos tipos de cambios postranscripcionales. Primero, al extremo 3' es añadido el residuo adenilato terminal CCA, al cual posteriormente se unirá covalentemente un aminoácido específico, para formar un aminoacil-tRNA cargado, preparándolo para su incorporación, a la cadena polipeptídica en crecimiento sobre el ribosoma. La segunda, corresponde a la maduración del tRNA, por modificación extensiva de bases ya sea metilación, desaminación, reducción o pseudouridinación. Algunas de estas bases modificadas se encuentran en posiciones características en todos los tRNAs (Lehninger *et al.*, 1995; Cortés, 2003). El tRNA puede existir en algunos compartimentos celulares, así mitocondrias en mamífero, y cloroplastos contienen sus propios tRNAs, diferentes a los citoplásmicos, en tanto que, mitocondrias de plantas poseen tRNAs de origen nuclear (Cortés, 2003).

- Papel de los UsnoRNAs y pequeños-RNAs.

La cantidad de enzimas que catalizan las modificaciones del RNA, es vasta, debido al papel central de este ácido ribonucleico en el flujo de información biológica (Ferré-D'Amaré, 2003). En particular, la maduración del rRNA, requiere de la acción de una gran población de snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), también denominados snoRNAs antisentido, por su complementariedad perfecta con el rRNA en regiones que abarcan de 10 a 21 nt. Se producen en el nucléolo y son codificados dentro de intrones en vertebrados y levaduras. Diversas predicciones, indican que los organismos pueden contener diferentes snoRNAs, de 75 a 100 en levaduras, y cerca de 200 en mamíferos. Algunos participan en la hidrólisis del transcrito primario (pre-rRNA), otros funcionan como guías en las modificaciones individuales de los nucleótidos de rRNA, y existe la posibilidad que estén involucrados en la biogénesis del ribosoma, en su plegamiento y ensamble de sus subunidades (Gerbi, 1995; Cortés, 2003). Estructuralmente todos los snoRNAs (excepto el MRP 7.2 RNA, posiblemente una ribozima), se agrupan en dos familias de caja C/D y H/ACA (Bachellerie *et al.*, 2002). Las secuencias de las cajas sirven de estructuras secundarias para la unión a proteínas comunes y marcan el sitio de modificación del rRNA. La caja C (5'-RUGAUGA-3') y D (5'-CUGA-3'), ubicadas a unos cuantos nucleótidos de distancia del extremo 5' y 3', respectivamente, y en ocasiones con copias hacia la porción central de sus motivos, denominados C', D', actúan en conjunto para la metilación del pre-rRNA. En el caso del apareamiento snoRNA-rRNA con la caja D, el quinto nucleótido es metilado río arriba de la caja D o D'. La ubicación de la metilación (2'-O-ribosa), no siempre es conservada en todos los nucleótidos, además de ocurrir en el pre-rRNA naciente antes de completar su transcripción, también sucede en el tRNA, mRNA, snRNA, pero está ausente en las regiones espaciadoras. Su papel aún permanece en la especulación, posiblemente facilitan el plegamiento del pre-rRNA durante la elongación, o bien, modulan la unión de la proteína al ribosoma (Bachellerie y Cavaillé, 1997). Mientras, la familia de caja H (ANANNA, donde N puede ser cualquier nucleótido), y el trinucleótido ACA, ubicado a tres nucleótidos de distancia del extremo 3', tienen una función importante en la pseudouridinación (ψ) del rRNA. Una vez formado el duplex rRNA-snoRNA con caja H/ACA, 14 a 16 nucleótidos río abajo son críticos para la isomerización de la uridina en pseudouridina (Bachellerie y Cavaillé, 1997).

Las pseudouridinas (5-ribosiluracil; ψ) son más comunes que la metilación, se

encuentran virtualmente en todas las subunidades ribosómicas y hay de cuatro a ocho veces más, en eucariontes que en eubacterias. En vertebrados los rRNA maduros, llevan > 100 grupos 2'-O-metil y ~95 residuos de pseudouridina (Kiss-László *et al.*, 1998).

La pseudouridinación requiere de la ψ -sintasa, tres proteínas y un snoRNA guía, se da por la ruptura de un enlace *N*-glicosil y rotación de la base uracilo (mientras está unida la enzima), y posterior formación de un enlace *C*-glicosil. Tanto la isomerización, como el reconocimiento, son parcialmente entendidos y otros totalmente desconocidos; como es el caso de eubacterias, donde las ψ -sintasas deben seleccionar el sitio a modificar entre 1 200 uridinas en la subunidad grande del ribosoma (Ofengand, 2002).

Otros RNAs, que no tienen un papel de guía en modificaciones enzimáticas de los precursores de RNA, pero que sin duda participan en la compleja red de la dinámica intranuclear, son los pequeños-RNAs (*small RNAs*). Represores muy ubicuos y versátiles, encontrados primero *Caenorhabditis elegans* y posteriormente en plantas, animales y hongos, tienen de 21 a 26 nt de longitud. Son generados por el procesamiento de un RNA largo (70 a 200 nt de longitud), de doble cadena (dsRNA), codificados en las regiones intergénicas de plantas y animales; que por acción de la RNasa III denominada “*Dicer*” (cortar en trozos), junto con otras proteínas, produce los pequeños-RNA (Carrington y Ambrose, 2003).

Anteriormente, considerados como RNA “basura”, inducen el silenciamiento de los genes, mediante un apareamiento con secuencias homólogas, por lo que se estima regulan procesos como el desarrollo embrionario, la morfología de órganos y algunos tejidos. Por ejemplo, guían el desarrollo temprano de la arquitectura de una hoja, actuando como mediadores de la proliferación celular; en embriones de *Drosophila*, o bien, en mamíferos como ratón, ayudan a dirigir a las células madre que originan las células sanguíneas. Los hay de muchos tipos: cortos de interferencia (si) RNAs, temporales pequeños (st) RNAs, de heterocromatina siRNAs, pequeños no codificantes y los microRNAs. En general controlan la estabilidad, traducción del mRNA, y sitios blanco de modificaciones epigenéticas en regiones del genoma. Los siRNAs, detectados inicialmente en vegetales, están asociados con el silenciamiento de transgenes, virus y transposones; se consideran intermediarios en las vías de defensa contra ácidos nucleicos extraños. En humanos, se estima que aproximadamente 255 genes codifican microRNAs, cerca del 1% de los genes del genoma total (Finnegan y Matzke, 2003).

3.5. Mitosis.

Diversas observaciones por microscopía fotónica, en la gran cantidad de organismos, unicelulares y pluricelulares, indican con unanimidad que existen varios cambios en las células al momento que “decide” dividirse. Este mecanismo de reproducción del cual depende toda forma de vida, se denomina ciclo celular. Los detalles de la división varían, pero sus requerimientos y puntos de control son universales. Primeramente, para llevarse a cabo requiere la duplicación del DNA, de su masa celular y de todos los orgánulos citoplasmáticos. Este control maestro, coordina y se acopla a la velocidad de crecimiento en tiempos precisos ya sea en una célula embrionaria o somática.

Tradicionalmente, el ciclo celular abarca dos estadios; mitosis e interfase; por métodos bioquímicos, se divide en las fases: G₁, S, G₂ y M, que designan los períodos de pre-síntesis, síntesis, post-síntesis y división del DNA, respectivamente. Su duración, es muy variable y generalmente depende del grado de diferenciación del organismo, por ejemplo; en embriones de mosca los ciclos son muy cortos, solamente de 8 minutos, mientras que en hepatocitos, abarca de uno a dos años. Un ciclo celular típico de mamífero, comprende 12 horas y se emplea como patrón para describir los eventos que tienen lugar en cada fase del ciclo celular.

G₁ (G de *gap*, intervalo o lapso), es el intervalo entre el término de la mitosis y el comienzo de la fase S, durante el cual la célula crece, hay síntesis de RNA y proteínas, pero no existe replicación del DNA. En células somáticas, abarca la mayor parte del ciclo y varía de aproximadamente 6 horas (en células de crecimiento rápido), a 12 horas (crecimiento lento). Por razones aún desconocidas, algunas células en esta fase pueden retirarse del ciclo celular indefinidamente, lo que se conoce como G₀ (G cero) o “stop” (en levaduras), hasta su reactivación. En mamíferos, la duración del ciclo celular está determinada por su capacidad de entrar en G₀ (Lewin, 2000).

El inicio de la replicación del DNA marca la transición de la fase G₁ a la fase S (síntesis), perdura hasta que es duplicado totalmente el contenido de DNA (de 2n a 4n), un período de 6 a 8 horas es típico. El núcleo incrementa de tamaño considerablemente debido a la acumulación de proteínas que equiparan la producción de DNA. La cromatina permanece en un estado compacto con pocos cambios visibles al microscopio fotónico.

El período que abarca del final de la fase S hasta el inicio de la mitosis es llamado G₂. La célula que ya posee dos juegos completos de cromosomas continúa su crecimiento. Aunque usualmente es el más corto de la interfase, proporciona un lapso de seguridad donde la célula revisa que ha finalizado correctamente la replicación del DNA, para avanzar hacia la mitosis.

La fase M o mitosis, marca la culminación del ciclo celular, los cromosomas se hacen visibles y se segregan las cromátidas hermanas cuando la envoltura nuclear es desensamblada, el citoesqueleto se reorganiza y virtualmente todas las actividades de síntesis se detienen durante esta fase. En general, su duración es de 1 a 2 horas (Alberts *et al.*, 1996; Lewin, 2000).

Desde su descripción por Walter Flemming en embriones de salamandra (1879), la mitosis, ha intrigado a los científicos, quienes se han dedicado a estudiar el proceso por diversas metodologías, para entender las bases moleculares de la segregación precisa de los cromosomas y de los mecanismos que aseguran la estabilidad genética (Malmanche *et al.*, 2006). Puesto que este complejo mecanismo, no únicamente funciona como un medio de proliferación celular (mitosis proliferativa), sino también origina la expresión de un fenotipo distinto (mitosis cuántica), en la célula hija después de varias divisiones, durante la citodiferenciación (Carlson, 1990). Diversos descubrimientos, indican que requiere una serie de eventos altamente coordinados que involucran tanto al citoplasma como el núcleo. Sus estadios sucesivos, característicos y constantes morfológicamente entre los eucariontes son: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Tienen un orden secuencial estricto, mientras que la citocinesis, habitualmente pero no siempre, acompaña a la mitosis; comienza generalmente durante la anafase (en ocasiones en telofase) y continúa hasta el fin de la telofase (Alberts *et al.*, 1996; Lewin, 2000; Ferrari, 2006).

Existen pocos reportes de la mitosis a nivel ultraestructural, estudios en células de la cripta duodenal de ratón fijados en paraformaldehído, contrastados con la técnica específica para DNA (amina de osmio), de Cogliati y Gauthier (1973), dividen el ciclo celular en once estadios, con cuatro correspondientes a la mitosis y siete a la interfase (Leblond y El-Alfy, 1998). En vegetales, son más escasos y aquellos que describen el proceso lo hacen con relación a la herencia de componentes ribonucleoproteicos (Falcón-Barcenas, 2002).

Aunque la belleza del evento es difícil de apreciar a partir de microfotografías

estáticas, la mayoría de las descripciones se basan en ellas, lo que se trata a continuación.

En *profase*, etapa más larga de la mitosis, el primer evento visible es la condensación de la cromatina, que requiere la acción coordinada de un complejo multiprotéico denominado condensina y topoisomerasa II. La cuál coincide con la fosforilación de H3, proceso dependiente de la cinasa Aurora B, que también regula la activación del centrosoma y microtúbulos (Ferrari, 2006). Los genes y material nucleolar ribonucleoproteico que forman el nucléolo, comienzan a disgregarse en componentes de diámetro cada vez menor que se adosan a la superficie de los cromosomas metafásicos, tanto en plantas como en animales (Puvion y Moyne, 1981; Jiménez-García, 1988). En la *profase tardía*, la célula reorganiza el citoesqueleto de tal modo que los centrosomas, cada uno con su par de centriolos (duplicados durante la interfase), migran hacia polos opuestos y organizan a los microtúbulos en un huso mitótico (Ferrari, 2006; Malmanche *et al.*, 2006). Los cinetocoros (complejos multiprotéicos trilaminares especiales), se ensamblan adyacentes a cada centrómero (secuencias ricas en AT), uno en cada cromátida hermana y en direcciones opuestas, a los cuales se unen los microtúbulos cinetocóricos, y aunque en esta etapa no se disgregan las cromátidas hermanas, ya existe una tensión generada en ellos (Alberts *et al.*, 1996).

El aparato de Golgi, se dispersa en vesículas pequeñas, que se distribuyen a lo largo del citoplasma; se detiene la pinocitosis, y la síntesis de RNA y proteína disminuye en un 25 % de su rango normal (McIntosh y Koonce, 1989). En vegetales, antes del inicio de la profase se forma una franja de microtúbulos y filamentos de actina, por debajo de la membrana plasmática; la franja de preprofase, que se estrecha conforme la célula progresa hacia la profase y desaparece antes de llegar a metafase. Determina de algún modo el plano de división celular posterior, para la construcción de la placa celular durante la citocinesis (Alberts *et al.*, 1996).

La *prometáfase* comienza con la ruptura de la envoltura nuclear, que se ve facilitada por la fosforilación de la lámina nuclear. Los microtúbulos que emanan de ambos polos centroméricos se unen a los cinetocoros de cada cromátida hermana, tan pronto como se da esta interacción cada cromosoma es orientado de tal forma que “ve”

hacia el centrosoma. Luego se desplazan retrocediendo y adelantándose, como resultado, se ejerce una fuerza en los cromosomas que los orienta en la placa metafásica. El rango de velocidad de los cromosomas hacia los centrosomas es de 0.05 $\mu\text{m/s}$ y disminuye conforme progresa la prometáfase (0.05 a 0.01 $\mu\text{m/s}$), sugiriendo que el huso mitótico restringe su movilidad. En la mayoría de los eucariontes, se disocia la envoltura nuclear para permitir esta interacción, excepto en hongos y algunas algas donde el huso se forma dentro de la envoltura nuclear (McIntosh y Koonce, 1989; Alberts *et al.*, 1996).

Al inicio de la *metafase*, los cromosomas se desplazan desordenadamente, primero en una dirección y después en otra, antes de colocarse equidistantemente en línea. Los cromosomas se congregan gradualmente hacia el ecuador del huso mitótico, donde son alineados para originar la llamada placa metafásica e iniciar la salida de mitosis. Su creación, puede requerir una cantidad de tiempo considerable, ya que el ensamble completo con el huso mitótico, implica que todos los cinetocoros de ambos lados se encuentren unidos a sus fibras, en un proceso llamado bi-orientación (Ferrari, 2006). Se propone que la congregación de los cromosomas hacia la placa metafásica, funciona como un punto de control de calidad del material condensado y apareado; errores de anclaje con el huso mitótico, llevan al detenimiento de la mitosis y degeneración de la célula, que evita, por ejemplo; la producción de un esperma anormal, en el caso de saltamontes. Aunque la formación de la placa metafásica, no ocurre en todos los organismos como en algunos hongos y plantas (*Tradescantia virginiana*), esto no significa que su movimiento y segregación no sea perfecto durante la anafase; aunque fallas ocasionales en estos organismos no resultan fatales (Nicklas y Arana, 1992).

El punto de chequeo en metafase, se denomina SAC (*spindle assembly checkpoint*), demora la transición metafase-anafase hasta que todos los cromosomas están propiamente unidos al huso mitótico. Los sensores, la naturaleza de las señales y las vías de transducción son sujetos de intensa investigación. La primera evidencia de SAC monitoreando al centrómero, se obtuvo en levaduras de gemación, donde se determinó que la presencia de un centrómero anormal puede retrasar la mitosis, posteriormente en células *in vivo* de vertebrados se observó inequívocamente, que los cinetocoros que fallan al unirse con los microtúbulos mandan una señal de espera para

entrar en anafase. Se identificaron los genes Mad 1, 2 y 3 (*mitotic arrest deficient*) y Bub 1, 2 y 3 (*budding uninhibited by benomyl*) en mutantes de levadura, cuyas proteínas están muy conservadas entre los eucariontes y por inmunolocalización en varios organismos modelo, se conoce que las proteínas Mad y Bub se encuentran en los cinetocoros que están desunidos o que tienen una tensión reducida; se piensa que su papel es transmitir una señal de espera e imponen un arresto mitótico durante la metafase, en respuesta a daño en los microtúbulos (Malmanche *et al.*, 2006).

Durante la *anafase*, etapa más rápida, los cromosomas se desplazan a una velocidad constante, por el acortamiento gradual de los microtúbulos cinetocóricos, movimientos que son tan rápidos como en la prometafase tardía. Su velocidad es independiente de la posición, excepto en insectos donde incrementa junto con la temperatura (15 a 30 ° C) (Richard y Koonce, 1989). A nivel molecular, la transición metafase-anafase está regulada por el complejo APC/C (complejo promotor de la anafase/ciclosoma), que ubiquitina una serie de proteínas reguladoras clave dentro del ciclo celular, marcándolas para su degradación por el proteosoma 26S. El complejo APC/C activo, inicia la destrucción de las ciclinas y activa la separasa que degrada a la cohesina y así remueve la unión entre cromátidas hermanas (Ulhmann, 2001; Ferrari, 2006; Malmanche *et al.*, 2006). En la *anafase tardía*, concomitantemente con el desensamble de los microtúbulos del cinetocoro, la elongación de los microtúbulos polares, se torna más evidente y contribuye a separar en mayor grado los polos del huso. En algunos animales, protozoos y plantas, durante la anafase temprana se forma un anillo contráctil de actina-miosina que da inicio a la división del citoplasma (citocinesis) (McIntosh y Koonce, 1989).

En la *telofase (telos, fin)*, los cromosomas alcanzan totalmente los polos opuestos, los microtúbulos del cinetocoro continúan dispersándose en dímeros de tubulina, y los polares se alargan aún más; las lamininas desfosforiladas se reorganizan y repolimerizan alrededor de los cromosomas, para reensamblar la lámina nuclear, y las vesículas de la membrana nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas. En la *telofase tardía*, las vesículas de la envoltura nuclear se fusionan para establecerla nuevamente, en los dos conjuntos de cromosomas (cariocinesis), durante este proceso también se reorganizan los complejos de poro (McIntosh y Koonce, 1989; Salamanca-

Gómez, 2004; Ferrari, 2006). Debido a que la nueva envoltura nuclear, se sitúa muy cerca de la superficie de los cromosomas, excluye todas las proteínas de la célula excepto las unidas a los cromosomas mitóticos (Alberts *et al.*, 1996). Los cromosomas nuevamente se tornan difusos y el núcleo recién formado adquiere una morfología característica de “riñón”. En cada núcleo reaparecen los nucléolos. Frecuentemente, se comienza a ensamblar un nuevo centriolo (excepto en vegetales), junto a cada uno de los previos, cuya replicación continúa durante el ciclo celular siguiente, de modo que cada célula hija tendrá dos pares de centriolos en la profase de la próxima mitosis.

En algunas células somáticas normales, el proceso visible de citocinesis, inicia generalmente durante la telofase, y difiere significativamente en las células animales y vegetales. En células animales, durante la telofase temprana, la membrana se constriñe alrededor de la circunferencia de la célula, en el plano ecuatorial del huso. Al principio, en la superficie, aparece un surco que gradualmente profundiza y forma una ranura. Este plegamiento de la membrana originado en la periferia, en la parte más media, va progresando hacia el centro de la célula. Donde finalmente, la conexión entre las dos células hijas, se reduce a una hebra delgada que pronto se parte al empezar la siguiente interfase. La división, ocurre siempre en la línea media del huso, en la región donde se superponen las fibras polares, y habitualmente se obtienen dos células hijas con igual dotación de cromosomas y citoplasma (división ecuacional) (Salamanca-Gómez, 2003).

En células vegetales, el citoplasma se divide en la línea media, por la secreción de vesículas provenientes del aparato de Golgi, que se fusionan y modelan una estructura plana limitada por membrana: la placa celular, situada cerca del plano donde solía ubicarse la placa metafásica (McIntosh y Koonce, 1989). Esta capa de polisacáridos no celulósicos, se impregna gradualmente con pectina para constituir la lámina media. Entonces cada célula construye su propia pared celular o matriz extracelular, depositando en ella celulosa, hemicelulosa, pectinas, ligninas, suberina, sílice, carbonato de calcio, proteínas estructurales, enzimas y agua. Mientras la célula continúa su crecimiento, se sintetiza la pared primaria, compuesta por celulosa, hemicelulosa, proteínas y pectinas; una vez que ha dejado de crecer comienza el desarrollo de la pared secundaria a la cual se añaden ligninas, depositadas al interior de la primaria. En las células vegetales, el proceso de segmentación de la pared celular, es muy desconocido, así como su papel en el crecimiento celular, la diferenciación, en la morfogénesis y en respuesta a estímulos ambientales (ejemplo: germinación). Se ignora

cómo establece el patrón de segmentación para medir las distancias entre células, y cómo es determinada la longitud y morfología de la planta u órgano (Covarrubias y Cassab, 2003).

Cabe señalar, que al parecer, el núcleo celular no es el único sitio con dominios, sino también ocurren en el citoplasma; muestra de ello, lo sugiere la mitosis acentriolar en plantas. Por inmunolocalización y fraccionamiento celular, se conoce que la γ -tubulina componente universal de los centros organizadores de los microtúbulos (MTOCs), en animales, está presente en gran cantidad, tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células vegetales; su almacén incrementa durante la fase G₂ tardía y se acumula en los precinetocoros antes de la profase. Esta compartimentalización subcelular, puede ser un factor importante en la organización de los microtúbulos, que emergen inicialmente durante la profase tardía, alrededor de los cinetocoros, actuando como centros organizadores en la construcción del huso mitótico acentriolar vegetal; se especula que la envoltura nuclear y sitios dispersos en los cromosomas tienen un papel importante en el proceso (Binarová *et al.*, 2000).

Durante la mitosis en el nucléolo acontecen una serie de cambios dramáticos, en profase se disgrega y restringe a las regiones cromosómicas del organizador nucleolar (NOR, en humanos los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22). Debido a que se suspende casi completamente la transcripción, se desvanece gradualmente, y la maquinaria de transcripción del rDNA (pol I), se inactiva por fosforilación dirigida por Cdk1-ciclina B, para adosarse a las hebras de cromatina. Se reconstituye (nucleogénesis) en telofase tardía e interfase temprana (G₁), a partir de la reactivación de la transcripción de los genes de rDNA (por inactivación de Cdk1-ciclina B), y por la fusión del material de los cuerpos prenucleolares (PNBs), compuestos del material pericromosómico durante la anafase (Jiménez-García, 1988; Hernandez-Verdun, 2006). Aunado a la reactivación de la transcripción, el nucléolo requiere la relocalización y activación de la maquinaria de procesamiento del pre-rRNA. Las proteínas involucradas en la maduración del pre-rRNA, dejan el nucléolo en profase y se ubican principalmente en la periferia de los cromosomas durante la mitosis. Estas son componentes del DFC y GC del nucléolo activo, como B23 y Nop52 (marcadores del GC), proteínas del procesamiento temprano y tardío del rRNA, respectivamente. En células vivas,

proteínas nucleolares marcadas con la GFP, se concentran alrededor de los cromosomas y migran con ellos. La coordinación del movimiento de las proteínas nucleolares con los cromosomas, y el mantenimiento de estas interacciones posiblemente está mediada por B23, sin embargo los mecanismos que mantienen a las proteínas que participan en el procesamiento del pre-RNA con los cromosomas durante la mitosis aún no se han caracterizado.

En mitosis, la C2 o nucleolina, se asocia a los FCs, al DFC, con el NOR y a la superficie de los cromosomas, de donde se condensa en PNBs. Las proteínas B23, fibrilarina, Bop1 y Nop 52; en profase se distribuyen hacia el nucleoplasma, y se asocian homogéneamente en la superficie de los cromosomas en metafase y anafase. En telofase y G₁ temprana, se concentran en los PNBs y posiblemente desempeñan algún papel en la síntesis y maduración del ribosoma. La fibrilarina, se localiza en la DFR en interfase, en mitosis con los NOR metafásicos, y en telofase en los PNBs durante la nucleogénesis (Jiménez-García, 1988; Hernandez-Verdun, 2006). En conclusión, la maquinaria de procesamiento del pre-rRNA es primeramente concentrada en los PNBs, para formar el nuevo nucléolo.

Por lo expuesto previamente se deduce que el ciclo celular y en particular durante la mitosis; en realidad comprende otros ciclos; el cromosómico, nucleolar, centriolar (en animales), de ensamble y desensamble de la envoltura nuclear; la despolimerización y repolimerización de los microtúbulos para originar el huso mitótico; y la duplicación y reparto de organelos (Jiménez-García, 1988; Vázquez-Ramos, 2003). La cuestión ha sido entender cómo se regulan estos eventos en el tiempo de manera coordinada y precisa, ya sea al constituir un nuevo individuo, en la regeneración celular o generación de un órgano, y en el deterioro o muerte celular programada.

Desde 1975 Paul Nurse, estudiando el ciclo celular en levaduras, identificó los genes que ejercen control en las divisiones nucleares. Investigaciones bioquímicas posteriores realizadas en ovocitos de anfibios, llevaron a la identificación del factor promotor de la maduración o de la fase M (MPF), el cuál facilita la entrada tanto a mitosis como meiosis. Lohka *et al.* (1988), trabajando con ovocitos de *Xenopus*, purificaron exitosamente este factor y determinaron su composición de Cdk1 (proteína cinasa dependiente de ciclina) y una ciclina tipo B. La Cdk1, también conocida como Cdc2 en levaduras, se activa e inhibe sucesivamente, mientras la célula atraviesa las

diferentes fases del ciclo de división, y afecta varios aspectos del comportamiento celular a través de sus efectos sobre las proteínas que fosforila. Presente a lo largo del ciclo, sólo es activa cuando se unen a ella las ciclinas, que pueden ser de dos tipos G_1 y G_2 . Las cuales son sintetizadas y degradadas con cada ciclo celular, controlan la capacidad de fosforilación de Cdk1 a proteínas blanco, y su actividad, por interacciones proteína-proteína y por fosforilaciones reversibles (Alberts *et al.*, 1996; Ferrari, 2006). El ensamble, activación y desensamble cíclico ciclina-Cdk, son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular. Así, el complejo proteico Cdk-ciclina G_1 , induce el inicio a la fase S y el complejo Cdk-ciclina G_2 a mitosis (Ferrari, 2006).

Para la entrada a mitosis, la ciclina mitótica se acumula gradualmente durante G_2 y se une a Cdk1 (Cdc2), formando el factor promotor de la fase M, que inicialmente permanece inactivo. La activación del MPF, posiblemente por un mecanismo de retroalimentación positiva, incrementa la acción de las enzimas que lo activan; de tal modo que la concentración de MPF activo se acelera hasta que desencadena una serie de sucesos subordinados (la condensación de los cromosomas, desorganización de la lámina nuclear y reorganización del citoesqueleto) que llevan a la célula a la mitosis. El MPF se desactiva repentinamente por la degradación de la ciclina mitótica en la metafase-anafase y permite a la célula salir de mitosis. El mecanismo de control sobre G_1 , es menos conocido pero se cree que actúa de manera similar. La actividad de Cdk1, en levadura se regula al menos por dos o más ciclinas, las cuales son Wee1, Cdc25, MO15, y Cdc13 (homóloga a la ciclina mitótica B). Antes de su unión con las ciclinas, las proteínas cinasas dependientes de ciclina (Cdks) se encuentran en una conformación inactiva y al unirse se convierten en sustrato para las cinasas; en primer lugar una fosforilación por la proteína Wee1 en Cdk1 en un residuo de tirosina cercano al sitio catalítico, bloquea su actividad de cinasa, e impide que actúe prematuramente como MPF; posteriormente una segunda cinasa (MO15), fosforila un residuo treonina en otra región de Cdk1 que activa a MPF y al removerse la primera fosforilación se torna totalmente activo (Alberts *et al.*, 1996).

La interacción de ciclina con Cdks cambia su conformación de la hélice para aproximar un residuo de glutamato (E_{51}) con lisina (K_{33}), el cual coordina ATP. Esta conformación no es suficiente, por lo cual la activación total, requiere la fosforilación de un residuo de treonina (T_{161} o T_{160}), en el *loop* de activación que resulta en el apareamiento de T_{161} con arginina (R_{128}), facilita una nueva conformación y activación

del *loop* que permite su unión al sustrato. La actividad de Cdk también está regulada por un segundo mecanismo de control, que es la maquinaria encargada de detectar daños al DNA, que convergen en las cinasas Wee1 y Myt1, e inhiben la actividad de Cdk1 mediante la fosforilación de dos residuos (Y₁₅ y T₁₄), en el *loop* rico en glicina. La fosforilación en estos sitios no afecta la unión de los nucleótidos, pero si obstruye estéricamente la catálisis; residuos que son desfosforilados por una fosfatasa (Cdc25), cuya acción incrementa durante la mitosis, a través de Cdk1 y la cinasa Polo-1 (Ferrari, 2006).

Los mecanismos por los cuales Cdk1 regula la entrada y transición hacia mitosis, son múltiples y están mediados por fosforilación de numerosos sustratos. Que incluyen a las lamininas y su consecuente disrupción de la membrana nuclear; de proteínas asociadas a microtúbulos y cinesinas, las cuales participan en la separación del centrosoma, ensamble del huso mitótico y fosforilación de condensinas (proteínas que regulan la condensación de los cromosomas). Además de la supervisión de estos mecanismos, Cdk1 completa su función reguladora a través del complejo APC/C, por la degradación de varias ciclinas como Polo cinasa-1, Aurora-A y B, securina y Cdc20 entre otras.

Actualmente se conocen más de 70 genes que controlan el ciclo celular, de los cuales *cdc* y *wee* (pequeño), codifican componentes de control del propio sistema del ciclo celular. Se calcula que cerca del 2% del genoma humano (kinoma humano), comprende a las PKs (proteínas cinasas) (Ferrari, 2006).

Existe poca información sobre el ensamble y desensamble del resto de los dominios nucleares durante la mitosis. Y el estudio de tres de ellos indica que parte de su estructura se preserva. Se consideran equivalentes en mitosis, de los *speckles*, a gránulos intercromatinianos mitóticos (MIGs), con sus factores de *splicing*; a los cuerpos de Cajal mitóticos (MCBs), y su contenido de coilina, snRNPs y SMN; y los *foci* provenientes del nucléolo (NDF, *nucleolus derived foci*), con un gran número de proteínas nucleolares; con los cuerpos de Cajal (CB) y el nucléolo, respectivamente. En todos los casos, el equivalente mitótico de la estructura nuclear desaparece hacia el final de la mitosis. Conforme la estructura misma se vuelve a formar en cada núcleo nuevo, los distintos componentes de estos dominios, muestran un comportamiento muy dinámico, diferente al entrar nuevamente al núcleo. Por ejemplo, la coilina marcada con

YFP, deja los MCBs en telofase temprana, se desplaza rápidamente al núcleo para acumularse en el nucleoplasma, y tornarse visible en los cuerpos de Cajal en G₁. La proteína SMN-GFP, por su parte, persiste en gran número en los MCBs, que carecen de coilina en telofase tardía y se acumulan en los CB en G₁ tardía. Varias proteínas como la fibrilarina, B23 y los factores de *splicing* SC-35, ASF/SF2, una vez concluida la mitosis, se introducen a diferentes tiempos para reensamblar el nucléolo y los *speckles*, respectivamente. Estos datos junto con filmaciones en tiempo real, a intervalos, de células en mitosis, que expresan GFP nucleares, sugieren que los remanentes mitóticos de las estructuras nucleares no entran directamente al núcleo sino que residuos de ellos, disgregados hacia el final de la mitosis, permiten a sus factores reconstituirlas. Su propósito no está claro aún, pero es posible que la preservación de las interacciones proteína-proteína y proteína-RNA durante la mitosis, puede que prevenga acciones deletéreas o bien, que permita se reasuman rápidamente los procesos nucleares después de la mitosis (Sleeman, 2004).

3.6. Descripción de la familia Taxodiaceae.

La familia Taxodiaceae comprende unos 10 géneros, y aproximadamente 16 especies; ampliamente distribuidas en regiones templadas del norte, y subtropicales del viejo y nuevo mundo, con un género presente en el hemisferio sur (Page, 1990; Brunsfeld *et al.*, 1994). *Taxodium* se localiza del noreste de los Estados Unidos, desde Florida a México y parte de Guatemala, *Cunninghamia* del norte de China a Taiwán, *Taiwania* del sur de China a Taiwán y norte de Birmania, *Cryptomeria* con un amplio rango en China y Japón, y con una distribución más local: *Sequoia* y *Sequoiadendron* en el oeste de Norteamérica, *Glyptostrobus* y *Metasequoia* en el sur y centro de China, y *Athrotaxis* en Tasmania (Kusumi *et al.*, 2000).

La familia está constituida por árboles monoicos, de gran talla con hojas caedizas o persistentes. Sus ramificaciones presentan hojas aciculares, alesnadas o escamiformes. Los conos femeninos son solitarios y de posición terminal, mientras que los masculinos pueden ser axilares o terminales. El tronco es leñoso y sus semillas poseen alas estrechas (Earle, 2003).

1.6.1. Generalidades de las especies de *Taxodium*.

Del género *Taxodium* se reconocen generalmente tres especies, *Taxodium mucronatum* Ten., *Taxodium distichum* (L.) L.C. Rich., y *Taxodium ascendens* Brongn. (Tabla 2). Aunque para algunos autores *T. mucronatum* es una subespecie de *T. distichum* (L.) Rich., pues exhibe una continua gradación morfológica con *T. distichum* var. *Nutans* (Aiton) Sweet, por lo que su situación taxonómica requiere estudiarse con detalle (Watson, 2000). Mientras que para *T. ascendens* Brongn, estudios basados en el análisis de polimorfismos de secuencias, sugieren que no es una especie distinta a *T. distichum* sino una variedad de éste (Tsumura *et al.*, 1999).

- *T. distichum* Rich.

En *T. distichum* o ciprés calvo, los árboles son de talla mayor que *T. ascendens* y de distribución más amplia. Crece en suelo estacional o intermitentemente inundado, en las riberas de los ríos, en clima húmedo, subhúmedo y seco subhúmedo; donde la precipitación anual normal es de 1120 a 1630 mm, y en los más secos de 760 mm. No obstante, lugares escasamente drenados tienen un papel más importante que las precipitaciones para determinar el sitio adecuado para su crecimiento. Se ubican de forma natural, en topografías planas u depresiones ligeras en elevaciones de 30 msnm hasta el nivel del mar. Los sitios se caracterizan por inundaciones frecuentes y prolongadas de hasta 3 m de profundidad y con un flujo de 6 km/h. Aguas de coloración rojiza originadas al pie de monte, son propicias para su desarrollo, a diferencia de *T. ascendens*, donde las de mayor contenido de materia orgánica (turba, aguas negras) son favorables. Ocasionalmente crecen en aguas salobres, a lo largo de estuarios, pero aparentemente no toleran un contenido de sal mayor a 0.89 %. No crece en suelos con un pH por debajo de 5.5. Aunados a la vegetación de *T. distichum* se encuentran maples (*Acer rubrum*), robles (*Quercus spp.*), pinos (*Pinus spp.*) y fresnos (*Fraxinus spp.*). Esta conífera decidua y monoica, posee un tronco muy dilatado y alargado, los individuos viejos desarrollan varias raíces laterales que proveen anclaje, a partir de las cuales se forman protuberancias cónicas de madera “esponjosa” conocidas como “rodillas” (*knees*) u neumatóforos, cuyo tamaño, dependiendo del nivel de agua, varía de algunos centímetros a más de 3.7 m. No tienden a formarse en sitios poco inundados, donde el agua alcanza menos de 30 cm de profundidad. Sin embargo, pequeñas “rodillas”, se han

observado en ejemplares que no están sujetos a inundaciones, y no son comunes en árboles ornamentales. La razón fisiológica se desconoce, pueden ser benéficos como órganos de aeración, pero no son críticos para su supervivencia, también pueden ayudar a fijar fuertemente los árboles ya que desarrollan grandes raíces. Un extenso sistema de raíces, les permite anclarse firmemente al suelo húmedo, tal que, rara vez son arrancados durante un huracán. Su madera, no tan áspera y gruesa como *T. ascendens*, es usualmente de tono café rojizo oscuro a café claro, con hendiduras ligeras. Su corona es cónica cuando son jóvenes, y se torna irregular o delicuescente (muy ramificado que el eje principal es difícil de determinar) con la edad. Las hojas, son lineares o lanceoladas, muy apesadas en las ramitas, divergentes lateralmente, dispuestas en dos hileras; miden de 5 a 17 mm, y algo pendientes u horizontales. Los conos masculinos y femeninos, maduran a partir de brotes del año previo. Los masculinos de aproximadamente 2 mm de diámetro, muy conspicuos en invierno, esbeltos y de coloración púrpura; forman agregados de 7 a 13 cm de largo. El polen se esparce en marzo y abril. Los conos femeninos solitarios u en grupos de 2 ó 3, son más globosos y cambian de tonalidad verde a café púrpura conforme maduran, en los meses de octubre a diciembre. Miden de 13 a 36 mm de diámetro y tienen de 9 a 15 escamas que se rompen irregularmente durante su maduración, cada una puede portar dos semillas de forma triangular, con cubiertas gruesas, callosas y proyecciones con apariencia de “pestañas”. El número de semillas por cono es en promedio 16, pero varía de 2 a 34. Son esparcidas por ardillas y por corrientes de agua. Es atacado por varios hongos, entre ellos *Stereum taxodi*, que le ocasiona el daño más serio en su tronco hasta que se pudre y es derribado. Insectos, provocan la decoloración del follaje (*Systema marginalis*) y defoliación (*Anacamptodes pergracilis*); los gusanos (*Dioryctria pymacella*) son una peste seria para los conos. Estos cipreses, posiblemente forman parte de los ecosistemas más redituables del mundo. Su producción anual de biomasa es de 15 700 kg/ha, en comparación con otras comunidades de bosques en regiones templadas que rinden de 12 300 a 15 000 kg/ha de biomasa anual. Además de árbol de ornato, tiene una multitud de usos, puesto que es bien conocido por su habilidad para resistir el pudrimiento, es útil en la industria de la construcción de botes, muebles, etc. Los ejemplares adultos son el hábitat de varias especies de aves, como el águila calva, el quebrantahuesos y pájaros cantores (Campbell y Clark, 1960; Davidson *et al.*, 1960; Brown, 1981; Watson, 1985; Flores-Rodríguez, 1992).

- *T. ascendens* Brongn.

T. ascendens, erróneamente llamado var. *nutans* (de *nodding*, caedizo), debido a la observación de algunos ejemplares en cultivo con tendencia a poseer ramas caedizas; en realidad sus ramas secundarias son algo más ascendentes que el ciprés calvo, de ahí su nombre *ascendens*. Son árboles de menor talla que *T. distichum* y *mucronatum*, crece en suelos húmedos en aguas poco profundas, y raramente al margen de los ríos, en climas húmedo y subhúmedo. Requiere suelos pobremente drenados y poco fértiles, de arcilla y estiércol húmedo, con un pH menor a 6.8. Se ubica en una topografía plana o en depresiones ligeras llamadas “domos”. Su distribución está más restringida hacia la costa sur de Florida en elevaciones de no más de 30 msnm. La madera de éstos árboles monoicos, es típicamente café oscura o grisácea es más áspera, gruesa y surcada que en *T. distichum* y *mucronatum*, por la cual, también es más resistente al fuego. Su tronco no ramificado, es muy plegado y acanalado, con crestas redondeadas, de base gruesa pero más corta que en *T. distichum*. Sus neumatóforos son pequeños, redondos, y en menor número que el ciprés calvo. La corona es piramidal, con hojas alesnadas y algo pequeñas (3-10 mm), de tonalidades verdes o amarillo verdoso, muy apesadas; no están dispuestas en dos filas y la mayoría ascienden verticalmente. Las ramitas pueden ser o no deciduas. Los conos masculinos, se agregan en panículos de 7 a 12 cm de largo; los femeninos, son pequeños y cercanos al ápice. Los femeninos de 1 a 2 cm de diámetro poseen escamas peltadas, inicialmente verdes, se tornan cafés al madurar. Los ejemplares, proveen sitios de apareamiento para ranas arbóreas, sapos y salamandras, y un hábitat para garzas, mamíferos y reptiles de los alrededores. Se emplea generalmente como árbol de aserradero, además de funcionar como áreas de recarga de los mantos acuíferos. Los que habitan en “domos” mejoran la calidad del agua del subsuelo. *T. ascendens* es un árbol longevo, pero no tanto como *T. distichum* y *mucronatum*. Existen poblaciones de *T. distichum* en el sureste de Estados Unidos con una edad aproximada de 400 a 600 años y pocos alcanzan 1 200 años (Whitford, 1956; Wyman, 1965; Watson, 1985).

- *Taxodium mucronatum* Ten.

Taxodium mucronatum se distribuye del sur de Texas, a lo largo del Río Bravo, Sonora y Tamaulipas, sur de la República Mexicana llegando hasta Guatemala (Flores-Rodríguez, 1992). Sólo el género *Taxodium*, entre las gimnospermas, crece a orillas de corrientes y manantiales en lugares templados, a muy variadas altitudes, de 300 a 2,500 msnm, esta conífera de hábitos riparios es con frecuencia la especie dominante en los bosques de galería (Rzedowski y Equihua, 1987).

Son árboles con hojas alternas, aplanadas y conos femeninos casi globosos con escamas caedizas, peltadas, delgadas y leñosas (Earle, 2003). Distribuido por casi todo el territorio nacional, en Oaxaca solo se encuentra una especie (*T. mucronatum*) (Del Castillo *et al.*, 2004).

Es una planta monoica, en la cual la polinización y la fertilización ocurre durante el transcurso de un año (Martínez, 1963). Posee una copa amplia e irregular, conformada por ramas grandes, fuertes, extendidas y poco levantadas, por lo que la forma de la copa se define como ancha y abatida.

Su tronco es grueso con una base dilatada de donde se despliega hasta la copa, forma contrafuertes u apoyos, por lo que la superficie muestra abultamientos irregulares y hendiduras de diferente medida y profundidad. Frecuentemente tiene bifurcaciones y trifurcaciones dando la apariencia de tratarse de la fusión de varios individuos. La corteza es rugosa y de color pardo grisácea en la capa superficial, y en la inmediata de color moreno rojizo. Debido a la facilidad con la que se desgarra el fuste o tronco exhibe ambas coloraciones. Presenta dos tipos de ramas: persistentes y leñosas, y las deciduas anualmente, y pequeñas. Ambas poseen hojas de borde entero, de tonalidad verde oscuro, lineares, rectas o muy levemente falcadas, con un ápice agudo y hialino. Dispuestas en dos hileras dísticamente, miden de 10 a 22 mm de largo, más común de 12 a 15 mm y 1 mm de ancho. Tienen una hendidura longitudinal leve en la cara adaxial, y una cresta baja en la abaxial; con estomas en ambas, dos hileras en el haz, y cinco o seis en el envés. Se tornan amarillentas o cafés al mudar, y brotan nuevamente en primavera (Flores-Rodríguez, 1992). Los conos, con una a dos semillas por escama, son de tipo globoso, los maduros se observan principalmente en los meses de julio y agosto, aunque es posible notarlos desde febrero hasta noviembre. Los estróbilos masculinos maduros se manifiestan de febrero a abril, los jóvenes de julio a enero. Esta especie poliniza a finales de febrero y marzo. Los megatróbilos maduran durante el

mismo año para su disseminación en otoño. Las semillas, son más abundantes en los meses de agosto a noviembre (SIRE: CONABIO-PRONARE).

Este árbol estimado por su belleza, longevidad y propiedades medicinales desde los antiguos pobladores del Valle de México, se encuentra muy arraigado a las tradiciones mexicanas prehispánicas, ligado a las leyendas e historia de México. Tan solo en 1921 fue declarado “árbol Nacional de México” con motivo de la celebración del centenario de la independencia de México (Anónimo, 1923; Bautista-Martínez, 1999). Dentro de la mitología es considerado como un símbolo de seguridad y protección, por lo que los antiguos mexicanos solían llamarlo “Ahoéhoetl”, “Ahuéhuetl” o “Ahuehuete” (“atl” agua y “huehue” viejo, abuelo), que en Náhuatl significa “viejo del agua” (Martínez, 1963; Aguilera, 1985). Debido a su amplia distribución en México, recibe muchos nombres locales, pero comúnmente es conocido como sabino o ciprés de río.

Entre los más famosos se encuentra el “árbol de la Noche Triste”, ejemplar ahora seco, localizado en la calzada México-Tacuba, en la colonia Popotla de la Ciudad de México. Bernal Díaz del Castillo, narra que en este árbol, Hernán Cortés lloró su gran derrota inflingida por el ejército azteca, la noche del 10 de julio de 1520.

Sin lugar a dudas el más notable y famoso ejemplar es el, de Santa María del Tule, Oaxaca, admirable por su edad y grosor. Declarado patrimonio de la humanidad en el 2003 por la UNESCO, por su longevidad y dimensiones; por lo cual también está registrado en el libro de los Records Guinness de 1986. Es posiblemente el organismo más corpulento del mundo y el árbol más grande de México (Rzedowski y Equihua, 1987; Ruiz, 2003).

De acuerdo a las mediciones de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos sus dimensiones son:

Altura: 43 m	Volumen estimado: 705 m ³
Perímetro: 42 m	Peso estimado: 509, 020 kg.
Perímetro con sinuosidades: 54 m	

Se calcula una edad aproximada de 2 000 años y es la conífera más frondosa de México (Del Castillo *et al.*, 2004).

De la antigüedad de los ahuehetes en nuestro país se tienen registros de polen

fósil que datan de aproximadamente 71 000 000 años, desde la era Cenozoica (Rzedowski *et al.*, 1977), época anterior a la llegada del hombre al Valle de México, lo que confirma que se trata de una especie originaria del país, es decir, no introducida (Rzedowski y Rzedowski, 1979). En el norte de Idaho, E.U., se han recobrado restos fósiles de hoja y amplificado, secuenciado y analizado exitosamente, el segmento de un gen de cloroplasto (*rbcL*) de *T. distichum* que data del Mioceno (17-20 m.a) (Soltis *et al.*, 1992).

Estudios moleculares del árbol del Tule (Oax.), demuestran que se trata de un solo individuo y no de varios agregados como se creía (Hall *et al.*, 1990; Dorado *et al.*, 1996).

De acuerdo con Del Castillo *et al.* (2004), *T. mucronatum* cuenta con datos deficientes en la lista roja de la UINC (Unión Mundial para la Naturaleza), y con una posible inclusión en la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002), por lo que a la fecha no se reconoce como especie en peligro de extinción.

Se emplea como árbol de ornato en parques y jardines. El tronco se usa como leña, en la construcción de canoas, e infusiones de la corteza como emenagogo, diurético, y para combatir casos de bronquitis y afecciones del pecho. En la medicina tradicional, la resina se unta en heridas, úlceras y para curar enfermedades cutáneas. En el bosque no recibe ningún manejo, sin embargo es cultivado, a lo largo de cuerpos de agua para estabilizar las orillas y bordes de canales (Flores-Rodríguez, 1992). Es recolectado principalmente para uso doméstico, su aprovechamiento se hace cortando con machete la parte de interés, en el momento requerido. En el caso de la resina, se extrae mediante incisiones en el fuste o ramas, e incluso en los conos tiernos. Probablemente se debiera sujetar a la NOM-007-RECNAT-1997, que regula el aprovechamiento de ramas, hojas, flores, frutos y semillas. Rara vez es atacado por plagas y es especialmente resistente al piojo de la madera, causante de la muerte en los tejos, cedros y pinos (Sarmiento-Fradera, 2000).

Hay siete especies de aves (palomas, gorriones, milanos, sinsonte, etc.) y dos de abejas que anidan en el árbol (Dinets, 2003).

TABLA 2. Cuadro comparativo de las especies de *Taxodium* (Martínez, 1963; Kupchan *et al.*, 1968; Bucholtz *et al.*, 1985; Watson, 1985; Flores-Rodríguez, 1992; Perusquia *et al.*, 1995; Dorado *et al.*, 1996).

	<i>Taxodium mucronatum</i> Tenore, 1853.	<i>Taxodium distichum</i> (Linnaeus) L.C. Richard, 1810.	<i>Taxodium ascendens</i> Brongniart.
Nombre común	Ahuehuete, ciprés, pénjamo, sabino, ciprés Montezuma, ciprés mexicano, árbol del Tule, yagaguichicifña.	Ciprés calvo Ciprés de los pantanos Ciprés, ciprés del sur, Ciprés rojo, amarillo, blanco Ciprés de marea o del Golfo.	Ciprés de estanques Ciprés negro Ciprés
Sinonimias	<i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich. var. <i>mucronatum</i> (Ten.) A. Henry 1906 <i>Taxodium distichum</i> Kunth 1817 non Rich. 1810 <i>Taxodium mexicanum</i> Carriere 1855 <i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich. var. <i>mexicanum</i> (Carr.) Gordon 1858 <i>Taxodium mucronatum</i> var. <i>mexicanum</i> (Carriere) Gordon <i>Cupressinata mexicana</i> (Carr.) J. Nelson 1866	<i>Cupressus disticha</i> Linnaeus 1753 <i>Cupressus laeta</i> Salisb. 1796. <i>Schubertia disticha</i> (L.) Mirb. 1825. <i>Cupressinata disticha</i> (L.) J. Nelson 1866. <i>Cupressus disticha</i> L. var. <i>patens</i> Aiton 1789. <i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich. var. <i>patens</i> (Aiton) Sweet 1827. <i>Taxodium sinense</i> J. Forbes var. <i>pendulum</i> J. Forbes 1839. <i>Glyptostrobus pendulus</i> (J. Forbes) Endl. 1847. <i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich var. <i>pendulum</i> (J. Forbes) Carr. 1867. <i>Taxodium sinense</i> Nois. ex Gordon 1858 non J. Forbes 1839. <i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich. var. <i>nutans</i> Carr. 1867 non Sweet 1827.	<i>Cupressus disticha</i> Linnaeus var. <i>imbricaria</i> Nuttall 1818. <i>Taxodium ascendens</i> Brongn. <i>Taxodium distichum</i> var. <i>nutans</i> (Aiton) Sweet
Distribución	Del sur de Texas, México (Durango, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, etc.) hasta Guatemala.	Estados Unidos (planicies del sur de Delaware, sur de Florida, planicie costera baja del Golfo y sureste de Texas), México y Guatemala.	Sureste de Virginia al sur de Florida y sureste de Louisiana.
Variedades	Considerada por algunos autores subespecie de <i>T. distichum</i> L. Rich.	Dos variedades: <i>Taxodium distichum</i> var. <i>Nutans</i> (Aiton) Sweet y <i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i> (Nuttall) Croom.	Algunos autores lo reconocen como una especie distinta mientras que, otros como la variedad o ecotipo <i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i> (Nutt.) Croom.
Dimensiones Promedio	De gran talla y muy longevos. 30 a 40 (50) m de alto, troncos más masivos con 42 m en su exponente más antiguo.	De gran talla y longevos. 50 m alto, tronco de 4 m de diámetro.	Altos y no muy longevos. 30 m de altura, tronco de 2 m de diámetro.

	<i>Taxodium mucronatum</i> Tenore, 1853.	<i>Taxodium distichum</i> (Linnaeus) L.C. Richard, 1810.	<i>Taxodium ascendens</i> Brongniart.
Fuste	Amplio, con bi o trifurcaciones, corteza pardo grisácea a morena rojiza.	Grueso, poco ramificado y alargado, de café rojizo oscuro a café claro con hendiduras ligeras.	Grueso y muy abultado y no ramificado, café oscuro u grisáceo, con madera muy gruesa.
Estructuras en la base del tronco	Escasos los neumatóforos u "rodillas".	Presenta más rodillas con la edad.	Tiene menos rodillas, más cortas y redondas que en <i>T. distichum</i> .
Corona	Frondosa, irregular y abatida	Cónica en individuos jóvenes y frondoso e irregular y muy ramificada con la edad.	Piramidal
Hojas	Con terminación en punta o mucron 12-15 mm.	Aleznadas 5-17 mm.	Muy aleznadas 3-10 mm.
Follaje	Deciduo de las ramas cortas, y persistente de las leñosas. De mayor persistencia que <i>T. distichum</i> .	Deciduos	Algunas ramas deciduas otras no.
Conos femeninos	1.6-2 cm largo y 1.5 de diámetro, globosos, solitarios u en grupos.	1.3-3.6 cm largo, globosos, en grupos de 2 ó 3	1-2 cm diámetro, los jóvenes son verdes, y café al madurar.
Conos masculinos	En panículos de 15-20 (30) cm de longitud.	En grupos púrpura de 7-13 cm de longitud.	En panículos de 7 a 12 cm de largo.
pH óptimo del suelo para crecer	Mayor a 7	Mayor a 5.5	Menor a 6.8
Hábitat	Requiere suelos inundados o un manto freático cercano a la superficie (ríos, manantiales, presas u arroyos).	Crece en suelos inundados estacionalmente y en márgenes de ríos. De distribución más amplia en E.U. que la variedad <i>ascendens</i> .	No crece en pantanos o junto a corrientes de agua, con poblaciones mas reducidas y sobrelapadas con <i>T. distichum</i> .
Usos	Tronco usado como leña. Resina y hojas en la medicina tradicional, son empleadas para curar úlceras, y como resolutivo, en enfermedades del pecho y bronquitis. Extractos de hoja tienen un efecto vasoactivo.	Usos diversos en la industria de la construcción. Produce taxodiona y taxodona, inhibidores de tumores.	Como madera en aserraderos y para recarga y limpieza del agua del subsuelo.

1.6.2. Relaciones filogenéticas del género *Taxodium*.

En cuanto a su clasificación, el género *Taxodium*, pertenece al grupo monofilético de las plantas con semilla, formado por cinco clados (cycadales, ginkgoales, coniferales, gnetales y angiospermae), y se ubica como un linaje relativamente tardío en las gimnospermas (Figura 6) (Soltis *et al.*, 1999).

La mayoría de los análisis moleculares que emplean diversos marcadores mitocondriales (*cox1*, *atpA*), de plastidio (*rbcL*) y nucleares (18S, 26S rDNA) apoyan la monofilia de las gimnospermas (Bowe *et al.*, 2000; Chaw *et al.*, 2000). Aunque sus relaciones filogenéticas con las angiospermas permanecen en discrepancia. Los estudios morfológicos desde tiempos de Haeckel (1894), identifican a las Gnetales (*Ephedra*, *Gnetum* y *Welwitschia*) como grupo hermano de las angiospermas (hipótesis antofita), debido a sus semillas con dos cotiledones, vasos en el xilema, gametofito femenino reducido, óvulos con dos integumentos y hojas con venación reticulada; además de la doble fertilización sin formación de un endospermo triploide, que de acuerdo con Friedman, es la principal sinapomorfia entre ambos grupos; un gran número de estudios moleculares no concuerdan con esta idea (Chaw *et al.*, 2000). Algunas, de las diversas filogenias moleculares (18S y 26S rDNA), con respecto a la posición de las Gnetales, son consistentes con la hipótesis antofita, mientras otras las colocan en la base de las plantas con semilla, o bien, como en el caso de los genes nucleares, apoyan su cercanía con las coníferas; y los provenientes de plastidios establecen una relación más estrecha con Pinaceae (Chaw *et al.*, 1997; Stefanovic *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1999; Bowe *et al.*, 2000; Rydin *et al.*, 2002; Soltis *et al.*, 2002; Nickerson y Drouin, 2004). Debido a la discrepancia de ambos estudios, la hipótesis antofita ha tendido a ser rechazada, y de acuerdo con las filogenias moleculares de gimnospermas; las Gnetales (*Gnetum* y *Welwitschia*), no son grupo hermano a las angiospermas, pero son cercanas a las coníferas. Actualmente, se considera a los arbustos monotípicos de Nueva Caledonia, la familia Amborellaceae, como grupo hermano a todas las angiospermas, seguido de Nymphaeales (lirios acuáticos), Austrobaileyaceae y Trimeniaceae, e Illiciaceae y Schisandraceae (Illiciales) (Qiu *et al.*, 1999; Chaw *et al.*, 2000).

Estudios recientes ubican a las cícadas (Cycadales) y *Ginkgo* (Ginkgoales), que forman el clado cícadas-*Ginkgo*, como linajes tempranos dentro de las gimnospermas y hermanos a las Gnetales y coníferas (Figura 6) (Leitch *et al.*, 2005). En las Coniferales, las Pinaceae representan la familia ancestral, seguida de Araucariaceae-Podocarpaceae-Phyllocladaceae, y Sciadopityaceae (grupo externo a Taxodiaceae y Cupressaceae) (Chaw *et al.*, 1997, 2000; Qiu *et al.*, 1999). La relación estrecha de Pinaceae con Gnetales ha tenido más aceptación, debido a que en la arquitectura del genoma del cloroplasto, ambos grupos carecen de los genes *ndh*, así como, de 3 pb en su rDNA espaciador (*cpITS*). Análisis de secuencias de *cpITS*, no han mostrado una relación de

parentesco entre angiospermas y gnetales, por lo cual las similitudes morfológicas se consideran como homoplasias (Chaw *et al.*, 2000; Burleigh y Mathews; 2004).

Por más de un siglo, la clasificación de las coníferas, propuesta por Pilger (1926) se mantuvo a nivel de familia. Él reconoció como familias separadas, a Cupressaceae *sensu stricto* y Taxodiaceae, con base en diferencias de su follaje (Gadek *et al.*, 2000). Las Cupressaceae *s.s.*, tienen cuatro hojas opuestas, escamosas o lineares y verticiladas, mientras que en Taxodiaceae son dos hileras de hojas lineares, alternas, dispuestas en espiral (excepto en *Metasequoia* que son opuestas y en *Atrhotaxis* en forma de escama). Por otro lado, existen numerosas similitudes (y sinapomorfías posibles), que unifican ambas familias: la fusión de las escamas del cono con las brácteas, alas laterales de las semillas derivadas de su cubierta, dos o más microsporangios por microsporófila; más de dos semillas por escama ovulífera, muda anual de ramas pequeñas, arquegonios agrupados, granos de polen sin alas, escamas peltadas en los conos y secuencias de DNA (Brunsfeld *et al.*, 1994; Judd *et al.*, 2000). Para tratar de esclarecer las relaciones entre ambas familias, si deben o no ser consideradas como una sola, alineaciones de secuencias de *rbcL*, 28S rRNA, y polimorfismos de cloroplasto (PCR-RFLP), de diversas especies (entre ellas *T. distichum*), señalan que Taxodiaceae y Cupressaceae *s.s.* forman un linaje monofilético en las coníferas, y pueden tratarse como una sola familia llamada Cupressaceae, con el género *Sciadopitys* (a menudo clasificada dentro de las Taxodiaceae) de hojas y ramillas cortas, en una familia monotípica distinta (Sciadopityaceae). Además, especulan que los linajes principales de Taxodiaceae divergieron primero, y las Cupressaceae *s.s.* son menos antiguas, es decir, entre las gimnospermas, representan los grupos de aparición más reciente (Chaw *et al.*, 1997; Gadek *et al.*, 2000; Kusumi *et al.*, 2000).

El tamaño del genoma en las gimnospermas, es mayor que en las angiospermas (excepto Gnetales que es similar al de angiospermas). Dentro de las coníferas, Pinaceae posee el genoma más grande, seguido de las familias Sciadopityaceae y Cefalotaxaceae (Leitch *et al.*, 2005). De acuerdo con los estudios cariológicos de Khoshoo (1961, 1962), el estado ancestral en cuanto al número de cromosomas en las coníferas parece ser $n=12$, el cual se preserva en Pinaceae, Cephalotaxaceae, *Taxus*, y *Ginkgo*; mientras la condición más derivada la representan con: $n=11$, en *Torreya*, Cupressaceae y

Taxodiaceae; n= 10, en *Sciadopitys* y n= 7 en *Amentotaxus*. Esta tendencia a la reducción en el número de cromosomas, correlaciona con filogenias generadas a partir de secuencias de 18S rRNA (Figura 7), que muestra a las Pinaceae como grupo externo al resto de las coníferas, connotando el estado ancestral de la familia y la reducción cromosómica en los clados terminales Sciadopityaceae-Taxaceae-Cephalotaxaceae-Taxodiaceae-Cupressaceae (Chaw *et al.*, 1997).

En el taxa de las Taxodiaceae, se distinguen dos clados: el Sequoiodeae identificado por Brunsfeld *et al.* (1994) y el Taxodioideae, reconocido por Endlicher (1847) y corroborado por Liu y Su (1983) (Gadek *et al.*, 2000).

Taxodium, *Glyptostrobus* y *Cryptomeria* forman el clado Taxodioideae, con óvulos erectos, en el cual *Glyptostrobus* y *Taxodium* ambos deciduos, están cercanamente relacionados y son grupo hermano de *Cryptomeria* (Li y Yang, 2003). *Sequoia*, *Sequoiadendron* y *Metasequoia* estrechamente emparentados, forman otro clado (Sequoiodeae), con *Sequoia* y *Sequoiadendron* más cercanos y como grupo hermano a *Metasequoia* (Li y Yang, 2003). *Metasequoia*, estuvo ampliamente distribuido en el Hemisferio Norte durante el Cretácico tardío y el Mioceno, rango que en la actualidad se restringe a una región aislada del oeste de China central. Su hábito deciduo pudo haber evolucionado en paralelo con el de *Taxodium* y *Glyptostrobus*. Con una sola especie, *Sequoia* (*S. sempervivens*) y *Sequoiadendron* (*S. giganteum*), están geográficamente muy limitados. *Sequoia* se restringe a las regiones costeras del norte de California y sur de Oregon y *Sequoiadendron* a las montañas centrales de California.

El colocar a la familia Taxodiaceae, como hermano a Cupressaceae *s.s.*, está de acuerdo con datos inmunológicos presentados por Price y Lowenstein (1989). Sus relaciones con el resto de los géneros que representan linajes tempranos, como es el caso de *Taiwania*, *Athrotaxis* y *Cunninghamia* permanecen sin esclarecerse (Gadek *et al.*, 2000; Kusumi *et al.*, 2000). Asimismo la monofilia de Taxodiaceae y Podocarpaceae, se disputa comúnmente, debido a su gran variación morfológica del último, como: la reducción de sus conos, escamas altamente modificadas, jugosas, brillantes y con un solo óvulo; secuencias de 28S rDNA sugieren que es grupo hermano de Araucariaceae (Judd *et al.*, 2002).

Las coníferas datan del Carbonífero (300 m.a.) y muchas familias actuales se desarrollaron en el Triásico tardío o Jurásico temprano (208 m.a.), donde dominaron el

paisaje. Actualmente permanecen en regiones frías, como en los bosques boreales de Norte America y Asia, constituyendo la vegetación dominante, y otras en el hemisferio sur (Araucariaceae, Cupressaceae *s.l.* y Podocarpaceae). Los datos basados en caracteres morfológicos y moleculares, concuerdan con la información del registro fósil, que ubican a las Cycadales y Ginkgoales en el Pérmico (270 m.a.), Pinaceae en el Cretácico (130 m.a. para el género *Pinus*), Podocarpaceae en el Triásico (245 m.a.) con algunos fósiles del Cretáceo e inclusive más recientes en el Eoceno; las Cupressaceae tienen registro fósil desde el Jurásico, la familia Taxodiaceae en el Cenozoico (Neogeno, 24 m.a.) y las angiospermas tardíamente en el Mesozoico (Albiano, 98 m.a.) (Soltis *et al.*, 1992; Conran *et al.*, 2000; Carrión y Cabezudo, 2003; Burtleigh y Mathews, 2004).

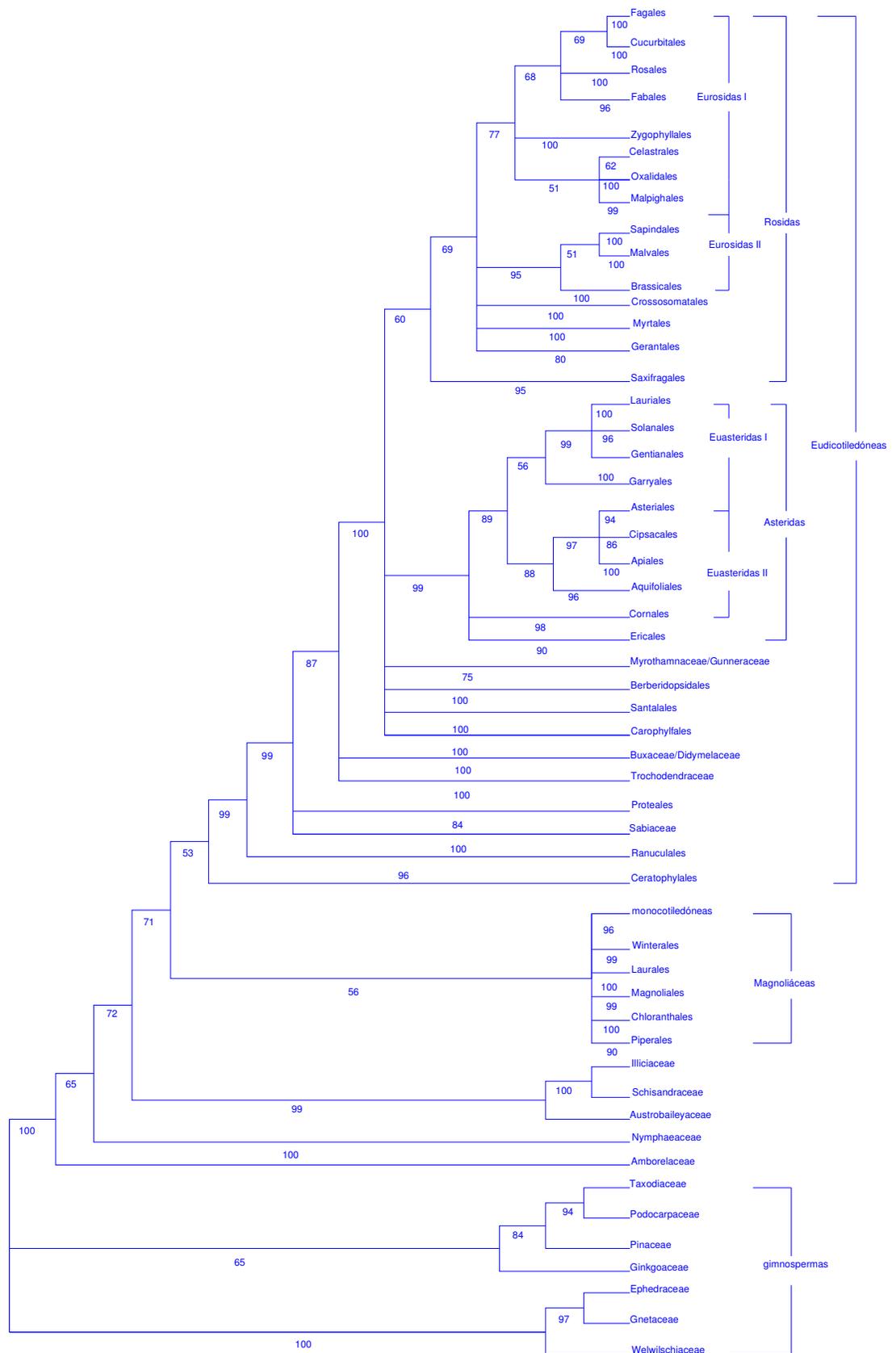


Figura 6. Relación filogenética de los diferentes grupos de angiospermas inferida mediante el análisis de rDNA 18S, los valores de bootstrap se indican en cada clado (Soltis *et al.*, 1999).

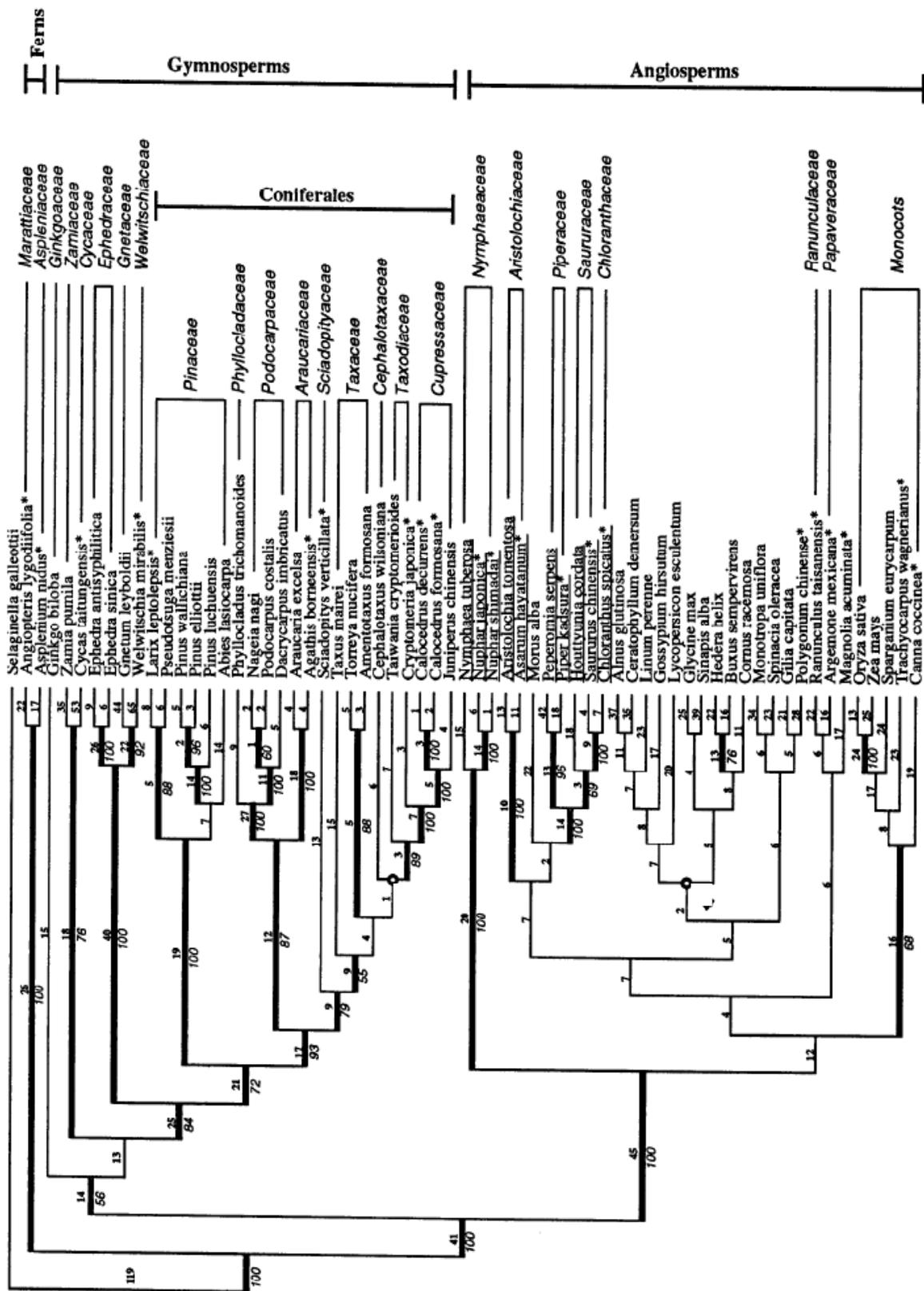


Figura 7. Arbol de máxima parsimonia, de las gimnospermas actuales. Los números superiores e inferiores en cada rama indican la longitud y valor de bootstrap, respectivamente. Las ramas engrosadas señalan la monofilia de los taxa, sustentada por valores de bootstrap mayores al 50% (Chaw *et al.*, 1997).

4. HIPÓTESIS.

- Si *Ginkgo biloba* gimnosperma, tiene gránulos de *Lacandonia*, alguna especie representante tardía del grupo contendrá estas partículas ribonucleoproteicas.
- Por lo que debe haber gránulos de *Lacandonia* en *Taxodium mucronatum*.
- Su estructura se preserva y es heredada durante la mitosis.

5. OBJETIVOS.

- Establecer si dentro del clado de las gimnospermas, alguna especie con un linaje tardío (como *Taxodium mucronatum*), no relicto, conserva los gránulos de *Lacandonia*.
- Inferir mediante un análisis detallado citoquímico ultraestructural, con contraste general y preferencial para MET, en núcleos interfásicos de *T. mucronatum*, si su composición es similar a *Lacandonia schismatica*.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Microscopía de luz.

Con el fin de realizar la exploración anatómica de *T. mucronatum*, las hojas se fraccionaron en tres regiones (apical, media y basal) y para provocar la muerte rápida del tejido, preservando en lo posible su estructura original, se fijaron fragmentos de aproximadamente 3 mm³ de hojas y brotes de *Taxodium mucronatum* en FAASO (formaldehído, alcohol, agua y ácido acético), por 48 horas a 4°C. El exceso del fijador, se eliminó con lavados de alcohol etílico al 50 % (J.T. Baker, México), tres veces por 30 minutos en cada ocasión. Para remover lentamente el agua del tejido fijado y lavado, se llevó a cabo la deshidratación con una serie de concentraciones graduales de etanol (70, 85, 96 y 100 %). El tiempo de deshidratación en cada solución, depende del tamaño de la muestra (por cada milímetro, corresponden 30 minutos), en este caso el tiempo en cada solución, fue de 3 horas. El reemplazo lento y gradual del agua por este solvente orgánico, prepara al tejido para la infiltración y lo hace miscible a solventes no polares, donde se introdujo un material solidificable para conferir firmeza al tejido y facilitar la ejecución de cortes uniformes. La infiltración progresiva, se llevó a cabo con una mezcla xilol-paraplast en proporción 2:1 por 6 horas, posteriormente en 1:1 por 14 horas y finalmente en 1:2 por 6 horas, las muestras se mantuvieron en una estufa a una temperatura entre 58 y 60 °C, para que el paraplast substituya al xilol mientras éste es evaporado. Por último, la inclusión se realizó en paraplast puro (Paraplast, McCormick Scientific PA, EUA), durante 24 horas como mínimo, conservando las muestras en la estufa.

Se elaboraron soportes de cartulina de 6.5 cm de largo x 4.7 cm de ancho, de acuerdo a López-Curto *et al.* (1998), donde se vaciaron las muestras incluidas en paraplast. El tejido se colocó hacia el fondo de la caja y con ayuda de unas pinzas de disección, se orientó rápidamente antes de la solidificación del paraplast (cuando esto ocurrió, se calentó levemente la aguja de disección, para sumergirla sin resistencia, evitando quemar el tejido). Una vez solidificados los bloques, fueron montados en soportes de madera, nuevamente con la aguja de disección caliente, se roza el extremo contrario donde se ubica la muestra y se pone en contacto rápidamente con el soporte, al cual se adhiere al enfriar. Los bloques fueron tallados con navajas de excelente filo (Gillette), en el extremo de corte (donde se colocó el tejido), procurando formar una

pirámide regular de base plana. Una vez montados, en el micrótopo de rotación (RM2135, Leica), se realizaron cortes de 10 a 20 micras de espesor. La serie de cortes, se colocó (por escasos segundos), en un baño de flotación (agua a 40 ó 50° C que contenía un poco de grenetina que sirve como adhesivo), para ser montados en un portaobjetos de vidrio jalándolos suavemente hacia él. La remoción del paraplast se llevó a cabo en una estufa a 50 °C, por 5 minutos y el exceso se extrae sumergiéndolos por 3 minutos en xilol (J.T. Baker, México), reemplazandolo en cada ocasión. La rehidratación del tejido se realizó en una serie de etanoles al: 100% (2 cambios), 96%, 70, 50 %, 30% y agua (hasta llegar a la concentración del solvente en que está preparado el colorante). Algunos cortes fueron teñidos con safranina-verde rápido como lo describe López-Curto *et al.* (1998), y con una solución de DAPI. La técnica de tinción doble safranina-verde rápido, así como la preparación del medio de montaje, se realizó de acuerdo a los anexos 6 y 7 de López-Curto *et al.* (1998).

6.2. Cortes en fresco.

Se seccionaron varias hojas de *Taxodium mucronatum* a mano y, fueron aclaradas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6%, teñidas con azul de toluidina y fucsina básica amoniacal (J.T. Baker, México). Mediante diversos tipos de iluminación (polarización, contraste de fases y Nomarski), se observó su contenido celular, en un microscopio de campo claro y epifluorescencia Nikon E-800.

6.3. Microscopía de epifluorescencia. APOTOME (Carl-Zeiss).

Los cortes semifinos, preparados para microscopía de luz de 20 µm fueron teñidos con una solución 1:15 de DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol dimetil sulfoxido) / TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20), por tres minutos y montados con el medio específico para DAPI almacenado a 4° C, provisto por el fabricante (Vectashield de Vector, Burlingame, CA).

La estructura de la cromatina, se analizó en un microscopio de epifluorescencia con sistema APOTOME (Carl-Zeiss), gentilmente provisto por Carl-Zeiss de México. Este sistema, genera cortes ópticos de material fluorescente de manera similar a un microscopio confocal, pero no utiliza como fuente de iluminación un rayo láser, sino una lámpara de mercurio de excitación amplia (HBO 340 a 700 nm) y una cámara

monocromática de alta sensibilidad con sistema de enfriamiento Peltier de Carl-Zeiss (AxioCam MRm Rev. 2). Las imágenes fueron obtenidas con ayuda del software AxioVision 4D (Carl-Zeiss).

6.4. Microscopía electrónica.

Secciones de hoja de 1 mm³, de individuos jóvenes y del árbol del Tule (de aproximadamente 2 000 años de edad), de la localidad de Santa María del Tule Oaxaca, México se fijaron a temperatura ambiente, en una solución de glutaraldehído al 6% y amortiguador PBS (pH 7), por 4 días (en el individuo de Oaxaca, y un día para los jóvenes). Para lograr la estabilidad de la membrana plasmática, algunas fueron postfijadas por 24 horas en tetraóxido de osmio al 1%. Este se eliminó lavando con PBS 6 veces por 10 minutos. La deshidratación fue gradual, en una serie de etanoles (50, 70, 80, 90, 96 y 100%), de 5 minutos en cada ocasión hasta la solución del 96 % y tres lavados de 5 minutos en la solución de etanol absoluto. Posteriormente, se lavó 3 veces, con óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) por 5 minutos para proceder a la preinclusión, realizada toda la noche en una mezcla de óxido de propileno-epon (1:1) y (1:2), seguido de una evaporación a temperatura ambiente. Para finalmente ser incluidas en epon de dureza media (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). La resina (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) se vacía en moldes de plástico previamente etiquetados y el tejido es orientado (con ayuda de un alfiler) para el corte y se colocan en una estufa a 60° C para su polimerización (de 24 a 48 horas). Los bloques son tallados cuidadosamente, se esculpe una pirámide cuya base es elaborada lentamente con el ultramicrotomo (Ultracut-R, Leica Microsystems). La obtención de cortes de excelente calidad se realiza con cuchillas de filo de diamante o vidrio (LKB Instruments, Londres).

Para la formación de la imagen del material biológico en las condiciones habituales de la microscopía electrónica de transmisión convencional, se requiere de la dispersión de electrones en ángulos grandes, por lo cual los cortes ultrafinos de hoja, fueron contrastados con elementos de elevado número atómico, para incrementar las interacciones elásticas. El contraste general uranilo-plomo (Hayat, 1975) y el procedimiento preferencial para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1979), se realizaron en cortes de 60-90 nm de grosor. En una cámara húmeda con hidróxido de sodio (Técnica química, México), se flotan los cortes por 20 minutos, en una solución al 5% de acetato

de uranilo (E. Merck, Darmstadt) que se une a las desoxirribonucleoproteínas; las rejillas son lavadas con el goteo de agua destilada. En un segundo paso, se flotan en una solución de EDTA (ácido etilendiamino tetracético) 0.2 M en agua destilada pH 7, por 18 min, para remover preferencialmente el metal de la cromatina, nuevamente se enjuaga con goteo y se secan a temperatura ambiente cubriéndolas en una caja de petri. Se tiñen con citrato de plomo 0.3 % (E. Merck, Darmstadt) por 10 minutos, se lavan y secan; procedimiento que incrementa el contraste de las ribonucleoproteínas mientras que la cromatina aparece con escaso o sin contraste. Los cortes teñidos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL (1010) operando a 100 kV.

6.5. Microscopía de fuerza atómica.

Para el análisis *in situ* de las muestras de *T. mucronatum*, los cortes semifinos de 250 nm de espesor, obtenidos a partir del material preparado para microscopía electrónica, fueron colocados en un portaobjetos de vidrio y analizados sin tinción, en un Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) BioScope equipado con un controlador NanoScope IIIa, trabajando en modo de contacto, con una punta de nitruro de silicio de 20 a 60 nm de radio de curvatura. El microscopio abarcó áreas de escaneo de hasta 14.82 μm^2 . Las imágenes se generaron con ayuda del software Proscan (versión 3.1 Park Scientific, 1997). El MFA, pertenece a la tercera generación de microscopios denominados generalmente de barrido por sonda. El cual emplea una punta de silicio que explora directamente la superficie de la muestra, mediante un barrido mecánico que emplea materiales piezoeléctricos, que se contraen al pasarles corriente. La punta se monta en un brazo cuyos sus pequeñísimos movimientos se amplifican por la incidencia y reflejo de un haz láser. Los sensores registran la distancia de los desplazamientos del haz, los cuales son enviados a un ordenador y producen una imagen topográfica del espécimen a escalas nanométricas.

6.6. Análisis de imágenes.

Las imágenes generadas por MET y MFA, fueron analizadas con el programa Carnoy Versión 2.0 (<http://www.carnoy.org>).

7. RESULTADOS.

7.1. Reconocimiento anatómico.

Mediante cortes seriados se llevó a cabo la exploración anatómica de la hoja de *T. mucronatum*, que posteriormente permitió reconocer el material al microscopio de fuerza atómica.

En cortes transversales de hoja de *Taxodium mucronatum*, se distinguen los siguientes elementos:

Su cutícula es menuda. La epidermis, compuesta por células uniformes de paredes delgadas, no lignificadas, es interrumpida en la cara adaxial por dos hileras de estomas, y en la cara abaxial por cinco o seis a cada lado de la cresta. Las hojas presentan caracteres xeromórficos, como: estomas hundidos y criptas estomáticas. Algunos estomas se disponen paralelos, y otros perpendiculares al eje de la hoja.

La subepidermis es escasa, pues solamente se distinguen unas cuantas células en la región media superior, extremos laterales e inferior.

Con respecto a la distribución del parénquima en empalizada y esponjoso, la hoja de *Taxodium mucronatum* es de tipo bifacial dorsiventral. El parénquima en empalizada con abundantes cloroplastos, constituido por dos capas de células alargadas, se ubica en la cara adaxial. Debajo de este parénquima, se observa un tejido con células irregulares de contorno sinuoso que corresponden al parénquima esponjoso, también denominado “tejido lagunoso” (Martínez, 1963). La tinción con verde rápido, indica que en sus paredes predominan componentes básicos y no lignificados; la safranina algo inespecífica resalta el contenido celular, con escasos taninos condensados de color rojo violáceo, así como algunos núcleos y nucléolos. El citoplasma se tiñe de color verde o verde violáceo y es ácido en el parénquima en empalizada. Hay un solo canal resinífero delimitado por sus células secretoras, que es central, situado en la cara abaxial, en la región de la cresta (Figura 8).

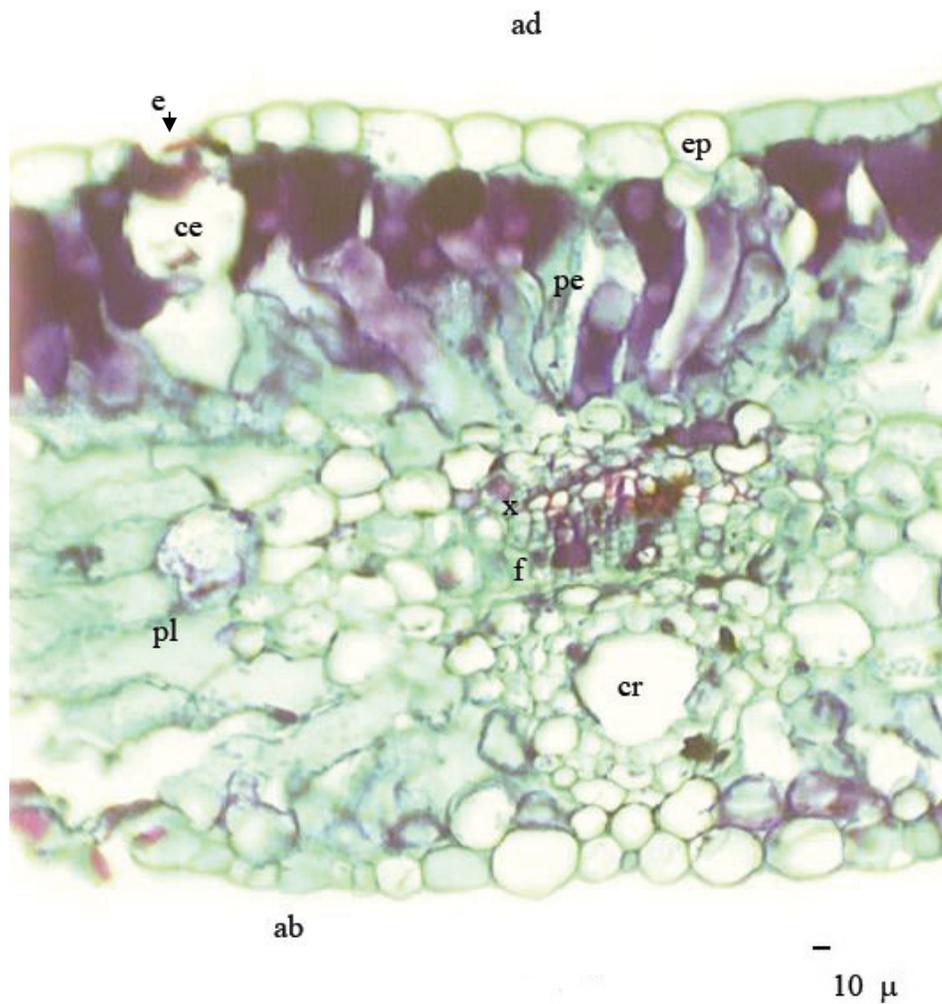


Figura 8. Corte transversal de hoja de *Taxodium mucronatum*, safranina-verde rápido, campo claro. Ep, epidermis; ad, cara adaxial; ab, cara abaxial; cr, canal resinífero; x, xilema; f, floema; pe, parénquima en empalizada; pl, parénquima lagunar; e, estoma; ce, cripta estomática.

En cortes en fresco, sin teñir, después de eliminar el alto contenido de cloroplastos, se evidenciaron sus componentes celulares, mediante distintas técnicas de microscopía fotónica. Polarización, contraste diferencial de interferencia (Nomarski) y de fases (Davidson y Abramowitz, 2006).

La luz plano polarizada, revela la birrefringencia del espécimen en las paredes celulares, y cristales de oxalato de calcio de tipo poligonal, anisotrópicos, particularmente abundantes en el parénquima en empalizada y escasos en el lagunoso. Los taninos presentan un comportamiento óptico isotrópico (Figura 9a) (Wood, 1997; Stoiber y Morse, 1994).

Por contraste diferencial Nomarski, los taninos condensados, se hacen visibles; ubicados solamente en las células que rodean al único canal resinífero (Figura 9b, c). Se aprecia un pseudorelieve en el canal central y remanente de cloroplastos del parénquima en empalizada, debido a la exageración óptica basada en el grosor del espécimen, no resulta muy útil para una medición real de su elevación y profundidad (Figura 9b).

En contraste de fases de interferencia destructiva, se tornan aparentes taninos de menor diámetro únicamente en las células del borde del canal central (Figura 9c).

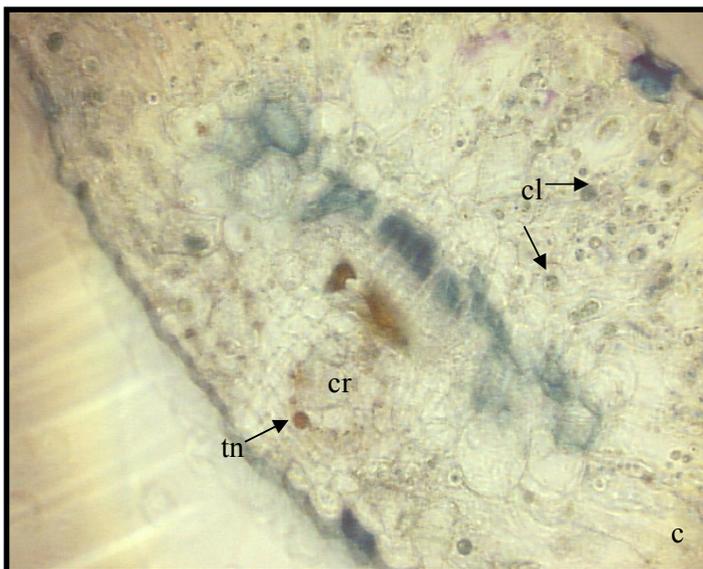
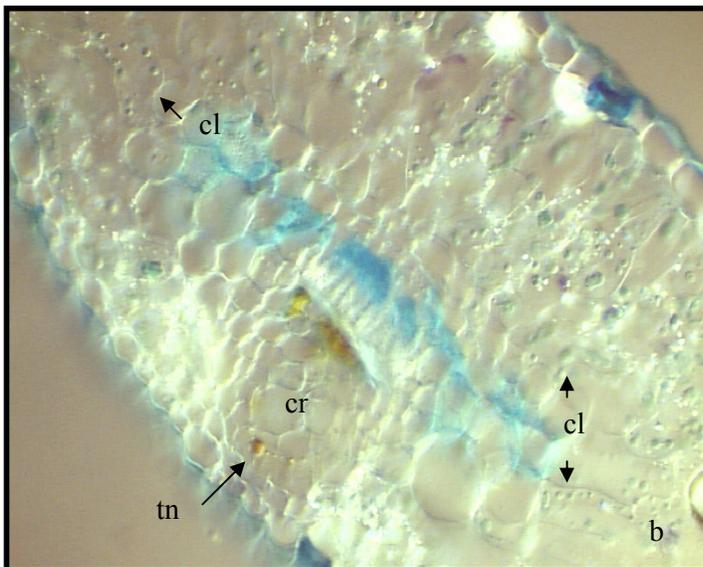
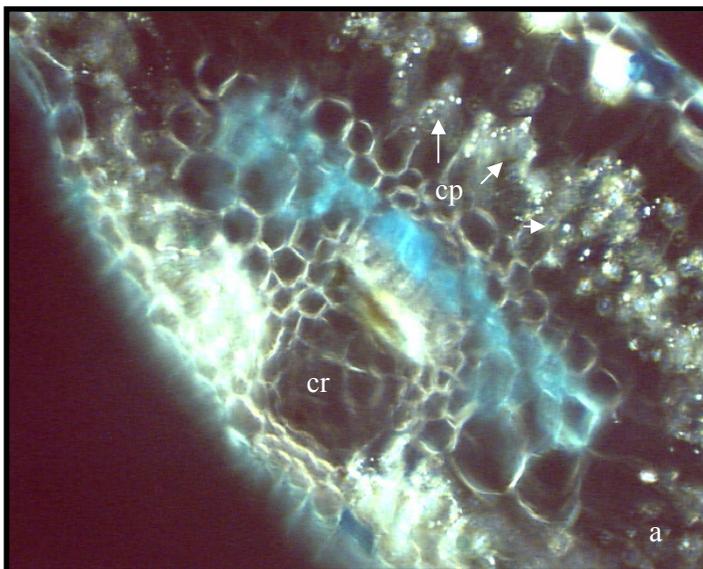


Figura 9. Cortes transversales en fresco, de hoja de *Taxodium mucronatum*. Microscopía de polarización (a), Nomarski (b) y contraste de fases (c). cl, cloroplasto; cr, canal resinífero; tn, tanino o taninos condensados; cp, cristal poligonal.

7.2. Estudio de la estructura de la cromatina, por epifluorescencia, con el sistema APOTOME, MET y MFA.

- Epifluorescencia y sistema ApoTome (Carl-Zeiss).

Por epifluorescencia convencional y contraste de fases, con filtro de emisión amplio (310 a 461 nm), para DAPI, en cortes de 20 μm de espesor; no se discierne fielmente la estructura nuclear del DNA, debido a los haces de luz reflejada provenientes de planos focales por arriba y debajo del plano principal, que disminuyen el contraste y definición de la imagen (Figura 10a). Sin embargo, al utilizar la iluminación estructurada (“grid projection”) del sistema ApoTome de Carl-Zeiss, con filtros de excitación (353 a 367 nm) y emisión (450 nm), estrechos para DAPI y el software AxioVision 4D (Carl-Zeiss); se puede observar en un corte óptico del núcleo en la región del mesófilo, una estructura continua en forma de red (Figura 10b y 11), de la cromatina en interfase de *T. mucronatum*.

Con la iluminación estructurada del sistema ApoTome (Carl-Zeiss), se realizaron diversos cortes ópticos, de excelente contraste y resolución a lo largo del eje óptico Z (Figura 12). Partiendo de un plano focal central (F) del núcleo, cinco cortes ópticos hacia arriba (E-A) y cuatro hacia abajo (G-I). La cromatina en núcleos interfásicos de *T. mucronatum*, conservan su estructura compacta y reticulada en cada plano focal. Bandas finas y gruesas del DNA, se unen con la cromatina compacta de forma continua, para estructurar una red. Excepto en las regiones del nucléolo, en algunos cortes se aprecia con un objetivo de elevada resolución (63x/1.4), una banda estrecha de DNA que parece introducirse en él (D, C), posiblemente en este plano focal se ubica con microscopio óptico, la cromatina perinucleolar; conforme se obtienen otros planos focales se observa que el resto de la cromatina tiende a rodearlo (B, J). Existe un canal ribonucleoproteico que comunica ambos nucléolos en telofase (H, J e I). Los pequeños espacios no tan redondeados como los del nucléolo, entre las bandas de cromatina, corresponden a sitios ricos en ribonucleoproteínas (Figura 12).

Una vez obtenidos los diferentes cortes ópticos, se realizó la construcción tridimensional (3D) del espécimen, con un despliegue real de las estructuras en el contexto espacial, es decir, la forma observada ya no es debida a una exageración óptica, donde se corrobora la continuidad de la cromatina a lo largo del nucleoplasma (Figura 13).

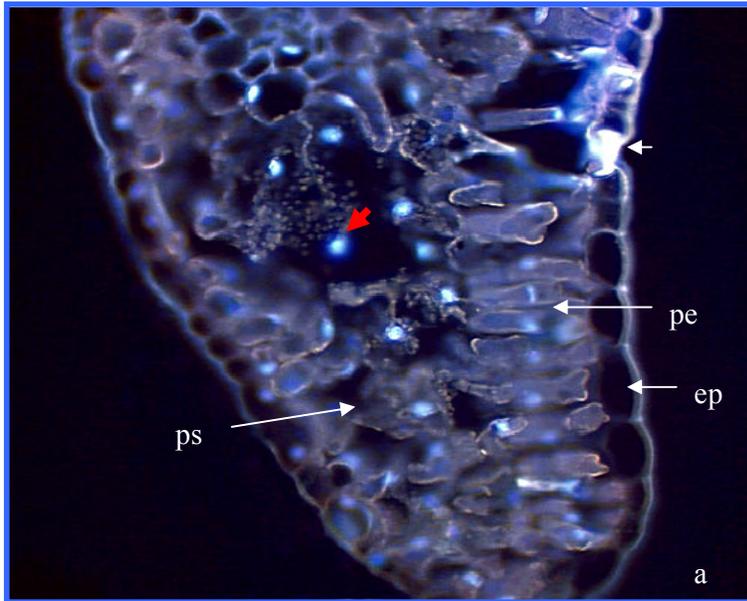


Figura 10a. Corte transversal de hoja de *Taxodium mucronatum* teñido con DAPI, contraste de fases e iluminación por epifluorescencia. ps, parénquima esponjoso; e, estoma; ep, epidermis; pe, parénquima en empalizada. La flecha roja indica un núcleo de la región del mesófilo. Barra 10 μm .

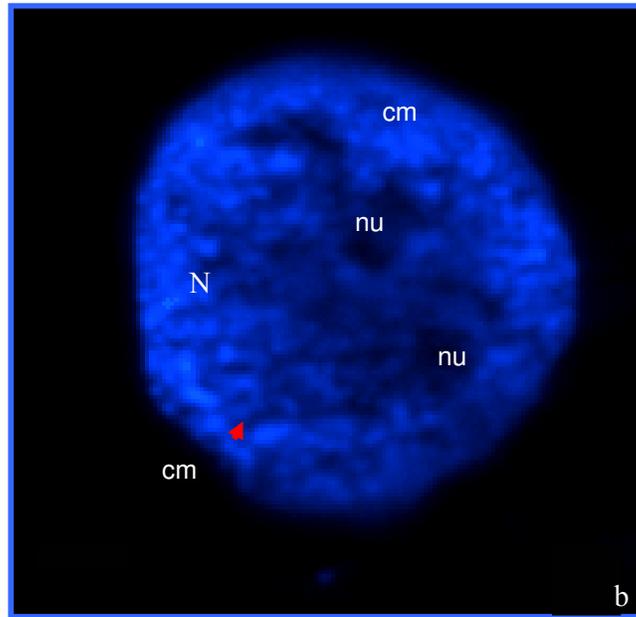


Figura 10b. Núcleo del mesófilo de *T. mucronatum*, observado con iluminación estructurada, del sistema ApoTome (Carl-Zeiss). La alta resolución del núcleo en interfase muestra un arreglo en forma de red, de la cromatina compacta. N, núcleo; nu, nucléolo; cm, cromatina compacta. Barra 2 μm .

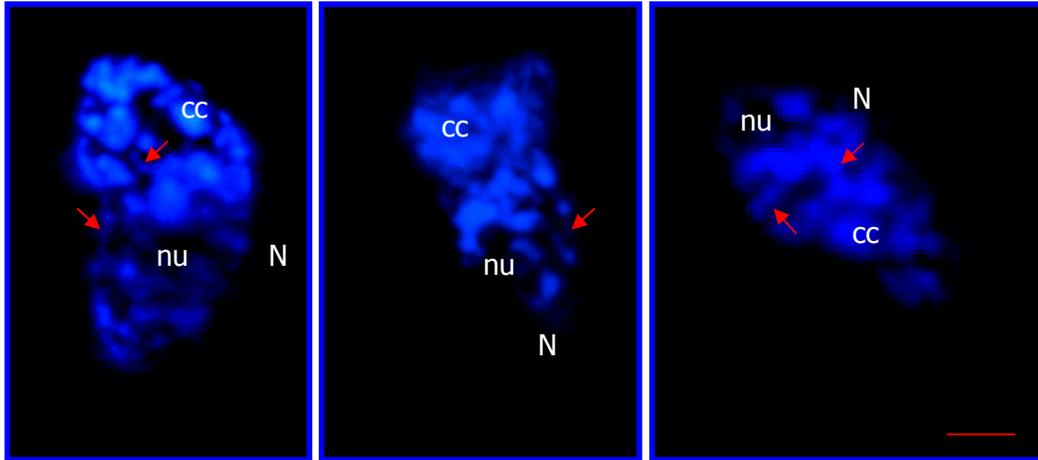


Figura 11. Tres observaciones independientes de núcleos en telofase de *T. mucronatum*, teñidos con DAPI y empleando el sistema ApoTome (Carl-Zeiss). En la cromatina compacta, se nota una estructura de bordes irregulares, interconectada por finas bandas de DNA (flechas rojas). Los espacios dentro del núcleo no teñidos, corresponden al nucléolo rico en RNAs. N, núcleo; cc, cromatina compacta; nu, nucléolo. La flecha señala algunas conexiones entre las hebras de cromatina. Barra 2 μm .

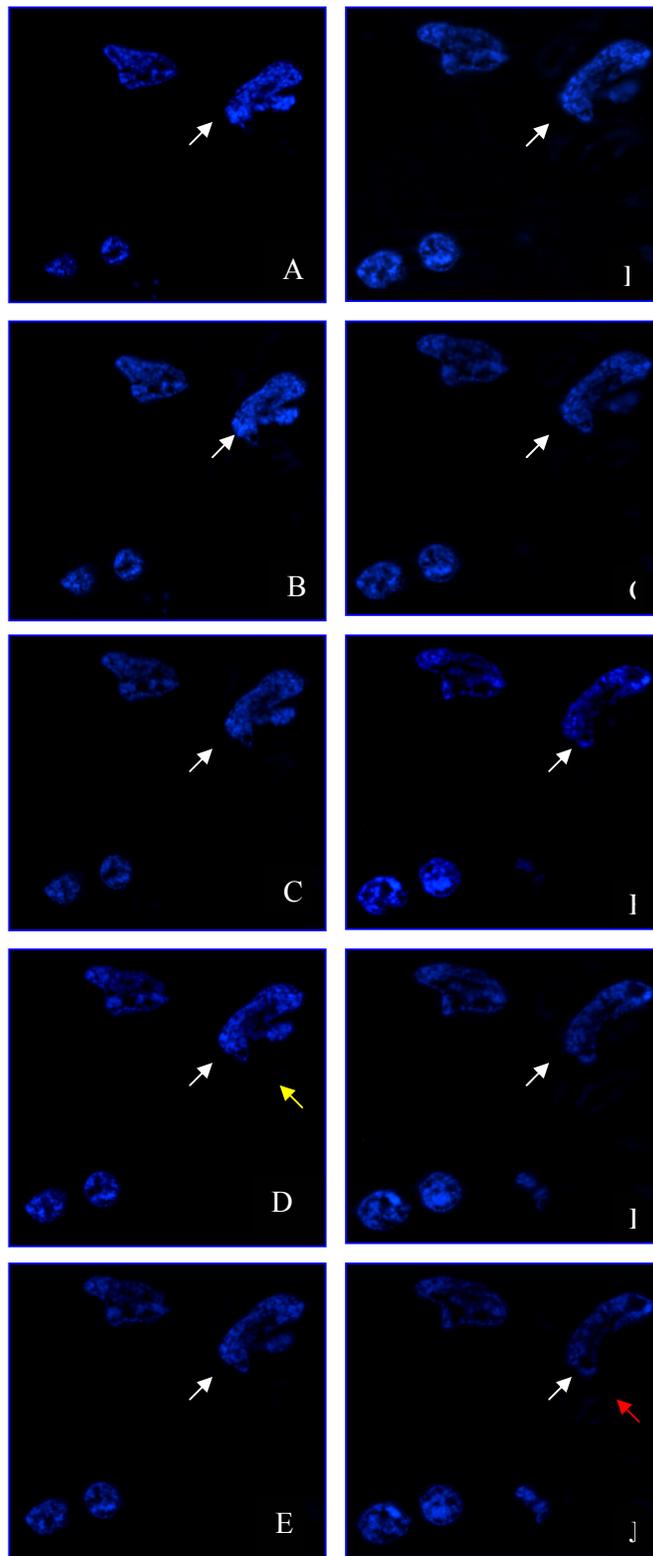


Figura 12. Serie de diez cortes ópticos en un corte de 20 μm de espesor, de núcleos en interfase de hoja de *T. mucronatum*, teñidos con DAPI y visualizados en un microscopio con sistema ApoTome (Carl-Zeiss), 63 X. La flecha blanca indica un núcleo en telofase, el cual es reconstruido posteriormente, la roja, el canal ribonucleoproteico y en amarillo una banda fina de DNA en el nucléolo.

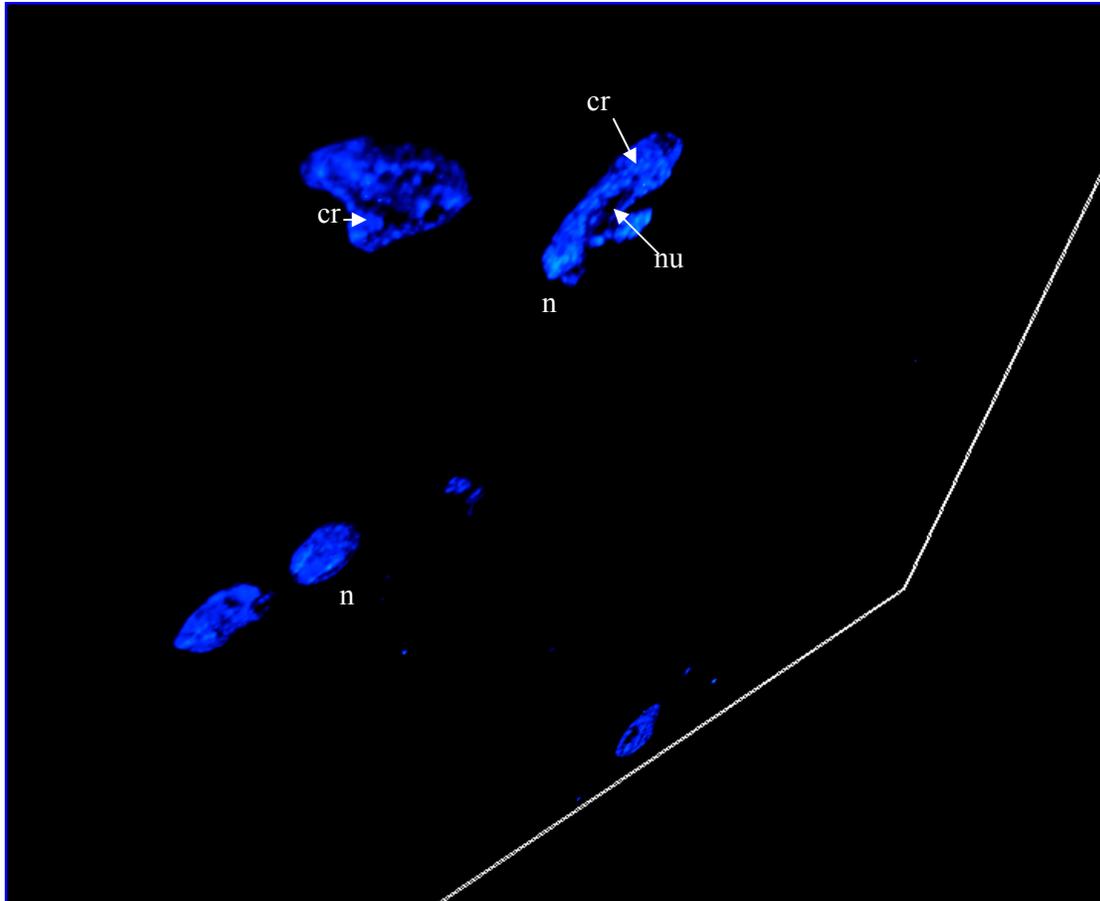


Figura 13. Reconstrucción tridimensional de los núcleos de *T. mucronatum* con ayuda del software AxioVision 4D (Carl-Zeiss). 63 X. En los núcleos (n), se observan hebras de cromatina continua, de diferente espesor, unidas por depresiones estrechas de DNA, que forman un patrón reticulado de la cromatina (cr). Las zonas oscuras dentro de la red, corresponden al nucléolo (nu) regiones ricas en RNAs.

- Microscopía de fuerza atómica.

La caracterización anatómica previa, fue de utilidad al escanear con el MFA (microscopio de fuerza atómica), los diversos cortes sin tinción. Tal que, la punta de nitruro de silicio, se dirigió hacia zonas cercanas a estructuras parecidas a paredes celulares, puesto que observaciones previas, indicaron que los núcleos se ubican en su mayoría, hacia la periferia de la célula vegetal, referencia muy útil al buscar en escalas nanométricas, ya que es algo parecido a tratar de encontrar una barquilla (núcleo) en el Golfo de México (citoplasma).

Por medio del MFA, se obtuvo, la resolución directa de la textura y topografía de núcleos en interfase de hojas provenientes del árbol más frondoso de México, *T. mucronatum*. En secciones no teñidas de 250 nm de espesor, en modo de contacto, fue posible analizar con mayor resolución vertical y horizontal, la superficie de la cromatina. Su topografía presenta elevaciones amplias y redondas de $1.5 \mu\text{m}^2$ y estrechas de $0.5 \mu\text{m}^2$ de diámetro en imágenes de $174.24 \mu\text{m}^2$. Algunas de éstas “mesetas” son alargadas, y se unen con las de aspecto redondo, para formar una red de espesor y profundidad discontinuos. Su apariencia es de una hebra retorcida, en ocasiones su arquitectura simula “donas” con segmentos esféricos, pequeños, de cromatina en la parte central (Figura 14, asterisco). Entre la red existen zonas de mayor depresión no ocupadas por material desoxirribonucleoproteico (Figura 14, región naranja). Puesto que su morfología nuclear, es similar a la obtenida por el sistema ApoTome (con tinción específica para DNA); las depresiones pueden corresponder a zonas ricas en material ribonucleoproteico no visibles a este aumento.

No obstante, en la periferia, se aprecian pequeñas esferas que parecen emerger de la cromatina. Posiblemente representan estructuras laxas de DNA u RNA que se extienden hacia la región intercromatiniana (Figura 14, flecha blanca).

En la imagen los tonos blancos a amarillo indican una topografía elevada mientras que las más oscuras a naranja representan regiones de mayor profundidad.

Las paredes celulares de *Taxodium mucronatum*, no son tan prominentes como en las células del tegumento de *Lacandonia schismatica* (Jiménez-García y Fragoso-Soriano, 2000), contrario a los espacios intercelulares muy evidentes.

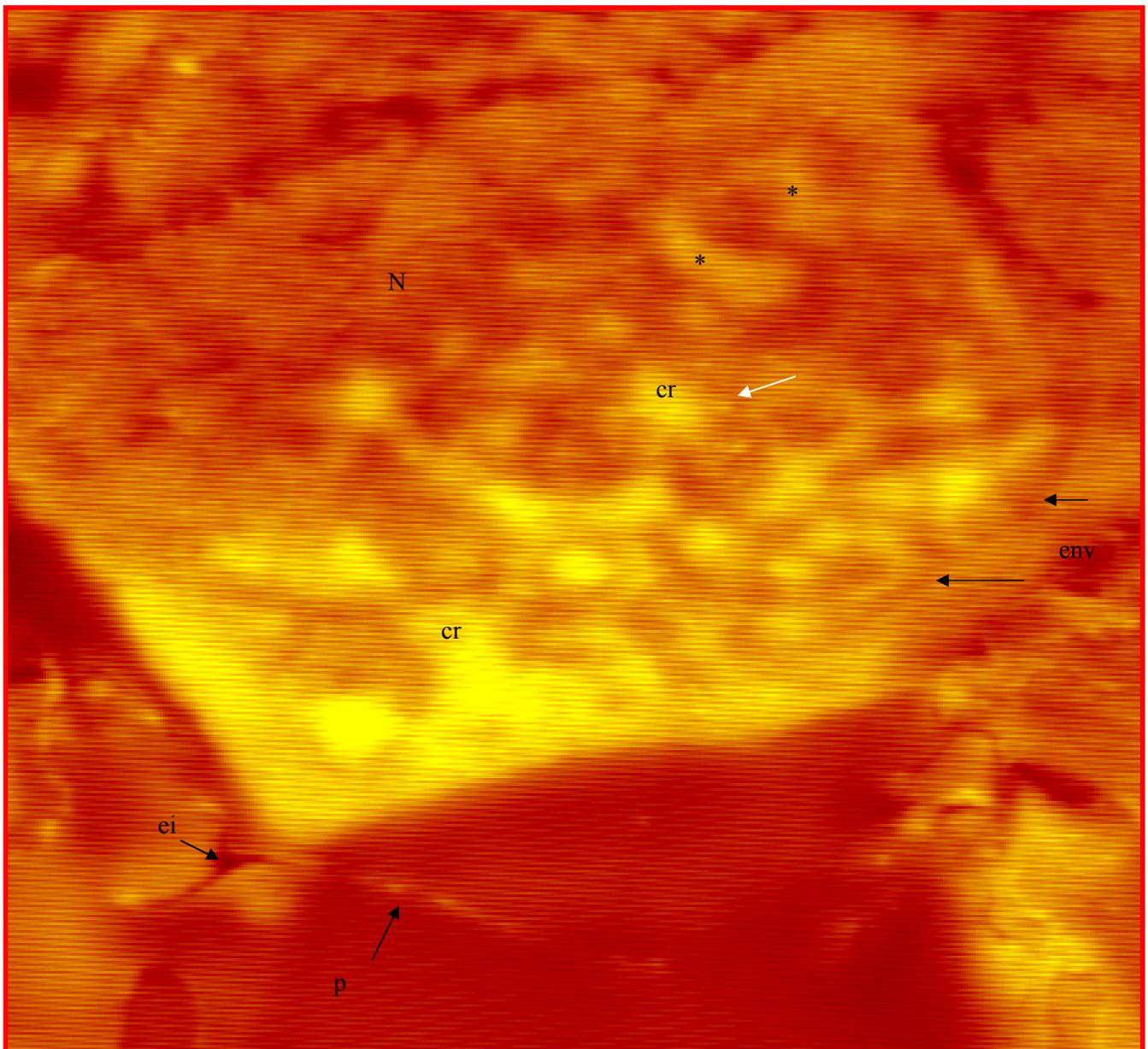


Figura 14. Microscopía de fuerza atómica (modo de contacto), del núcleo de *Taxodium mucronatum*, longitud 13.2 μm , área total 174.24 μm^2 . Se observa un patrón reticulado de la cromatina compacta *in situ*. N, núcleo; cr, cromatina reticulada; p, pared celular; env, límite de la envoltura nuclear; ei, espacio intercelular; (*), estructura en forma de “dona”; flecha blanca, protuberancias laxas al borde de la cromatina.

Al modificar el ángulo de orientación e iluminación de la célula escaneada, con ayuda del software Proscan versión 3.1, se vuelve evidente el arreglo tridimensional y la topografía de la cromatina compacta *in situ* (Figura 15). La arquitectura irregular de la cromatina, refleja la presencia de dominios nucleares de las regiones cromosómicas en interfase. Este ángulo de visión, resalta su textura grumosa, la profundidad de los canales intercromosómicos (Figura 15, flecha negra), así como las regiones estrechas de DNA que comunican la red.

En *T. mucronatum*, otros tipos celulares y componentes nucleares pueden distinguirse con el microscopio de fuerza atómica, en barridos que abarcan de $400 \mu\text{m}^2$ hasta $14.82 \mu\text{m}^2$, con una punta de nitruro de silicón de 20 – 60 nm de radio de curvatura. Por correlación morfológica, con cortes teñidos con safranina-verde rápido, se visualizaron células que corresponden al parénquima lagunoso, ya que presentan un contorno sinuoso muy evidente en sus paredes celulares. Los nucléolos, del parénquima esponjoso son muy prominentes (Figura 16).

Al disminuir el área de escaneo, $14.82 \mu\text{m}^2$; en imagen $3.85 \mu\text{m}$ de largo, con barridos de velocidad promedio de 2.54 Hz, en modo de contacto, aún se resuelve la estructura del nucléolo y cromatina adyacente (Figura 17). Ambos presentan una textura granular, que es más compacta y elevada en el nucléolo (altura máxima 397 nm); dentro del cuál hay depresiones que asemejan a centros fibrilares heterogéneos, vistos al MET, en otras especies vegetales, y algunos espacios nucleolares de diámetro menor (Figura 17, asterisco).

Adyacentes a los HeFC, y sobre el nucléolo, se aprecian esferas de diámetro pequeño, que parecen dirigirse o salir de ellos, a manera de dominios proteicos (Figura 17, flechas azules). El espacio entre la cromatina y el nucléolo ($0.51 \mu\text{m}$), es más amplio, que entre las bandas de cromatina compacta ($0.37 \mu\text{m}$), donde nuevamente, se notan partículas de diámetro estrecho ($0.055 \mu\text{m}$), que ocupan regiones de menos altitud; posiblemente correspondan a pre-ribosomas o ribonucleoproteínas (Figura 17, flechas blancas). Solo unos genes de la red de cromatina entran en contacto con el nucléolo (Figura 17, flechas negras).

Al proyectar el volumen, se distingue la textura del nucléolo, donde predominan diversas protuberancias de mayor elevación que en la cromatina compacta (Figura 18). Los componentes de los HeFCs se ubican en zonas de mayor profundidad dentro del nucléolo (color naranja). Las prominencias en la región de 0.51 μm largo, entre el nucléolo y la cromatina perinucleolar, con una textura algo más laxa, son continuas con la cromatina compacta de ambas estructuras nucleares, su altitud decrece gradualmente hasta ubicar sitios hundidos cuya arquitectura no se define con el diámetro de la punta empleada. Se aprecian algunas prolongaciones estrechas, entre las bandas grumosas de cromatina a la misma elevación que la conectan (Figura 18, flecha blanca).

La resolución obtenida hasta el momento, en imágenes de 3.86 μm de largo, indica que las protuberancias de las bandas de cromatina compacta, pueden corresponder a dominios en forma de bucle (300 nm). Las formaciones en zonas a menor altitud, no se visualizan claramente y tienen una posible correlación con RNPs. Al reducir el área de escaneo la imagen se torna muy plana, probablemente porque el radio de curvatura de la punta es mayor que la estructura, y en materiales biológicos de superficies muy irregulares, es incapaz de resolver la topografía de formas por debajo de 30 nm de diámetro.

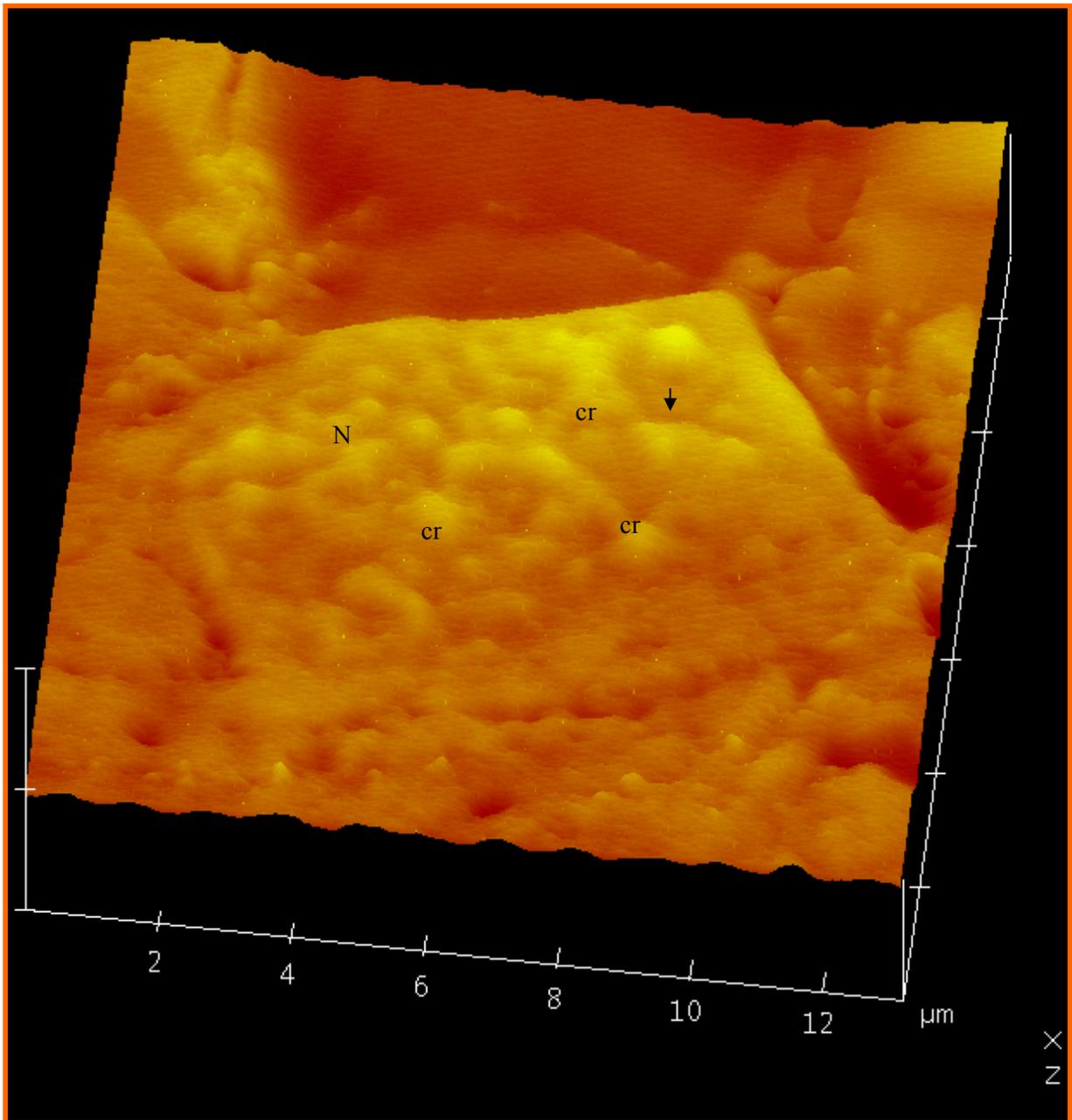


Figura 15. Topografía de una célula de *T. mucronatum* mediante MFA. Se destaca el núcleo celular (n), los grumos de cromatina compacta (cr) y un canal intercromosómico. Longitud de la imagen de 13.2 μm, área 174.24 μm²; 2.54 Hz; x= 2 μm/div, z= 473 nm/div.

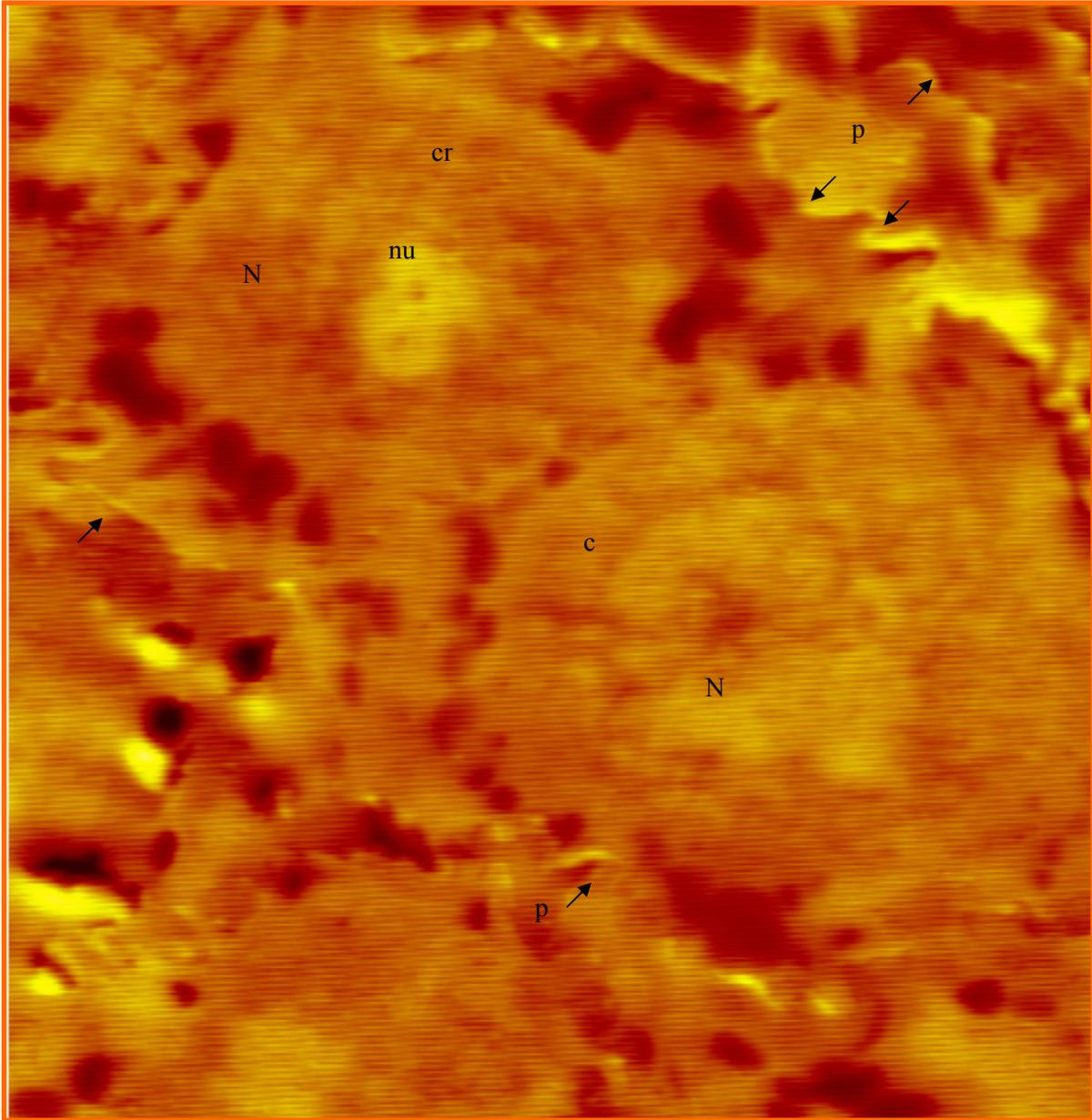


Figura 16. Dos núcleos del parénquima esponjoso en *T. mucronatum* visualizados mediante MFA. Imagen de 20 μm de largo. N, núcleo; nu, nucléolo; c, citoplasma; p, pared celular sinuosa.

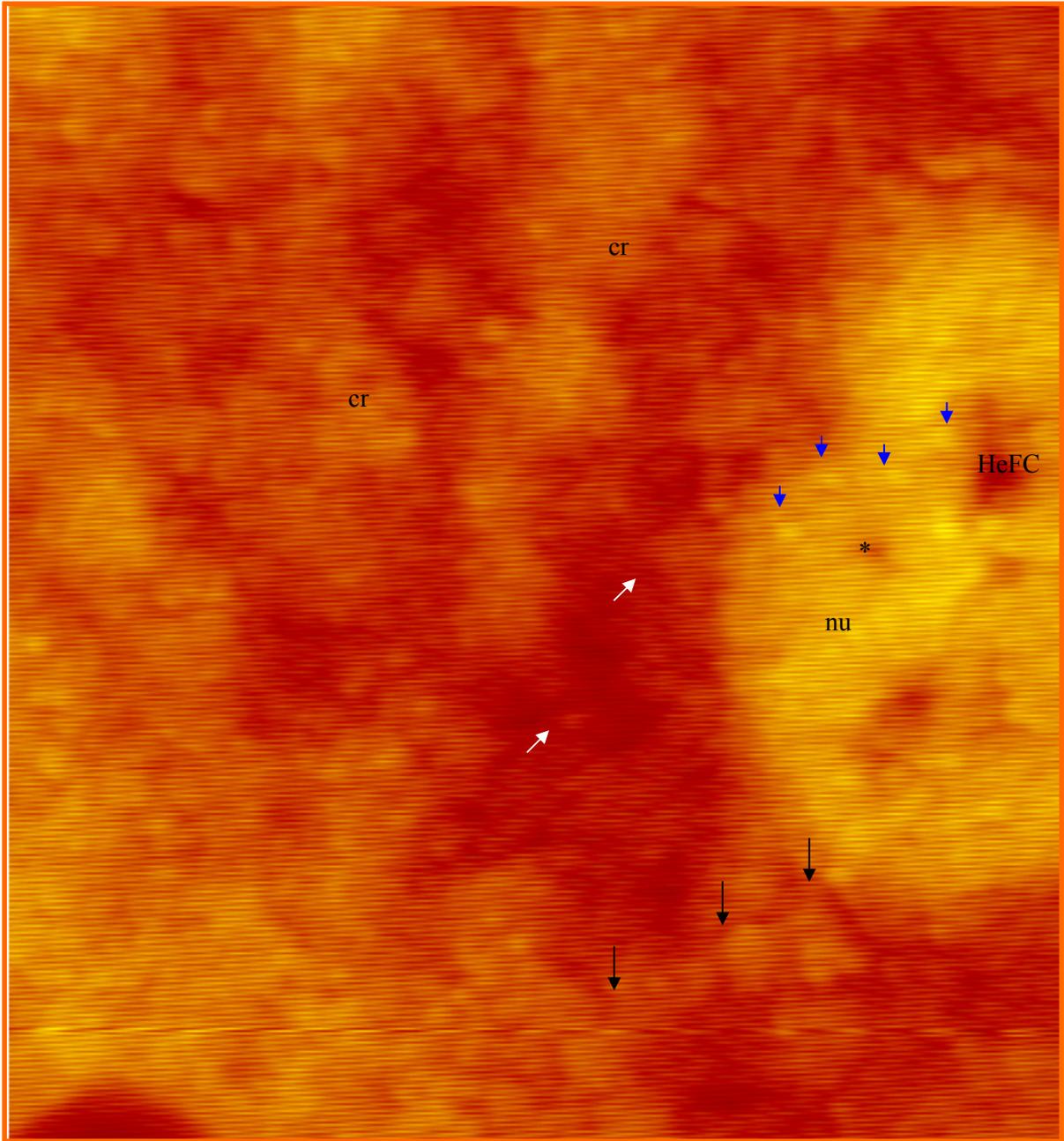


Figura 17. Nucléolo y grumos de cromatina compacta de *T. mucronatum* visualizados mediante MFA. Imagen 3.85 μm de longitud. nu, nucléolo; cr, cromatina; HeFC, centros fibrilares heterogéneos. Flechas y asterisco, ver el texto.

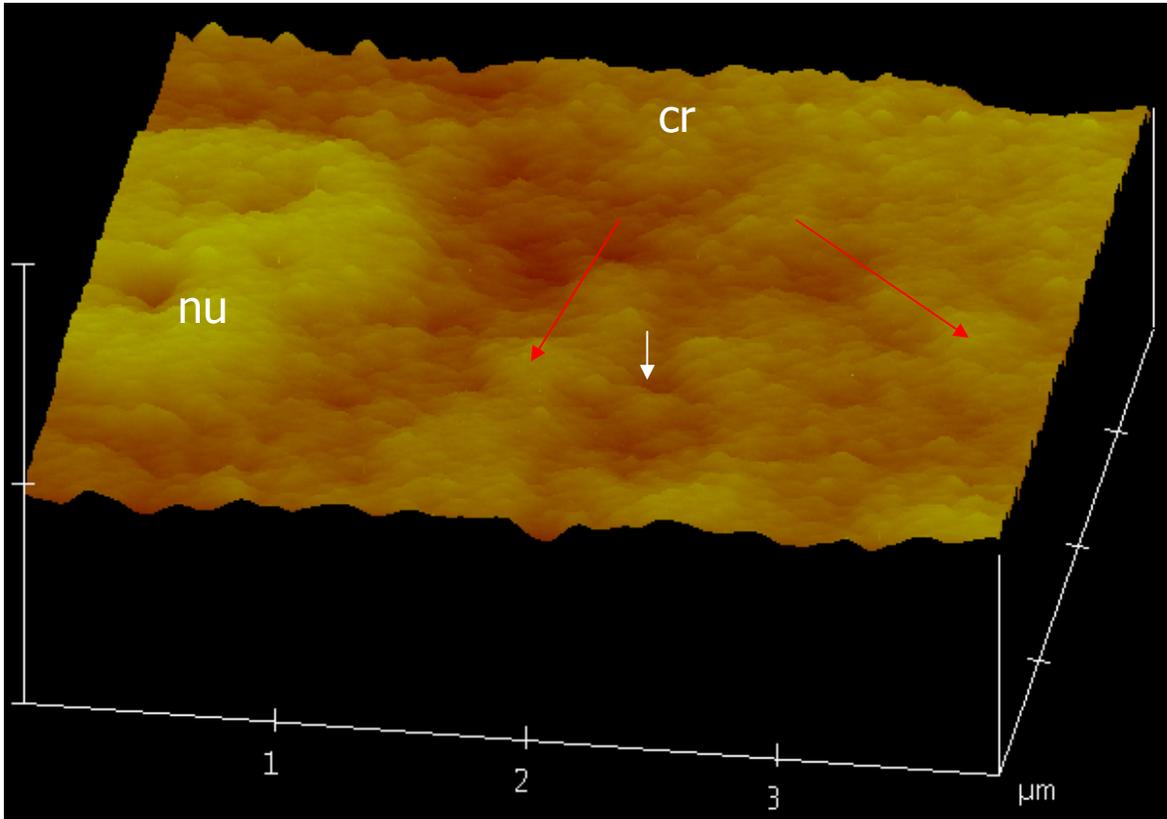


Figura 18. Topografía del nucléolo y cromatina compacta de una célula de *T. mucronatum* mediante MFA. Área $14.82 \mu\text{m}^2$, en imagen $3.85\mu\text{m}$ de longitud; 2.54 Hz ; $x= 1 \mu\text{m}/\text{div}$, $z= 397 \text{ nm}/\text{div}$.

- Microscopía electrónica de transmisión convencional.

A nivel ultraestructural, el núcleo de *T. mucronatum*, está delimitado por una envoltura nuclear, perforada a intervalos regulares por los poros nucleares. El patrón reticulado de la cromatina es más evidente, así como los componentes no-ribonucleoproteicos y ribonucleoproteicos (Figura 19).

Los grumos de cromatina compacta distribuidos a lo largo del nucleoplasma son característicos de esta especie, presentes en hoja: en células del parénquima en empalizada, del esponjoso, epidermis y conos (Figura 20).

Aunque el MET no brinda información sobre su textura, la resolución es más fina y claramente se observa que los grumos densos de cromatina compacta se adosan a la envoltura nuclear, otros están dispersos en el nucleoplasma y rodean al nucléolo. Son notables componentes granulares, los cuales se disponen agrupados y dispersos, en las regiones intercromatinianas; además de cloroplastos, mitocondrias, vesículas y paredes celulares (Figuras 21 y 22).

En cortes de 90 a 60 nm de espesor, con contraste general uranilo-plomo, los núcleos de *T. mucronatum* generalmente de 10 μm de diámetro, tienen ambas estructuras de cromatina (la adosada a la envoltura nuclear y la dispersa en el nucleoplasma), conectadas por un material fibro-granular laxo, que se halla al borde de los grumos de cromatina compacta y son continuos con segmentos de DNA más empaquetado (Figura 22).

En la región pericromatiniana, se extienden algunas fibras laxas, y predominan gránulos muy electrodensos dispersos y agrupados. Los que forman agregados, están cercanos o en la periferia de la cromatina compacta, a manera de transcritos que emergen gradualmente, para ser empaquetados en una estructura en forma de gránulo (Figuras 22 y 23). El *splicing* no siempre cotranscripcional, puede ocurrir alejado de la región pericromatiniana, en los sitios más activos de síntesis de RNA, donde también se almacenan en forma de gránulo, otros se apartan paulatinamente de las zonas de transcripción activa (gránulos dispersos), posiblemente para ser exportados hacia el citoplasma a través de los poros nucleares, para su traducción en los polisomas (Figura 22). Los gránulos, claramente emergen a partir de regiones laxas (en transcripción), en la periferia o en sitios no tan empaquetadas dentro de la cromatina compacta (Figura 23). A mayores aumentos, se distinguen estas partículas ribonucleoproteicas de

diámetro superior a un ribosoma (25 nm) (Figuras 22, 23 y 24). Algunos gránulos ubicados al borde de la cromatina compacta, y en el nucleoplasma, tienen un diámetro entre 30 y 35 nm (Figura 24). Para determinar si corresponden a partículas formadas por RNA, fueron contrastados por un procedimiento preferencial.

En cortes de hoja y brotes de *T. mucronatum*, fijados con glutaraldehído al 6%, sin postfijación con tetraóxido de osmio, contrastados por el procedimiento preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA) de Bernhard (1969), se destacaron los componentes ribonucleoproteicos de los núcleos interfásicos. Tanto partículas de 32 nm de diámetro, como el nucléolo, son positivos al método de contraste, lo cual indica que son estructuras de naturaleza ribonucleoproteica (Figuras 25 y 26). El diámetro de estos gránulos es similar al descrito en *L. schismatica* (Jiménez-García *et al.*, 1992).

Estas partículas ribonucleoproteicas son muy abundantes en los espacios inter y pericromatinianos. Un núcleo en interfase típico de *T. mucronatum*, tiene cerca de 317 gránulos en un área reducida a $1.02 \times 10^6 \text{ nm}^2$, al considerar los espacios ocupados por cromatina en una microfotografía electrónica con un área total de $1.63 \times 10^6 \text{ nm}^2$, en cortes de 60 nm de espesor. El contraste utilizado oscurece preferencialmente las ribonucleoproteínas, y la estructura de la cromatina se torna algo difusa, sin embargo su forma continúa, aún es levemente visible. Parte de la cromatina perinucleolar penetra en el nucléolo vegetal, donde posiblemente tiene continuidad con los centros fibrilares, la función de estos genes hasta el momento se desconoce (Figura 26, asterisco).

Cercanos a las bandas de cromatina compacta amorfa, en los espacios inter y pericromatinianos, hay abundantes gránulos ribonucleoproteicos de 32 nm de diámetro, agregados y dispersos como ocurre con los gránulos de *Lacandonia* y los pericromatinianos de células de mamífero, respectivamente (Figura 27).

El tetraóxido de osmio, agente estabilizador de membranas lipídicas, interfiere con el método de contraste regresivo para ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), por lo que se evita en la postfijación, y en consecuencia, no son visibles las membranas en ningún organelo celular. Solo se identifican por componentes característicos como el espacio de la cisterna nuclear y por ribosomas adosados a la membrana nuclear externa y retículo endoplásmico rugoso (Figura 28).

Los gránulos dispersos de la región intercromatiniana, y los adyacentes a la cromatina laxa, son de diámetro mayor que los ribosomas, claramente contrastados por el método preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969) (Figura 28). Como ocurre con los GPC, estos sitios de RNA y proteínas, se ubican próximos a la cromatina compacta (Figura 29A), y otros se agrupan en el nucleoplasma (Figura 29B), últimos unidos entre sí por fibras muy finas, de modo similar a los gránulos de *Lacandonia*.

Las fibras pericromatinianas, como se ha demostrado en varios experimentos de Puvion (1981) y Fakan (1984), son la expresión morfológica de la transcripción del pre-mRNA, donde ocurre la remoción de intrones más extensa. Durante el *splicing*, pueden o no originar un gránulo, y aquellos transcritos cuya información sea prioritaria para la célula, son transportados rápidamente, sin formarlos. El resto de las fibras ribonucleoproteicas, en este caso, a medida que son transcritas y procesadas se van enrollando hasta originar un gránulo (pericromatiniano o de *Lacandonia*). Las fibras, visualizadas a grandes aumentos (Figura 29B, flechas blancas), pueden representar remanentes del transcrito en proceso de enrollamiento, aún no liberado de la unidad matriz al término de la transcripción, o bien, intrones en proceso de remoción que en consecuencia comunican a los gránulos primeramente constituidos (Figura 29B). Esto último parece ocurrir, ya que hacia la parte central de la microfotografía (Figura 29B), son visibles cuatro gránulos, comunicados entre sí, por finas fibras ribonucleoproteicas, excepto el último, ya libre. También, se aprecia que carecen de halo, como en los gránulos de *Lacandonia* y de Balbiani (Figura 29 A, B).

En cuanto al nucléolo de *T. mucronatum*, fue posible observar el componente granular, el fibrilar denso, los centros fibrilares heterogéneos y espacios o intersticios nucleolares (Figuras 30, 31) como en fuerza atómica (Figura 7).

Los nucléolos de *T. mucronatum*, son muy prominentes, especialmente en células del parénquima esponjoso o lagunoso; miden en promedio 2 μm de diámetro.

El componente fibrilar denso, denota la elevada transcripción de sus genes ribosomales, visibles como una región muy electrodensa al contraste preferencial para ribonucleoproteínas. Los centros fibrilares heterogéneos presentan su característico componente ribonucleoproteico central, evidente al MET y ubicado topográficamente a

menor altitud que el componente fibrilar denso, como se indica por MFA. Están rodeados por genes de rDNA (zona clara) no tan activos transcripcionalmente (Figura 30).

El componente granular, es el más prominente de los tres. Hacia la periferia en algunos de sus bordes emergen gránulos de 12 a 24 nm de diámetro, que incrementan en tamaño (de 24 a 27 nm de diámetro), al alejarse del nucléolo; pueden corresponder a pre-ribosomas en proceso de maduración, junto con otros componentes proteicos desconocidos; algunos todavía unidos por finas fibras de RNA y proteínas que están participando en su maduración (Figura 30, recuadro blanco).

Una región de cromatina perinucleolar hace contacto con el nucléolo, cercanamente a un centro fibrilar denso, lo que indica una posible continuidad con él. Algunas fibras laxas de cromatina alejadas del nucléolo, están activas en la transcripción de sus genes, debido a que se observan ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro (Figura 30).

Además del componente granular, los centros fibrilares heterogéneos y la región fibrilar densa, son muy activos transcripcionalmente.

Los transcritos de los centros fibrilares se mezclan con los del granular, donde prosigue su maduración. Fibras que emergen de los centros fibrilares heterogéneos, parecen continuarse con material fibro-granular ubicado entre las bandas de cromatina; de tal modo que productos de genes ribosomales (rDNA), y mensajeros (mRNA), se mezclan en el canal ribonucleoproteico, delimitado por cromatina (Figura 30, 31).

Los gránulos, en sitios lejanos al nucléolo, su diámetro es de 32 ± 2 nm, mientras los adyacentes a los HeFCs, tienen un rango más amplio, abarcando de 12 hasta 22 nm de diámetro (Figura 31). Algunos, aún no han completado su maduración y permanecen intrones, visibles como fibras ribonucleoproteicas que los unen, otros en proceso de formación, tienen continuidad con las fibras pericromatinianas (Figuras 31, 32).

Estas partículas ribonucleoproteicas de 32 ± 2 nm de diámetro, ubicadas entre las bandas de cromatina, no son tan abundantes como en *L. schismatica*. Su número disminuye, conforme transcurre la mitosis (Figura 33).

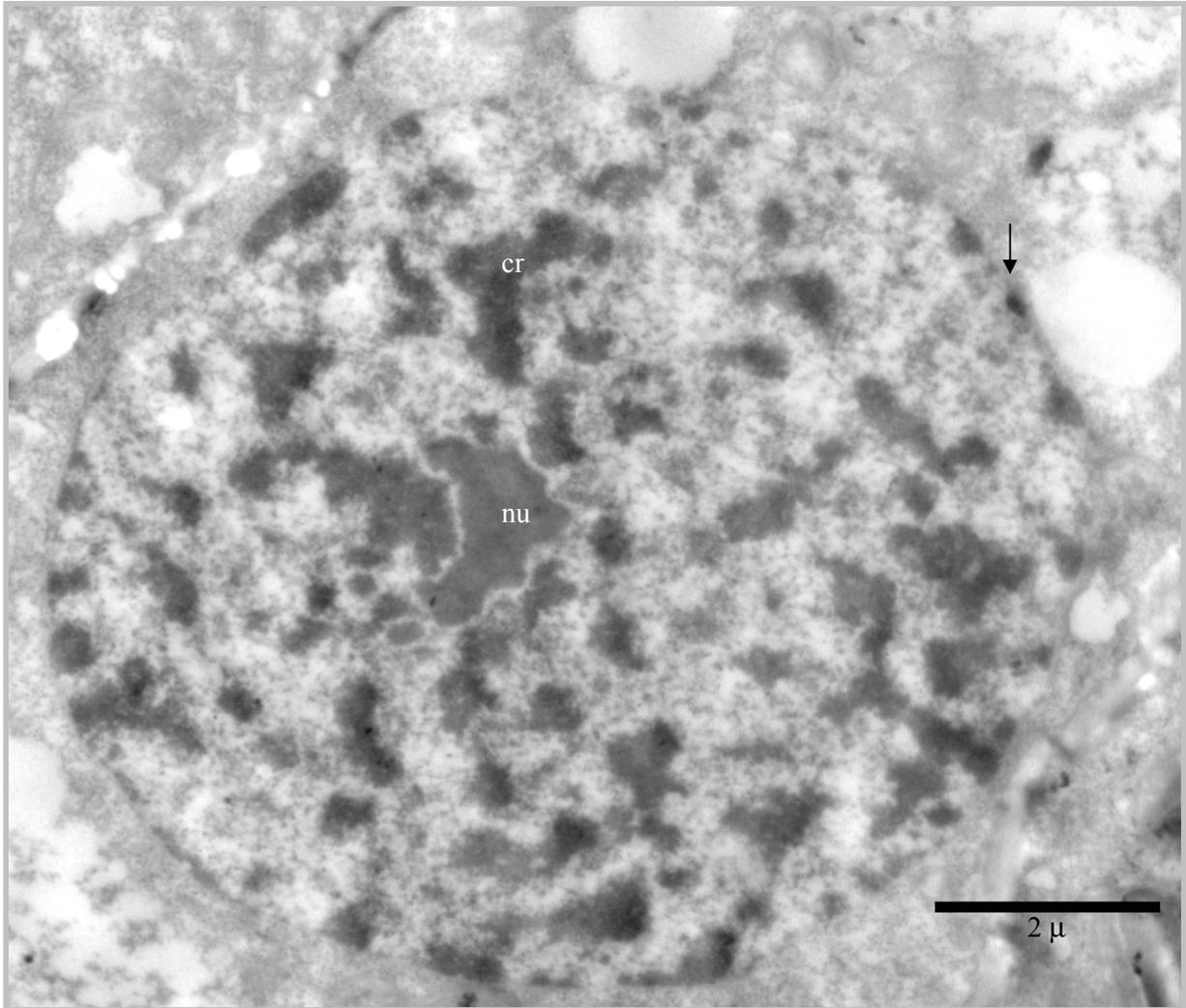


Figura 19. Núcleo de hoja, región del mesófilo de *T. mucronatum*, contraste general uranilo-plomo. La flecha indica el límite del núcleo celular; cr, cromatina; nu, nucléolo.

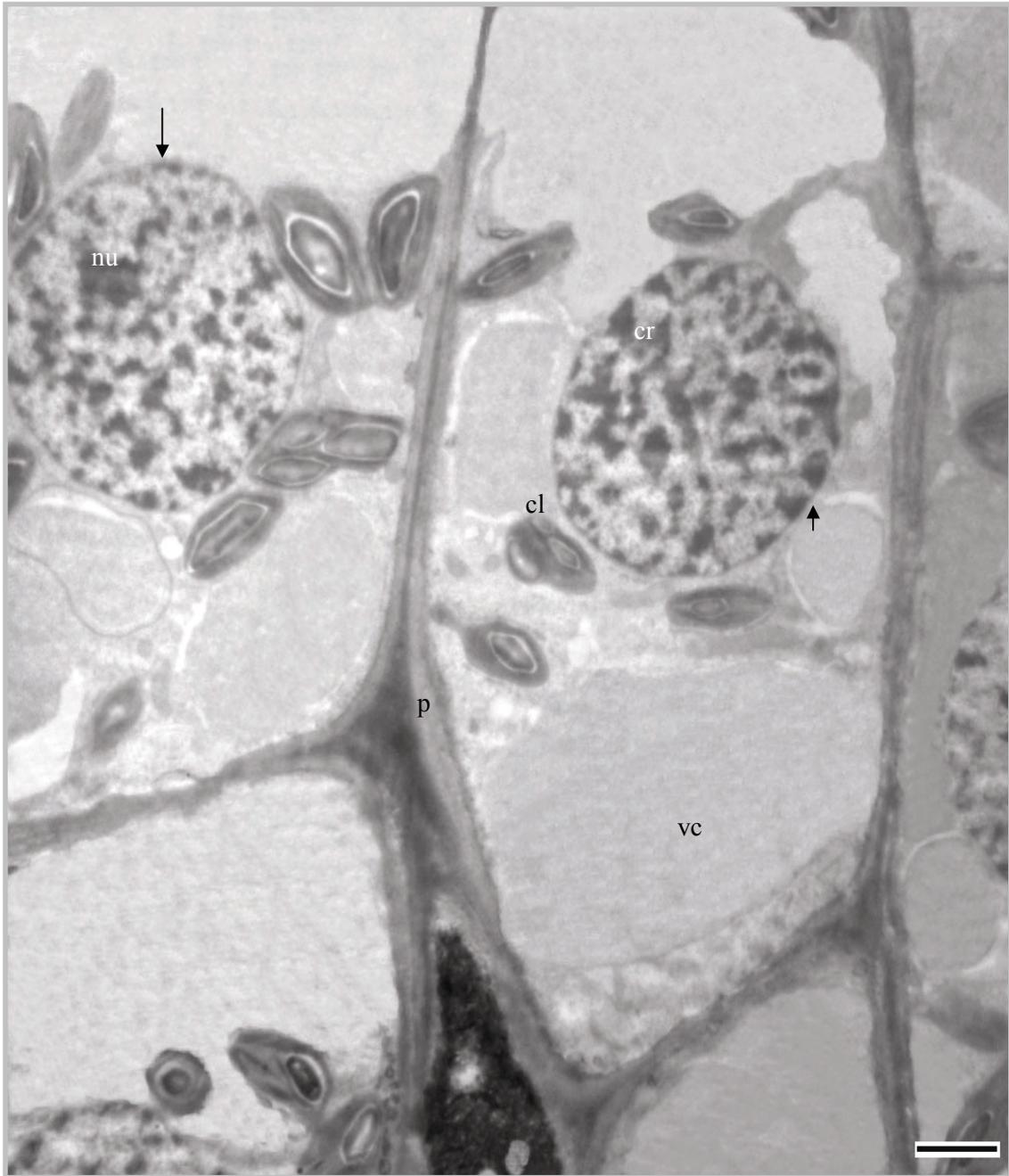


Figura 20. Corte paralelo de un núcleo de hoja, epidermis de *T. mucronatum*. Contraste general uranilo-plomo. La flecha indica el núcleo celular; cr, cromatina; cl, cloroplasto; vc, vacuola; p, pared celular. Barra 2 μ m.

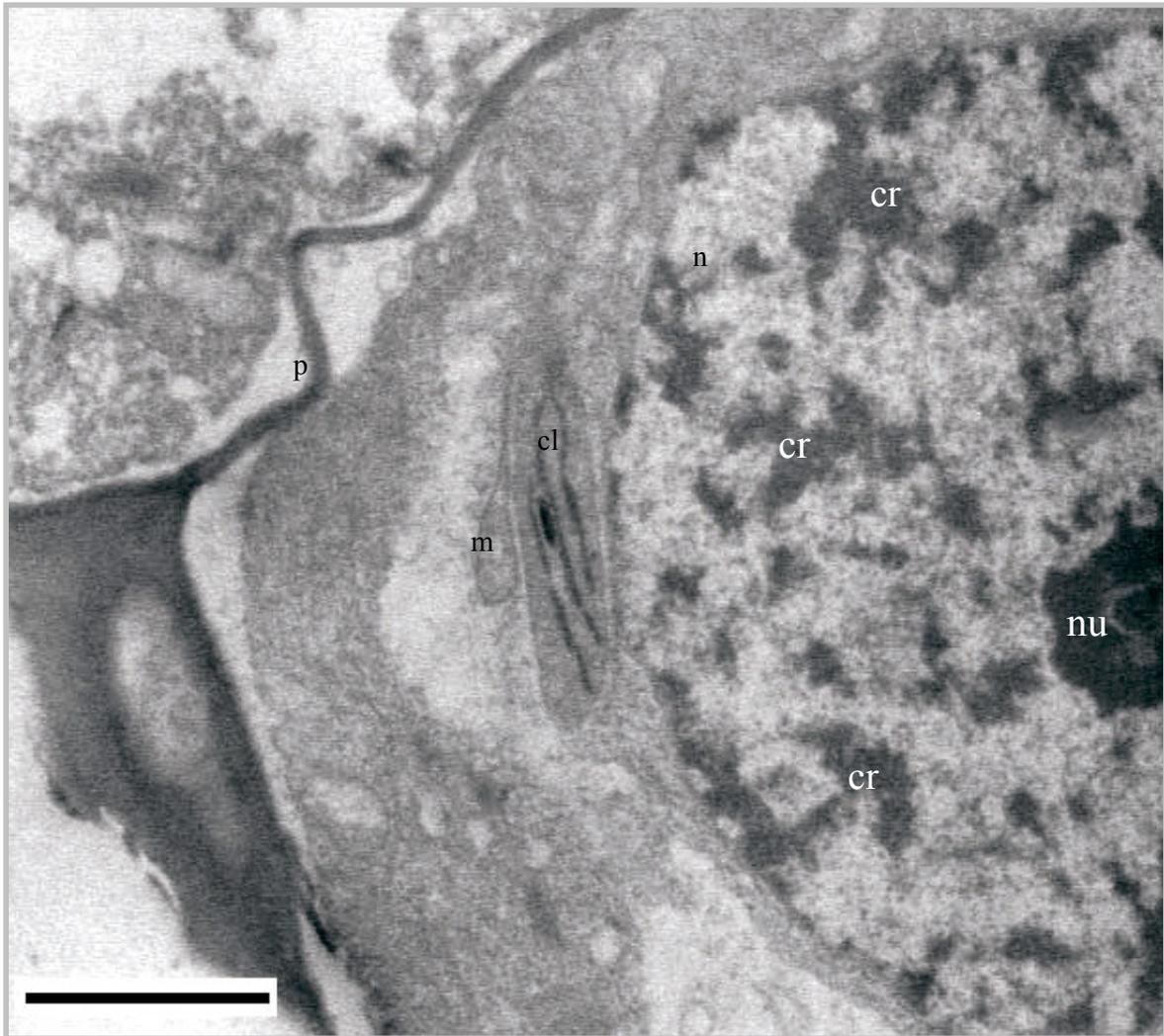


Figura 21. Núcleo en interfase de *T. mucronatum*. Contraste general uranilo-plomo. n, núcleo; nu, nucléolo; cr, cromatina; cl, cloroplasto; m, mitocondria; p, pared celular. Barra 2 μ m.

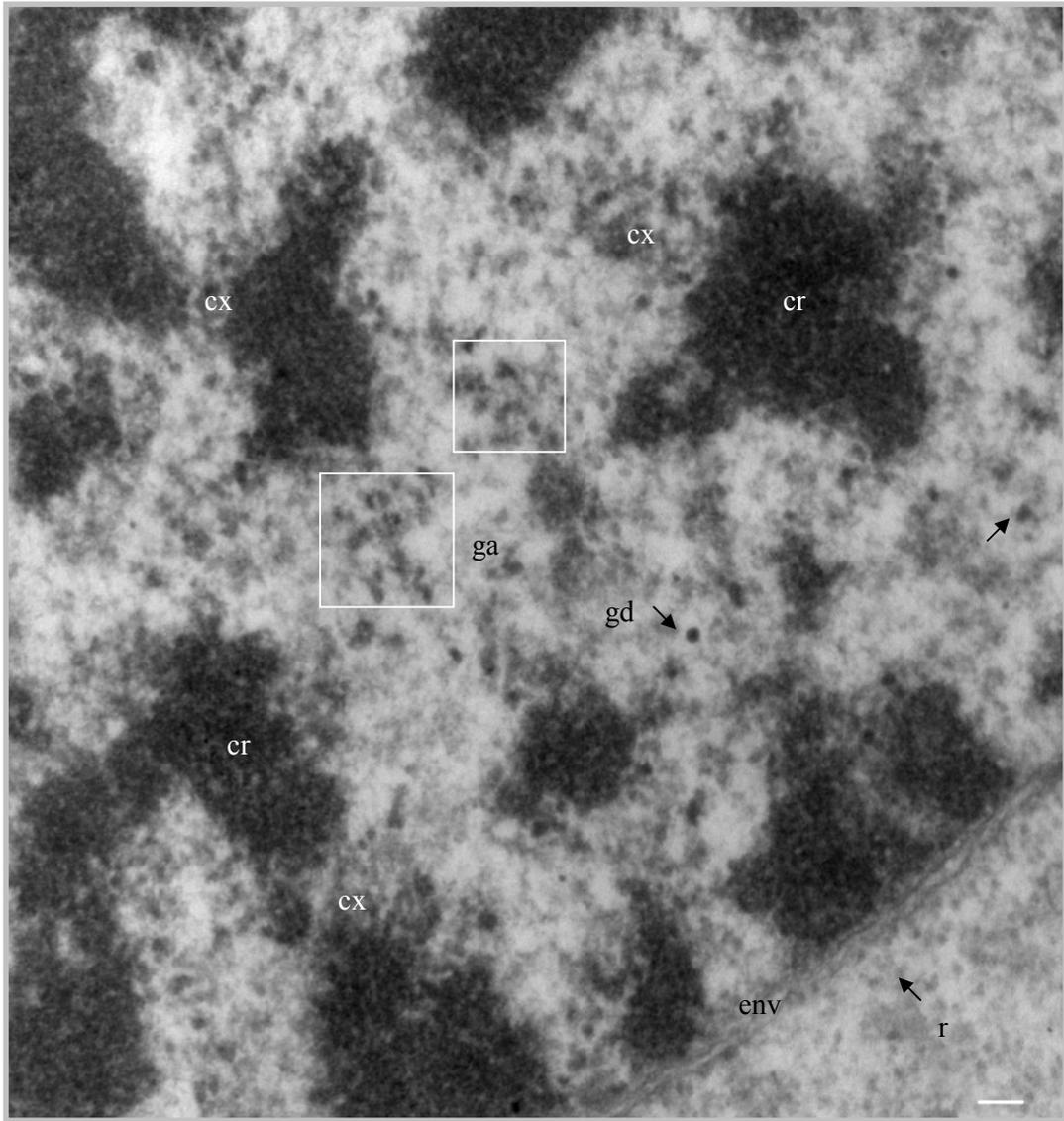


Figura 22. Núcleo de hoja. Grupos de cromatina compacta dispersos en el nucleoplasma y unidos por formas laxas de la misma, entre las cuales se observa un material granular. cr, cromatina compacta; cx, cromatina laxa, gd; gránulos dispersos; ga, gránulos agrupados; env., envoltura nuclear; r, ribosomas. Barra 50 nm.

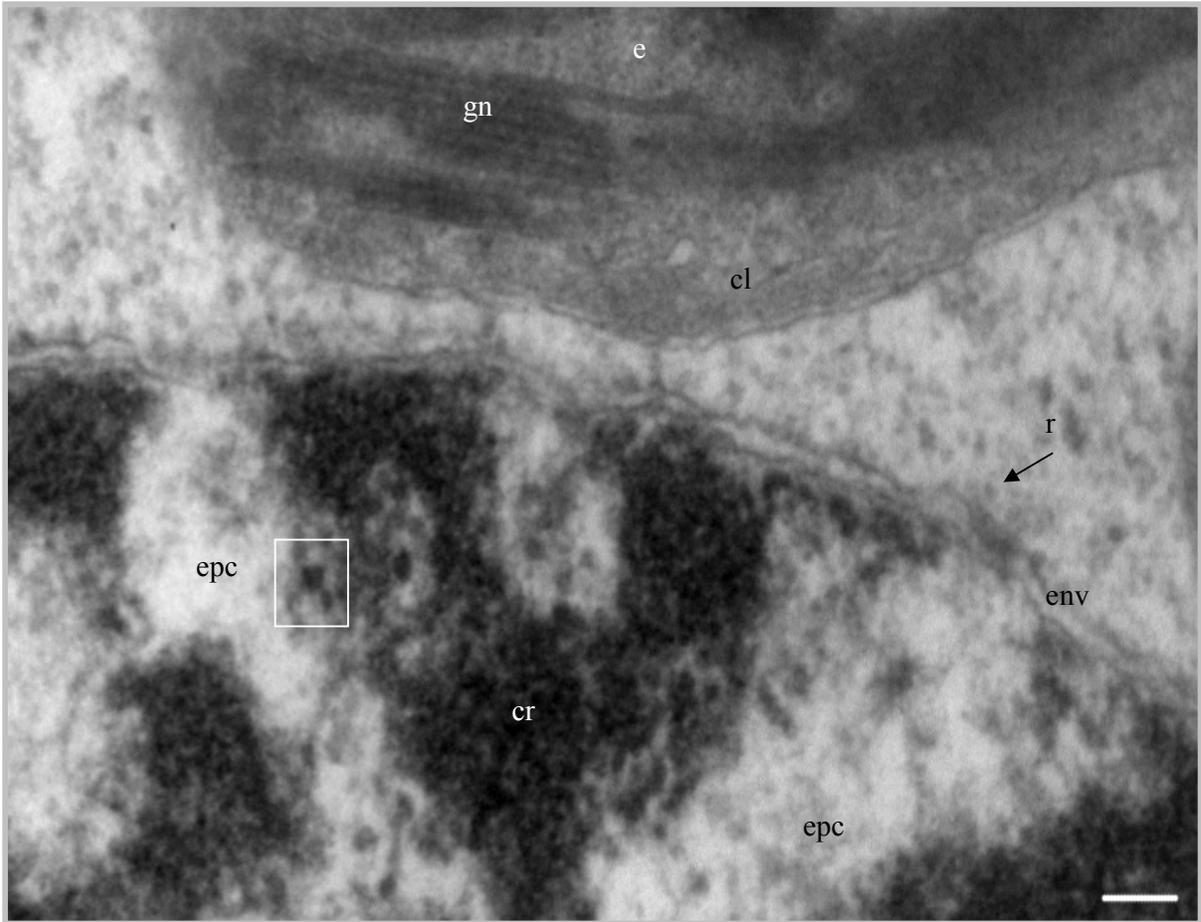


Figura 23. Núcleo de hoja. Cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear. El recuadro señala un gránulo de 32 nm de diámetro, cercano a la cromatina compacta. cr, cromatina compacta; epc, espacio pericromatiniano; env., envoltura nuclear; r, ribosomas; cl, cloroplasto; gn, grana, e; estroma. Barra 50 nm.

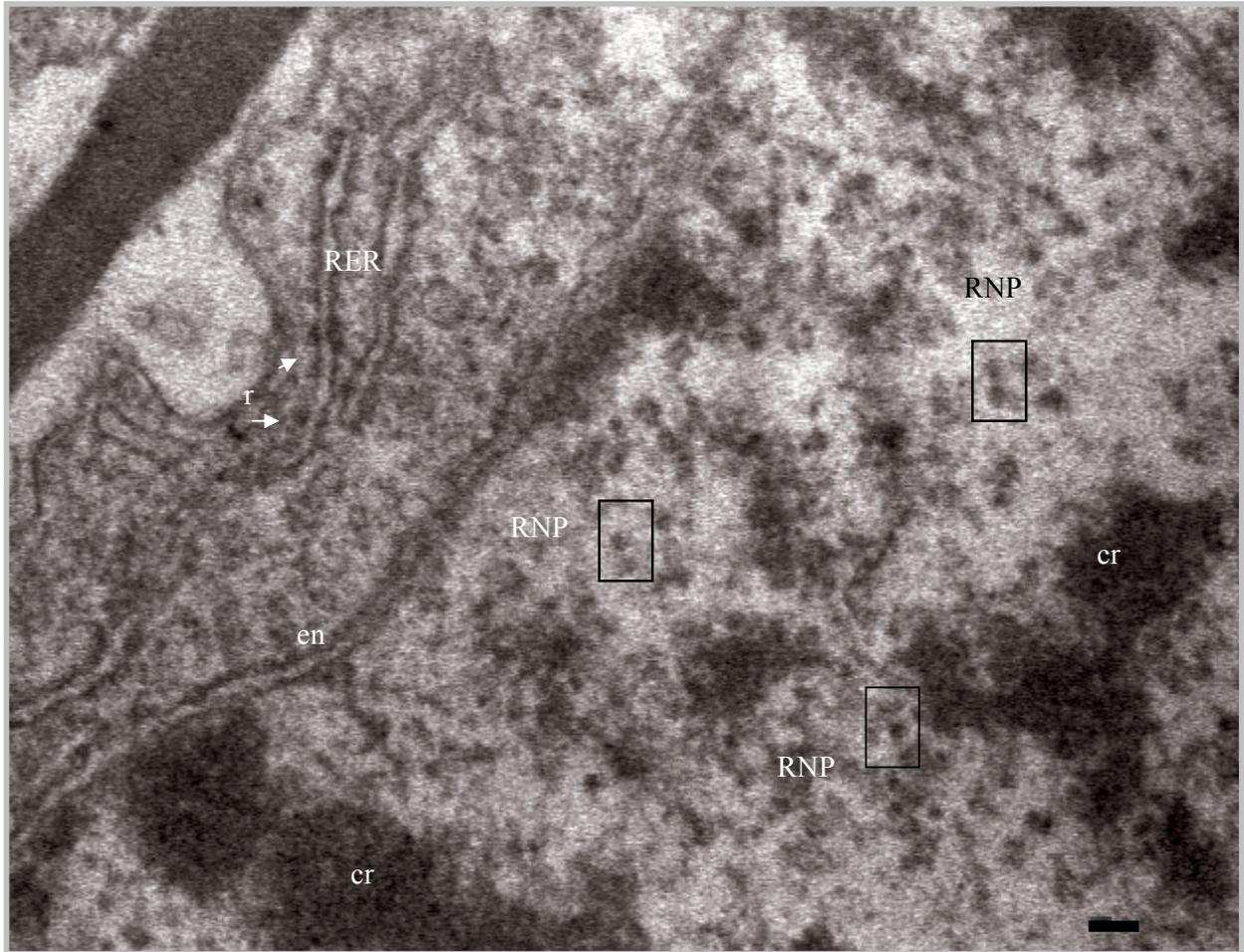


Figura 24. Corte ultrafino de hoja de *T. mucronatum*. Contraste general uranilo-plomo. cr, cromatina compacta; en.-envoltura nuclear; r, ribosoma adosado al RER; RNP, partículas ribonucleoproteicas. Barra 50 nm.

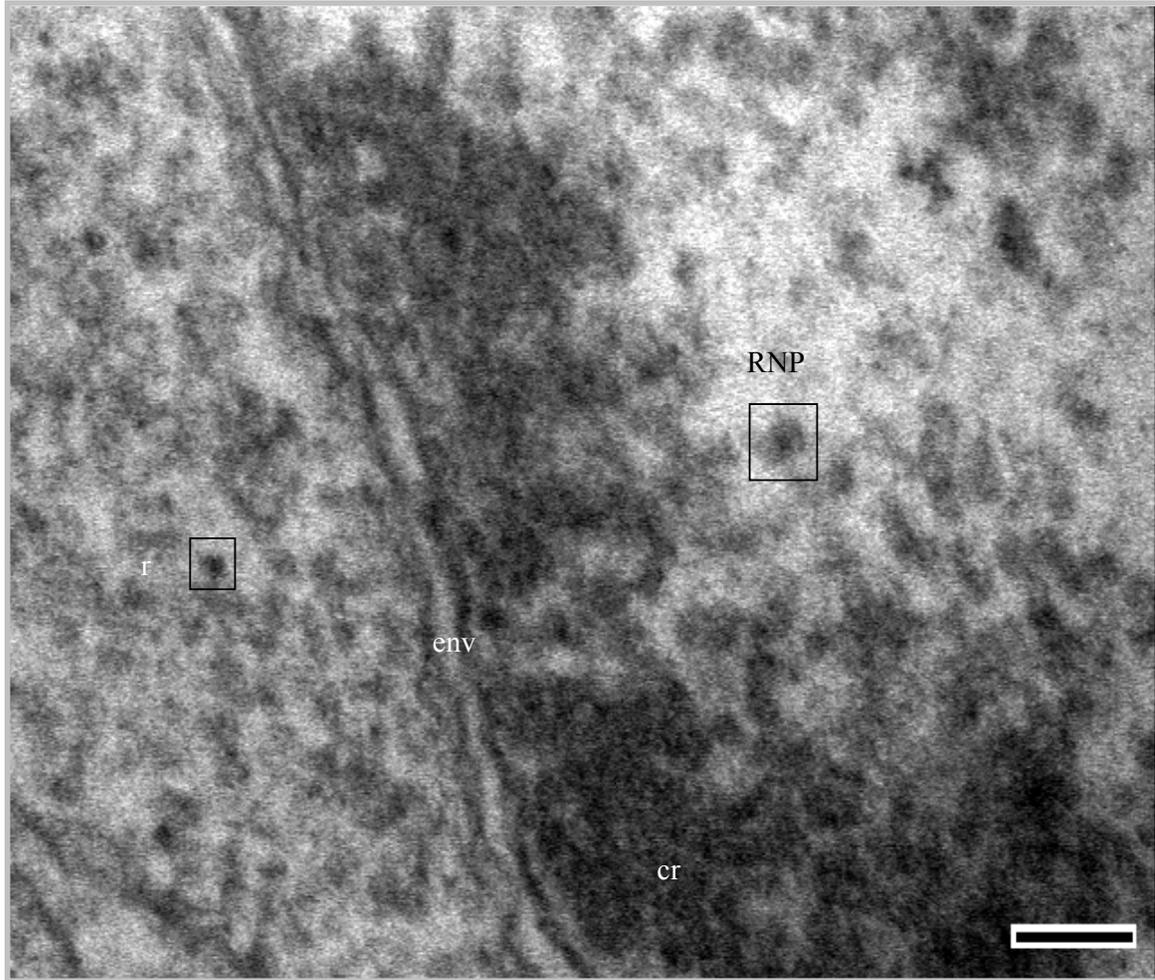


Figura 25. Núcleo de *T. mucronatum*, contraste general uranilo-plomo. Env., envoltura nuclear; cr, cromatina; r, ribosoma; RNP, partícula ribonucleoproteica de 32 nm de diámetro. Barra 100 nm.

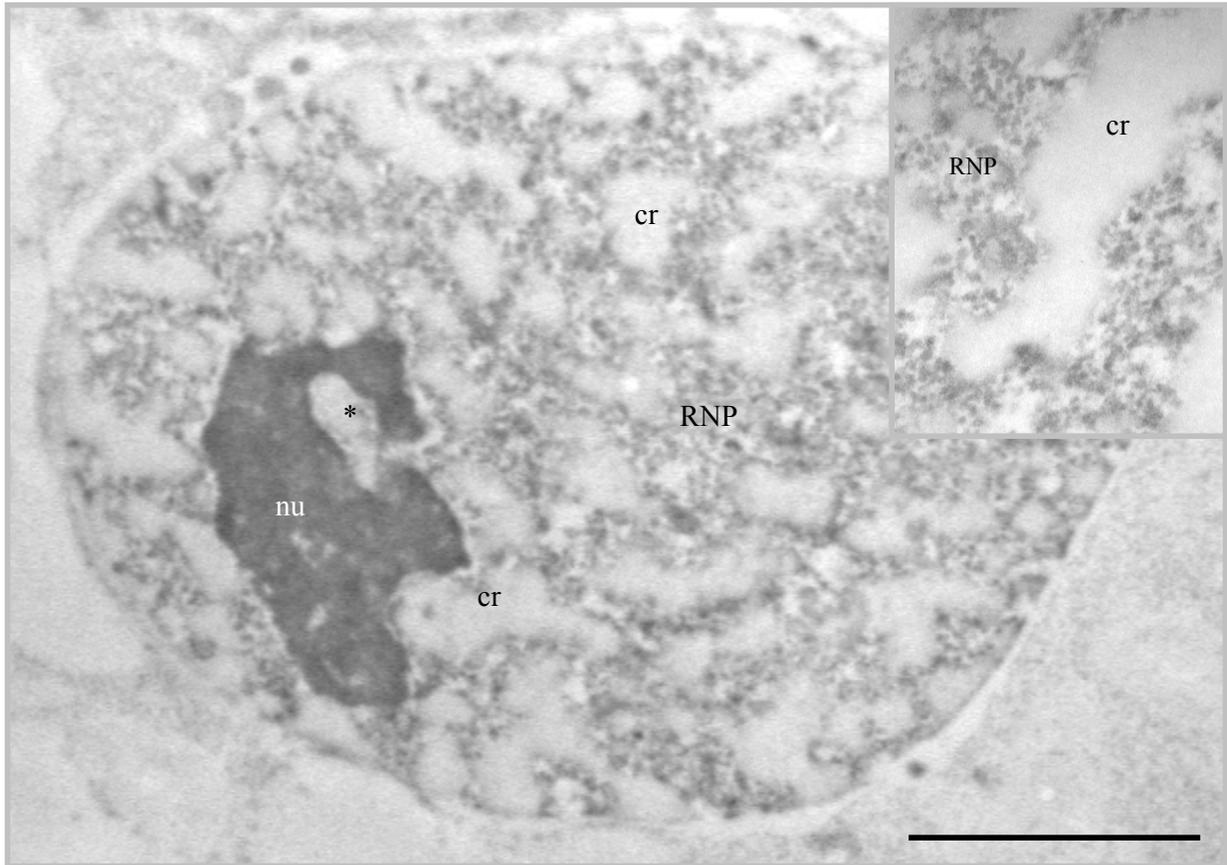


Figura 26. Del núcleo de una célula del mesófilo de *T. mucronatum*, se observa en tonos más oscuros las estructuras que contienen RNA, positivas al EDTA, mientras la cromatina compacta se nota gris claro. El inserto muestra la abundancia de partículas ribonucleoproteicas entre las bandas de cromatina. (*), Cromatina perinucleolar; cr, cromatina; nu, nucléolo; RNP, partículas ribonucleoproteicas. Barra 2 μm .

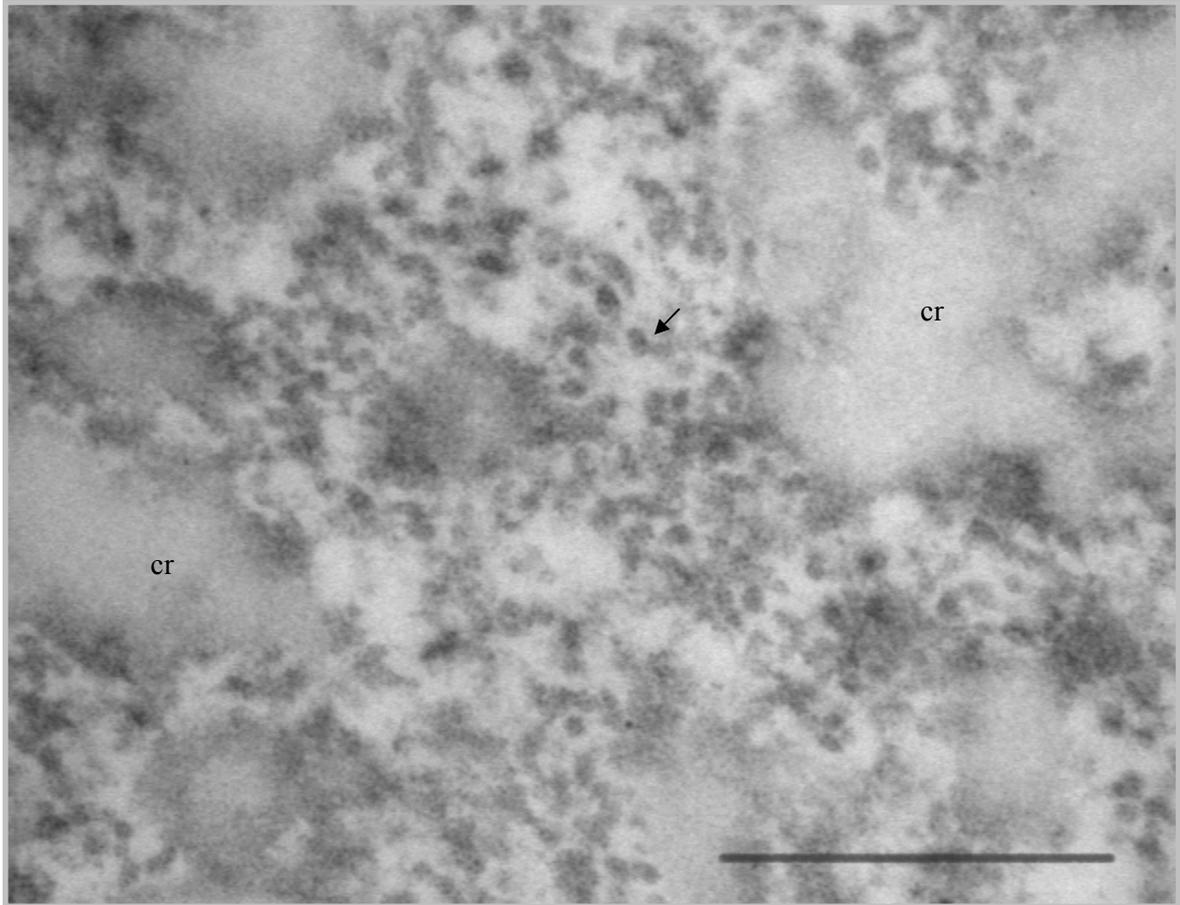


Figura 27. Abundantes gránulos de 32 nm de diámetro que ocupan los espacios inter y pericromatinianos. Cr, cromatina; flecha, indica un gránulo. Barra 500 nm.

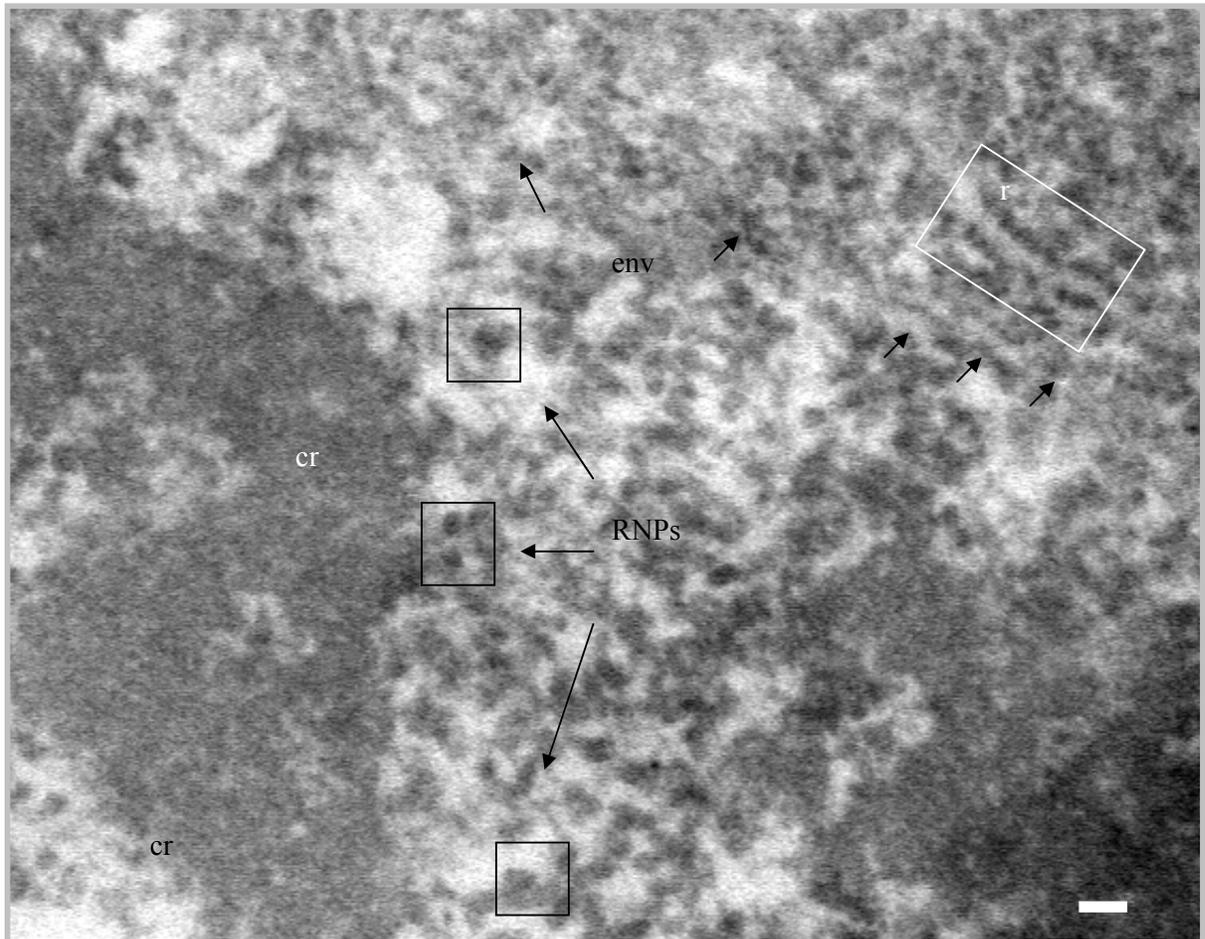


Figura 28. Región intercromatiniana, en *T. mucronatum*. Donde a mayores aumentos se observa la presencia de gránulos de 32 nm de diámetro, los cuales se revelan al emplear la técnica preferencial para ribonucleoproteínas EDTA. Barra 30 nm. env., límite de la envoltura nuclear; r, banda de ribosomas adosados al RER; RNPs, ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro en la región pericromatiniana.

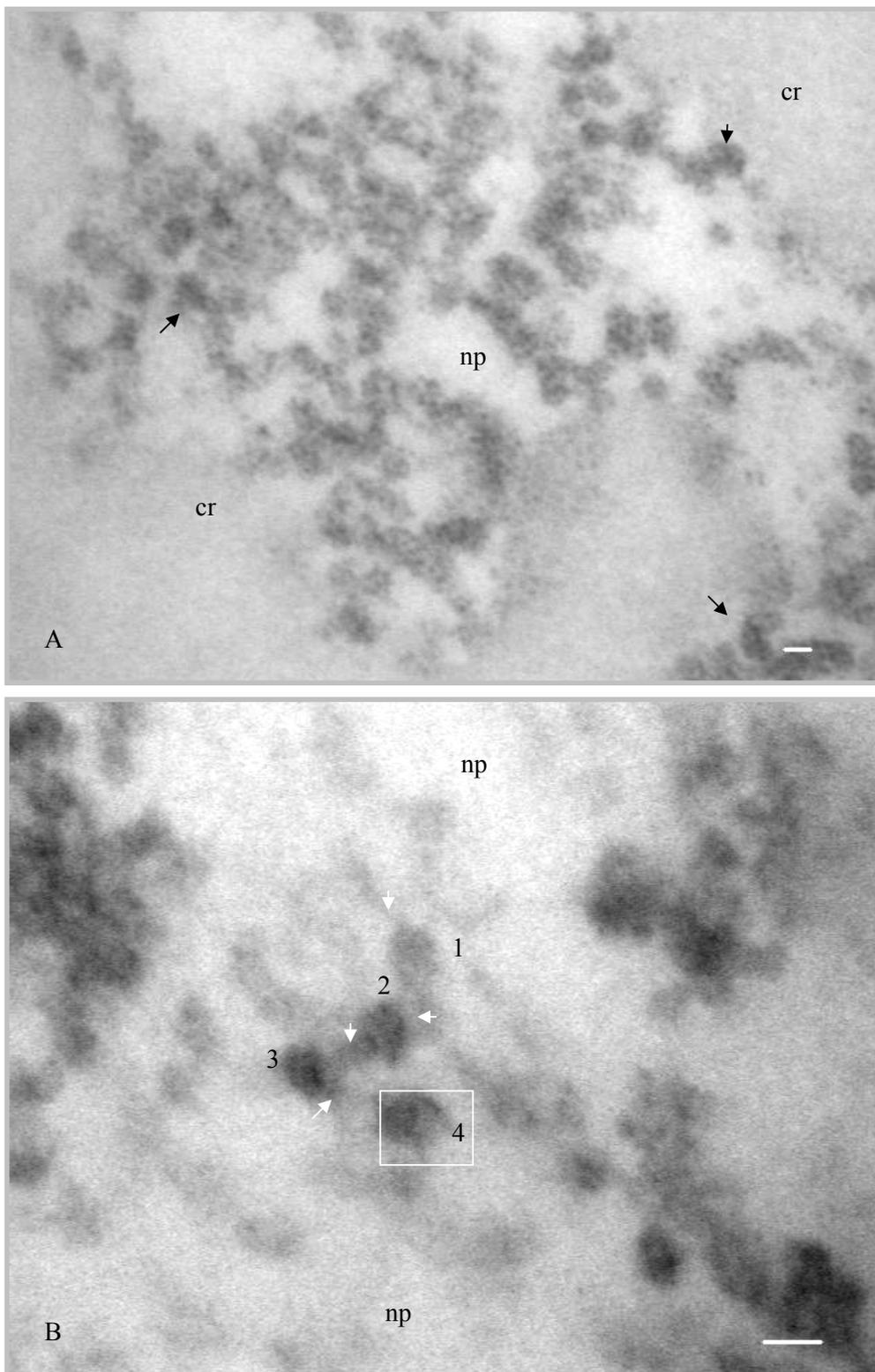


Figura 29. Gránulos ribonucleoproteicos. (A), Material granular abundante en la región intercromatiniana, algunos adosados a la cromatina (flechas negras). (B), gran aumento de RNPs agrupadas en el nucleoplasma y conectadas por fibras ribonucleoproteicas (flecha blanca), excepto el gránulo libre (recuadro), con un pequeño remanente de la fibra que lo unía. Cr, cromatina; np, nucleoplasma; RNP, ribonucleoproteína; flecha, fibra ribonucleoproteica. Barra 30 nm.

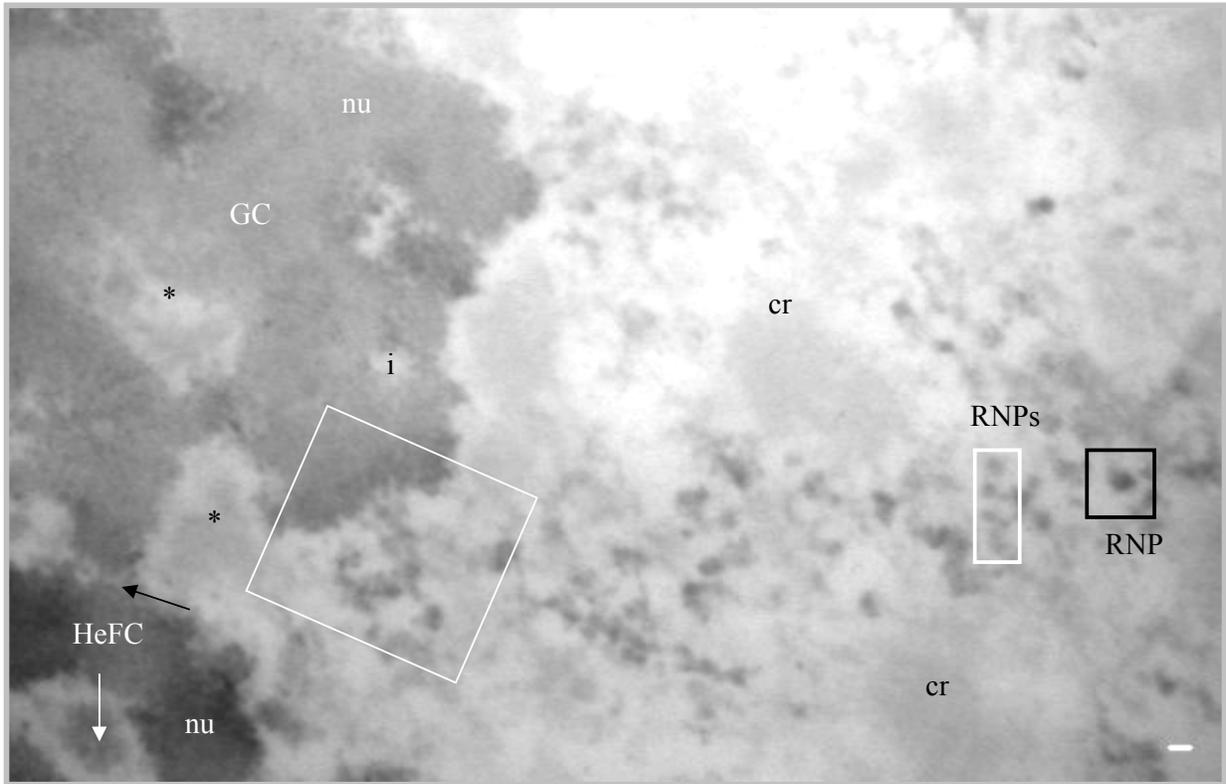


Figura 30. Núcleo de *T. mucronatum*, empleando el procedimiento preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA). GC, componente granular; n, nucléolo; HeFC, centros fibrilares heterogéneos; i, intersticio nucleolar; cr, cromatina; flecha negra, nucleolonema; (*), cromatina perinucleolar; RNP, partículas ribonucleoproteicas, (recuadro blanco) de 12 a 24 nm de diámetro y (recuadro negro) de 32 nm de diámetro, en la región intercromatiniana. Barra 30 nm.

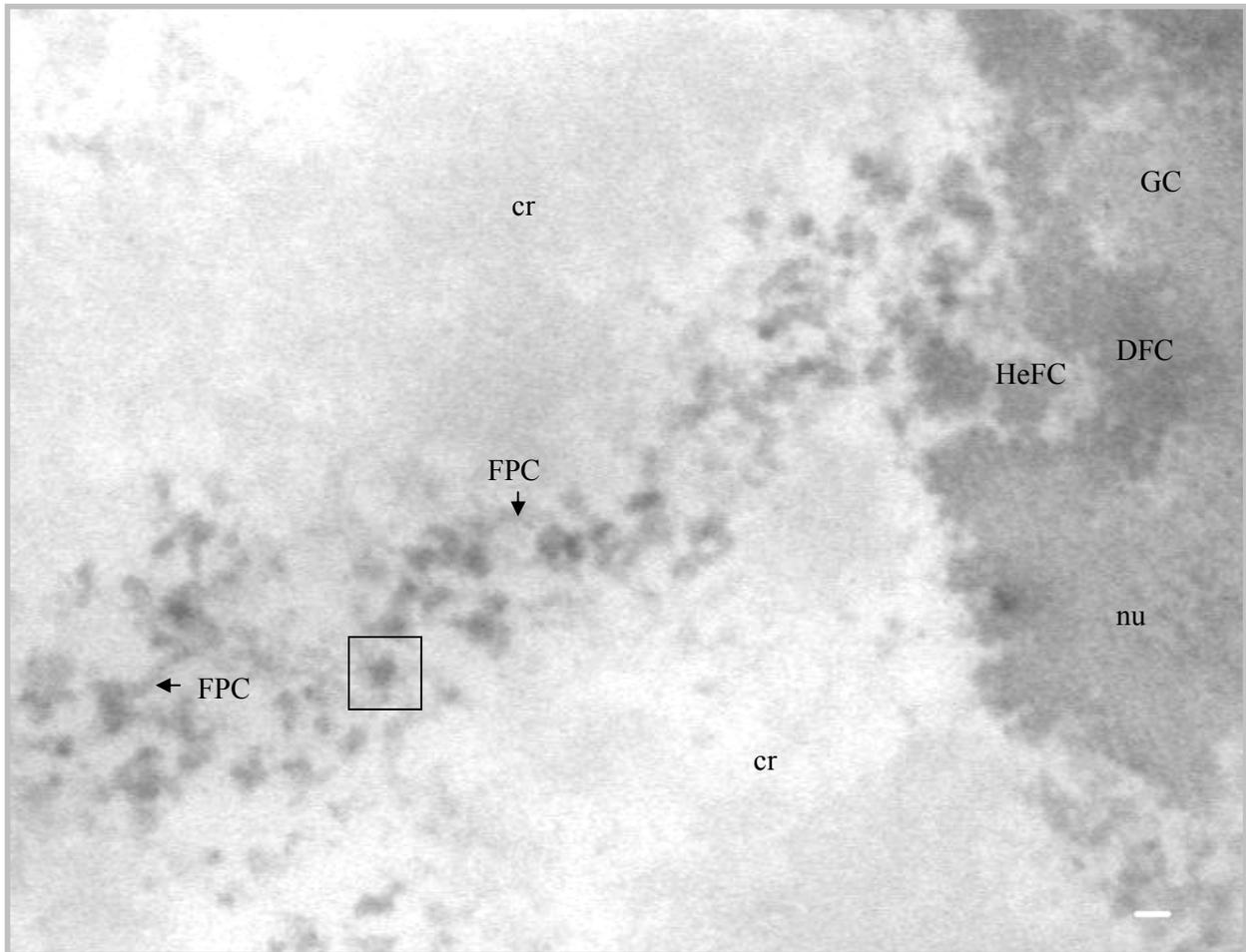


Figura 31. Se revelan gránulos de 32 nm de diámetro, mediante la quelación con EDTA, interconectados por fibras pericromatinianas. Una red fibrogranular se extiende a partir del nucléolo y entre las bandas de cromatina. nu, nucléolo; HeFC, centros fibrilares heterogéneos; DFC, componente fibrilar denso; GC, componente granular; cr, cromatina; FPC, fibras pericromatinianas las cuales interconectan partículas de 32 nm de diámetro (recuadro negro). Barra 30 nm.

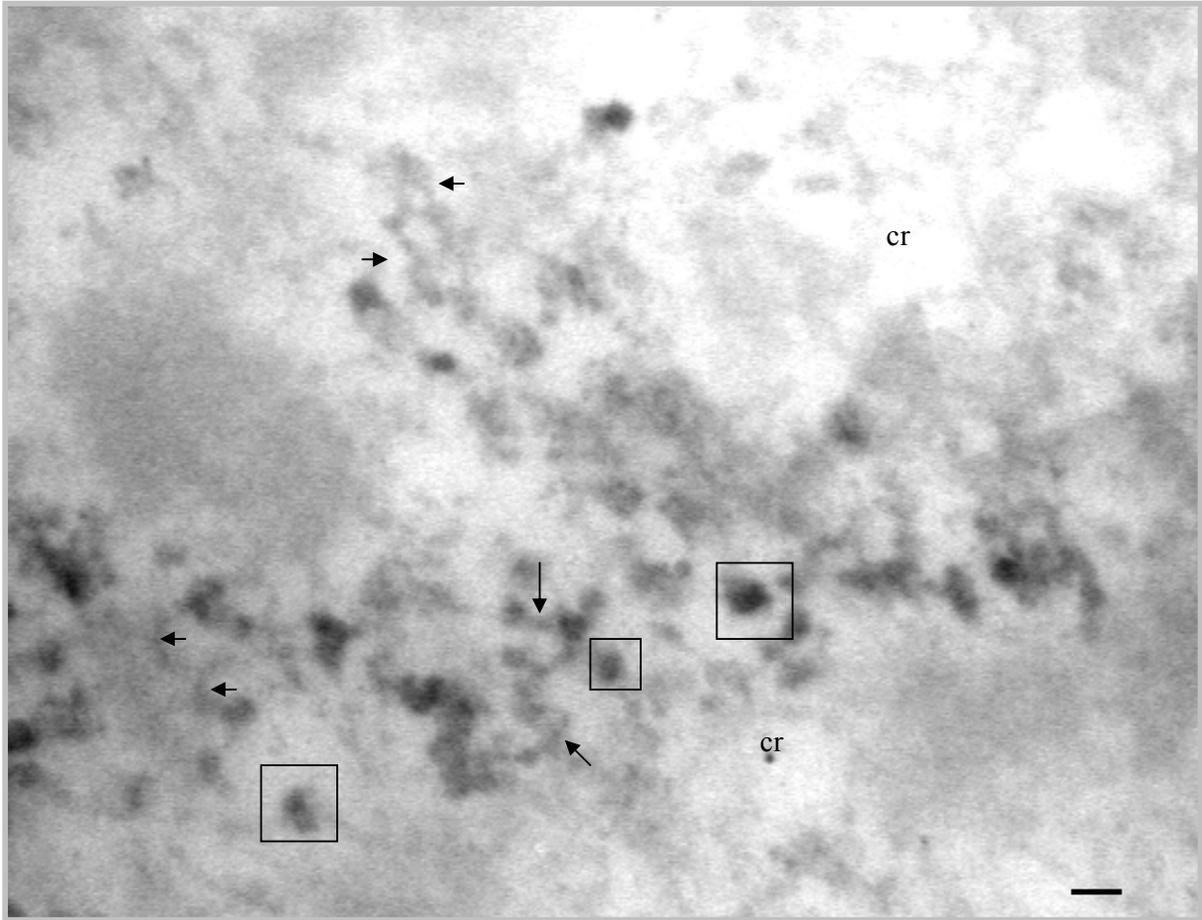


Figura 32. EDTA. Se observan partículas ribonucleoproteicas de 32 nm de diámetro unidas por fibras pericromatinianas. cr, cromatina; RNP, partícula ribonucleoproteica; la flecha indica gránulos interconectados mediante fibras pericromatinianas. Barra 30 nm.

7.3. Mitosis en *Taxodium mucronatum*.

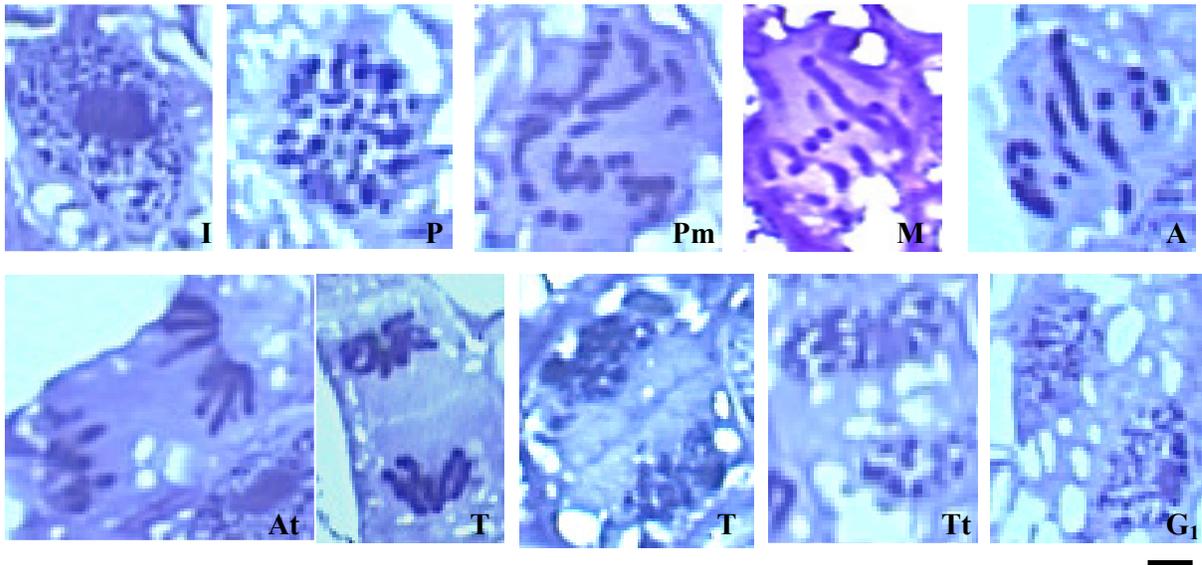


Figura 33. Fases de la mitosis en hojas de *T. mucronatum*, teñidas con azul de toluidina. (I) interfase, con un nucléolo hacia la parte central de la célula, muy prominente y activo; (P) profase, la cromatina comienza a condensarse para formar los cromosomas; el nucléolo se disgrega (Pm) prometafase, comienza con la ruptura de la envoltura nuclear, el nucléolo ya no es visible y los cromosomas son mas compactos y alargados; (M) metafase, los cromosomas están conectados unos con otros y han migrado al plano ecuatorial del huso mitótico, donde forman la placa metafásica, el citoplasma es menos denso; (A) anafase, se rompen las uniones entre los cromosomas y cada cromátida comienza su migración hacia sus respectivos polos de la célula; (At) anafase tardía, las cromátidas han alcanzado totalmente los polos; (T) telofase, hay una intensa secreción de vesículas hacia el plano ecuatorial de la célula, los cromosomas comienzan a descompactarse y son rodeados por la envoltura nuclear; (Tt) telofase tardía, la envoltura nuclear rodea totalmente a la masa de cromosomas en descompactación y el nucleoplasma se extiende como resultado del reinicio de la transcripción y los núcleos se alargan, el nucléolo reaparece; (C) citocinesis, se ha terminado la formación de la placa celular y en consecuencia separado los núcleos hijos, la célula entra en G₁, donde puede permanecer indefinidamente (G₀) o bien reiniciar el ciclo. Barra 2 μ m.

PROFASE.

La cromatina comienza a condensarse, el nucléolo y los materiales ribonucleoproteicos de los espacios pericromatinianos se disgregan (Figura 34, 35). La cromatina es cada vez más compacta, uniforme y esférica. Desaparece la cromatina asociada al nucléolo. El cuál es observado como un espacio claro, empaquetado en vesículas pálidas, algunas esparcidas por el nucleoplasma. La envoltura nuclear aún delimita al núcleo (Figuras 34, 35 y 36).

Conforme avanza la profase, se organizan los microtúbulos del citoesqueleto, para ensamblar el huso mitótico. En *T. mucronatum*, no se observan centriolos opuestos en cada polo.

Los cromosomas en compactación tienen un aspecto esponjoso, hay numerosos sitios no densamente empaquetados. Algunos de ellos pueden corresponder a regiones del nucléolo inactivo, que se restringen gradualmente en el cromosoma (Figura 35).

La síntesis de RNA y proteína disminuye aproximadamente en un 98%, ya que el material ribonucleoproteico en forma de gránulos es escaso en las regiones intercromatinianas. Se observan máximo 4 partículas ribonucleoproteicas de 32 ± 2 nm de diámetro, en un área de 2.89×10^6 nm². Del mismo modo se interrumpe la transcripción, puesto que se notan pequeños gránulos en proceso de formación entre 12 y 23 nm de diámetro (Figuras 36 y 37).

Este material en forma de gránulos, es atraído durante el empaquetamiento de la cromatina, por las fibras de 2 nm de ancho, que aún los conectan y rodean a los cromosomas conforme progresa la mitosis.

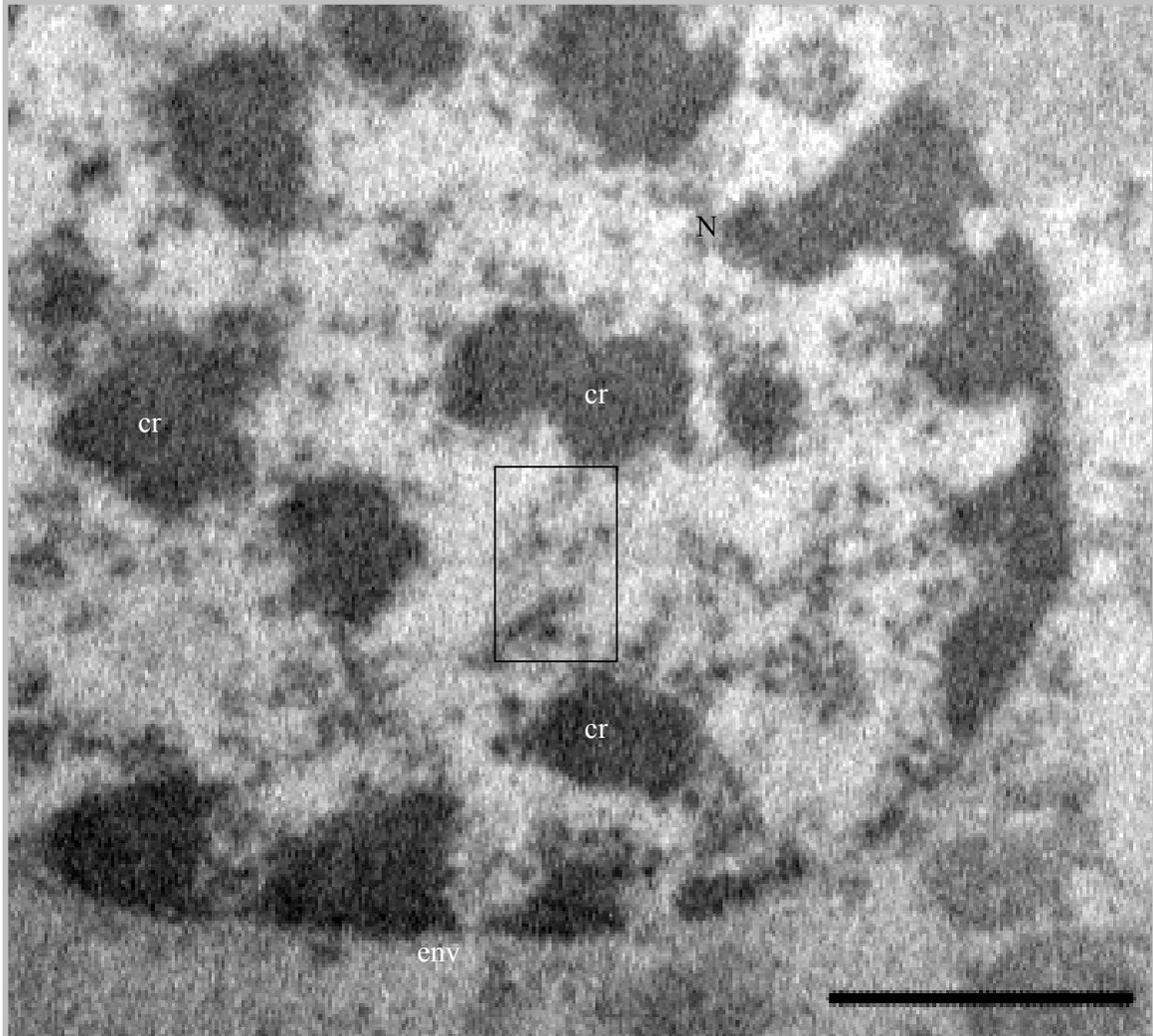


Figura 34. Núcleo de *T. mucronatun* en profase. Contraste general uranilo-plomo. La envoltura nuclear aún delimita el núcleo. Los cromosomas se tornan cada vez más aparentes. El nucléolo y las partículas ribonucleoproteicas se dispersan. N, núcleo; env., límite de la envoltura nuclear; cr, cromatina muy compacta y esferoidal; recuadro negro, escasas RNPs, en la región pericromatiniana. Barra 1 μm .

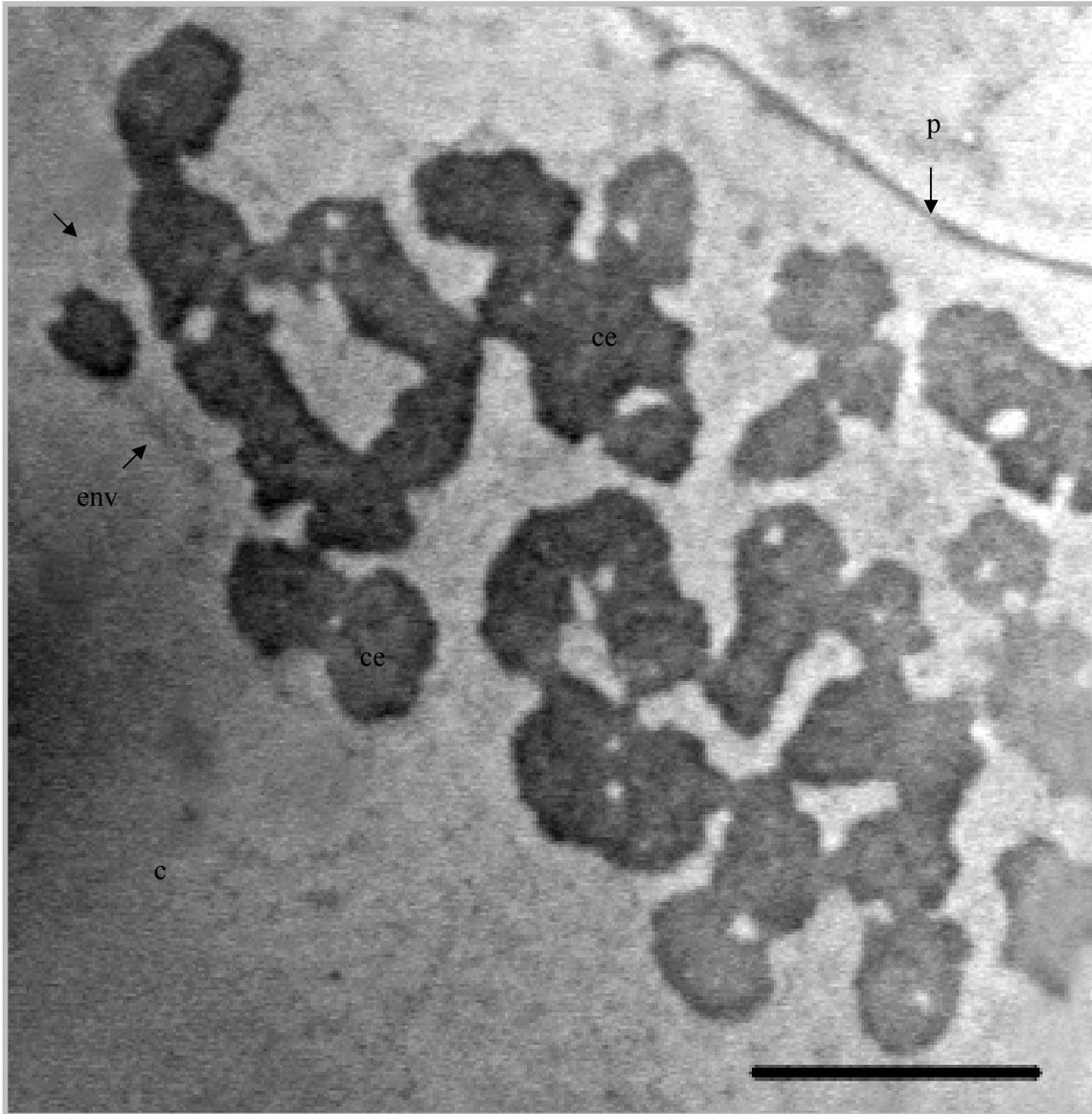


Figura 35. Los cromosomas en profase, parcialmente blanqueados, al emplear el método regresivo para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969); tienen una apariencia rugosa y esponjosa. Ce, cromosoma esponjoso; env., límite de la envoltura nuclear; p, pared celular; c, citoplasma. Barra 2 µm.

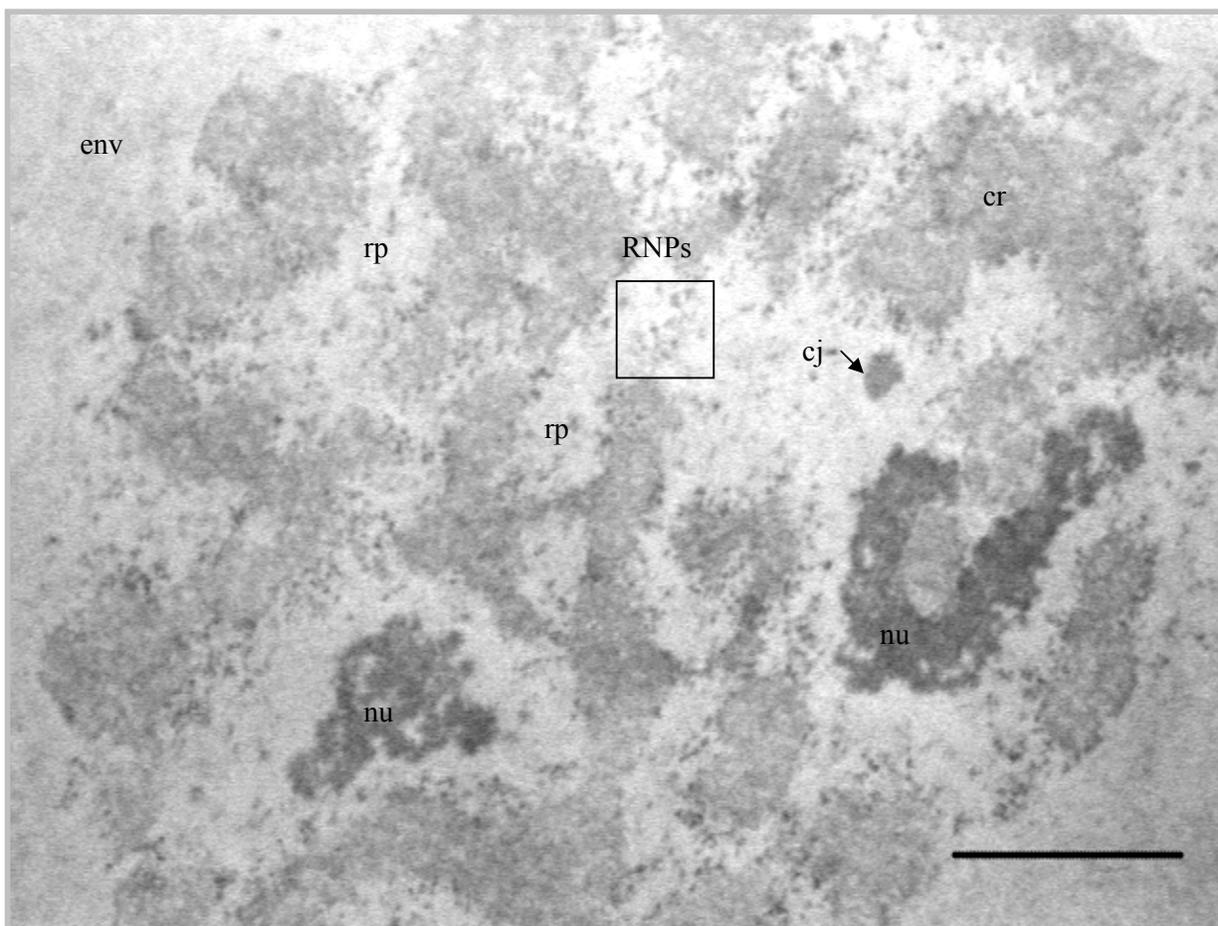


Figura 36. Núcleo en profase de *T. mucronatum*, EDTA. La cromatina comienza a condensarse, la envoltura nuclear permanece íntegra. El nucléolo y las ribonucleoproteínas se disgregan. env., límite de la envoltura nuclear; nu, nucléolo; cj, cuerpo de Cajal; cr, cromatina condensada; rp, región intercromatiniana; RNP, ribonucleoproteínas. Barra 2 μm .

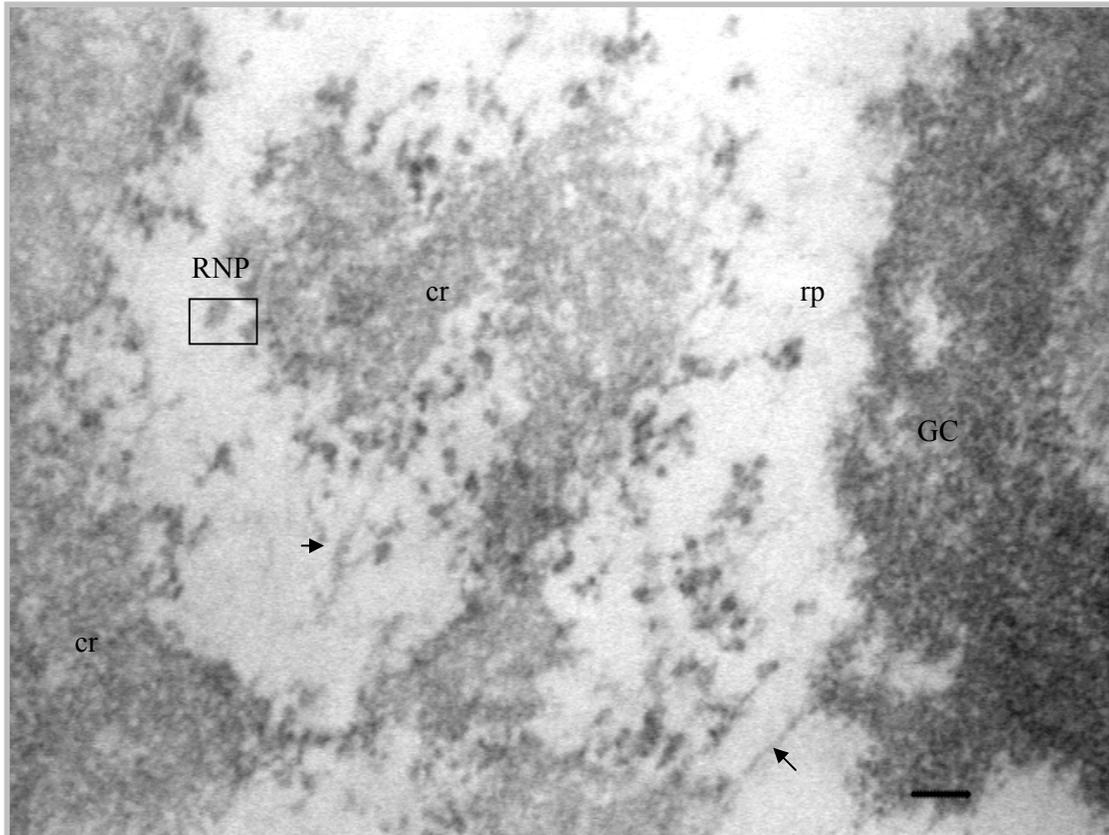


Figura 37. En la región intercromatiniana, en profase, las RNPs, de 32 nm de diámetro son escasas. GC; componente granular; cr, cromatina condensada; rp, región intercromatiniana; RNP, ribonucleoproteínas; las flechas indican delgadas fibras ribonucleoproteicas. Barra 100 nm.

PROMETAFASE.

La extensa fosforilación de la lámina nuclear concluye con la ruptura de la envoltura nuclear (Figura 38, inserto). Entonces los microtúbulos entran en contacto con los cinetocoros de cada cromátida hermana, que son orientadas hacia el centrosoma y posteriormente en la placa metafásica. El aspecto esponjoso de los cromosomas en profase, cambia a denso, mientras coalescen paulatinamente, y dan lugar a los cromosomas en metafase (Figuras 38 y 41).

El nucléolo se ha desvanecido completamente, vesículas pálidas se distinguen ocasionalmente en el nucleoplasma.

Los gránulos que rodean a los cromosomas, tienen en promedio 28 nm de diámetro, entre ellos, escasos son de 32 ± 2 nm y otros de 49 nm de diámetro (Figura 39). Estos últimos pueden corresponder a cromatina laxa en proceso de condensación, por lo cual el contraste preferencial para ribonucleoproteínas fue muy útil (Figura 39, inserto). Abundante material ribonucleoproteico converge a la periferia del cromosoma en enrollamiento (Figura 39).

La transcripción se ha interrumpido completamente, el nucléolo ya no es evidente, y escasas ribonucleoproteínas se observan próximas a los cromosomas. Los gránulos de 32 nm de diámetro han desaparecido en esta etapa. Y solo abundan de 9 a 14 nm y 25 nm de diámetro (Figura 40).

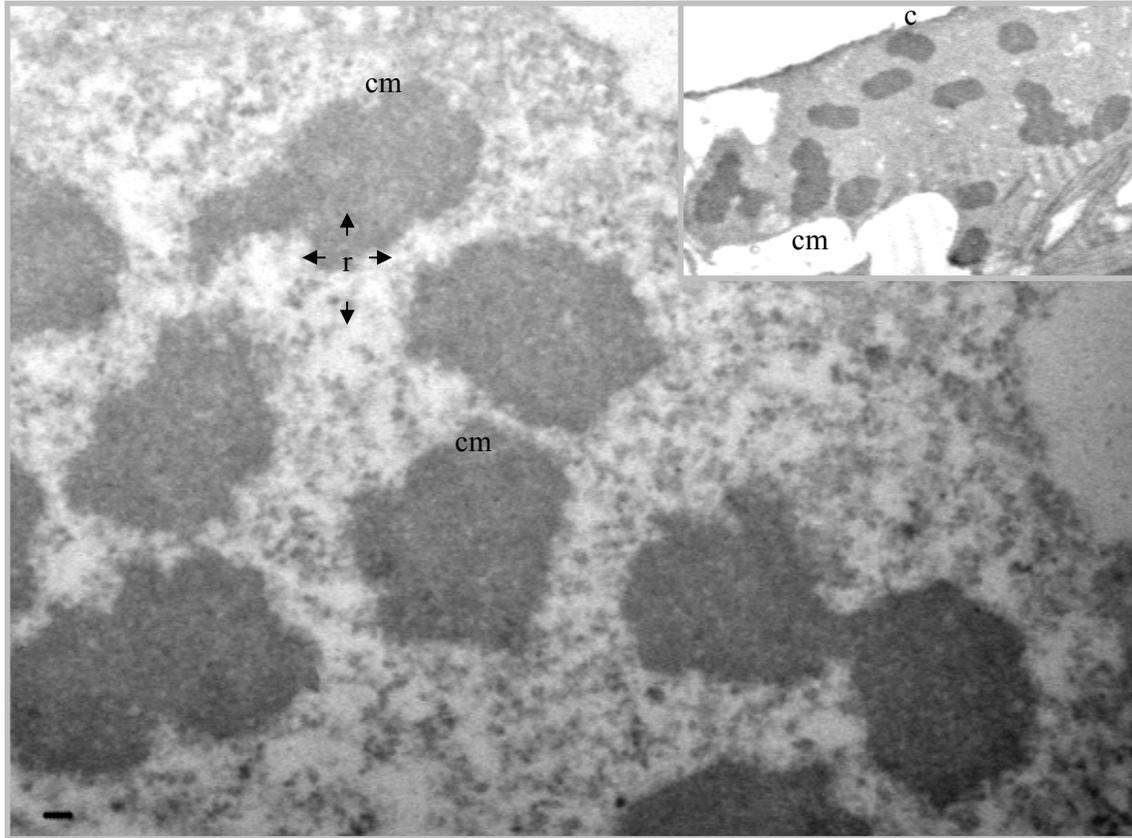


Figura 38. Prometafase. Contraste general uranilo-plomo. La envoltura nuclear se ha roto, y numerosas ribonucleoproteínas de 25 nm de diámetro rodean los cromosomas. Cm, cromosomas; c, citoplasma; r, ribosomas. En el inserto se observan 11 cromosomas (4C), característicos de *T. mucronatum*, esparcidos en el citoplasma, por la ruptura de la envoltura nuclear. Barra 50 nm.

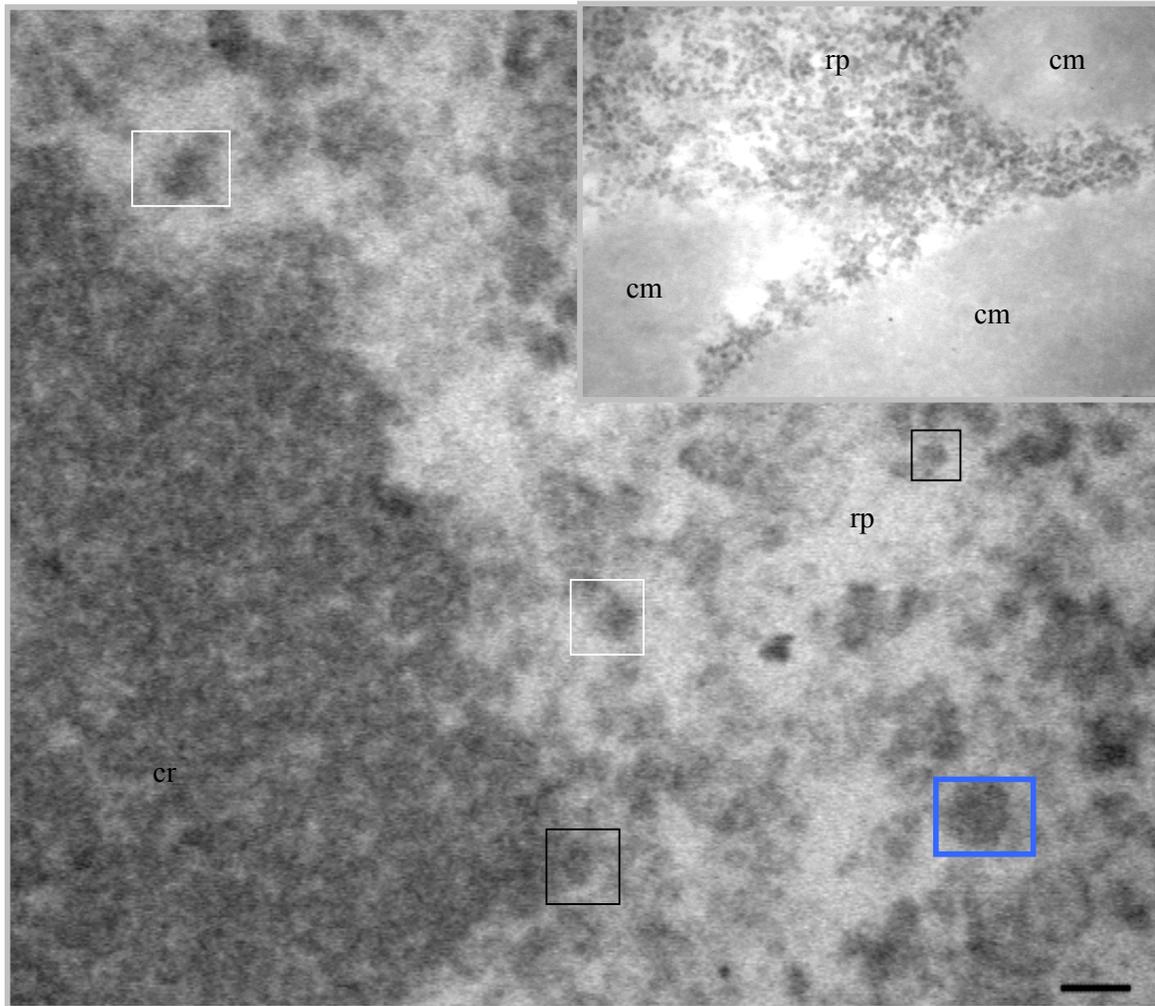


Figura 39. Borde de los cromosomas condensados en prometafase. Contraste uranilo-plomo. Obsérvese gránulos de diferente diámetro, se congregan hacia el cromosoma compacto. El inserto muestra que las ribonucleoproteínas contrastadas preferencialmente, tienden a agruparse hacia los bordes de los cromosomas. Cm, cromosoma, rp, región pericromatiniana; RNP de 26 ± 2 nm (recuadro negro), de 32 ± 2 nm (recuadro blanco), y más de 44 nm (recuadro azul) de diámetro. Barra 50 nm.

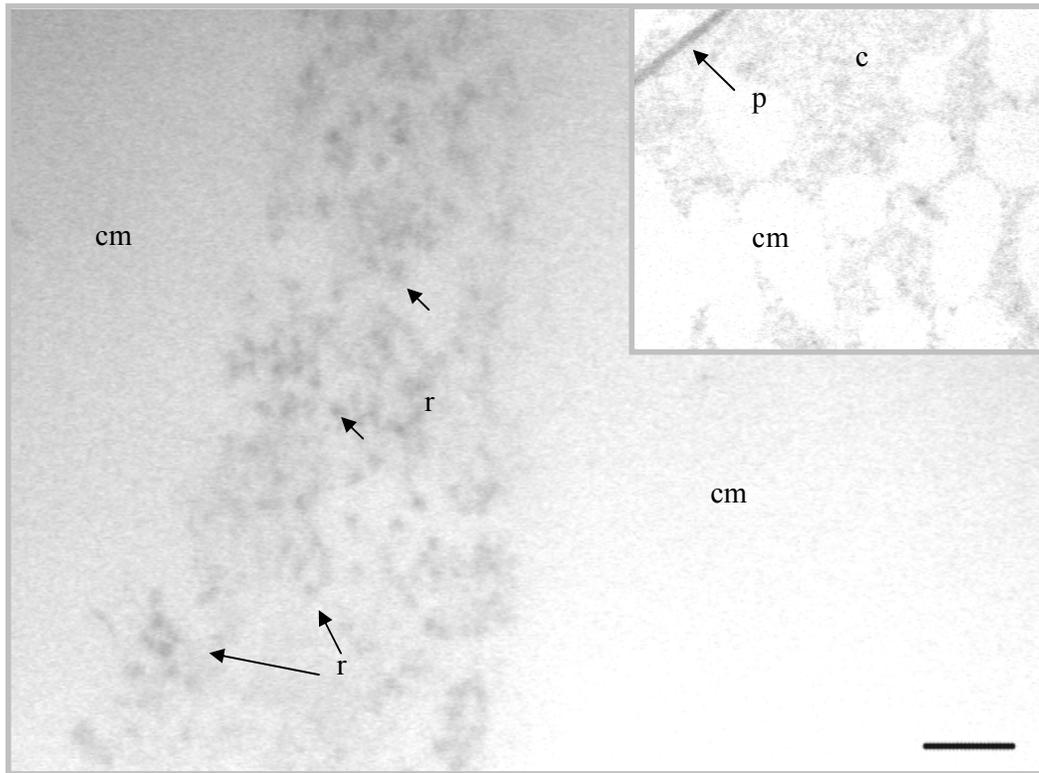


Figura 40. El contraste preferencial para ribonucleoproteínas, EDTA, denota únicamente la presencia de gránulos menores a 25 nm de diámetro y gránulos ribonucleoproteicos de 32 ± 2 nm de diámetro ya no son visibles. Inserto, la prometafase comienza con la ruptura de la envoltura nuclear, el citoplasma y numerosos ribosomas rodean a los cromosomas densos blanqueados. Cm, cromosoma; r, ribosomas; c, citoplasma; p, pared celular. Barra 50 nm.

METAFASE.

Una vez completada la unión de los microtúbulos del huso mitótico en ambas caras de los cinetocoros, los cromosomas son alineados equidistantemente entre sí y orientados en la placa metafásica, se realiza el chequeo de su unión correcta y comienzan a desplazarse hacia los polos opuestos.

Como en células de la cripta duodenal de ratón (Leblond y El-Alfy, 1998) los cromosomas en *T. mucronatum* están unidos entre sí, por puentes delgados de DNA (Figura 41).

Los cromosomas metafásicos se caracterizan por ser acumulaciones muy largas de cromatina, que se congregan gradualmente resultado de la fusión de los cromómeros (zonas claras dentro de los cromosomas), para formar la placa metafásica (Figura 41, inserto).

Los gránulos de 32 nm de diámetro no están presentes en regiones cercanas a los cromosomas, ni dispersos en el citoplasma (Figura 42, 43 y 44).

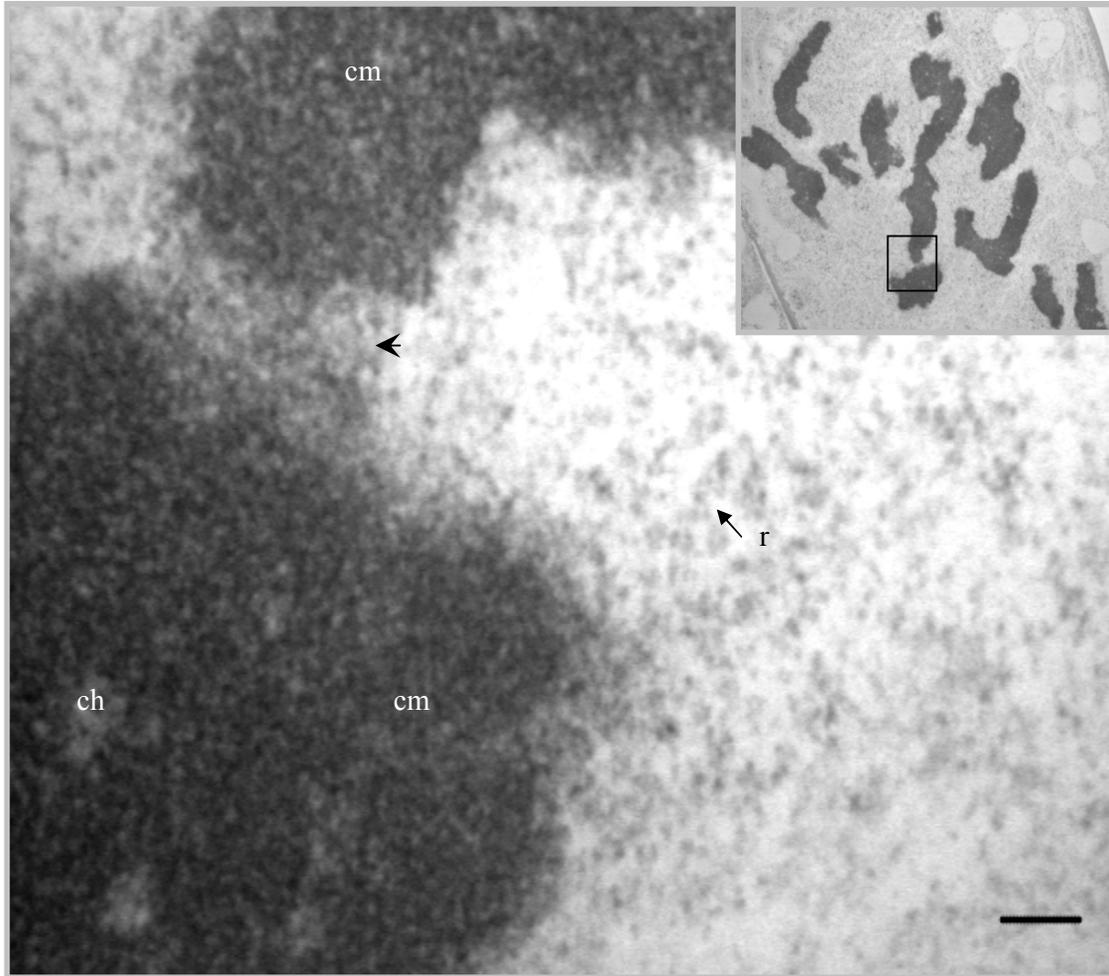


Figura 41. Metafase en *T. mucronatum*. El recuadro en el inserto señala la región ampliada, donde se notan la unión de los cromosomas por puentes de DNA y sitios no compactados totalmente dentro de ellos. Cm, cromosoma; cabeza de flecha, indica el puente de DNA; ch, acumulación esférica de cromatina lúcida o cromómero; r, ribosomas en el citoplasma que rodean los cromosomas. Barra 50nm.

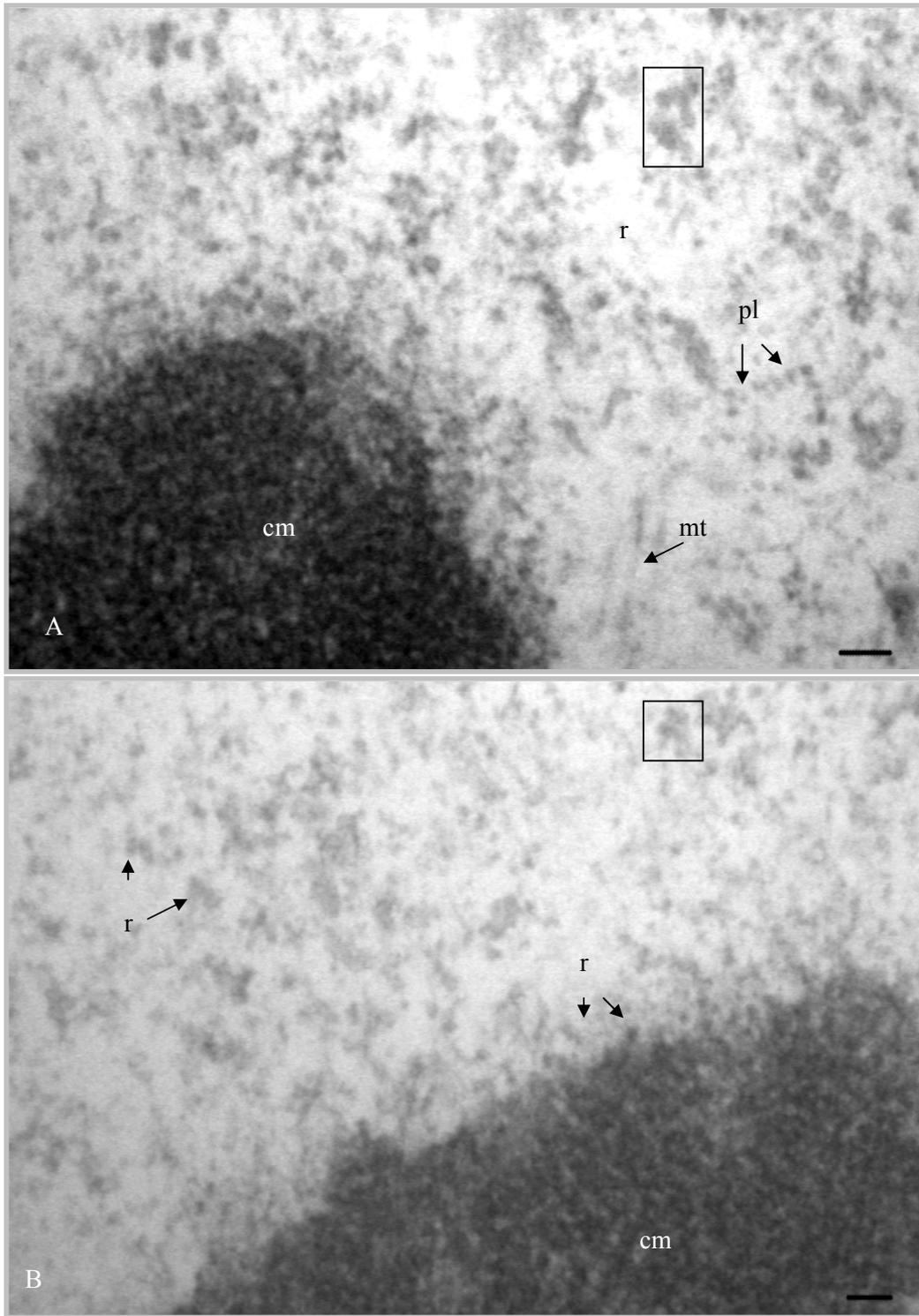


Figura 42. Abundantes ribosomas rodean a los cromosomas en metafase. (A) Gránulos de 12 a 22 nm y aglomerados de ribosomas de 37 nm de diámetro (recuadros). (B) Ribosomas de 14 a 24 nm de diámetro, adosados a la superficie de los cromosomas metafásicos. Cm, cromosomas; r, ribosomas; pl, polisomas; mt, microtúbulos Barra 50 nm.

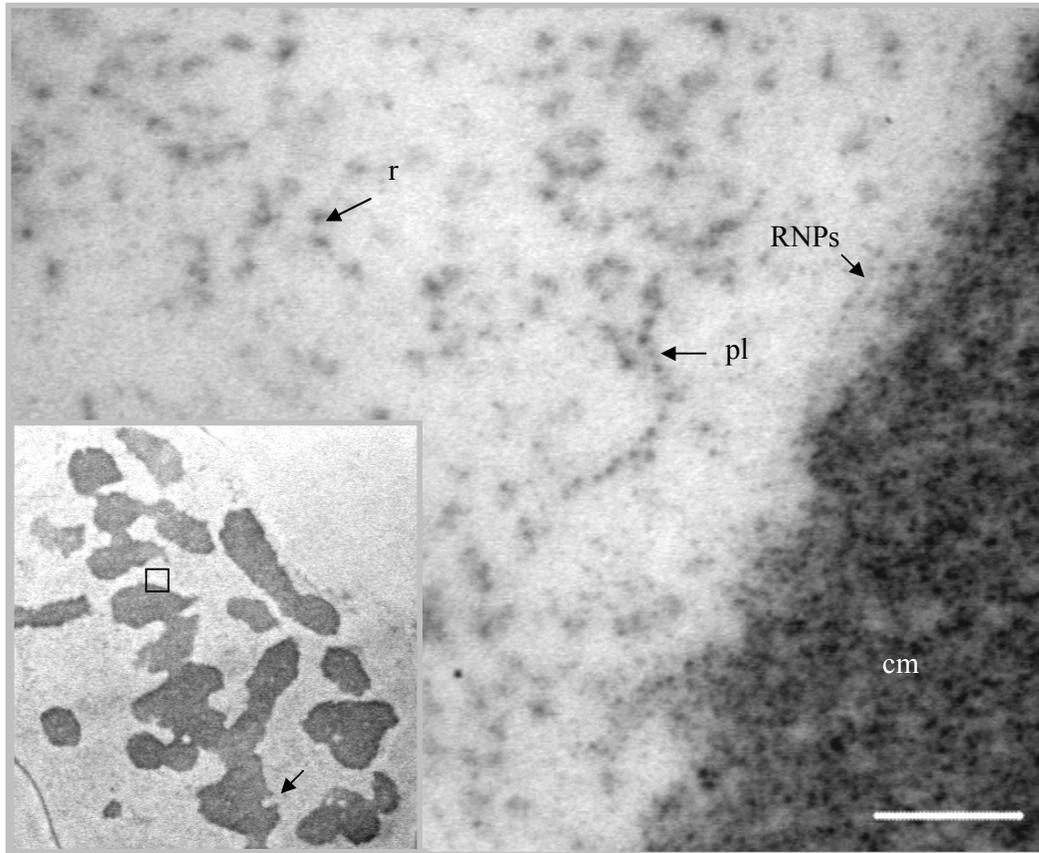


Figura 43. La cromatina levemente blanqueada, tiene ribonucleoproteínas que se adosan a ella. Una cadena de polisomas es claramente contrastada, otras ribonucleoproteínas de menor diámetro están adyacentes al cromosoma (RNPs). El inserto muestra la región a mayor aumento, con escasos cromómeros entre los cromosomas (flecha). Cm, cromosoma; r, ribosomas; pl, cadena de polisomas. Barra 100 nm.

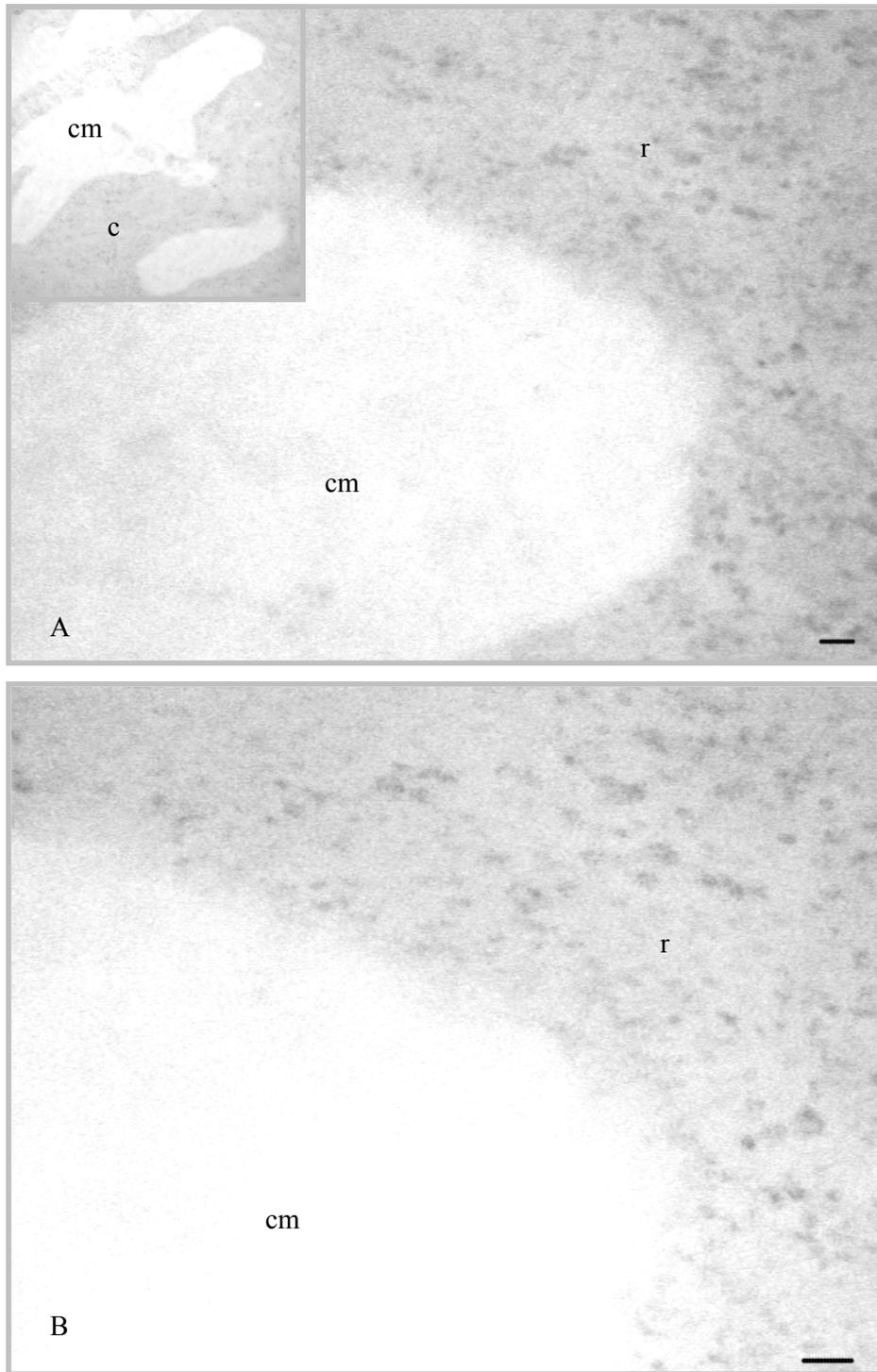


Figura 44. Los gránulos de 32 nm de diámetro son nulos en metafase. En (A) y (B), se observan los cromosomas en tonalidad más clara al resto de los componentes ribonucleoproteicos de 25 nm de diámetro. El inserto, célula en metafase. Cm, cromosoma; r, ribosomas, c citoplasma. Barra 50 nm.

ANAFASE.

Una vez superado el punto de chequeo SAC, y degradadas las cohesinas que unen las cromátidas hermanas, comienzan su migración gradual hasta alcanzar los polos de la célula (Figura 45).

Tardíamente, la separación es mayor conforme se elongan los microtúbulos polares, mientras se desensamblan los del cinetocoro. Posiblemente en esta etapa comienza el ensamble de la placa celular, para formar el fragmoplasto.

La transcripción se reactiva lentamente, el nucleoplasma es ligeramente opaco al haz electrónico, debido a la mayor densidad de ribonucleoproteína, en comparación con la metafase.

En sitios cercanos a las cromátidas, aparecen escasos gránulos de 32 nm de diámetro. Algunos comienzan a estructurarse en regiones laxas dentro de la cromatina (Figura 46, flecha blanca).

En anafase tardía, la estructura compacta de las cromátidas se vuelve muy esponjosa, puesto que son visibles más sitios redondeados, de menor densidad electrónica. Finalmente conforman un grupo denso, en el cual los cromosomas individuales no se distinguen, que a menudo se refiere como “masa cromosómica” (Figura 47).

Con el contraste preferencial para ribonucleoproteínas, se denota hacia la periferia de los cromosomas, escasas partículas de 32 nm de diámetro, similar a los gránulos pericromatinianos; por el contrario abundan las de 25 nm (Figuras 47, 48A, B y 49).

Una franja ribonucleoproteica se adosa en la superficie de los cromosomas, y viajan con ellos (Figura 48B).

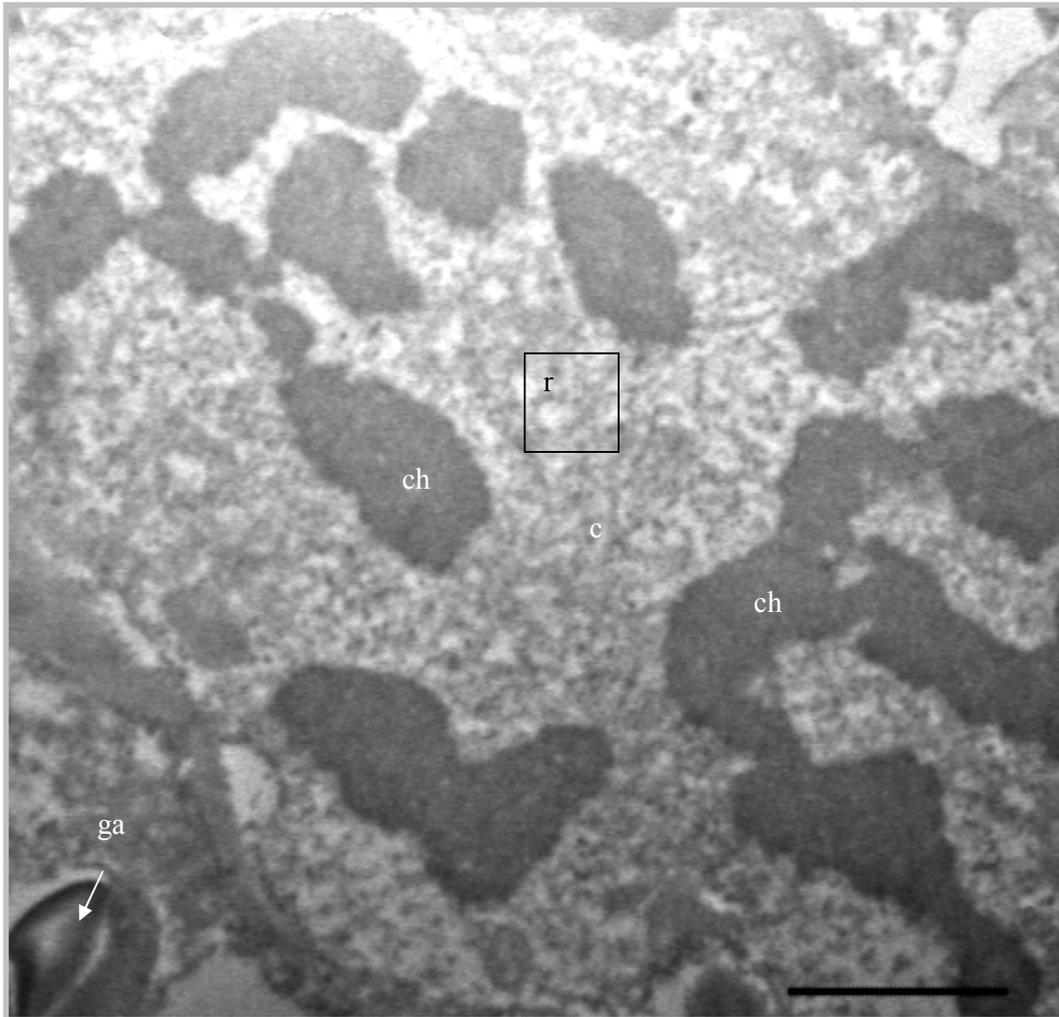
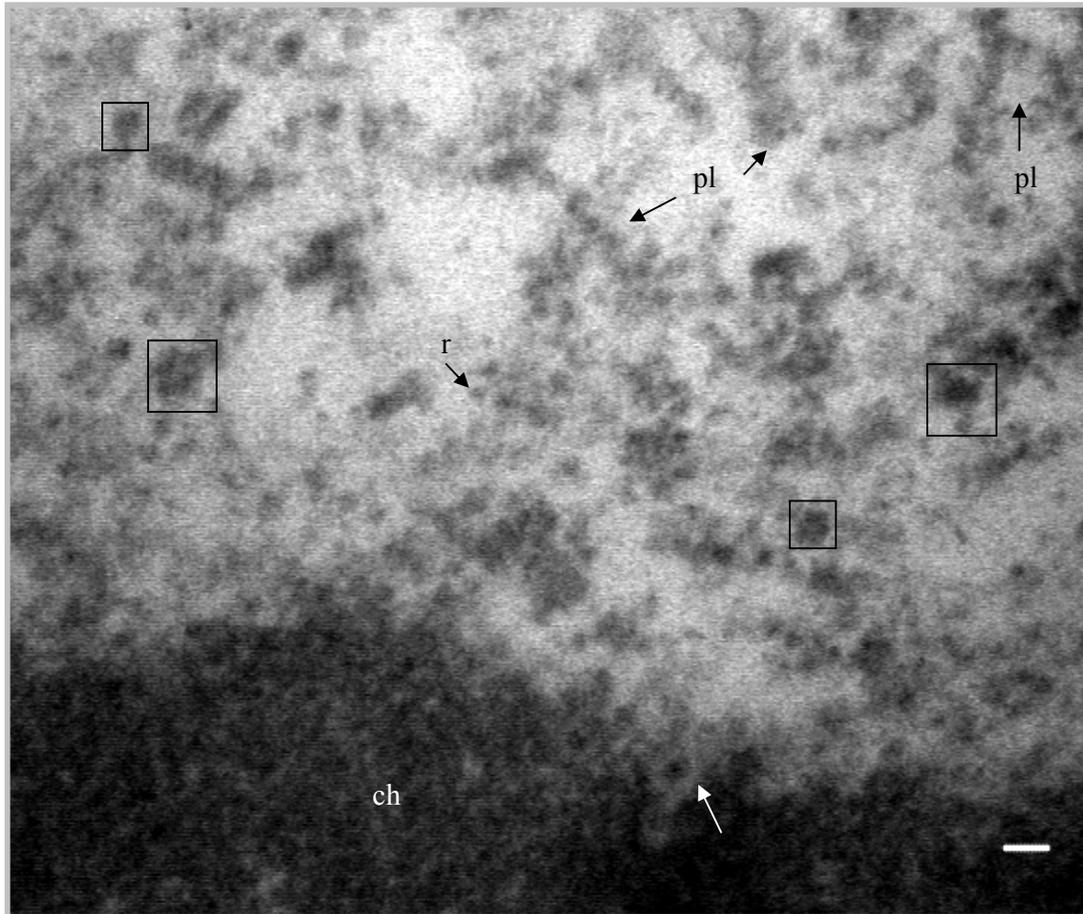


Figura 45. En anafase temprana, los dos grupos de cromosomas hijos migran a sus respectivos polos de la célula. Ch, cromátida; c, citoplasma, r, ribosomas; ga, grano de almidón dentro de un cloroplasto. Barra 2 μ m.



46. Anafase tardía, partículas de 26 nm de diámetro se encuentran cercanas a la cromatina compacta y las de 32 ± 2 nm (recuadro) algo distantes. Se reactiva lentamente la transcripción y la maduración del transcrito, no siempre es cotranscripcional. Ch, cromátida; r, ribosomas; pl, polisomas. Barra 50 nm.

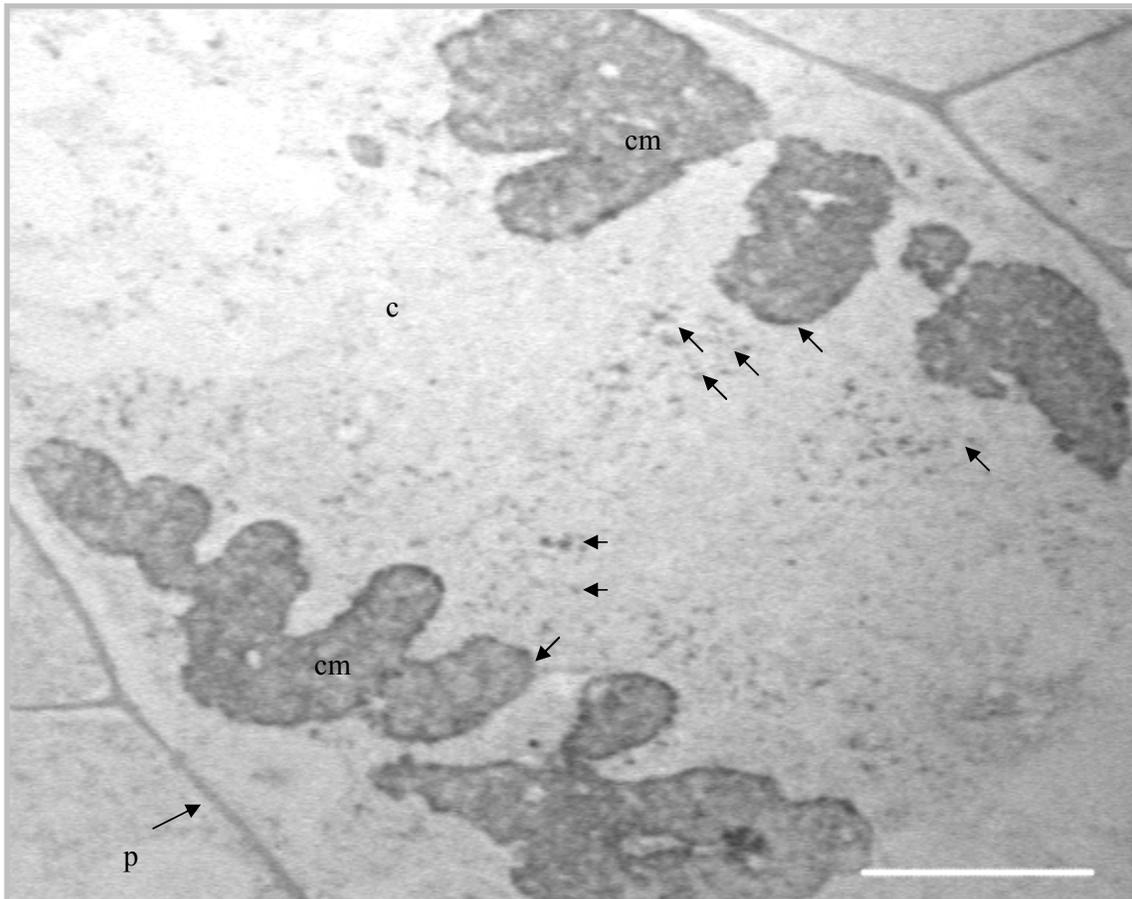


Figura 47. Anafase tardía, EDTA. Los dos grupos de cromátidas se han desplazado totalmente hacia los polos opuestos de la célula. Un material granular ribonucleoproteico se desplaza con ellos (flechas cortas). Cm; cromosomas, c, citoplasma; p, pared celular. Barra 2 μ m.

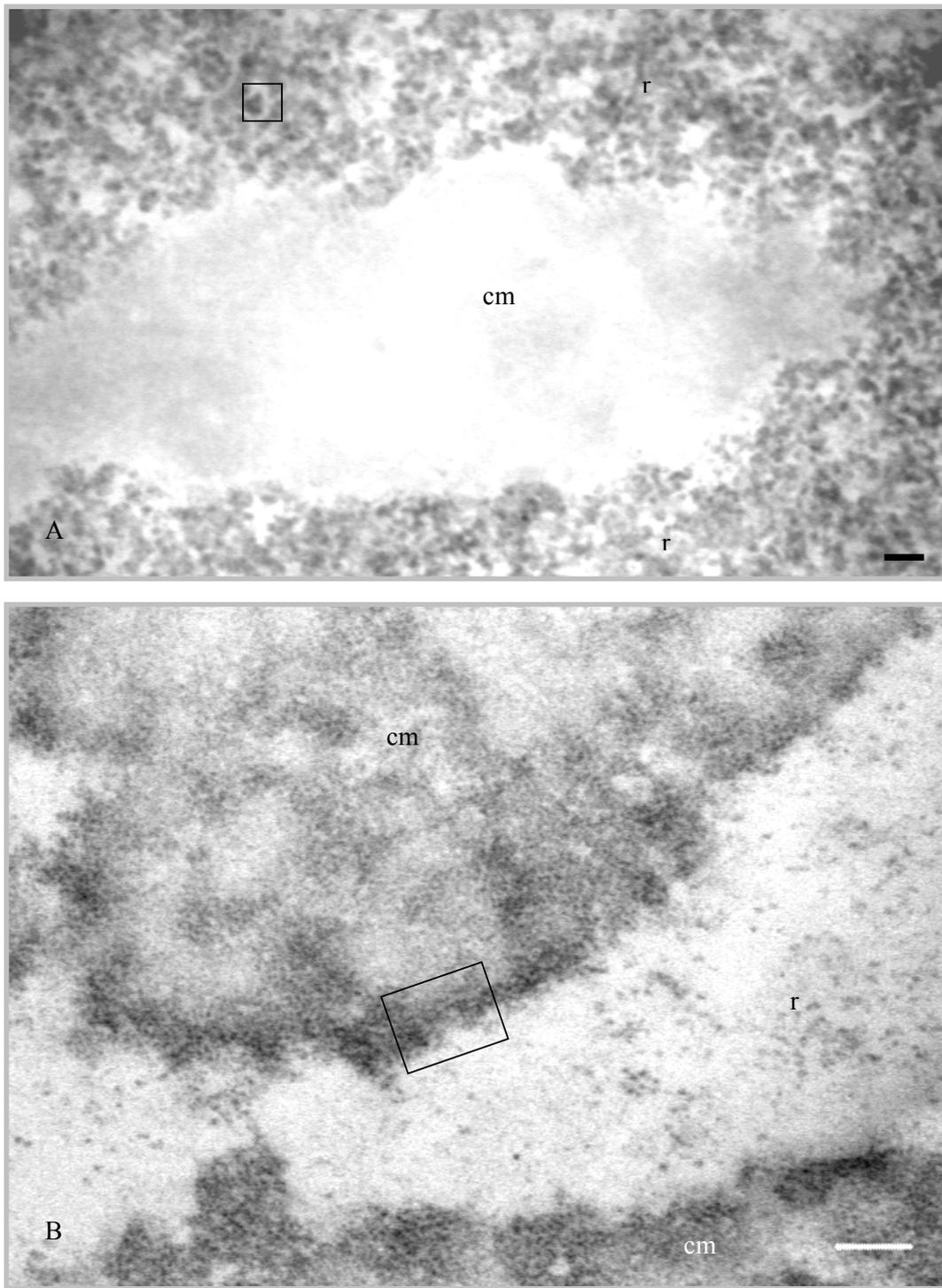


Figura 48. (A) Cromosoma anafásico, rodeado por abundantes ribosomas. Pocos gránulos de 32 nm son visibles (recuadro). Barra 50 nm. (B) Cromátidas ubicadas en un polo celular durante la anafase tardía. Nótese el leve borde de proteínas, adosado en la periferia de los cromosomas (recuadro), revelado con el contraste regresivo para ribonucleoproteínas. Cm, cromosomas; r, ribosomas. Barra 500 nm.

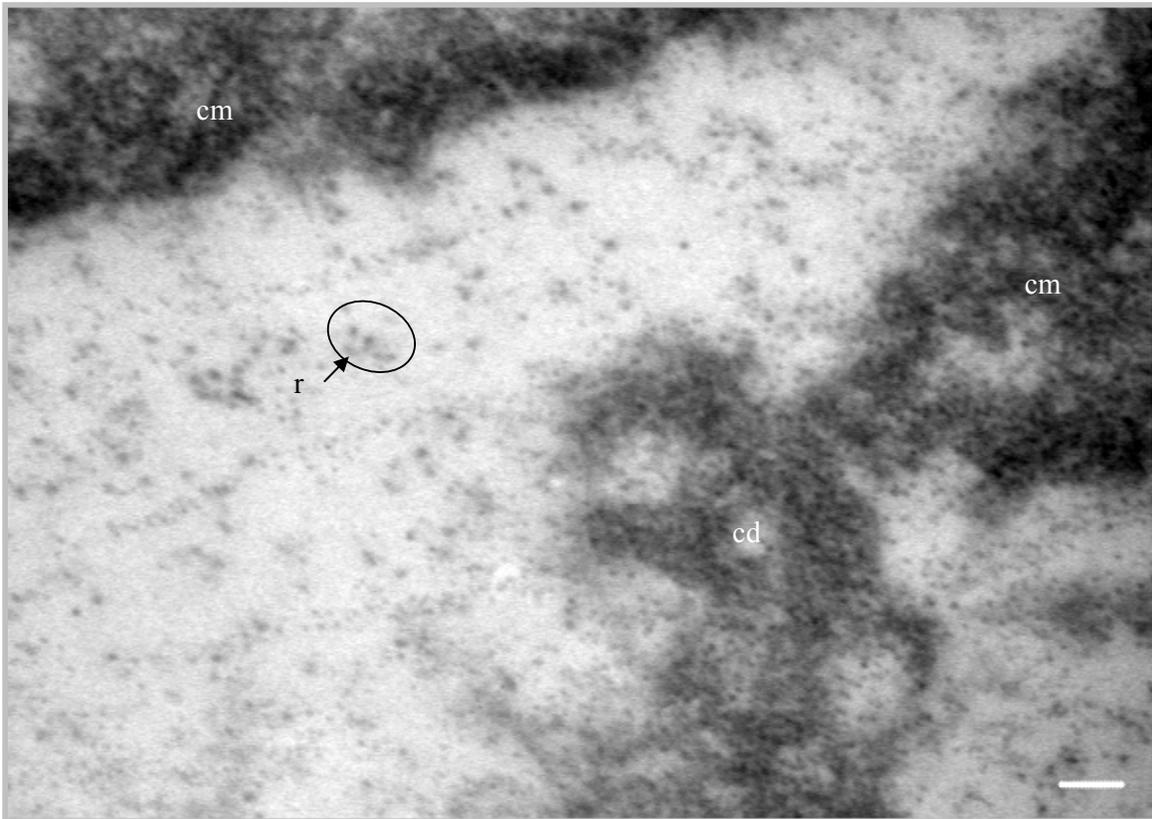


Figura 49. Región de una cromátida en proceso de descompactación. Proteínas unidas en la periferia de los cromosomas son transportadas con ellos. La transcripción aún no se ha activado y ribosomas ocupan los espacios entre cromátidas. Cm, cromosoma; cd, cromatina laxa; r, ribosomas (óvalo). Barra 50 nm.

TELOFASE.

La telofase, comienza cuando la “masa cromosómica”, es rodeada por la envoltura nuclear. Los cromosomas han alcanzado totalmente los polos y los microtúbulos continúan su despolimerización. La citocinesis es más evidente, por la secreción de abundantes vesículas en el plano ecuatorial del huso, antes sitio de superposición de los microtúbulos polares. Las vesículas se fusionan y dan origen a la placa celular, donde continúan depositándose materiales celulósicos para la formación de la pared (Figura 50).

En *T. mucronatum*, como en el resto de los vegetales, no se observaron centriolos; pero se notan cuerpos densos, en ambos polos que congregan a los cromosomas, posiblemente corresponden a sitios ricos en γ -tubulina, y funcionan como centros organizadores de los microtúbulos para la formación del huso.

La transcripción incrementa, conforme avanza la telofase y numerosos gránulos de 32 ± 2 nm de diámetro, se extienden en la periferia de la cromatina en descompactación (Figuras 50 y 51).

En telofase tardía, las lamininas desfosforiladas, convergen alrededor de los cromosomas, y reensamblan la lámina nuclear, en cada conjunto de cromosomas, proceso denominado cariocinesis. La formación de la envoltura nuclear, excluye a las proteínas de la célula, excepto las adosadas a la superficie de los cromosomas (Figura 52). El ensamble total de la envoltura nuclear, parece incrementar la compactación de la cromatina, a tal grado que el volumen nuclear en las telofases en células de mamífero, se estima en $25 \mu\text{m}^3$, en vegetales se desconoce.

Al final de la telofase, los cromosomas se tornan algo difusos y se distribuyen cada uno en su región cromosómica dentro del núcleo, para estructurar nuevamente la red de DNA y proteínas. Una cantidad mínima de nucleoplasma es retenido dentro de la masa cromosómica. Conforme avanza la telofase tardía, se expanden los espacios nucleoplásmicos y como resultado el volumen nuclear se alarga. Los núcleos, adquieren una forma característica arriñonada (Figuras 52, 53). La masa cromosómica es rota en varios trozos irregulares. La síntesis de proteínas y RNAs, cada vez mayor, se refleja en los numerosos transcritos que comienzan a acumularse entre las bandas de cromatina compacta-laxa (Figuras 50, 51, 52 y 53).

El nucléolo reaparece e incrementa su tamaño gradualmente, conforme es reestablecida la transcripción de sus genes ribosómicos (Figura 52). La expresión de los genes en sus tres componentes es total, ya que se observa el componente granular, el más prominente de todos y varios centros heterogéneos fibrilares (Figura 52).

Las RNPs, adosadas a los cromosomas durante la mitosis, posiblemente funcionan como una herencia ribonucleoproteica a corto plazo, útil para la síntesis de proteínas que se requieren de inmediato una vez que la célula ha concluido la mitosis, mientras se prepara para reiniciar la transcripción o reactivación de ciertos genes en cada territorio cromosómico (Figuras 50 y 52).

Avanzada la telofase tardía, en el nucléolo, el componente granular ocupa mayor volumen dentro del núcleo. Los transcritos primeramente sintetizados emergen en los bordes de los cromosomas (Figura 52, 54 y 53 insertos). Abundantes ribonucleoproteínas de 32 ± 2 nm de diámetro se ubican en el nucleoplasma e inclusive algunos están en proceso de maduración, puesto que finas fibrillas los unen con los cromosomas (Figuras 55, 56).

Una vez reestablecido el nivel de síntesis normal de los diversos transcritos, la morfología del núcleo celular se vuelve más esférica, clásica de un núcleo en G_1 . Ya sea para iniciar un nuevo ciclo mitótico o permanecer en reposo indefinidamente, o hasta ser estimulado por el ambiente (Figura 57).

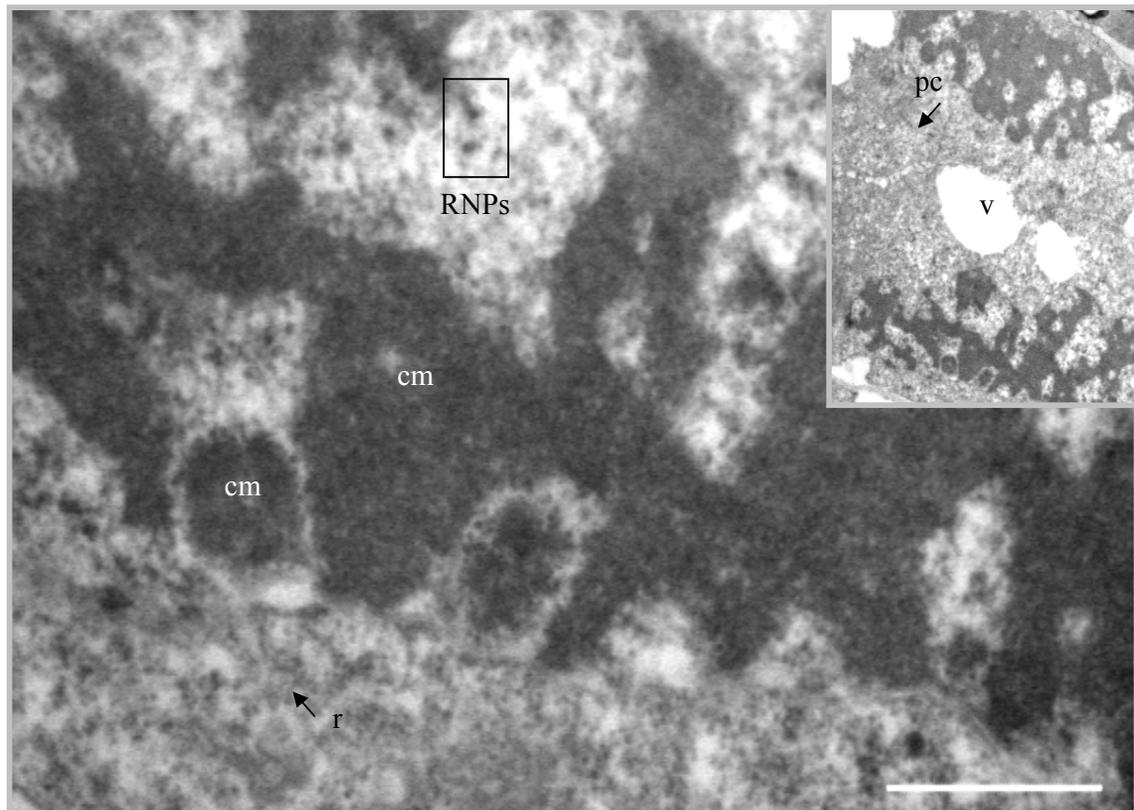


Figura 50. Telofase temprana. Contraste general uranilo-plomo. Los cromosomas y su material adosado se descondensan y comienza la transcripción. En el inserto, se observan vesículas de secreción del aparato de Golgi, para la formación de la pared celular situadas en el plano medio de la célula. Cm; cromosomas desenrollándose; v, vesículas; RNPs, de 32 nm de diámetro; pc, placa celular; r, ribosomas. Barra 500 nm.

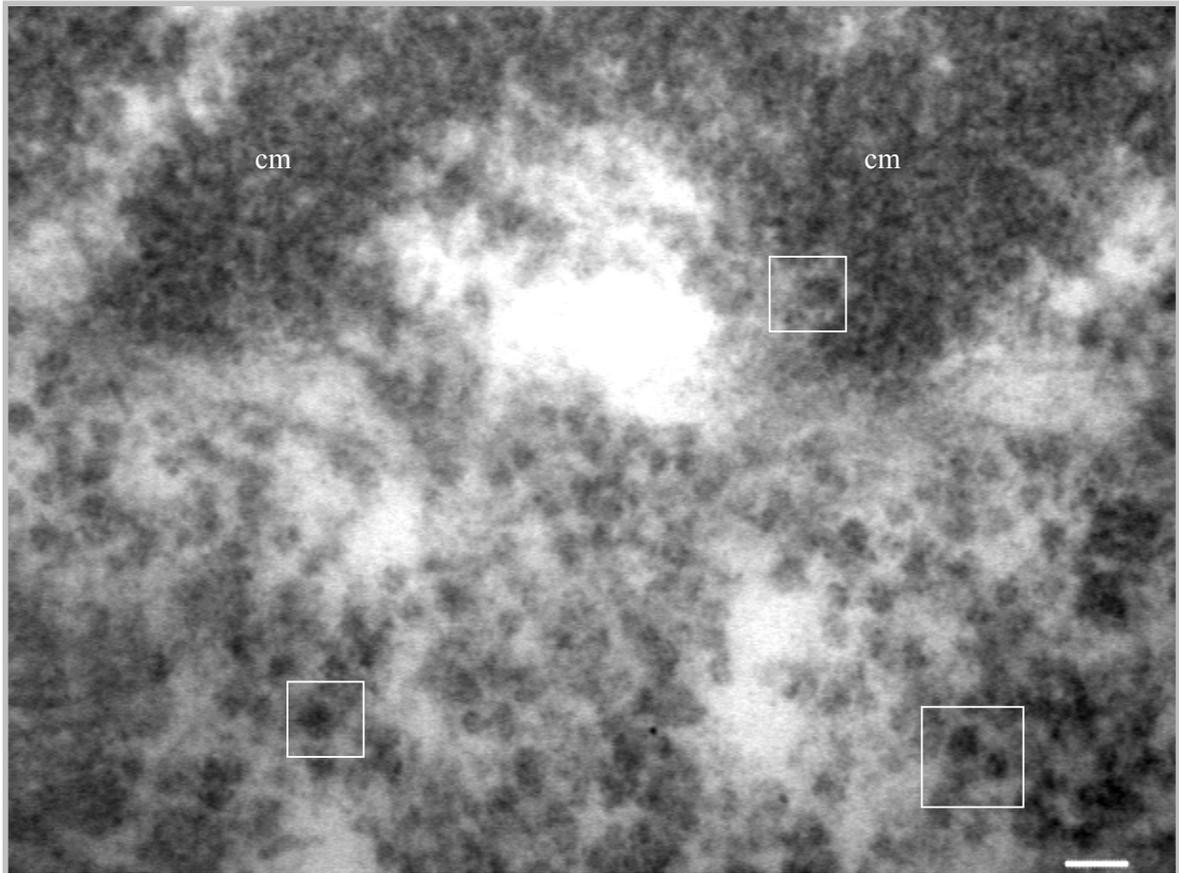


Figura 51. En telofase, la transcripción se reinicia abruptamente. Gránulos de 32 nm de diámetro son abundantes nuevamente. Cm; cromosomas desenrollándose; RNPs, de 32 nm de diámetro. Barra 50 nm.

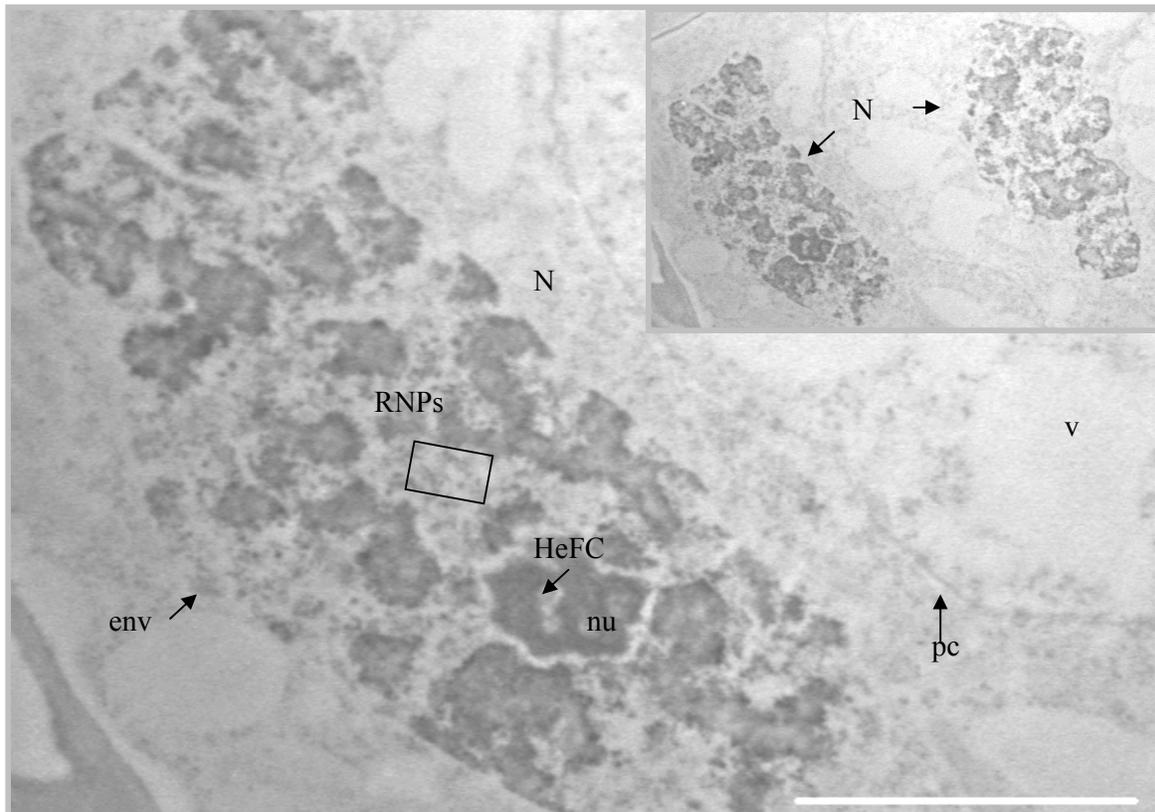


Figura 52. Telofase tardía. EDTA. Se reanuda la transcripción (RNPs), la envoltura nuclear rodea a los cromosomas cada vez menos densos y cada núcleo hijo, tiene una forma característica de “riñón”. El inserto, muestra la morfología distintiva de dos núcleos en telofase tardía, más evidente en el de la derecha. N, núcleo de telofase tardía de forma arriñonada; nu, nucléolo; HeFC, centros fibrilares heterogéneos; env., límite de la envoltura nuclear; pc, placa celular, v, vesículas provenientes del aparato de Golgi, Barra 2 μ m.

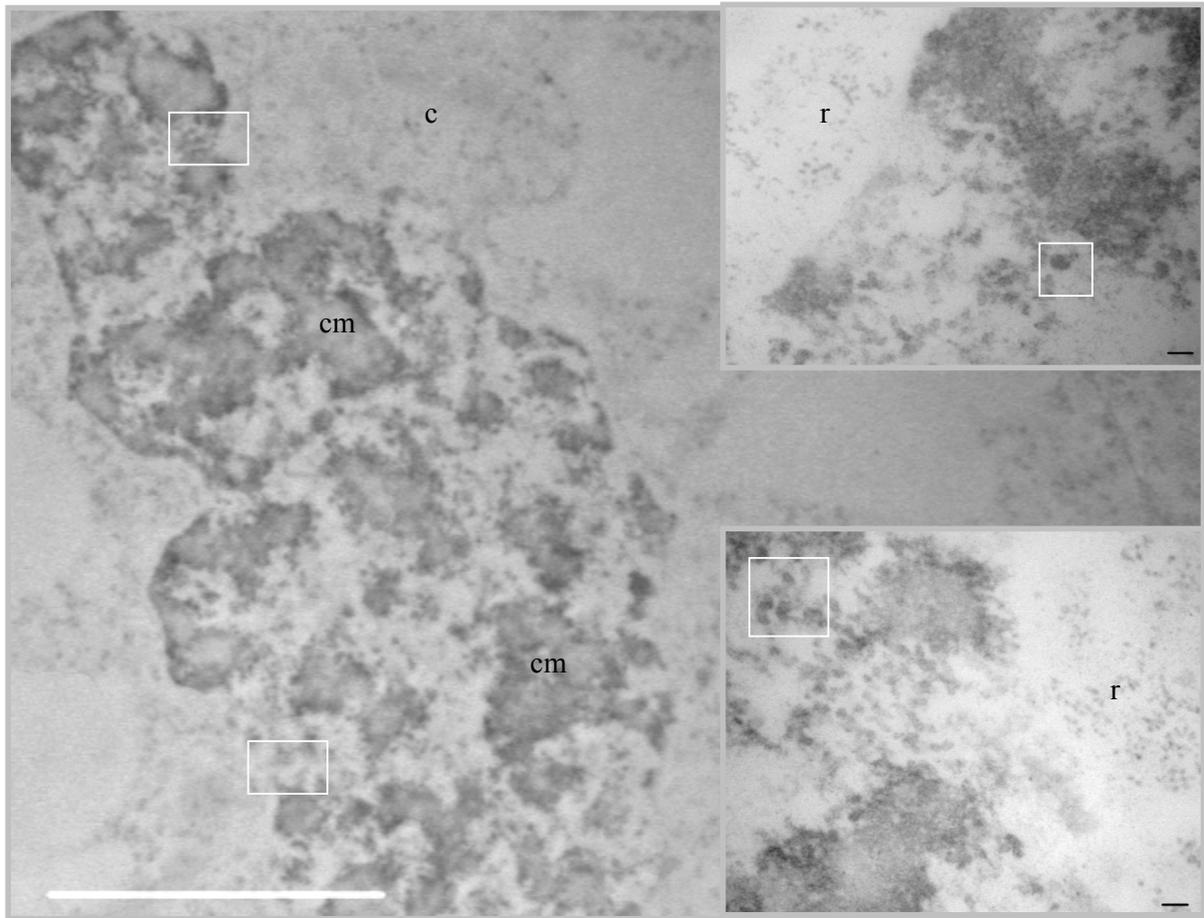


Figura 53. Regiones dentro de un núcleo en telofase tardía, cuyos espacios intercromosómicos están ocupados por ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro (recuadros blancos). Cm, cromosomas; r, ribosomas; c, citoplasma. Barra 2 μ m. Insertos 50 nm.

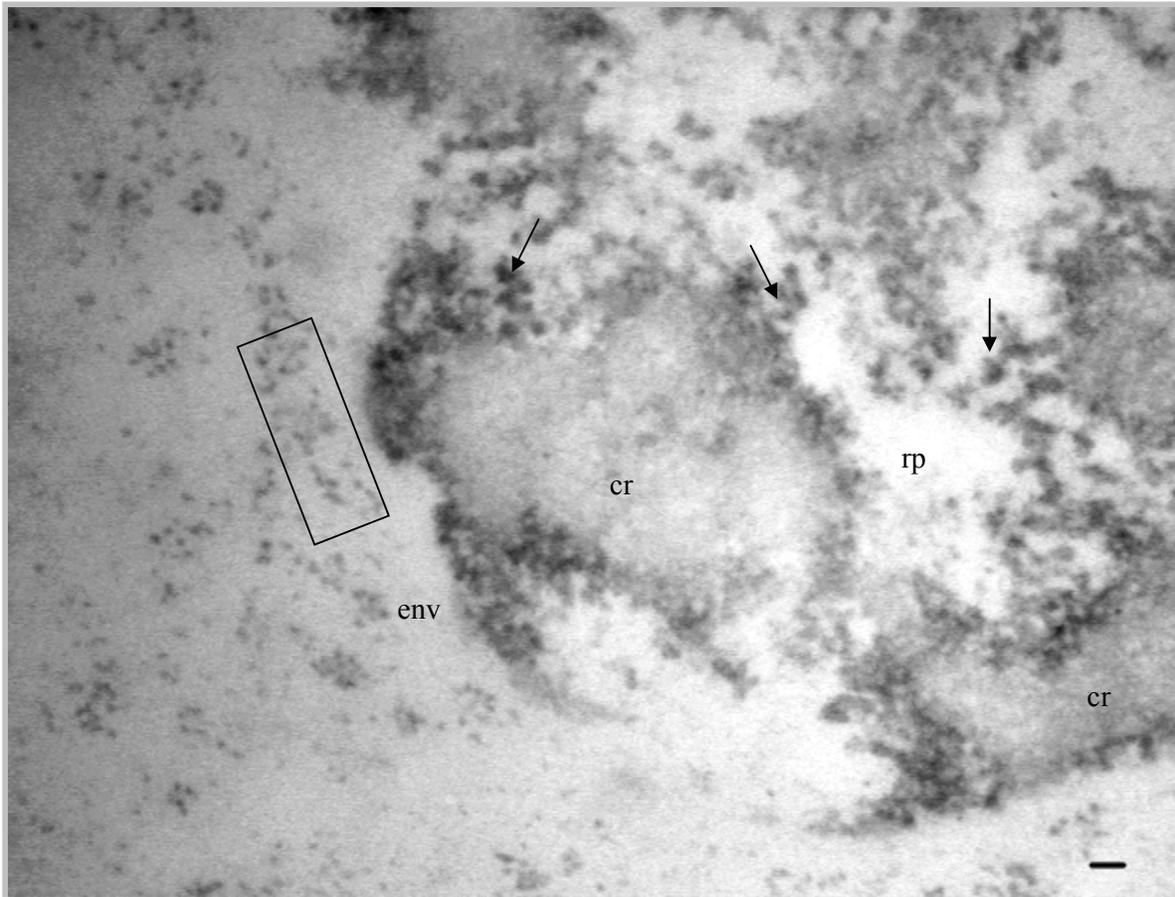


Figura 54. Región de cromatina que reanuda su transcripción. Numerosos RNAs están en etapas tempranas de maduración (flechas negras). La envoltura nuclear delimita el núcleo en telofase. Cr, cromatina; rp, región pericromatiniana; env., límite de la envoltura nuclear; r, ribosomas (rectángulo). Barra 50 nm.

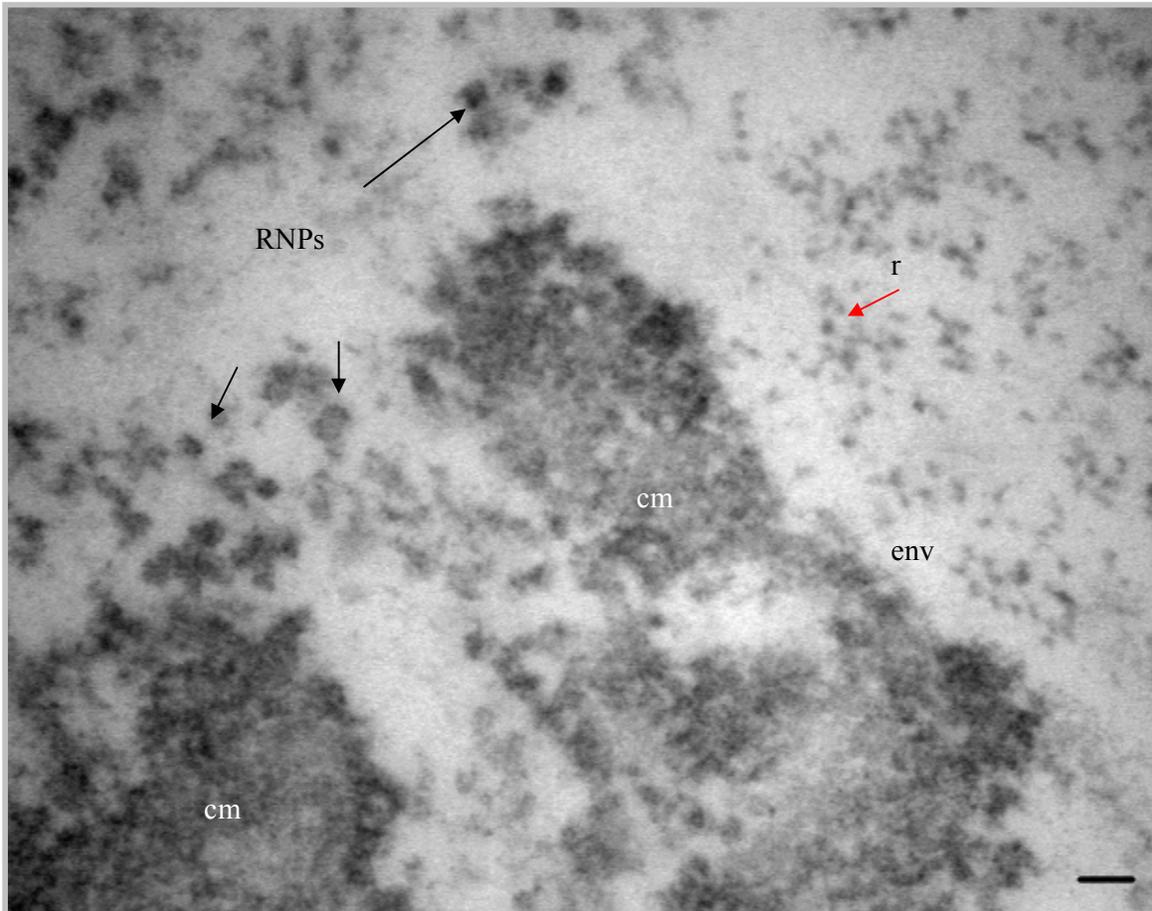


Figura 55. Gránulos ribonucleoproteicos de 32 nm de diámetro en la región intercromatiniana, emergen de los cromosomas telofásicos, en descompactación. Cm, cromosoma parcialmente blanqueado; RNP, ribonucleoproteínas (flechas negras) de 32 nm; env., límite de la envoltura nuclear; r, ribosomas (flecha roja). Barra 50 nm.

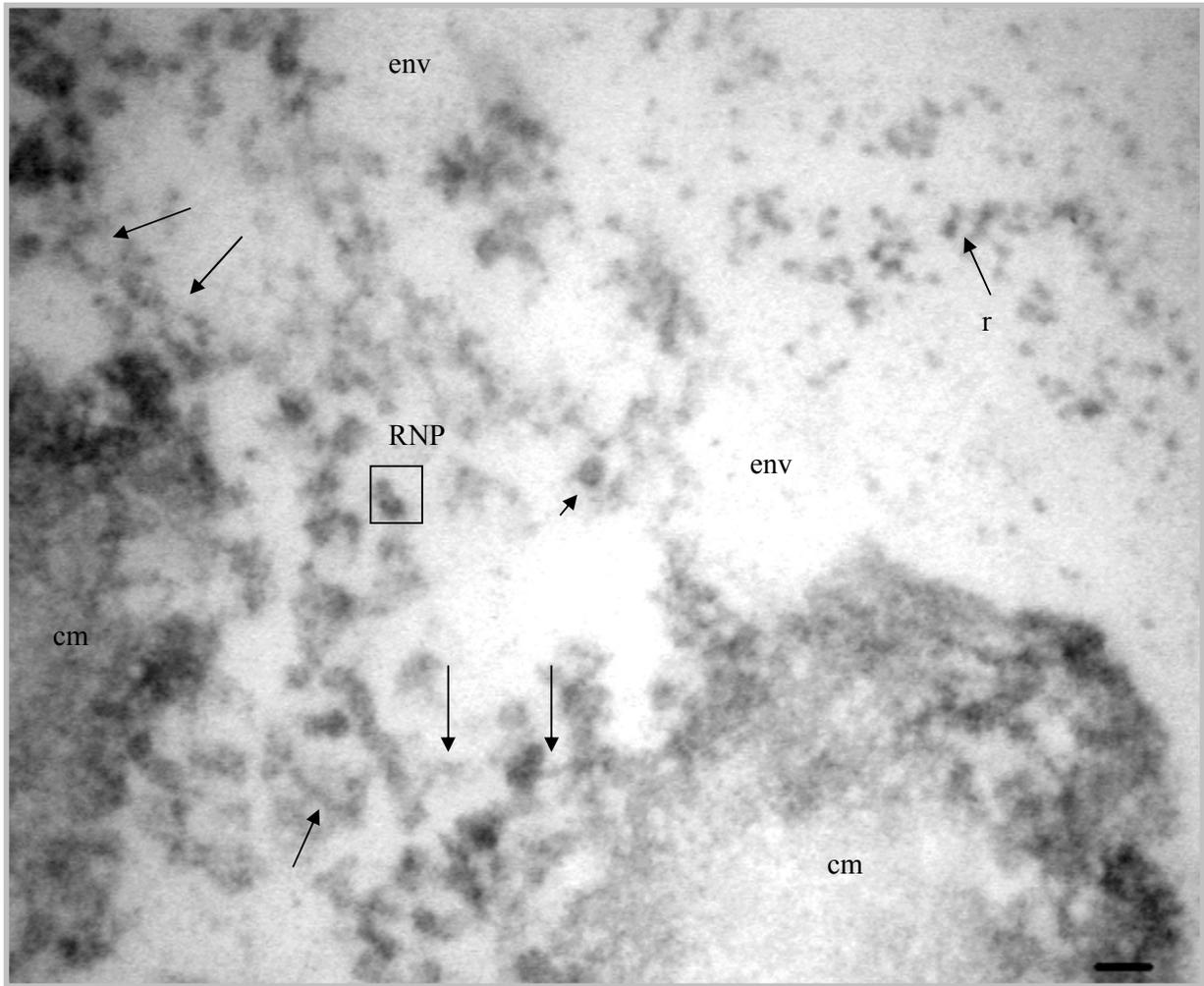


Figura 56. Ribonucleoproteínas en vía de maduración (recuadro), unidas por fibras ribonucleoproteicas al borde de una región cromosómica (flechas largas) y una ya madura (flecha corta). Cm; cromosoma; RNP, ribonucleoproteínas de 32 nm de diámetro y una en dirección al citoplasma (flecha corta); env., límite de la envoltura nuclear; r, ribosomas. Barra 50 nm.

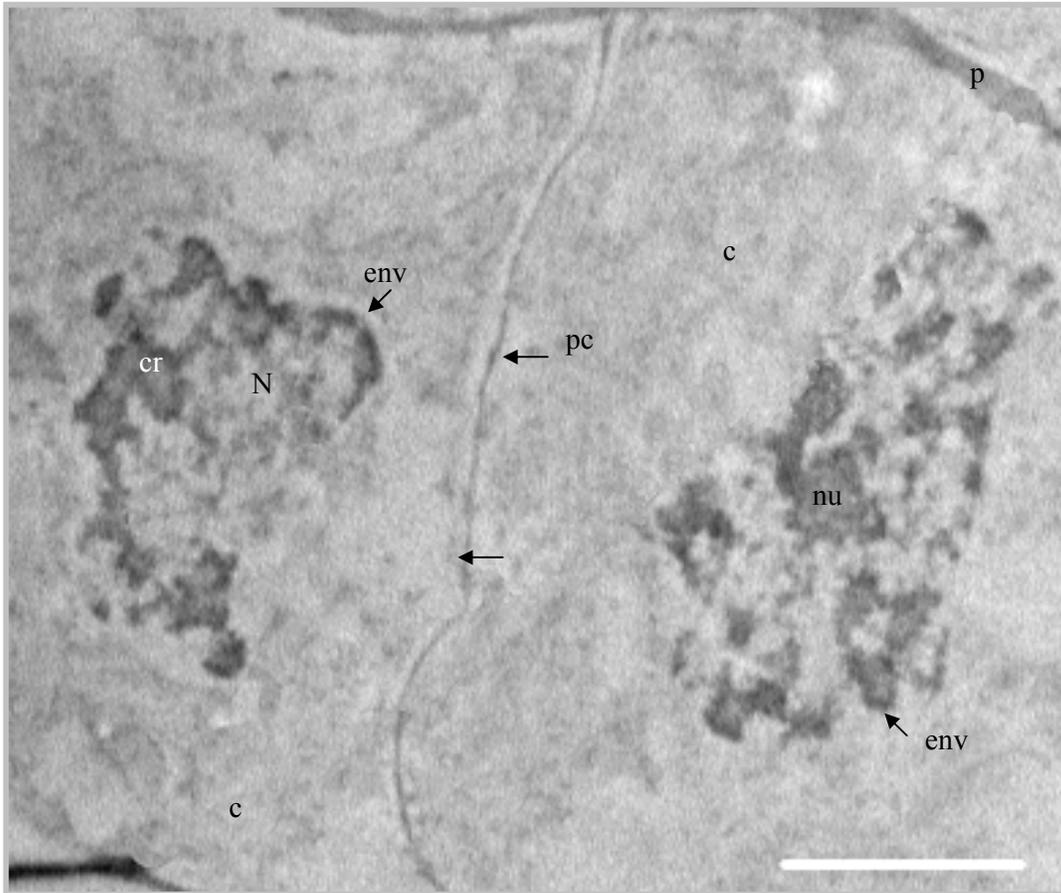


Figura 57. Fin de la telofase. Los núcleos hijos han reconstruido la envoltura nuclear y una banda de proteínas, la placa celular, divide a las dos células completamente. Los núcleos en G₁, adquieren progresivamente una forma esférica. N, núcleo; nu, nucléolo; cr, red de cromatina; env., límite de la envoltura nuclear; pc, placa celular; c, citoplasma; p, pared celular. Barra 2 μ m.

8. DISCUSIÓN.

La dinámica nuclear y la funcionalidad de su compartimentalización, es motivo de estudio en varios laboratorios del mundo, mediante diversas metodologías novedosas como el marcaje con proteínas fluorescentes, y su seguimiento *in vivo* en tiempo real, han aportado conocimientos acerca del comportamiento de la dinámica intranuclear, en procesos neurodegenerativos y cáncer (Sleeman, 2004). A pesar de los avances obtenidos, existen aspectos no explorados del metabolismo y organización del RNA, principalmente en vegetales. Ejemplo de ello son los gránulos de *Lacandonia* (Jiménez-García *et al.*, 1992). Estas partículas ribonucleoproteicas fueron inicialmente descubiertas asociadas a un núcleo no común, de una angiosperma excepcional *Lacandonia schismatica*. Además de presentar una inversión de sus órganos reproductores, sus núcleos en interfase son del tipo reticulado, en cuyos espacios inter y pericromatinianos abundan estas partículas ribonucleoproteicas.

Es bien conocido que la organización de los genes durante la interfase denota los rasgos más intrínsecos de las especies. En vegetales poco se conoce sobre la organización de la maquinaria de procesamiento del mRNA, así como el grado de similitud que puede compartir con los exhaustivamente caracterizados núcleos interfásicos de mamífero. Existen reportes sobre la presencia en vegetales de los *speckles* y cuerpos de Cajal, al parecer similares a los de metazoarios y mamíferos (Lorković y Barta, 2004). Estos últimos fueron observados en *T. mucronatum*, esta estructura ribonucleoproteica de composición molecular variable, con interacción física entre si y con el nucléolo en células animales, en vegetales es más dinámico, la razón se desconoce (Sleeman, 2004).

Los gránulos de *Lacandonia*, representan dominios subnucleares homólogos a los GPC de mamífero y GB de insectos, que poseen componentes de ambos, como proteínas SR características de los GB y pre-mRNA como se ha descrito para los GPC (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000). De tal manera que no solamente son estructuras de tamaño y distribución intermedias entre estos y los GIC, sino representan dominios de función aún desconocida dentro del metabolismo de los ácidos nucleicos en plantas. Con el fin de explorar su papel, el estudio de su comportamiento en otros grupos vegetales, puede aportar indicios sobre ello.

La caracterización ultraestructural por tres metodologías: la específica para

DNA, preferencial al MET e *in situ* con el MFA; de núcleos en *Taxodium mucronatum*, mostró la presencia de una red de cromatina en toda la extensión del núcleo en interfase, telofase y G₁. Se piensa que el patrón reticulado está asociado a organismos con elevado contenido de DNA; esta estructura se ha reportado en monocotiledóneas, criptógamas, briofitas y algas clorofíceas (Jiménez-García *et al.*, 1992); de las cuales solo en representantes de algunos grupos existe información sobre la frecuencia del contenido de DNA. Entre las plantas terrestres, las angiospermas, tienen el mayor contenido de DNA (valor-C) más elevado (127.4 pg, en *Fritillaria assyriaca* Baker), restringiéndose solamente a dos grupos: en familias de monocotiledóneas (Commelinidae, Asparagales, Liliales) y Santales (*Viscum sp.*) con valores ≥ 35 pg; algunos géneros dentro de estos clados con genomas grandes son *Allium* y *Lilium*. El resto de las angiospermas, se caracterizan por poseer genomas pequeños ≤ 3.5 pg.

Aunque las gimnospermas actuales con menos representantes (730 sp.), en comparación con las angiospermas (~250 000 sp); en general presentan genomas grandes con un valor modal 9.95 pg, donde *Gnetum ula* Brong, tiene el contenido más bajo (2.3 pg) y el más elevado en *Pinus nelsonii* Shaw (32.2 pg). Registros del tamaño del genoma, en la familia Taxodiaceae cuantificado por citometría de flujo no existen; pero las familias monotípicas muy cercanas como; Cephalotaxaceae y Sciadopityaceae, comparten valores semejantes con el género *Pinus*, por lo que se puede especular que el contenido de DNA en las Taxodiaceae puede estar entre estos rangos. Por Feulgen, se estima su valor C en 8.75 pg (Ori y Khoshoo, 1986).

Las monilofitas, en sus grupos basales (*Ophioglossum* y *Psilotum*), poseen un contenido de DNA elevado (65.5 y 72.7 pg, respectivamente), mientras los helechos (*Azolla microphylla*), solamente alcanzan 0.77 pg. En cuanto a las licofitas (11.97 pg) y briofitas (2.05 pg) en general se caracterizan por presentar genomas muy pequeños, a pesar de su poliploidia (Leitch *et al.*, 2005).

Tal que, la relación de núcleo reticulado con un contenido elevado de DNA, es posible para *Allium*, *Pinus*, *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis* (ambas pertenecientes a la clase Liliopsida) y *T. mucronatum*. En *Ginkgo*, se especula un valor intermedio (> 3.5 , < 14 pg), y por Feulgen de 9.95 pg (Ori y Khoshoo, 1986). Sin embargo, la relación, no se cumple para las briofitas, por lo cual este aspecto requiere ser explorado con mayor detalle.

Entre la red de cromatina de *T. mucronatum*, hay una cantidad considerable,

pero no mayor a *L. schismatica*, de gránulos ribonucleoproteicos de 32 ± 2 nm de diámetro, distribuidos en la región intercromatiniana y pericromatiniana. Su morfología, tamaño y citoquímica es similar al descrito en *Lacandonia schismatica* y *Ginkgo biloba* (Jiménez-García *et al.*, 1992; Agredano-Moreno *et al.*, 1994; Jiménez-Ramírez *et al.*, 2000). Son positivos al procedimiento preferencial de contraste regresivo para ribonucleoproteínas de Bernhard (1969).

Estas RNPs en *T. mucronatum*, se comportan de manera similar a los gránulos pericromatinianos de mamíferos, a los gránulos de Balbiani en dípteros (Daneshmandi y Hosik, 1973 y 2001a; Daskal, 1981), y gránulos de *Lacandonia*, como almacenes de pre-mRNA (Agredano-Moreno y Jiménez-García 2000; Agredano-Moreno, 2001). Su morfología es producto de una fibra ribonucleoproteica que es plegada conforme transcurre la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA.

Algunos se observaron en continuidad a la cromatina laxa y entre los espacios intercomatinianos, unidos por finas fibras; escasos en dirección al citoplasma. Como se ha demostrado para los GB, los cercanos a sitios de transcripción activa contienen una serie de proteínas que participan en la maduración del transcrito, entre ellas proteínas SR, encargadas ya sea del *splicing* cotranscripcional o en su establecimiento; mientras las lejanas han removido completamente sus intrones; una vez terminada la maduración del pre-mRNA son transportados hacia el poro nuclear y preservan algunas proteínas SR que funcionan como señal para la translocación del gránulo. Considerando su morfología, tamaño, contraste preferencial ribonucleoproteico, y comportamiento durante su formación; son aspectos muy parecidos a los descritos en *L. schismatica*. Así las partículas de 32 ± 2 nm de diámetro ubicadas entre las bandas de cromatina en *T. mucronatum* corresponden a gránulos de *Lacandonia*.

En *T. mucronatum* como en *L. schismatica*, su número tiene relación directa con el nivel de transcripción celular (Agredano-Moreno, 2001), y disminuyen conforme progresa la mitosis (Falcón-Barcenas, 2002).

Los cambios morfológicos durante la mitosis, que como resultado disgregan las maquinarias del procesamiento y transcripción del RNA, reducen drásticamente la transcripción. Por lo consiguiente, en *T. mucronatum*, durante la profase, ocurre un descenso rápido en la cantidad de gránulos, a medida que se compacta la cromatina, hacia la formación de cromosomas. La interrupción de la transcripción, en

consecuencia, se observa por gránulos en plegamiento, de menor diámetro (12 a 23 nm) que ribosomas, adyacentes a los cromosomas en compactación.

El número de partículas ribonucleoproteicas por área, de 32 ± 2 nm de diámetro, decrecen en un 98%, indicando la represión casi total de la transcripción. A este nivel es difícil determinar, si ésta reducción, corresponde únicamente a la represión de la transcripción de los genes que codifican mensajero (mRNA), debido a que su contenido en el núcleo (mamífero) abarca del 3 al 5%, en comparación con el ribosómico (rRNA) de 85 a 90% del RNA celular total (Cortés, 2003). Además se sabe, que algunos sitios continúan activos, como los segmentos de genes ribosómicos y agregados de proteínas pertenecientes al nucléolo en dispersión (Jiménez-García, 1988). Sin embargo, por su ubicación, se deduce que en su mayoría corresponden a sitios de elevada transcripción, muy abundantes en organismos poliploides como los vegetales. En prometafase, metafase y anafase son nulos. Mientras que al comienzo de la telofase junto con el ensamble del nucléolo y la reactivación de la transcripción, reaparecen hacia la periferia de la cromatina laxa, espacios intercromosómicos y en dirección a los poros nucleares. Por lo tanto, los gránulos de 32 nm de diámetro en *T. mucronatum* pueden corresponder a transcritos con mensajeros maduros.

La migración en forma de gránulo de mRNA o pre-mRNA, con los cromosomas, durante la mitosis, se conoce en *L. schismatica* (Falcón-Barcenas, 2002). En *T. mucronatum*, un material ribonucleoproteico se adosa a la superficie de los cromosomas, entre ellos partículas de 32 nm de diámetro.

Varias proteínas inmunomarcadas, y seguidas por epifluorescencia, viajan con los cromosomas, generalmente son factores que participan en el *splicing* y en la reorganización del nucléolo (Hernandez-Verdun, 2006); en plantas durante la anafase y telofase tardías, proteínas de la lámina nuclear se distribuyen alrededor de cada juego de cromátidas (Masuda *et al.*, 1999), lo que puede ocurrir en *T. mucronatum*, de acuerdo a lo observado durante la anafase tardía.

Debido a que no han sido purificados los gránulos de *Lacandonia* (GL) u homólogos, se desconoce si algunos componentes participan en la reactivación y reorganización de los dominios de transcripción, como los PNBs y *speckles* en células de mamíferos (Jiménez-García, 1988; Hernandez-Verdun, 2006), por lo que las hipótesis generalmente apoyan un papel de herencia de vida media corta, no esencial en

el reinicio de la transcripción, cuya función es evitar la síntesis de novo (energéticamente menos redituable), de mensajeros requeridos rápidamente en estadios tempranos al término de la mitosis.

En vegetales, los GL son más abundantes que sus homólogos en mamíferos e insectos, por lo que se consideran organismos probables para su asilamiento y purificación. *T. mucronatum* es un buen candidato.

Hasta el momento se desconoce si existen subpoblaciones de estos gránulos, y si el contenido guarda relación con su distribución en interfase y durante la mitosis. Tanto en interfase, como en la fase M, algunos se ubican cercanos y alejados de la cromatina laxa, y otros en la superficie de los cromosomas. Un análisis de su proteoma, en relación con el procesamiento del pre-mRNA, en los estadios del ciclo celular y durante la diferenciación, puede aportar indicios sobre estos procesos, como el papel de la maduración y permanencia de los mRNAs de un ciclo celular al siguiente.

El hallazgo de estas ribonucleoproteínas de almacén del pre-mRNA, y proteínas SR de la familia de *splicing* (Agredano-Moreno y Jiménez-García, 2000), en linajes tempranos de gimnospermas, como *Ginkgo biloba* (Jiménez-Ramírez *et al.*, 2000), y ahora en tardíos como *T. mucronatum*; que han permanecido aproximadamente por 300 m.a., hace pensar en una función primordial dentro de la organización de la maquinaria encargada del procesamiento del RNA mensajero, que abarca el grupo monofilético de las gimnospermas. La relación que comparte con las angiospermas, como *L. schismatica*, aún resulta desconocida.

Otro aspecto importante, estudiado en *T. mucronatum* fue, la textura de la cromatina en interfase por MFA. Una nueva era de la biología, la nanobiología, está en sus inicios y avanza vertiginosamente, con la posibilidad de explorar *in vivo* los materiales biológicos a escalas nanométricas (10 millonésimas de un metro), donde las propiedades cambian drásticamente; como ejemplo; materiales magnéticos dejan de serlo, los opacos se tornan transparentes, aisladores eléctricos empiezan a conducir la electricidad y los superconductores se vuelven aisladores eléctricos (Silva-Andrade *et al.*, 2002), considerando esto, muchos aspectos se desconocen sobre la naturaleza nanomolecular del DNA, RNA y partículas ribonucleoproteicas. En esta etapa, el laboratorio está perfeccionando la resolución *in situ*, al MFA, de gránulos ribonucleoproteicos (Jiménez-García y Fragosó-Soriano en progreso), ha logrado

obtener elementos distinguibles por microscopía de fuerza atómica, de núcleos en interfase como *Ginkgo biloba* y *L. schismatica* entre otros (Jiménez-García y Fragoso Soriano, 2000; Jiménez-Ramírez *et al.*, 2000). *T. mucronatum*, ejemplar de más de 2000 años, se suma a estas observaciones, donde se reconocieron por correlación anatómica al AFM, por primera vez, células y núcleos del tejido lagunoso, destacándose por la sinuosidad de sus paredes y nucléolos prominentes. Fue posible determinar la ubicación a menor altitud, de los HeFCs de *T. mucronatum*, diferencia no obvia al MET. Descritos en otros vegetales como *L. schismatica*, apoyan la idea de un patrón de organización común entre los núcleos reticulados (Jiménez-García *et al.*, 1992).

A pesar de las fuerzas laterales infringidas por el aire, que reducen las interacciones espaciales de la punta con la muestra, en barridos en modo de contacto, la resolución obtenida de la cromatina compacta es claramente reticulada y conserva una textura grumosa, corroborada en cortes de grueso espesor resueltos por el sistema ApoTome (Carl-Zeiss). Debido a que en epifluorescencia, el problema de resolución se acentúa si el espesor de la muestra, es mayor a la profundidad de campo del objetivo, así con este microscopio y su sistema de resolución de 25 nm en Z (Hubert y Schaffer, 2005), las imágenes de elevado contraste y con ayuda de un filtro específico para DAPI, mostraron la organización del núcleo en *T. mucronatum* del tipo reticular.

La resolución obtenida hasta el momento, en modo de contacto, abarca un rango de 700 hasta aproximadamente 300 nm. Donde es visible el arreglo de las fibras de DNA, con protuberancias muy semejantes a cromosomas compactos, vistos al MEB (Alberts *et al.*, 1996). Algunas de ellas, lejanas a los grumos compactos de cromatina, de estructura irregular, pueden corresponder a superficies muy elevadas de gránulos de 30 nm de diámetro.

El avance en esta área permitirá en un futuro cercano, hacer uso de la característica más importante del AFM, de observar y analizar las estructuras en su ambiente nativo, aspecto no tan fácil de abordar (Shao *et al.*, 1995). Donde exploraciones iniciales, no han resultado tan exitosas como en estructuras fijas (Hansma, 2001). El medir las fuerzas entre las interacciones moleculares, por el momento es complicado, debido al problema de cuantificar una sola interacción en un ambiente tan cambiante a nivel nanomolecular. Posiblemente a corto plazo, sea posible determinar las fuerzas intermoleculares entre los diversos dominios nucleares.

9. CONCLUSIONES.

- Empleando contraste general uranilo-plomo, una tinción específica para DNA y un análisis *in situ* de cortes de hoja de *Taxodium mucronatum*, mediante tres tipos de microscopía respectivamente: MET, sistema ApoTome (Carl-Zeiss), y MFA, se observa que el arreglo de la cromatina en los núcleos en interfase de *Taxodium mucronatum* es de tipo reticulado.
- Asociada a esta red, el contraste preferencial para ribonucleoproteínas con EDTA reveló la presencia de partículas ribonucleoproteicas de 32 ± 2 nm de diámetro entre los espacios inter y pericromatinianos en *Taxodium mucronatum*, los gránulos de *Lacandonia*.
- Algunos gránulos de *Lacandonia*, de 32 nm de diámetro se observan interconectados con fibras pericromatinianas. Indicando un posible evento de *splicing*.
- En *Taxodium mucronatum* los gránulos de *Lacandonia*, disminuyen durante la mitosis como en *Lacandonia schismatica* y *Ginkgo biloba*, para reaparecer durante la telofase, lo que sugiere que no son heredados de un ciclo celular al siguiente, solo algunos de ellos, que presentes rodean a los cromosomas.
- Hay gránulos de *Lacandonia* en *Taxodium mucronatum*, gimnosperma tardíamente divergente.
- Estos gránulos asociados a núcleos vegetales reticulados, tienen un alto grado de conservación en la naturaleza, lo que sugiere una importancia fundamental de estas estructuras en el funcionamiento nuclear.

10. REFERENCIAS.

- Agredano-Moreno, L.T., González-Jiménez, M.A., Segura-Valdez, M.L., Ublado, E., Ramos, C.H., Martínez, E. y Jiménez-García, L.F. 2001. Further Ultrastructural Characterization of the Intranuclear Ring-Shaped Bodies of the Plant *Lacandonia schismatica*. *J. Struct. Biol.* 136: 1-6.
- Agredano-Moreno, L. y Jiménez-García, L. 2000. New evidence that *Lacandonia* granules are ultrastructurally related to perichromatinian and Balbiani ring granules. *Biol. Cell* 92 : 71-78.
- Agredano-Moreno, L. T. 2001. Tesis de Doctorado. Los gránulos de *Lacandonia*: caracterización por medio de inmunolocalización e hibridación *in situ* ultraestructural y asilamiento de una fracción enriquecida en gránulos. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Agredano-Moreno, L., Jiménez-García, L., Echeverría, O. M., Martínez, E., Ramos, C. y Vázquez-Nin, G.H. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. *Biol. Cell* 82 : 177-184.
- Aguilera, C. 1985. Flora y Fauna Mexicana. Edit. Everest Mexicana, S.A. México, D.F. 203 p.
- Álvarez-Buylla, M. E. 2001. La *Lacandonia schismatica*. Luna Córnea. México, pp. 198 – 207.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M, Roberts, K. y Watson, J. 1996. El núcleo celular. En: Biología Molecular de la Célula. Omega. Barcelona, pp. 361-424.
- Alzhanara-Ericson, A, Sun, X., y Visa, N.1996. A protein of the SR family of splicing factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore. *Genes Dev.* 10 : 2881-2893.
- Andersen, J.S. Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M. y Lamond, A.I. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12 : 1-11.
- Andrade, L.E., Tan, E.M., Chan, E.K.L. 1993. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 1947-1951.
- Andrade-Silva, F., Chávez, F., Prutsku T. e Ilinski, A. 2002. Microscopía de fuerza atómica control de las superficies de los semiconductores. *Ciencia y Desarrollo.* 163 : 68-77.
- Anónimo. 1923. El Ahuehuete o Sabino. *Revista México Forestal.* 1 : 9-10.
- Antología Fitogeografica. Serie de apoyo académico. No. 25. Div. Ciencias Forestales. U.A.C.H. Chapingo, México.
- Bachelierie, J.P., Cavaillé, J. y Hüttenhofer, A. 2002. The expanding snoRNA world. *Biochimie.* 84 : 775-790.
- Bachelierie, J.P. y Cavaillé, J. 1997. Guiding ribose methylation of RNA. *TIBS.* 22 : 257-261.
- Bachelierie, J.P., Puvion, E. y Zalta, E. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58 : 327-337.
- Bautista-Martínez, A.1999. Biodiversitas, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, año 5. Num. 25. julio. “El Ahuehuete”, pp. 12-14.
- Bauren, G. y Wieslander, L. 1994. Splicing of Balbiani ring 1 pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell* 76 : 183-192.

- Beck, J. S. 1961. Variations in the morphological patterns of `autoimmune` nuclear fluorescence. *Lancet*. 1: 1203-1205.
- Beermann, W. 1962. Ein Balbiani-Ring als locus einer Speicheldrüsen Mutation. *Chromosoma*. 12:1-25.
- Belmont, A.S., Dietzel, S., Nye, A.C., Strukov, Y.G., Tumbar, T. 1999. Large-scale chromatin structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 : 307-311.
- Bernhard, W. y Monneron, A. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27 : 266-288.
- Beven, A.F., Simpson, G.G., Brown, J.W.S. y Shaw, P. 1995. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J. Cell Sci.* 108 : 509-518.
- Binarová, P., Cenklová, V., Hause, B., Kubátová, E., Lysák, M., Dolezel, J., Bögre, L. y Dráber, P. 2000. Nuclear γ -tubulin during acentriolar plant mitosis. *The Plant Cell*. 12 : 433-442.
- Bowe, L.M., Coat, G. y De Pamphilis, C.W. 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales` closest relatives are conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4092-4097.
- Brasch, K. y Ochs, R. L. 1992. Nuclear bodies (NB): a newly "rediscovered" organelle. *Exp. Cell Res.* 202 : 211-223.
- Bregman, D.B., Du, L., van der Zee, S., Warren, S.L. 1995. Transcription dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J. Cell Biol.* 129 : 287-298.
- Brown, G.L. y Locke, M. 1978. Nucleoprotein localization by bismuth staining. *Tissue and Cell* 10:365-388.
- Brown, S. 1981. A comparison of the structure, primary productivity, and transpiration of cypress ecosystems in Florida. *Ecol. Monographs*. 51 : 403-427.
- Brunsfeld, S.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Strenge, D.D. y Ranker, T.A. 1994. Phylogenetic relationships among the genera of Taxodiaceae and Cupressaceae: evidence from *rbcL* sequences. *Syst. Bot.* 19 : 253-262.
- Buratti, E. y Baralle, F.E. 2004. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol. Cell Biol.* 24 : 10505-10514.
- Bucholtz, G.A., Lockey, R.F. y Serbousek, D. 1985. Bald cypress tree (*Taxodium distichum*) pollen, an allergen. *Ann Allergy*. 55 : 805-810.
- Burge, C. B., Tuschl, T., Sharp, P. A. 1999. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. En: The RNA world. Gesteland R.F., Cech T. R., Atkins J. F. (Eds), Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 525-560.
- Burleigh, J.G. y Mathews, S. 2004. Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: implications for resolving the seed plant tree of life. *Am. J. Bot.* 91: 1599-1613.
- Bush, H. y Smetana, K. 1970. The Nucleolus. Academic Press, New York.
- Campbell, R.N. y Clark, J.W. 1960. Decay resistance of baldcypress heartwood. *Forest Products J.* 10:250-253.
- Carlson, B.M. 1990. Embriología básica de Patten. McGraw-Hill. México.
- Carmo-Fonseca, M. 2002. New clues to the function of the Cajal body. *EMBO Rep.* 3 : 726-727.

- Carrington, J.C. y Ambrose, V. 2003. Role of MicroRNAs in plant and animal development. *Science*. 301: 336-338.
- Carrión, J. y Cabezudo, B. 2003. Perspectivas recientes en evolución vegetal. *Anales de Biología*. 25:163-198.
- Clemson, C. M. y Lawrence, J. B. 1996. Multifunctional compartments in the nucleus: insights from DNA and RNA localization. *J. Cell Biochem*. 62 : 181-190.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.D., van Driel, R., Fakan, S. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and *splicing* in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell* 10 : 211-223.
- Conran, J. G., Word, G. M., Martin, P.G., Dowd, J.M., Quinn, C.J., Gadek, P.A. y Price, R. A. 2000. Generic relationships between the gymnosperm families Podocarpaceae and Phyllocladaceae based on an analysis of the chloroplast gene *rbcL*. *Aust. J. Bot.* 48 : 715-724.
- Cortés, H. 2003. Acido ribonucleico, RNA. En: Biología celular y molecular. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 23-62.
- Covarrubias-Robles, A. y Cassab-López, G-I. 2003. Matriz extracelular de plantas. En: Biología celular y molecular. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 547-591.
- Cremer, T., Küpper, K. Dietzel, S. y Stanislav, F. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus on the way from structure to function. *Biol. Cell* 96 : 555-567.
- Cronquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, New York.
- Chaw, S.M., Zharkikh, A, Sung, H.M., Lau, T.C. y Li, W.H. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Soc. Mol. Biol. Evol.* 14 : 56-68.
- Chaw, S-H., Parkinson, C.L., Cheng, P., Vincent, T.M. y Palmer, J.D. 2000. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *PNAS*. 97 : 4086-4091.
- Chaw, S-H., Zharkikh, A., Sung, H-M., Lau, T-C., y Li., W-H. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14 : 56-68.
- Ching, R.W., Dellaire, G., Eskiw, C.H. y Bezett-Jones, D.P. 2005. PML bodies: a meeting place for genomic loci?. *J. Cell Sci.* 118 : 847-854.
- Chubb, J.R. y Bickmore, W.A. 2003. Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* 112 : 403-406.
- Daneholt, B. y Hosick, H. 1973. Evidence for transport of 75S RNA from a discrete chromosome region via nuclear sap to cytoplasm in *Chironomus tentans*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 : 422-446.
- Daneholt, B. 1997. A look at RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88 : 585-588.
- Daneholt, B. 1999. Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr. Biol.* 9 : 412-415.
- Daneholt, B. 2001a. Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *PNAS*. 98 : 7012-7017.

- Daneholt, B. 2001b. Packing and delivery of a genetic message. *Chromosoma* 110 : 173-185.
- Daskal, Y. 1981. "Perichromatin Granules". En: *The Cell Nucleus*. H. Busch (Eds.), Academic Press, New York, pp. 117-137.
- Daskal, Y., Merski, J.A., Huges, J.B. y Bush, H. 1975. The effects of cycloheximide on the ultrastructure of rat liver cells. *Exp. Cell Res.* 93 : 395-401.
- Davidson, M.W. y Abramowitz, M. 2006. Optical microscopy. En: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>
- Davidson, R. W., Lentz, P. y McKay, H.M. 1960. The fungus causing pecky cypress. *Mycologia.* 52 :260-279.
- Del Castillo, R.F., Pérez de la Rosa, J.A., Vargas Amado, G. y Rivera García, R. 2004. Coníferas. En: García-Mendoza, A.J., Briones-Salas, M.J. (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, pp. 141-158.
- Dinets, V. 2003. En: <http://www.conifers.org/cu/tax/mucronatum.htm>
- Dorado, O., Avila, G, Arias, D.M., Ramírez, R., Salinas, D., Valladares, G. 1996. The árbol del Tule (*Taxodium mucronatum* Ten.) is a single genetic individual. *Madroño.* 43 : 445-452.
- Dundr, M. y Misteli, T. 2004. Transcriptional complexity from dynamic interaction networks *In vivo*. *Curr. Genomics.* 5 : 559-566.
- Dundr, M., y Misteli, T. 2001. Functional architecture of the cell nucleus. *Biochem. J.* 356 : 297-310.
- Dupuy-Coin, A. M., Arnoult, J. y Bouteille, M. 1978. Quantitative correlation of morphological alterations of the nucleus with functional events during in Vitro infection of glial cells with herpes simplex hominis (HSV 2). *J. Ultrastruct. Res.* 65 : 60-72.
- Earle, C.J. 2003. *The Gymnosperm Database*. URL: <http://www.conifers.org>
- Eils, R., Gerlich, D., Tvarusko, W., Spector, D.L. y Misteli, T. 2000. Quantitative imaging of pre-mRNA splicing factors in living cells. *Mol. Biol. Cell* 11 : 413-418.
- Everet, R.D. 2001. Promyelocytic leukemia protein mediates interferon-based anti-herpes simplex virus 1 effects. *Oncogene.* 20 : 7274-7286.
- Fakan, S. y Bernhard, W. 1971. Localization of rapidly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 99 : 155-164.
- Fakan, S., Leser, G. y Martin, T. 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections. *J. Cell Biol.* 98 : 358-363.
- Falcón-Barcenas, T. 2002. Tesis de Maestría. Estudio de los gránulos de *Lacandonia* durante la mitosis por microscopía electrónica de transmisión (MET). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ferré-D`Amaré, A.R. 2003. RNA-modifying enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 : 49-55.
- Ferrari, S. 2006. Protein kinases controlling the onset of mitosis. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 781-795.
- Finnegan, J. y Matzke, M. 2003. The small RNA world. *J. Cell Sci.* 116 : 4689-4693.
- Flores-Rodríguez V. 1992. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Integración de los conocimientos sobre el ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.) y algunas consideraciones acerca del bosque de galería. FES Iztacala, UNAM.

- Gadek, P., Alpers, D., Heslewood, M. 2000. Relationships within Cupressaceae sensu lato: combined morphological and molecular approach. *Amer. J. Bot.* 87 : 1044-1057.
- Gall, J. G. 2003. The centenal of the Cajal body. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 975-980.
- Gallie, D.R. 1991. The cap and poly (A) tail function synergistically to regulate mRNA translation efficiency. *Genes Develop.* 5 : 2108-2116.
- Gerbi, S. A. 1995. Small nucleolar RNA. *Biochem. Cell Biol.* 73 : 845-858.
- Goessens, G. y Lepoint, A. 1974. The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Erlich tumor cells. *Exp. Cell Res.* 87 : 63-72.
- Goessens, G. y Lepoint, A. 1979. Fine structure of nucleoli in micronucleated cells. *Biol. Cell* 35:211-220.
- Grainger, R. J. y Beggs, J. D. 2006. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA.* 11 : 533-557.
- Grande, M. A., Van der Kraan, I., Jong, L., Van Driel, R. 1997. Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J. Cell Sci.* 110 : 1781-1791.
- Graveley, B. R. 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA.* 6 : 1197-1211.
- Greenleaf, A. L. 1993. Positive patches and negative noodles: linking RNA processing to transcription?. *Trends Biochem. Sci.* 18 : 117-119.
- Gross, T., Richert, K., Mierke, C., Lutzelberger, M., Kaufer, N.F. 1998. Identification and characterization of srp1, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and RS typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.* 26 : 505-511.
- Gross, P. y Oelgeschlager, T. 2006. Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochem. Soc. Symp.* 73 : 225-236.
- Guinnes, Libro de los Record. 1986. Lasser Press Mexicana, México, D.F, p. 61.
- Hall, G.W., Diggs, G.M., Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1990. Genetic uniformity of El Árbol del Tule (The Tule Tree). *Madroño* 37 : 1-5.
- Hampsey, M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 465-503.
- Hansen, A.S., Hansmann, T., Samigullin, A., Antonov, A., Martin, W. 1999. *Gnetum* and the angiosperms: molecular evidence that their shared morphological characters are convergent rather than homologous. *Mol. Biol. Evol.* 16 : 1006-1009.
- Hansma, H.G. 2001. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52: 71-92.
- Hayat, M.A. 1975. Positive staining for electron microscopy. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hernandez-Verdun, D., Bouteille, M., Ege, T., Ringertz, N.R. 1979. Fine structure of nucleoli in micronucleated cells. *Exp. Cell Res.* 124 : 223-235.
- Hernandez-Verdun, D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem. Cell Biol.* 125:127-137.
- Heun, P., Taddei, A., Gasser, S.M. 2001. From snapshots to moving pictures: new perspectives on nuclear organization. *Trends Cell Biol.* 11 : 519- 525.

- Hubert, B. y Schaffer, J. 2005. Optical sections by means of “structured illumination” background and application in fluorescence microscopy. *Photonik*. 5 : 86-88.
- Ideue, T., Kalam, A., Yoshida, J., Matsusaka, T., Yanagida, M., Oshima, Y., Tani, T. 2004. The nucleolus is involved in mRNA export from the nucleus in fission yeast. *J. Cell Sci.* 117:2887-2895.
- Izaguirre, M. 2001. Nucléolo. En: *Biología del núcleo celular*. Echeverría, O. M. y Ontiveros, F. (Eds.), Las prensas de ciencias, UNAM. México, pp. 115-125.
- Janicki, S.M. 2004. From silencing to gene expression real-time analysis in single cells. *Cell* 116 : 683-698.
- Janicki, S.M., Tsukamoto, S., Salghetti, W., Tansey, R., Sachidanandam, K., Prasanth, K., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R. 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* 116 : 683-698.
- Janicki, S.M., y Spector, D.L. 2003. Nuclear choreography: interpretations from living cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 149-157.
- Jarmolowki, A., Boelens, W.C., Izaurralde, E., Mattaj, I.W. 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* 124 : 627-635.
- Jiménez-García, L.F. 1988. Tesis doctoral. El nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Jiménez-García, L.F., Elizundia, J.M., López-Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría, O.M., Vázquez-Nin, G.H. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi ad protoctists. *BioSystems*. 22 : 103-116.
- Jiménez-García, L., Agredano-Moreno, L., Segura-Valdez, L., Echeverría, O.M., Martínez, E., Ramos, C.H. y Vázquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* 75 : 101-110.
- Jiménez-García, L., Reynoso, R., Fragoso,R., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L. González.-Moreno, S., Ramos, C.H. y Martínez, E. 1998. Biología molecular de *Lacandonia schismatica*. Análisis por microscopía electrónica y de fuerza atómica. *Bol. Soc. Bot. México* 62 : 5-14.
- Jiménez-García, L.F. y Fragoso-Soriano, R. 2000. Atomic Force of the Cell Nucleus. *J. Struct. Biol.* 129 : 218-222.
- Jiménez-Ramírez, J., Agredano-Moreno, L., Segura-Valdez, L. y Jiménez-García, L. 2000. *Lacandonia* granules are present in *Ginkgo biloba* cell nuclei. *Biol. Cell* 94 : 511-518.
- Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Education. México.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2002. Lycophytes, ferns and their allies, and extant gymnosperms. En: *Plant Systematics a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland. Massachusetts, U.S.A, pp. 199-215.
- Jurica, M. S., Licklider, L. J., Gygi, S. P., Grigorieff, N. y Moore, M. J. 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*. 8 : 426-439.
- Kupchan, S.M., Karim, A. y Marcks, C. 1968. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *J. Am. Chem. Soc.* 90 : 5923-5924.

- Kiss-László, Z., Henry, Y. y Kiss, T. 1998. Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* 17 : 797-807.
- Khosshoo, T. N. 1961. Chromosome number in gymnosperms. *Sil. Genet.* 1 : 1-9.
- Khosshoo, T. N. 1962. Cytogenetical evolution in gymnosperms karyotype. *Summer School Bot. Darjeeling*, pp. 119-135.
- Kornblihtt, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Muñoz, M. J. y Nogués, G. 2006. Multiple links between transcription and splicing. *J. RNA* 10 : 1489-1498.
- Kramer, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA *splicing*. *Annu. Rev. Biochem.* 65 : 367-409.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P. y Hendzel, M.J. 2000. Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASAF) through the nucleoplasm and steady-state speckle compartments. *J. Cell Biol.* 150 : 41-51.
- Kusumi, J., Tsumura, Y., Yoshimaru, H. y Tachida, H. 2000. Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae *sensu stricto* based on *MATK gene*, *CHL1 GENE*, *TRNL-TRNF* IGS region, and *TRNL* intron sequences. *Am. J. Bot.* 87 : 1480-488.
- Lamond, A.I. y Earnshaw, W.C. 1998. Structure and function in the cell nucleus. *Science.* 280: 547-553.
- Lamond, A.I. y Sleeman, J.E. 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr. Biol.* 13: 21-24.
- Lamond, A.I. y Spector, D.L. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 : 605-612.
- Lemon, B. y Tjian, R. 2000. Orchestrated response, a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14 : 2551-2569.
- Lehninger, A. L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1995. Principios de bioquímica. Omega, Barcelona, p. 1013.
- Leitch, I.J., Soltis, D.E., Soltis, P.S. y Bennett, M.D. 2005. Evolution of DNA amounts across land plants (embryophyta). *Ann. Bot.* 95 : 207-217.
- Lewin, B. 2000. Genes VII. Oxford University Press, USA, pp. 171-172.
- Li, C.X. y Yang, Q. 2003. Phylogenetic relationships among the genera of Taxodiaceae and Cupressaceae from 28S rDNA sequences. *Yi Chuan.* 25 : 177-180.
- Liu, Q., Fisher, U., Wang, F. y Dreyfuss, G. 1997. The spinal muscular atrophy gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90 : 1013-1021.
- Li, C.X. y Yang, Q. 2003. Phylogenetic relationships among the genera of Taxodiaceae and Cupressaceae from 28S rDNA sequences. *Yi Chuan.* 25 : 177-180.
- Leblond, C.P. y El-Alfy, M. 1998. The eleven stages of the cell cycle, with emphasis on the changes in chromosomes and nucleoli during interphase and mitosis. *The Anatomical Record.* 252:426-443.
- Lopato, S. Mayeda, A., Krainer, A.R., Barta, A. 1996. Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 3074-3079.

- López-Curto, M. L., Márquez-Guzmán, J., Murguía-Sánchez, G. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias, UNAM. Las Prensas de Ciencias, México.
- Lorković, Z.J. y Barta, A. 2004. Compartmentalization of the *splicing* machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci.* 12 : 564-568.
- Louvet, E., Júnera, R.H., Le Panse, S. y Hernández-Verdun, D. 2005. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Histochem. Cell Biol.* 304 : 457-470.
- Lutzelberger, M., Gross, T. Kaufer, N. F. 1999. Srp2, an SR protein family member of fission yeast: In vivo characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res.* 27 : 2618-2626.
- Majewska-Sawka, A. y Rodríguez-García, M.I. 1996. rRNA distribution during microspore development in anthers of *Beta vulgaris* L.: quantitative in situ hybridization analysis. *J. Cell Sci.* 109 : 859-866.
- Malca, H., Shomron, N. y Ast, G. 2003. The U1 snRNP base pairs with the 5' splice site within a pentanRNP complex. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3442-3455.
- Malmanche, N., Maia, A. y Sunkel, C.E. 2006. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* 580 : 2888-2895.
- Márquez-Guzmán, J., Engleman, E., Martínez-Mena, A., Martínez, E. 1989. Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. MO. Bot. Gard.* 76 : 124-127.
- Marshall, W.F. 2002. Order and disorder in the nucleus. *Curr. Biol.* 12 : 185-192.
- Martínez, E., y Ramos, C. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76 : 128-135.
- Martínez, E., Ramos, C. H., Chiang, F. 1994. Lista florística de la Lacandona, Chiapas. *Bot. Soc. Bot. Mex.* 54 : 99-177.
- Martínez, M. 1963. El ahuehuate (*Taxodium mucronatum* Ten.), en: Las pináceas mexicanas. 3a. ed., UNAM, Instituto de Biología, México, pp. 161-212.
- Martínez, M. 1994. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de las Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Masuda, K., Shizuka, H. y Fujino, K. 1999. Assembly and disassembly of the peripheral architecture of the plant cell nucleus during mitosis. *Planta.* 210 : 165 -167.
- McIntosh, J.R. y Koonce, M.P. 1989. Mitosis. *Science.* 246: 622-628.
- Medina, M. A., Moreno Díaz de la Espina, S., Martín, M., Fernández-Gómez, M.E. 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell* 67 : 331-339.
- Misteli, T. y Spector, D.L. 1999. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol. Cell* 3 : 697-705.
- Misteli, T. Caceres, J.C. y Spector, D.L. 1997. The dynamics of a premRNA *splicing* factor in living cells. *Nature.* 387 : 523-527.
- Monneron, A. y Bernhard, W. 1969. The fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27 : 266-288.

- Moyne, G., Nash, R.E. y Puvion, E. 1977. Perichromatin granules and other nuclear components in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cell* 6 : 5-16.
- Muratani, M., Gerlich D., Janicki S.M., Gebhard M., Eils, R., y Spector, D.L. 2002. Metabolic energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat. Cell Biol.* 4:106-110.
- Nathanson, L., Deutscher, M.P. 2000. Active aminoacyl-tRNA synthetases are present in nuclei as a high molecular weight multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 275 : 31559-31562.
- Neugebauer, K.M. 2002. On the importance of being cotranscriptional. *J. Cell Sci.* 115 : 3865-3871.
- Nilsen, T.W. 2003. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays.* 25 : 1147-1149.
- Nicklas, R. B. y Arana, P. 1992. Evolution and the meaning of metaphase. *J. Cell Sci.* 102 : 681-690.
- Nickerson, J. y Drouin, G. 2004. The sequence of the largest subunit of RNA polymerase II is a useful marker for inferring seed plant phylogeny. *Mol. Phyl. Evol.* 31 : 403-415.
- Ofengand, J. 2002. Ribosomal RNA pseudouridines y pseudouridine synthases. *FEBS Lett.* 514 : 17-25.
- Ori y Khoshoo, 1986. Genome size in gymnosperms. *Plant Sys. Evol.* 153 : 119-132.
- Page, C.N. 1990. Coniferophytina. En: Kabitzki, K. (e.d.), The families and genera of vascular plants, vol. 1, Kraemer, U.K. y Green, P.S. (Eds.), Pteridophytes and gymnosperms, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 282-361.
- Paule, M. R. y White, R.J. 2000. Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28 : 1283-1298.
- Perusquia, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *J. Ethnopharmacol.* 46 : 63-69.
- Petrov, P. y Bernhard, W. 1971. Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoproteic components of interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.* 35 : 486-582.
- Phair, R.D. y Misteli, T. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature.* 404: 604-609.
- Piñol-Roma, S. 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell* 10: 77-90.
- Pradhan, A. y Liu, Y. 2004. The calcium- responsive transactivator recruits CREB binding protein to nuclear bodies. *Neurosci. Lett.* 379 :191-195.
- Prieto, J.L. y McStay, B. 2005. Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochem. Soc. Transac.* 33: 1414-1443.
- Proudfoot, N.J., Fuger, A., Dye, M.J. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108: 501-512.
- Puvion, E. y Bernhard, W.1975. The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. *J. Cell Biol.* 67 : 200-214.

- Puvion, E. y Lange, M. 1980. Functional significance of perichromatin granule accumulation induced by cadmium chloride in isolated liver cells. *Biol. Cell* 25: 17-32.
- Puvion, E. y Moyne, G. 1981. "In situ localization of RNA structures". En: *The Cell Nucleus*. H. Busch (Eds.), Academic Press, New York, pp. 59-115.
- Puvion, E., Viron, A., Assens, C., Leuc, E., Jeanteur, P. 1984. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNP in isolated liver cells. *J. Ultrastruct. Res.* 87 : 180-189.
- Qiu, Y-L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V. y Chase, M.W. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature*. 402: 404-407.
- Raven, P. H., Johnson, G.B. 1996. The cell nucleus. En: *Biology*. Times Mirror Higher Education Group, Inc. Dubuque Iowa.
- Ramamoorthy, T.P., y R. Bye, A. L. 1998. Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM. México, pp. 571 y 119.
- Raska, I., Andrade, L.E.C., Ochs, R.L., Chan, E.K. L., Chang, C.M., Roos, G., Tan, E.M. 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 195 : 27-37.
- Recillas, F. y Zurita, M.E. 2003. Control de la expresión genética en eucariontes. En: *Biología celular y molecular*. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 63-101.
- Ruiz, E. 2003. El Ahuehuete o "Viejo del agua" podría ser declarado patrimonio cultural de la humanidad. CONACULTA.
- Rydin, C., Källersjö, M. y Friis, E.M. 2002. Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: conflicting, rooting problems, and the monophyly of conifers. *Int. J. Plant Sci.* 163 : 197-214.
- Rzedowski, J. y de Rzedowski, G.C. 1979. Flora fanerogámica del Valle de México. Cía. Editorial Continental, México.
- Rzedowski, J, Vela, L.G. y Madrigal, X. 1977. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los bosques de coníferas en México. Guizar, N.E. (comp.) 1986.
- Rzedowski, J. y Equihua, M. 1987. Flora. Atlas Cultural de México, SEP/INAH. Planeta, Edo. México.
- Sachs, A. B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 15 : 85-90.
- Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P, Neuwald, A.F. y Spector, D.L. 2004. Proteomic Analysis of Interchromatin Granule Clusters. *Mol. Biol. Cell* 15 : 3876-3890.
- Salamanca-Gómez, F. 2003. Los cromosomas humanos. En: *Biología celular y molecular*. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 807-835.
- Sanford, J. R. y Cáceres, J.F. 2004. Pre-mRNA splicing: life at the centre on the central dogma. *J. Cell Sci.* 117 : 6261-6263.
- Sanford, J. R.; Gray, N. K.; Beckmann, K. y Cáceres, J. 2004. A novel role for shuttling proteins in mRNA translation. *Genes Develop.* 18 : 755-768.
- Sarmiento-Fradera, M. Ahuehuetes, the old trees of the water. *México Desconocido*. 277: 15-18.

- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C. Greco, A., Hochstrasser, D. y Díaz, J.J. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13:4100-4109.
- Schols, P. y Smets, E. 2001. Carnoy: analysis software for LM, SEM and TEM images. Leuven: distributed by the authors. <http://www.carnoy.org>.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V. J., Manley, J. L., Lahti, J. M., y Reinberg, D. 2003. ASAP, s novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 23 : 2981-2990.
- Shao, Z., Yang, J. Somylo, A.P. 1995. Biological atomic force microscopy: from microns to nanometers and beyond. *Annu. Rev. Cell Biol.* 11 : 241-265.
- Shen, H., Kan, J.L.C., Green, M.R. 2004. Arginine-serine-rich domains at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol. Cell* 367-376.
- Shopland, L.S., Johnson, C.V., Byron, M. 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *J. Cell Biol.* 162 : 981-990.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación* 6 de marzo.
- Segui-Simarro, J.M., Testillano, P.S. y Risueno, M.C. 2003. Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus*. *L. J. Struct. Biol.* 142 : 379-391.
- Silva-Andrade, F., Chávez, F., Prutskij, T., Ilinsky, A. 2002. Microscopía de fuerza atómica control de las superficie de los semiconductores. *Ciencia y Desarrollo.* 163: 69-77.
- Simpson, R.T. 1999. In vivo methods to analyze chromatin structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:225-229.
- Singer, I.L. 1975. Ultrastructural studies of H-1 parvo-virus replication in human NB cell nuclei. *Exp. Cell Res.* 95 : 205-217.
- SIRE:CONABIO-PRONARE. *Taxodium mucronatum*. Paquetes tecnológicos.
- Skoglund, U., Andersson, K., Strandberg, B., Daneholt, B. 1986. Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. *Nature.* 319 : 560-564.
- Sleeman, J. E. 2004. Dynamics of the mammalian nucleus: can microscopic movements help us to understand our genes?. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* 362 :2777-2793.
- Smetana, K., Steele, W. J. y Bush, H. 1963. A nuclear ribonucleoprotein network. *Exp. Cell Res.* 31: 198-201.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., y Zanis, M.J. 2002. Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *Am. J. Bot.* 89 : 1670-1681.
- Soltis, P., Soltis, D., Wolf, P. 1999. The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of rDNA signal?. *Mol. Biol. Evol.* 16 : 1774-1784.

- Soltis, P., Soltis, D. y Smiley, C.J. 1992. An rbcL sequence from a Miocene *Taxodium* (Bald cypress). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 : 449-451.
- Soop, T., Ivarsson, B., Björkroth, B., Fomproix, N. Masich, S. Cordes, V. y Daneholt, B. 2005. Nup153 affects entry of messenger and ribosomal ribonucleoproteins into the nuclear basket during export. *Mol. Biol. Cell* 16 : 5610-5620.
- Spector, D.L. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72 : 573-608.
- Spector, D. L. 2001. Nuclear Domains. *J. Cell Sci.* 114 : 2891-2893.
- Spector, D.L., Goldman, R.D. y Leinward, A.L. 1998. Cells a laboratory manual, subcelular localization of genes and their products. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Spector, D.L. 1990. Higher order nuclear organization: Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 : 147-151.
- Staley, J. P., Guthrie, C. 1999. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28. *Mol Cell* 3 : 55-64.
- Stefanović, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J. y Masselot, M. 1998. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *Amer. J. Bot.* 85 : 688-697.
- Stein, G.S., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L. y Lian, J.B. 2000a. Nuclear structure – gene expresión interrelationships, implications for aberrant gene expresión in cancer. *Cancer Res.* 60 : 2067-2076.
- Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B.; Montecino, M., Choi, J.Y., Zaidi, K. y Javed, A. 2000b. Intranuclear trafficking of transcription factors, implications for biological control. *J. Cell Sci.* 113 : 2527-2533.
- Sternsdorf, T., Grötzinger, K, Jensen, H. W. 1997. Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology.* 198 : 307-331.
- Stevens, S.W., Ryan, D. E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D., y Adelson, J. 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell* 9 : 31-44.
- Stoffler, D., Fahrenkrug, B. y Aebi, U. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 : 391-401.
- Stoiber, R.E. y Morse, S.A. 1994. Crystal identification with the polarizing microscope. Chapman & Hall, New York. pp. 121.
- Tsumura, Y., Tomarum N., Suyama, Y. e Bacchus, S. 1999. Genetic diversity and differentiation of *Taxodium* in the south-eastern United States using cleaved amplified polymorphic sequences. *Heredity.* 83 : 229-238.
- Turner, I.A., Norman, C.M., Churcher, M.J. y Newman, A. J. 2004. Roles of the U5 snRNP in spliceosome dynamics and catalysis. *Biochem. Soc. Trans.* 32 : 928-931.
- Uhlmann, F. 2001. Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO reports.* 2: 487-492.
- Vázquez-Nin, G.H. y Bernhard, W. 1971. "Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules". *J. Ultrastruct.* 36 : 842-860.

- Vázquez-Nin, G., Echeverría, O. 1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40 : 7-16.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M.; Molina, E. y Fragoso, J. 1978. Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35 : 221-228.
- Vázquez-Nin, G.H., Ortega-Rangel, J.A. y Echeverría, O.M. 1980. Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell* 39 : 143-146.
- Vázquez-Nin, G.H. Echeverría, O.M., Fakan, S., Leser, G. y Martín, T. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma.* 99 : 44-51.
- Vázquez-Nin y Echeverría, O.M. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, México, 168 p.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Jiménez-García, L.F. 2003. El núcleo celular interfásico. Morfología y función. En: Biología celular y molecular. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 341-394.
- Vázquez-Ramos, J.M. 2003. El ciclo celular. En: Biología celular y molecular. Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. (Eds.), Pearson Education, México, pp. 595-616.
- Villa-Salas, Alonso y Martínez. Biodiversitas, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, año 5 Núm. 25 julio de 1999. "El Ahuehuate", Alicia Elena Martínez Bautista, pp. 12, 13 y 14.
- Verschure, P. J. 2004. Positioning the genome within the nucleus. *Biol. Cell* 96 : 569-577.
- Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Harper, F., Bachelier, J.P. 1993. Intranuclear distribution of Poly (A)⁺ RNA determined by electron microscope in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* 208 : 19-34.
- Wassef, M, Burglen, J., Bernhard, W. 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69 : 121-133.
- Watson, F.D. 1985. The nomenclature of pondycypress and baldcypress. *Taxon.* 34 : 506-509.
- Watson, M.L. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13 : 162-167.
- Watson, E.D. 2000. *Taxodium*. En: Flora of North America Association. <http://www.fna.org/FNA/>
- Wetterberg, I., Bauren, G. y Wieslander, L. 1996. The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA* 2 : 641-651.
- Whitford, L.A. 1956. A theory on the formation of cypress knees. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 72 : 80-83.
- Will, C. y Luhrmann, R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 : 290-301.
- Wood, E.A. 1997. Crystals and light: an introduction to optical crystallography. Dover Publications, Inc., New York, 156 p.
- Wyman, D. 1965. Trees of American gardens. Macmillan, New York, 502 p.

- Xie, S. Q., Martin, S., Guillot, P.V., Bentley, D.L. y Pombo, A. 2006. Splicing speckles are not reservoirs of RNA polymerase II, but contain an inactive form, phosphorylated on serine² residues of the C-terminal domain. *Mol. Biol. Cell* 17 : 1723-1733.
- Yoshihisa, T. 2006. tRNA new aspects in intracellular dynamics. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 1813-1818.
- Young, D.W., Zaidi, S.K., Furcinitti, P.S., Javed, A., Van Wijnen, A. J., Stein, J.L., Lian, J.B. y Stein, G. S. 2004. Quantitative signature for architectural organization of regulatory factors using intranuclear informatics. *J. Cell Sci.* 117 : 4889-4896.
- Zaidi, S. K., Young, D.W., Choi, E.J., Pratap, J. (2005). The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *Europ. Molec. Biol. Org.* 6 : 128-133.
- Zavala, G., Vázquez-Nin, G. 1997. Changes of ribonucleoproteic structures of embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation. *Biol. Cell* 89 : 245-255.
- Zavala, G., Aguilar, X., Jiménez-García, L.F., Echeverría, O.M. y Vázquez-Nin, G.H. 1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during differentiation of muscle cells in the chick embryo. *Biol. Cell.* 76: 159-165.
- Zenklusen, D. y Stutz, F. 2001. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* 498 : 150-156.
- Zink, D., Cremer, T. 1998. Cell nucleus: chromosome dynamics in nuclei of living cells. *Curr. Biol.* 8 : 321-324.
- Zink, D., Fischer, A. H. y Nickerson, J.A. 2004. Nuclear structure in cancer cells. *Nature.* 4 : 677-687.
- Zimber, A., Nguyen, Q. y Gespach, C. 2004. Nuclear bodies and compartments. Functional roles and cellular signaling in health and disease. *Cell Signaling.* 16 : 1085-1104.

11. RELACIÓN DE FIGURAS	PAG.
Figura 1. Dominios nucleares.	7
Figura 2. Esquema del núcleo de mamífero en interfase, con sus componentes ribonucleoproteicos.	13
Figura 3. Empaquetamiento y transporte del transcrito de mRNA.	19
Figura 4. Vía de ensamble y reciclado de los componentes del <i>esplíceosoma</i>	31
Figura 5. Dinámica y catálisis del <i>esplíceosoma</i>	32
Figura 6. Relación filogenética de los diferentes grupos de angiospermas	65
Figura 7. Árbol de máxima parsimonia de las gimnospermas actuales	66
Tabla 1. Dominios nucleares.	8
Tabla 2. Cuadro comparativo las especies de <i>Taxodium</i>	59

ÍNDICE DE FOTOMICROGRAFÍAS

- FOTOMICROGRAFÍAS ÓPTICAS.

Figura 8. Corte transversal de hoja de <i>Taxodium mucronatum</i>	76
Figura 9. Cortes transversales en fresco, de hoja de <i>T. mucronatum</i> observados por diferentes técnicas de iluminación	78
Figura 10 a. Corte transversal de hoja de <i>T. mucronatum</i> , epifluorescencia y contraste de fases.	77
Figura 33. Fases de la mitosis en <i>T. mucronatum</i>	107

- DEL SISTEMA APOTOME (Carl-Zeiss).

Figura 10 b. Núcleo de hoja del mesófilo de <i>T. mucronatum</i>	77
Figura 11. Núcleos de hoja de <i>T. mucronatum</i>	78
Figura 12. Serie de cortes ópticos de núcleos de <i>T. mucronatum</i>	79
Figura 13. Reconstrucción tridimensional de núcleos de <i>T. mucronatum</i>	80

- FOTOMICROGRAFÍAS DE FUERZA ATÓMICA, MODO DE CONTACTO.

Figura 14. Núcleo de <i>Taxodium mucronatum</i>	82
Figura 15. Topografía de una célula de <i>T. mucronatum</i>	85
Figura 16. Núcleos del parénquima esponjoso en <i>T. mucronatum</i>	86
Figura 17. Nucléolo y grumos de cromatina compacta en <i>T. mucronatum</i>	87
Figura 18. Topografía del nucléolo y cromatina compacta en <i>T. mucronatum</i>	88

Figura 49. Cromátida en descompactación	127
Figura 50. Telofase temprana, contraste general uranilo-plomo	130
Figura 51. Telofase, contraste general uranilo-plomo	131
Figura 52. Telofase tardía. EDTA	132
Figura 53. Regiones de un núcleo en telofase tardía, ocupadas por abundantes gránulos de 32 nm. EDTA	133
Figura 54. Región de cromatina que reanuda la transcripción. EDTA	134
Figura 55. Gránulos ribonucleoproteicos de 32 nm, en telofase tardía. EDTA	135
Figura 56. Ribonucleoproteínas en maduración	136
Figura 57. Fin de la telofase	138