



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Análisis de la distribución de factores de *splicing*
de la familia de proteínas SR en las células
epiteliales de la mucosa oral de ratón

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

C.D. CYNTHIA JEANNETTE CEJA LÓPEZ

DIRECTOR:

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA 2009

AGRADECIMIENTOS



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.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, director de esta tesis, por haber depositado su confianza en mí y haberme dado la honrosa oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo en el laboratorio de Microscopía Electrónica en la Facultad de Ciencias, y por ser mi mayor ejemplo de profesionalismo y dedicación. Otra vez gracias.

A mi guía y amiga M. en C. Reyna Lara Martínez, por su generosidad al compartir conmigo sus conocimientos y experiencia profesional, por su valioso tiempo y por su calidad como persona.

A la Dra. Lourdes Agredano Moreno por su ejemplo de constancia y disciplina y por su confianza.

A la Dra. Patricia Tato por la contribución tan importante en la realización de este trabajo, por sus incondicionales apoyo y estímulo que me alientan a seguir cada día, por su confianza y cariño y sobretodo por ser un admirable ejemplo a seguir, tanto profesional como personal.

Al Dr. Javier Ambrosio por sus valiosas observaciones durante el progreso de este trabajo y por compartir sus conocimientos y pasión por la investigación, por su apoyo y confianza y por dejar huella como un excelente profesor.

A la Dra. Ana María Fernández, por su apoyo para realizar pruebas de inmunohistoquímica y por su dedicación, entusiasmo y comprensión.

Al Dr. Juan A. Molina Guarneros, por el apoyo que me ha brindado en el transcurso de este proyecto, por escucharme, por sus sabios consejos y por creer en mí.

A la Histotecnóloga Guadalupe Hiriart del INER, Teodomiro Pérez Salazar del Dpto. de Patología Bucal y Clínica, y a Juan Trejo por el apoyo en el procesamiento de las muestras histológicas.

A la Dra. Laura Elena Pérez Flores por impulsarme, por ser mi inspiración y por la confianza infinita que siempre ha depositado en mí.

Al Dr. Alberto Jorge Falcón Albarrán por su apoyo en los cursos de biología, y por su constante aliento en los momentos más difíciles.

A mi amigo José López Molina por estar siempre y por su invaluable apoyo.

A mis queridos padres, Emma y Jorge

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	11
1. Expresión génica	11
2. Proceso de Transcripción	11
3. Procesamiento del pre-mRNA	12
3.1 Metilación (cap)	13
3.2 Poliadenilación	13
3.3 <i>Splicing</i>	13
3.3.1 <i>Spliceosoma</i>	15
3.3.2 Proteínas SR	17
4. Organización nuclear	20
4.1. Gránulos intercromatinianos	22
4.2. Fibras pericromatinianas	23
4.3. Gránulos pericromatinianos	23
4.4. Cuerpos de Cajal	23
5. Patrón moteado, dinámica intranuclear	25
5.1. Patrón moteado en tejidos	28
6. Mucosa oral	29
6.1 Funciones	29
6.1.1. Protección	29
6.1.2. Sensibilidad	30
6.1.3. Secreción	30

6.2. Estructura	30
6.2.1. Mucosa de revestimiento	30
6.2.2. Mucosa masticatoria	30
6.2.3. Mucosa especializada	30
6.3. Epitelio oral	31
6.3.1. Capas estructurales del epitelio	31
6.3.1.1. Estrato basal	31
6.3.1.2. Estrato espinoso	32
6.3.1.3. Estrato granuloso	33
6.3.1.4. Estrato córneo	33
6.4. Proliferación epitelial	34
7. Factores de splicing y procesos patológicos	34
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	37
V. OBJETIVOS	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	39
VII. RESULTADOS	43
VIII. DISCUSIÓN	59
IX. CONCLUSIONES	62
X. PERSPECTIVAS	63
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A1hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (del inglés heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)
ASF/SF2	Factor de SF2 splicing alternativo/factor de splicing 2
CBs	Cuerpos de Cajal (del inglés cajal bodies)
CTD	Dominio carboxilo Terminal (del inglés carboxy terminal domain)
DNA	Ácido desoxiribonucleico del inglés deoxyribonucleic acid)
GC	Componente granular (del inglés granular component)
GFP	Proteína fluorescente verde (del inglés green fluorescent protein)
HnRNPs	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (del inglés heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)
hnRNAs	RNAs heterogéneos nucleares (del inglés heterogeneous nuclear RNAs)
HPV-16	Cepa 16 del virus de papiloma humano (del inglés human papillomavirus)
IGCs	Gránulos intercromatinianos (del inglés interchromatin granule clusters)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (del inglés messenger ribonucleic acid)
NORs	Regiones organizadoras del nucléolo (del inglés nucleolar organizing regions).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCG	Gránulos pericromatinianos
PFCs	Fibras pericromatinianas
Pre-mRNA	Precursor de RNA mensajero

RRMs	Motivos de reconocimiento al RNA (del inglés RNA-recognition motifs)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés ribonucleic acid)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal (del inglés ribosomal RNA).
RNAP	RNA polimerasa (del inglés RNA polymerase)
SC35	Componente de 35kD del spliceosoma
snRNA	RNA pequeño nuclear (del inglés small nuclear RNA)
snoRNA	RNA pequeño nucleolar (del inglés small nucleolar RNAs)
scRNAs	Ácido ribonucleico pequeño citoplásmico
SFCs	Compartimientos de factores de splicing (del inglés splicing factor compartments)
SR	Dominios ricos en serina/arginina
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia (del inglés transfer RNA)
VPH	Virus de papiloma humano (del inglés human papillomavirus)

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1a. Flujo de la información genética.	14
Figura 1b. La reacción del <i>splicing</i> incluye dos pasos de transesterificación	14
Figura 2. Las subfamilias de proteínas SR.	16
Figura 3. Composición molecular del <i>spliceosoma</i> .	17
Figura 4. Estructura primaria de las proteínas SR.	18
Figura 5. Secuencia del <i>splicing</i> .	20
Figura 6. Dominios intranucleares.	21
Figura 7. Ribonucleoproteínas intranucleares.	24
Figura 8. Dinámica de los factores de <i>splicing</i> .	27
Figura 9. Modelo morfológico de la actividad de transcripción y <i>splicing</i> en el núcleo celular.	28
Figura 10. Estratos epiteliales del epitelio plano estratificado de la mucosa oral	32
Figura 11. Estratos epiteliales de la mucosa oral de carrillo de ratón	43
Figura 12. Patrón moteado de los 4 estratos epiteliales de la mucosa oral de ratón observado en los 4 campos de visualización	44
Figura 13. Micrografía panorámica de un corte de tejido epitelial oral	45
Figura 14. Núcleo 1	46
Figura 15. Núcleo 2	46
Figura 16. Núcleo 3	47
Figura 17. Núcleo 4	47
Figura 18. Núcleo 5	48
Figura 19. Núcleo 6	48
Figura 20. Núcleo 7	49
Figura 21. Núcleo 8	49
Figura 22. Núcleo 9	50

Figura 23. Núcleo 10	50
Figura 24. Núcleo 11	51
Figura 25. Núcleo 12	51
Figura 26. Núcleo 13	52
Figura 27. Núcleo 14	52
Figura 28. Núcleo 15	53
Figura 29. Núcleo 17	53
Figura 30. Núcleo 17	54
Figura 31. Reconstrucción tridimensional del patrón moteado en 20 cortes ópticos meridionales.	55
TABLA 1. Características de las motas en los diferentes estratos.	56
Figura 32. Grafica del número de motas por estrato.	57
Figura 33. Grafica del número de motas por núcleo por estrato.	57
Figura 34. Grafica del tamaño de motas por núcleo por estrato.	58
Figura 35. Grafica de la forma de las motas por núcleo por estrato.	58

RESUMEN

Los factores de *splicing* se distribuyen dentro del núcleo en forma de un patrón moteado en células en cultivo y en tejidos. La distribución parece depender del tipo celular. En este trabajo se estudió si los factores de *splicing* en células del epitelio oral de ratón se organizan en un patrón moteado, y si este varía dependiendo del estrato celular. Se analizaron 99 núcleos celulares correspondientes a los estratos epiteliales de 10 muestras del epitelio oral de ratón que se procesaron para inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 3C5 contra la familia de proteínas SR de los factores de *splicing*. Las preparaciones se analizaron por medio de epifluorescencia y microscopía confocal.

Los resultados del análisis del tamaño, número y forma de las motas muestran diferencias en la expresión de los factores de la familia SR del *splicing* en cada estrato del epitelio. Existe una mayor actividad transcripcional en el estrato granuloso, seguido del basal y espinoso; existe una mayor expresión de los factores en el estrato basal, seguido del espinoso y el córneo existiendo diferencias significativas entre cada estrato, sugiriendo que la expresión de los factores está relacionada con la existencia de células progenitoras, división y muerte celular. Los resultados sugieren que cada estrato posee características propias y específicas en número, tamaño y forma de las motas; la caracterización de la distribución de los factores de *splicing* en la mucosa oral sana realizada en esta tesis, constituye una herramienta clave en el estudio de la patogénesis de la misma, así como un aporte importante a la biología celular de la mucosa oral, que nos proporciona información de la organización de moléculas importantes en procesos patológicos, lo cual nos sirve como referencia para conocer la salud y así, en estudios posteriores poder detectar anomalías relacionadas con estos factores que pueden estar involucradas en la enfermedad, partiendo del conocimiento del patrón de expresión normal.

Las alteraciones en los patrones de *splicing* pueden servir como marcadores de la alteración celular asociados con la enfermedad y tienen el potencial de proporcionar información pronóstica y diagnóstica y distintos patrones de expresión de factores de *splicing* podría servir como nuevos marcadores patológicos y representar una herramienta para la intervención en pacientes ya que diversos factores de *splicing* han sido encontrados alterados en diversas patologías humanas, incluyendo los que han sido analizados en tejido sano en esta tesis.

I. INTRODUCCIÓN

El núcleo celular es una estructura molecular muy compleja, altamente dinámica y organizada en compartimentos relacionados con la expresión genética. Uno de estos compartimentos se denomina “*speckles*” también conocido como “*patrón nuclear moteado*” o compartimentos de factores de *splicing* (SFCs) cuando es analizado con microscopio de fluorescencia utilizando anticuerpos contra los factores de *splicing* de la familia de proteínas SR. El *patrón nuclear moteado* está compuesto de 20-50 puntos brillantes donde se concentran tales factores. El *splicing*, un proceso llevado a cabo por una maquinaria molecular compleja llamada *spliceosoma* que consta de diversos factores, entre muchos otros, se encuentran la familia de proteínas SR y varios tipos de hnRNPs, de los cuales uno de ellos tiene una función específica en el procesamiento del RNA. Sin embargo en estudios recientes, al ser analizados en tejidos fijos, se les ha encontrado relacionados con moléculas involucradas en procesos patológicos tales como la expresión de proteínas víricas de una cepa de virus de papiloma humano (VPH) que evoluciona a cáncer cervicouterino. Tal es el caso de la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (A1hnRNP), que a altos niveles, inhibe la expresión de HPV – 16 [1], así como relacionados con diversos tipos de carcinomas [1,2,3,83,84,86-91].

Durante varios años, estudios han sugerido cambios en el *splicing* del mRNA en neoplasias humanas [2,3], incluyendo el cáncer de mama, en el que se han observado incremento en la expresión individual de proteínas SR durante tumorigénesis de glándula mamaria. Las preneoplasias difieren de los tumores en que presentaron un patrón de expresión complejo que reveló diferencia en el patrón de expresión de las proteínas SR entre los tejidos neoplásicos y la metástasis. Estos datos sugieren que las modificaciones relacionadas con la concentración de factores específicos de *splicing* durante la preneoplasia temprana difieren durante la formación del tumor, dando lugar a la capacidad de las proteínas SR para afectar las decisiones del procesamiento y que un número de pre-mRNAs podrán sufrir cambios en el *splicing* durante los estados tempranos e intermedios del cáncer [3].

Estas proteínas, por lo tanto, se convierten en atractivos factores de estudio debido a los cambios en su actividad durante la tumorigénesis por lo que, la determinación de los niveles en los patrones de expresión de factores de *splicing* en lesiones preneoplásicas podría ser muy útil, sugiriendo que éstas moléculas, independientemente de sus funciones conocidas, pueden revelar una expresión distinta al ser analizados con experimentos en tejidos fijos. Los factores de la familia de proteínas SR, han sido observados en cultivos de células de mamíferos y recientemente en algunos tejidos; en ambos casos, su expresión cambia dependiendo de la actividad fisiológica. También se ha observado que el número y la distribución de motas (*speckles*) parecen variar entre tejidos [4], lo que sugiere que su organización depende también de la diferenciación celular, aunque los cambios en esta distribución en las distintas etapas de las células epiteliales no han sido observados.

II. ANTECEDENTES

1. EXPRESIÓN GÉNICA

La base molecular y el control génico en eucariontes, es actualmente una de las áreas más intensamente estudiadas. Los avances de la genética molecular han permitido el estudio de la participación de los genes en los programas controlados que dirigen el desarrollo de un animal o planta. Una vez que fue comprendida la importancia del procesamiento del RNA y de la estructura génica y cromosómica en eucariontes, la atención se centra en el estudio de la regulación génica la cual sucede a nivel de la transcripción, así como después de ella, y qué patrones de regulación génica específicos son determinantes en cualquier decisión del programa de desarrollo.

El Dogma Central de la Biología Molecular establece el flujo de información desde el DNA al RNA y de éste a las proteínas a partir de los procesos secuenciales de replicación, transcripción y traducción, en los cuales las proteínas participan regulando dichos procesos, así como la retrotranscripción por medio de la enzima transcriptasa reversa [5].

2. PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

La transcripción del DNA es un mecanismo fundamental para el control celular y para la expresión de la información génica. Este mecanismo permite que la información del DNA llegue al resto de orgánulos celulares y salga del núcleo en el caso de los eucariotas. Para ello esa información debe copiarse en forma de RNA.

El RNA es una macromolécula polinucleótida de una sola cadena con dirección 5´a 3´, constituida por una base nitrogenada (citosina, guanina, adenina o uracilo); fosfato y azúcar ribosa. Con cuatro tipos de RNA, los cuales se sintetizan como precursores; es el mRNA el cual presenta el 3-5% del total; el tRNA con 5-7%; el rRNA con 85-90% y un pequeño grupo de RNAs localizados en el núcleo; el RNA pequeño nucleolar (snoRNA) y el RNA pequeño citoplásmico (scRNA) que representa el 1% del total.

El mRNA es la copia genética originada en el núcleo utilizada en la traducción en el citoplasma, que determina el orden de los aminoácidos que se incorporan en la elongación de un polipéptido; además contiene secuencias específicas denominadas promotores, sitios de inicio, motivos de ampliación de secuenciación hacia la izquierda o la derecha de la terminación de la transcripción.

El RNA es el único polímero biológico que sirve en la catálisis (ribozimas) y como almacén de la información, por este motivo, se les han postulado como las moléculas que fueron la base de la vida temprana en la evolución.

Para la transcripción del RNA ocurre una reacción de polimerización.

El proceso de transcripción se divide en tres etapas:

Iniciación: La RNA-polimerasa II se une a una zona del DNA que se quiere transcribir. A continuación se corta la hebra de DNA y se separan las dos cadenas, iniciándose el proceso de copia del DNA; esta copia no requiere ningún cebador. Los ribonucleótidos se añaden en sentido 5'-3'.

En el caso de la transcripción de un gen que codifica para una proteína, la RNA-polimerasa se une a una zona de control denominada promotor, que regula la actividad de la RNA-polimerasa y, por tanto, regula la expresión del gen.

Elongación: La RNA-polimerasa II continúa añadiendo ribonucleótidos complementarios al DNA hasta que se llega a una determinada secuencia que indica a la polimerasa el final de la zona a transcribir. Cuando ya se han añadido unos 30 ribonucleótidos, en el extremo 3' se une un nucleótido modificado de 7-metil guanosina, que forma lo que se denomina la "caperuza", el "casquete" o el extremo "Cap".

Terminación: La transcripción finaliza, y al RNA recién formado se le añade una cola de unos 200 nucleótidos de adenina, conocida como la cola de poli-A, agregada por la enzima poli-A polimerasa, que sirve para que el RNA no sea destruido por las nucleasas celulares.

Tras estos procesos se habrá formado un RNA, mensajero, transferente, ribosómico o nucleolar, que se desplazará hasta el lugar donde llevan a cabo su función, que generalmente es en el citoplasma [5,6].

3. PROCESAMIENTO DEL pre-mRNA

Las células eucariontes, de acuerdo a su compartimentalización, tienen una actividad nuclear distinta a las células procariontes. La mayor parte de los genes de un organismo eucarionta están compuestos de fragmentos con secuencias codificadoras de proteínas, interrumpidas por fragmentos mucho mayores de secuencias no codificantes. Cada segmento de DNA (gen) sirve como un molde químico o patrón para la síntesis enzimática, en el núcleo celular, de un RNA primario precursor del ARN mensajero en el proceso de transcripción.

Actualmente se conoce que los genes de eucariontes están segmentados. En 1978, Gilbert propuso utilizar el término exón para las regiones que se expresan e intrón para las que son intermedias o interrumpen la lectura del mensaje genético, lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gene, llamado RNA pre-mensajero (pre-mRNA) o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA). Esos transcritos son procesados o madurados en tres reacciones principales que son:

3.1. Metilación (cap)

La metilación en el extremo 5', que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosina, denominado "cap", que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción.

3.2. Poliadenilación

La poliadenilación en el extremo 3', que se refiere a la adición de adeninas en todos los mRNAs excepto en los de las histonas, llamado cola de poli A, la cual está formada por una secuencia de 50 a 250 nucleótidos.

3.3. Splicing

El splicing, es el proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones (escindiéndolos del pre-mRNA) y se unen o empalman los exones para generar el RNA mensajero maduro o mRNA.

El *splicing* es un proceso que químicamente consiste de dos reacciones sucesivas de transesterificación. El corte y el empalme son dependientes de la hidrólisis de ATP y son catalizados por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado "spliceosoma". Este proceso dará como resultado la formación del mRNA, que será transportado al citoplasma y en donde será traducido a proteína en el caso de que ocurra *splicing* constitutivo o bien, a diversas proteínas en el caso de que se lleve a cabo *splicing* alternativo. El *splicing* se lleva a cabo en el núcleo, aunque hay reportes de que también puede ser citoplásmico [7-11].

En la figura 1b se ilustra el proceso del *splicing*. En resumen, el pre-mRNA se forma a partir de un gen segmentado y tiene varios sitios de acción *cis* o elementos de la misma secuencia.

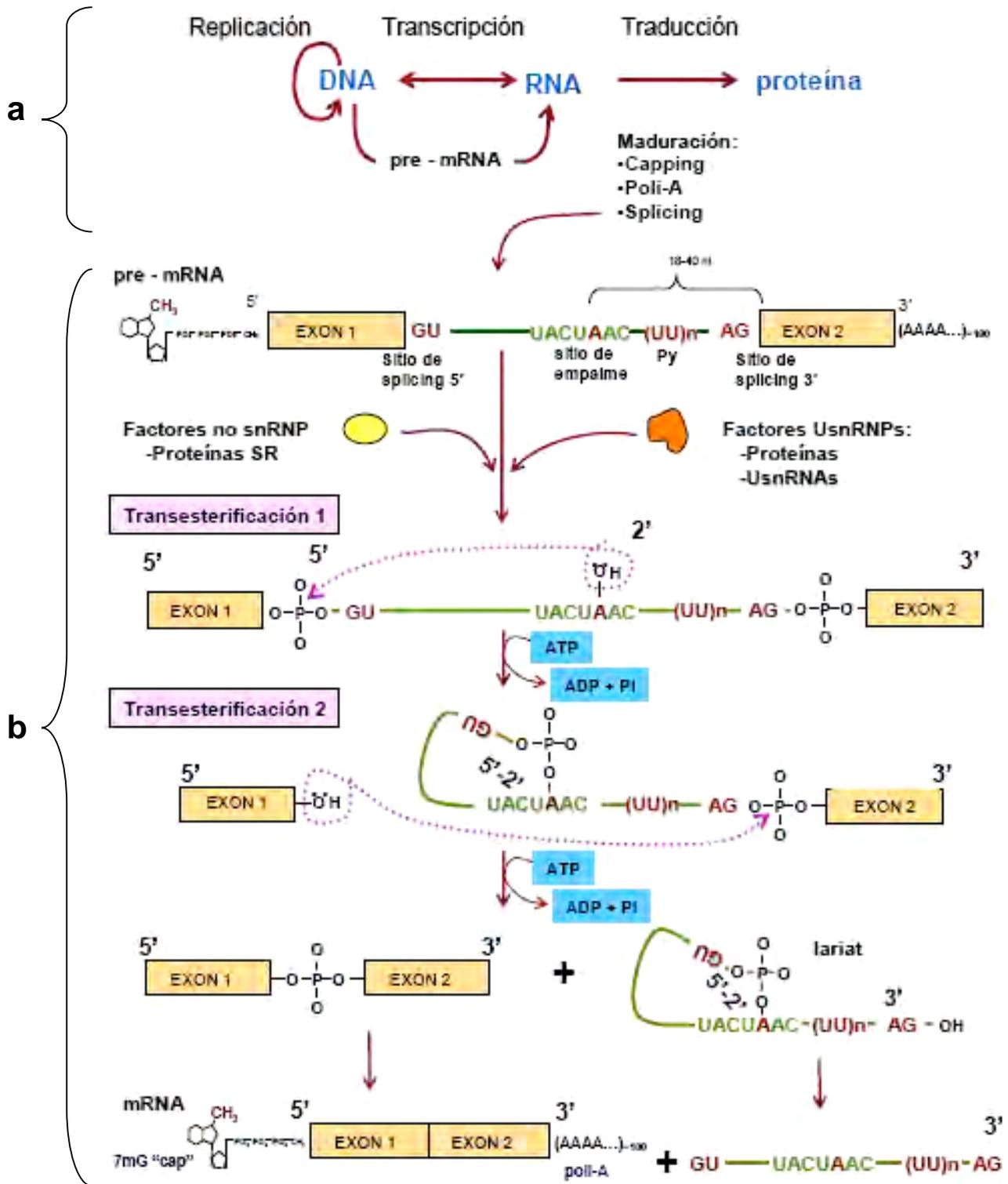


Figura 1. a) Flujo de la información genética. b) La reacción del *splicing* incluye dos pasos de transesterificación, en donde se requiere de ATP. En la reacción se libera el intrón y se ligan los exones. (Tomado de Jiménez-García, *et al.* 2007).

Los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitios de *splicing* 5') e intrón y exón (sitios de *splicing* 3'), respectivamente. El punto de empalme (*branchpoint*) es en general una adenina y mantiene una secuencia consenso, al menos para el caso de levaduras. Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos, usualmente) llamada la región Py. En el primer paso de transesterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de empalme, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 5', generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con el lado 2' del residuo de adenina en el sitio de empalme. Después ocurre la segunda reacción de transesterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 3'. Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de reata o *ariat*, al mismo tiempo que se unen los exones para generar el mRNA maduro. El intrón en forma de *ariat* se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) [7-10].

3.3.1. El *spliceosoma*.

Para que se lleve a cabo el *splicing* se requieren varios factores, que en conjunto forman un gran complejo macromolecular llamado *spliceosoma*, el cual que incluyen diferentes tipos de RNA y proteínas que son:

1) Los RNA pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnRNAs). Los cinco tipos son: el U1snRNA, el U2snRNA, el U4snRNA, el U5snRNA y el U6snRNA. El U3snRNA participa en eventos de maduración del pre-rRNA (RNA ribosomal inmaduro o precursor). Estos RNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, salvo el U6snRNA, que lo transcribe la RNA polimerasa III. En el núcleo, los UsnRNAs se asocian con proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs).

2) Las partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que contienen RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), son estabilizadoras, es decir, su función radica en asociarse al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases. De esta manera el pre-mRNA permanece accesible para interactuar con otras moléculas.

3) Las proteínas SR (proteínas con dominios ricos en Serina y Arginina), SR de las cuales hablaremos más adelante de una manera detallada; representan una familia de factores de *splicing* que se reporta en

vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas

tienen varios papeles reguladores en el *splicing* como son la definición de los sitios de *splicing* y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Estas proteínas nucleares de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) De Tipo I, las cuales presentan un solo Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM) en el extremo amino-terminal y su dominio SR carboxilo Terminal, y B) de Tipo II, las cuales presentan dos Motivos de Reconocimiento a RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal SR. (figura 2).

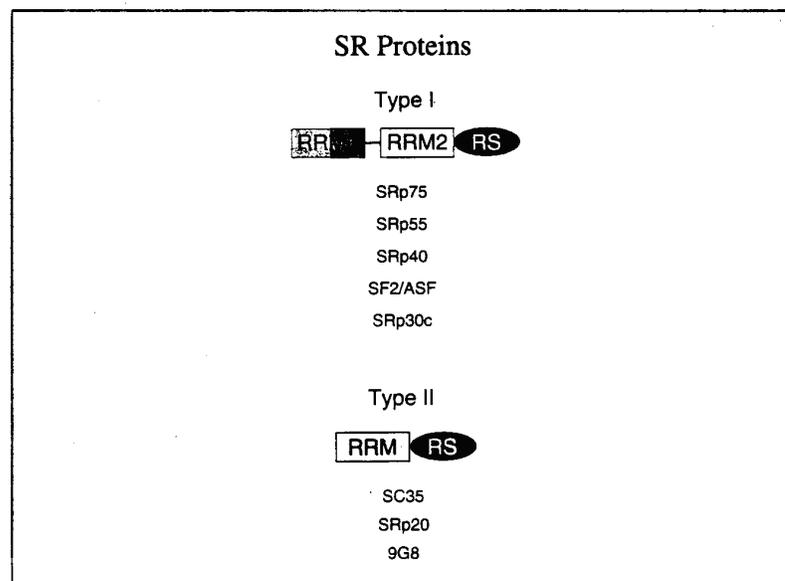


Figura 2. Las subfamilias de proteínas SR. Las proteínas SR pueden distinguirse según la presencia o ausencia de un segundo RRM (Motivo de Reconocimiento a RNA). Las de tipo 1 (Type 1), tienen dos motivos de reconocimiento a RNA, y las tipo II (Type II) tienen solo un motivo de reconocimiento a RNA. (Tomado de Krainer, *et al.* 1985)

Además, existen otras proteínas que pueden o no tener una estructura distinta del Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM). En las células de mamíferos se han identificado y aislado componentes esenciales del *splicing*, tales como el factor SF2/ASF, el factor SC35 y el 9G8, los cuales han sido identificados por anticuerpos monoclonales [10, 12-32].

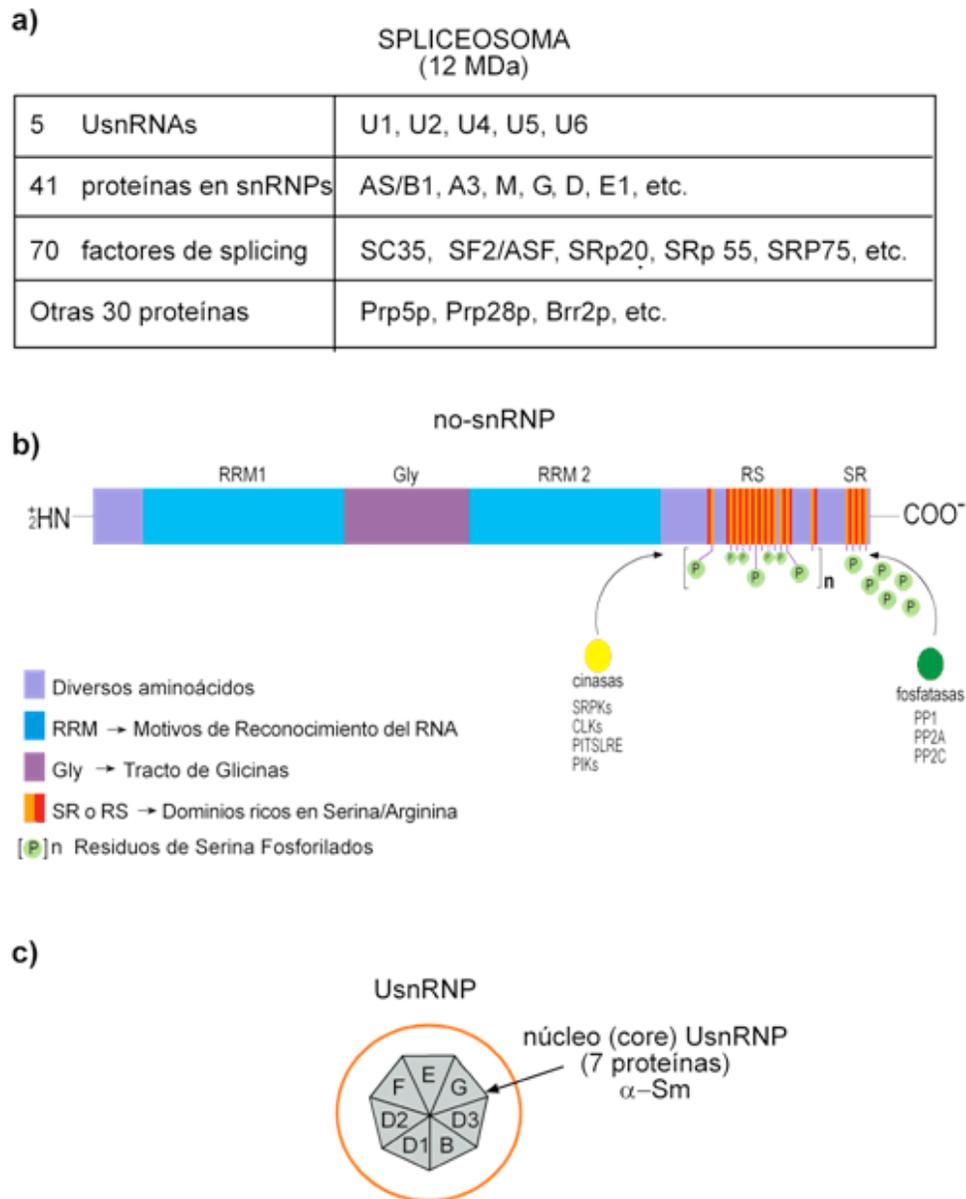


Figura 3. Composición molecular del *spliceosoma*. La tabla (a) muestra los diferentes elementos proteicos y de RNAs del *spliceosoma*. En (b) se muestra el esquema genérico de factores de *splicing* no-snRNPs (proteínas SR) con los dominios estructurales que las componen y las cinasas y fosfatasa que los modifican; en (c) se muestran las proteínas comunes a todas las snRNPs excepto el U6, que son reconocidos por los anticuerpos anti-Sm. De unas 20 proteínas totales de las USNRNPs, 7 forman el núcleo (*core*). (Tomado de Jiménez-García, *et al.* 2007).

3.3.2. PROTEÍNAS SR

La figura 3 muestra los elementos del *spliceosoma* (a), un esquema de las proteínas SR (b) y el sitio conservado de 20 proteínas de las UsnRNPs (c).

Según el número de RRM's presentes pueden dividirse en dos diferentes subgrupos: las proteínas SR de tipo 1, representadas por SF2/ASF (factor de *splicing* 2/ factor de *splicing* alternativo), SRp40, SRp55 y SRp75, poseen dos motivos de reconocimiento a ARN; y las de tipo 2, entre las cuales se encuentran SRp20, 9G8 y SC35, poseen un sólo motivo. A pesar de que en principio se especuló que la presencia de una o ambas copias del RRM podía determinar la especificidad de estos reguladores del *splicing*, los dos tipos de proteínas presentan comportamientos similares en ensayos *in vitro* de *splicing* constitutivo y alternativo [21].

Numerosas investigaciones han demostrado que los residuos de serina precedidos o seguidos de argininas (dipéptidos RS/SR) son fosforilados por cinasas específicas, permitiendo así que las proteínas SR migren desde sus reservorios intranucleares hacia los sitios de *splicing*. Se han identificado varias quinasas en mamíferos que fosforilan factores de *splicing* con dominios ricos en dipéptidos SR dispuestos en tandem, incluyendo las cinasas específicas de proteínas SR 1 y 2 (SRPK1 y SRPK2). La remoción de las repeticiones de serina y arginina de la proteína SR SF2/ASF, así como la sustitución de las serinas o de las argininas, resultó en proteínas mutantes que no podían ser fosforiladas por SRPK1, lo cual sugirió que esta cinasa reconoce específicamente los dipéptidos SR conservados [12,15,19, 23-32].

La figura 5 ilustra como los factores de *splicing* interaccionan con el pre-mRNA secuencialmente, formando complejos ribonucleoproteicos transitorios que permitirán que ocurran los dos pasos de transesterificación. En el primer paso se forma el complejo **E**, que se caracteriza por 1) la unión del U1snRNA de la U1snRNP al sitio de *splicing* 5'; este sitio de reconocimiento está dado por una secuencia complementaria de U1snRNA con el sitio de unión exón-intrón, provocando un apareamiento con los primeros seis nucleótidos del intrón, delimitando así el exón 1; 2) la unión del factor U2AF (que tiene el dominio SR) con el sitio Py; 3) la participación en el complejo de los factores SC35, SF2/ASF, SF1/BBP y el U2snRNP. Posteriormente, el complejo **E** se transforma en el complejo **A**, cuando el U2snRNP se une al sitio de empalme. El complejo **B1** se forma luego, cuando se asocia el trímero U4/U5/U6snRNP pre-ensamblado. Así, el U5snRNA se une al sitio de *splicing* 5' y el U6snRNA se une al U2snRNA. Este complejo forma un spliceosoma maduro. Posteriormente se forma el complejo **B2**, en donde se libera el U1snRNA, el U5snRNA se mueve del exón hacia el intrón y el U6snRNA se une al sitio de *splicing* 5'. Este paso se lleva a cabo mediante un apareamiento de aproximadamente 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. Como consecuencia, se activa el spliceosoma para llevar a cabo su catálisis. La función de U5snRNA es interactuar con secuencias del exón en el sitio del procesamiento 5' y 3'. El complejo **C1** se forma cuando se libera el U4snRNA y el U5snRNA se une al exón en el sitio de *splicing* 3'. En este punto se cataliza la transesterificación, es decir, se rompe el sitio de *splicing* 5' y se forma el *lariat*. Finalmente se forma el complejo **C2**, que contiene el trímero U2/U5/U6snRNAs, que permite el rompimiento del sitio de *splicing* 3' y se ligan los exones [10,12-32].

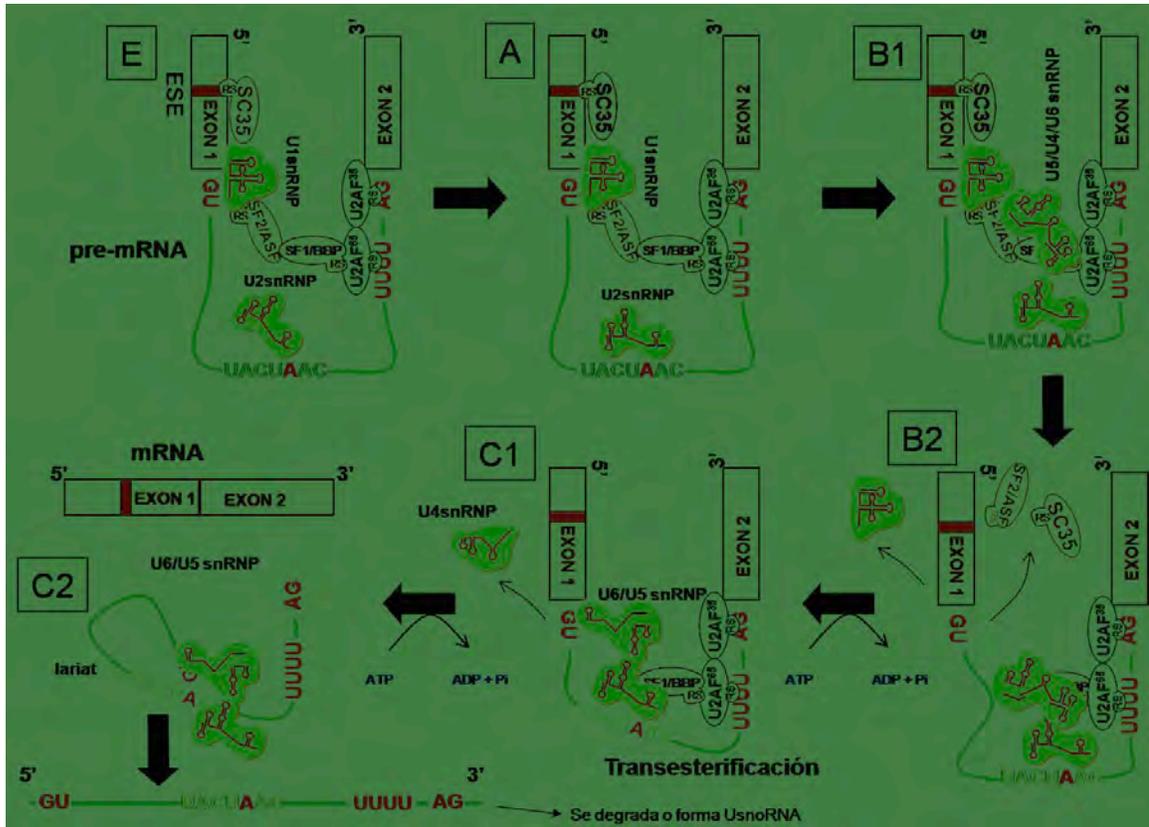


Figura 5. Secuencia del *splicing*. El *splicing* ocurre de manera secuencial en varios pasos en el spliceosoma (complejos E→ A→B1→B2→C1→C2). Los factores no snRNPs (U2AF65/35, verde), proteínas SR, (amarillo) - ambas con el dominio RS- y los factores snRNP (naranja), participan en el reconocimiento y acercamiento de los sitios de unión intrón-exón, para que ocurran los dos pasos de transesterificación. (Tomado de Jiménez García, *et al.* 2007).

4. ORGANIZACIÓN NUCLEAR

El núcleo celular se encuentra compartimentalizado en dominios funcionales, en 1831 Robert Brown describió la existencia de un pequeño “glóbulo” en el interior de las células, de material relativamente denso, al cuál denominó núcleo la organización funcional del núcleo ha sido motivo de gran número de estudios muchos de los cuales tienden a proponer la disposición organizada en tiempo y espacio de los eventos vinculados con el procesamiento de la información genética [36,54,76].

El desarrollo del método preferencial para ribonucleoproteínas marcó un gran avance en el estudio de las partículas con el metabolismo del RNA en eucariontes.

El conocimiento que se ha generado con respecto a estos procesos ha llevado a proponer que el núcleo de mamíferos se encuentra compartimentalizado en dominios con estructura y función determinada [36,54].

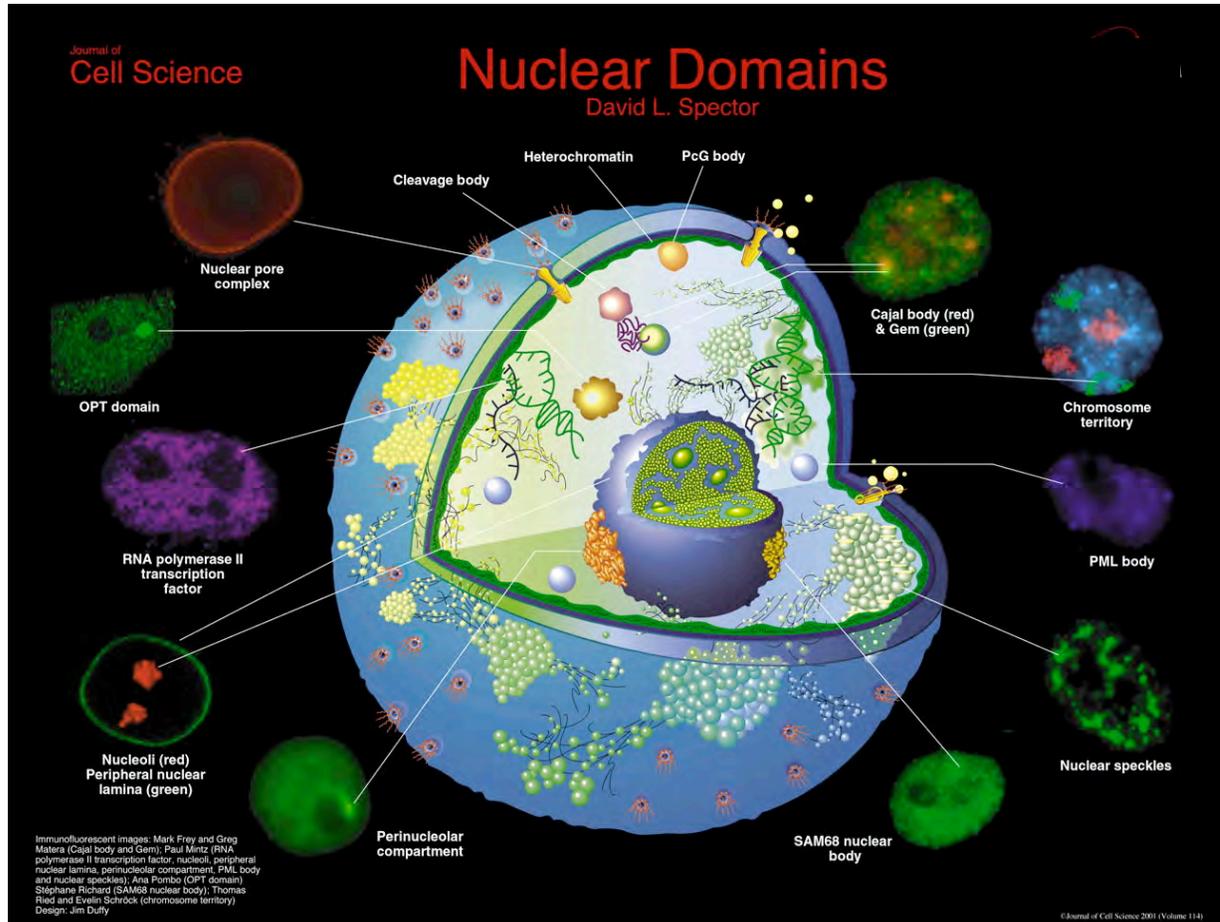


Figura 6. Dominios nucleares (Nuclear domains). Imágenes de inmunofluorescencia mostrando los diferentes dominios intranucleares observados por diversos investigadores: Merk Frey and Greg Matera (Cuerpos de Cajal); Paul Mintz (RNAPol II, nucleolo, lámina perinuclear, compartimento perinucleolar, patrón moteado); Ana Pombo (dominio OPT); Stéphane Richard (cuerpo nuclear SAM68); Thomas Ried and Evelin Schöck (territorio cromosómico). Diseño: Jim Duffy (modificado de Spector, 2001).

En células de mamíferos creciendo en cultivo, los anticuerpos contra factores proteicos de *splicing* producen imágenes con el microscopio de epifluorescencia con un patrón en forma de manchas embebidas en un ambiente difuso. Este patrón de tinción es conocido como patrón moteado (*speckled pattern*). Consta de 25 a 50 motas de entre 0.8 a 1.8 nm de tamaño, de forma irregular. Si se utilizan anticuerpos contra factores de *splicing* que forman ribonucleoproteínas, además de ese patrón, se tiñen los cuerpos de Cajal de los cuales hablaremos más adelante de manera detallada, que son estructuras

ribonucleoproteicas de 0.5 μm de diámetro. En estudios de hibridación *in situ* se confirmó que también los RNAs que son factores de *splicing* producen un mismo tipo de tinción intranuclear [34-46]. Las *speckles* son estructuras amorfas que contienen altas concentraciones de snRNPs y proteínas relacionadas con el *splicing*. En células de mamíferos, la composición y localización intranuclear de las *speckles* responden a cambios en la transcripción del mRNA y a la fosforilación de proteínas. Además, contienen varias moléculas con un papel estructural. Los efectos de la fosforilación en las *speckles* y su función son particularmente evidentes en células de mamíferos, lo que sugiere que depende de la fosforilación de la proteína para controlar el estado físico de los *speckles* y su capacidad para proveer de factores de *splicing*. El comportamiento de las *speckles* es dinámico, puesto que varía su estructura y tamaño, además de su forma. Estos pueden variar según los niveles de expresión de genes y a la respuesta metabólica y al ambiente.

El uso de métodos de inmunomarcaje fluorescente y ultraestructural de proteínas con anticuerpos y de ácidos nucleicos con hibridación *in situ*, así como la utilización del microscopio confocal para el análisis de muestras fluorescentes permitió más adelante reconocer que el patrón moteado y la ultraestructura fina estaban relacionados (figura 7). Así, el patrón moteado observado con el microscopio de fluorescencia y con el confocal, corresponde a los gránulos intercromatinianos (motas grandes) y a las fibras pericromatinianas (ambiente difuso de tinción) observadas con el microscopio electrónico de transmisión [41-44].

4.1. Gránulos intercromatinianos

Los gránulos intercromatinianos (ICG) son estructuras nucleares que se organizan en cúmulos en los espacios intercromatinianos del núcleo, que miden entre 20-25 nm de diámetro y juegan un papel muy importante en el ensamblado, modificación y almacenamiento de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA. Entre los constituyentes de estos gránulos, están partículas (snRNPs), factores de *splicing* de la familia SR (como el factor SC35) y la subunidad grande de la RNA polimerasa II en su forma hiperfosforilada. Los ICGs han sido sometidos a análisis proteómicos, donde se han podido identificar 146 proteínas. Las proteínas son de diferentes tipos y entre ellas se encuentran las proteínas de la familia SR, que están involucradas en el reconocimiento del RNA y del dominio SR [36, 38, 51]. Se ha observado que si existe una acumulación de factores de *splicing* como el de las proteínas SR hiperfosforiladas en los sitios de síntesis, los ICGs se desensamblan, lo que altera la coordinación entre la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA en núcleos de mamíferos [52].

4.2. Fibras pericromatinianas

Las fibras pericromatinianas (PCFs) fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969) como “la expresión morfológica extranucleolar de la transcripción”. Estas estructuras tienen un diámetro de 3 a 5 nm y están situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta. Pueden ser observadas al microscopio electrónico de transmisión, donde son detectadas en sitios de transcripción por la incorporación de uridina tritiada o la 5-bromouridina 5' trifosfatada, lo que nos indica la presencia de transcritos nacientes [36, 42, 43, 45-50]. Se ha visto que hay una relación directa en la densidad de estas estructuras con el rango de síntesis de pre-mRNA, además de que puede ser estimulada o inhibida por la acción de varios tipos de drogas y hormonas. Aunado a esto, en estudios bioquímicos y de autorradiografía para ubicar los sitios de transcripción, se ha observado que las PCF migran hacia los espacios intercromatinianos mientras el RNA inicia la maduración [52].

Se sabe que las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos y los gránulos intercromatinianos están presentes en animales plantas y hongos, con características y distribución similares (54).

4.3. Gránulos pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos (PCG) son estructuras ribonucleoproteicas de 30-50 nm de diámetro, con un halo claro de 25 nm, que se localizan generalmente en el borde de la cromatina compacta [48]. Están formado de 12 a 15 A, enrolladas regularmente y embebidas en una matriz difusa [50]. Diversos estudios proponen que los PCG son sitios que contienen mRNA y están involucrados en su procesamiento y/o almacenaje [50].

4.4. Cuerpos de Cajal

Inicialmente se describieron como cuerpos nucleolares accesorios por Santiago Ramón y Cajal y posteriormente fueron renombrados como Cuerpos de Cajal (CBs, del inglés Cajal bodies), aunque también suelen ser conocidos como cuerpos espiralados [53].

Los CBs son estructuras esféricas pequeñas con 1 a 5 copias por núcleo, un rango de su tamaño varía entre 0.1-1.0 micras. Los CBs contienen un gran número de componentes incluyendo las snRNPs spliceosomales, los snoRNAs: U3, U7, U8, U14, los factores de transcripción TFIIH y TFIIIF, el factor de rompimiento-estimulación, el factor específico de rompimiento y poliadenilación y componentes nucleolares como la fibrilarina, Nopp140 y la proteína B23 [53].

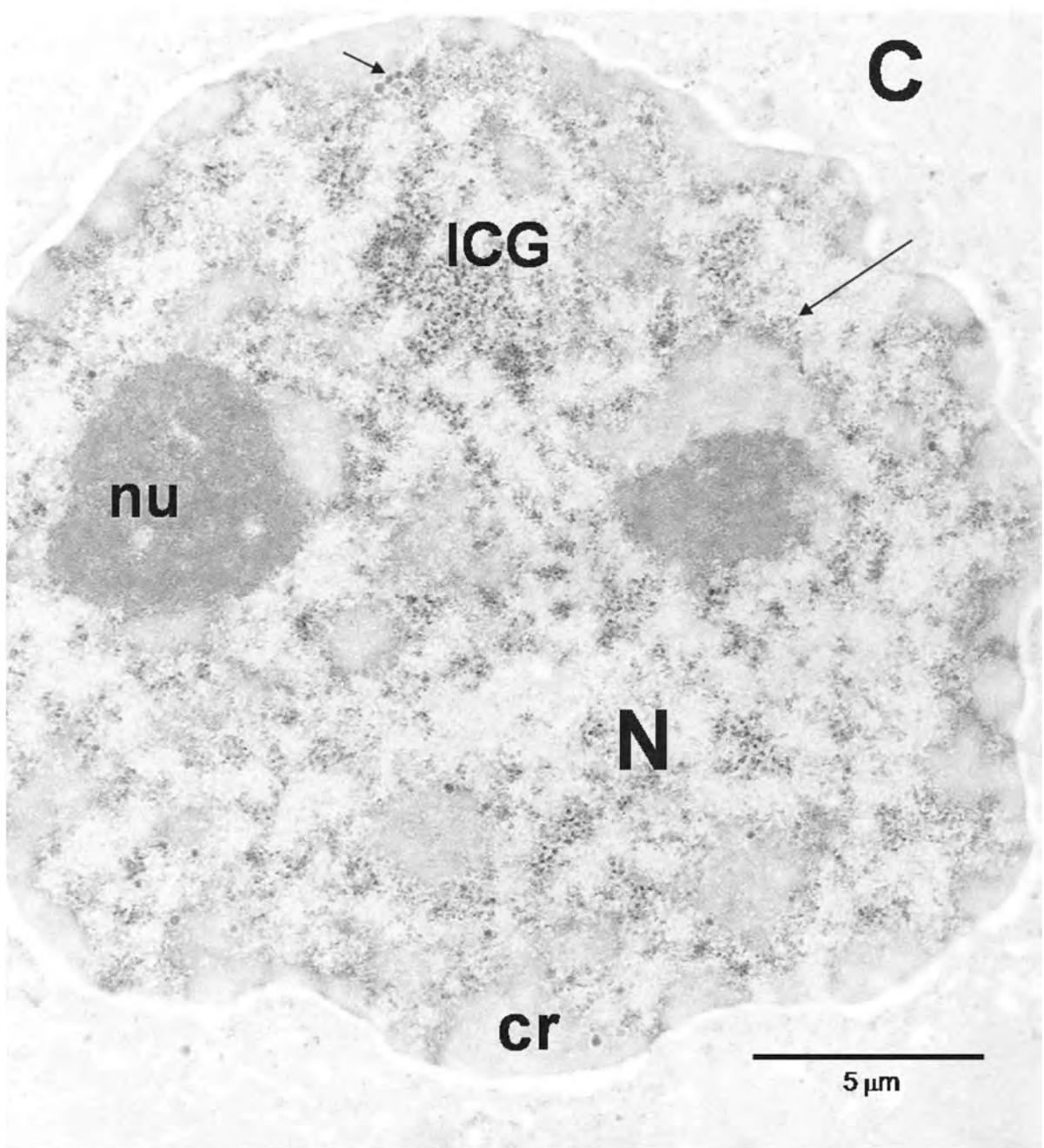


Figura 7. Ribonucleoproteínas intranucleares. Ultraestructura de un núcleo (N) interfásico contrastado con el método de Bernhard para ribonucleoproteínas. La cromatina (cr) es clara. El nucléolo (nu), los gránulos intercromatinianos (ICG), las fibras pericromatinianas (flecha grande) y los gránulos pericromatinianos (flecha pequeña) están formados por RNPs. C, citoplasma. Cortesía de los Dres. G. Vázquez-Nin y O. Echeverría, Facultad de Ciencias, UNAM. (Tomado de Jiménez-García, *et al.* 2007).

Los CBs se encuentran dentro del nucleoplasma pero se han encontrado dentro del nucléolo de células de carcinoma mamario en humano indicando que pueden pasar a través del nucléolo. Recientemente se ha demostrado que son estructuras móviles que pueden viajar por todo el nucleoplasma [54].

Otros estudios sugieren que los CBs pueden estar involucrados en el transporte y maduración de los snRNPs y snoRNAs. Sleeman y Lamond (1999) reportaron que las proteínas Sm de la estructura core marcadas con GFP y asociadas con UsnRNAs son reimportadas al núcleo donde pasan directamente a los CBs, posteriormente lo atraviesan y alcanzan su destino final en los SFCs o patrón moteado. Cuando se inhibe la exportación de snRNAs del nucleoplasma al citoplasma con leptomicina B, se provoca un agotamiento progresivo de las snRNPs en los CBs [47].

Se ha observado que factores involucrados en la transcripción, *capping*, *splicing*, poliadenilación y el rompimiento del pre-mRNA inicialmente son encontrados en los CBs con otros elementos de la maquinaria de procesamiento para formar complejos de multi-subunidades transcripcionalmente competentes, llamados transcriptosomas de la RNAP II. Esto también puede ser aplicado para el ensamble de los transcriptosomas de la RNAP I y III [53].

5. PATRÓN MOTEADO, DINÁMICA INTRANUCLEAR

Desde que Spector [39] encontró que las motas o *speckles* contienen gran cantidad de factores de *splicing*, se pensó que tal vez ese podría ser el sitio en donde ocurre este proceso. Sin embargo, las motas o *speckles* del patrón moteado no son un sitio donde se incorpore rápidamente uridina tritiada o bromouridina, lo que indica que la transcripción no ocurre ahí. Por otro lado, en la periferia o ambiente difuso en el que se encuentran embebidas sí hay transcripción. Como la transcripción y el *splicing* están acoplados y en realidad el *splicing* es un evento cotranscripcional, se descarta que éste ocurra en las motas pero sí en la región difusa. Más aún, para los sitios del patrón moteado al que se asocian los transcritos de pre-mRNA y de mRNA, se llevaron a cabo experimentos en los que se infectaron células HeLa con adenovirus-2. Los adenovirus infectan células de primates en un ciclo lítico que dura entre 24 y 36 horas aproximadamente. En la fase temprana (E) se producen varios transcritos, pero destaca el de la proteína E1A. Durante la fase tardía (L) se produce la **unidad de transcripción mayor tardía** (MLTU, por sus siglas en inglés). Esta unidad de transcripción puede producir hasta 14 distintos mRNAs maduros por *splicing* alternativo y de hecho, en este tipo de virus se descubrió la presencia de genes partidos y el *splicing* en 1977. Volviendo a los experimentos mencionados, conforme transcurría el tiempo de infección, los transcritos virales –y el DNA de una hebra- detectados por hibridación *in situ* ocupaban varios sitios dentro del núcleo. Sin embargo, no ocupaban los territorios del patrón moteado sino que los factores de *splicing*, es decir, el patrón moteado se reorganizaba. Esto sugirió que por el contrario, los factores de *splicing* se desplazaban hacia los sitios de producción de RNA viral,

generando nuevos dominios de actividad de transcripción y de *splicing*. Adicionalmente, la transfección transitoria de células COS-1 con el gen de tropomiosina (que normalmente no lo expresa) corroboró la reorganización de factores de *splicing* conforme transcurría el tiempo de transfección (figura 8). Entonces se sugirió la hipótesis de que los factores de *splicing* debían moverse hacia los sitios de transcripción mediante un mecanismo de reclutamiento [54].

Posteriormente se encontró que la inhibición de la transcripción por fármacos y del *splicing* por microinyección de oligonucleótidos contra un U1snRNA, también producían un re-arreglo en el patrón moteado [55-57], así como la presencia de intrones determina también ese reclutamiento [55]. El reclutamiento de factores de *splicing* a sitios de transcripción activa dependía además de la fosforilación tanto de los factores de *splicing*, como del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II, que mantiene un acoplamiento molecular [58-73]. Los procesos de transcripción y *splicing* del pre-mRNA están espacial y temporalmente coordinados, y la fosforilación de las proteínas regula la actividad y la localización subnuclear de los factores de *splicing* del pre-mRNA en los

subcompartimientos nucleares. Se ha comprobado que la sobreexpresión de la cinasa CLK/STY provoca la redistribución de factores de *splicing* de un patrón moteado a un patrón difuso y cuando la RNA pol II es inhibida, los factores de *splicing* snRNPs y no snRNPs se redistribuyen en motas redondas, lo cual indica que los factores se almacenan. Más adelante, se transfectaron células con una construcción molecular que incluía al gen del factor de *splicing* SF2/ASF y la proteína verde fluorescente (GFP) y se registraron los movimientos mediante video. Los resultados indicaron que los factores de *splicing* se movían intensamente en el núcleo celular y su morfología y movimiento dependían de la actividad de transcripción de la célula [74-75]. De manera similar, la distribución de los factores de *splicing* durante la mitosis se podría explicar por el movimiento de éstos durante períodos de transcripción activa e inactiva. Más aún, el fenómeno de movimiento de factores de procesamiento hacia sitios de transcripción activa, parece aplicarse a la maduración del pre-rRNA, pues durante la nucleogénesis en la etapa de telofase durante la mitosis, los factores de maduración del pre-rRNA en forma de cuerpos prenucleolares, se asocian con las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) que se encuentran en actividad de transcripción intensa [76].

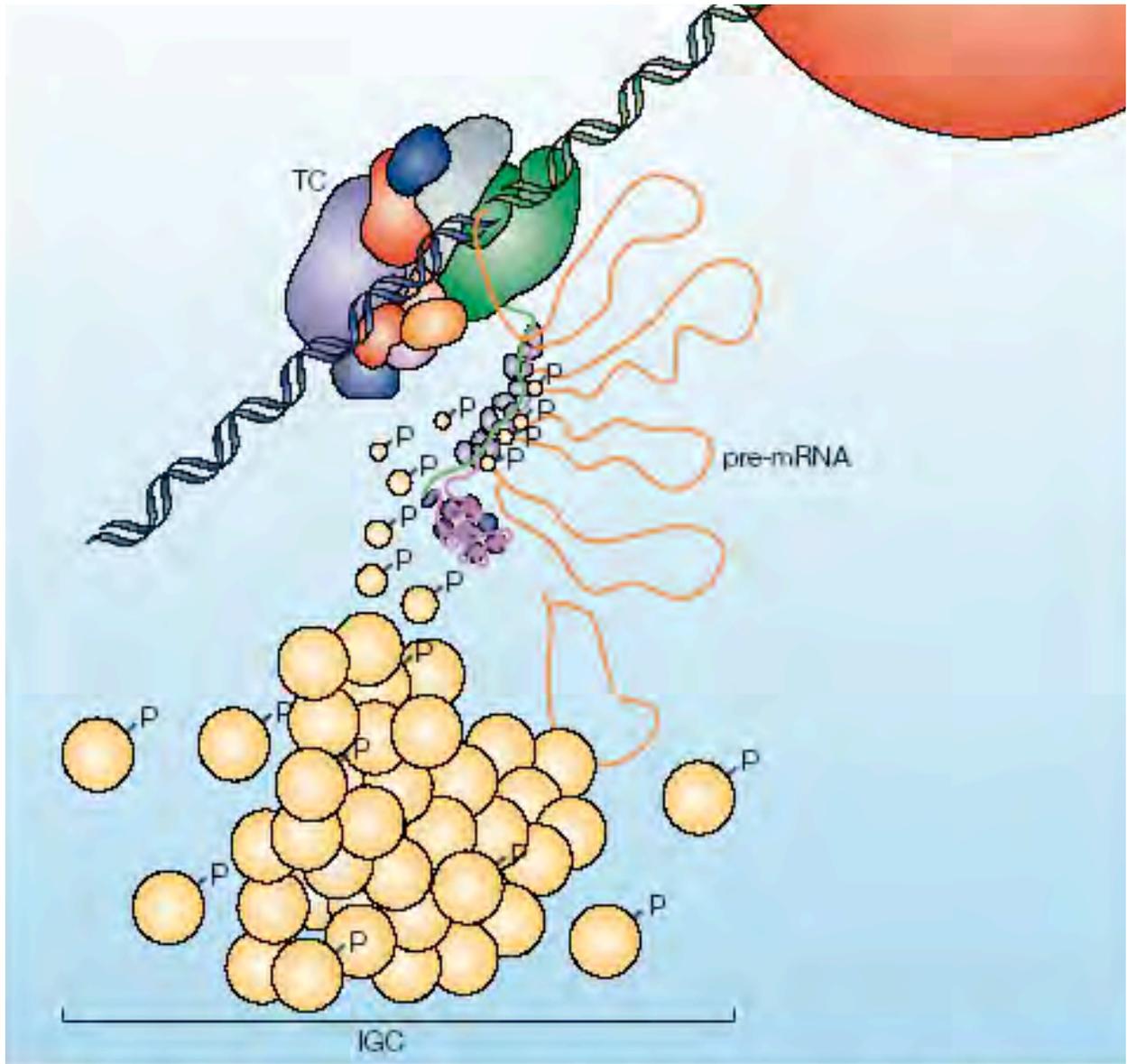


Figura 8. Dinámica de los factores de splicing de la familia de proteínas SR durante los procesos de fosforilación y desfosforilación. TC= Complejo de transcripción, P=grupos fosfato, IGC=gránulos intercromatinianos, pre-mRNA=RNA premensajero. Tomado de Angus I. Lamond 2003.

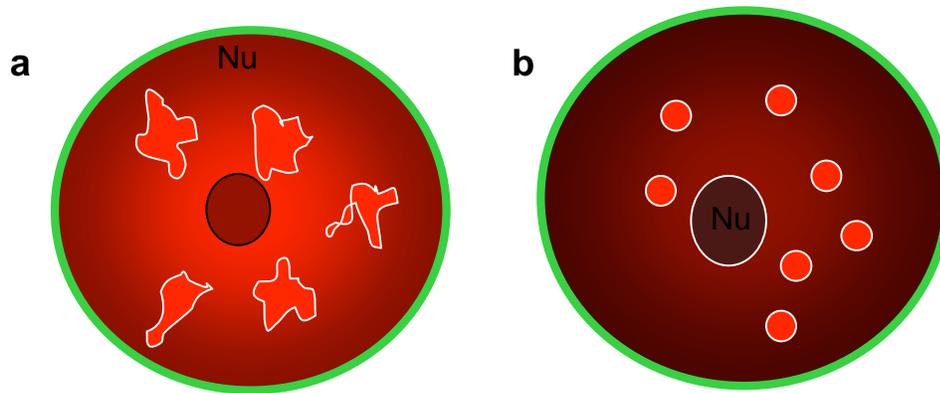


Figura 9. Modelo morfológico de la actividad de transcripción y splicing en el núcleo celular. Se muestran dos núcleos, uno con actividad transcripcional alta (a) y otro con actividad transcripcional baja (b). En el primer caso las motas son irregulares y en el segundo las motas son redondas. Nu= nucléolo. Modificado de Jiménez García 2007.

5.1. Patrón moteado en tejidos

Además de presentarse un patrón intranuclear moteado para los factores de *splicing* en células en cultivo, George en 2002 encontró que este patrón también se presenta en el núcleo de células que se encuentran formando parte de un tejido en varios órganos estudiados, como el hígado, el páncreas y el útero [77]. Además, la morfología celular de este patrón moteado en tejidos depende de la actividad de transcripción y del *splicing*. En efecto, en células epiteliales del útero de rata, durante la etapa de estro, cuando el estradiol circulante es muy alto y la actividad transcripcional por lo mismo es elevada, la morfología del patrón moteado presenta motas irregulares embebidas en un ambiente difuso. Por el contrario, durante la etapa de diestro, cuando el estradiol circulante está en su nivel más bajo y por ello la actividad de transcripción y *splicing* es muy baja, el patrón moteado adquiere las características de un patrón en donde las motas son muy redondas y el ambiente de tinción difusa es bajo (figura 9). Más aún, en células epiteliales de ratas a las que se les ha eliminado los ovarios, los núcleos son similares a los que se presentan en etapa de diestro, con motas muy redondas y un ambiente difuso muy escaso. El patrón cambia rápidamente si se activan la transcripción y el *splicing* por inyección de estradiol [77], similar a lo que ocurre en células en cultivo.

6. MUCOSA ORAL

El término membrana mucosa se emplea para describir el revestimiento húmedo del tracto intestinal, es el pasaje hacia otras cavidades corporales que se comunican con el exterior. En la cavidad bucal, este revestimiento se llama membrana mucosa oral, o mucosa bucal. A nivel de los labios la mucosa bucal se continúa con la piel, una capa de protección seca con una estructura que recuerda el revestimiento bucal en algunos aspectos, mientras que en la faringe se continúa con la mucosa húmeda que bordea el resto del intestino, de esta manera la mucosa oral esta situada anatómicamente entre la piel y la mucosa intestinal y muestra algunas de las propiedades de cada unas de ellas. La mucosa oral consta de dos componentes titulares separados, un epitelio de revestimiento y un tejido conectivo subyacente. La estructura de la mucosa bucal refleja una variedad de adaptaciones funcionales que son el resultado de cambios evolutivos en las especies que han tenido lugar en un largo periodo de tiempo.

Dicha configuración anatómica confiere a la mucosa oral una serie de características que la diferencian del resto de las superficies de revestimiento epitelial y la convierten en interesante objeto de estudio.

6.1. Funciones

La función mas importante de la mucosa oral es la protección que otorga a los tejidos más profundos de la cavidad bucal, entre sus otras funciones el tejido bucal es órgano sensorial, un regulador de la temperatura corporal y el medio a través del cual se segrega la saliva.

6.1.1. Protección

La mucosa oral, como cubierta superficial separa y protege tejidos profundos y órganos de la región del medio ambiente bucal. Las actividades normales exponen los tejidos de la boca a fuerzas mecánicas y la mucosa oral muestra una serie de adaptaciones del epitelio y del tejido conectivo para poder resistir esas agresiones. Existe una población residente de microorganismos dentro de la cavidad que ocasionarían infecciones si ganasen acceso a los tejidos. El epitelio de la mucosa oral actúa como principal barrera a estas amenazas.

El epitelio bucal como primera línea de defensa puede sufrir diferentes alteraciones en su estructura, como consecuencia de adaptaciones funcionales en respuesta a ciertos estímulos o por factores intrínsecos o extrínsecos desconocidos.

6.1.2. Sensibilidad

En la boca hay receptores que responden a la temperatura, al tacto y al dolor, al igual que corpúsculos gustativos que no se hayan en ninguna otra parte del organismo. Ciertos receptores responden al “gusto” del agua y señalan una necesidad que debe ser cumplida: la sed. Reflejos tales como la deglución, el vomito, y la salivación son también iniciados por receptores de la mucosa oral.

6.1.3. Secreción

La secreción principal asociada con la mucosa oral es la saliva producida por las glándulas salivales, la que contribuye al mantenimiento de una superficie húmeda.

6.2. Estructura

En función de su localización en diferentes zonas de la cavidad oral, podemos encontrar tres tipos funcionales de mucosa oral: mucosa de revestimiento, mucosa masticatoria y mucosa sensitiva o especializada [78,79]. Dado que cada una cumple una función determinada, sus características estructurales e histológicas varían:

6.2.1. Mucosa de revestimiento:

Tapiza la región geniana, ambos surcos vestibulolabiales y paladar blando. Al no intervenir de una manera directa en el acto masticatorio presenta una superficie plana estratificada no queratinizada. Gracias a la capa submucosa formada por el tejido conectivo obtiene relativa movilidad.

6.2.2. Mucosa masticatoria:

Se encuentra tapizando paladar duro y encía, soporta de manera directa la mecánica masticatoria por lo que el epitelio plano estratificado que lo constituye se encuentra queratinizado, su capa basal es de tipo fibroso y no presenta submucosa conectiva de manera que se adhiere firmemente a las estructuras óseas y periósticas que recubre.

6.2.3. Mucosa especializada:

hace referencia a una zona anatómica sensitiva, se trata de las papilas linguales situadas en la superficie dorsal de toda la lengua.

6.3. Epitelio oral

Como tejido que forma la superficie de la mucosa oral, el epitelio representa la barrera primaria entre el medio bucal y los tejidos más profundos. Es un epitelio plano estratificado y consta de células estrechamente adosadas entre sí y dispuestas en una serie de capas distintas o estratos y al igual que la epidermis y el revestimiento del tracto gastrointestinal, el epitelio oral mantiene su integridad estructural mediante un sistema de renovación continua, por lo cual, las células producidas por divisiones mitóticas en las capas más profundas, migran a la superficie para reemplazar a aquellas que se descaman. Puede entonces considerarse que las células epiteliales pertenecen a dos poblaciones celulares funcionales, una población progenitora, cuya función es la de proveer nuevas células y una población en maduración, cuyas células sufren continuamente un proceso de diferenciación o maduración celular para formar una capa protectora superficial.

El epitelio de la mucosa oral es de tipo plano estratificado, puede presentarse paraqueratinizado, queratinizado y no queratinizado.

El epitelio plano estratificado paraqueratinizado, únicamente presenta diferencias con el epitelio queratinizado a nivel de su estrato córneo, elementos celulares de esta capa conservan sus núcleos y algunos organelos parcialmente lisados. Se trata de núcleos picnóticos de cromatina densa. Son células acidófilas aunque la tinción no es tan intensa como en epitelios queratinizados, lo que es indicativo de un metabolismo celular escaso. Presentan gran cantidad de tonofilamentos a nivel de los espacios intercelulares. El epitelio plano estratificado no queratinizado, presenta su principal diferencia con el epitelio queratinizado en que no genera la capa córnea superficial y que carece del estrato granuloso. En el epitelio no queratinizado encontramos capa basal, capa intermedia y capa superficial. La capa basal no presenta diferencias respecto a lo descrito anteriormente.

Durante su evolución y especialización, las células migran desde las capas más basales del epitelio hacia la superficie donde se transforman en elementos queratinizados con ausencia de núcleo. Las células del epitelio bucal se disponen formando cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo.

6.3.1. Capas estructurales del epitelio de la mucosa oral

6.3.1.1. Estrato basal

Se encuentra formado por una única capa de células cúbicas o cilíndricas. Su núcleo es ovalado y posee un citoplasma intensamente basófilo, a expensas de una actividad sintetizadora de proteínas por parte de los ribosomas y del retículo endoplásmico rugoso. Son responsables de la formación de la

lámina basal, que forma parte de la membrana basal. Las células del estrato basal se conectan con la lámina basal a través de hemidesmosomas y puntos de anclaje, entre los que se establecen uniones intercelulares tipo desmosoma, uniones ocluyentes o uniones comunicantes.

Es este estrato basal donde empieza el proceso de renovación epitelial, inmersos en el estrato germinativo podemos encontrar melanocitos, células de Merckel y células de Langerhans. Las células basales se caracterizan, principalmente porque expresan integrinas de superficie en mayor medida que en las células del resto de los estratos [79]. Dichas integrinas son receptores de adhesión de la superficie celular. Cada una de estas integrinas se componen de una subunidad alfa y una beta, dichas subunidades son glicoproteínas transmembranas que enlazan, por una parte, el citoesqueleto, y por otra, la matriz extracelular.

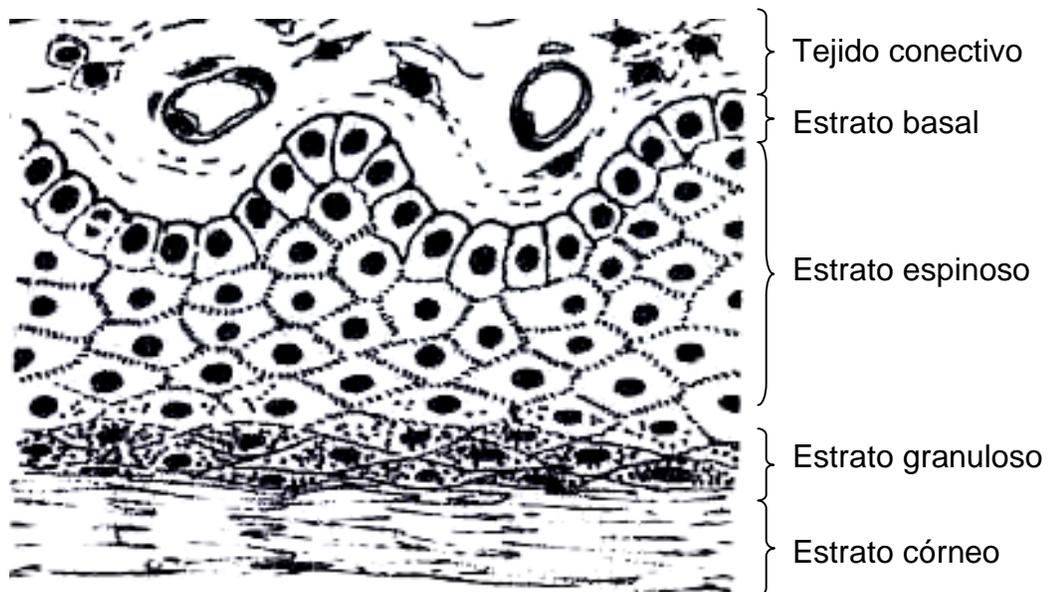


Figura 10. Estratos epiteliales del epitelio plano estratificado de la mucosa oral. Se muestra de arriba hacia abajo el tejido conectivo seguido de los estratos epiteliales basal, espinoso, granuloso y córneo. (Ferraris y Campos, 2002). La descripción de cada una de las capas se presenta en el texto.

Las integrinas juegan un papel importante en la migración celular y por lo tanto en la organización espacial de los epitelios, tanto en su desarrollo como en el proceso de reparación de las heridas. [79, 81].

6.3.1.2. Estrato espinoso

Se encuentra formado por varias hileras de células poligonales de núcleo redondo, mas o menos pequeño, de cromatina laxa, con citoplasma ligeramente basófilo y caracterizadas por presentar

abundantes desmosomas constituidos por haces de tonofilamentos. Dichos filamentos son heteropolímeros constituidos por una subunidad de queratina ácida y una básica, la expresión de los pares de citoqueratinas o queratinas de los tonofilamentos varía en el epitelio que recubre las distintas regiones de la cavidad bucal. Los citoplasmas celulares presentan gran cantidad de inclusiones de glucógeno. Las características descritas son clásicas de células en vías de queratinización.

En el estrato espinoso al igual que el basal podemos encontrar células de Merckel y de Langerhans.

6.3.1.3. Estrato granuloso

Se encuentra constituido por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas con un pequeño núcleo de cromatina densa. Su citoplasma se encuentra lleno de gránulos de queratohialina intensamente basófilos. Los tonofilamentos son abundantes y están en íntima relación con los gránulos de queratohialina los cuales en el proceso de queratinización se encargan de formar la sustancia interfibrilar que une los haces de tonofilamentos. Los tonofilamentos de queratina de la capa interfibrilar son más fosforilados y poseen más puentes disulfuros que en los estratos basal y espinoso. En el estrato espinoso encontramos unos orgánulos característicos de los epitelios queratinizados: los cuerpos de Odland o queratinosomas [80].

En la capa de células granulosas comienza la degeneración de núcleo y del resto de organelos celulares. A diferencia de las células basales y espinosas, en las que las enzimas lisosómicas como la fosfatasa ácida, solo se expresan en forma de escasos agregados granulares, en la capa granulosa las técnicas histoquímicas revelan una coloración muy difundida de las enzimas lisosómicas. En el estrato granuloso se da por tal un gran contraste poco explicado desde el punto de vista biológico: la célula granulosa desarrolla una importante actividad sintética de proteínas de envoltura, lípidos, receptores y antígenos relacionados con la queratinización, y al mismo tiempo en cinco o seis horas se prepara para la desestructuración de sus organelos y núcleo hasta convertirse en un elemento de estrato córneo. Fisher tras realizar varios experimentos con roedores propuso al protooncogen c-fos como eje central de este proceso [78].

6.3.1.4. Estrato córneo

Se encuentra constituido por células planas sin núcleo evidente y con citoplasma fuertemente acidófilo. Estas células libres de gránulos de queratohialina reciben la denominación de corneocitos. Ultraestructuralmente, las células de las capas cornificadas carecen de organelos y están compuestas por filamentos agrupados de modo compacto que se forman a partir de los tonofilamentos de queratina, recubiertos por la proteína básica de la queratohialina [82].

6.4. Proliferación epitelial

Las células progenitoras están situadas en la capa basal en los epitelios, tales como el piso de boca y en las dos o tres capas celulares inferiores en epitelio más gruesos tales como los del carrillo o el paladar. Recientes estudios sobre la epidermis y el epitelio bucal indican que el comportamiento progenitor no es homogéneo, sino que consiste en dos subpoblaciones celulares funcionalmente distintas, una pequeña población de células progenitoras que se recicla muy lentamente y se considera compuesta por células germinales cuya función es la de reproducir células basales y que retienen el potencial proliferativo del tejido. La mayor parte del comportamiento progenitor se compone de células de ampliación cuya función es la de aumentar el número de células disponibles para una maduración posterior.

El concepto de célula germinal epitelial puede tener significación para comprender el desarrollo de los carcinomas.

La velocidad a la cual reproducen células nuevas en la población progenitora puede ser determinada mediante una serie de métodos. El uso de técnicas diferentes ha conducido a un amplio rango de valores para evaluar la velocidad de proliferación en diversos epitelios; pero en general, el tiempo de recambio en la piel es de 52 a 75 días, en el intestino de 4 a 14 días, en la encía de 41 a 57 días y en el carrillo de 25 días [78].

7. LOS FACTORES DE SPLICING Y LOS PROCESOS PATOLÓGICOS

Diversos estudios proveen información detallada sobre el *splicing* y su regulación [83, 84, 86]. El papel potencial del *splicing* como un modificador de las enfermedades humanas también ha sido revisado recientemente [86-90].

Diversos estudios sugieren cambios en el *splicing* del pre-mRNA en neoplasias humanas [83, 84, 86-90] incluyendo el cáncer de mama, en el que se han observado incremento en la expresión individual de proteínas SR durante tumorigénesis de glándula mamaria. Las preneoplasias difieren de los tumores en que las proteínas SR presentaron un patrón de expresión complejo que revela diferencia entre los tejidos neoplásicos y la metástasis [83].

Estos datos sugieren que las modificaciones relacionadas con la concentración de factores específicos de *splicing* durante la preneoplasia temprana difieren durante la formación del tumor, dando lugar a la capacidad de las proteínas SR para afectar las decisiones del procesamiento, sugiriendo que un

número de pre-mRNAs podrán sufrir cambios en el *splicing* durante los estados tempranos e intermedios del cáncer.

Esta clase de proteínas, por lo tanto, se convierten en atractivos objetos para el estudio debido a los cambios en su actividad durante la tumorigénesis, por lo que la determinación de los niveles en los patrones de expresión de factores de *splicing* en lesiones preneoplásicas podría ser muy útil para identificar los pacientes en situaciones de alto riesgo para desarrollar cáncer de mama invasivo y metástasis posterior [83].

Distintos patrones de expresión de factores de *splicing* podría servir como nuevos marcadores de metástasis y los factores de *splicing* pueden representar una herramienta para la intervención en pacientes que presenten anormalmente dichos factores.

Otros factores de *splicing* han sido involucrados en procesos patológicos, tal es el caso de algunos hnRNPs, de los cuales uno de éstos tiene una función específica en el procesamiento del RNA, a partir de estudios en células en cultivo. Sin embargo en estudios recientes, al ser analizado en tejidos fijos, a este factor se le ha encontrado relacionado con moléculas involucradas en procesos patológicos tales como la expresión de proteínas víricas de una cepa de VPH que evoluciona a cáncer cervicouterino, tal es el caso del factor A1hnRNP, que a altos niveles, inhibe la expresión de HPV - 16 L1. [1].

La integridad y funcionalidad del epitelio de la mucosa oral son garantizadas por un proceso de renovación constante similar al del epitelio de útero, en el cual sus estratos se reorganizan estructuralmente como consecuencia de las modificaciones bioquímicas y morfológicas celulares.

En virtud de la acción de algún factor agresor puede darse un desequilibrio del proceso homeostático tisular, incluso, las células epiteliales pueden experimentar alteraciones bioquímicas y morfológicas. Sin embargo, éstas pueden diferir de aquellas comunes al patrón de normalidad característico de la mucosa. Dependiendo del tipo e intensidad de la agresión sufrida por el epitelio, las células pueden adaptarse progresivamente o sufrir un proceso regresivo en respuesta a una adaptación celular frente a la acción de agentes agresores, dando lugar a las lesiones hiperplásicas, displásicas o, en los casos más graves, a las llamadas neoplasias epiteliales.

III. JUSTIFICACIÓN

Durante varios años, estudios han sugerido cambios en el *splicing* del mRNA en diversas patologías humanas, en las que se han observado incremento o disminución en la expresión individual de diversos factores de *splicing*, incluyendo las proteínas SR.

En virtud de la acción de algún factor agresor puede darse un desequilibrio del proceso homeostático tisular, incluso, las células epiteliales pueden experimentar alteraciones bioquímicas y morfológicas. Sin embargo, éstas pueden diferir de aquellas comunes al patrón de normalidad característico de la mucosa oral. Siendo así, en algunos casos, dependiendo del tipo e intensidad de la agresión sufrida por el epitelio, sus células pueden adaptarse progresivamente o sufrir un proceso regresivo en respuesta a una adaptación celular frente a la acción de agentes agresores dando lugar a alteraciones patológicas.

El estudio de la expresión de los factores de *splicing* contribuye a la comprensión de los diversos mecanismos por los cuales la alteración de dicho proceso, así como su regulación, afectan los procesos metabólicos, contribuyendo así estudio la enfermedad humana.

Distintos patrones de expresión podrían servir como nuevos marcadores patológicos. Los factores de *splicing* pueden representar una herramienta para la intervención en pacientes que los expresan anormalmente como ya se han reportado en cáncer de mama y cervicouterino. La mucosa oral de ratón comparte características fisiológicas y genéticas muy similares a la mucosa oral humana, en ambos tejidos, así como en la mucosa del cuello uterino, la integridad y funcionalidad son garantizadas por un proceso de renovación constante, similar al de otros epitelios en los cuales ya se han estudiado y detectado cambios en la expresión de factores de *splicing*. Sin embargo en el epitelio de mucosa oral no existe evidencia, ya sea tejido patológico o sano, siendo importante destacar el estudio de este último, ya que es primordial tener conocimiento de la salud para poder detectar anomalías.

IV. HIPÓTESIS

Los factores de la familia SR del *Splicing*, están presentes en las células de la mucosa oral de ratón en una distribución regular en forma de un patrón moteado y difuso similar al que se ha observado en tejidos de otros órganos de ratón, y ésta distribución presenta diferencias en cada estrato del epitelio.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la distribución de los factores de *splicing* del tipo SR en los diferentes estratos epiteliales de la mucosa oral de ratón.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia o ausencia del patrón moteado intranuclear en células del epitelio de mucosa oral de ratón por medio de la inmunolocalización de las proteínas de la familia SR con el anticuerpo monoclonal 3C5.
2. Analizar el tamaño, forma y número de motas intranucleares de los diferentes estratos celulares.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

Se tomaron muestras de tejido bucal de la zona del carrillo de diez ratones machos de la cepa Balb/C de 3 meses de edad obtenidos del bioterio del Posgrado de la Facultad de Odontología de los cuales se analizaron 99 núcleos de las células epiteliales de la mucosa del carrillo, repartidos 33 en cada uno de los tres estratos epiteliales, basal, espinoso y granuloso para el análisis de la distribución de los factores de splicing de la familia de proteínas SR. Las muestras se tomaron utilizando una hoja de bisturí del número 15 montada en un mango de bisturí del número tres, haciendo un corte en forma de cuña en la mucosa del carrillo a una profundidad de 2-3 mm con la ayuda de unas pinzas de curación. Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 48% diluido en PBS (amortiguador con fosfatos 0.15 M y NaCl 0.15M, pH 7.3) a temperatura ambiente durante 24 hrs. Después se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, se colocaron en canastillas de inclusión para continuar con el proceso de deshidratación con alcohol etílico en concentraciones crecientes de 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90% por 15 minutos y dos lavados con etanol al 100% (15 y 45 minutos). Se prosiguió con un baño de xilol por 45 minutos e impregnación con parafina por una hora; la inclusión se hizo con paraplast durante toda la noche.

Una vez obtenidos los bloques de inclusión, se hicieron cortes de 3µm de grosor que se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatina al 0.1%, sulfato de cromo y potasio al 0.01%). Para realizar las tinciones posteriores, los cortes se desparafinaron a 60°C por 20 minutos y se rehidrataron con xilol y baños de etanol en concentraciones decrecientes de 100, 96, 70 y 50%, por cinco minutos en cada uno, y tres lavados con agua destilada, por 5 minutos cada uno.

Tinción con hematoxilina y eosina.

Las laminillas se tiñeron con hematoxilina por 2 minutos, se lavaron con agua corriente y con alcohol-ácido. Este colorante se viró con agua amoniacal y las laminillas se lavaron dos veces con agua corriente durante 1 minuto.

Posteriormente se tiñeron con eosina durante 1 minuto, se lavaron 1 minuto con alcohol-acetona (1:1) y alcohol absoluto-xilol. Las laminillas teñidas se pasaron por xileno (3 veces, 1 minuto cada una) y se montaron con medio de montaje acuoso Entellan. Se procedió a la observación visual de las muestras mediante el microscopio de luz para establecer el diagnóstico histopatológico y para corroborar la presencia de los estratos epiteliales.

Procesamiento para inmunofluorescencia

Los cortes histológicos desparafinados a 60°C durante 15 minutos, se enjuagaron con buffer TBST (amortiguador salino con Tween 20), se sometieron a recuperación antigénica con Proteinasa K (Dako Corporation, 53020) a temperatura ambiente por 10 minutos, se hicieron lavados con TBS (Tris base 0.05M, NaCl 0.3M y Tween 20 0.1% por cinco minutos. Se realizó la incubación con solución bloqueadora (Bloqueador universal Vector Laboratorios, Inc.) diluido en TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 lavados con TBS de 5 minutos cada uno.

Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal 3C5 dirigido contra factores de Splicing de la familia SR que reconoce el epítotope SR de las proteínas e la familia SR (donado por el Dr. Davis Spector, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) a una dilución de 1:20 por 24 horas a 4°C en una cámara húmeda.

Posteriormente se hicieron lavados de los cortes histológicos con PBS (amortiguador de fosfato salino) tres veces por 10 minutos y los cortes se incuban con el anticuerpo secundario IgG ó IgM anti-ratón acoplado con fluoresceína (isotiocinato de fluoresceína, FITC, Jason InmunoResearch Laboratorios Inc. 41485), en la oscuridad, por espacio de una hora y media a temperatura ambiente con una dilución de 1:20 en TBST. Transcurrido el tiempo, se lavaron con PBS tres veces por 10 minutos. Se hicieron dos lavados con TBS de 5 minutos cada uno y se realizó una contra tinción con DAPI (4`6-diamidino-2-fenilindol; Roche) diluido 1:20 en TBST. Las muestras se montaron con medio de montaje antidesvanecimiento para inmunofluorescencia Vectashield (Vector Laboratorios, Inc.).

Microscopía de Barrido Láser Confocal

A los núcleos celulares se les hicieron 20 cortes ópticos meridionales en "z" de 0.1 µm, utilizando el Microscopio Confocal Espectra Leica modelo TCS SP5, equipado con Láser Diodo azul 405nm, láser de Argón (458, 476, 488, 496, 514 nm), láser DPSS 561nm y láser de Helio-Neón (594, 633nm), escáner adicional de resonancia para adquirir imágenes rápidas y, un divisor de haz acústico óptico (AOBS) especial para adquirir varios colores simultáneamente.

Los objetivos disponibles: 5X/0.15, 10X0.4, 20X/0.7 MULTIINMERSIÓN CORR LAMBDA BLUE (corrección cromática especial en el rango azul para aplicaciones con proteínas fluorescentes), 40X/1.25-0.75 OIL, 63X/1.4-0.6 OIL CORR LAMBDA BLUE, 63X/1.3 GLY (con distancia de trabajo de 280 µm, para muestras gruesas).

- Cámaras para estudios de microscopía confocal *in vivo* con control de temperatura, humedad y CO₂.

- Incubador de cultivos con control de CO₂, temperatura y humedad.
- Cámara de vídeo digital Leica DFC 350 FX para captación de imágenes de fluorescencia (3.3 Mpixel; 12 bits de profundidad de escala de grises).
- Estación de trabajo off-line para tratamiento de imagen.
- Lupa estereoscópica con fuente de luz fría.
- Nevera estándar con congelador.
- Material disponible:
 - placas p35 para estudios *in vivo*
 - cámara Attofluor (Molecular Probes) para utilizar con cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences) para estudios *in vivo*.
 - Anticuerpos secundarios fluorescentes, medios de montaje y otros reactivos en stock.

Se capturaron las imágenes para su posterior reconstrucción tridimensional y su reproducción en video con el programa Leica LAS AF Lite (proporcionado por La Facultad de Medicina, UNAM).

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIABLES (NÚMERO, TAMAÑO Y FORMA)

Registro y procesamiento de imagen

Se obtuvieron las imágenes del patrón moteado observado en los núcleos celulares de la mucosa para analizar su morfología y distribución en los estratos del epitelio.

Se cuantificó el número, tamaño, y forma de las motas de 99 núcleos, se obtuvieron imágenes de cada muestra de tejido.

Se capturaron las imágenes de 4 campos de visualización microscópica utilizando el Microscopio Espectral Confocal modelo TCS SP5, el campo en verde fluorescente corresponde a la inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal 3C5 de los factores de splicing de la familia de proteínas SR (patrón moteado), la imagen en campo claro de contraste interferencial de Nomarski (DIC), se utilizó para ubicar el patrón moteado en los distintos estratos epiteliales. La tinción de los núcleos con la técnica de tinción DAPI (en azul) se utilizó como referencia para la ubicación de cada núcleo y el traslape para determinar la relación existente entre el núcleo y los factores de splicing de la familia de proteínas SR.

Análisis del número de motas

El número de motas nos indica la cantidad de sitios en el núcleo celular en los que se están expresando los factores de *splicing* de la familia de proteínas SR. Para determinar el número exacto de motas se hizo la reconstrucción tridimensional de los núcleos celulares. La técnica es indispensable para observar si atrás de una mota existe otra u otras, lo que no sería posible determinar en una imagen de un solo plano.

Análisis del tamaño de las motas

El tamaño de las motas es una variable que nos indica la actividad transcripcional y de *splicing* en el núcleo celular, entre más grande sea una mota, existe una mayor actividad transcripcional y de *splicing*. La existencia de una mota grande está relacionada con un número menor de motas, en donde tiene lugar el fenómeno denominado fusión de motas. Las motas se midieron en nm con el mismo Software Leica LAS AF Lite.

Análisis cuantitativo de la forma de las motas

La forma de las motas de los 99 núcleos se digitalizó y evaluó por medio del software de medida de circularidad ImagenJ, en el cual se utiliza el círculo como referencia. Cuando la medida de circularidad es más cercana al valor 1, significa que la imagen es más parecida a un círculo, indicando que existe menor actividad transcripcional que en una imagen se aleja del valor 1.

El análisis estadístico se hizo por medio de un análisis de varianza ANOVA y se analizaron los datos en el programa estadístico GraphPad.

VII. RESULTADOS

El epitelio de la mucosa oral de carrillo de ratón se conforma de 4 estratos epiteliales

La figura 11 representa la imagen de un corte de tejido de uno de los 10 ratones, teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina. Se observa la disposición de los 4 estratos epiteliales a analizar del epitelio oral.

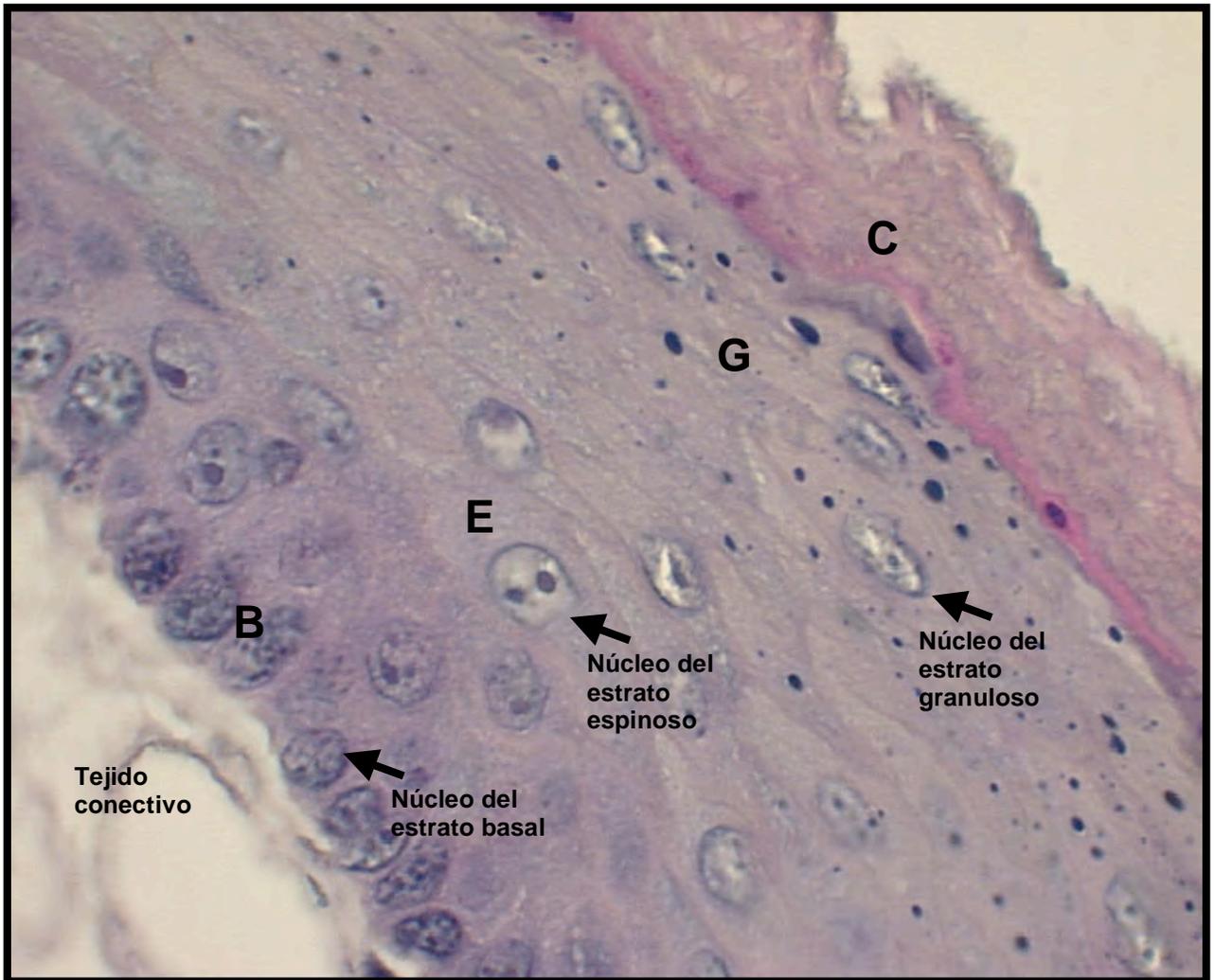


Figura 11. Estratos epiteliales de la mucosa oral de carrillo de ratón: B=estrato basal, E=estrato espinoso, G=estrato granuloso y C=estrato córneo. Se indican con flechas los núcleos en los estratos basal, espinoso y granuloso, pero no se observan núcleos en el estrato córneo.

El patrón moteado está presente en los núcleos celulares de los estratos basal, espinoso, y granuloso del epitelio del carrillo de ratón, pero no en el estrato córneo.

La siguiente figura representa la manera en la que fueron comparados distintos campos de visualización en el microscopio, que tendrán como objetivo servir como una herramienta de referencia para observar la distribución de los factores de splicing de la familia de proteínas SR, comparándolos en los núcleos de las células de cada estrato. Cada cuadro (a, b, c, d) representa la imagen de un corte de tejido de uno de los 10 ratones.

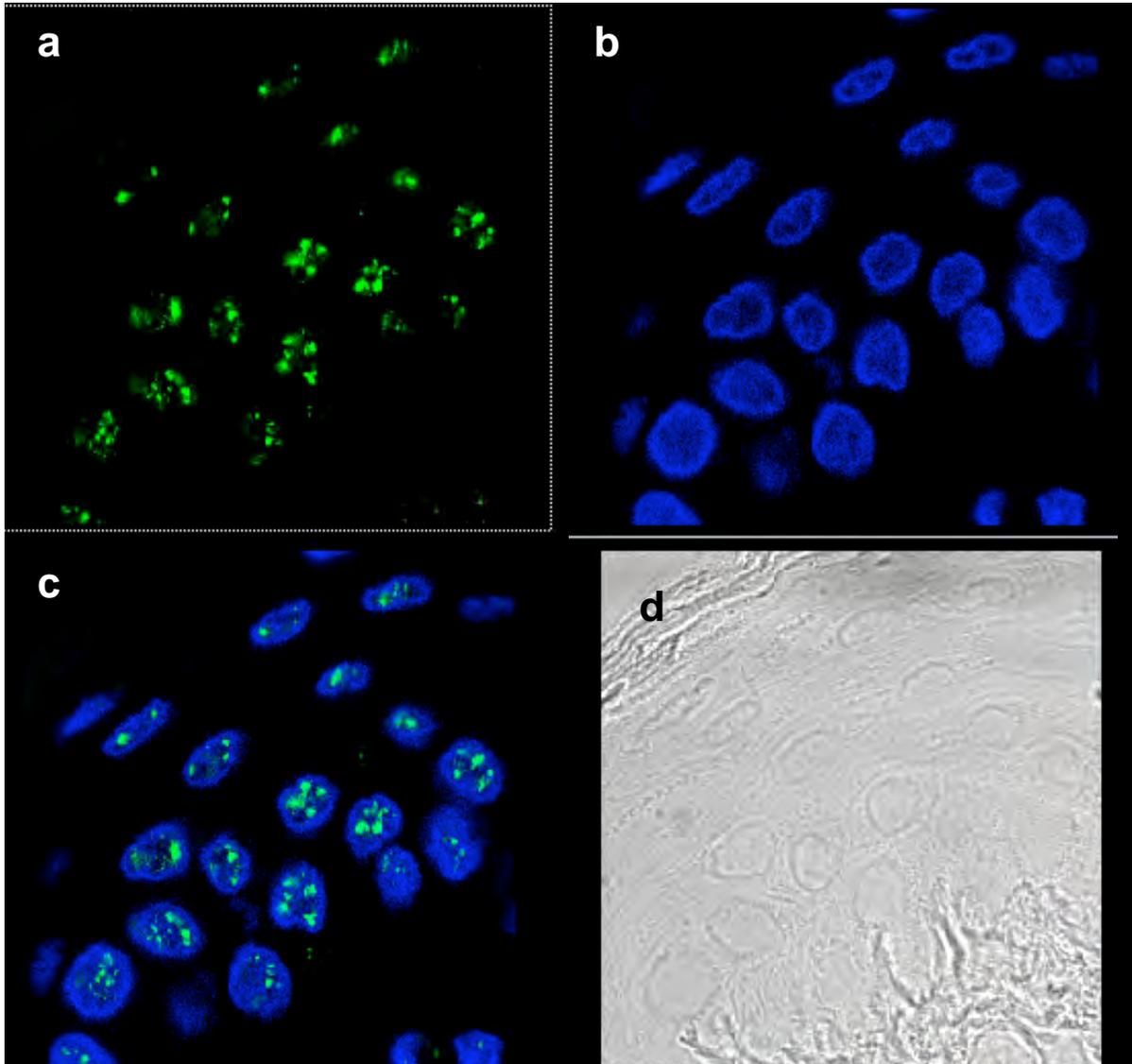


Figura 12. Patrón moteado de los 4 estratos epiteliales de la mucosa oral de ratón. Las imágenes representan el mismo tejido, donde a=se observa en color verde la inmunofluorescencia de factores de splicing de la familia de proteínas SR (patrón moteado), b=tinción con DAPI en azul, c=traslape de a y b donde se observa la ubicación del patrón moteado en el núcleo celular, d=campo claro (microscopía de contraste de interferencia, (DIC por sus siglas en inglés), en el cual se distinguen los estratos

epiteliales. Los campos b, c y d únicamente se usaron como herramienta de referencia del patrón moteado.

Se analizaron un total de 99 núcleos los cuales fueron observados en tres estratos del epitelio, el patrón moteado de los factores de splicing de la familia SR se encuentra distribuido en los estratos basal, espinoso y granuloso, pero no en el córneo, en el cual se observa también ausencia de núcleos, hallazgo encontrado en todas las muestras de los 10 ratones analizadas. La siguiente imagen representa un corte de tejido de uno de los diez ratones analizadas, en el cual se muestran 17 núcleos celulares, los cuales son descritos con detalle más adelante.

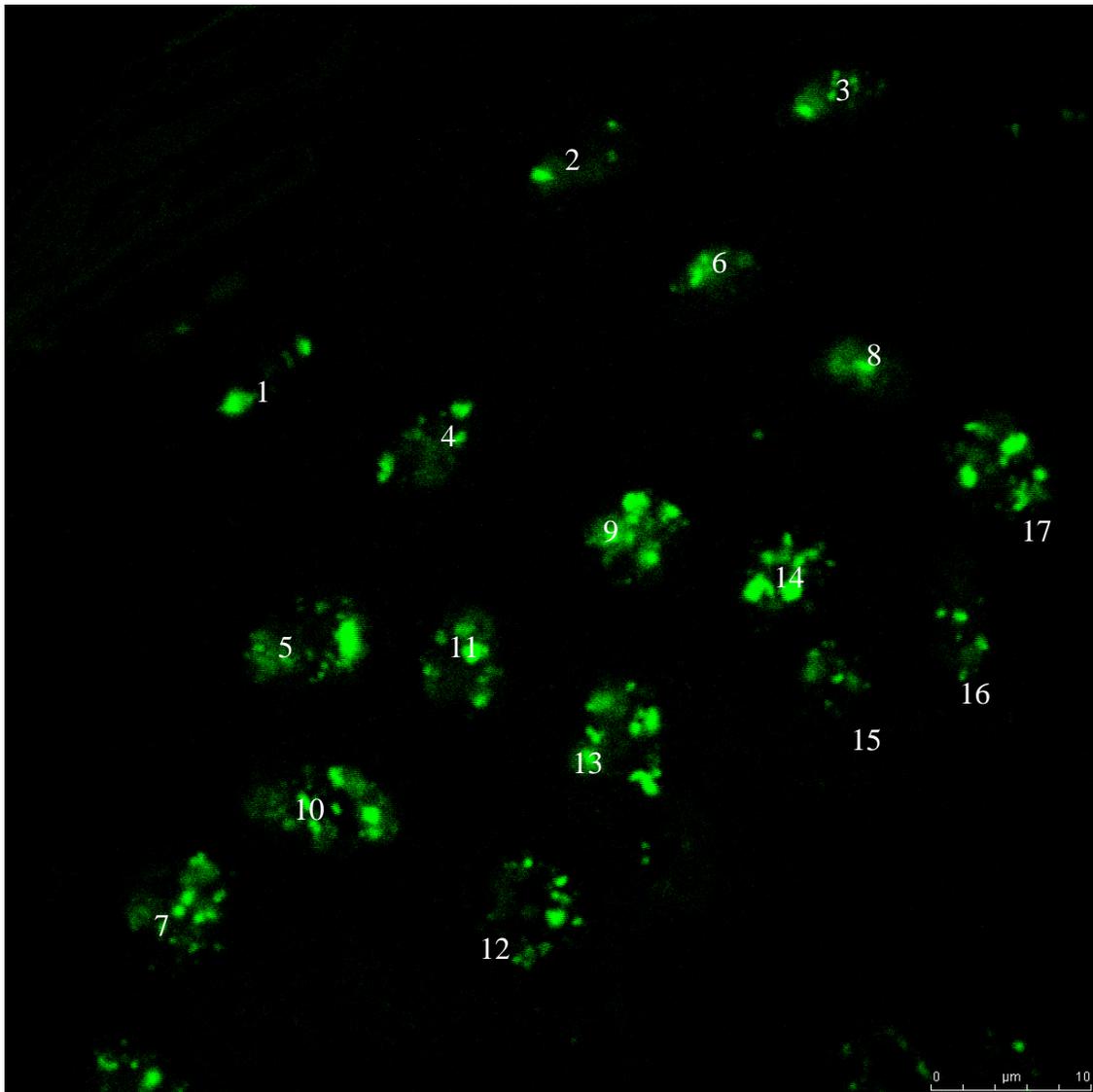


Figura 13. Micrografía panorámica de un corte de tejido epitelial oral. Se muestra la inmunolocalización de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) con el anticuerpo monoclonal 3C5, la numeración corresponde a cada núcleo celular.

Las siguientes imágenes (figuras 14 a 30), representan la ampliación de cada núcleo de la micrografía panorámica anterior, con su respectivo número

En las células del estrato granuloso existe una escasa cantidad de motas en comparación con los estratos espinoso y basal.

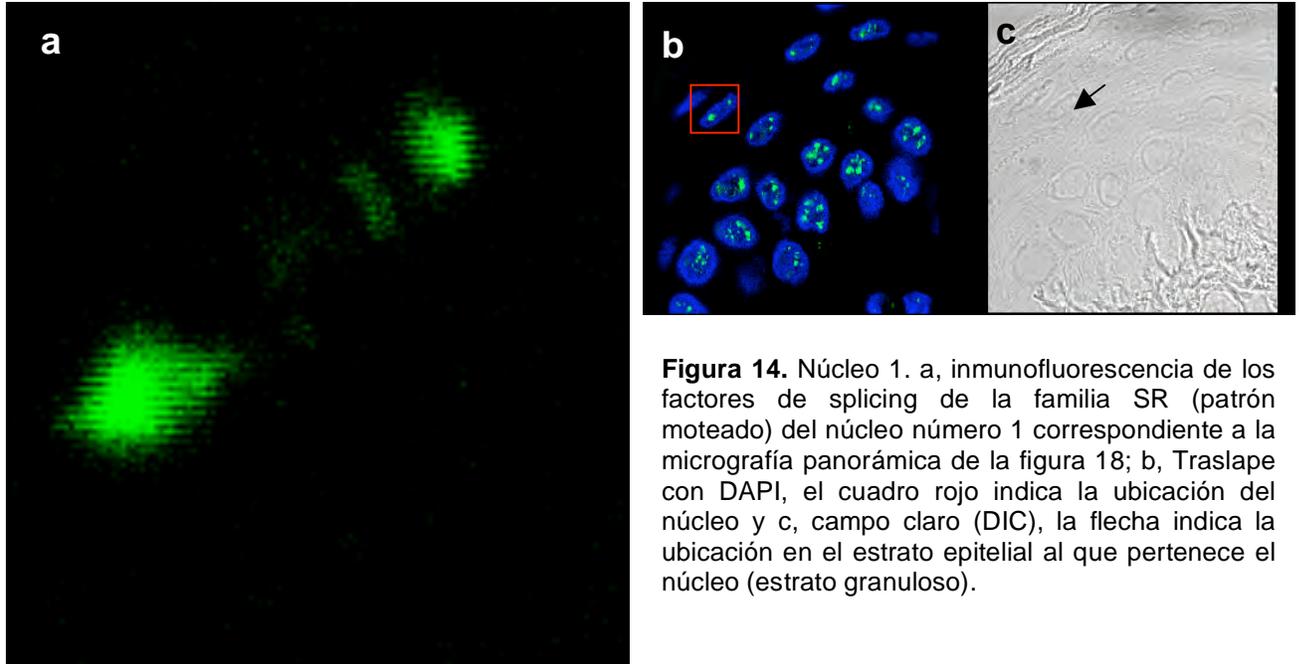


Figura 14. Núcleo 1. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 1 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato granuloso).

Las figuras 14, 15 y 16 representan a imágenes de núcleos 1, 2 y 3 pertenecientes al estrato granuloso, se observan pocas motas en estos núcleos en comparación con los núcleos de los estratos espinoso y basal,

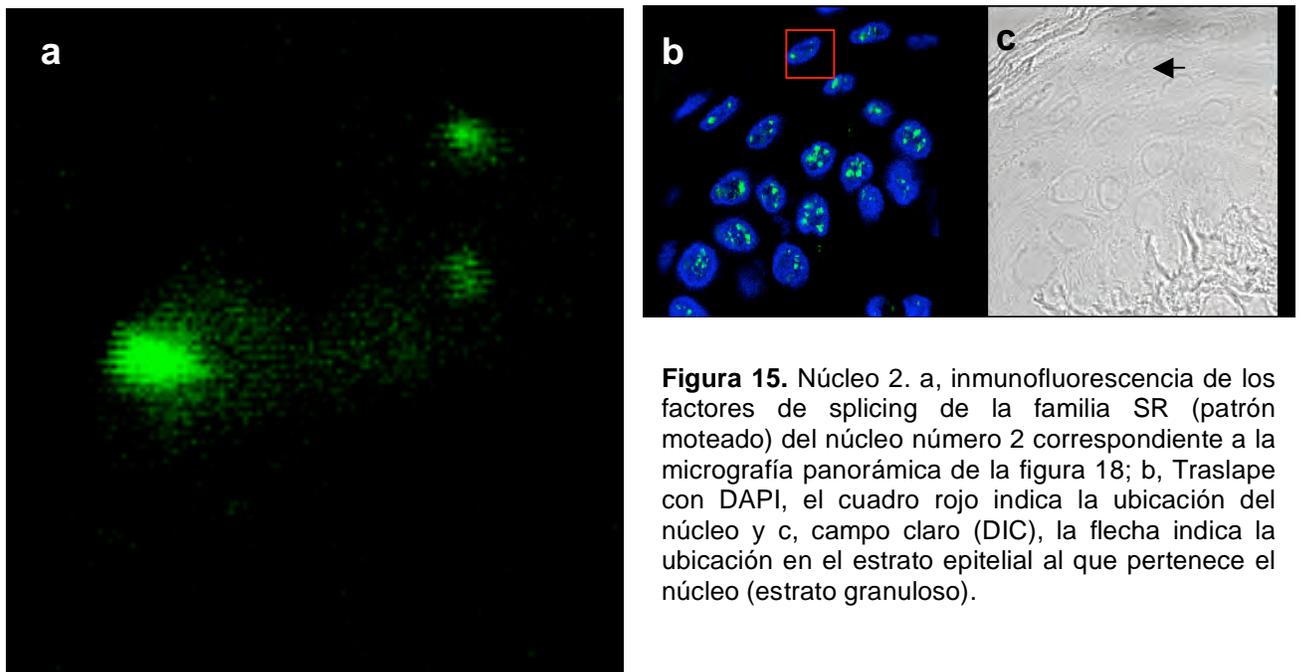


Figura 15. Núcleo 2. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 2 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato granuloso).

además que se observan motas grandes y con patrón difuso, lo que indica que en este estrato tiene lugar fenómeno de fusión de motas que significa una actividad transcripcional elevada.

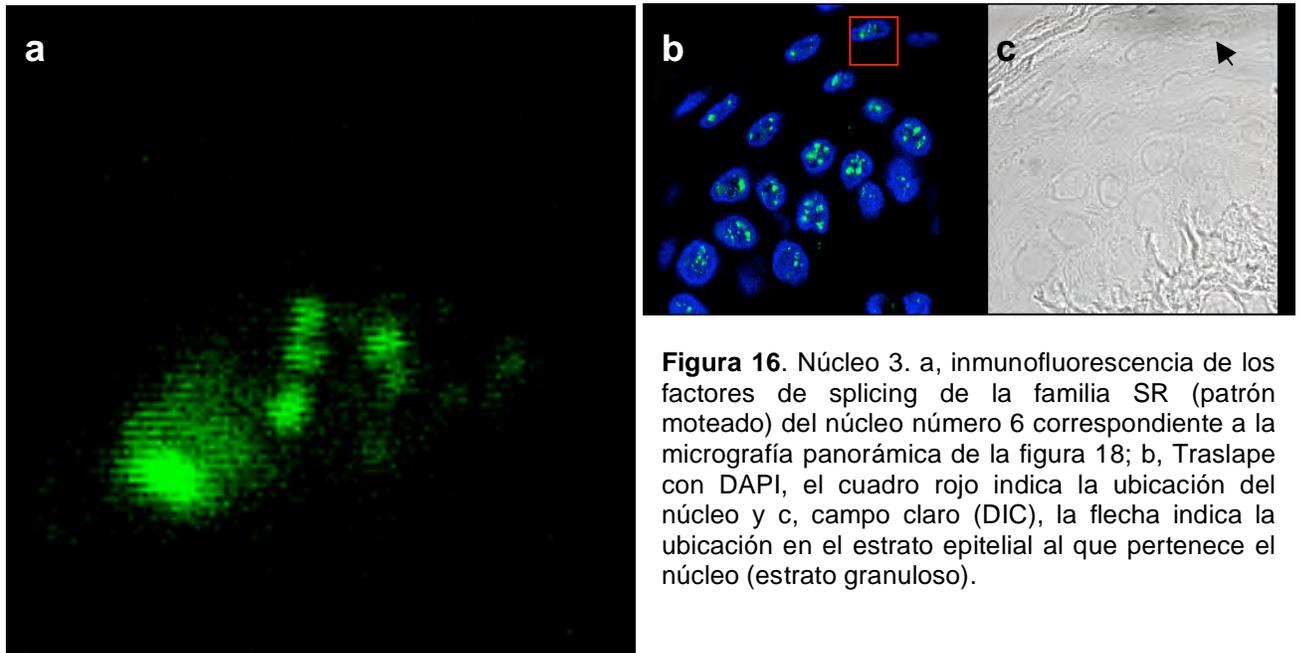


Figura 16. Núcleo 3. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 6 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato granuloso).

Las figuras 17 a 21 muestran las imágenes de los núcleos 4 al 8 pertenecientes al estrato espinoso, en el cual se observan los núcleos con mayor número de motas que el granuloso, así como motas de menor tamaño, esto significa que existe una menor actividad transcripcional en el estrato espinoso que en el estrato granuloso.

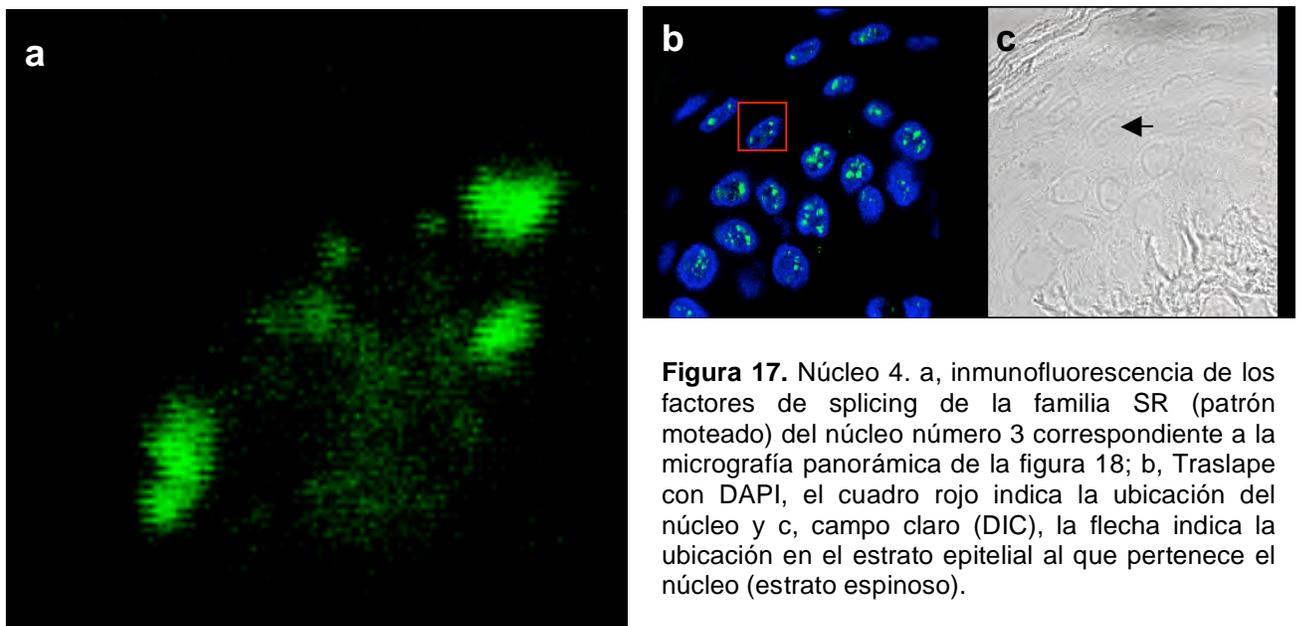


Figura 17. Núcleo 4. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 3 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato espinoso).

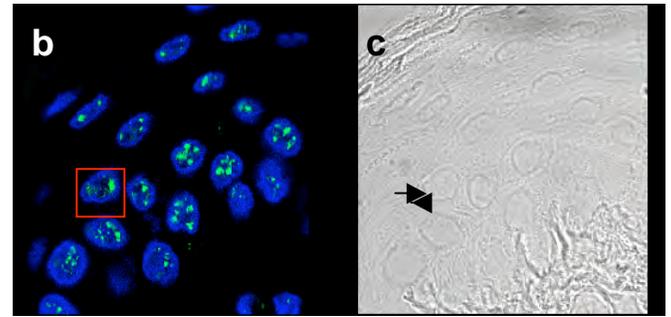
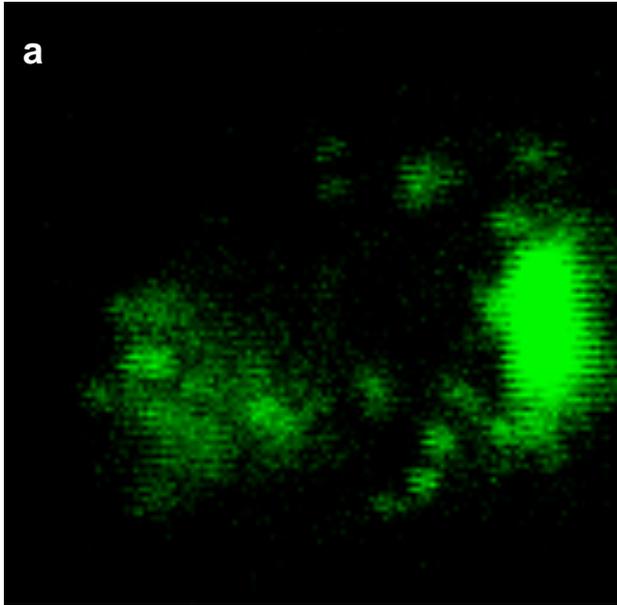


Figura 18. Núcleo 5. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 4 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato espinoso).

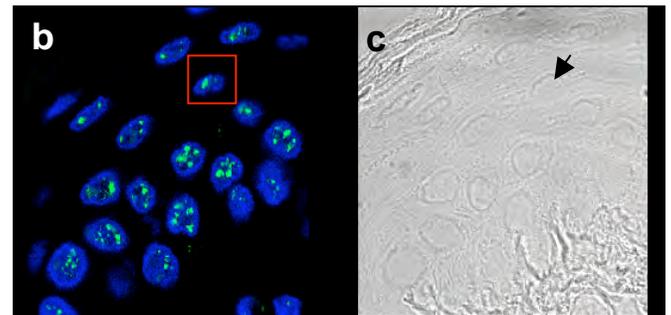
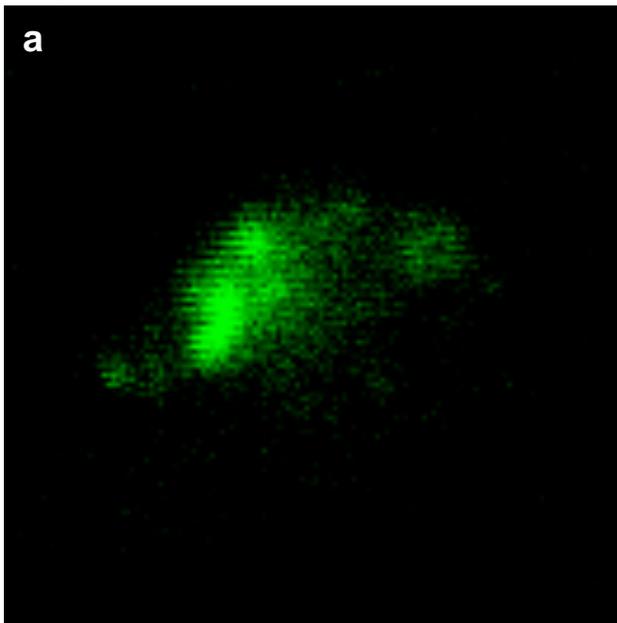


Figura 19. Núcleo 6. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 5 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato espinoso).

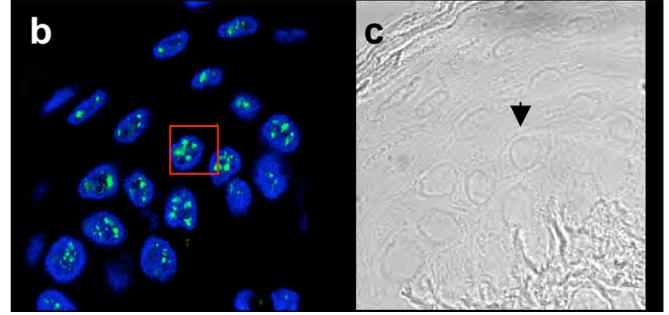
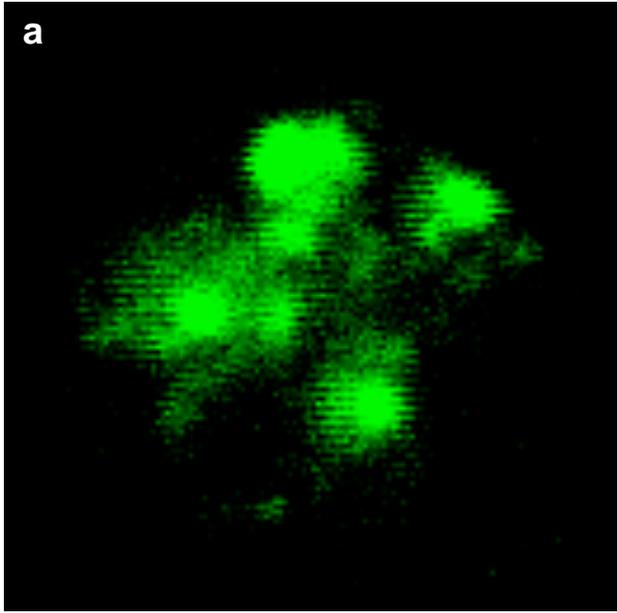


Figura 20. Núcleo 7. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 10 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato espinoso).

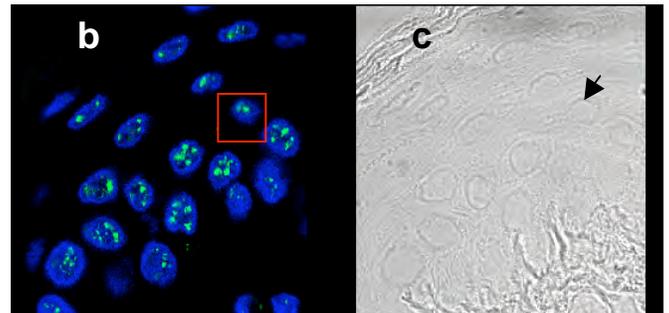
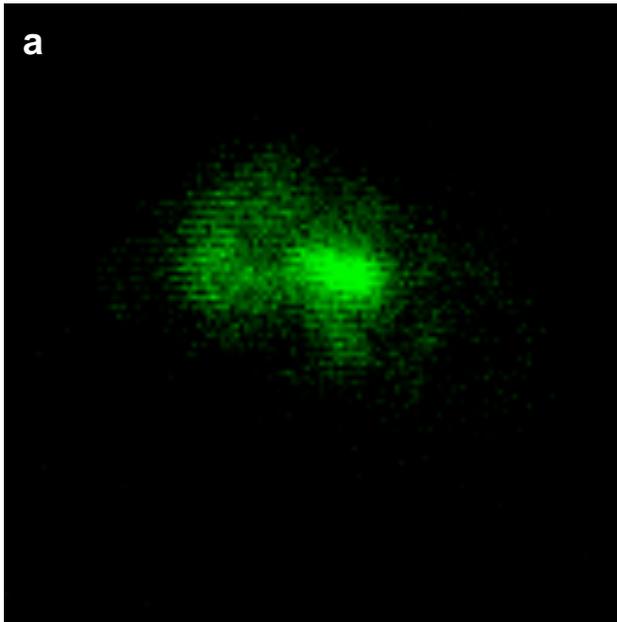


Figura 21. Núcleo 8. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 11 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato espinoso).

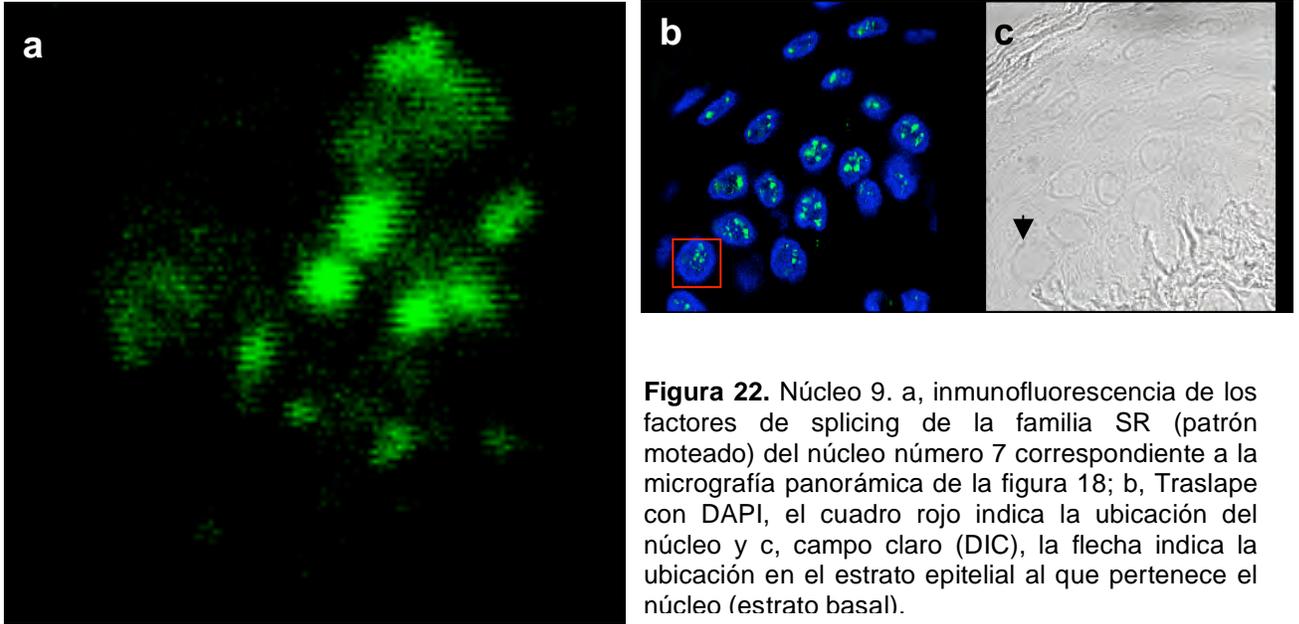


Figura 22. Núcleo 9. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 7 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

En las figuras 22 a 30 se muestran los núcleos pertenecientes al estrato basal, se observan mayor número de motas redondas y menor patrón difuso que en los estratos espinoso y granuloso, lo cual indica que hay menor actividad transcripcional que en estos estratos además se observarse mayor número de motas.

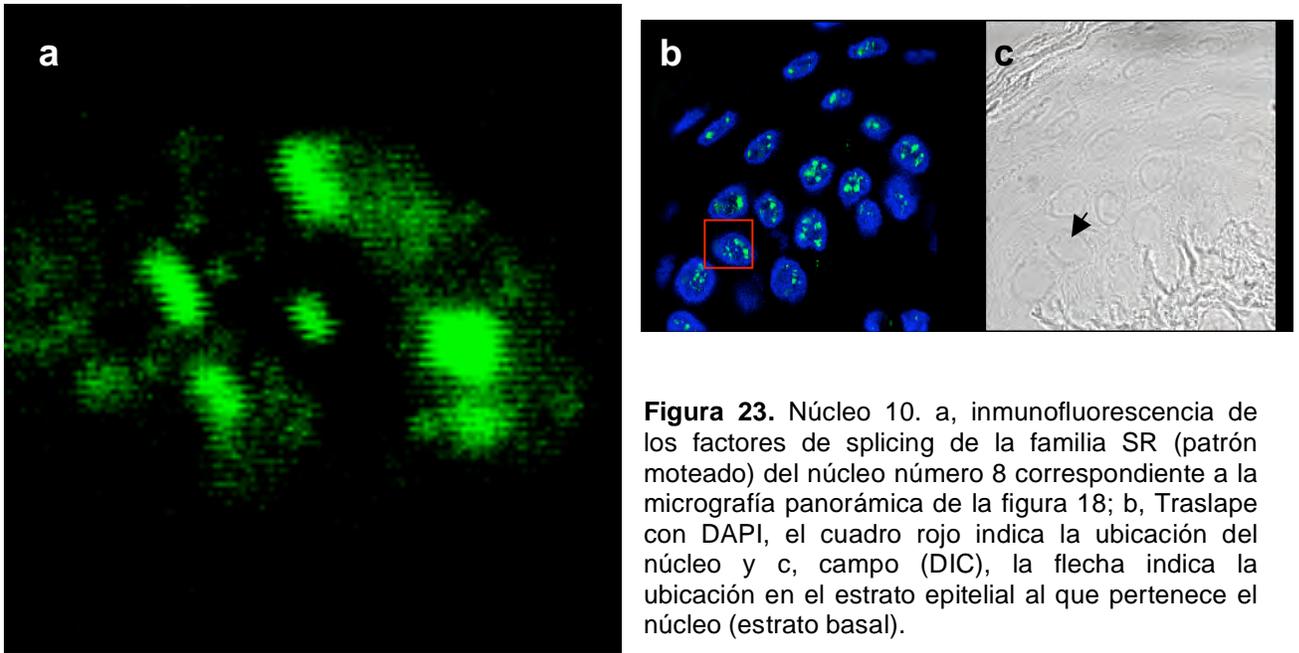


Figura 23. Núcleo 10. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 8 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

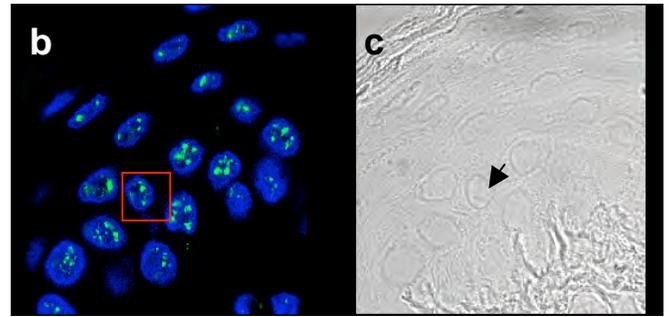
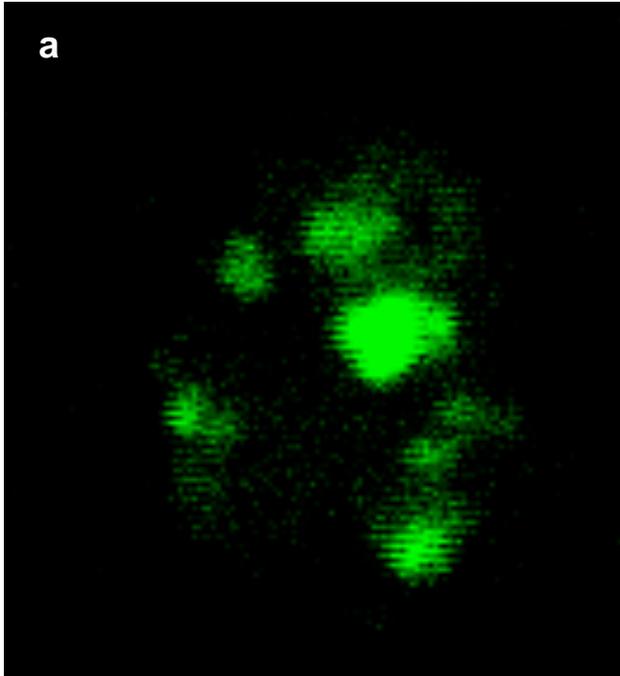


Figura 24. Núcleo 11. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 9 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

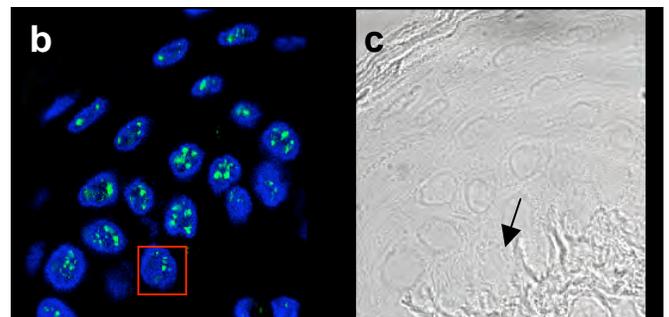
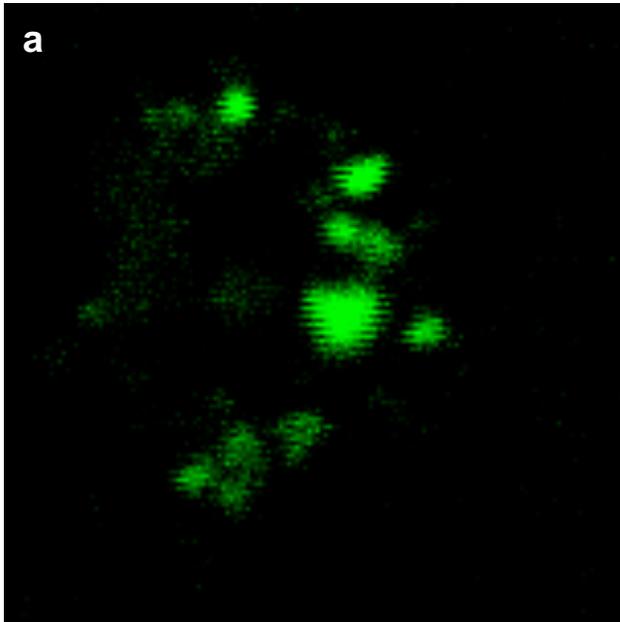


Figura 25. Núcleo 12. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 12 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

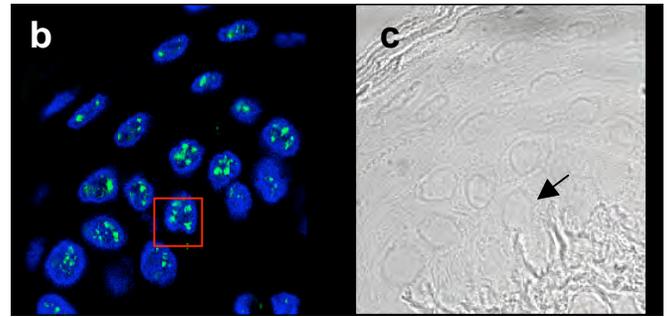
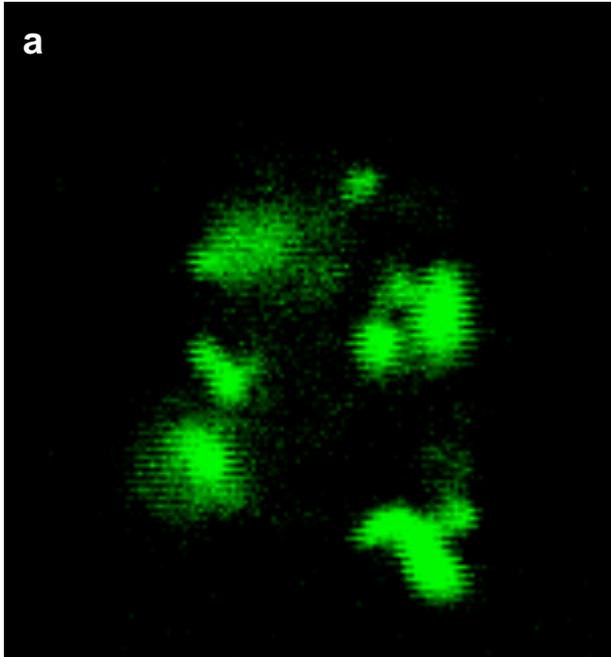


Figura 26. Núcleo 13. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 13 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

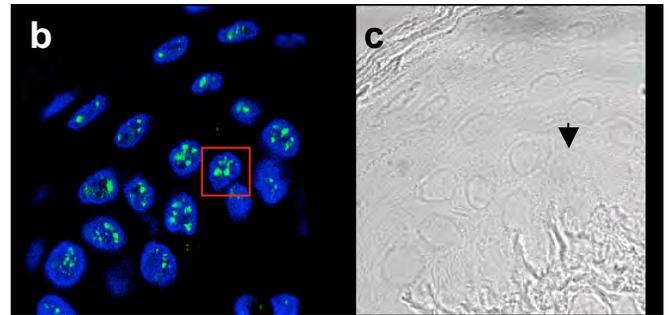
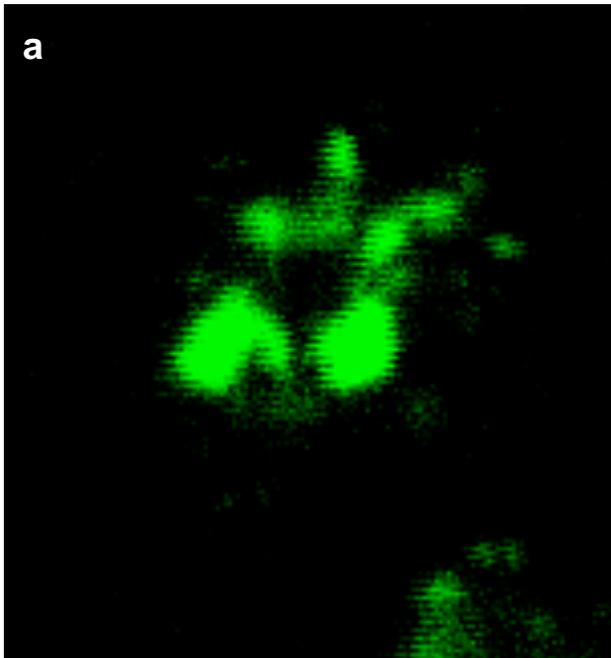


Figura 27. Núcleo 14. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 14 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

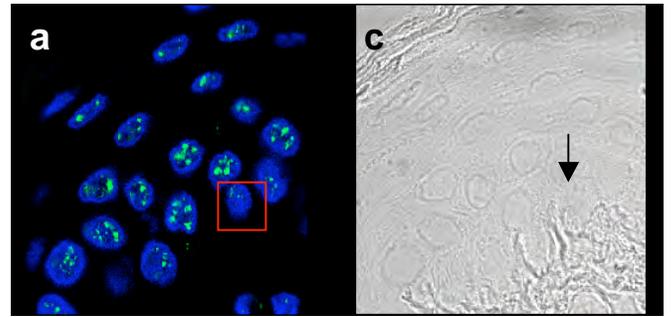
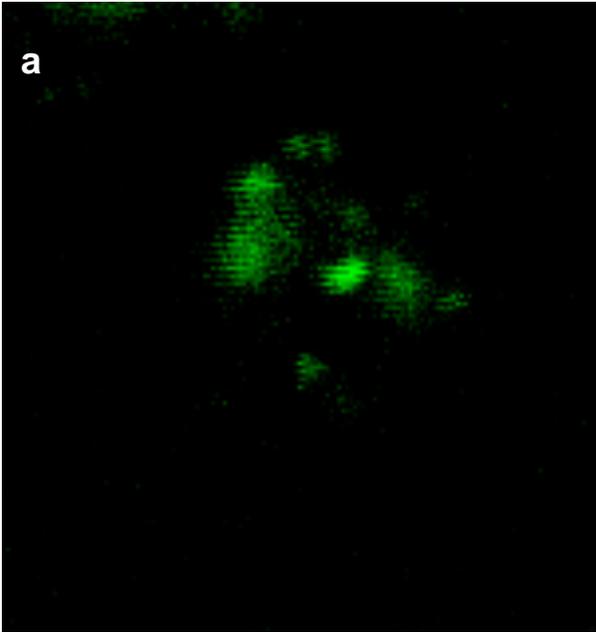


Figura 28. Núcleo 15. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 15 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

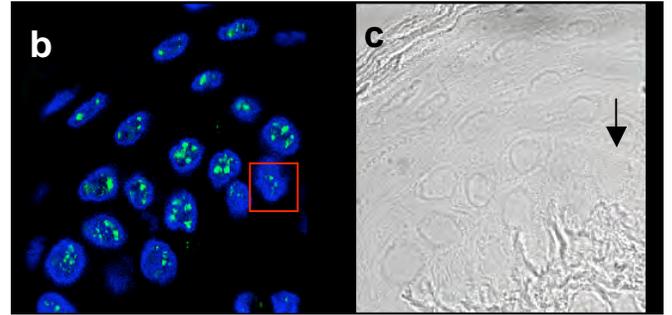
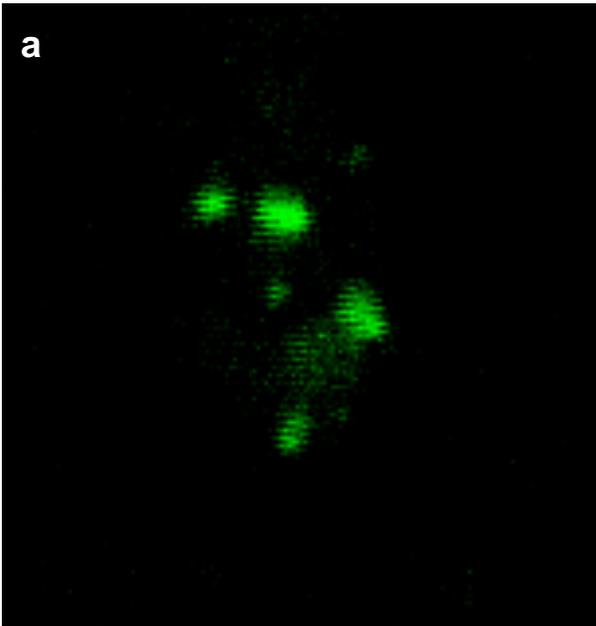


Figura 29. Núcleo 16. a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 16 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

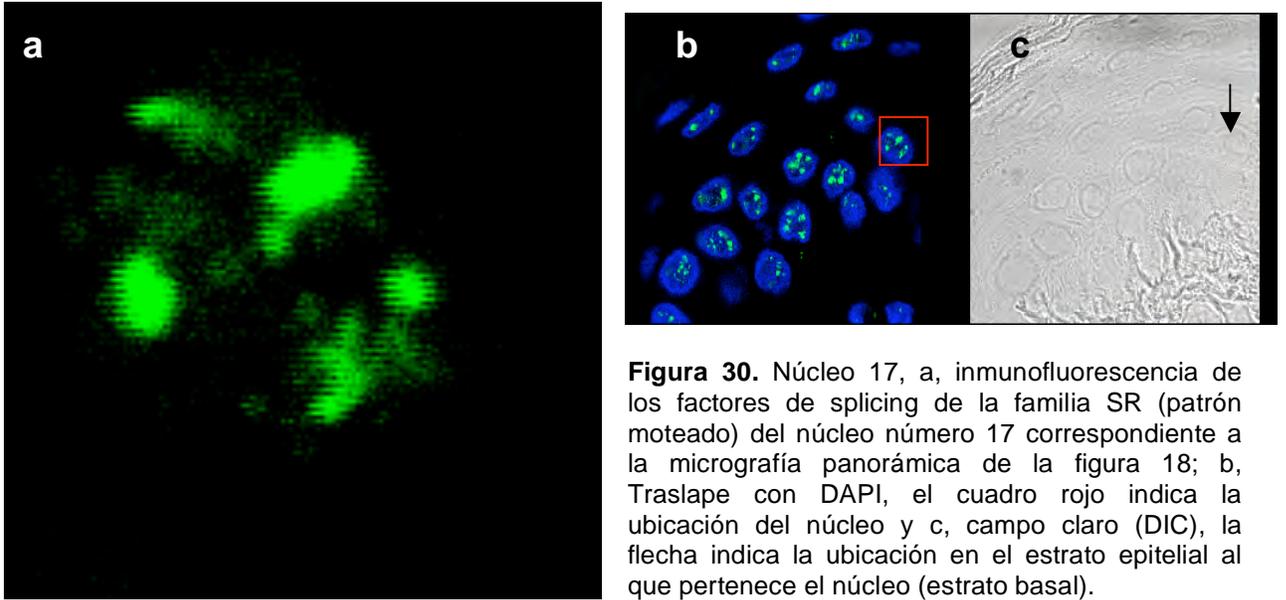


Figura 30. Núcleo 17, a, inmunofluorescencia de los factores de splicing de la familia SR (patrón moteado) del núcleo número 17 correspondiente a la micrografía panorámica de la figura 18; b, Traslape con DAPI, el cuadro rojo indica la ubicación del núcleo y c, campo claro (DIC), la flecha indica la ubicación en el estrato epitelial al que pertenece el núcleo (estrato basal).

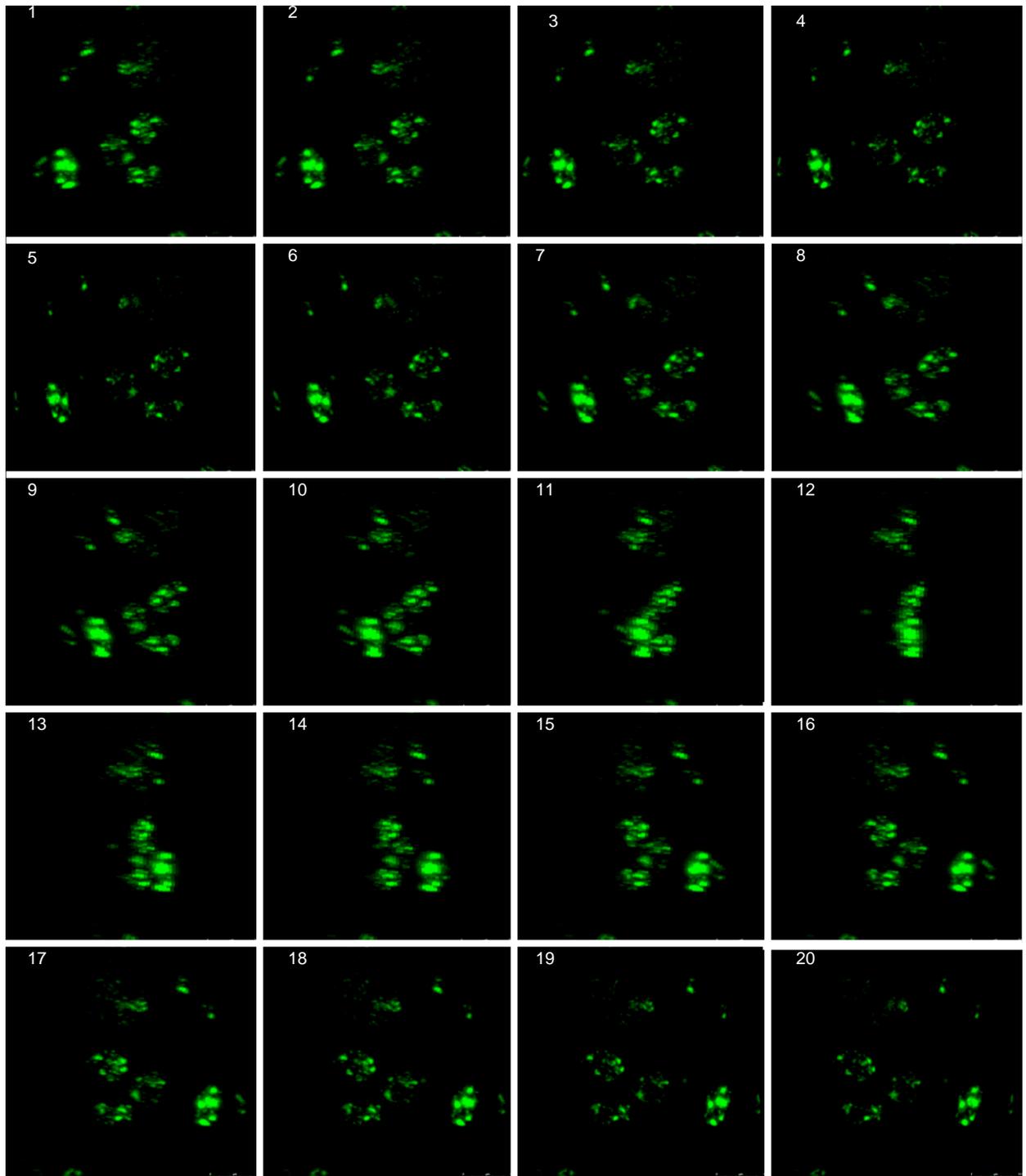


Figura 31. Reconstrucción tridimensional del patrón moteado en 20 cortes ópticos. Veinte cortes ópticos meridionales. Se observa la expresión de los factores de splicing de la familia de proteínas SR inmunolocalizadas con el anticuerpo monoclonal 3C5, en los núcleos de células epiteliales de la mucosa oral. (Material suplementario)

Para determinar el número exacto de motas se hizo la reconstrucción tridimensional de los núcleos celulares. La técnica es indispensable para observar si atrás de una mota existe otra u otras, lo que no sería posible determinar en una imagen de un solo plano. Esto se logra por medio de la obtención de las imágenes de los cortes seriados de la muestra (figura 31) obtenidas del microscopio confocal, que son procesados en el programa del microscopio para obtener el modelo tridimensional en un formato de video para su observación visual.

La distribución de los factores de splicing de la familia de proteínas SR varía en las células de cada estrato epitelial

Para analizar la distribución del patrón moteado, se tomó en cuenta tres variables que son el número, tamaño y forma de las motas. El número y tamaño de las motas indica la cantidad de factores involucrados en el procesamiento del mRNA en las células epiteliales de la mucosa oral de ratón y la forma, está relacionada con la dinámica intranuclear de las proteínas SR; como se menciona anteriormente, entre más redonda es una mota, la actividad transcripción es menor. La cuantificación está determinada por la medida de circularidad, donde la cifra más cercana a 1, indica menor actividad de transcripción y por consecuencia menor actividad de *splicing*.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MOTAS EN LOS DIFERENTES ESTRATOS

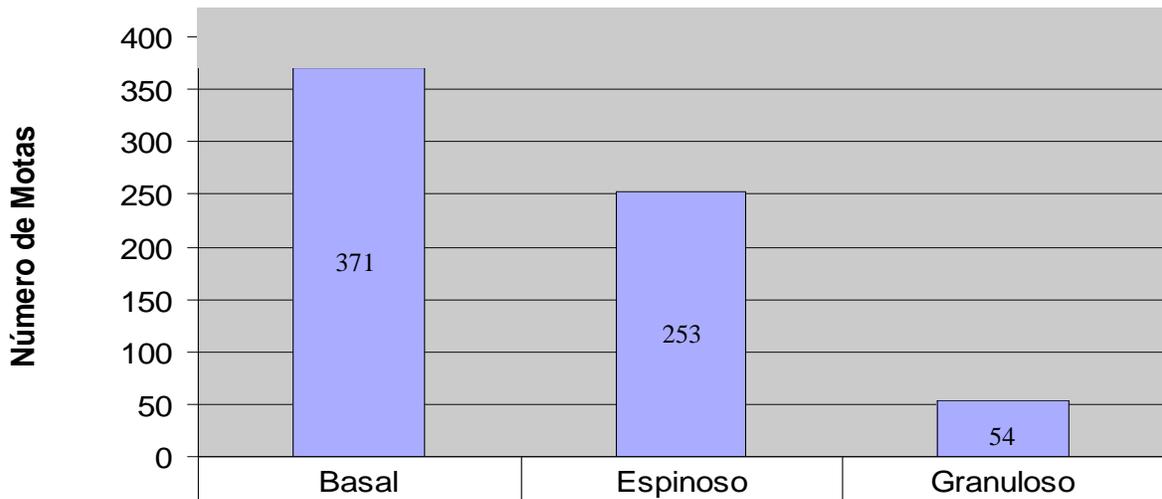
ESTRATO	BASAL	ESPINOSO	GRANULOSO	TOTAL
Núcleos analizados	33	33	33	99
Número de motas analizadas por estrato	371	253	54	678
Media del número de motas por núcleo por estrato	11.24	7.66	1.66	6.85
Media del tamaño de las motas por núcleo (nm)	664.51	1021.91	1328.83	1005
Media de medida de Circularidad	0.709882353	0.72770303	0.672085714	0.7032237

Medida de circularidad, 0-1, donde 1=círculo

Como se observa en la tabla 1, el estrato basal presenta la mayor cantidad de motas por estrato y por núcleo pero son de menor tamaño en comparación con el estrato granuloso donde las características son inversas al estrato basal.

Con respecto a la dinámica de las motas, se observó que el estrato granuloso es el más activo.

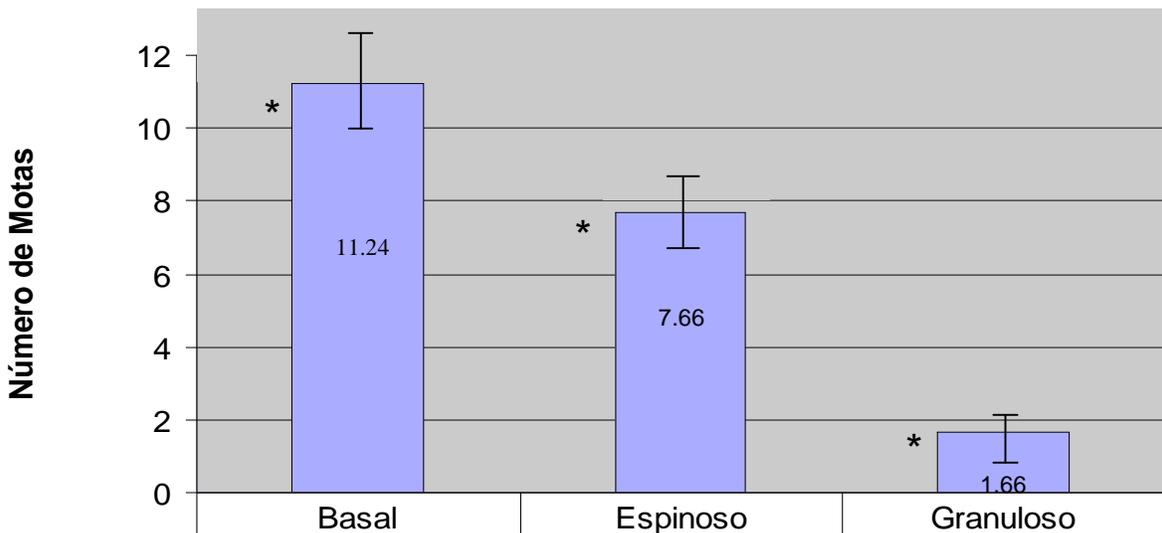
FIGURA 32. GRÁFICA DEL NÚMERO DE MOTAS POR ESTRATO



ANOVA: $P < 0.05$
*diferencias significativas
Barra de error: desviación estandar

En la figura 32 se muestra la gráfica del número de de motas totales analizadas en 33 núcleos del estrato basal, 33 núcleos de estrato espinoso, y 33 núcleos del estrato granuloso; no se incluye el estrato córneo en ninguna gráfica debido a que no se observó la presencia de las proteínas SR por inmunolocalización con el anticuerpo 3C5.

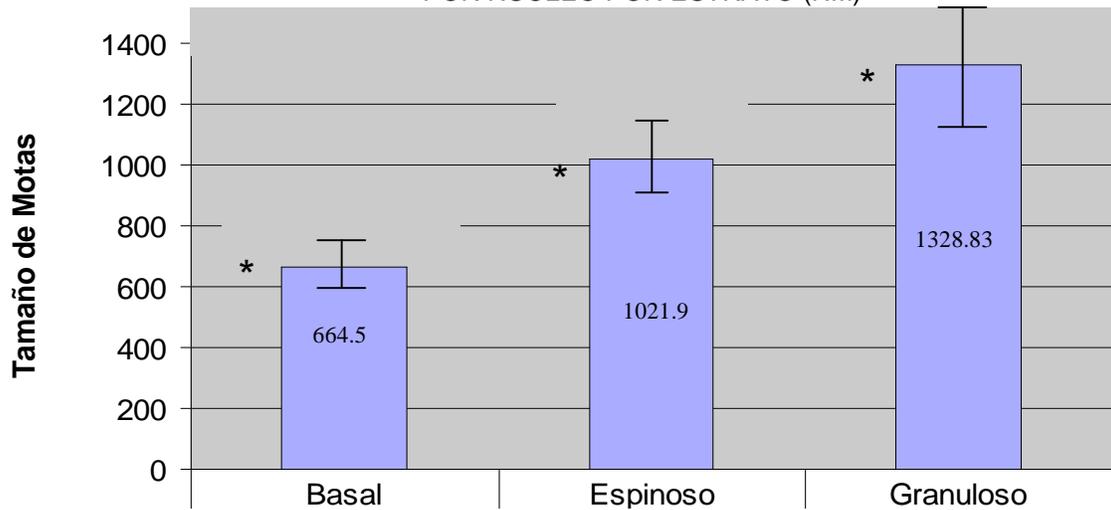
FIGURA 33. GRAFICA DE LA MEDIA DEL NÚMERO DE MOTAS POR NÚCLEO POR ESTRATO



ANOVA: $P < 0.05$
*diferencias significativas
Barra de error: desviación estandar

En la figura 33 se muestra la gráfica de la media del número de de motas por núcleo por estrato analizadas en 33 núcleos del estrato basal, 33 núcleos de estrato espinoso, y 33 núcleos del estrato granuloso. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre los 3 estratos.

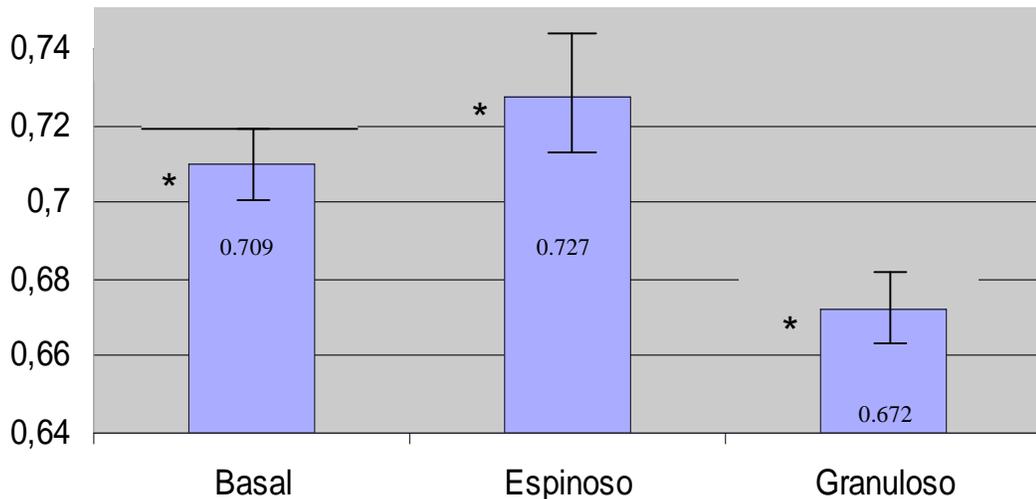
FIGURA 34. GRÁFICA DE LA MEDIA DEL TAMAÑO DE MOTAS POR NÚCLEO POR ESTRATO (NM)



ANOVA: $P < 0.05$
 *diferencias significativas
 Barra de error: desviación estandar

En la figura 34 se muestra la gráfica de la media del número del tamaño de las motas por núcleo por estrato medida en nanómetros (nm), analizadas en 33 núcleos del estrato basal, 33 núcleos de estrato espinoso, y 33 núcleos del estrato granuloso. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre los 3 estratos.

FIGURA 35. GRÁFICA DE LA MEDIA DE LA FORMA DE LAS MOTAS POR NÚCLEO POR ESTRATO



ANOVA: $P < 0.05$
 *diferencias significativas
 Barra de error: desviación estandar. Circularidad 0-1. Círculo=1

En la figura 35 se muestra la gráfica de la media de la forma de las motas por núcleo por estrato, analizadas en 33 núcleos del estrato basal, 33 núcleos de estrato espinoso, y 33 núcleos del estrato granuloso. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas entre los 3 estratos.

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se ha evidenciado la presencia de los factores pertenecientes a la familia SR del *splicing* en las células epiteliales de la mucosa oral de ratón en una distribución regular en forma de un patrón moteado, presentando su región brillante y difusa, similar al que se ha observado en tejidos de otros órganos (4, 46, 77). Se muestra que en el núcleo se presenta una distribución que corresponde al patrón moteado observado en células de mamíferos. Los criterios para afirmar que se trata de un patrón moteado auténtico son los siguientes: 1) la distribución de la marca es intranuclear, 2) el marcaje no incluye al nucléolo, 3) la marca se presenta como dos regiones intranucleares: una de marca intensa en regiones discretas (motas o "speckles") y otra en forma de tinción difusa en la que están embebidas las regiones de mayor concentración (patrón difuso). Además se observó que la marca se presenta en algunas células en forma de motas irregulares o bien redondas, como lo que se observa en células en cultivo, con diferente actividad transcripcional o en células sometidas a diferente ambiente hormonal (4, 37, 41, 43, 54, 56, 66, 74, 85). Estudios posteriores con el microscopio electrónico podrán revelar si el patrón moteado observado en este tejido también está formado por partículas ribonucleoproteicas como previamente se ha observado en otros tejidos (93).

Se observó una expresión distinta en cada uno de los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo del epitelio (figuras 32 a 35). Para analizar de manera detallada estas diferencias en la expresión de los factores, se realizó un estudio del patrón moteado con un anticuerpo monoclonal (92). El patrón moteado es un fenómeno descrito como el reflejo morfológico de la transcripción (4, 12, 35, 37, 38, 40, 41, 65, 66, 74, 77, 85).

La cantidad de motas encontradas en el epitelio oral es distinta a la encontrada en otros tejidos siguiendo la misma mitología. Se ha descrito que el *patrón nuclear moteado* está compuesto de 25-50 puntos brillantes donde se concentran los factores de *splicing* (46, 77, 85) y un hallazgo interesante es que el patrón moteado del epitelio de mucosa oral de ratón, consta de 1-17 motas con una media de 6.85 motas por núcleo. Se muestra la figura en la cual se compara el promedio de las medidas de las motas de los distintos estratos.

Otro hallazgo es que la medida de las motas de los estratos del epitelio oral oscila entre los 0.4 a 3.0 nm, a diferencia de los 0.8 a 1.8 nm reportado en la literatura (85).

Se observa que en el estrato granuloso en el cual es el sitio donde se comienzan a perder los núcleos debido al recambio epitelial (78-82), el tamaño de las motas es mucho mayor (figura 34), que en los estratos basal y espinoso. Las figuras 14, 15 y 16 representan a imágenes de núcleos 1, 2 y 3 pertenecientes al estrato granuloso, se observan pocas motas en estos núcleos en comparación con

los núcleos de los estratos espinoso y basal, resultado contrario a lo que se esperaba, pues una mota grande nos habla de un patrón más difuso lo cual corresponde a una actividad transcripcional mayor. Además, se observan motas grandes y con patrón difuso, lo que indica que en este estrato tiene lugar fenómeno de fusión de motas.

La presencia del fenómeno conocido como fusión de motas (54), en el cual las motas migran concentrándose en un punto, lo que nos deja ver una mota mucho más grande, debido a la fusión de las mismas, lo que significa una actividad transcripcional elevada.

El estrato basal es el sitio donde se encuentran las células progenitoras (78, 79, 82), siendo éste en el cual se observó mayor número de motas (figuras 37 y 38); sin embargo existe una relación inversa entre el tamaño y la distribución de las mismas (figuras 39 y 40), ya que el número de motas es mayor pero al mismo tiempo, este estrato tiene el menor tamaño de las motas en relación a los demás estratos, se observa que entre mayor sea la cantidad de las motas, el tamaño es menor, Las figuras 17 a 21 muestran las imágenes de los núcleos 4 al 8 pertenecientes al estrato espinoso, en el cual se observan los núcleos con mayor número de motas que el granuloso, así como motas de menor tamaño, esto significa que existe una menor actividad transcripcional en el estrato espinoso que en el estrato granuloso. Sin embargo en cuanto a medida de circularidad (figura 35), está en un lugar intermedio entre el espinoso y el granuloso, indicando que su actividad transcripcional es mayor que el espinoso, pero menor que en el granuloso.

En la transición del estrato basal y el estrato espinoso es donde se lleva a cabo el proceso de división celular (78,79,81, 82), Por medio del análisis de la forma de las motas se observa la actividad transcripcional y comparar entre un núcleo y otro (menor o mayor actividad entre ellos), la cual se espera sea mayor que es otros estratos, sin embargo en el estrato basal se observa que la forma de las motas es más parecida a un círculo que en los estratos granuloso y espinoso (figura 35), hallazgo importante ya que es en este estrato donde existe mayor proliferación celular, sin embargo una mayor actividad transcripcional se está dando en el estrato granuloso y después en el basal. Una medida de circularidad más cercana al 1 quiere decir una forma de mota, más redonda y por consiguiente una menor actividad transcripcional, en la cual los factores de *splicing* se encuentran almacenados en los gránulos intercromatinianos (4, 37, 41, 43, 54, 56, 66, 74, 85).

En el estrato espinoso, al cuantificar el número de motas, se observa que la media está por debajo del estrato basal (figuras 32 y 33), lo cual indica menor expresión de los factores de *splicing* en este estrato, pero mayor que en el granuloso donde se observa el menor número de motas. En las figuras 22 a 30 se muestran los núcleos pertenecientes al estrato basal, se observan máyor número de motas

redondas y menor patrón difuso que en los estratos espinoso y granuloso, lo cual indica que hay menor actividad transcripcional que en estos estratos además se observarse mayor número de motas.

El estrato granuloso se caracteriza por sus gránulos de queratohialina (78-82). Existen pocos núcleos en este estrato lo cual nos podría hablar de un proceso de destrucción o lisis del núcleo celular (78-79). Por lo tanto una disminución en la expresión de factores relacionados con el *splicing* y la transcripción, sin embargo los resultados muestran lo contrario, una actividad transcripcional mayor se observó en el estrato granuloso, que es un estrato en el cual el núcleo está desapareciendo, existe de hecho, un número limitado de núcleos, y consecuentemente esperábamos observar una menor expresión de los factores involucrados en procesos de *splicing* y transcripción. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la actividad metabólica que presentan las células de este estrato, ya que en la capa de células granulosas comienza la degeneración de núcleo y del resto de organoides celulares. A diferencia de las células basales y espinosas, en las que las enzimas lisosómicas como la fosfatasa ácida, solo se expresan en forma de escasos agregados granulares, la célula granulosa desarrolla una importante actividad sintética de proteínas de envoltura, lípidos, receptores y antígenos relacionados con al queratinización, y al mismo tiempo en cinco o seis horas se prepara para de la desestructuración de sus organelos y núcleo hasta convertirse en un elemento de estrato córneo (78).

El *splicing* es un mecanismo crucial para la generación de diversidad de proteínas (5, 6). Diferentes variantes de *splicing* de una determinada proteína puede mostrar diferentes e incluso antagónicas funciones biológicas (3,89). Por lo tanto, su adecuado control es necesario para asegurar la compleja orquestación de los procesos celulares dentro de los organismos (88).

Nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a corregir o eludir anomalías en el *splicing* están surgiendo. Los enfoques incluyen incremento en la expresión de las proteínas que alteran el *splicing* (3).

La alteración de la actividad de factores reguladores o la modificación del equilibrio entre ellos pueden llevar a la desregulación de los procesos celulares fundamentales, como adhesión, la proliferación, diferenciación, muerte, motilidad y diferenciación (3, 81).

Las mutaciones o cambios en la actividad de los factores de *splicing* o proteínas reguladoras que comprometen la exactitud del adecuado funcionamiento celular podrían tener profundos efectos sobre la patogénesis y modificar la calidad de los elementos de *splicing* del mRNA y, por lo tanto, la función de estas proteínas.

IX. CONCLUSIONES

- En esta tesis se caracterizó la morfología del patrón nuclear moteado de los factores de *splicing* de la familia de proteínas SR en las células epiteliales de la mucosa normal del carrillo, en 99 núcleos celulares por medio del análisis de la distribución de dichos factores.
- Los factores de *splicing* de la familia SR están presentes en las células epiteliales de la mucosa oral de ratón.
- Los factores de *splicing* de la familia SR se organizan como *patrón moteado intranuclear* en células del epitelio de la mucosa oral de ratón.
- El análisis del tamaño, número y forma de las motas muestra diferencias en la expresión de los factores de la familia SR del *splicing* en cada estrato del epitelio, lo que sugiere que este patrón presenta características específicas en cada estrato.
- Existe una mayor actividad transcripcional en el estrato granuloso, seguido del basal y espinoso, hallazgos que difieren a lo esperado en la literatura ya que se esperaba encontrar mayor actividad transcripcional en el basal debido a la proliferación celular, sin embargo la mayor actividad está en el granuloso debido a los procesos pertenecientes al metabolismo de muerte celular y producción de queratina.
- Existe una mayor expresión de los factores de *splicing* de la familia de proteínas SR en el estrato basal, seguido del espinoso y el córneo existiendo diferencias significativas entre cada estrato sugiriendo que la expresión de los factores está relacionada con la existencia de células progenitoras y división celular.
- La caracterización de la distribución de los factores de *splicing* en la mucosa oral sana realizada en esta tesis, constituye una herramienta clave en el estudio de la patogénesis de la misma, así como un aporte importante a la biología celular de la mucosa, que nos proporciona información de la organización de moléculas importantes en procesos patológicos, lo cual nos sirve como referencia para conocer la salud y así, en estudios posteriores poder detectar anomalías relacionadas con estos factores que pueden estar involucradas en la enfermedad, partiendo del conocimiento del patrón de expresión normal.

X. PERSPECTIVAS

Diversos factores de splicing han sido encontrados alterados en diversas patologías humanas, incluyendo los que han sido analizados en tejido sano en esta tesis. Los resultados sugieren que el tejido epitelial de la mucosa oral posee un patrón de expresión de proteínas SR característico, por lo tanto a partir de esta caracterización en tejido oral sano sería interesante en un futuro, utilizar esta información como referencia para estudiar el mismo tejido en estados de alteración patológica.

Las alteraciones en los factores de splicing pueden servir como marcadores de la alteración celular asociados con la enfermedad y tienen el potencial de proporcionar información diagnóstica y pronóstica, con respecto a las evidencias de estudios realizados con anterioridad (3, 83, 84, 86-91).

Distintos patrones de expresión de factores de *splicing* podría servir como nuevos marcadores patológicos y representar una herramienta para la intervención en pacientes que presenten anormalmente dichos factores.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhao X. et al. (2007). Identification of a 17-nucleotide splicing enhancer in HPV-16 L1 that counteracts the effect of multiple hnRNP A1-binding splicing silencers. *Virology* 369, 351–363
- 2, Lee MP and Feinberg AP. (1997). *Cancer Res.* 57, 3131-3134.
3. Scorilas, A., Kyriakopoulou, L., Katsaros, D. and Diamandis, E.P. (2001). Cloning of a gene (SR-A1), encoding for a new member of the human Ser/Arg-rich family of pre-mRNA splicing factors: overexpression in aggressive ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 85: 190-198.
4. George-Tellez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., and Jiménez-García, L.F. 2002. Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in uterus by hormone action. *Boil. Cell*, 94:99-108.
- 5.- Lodish H, Berk A, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C A, Krieger M, Scott M P, Zipursky S L, Darnell J, (2004). *Molecular and Cell Biology*. 5ª edición.
6. Alberts, A. Jhonson, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª edition. Ediciones Omega B.
7. Reed, R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin in Cell Biol* 12, 340-345.
8. Hastings, M.L., and Krainer, A.R. (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 302-309.
9. Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36, 333-60.
10. Lewin, B. (2008). *Genes IX*. Jones and Bartlett, Boston.
11. Eran, M., and T. Misteli. (2005). Splicing Misplaced. *Cell* 122, 317-318.
12. Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 7, 663-680.
13. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343, 437-441.

14. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* 256, 535-8.
15. Ge, H., and Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62, 25.
16. Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6(9), 1197-211.
17. Gui, J.F., Lane, W.S., and Fu, X.D. (1994). A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682.
18. Jurica, M., and Moore, M. (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28, 336-345.
19. Krainer, A.R., and Maniatis, T. (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42, 725-736.
20. Krainer, A.R., Conway, G.C., and Kozak, D. (1990). Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, 6, 837.
21. Krämer, A., Keller, B.W., Appel, K., and Lührmann, R. (1984). The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 38, 299-307.
22. Krämer, A., and Utans, U. (1991). Three protein factors (SF1, SF3 y U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO* 10, 1503.
23. Krämer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Ann Rev Biochem* 65, 367-409.
24. Tacke, R., Chen, Y., and Manley, J.L. (1997). Sequence-specific RNA binding by an SR proteins requires RS domain phosphorylation: Creation of an SRP40-specific splicing enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1148-1153.
25. Tacke, R., Manley, J.L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol* 3, 358-62.

26. Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Jackson, S.P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* 273(12), 6769-75.
27. Wang, J., Xiao, S.H., and Manley, J.L. (1998). Genetic analysis of SR protein ASF/SF2: Interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev* 11, 334-344.
28. Will, C.L., and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 3, 290-301. MENSAJE BIOQUÍMICO, Vol. XXXI (2007) 154
29. Yeackley, J.M., Tronchere, E., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y., and Fu, X.D. (1999). Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145, 447-455.
30. Zamore, P.D., and Green, M.R. (1989). Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9243.
31. Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Green, M.R. (1994). Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.
32. Zhou, Z., Lawrence, J.L., Gygi, S.P., and Robin, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-185.
33. Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M., and Lawrence, J.B. (2006). Molecular Anatomy of a Speckle. *The Anatomical Record Part A*, 288A, 664-675.
34. Handwerger, K.E., and Gall, J.G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Cell Biology* 16 (1), 19-26.
35. Huang, S., and Spector, D.L. (1992). U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *PNAS USA* 89, 305-308.
36. Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4, 605-612.
37. Mintz, P.J., and Spector, D.L. (2000). Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol* 129, 241-251.

38. Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F., and Spector, D.L. (2004). Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell* 15, 3876-3809.
39. Spector, D.L., Schrier, H., and Busch, W.H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell* 49, 1-10.
40. Spector, D.L. (1990). Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 147-151.
41. Spector, D.L., Fu, X.D., and Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO* 10, 3467-3481.
42. Spector, D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann Rev Cell Biol* 9, 265-315.
43. Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891-2893.
44. Spector, D.L. (2006). Cellular bodies. *Cell* 127, 1070.
45. Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol* 4, 86-90.
46. Fakan, S., Lesser, G., and Martin, T.E. (1984) Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol* 98, 358-362.
47. Fakan, S., and Puvion, E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* 65, 255.
48. Monneron, A., and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27, 266-288.
49. Puvion, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp Cell Res* 229, 217-225.
50. Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., and Jiménez-García, L. El núcleo celular Interfásico. En *Biología Celular y Molecular*, Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. Prentice Hall, México. 341-394.

51. Bergman, D.B., Du, L., Van der Zee, S., and 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.
52. Sacco-Bubulya, P., and Spector, D.L. (2002). Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 156, 425-436.
53. Gall, J.G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.
54. Jiménez-García, L.F., and Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
55. Spector, D. L., O'Keefe, RT, Jiménez-García, L.F. (1993). Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 799-805.
56. O'Keefe, R.T., Mayeda, C.L., Sadowski, A.R., Krainer, A.R., and Spector, D.L. (1994). Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol* 124, 249-260.
57. Huang, S., and Spector, D.L. (1996). Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *J Cell Biol* 131, 719-732.
58. Bentley, D., (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA. *Curr Opin in Cell Biol* 11, 347-351.
59. Cáceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L., and Krainer, A.R. (1997). Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 138, 225-238.
60. Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* 15(24), 3319-29.
61. Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzymes is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.

62. Cho, E.J., Rodríguez, C.R., Takagi, T., and Buratowski, S. (1998). Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 15, 3482-7.
63. Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271, 19009-19012.
64. Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19), 2452-60.
65. Misteli, T., and Spector, D.L. (1996). Serine/Threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol Biol Cell* 7, 1559-1572.
66. Misteli, T., and Spector, D.L. (1997). Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trend Cell Biol* 7, 135-138.
67. Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3, 697-705.
68. Misteli, T. (2000). Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113, 1841-1849.
69. Murray, M., Kobayashi, R., and Krainer, A.R. (1999). The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2Cgamma is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 13, 87-97.
70. Robert, F., Blanchette, M., Maes, O., Chabot, B., and Coulombe, B. (2002). A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277(11), 9302-6.
71. Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-40.
72. Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin in Cell Biol* 15, 326-331.
73. Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.

74. Misteli, T., Cáceres, J.F., and Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
75. Carmo-Fonseca, M., Platani, M., and Swedlow, J.R. (2002). Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends in Cell Biol* 12(11), 491-494.
76. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R., and Spector, D.L. (1994). Nucleologénesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 9, 955-966.
77. George-Tellez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., and Jiménez-García, L.F. (2002). Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol Cell* 94, 99-108.
78. Ten Cate, A.R. (2006). Oral histology development, structure and function. A Ed. Mosby-Year Book, Inc. Missouri.
79. Garant. Oral Cells and Tissue. (2006). Quintessence Publishing.
80. Ferraris y Campos (2002) Histología y Embriología bucodental. Ed. Médica Panamericana.
81. Ali A Asma, Manal M Zyada. (2006) The significance of Epstein Barr Virus (EBV) & DNA Topoisomerase II alpha (DNA-Topo II alpha) immunoreactivity in normal oral mucosa, Oral Epithelial Dysplasia (OED) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) *Diagnostic Pathology* 2008, 3:45
82. Dotto GP. Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:442-57.
83. Stickeler, E., Kittrell, F., Medina, D. and Berget, S. M. (1999). Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 18, 3574-3582.
84. YM Skalsky, PM Ajuh², C Parker¹, AI Lamond², G Goodwin¹ and CS Cooper (2001). PRCC, the commonest TFE3 fusion partner in papillary renal carcinoma is associated with pre-mRNA splicing factors. *Oncogene* 20, 178 -187
85. Jiménez García, Lara Martínez, Gil Chavarría, Alma Leticia Zamora Cura, Martha Salcedo Alvarez, Lourdes Teresa Agredano Moreno, José de Jesús Moncayo Sahagún², María de Lourdes Segura Valdez. (2007) *Biología celular del splicing. Mensaje bioquímico* Vol. XXXI

86. Anabella Srebrow, Alberto R. Kornblihtt (2006) The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science* 119, 2635-2641
87. Brinkman, B. M. (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.* 37, 584- 594.
88. Caceres, J. F. and Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 18, 186-193.
89. Faustino, N. A. and Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17, 419-437.
90. Venables, J. P. (2006). Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *BioEssays* 28, 378-386.
91. Wang, X. Q., Luk, J. M., Leung, P. P., Wong, B. W., Stanbridge, E. J. and Fan, S. T. (2005). Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11, 483-489.
92. Turner, B.M. & Franchi, L. (1987). Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells. *J. Cell Sci* 87, 269-282
93. Jiménez-García, L.F., *et al.* (1989). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi, and protocists. *BioSystems* 22, 103-116