



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Análisis de la distribución espacial intranuclear del  
RNA derivado de la expresión de genes del  
cromosoma 22 en núcleo interfásico de células  
HeLa

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Carlos Gaona López

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Luis Felipe Jiménez García

COMITÉ TUTOR: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/485/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de agosto de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **GAONA LÓPEZ CARLOS** con número de cuenta **97201294** con la tesis titulada "**Análisis de la distribución espacial intranuclear del RNA derivado de la expresión de genes del cromosoma 22 en núcleo interfásico de células HeLa**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA:**

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Vocal: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA  
Secretario: M. EN C. MARTHA MONTAÑO RAMÍREZ  
Suplente: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA  
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de agosto de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/ grf\*

## **Agradecimiento**

Se agradece el apoyo dado por el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

El presente trabajo fue realizado con beca proporcionada por el CONACyT para cursar estudios de posgrado.

Agradezco el apoyo (BECA MIXTA) proporcionado por el CONACyT para la realización de una estancia de investigación de tres meses en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España.

Agradezco el apoyo parcial proporcionado por la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP), para la realización de una estancia de investigación de tres meses en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España. Dicho apoyo consistió en complemento del costo del boleto de avión.

Agradezco al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM por el apoyo y asesoría en la preparación de cultivos celulares, el cual fue parcialmente financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), proyecto 248/2010, a cargo de la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva.

Agradezco a mi Tutor el Dr. Luis Felipe Jiménez García por el constante asesoramiento en mi proyecto de investigación; de igual manera agradezco la asesoría, comentarios y correcciones hechas por la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y a la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, gracias a los tres se culminó con éxito el presente trabajo en el tiempo estipulado.

Agradezco la asesoría, comentarios y enseñanzas hechas por parte de la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno, gracias a las cuales el presente trabajo se culminó con éxito en el tiempo estipulado.

# Índice

1.1 Resumen .....	5
1.2 Introducción .....	7
1.2.1 Ultraestructura del núcleo .....	7
1.2.1.1 Ciclo Celular .....	7
1.2.1.1.1 Núcleo mitótico .....	9
1.2.1.1.2.1 Profase .....	10
1.2.1.1.2.2 Prometafase .....	10
1.2.1.1.2.3 Metafase .....	10
1.2.1.1.2.4 Anafase .....	11
1.2.1.1.2.5 Telofase .....	12
1.2.1.1.2 Núcleo interfásico .....	12
1.2.1.2 Nucléolo .....	13
1.2.1.3 Cromatina .....	14
1.2.1.4 Cuerpos Nucleares y Partículas Ribonucleoproteicas (no nucleolares) .....	16
1.2.1.4.1 Fibras Pericromatinianas (FC) .....	17
1.2.1.4.2 Gránulos Pericromatinianos (GPC) .....	18
1.2.1.4.3 Gránulos Intercromatinianos (GIC) .....	20
1.2.1.4.4 Cuerpos de Cajal .....	21
1.2.1.4.5 Polipartículas .....	23
1.2.2 Modelo Experimental .....	23
1.2.2.1 Células HeLa .....	23
1.2.2.2 Hibridación <i>in situ</i> Ultraestructural .....	24
1.2.2.3 Cromosomas Acrocéntricos .....	26
1.2.2.3.1 Cromosoma 22 .....	28
1.3 Objetivos .....	29
1.4 Metodología .....	29
1.4.1 Cultivo Celular .....	29
1.4.2 Obtención de las Muestras .....	30
1.4.3 Procesamiento de las Muestras .....	30
1.4.4 Preparación de las Muestras para su Observación .....	31
1.5 Resultados .....	34
1.6 Discusiones .....	46
1.7 Conclusiones .....	47
1.8 Referencias .....	47

## 1.1 Resumen

El interior del núcleo celular eucarionte es estructural y funcionalmente complejo, se trata de una estructura altamente compartimentalizada, en donde esos compartimentos o dominios no están delimitados por membranas. En el nucléoplasma los cromosomas están ordenados dentro de lo que se conoce como “territorios cromosómicos”, en donde los genes activos se encuentran ubicados en la periferia de los manchones de heterocromatina. Otro dominio claramente distinguible es el nucléolo, cuya principal función, aunque no la única, es la formación de las distintas subunidades ribosómicas. Dentro del núcleo se encuentran también varias partículas ribonucleoproteicas (RNPs), entre las que se encuentran; las fibras pericromatinianas, las cuales son la expresión física de cuan activa es una célula transcripcionalmente hablando; los gránulos intercromatinianos, los cuales no son más que el sitio de almacén de la maquinaria de splicing; los gránulos pericromatinianos, dichas estructuras se encuentran formadas por mRNAs y otras más como los cuerpos de Cajal, las polipartículas y los gránulos de *Lacandonia*.

En el presente trabajo se analizó un dominio muy particular conformado por los transcritos primarios, también conocidos como RNA heterogéneo nuclear, la distribución de dichos transcritos es un tema de íntima relación con lo que sería los territorios cromosómicos; para dicho análisis se empleó como modelo de estudio la línea celular HeLa, procedente de cáncer cérvico-uterino, dejando así, de lado el problema de la transcripción diferencial entre los distintos tipos celulares. Así mismo, se describió un panorama general de la morfología de este tipo celular y lo que encontramos es que dichas células presentan un núcleo de forma irregular, con franjas delgadas de cromatina en la periferia y a lo largo del nucleoplasma, esto por tratarse de una célula de tipo cancerígeno, posteriormente el dominio más conspicuo corresponde al nucléolo como habría de esperarse para una célula con dicha patología. En cuanto a la distribución de los transcritos primarios del cromosoma 22, se observa como la hibridación de la sonda está prácticamente restringida a regiones del núcleo ligeramente electrondensas, las cuales no serían más que pequeños manchones de cromatina en un estado de compactación adecuado tanto para la transcripción activa, así como para ser visibles mediante la técnica de contraste empleada, lo cual confinaría el área de distribución de los transcritos a la periferia de los manchones de cromatina de los cuales proceden. De igual manera encontramos señal dentro del nucléolo, en los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos, ya que en el cromosoma 22 encontramos genes característicos de tales estructuras.

## Abstract

The eukaryotic cell nucleus is structural and functionally complex, is a highly compartmentalized structure, where these compartments or domains are not delimited by membranes. Chromosomes in the nucleoplasm are arranged in what is called "chromosome territories" in which active genes are located on the periphery of clumps of heterochromatin. Another domain is clearly distinguishable nucleolus, whose main function, but not only is the formation of the different ribosomal subunits. Inside the nucleus are also several ribonucleoprotein particles (RNPs), among which are; perichromatin fibers, which are the physical expression of how a cell is transcriptionally active talking; interchromatin granules, which are nothing more than the site store the splicing machinery, the perichromatin granules, these structures are formed by mRNAs and other more as Cajal bodies, the poliparticles and *Lacandonia* granules.

In this work examined a very specific domain corresponding of the primary transcripts, also known as heterogeneous nuclear RNA, the distribution of these transcripts is a topic of close relationship with what would be the chromosome territories, for this analysis was used as model HeLa cell line, from cervical cancer, leaving, aside the problem of differential transcription between different cell types. It also described an overview of the morphology of this cell type and what we found is that these cells have a nucleus of irregular shape, with thin strips of chromatin in the periphery and throughout the nucleoplasm, this because it is a cell cancer type, then the most conspicuous domain corresponds to the nucleolus as would be expected for a cell with this pathology. As for the distribution of primary transcripts of chromosome 22, is seen as the hybridization of the probe is virtually restricted to high electron-density regions, which are nothing more than small patches of heterochromatin in a state suitable for both active transcription, as well as to be visible by the technique of contrast used, which confine the range of transcripts to the periphery of chromatin clumps of whom come. Likewise find signal in the nucleolus, the granules perchromatin and interchromatin since these structures are genes on chromosome 22

## 1.2 Introducción

### 1.2.1 Ultraestructura del núcleo

#### 1.2.1.1 Ciclo Celular

En 1838, Mathias Jacob Scheiden y Theodor Schwann formularon la teoría celular, que considera a la célula como la unidad estructural común de todos los seres vivos, y que toda célula proviene a partir de otra célula. Esto último fue un aporte hecho por Rudolph Virchow en 1858 (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002).

El ciclo de división celular es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se reproducen. En especies unicelulares como las bacterias y levaduras, cada división de la célula produce un nuevo organismo. En especies pluricelulares se requieren muchas secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo; pese a esto la división celular también es necesaria en el cuerpo adulto para reemplazar las células perdidas por desgaste, deterioro o por muerte celular programada (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002; Bloom, J., Cross, F.R. 2007).

Una célula se reproduce llevando a cabo una secuencia ordenada de acontecimientos en los cuales duplica su contenido y luego se divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, conocido como ciclo celular, es el mecanismo esencial mediante el cual todos los seres vivos se reproducen (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002; Bloom, J., Cross, F.R. 2007).

Los pormenores del ciclo celular varían entre las distintas especies y aun entre los distintos tipos celulares dentro de una misma especie. Pero el conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar son aquellos que le permiten llevar a cabo su tarea más importante; la transmisión de su información genética a la siguiente generación de células (Ver: Bloom, J., Cross, F.R. 2007).



El proceso de dividir exactamente el material genético es muy complejo en las células eucariotas debido a la serie de pasos que deben ocurrir para lograr este objetivo. La solución está dada por una serie de pasos, al conjunto de los cuales se le llama, ciclo celular; su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. (Ver: Bloom, J., Cross, F.R. 2007; Dundr, M., Misteli T., 2001).

Un núcleo celular típico se da en dos fases, la interfase y la fase M. La interfase se divide en tres etapas G1, S, G2 y la fase M se divide en mitosis y citocinesis. La célula transcurre la mayor parte de su vida en interfase, etapa durante la cual se llevan a cabo intensas actividades metabólicas, de síntesis proteica, duplicación del material genético, además, de la duplicación de muchos elementos celulares que serán divididos durante la mitosis (Ver: Alberts, B., et al., 2002; Dundr, M., Misteli T., 2001).

Los procesos del ciclo celular están controlados por el sistema de control del ciclo celular. Su núcleo central está constituido por varias quinasas dependientes de ciclinas (Cdk, de cyclin dependent kinases), las cuales son activadas consecutivamente desencadenando los diferentes pasos del ciclo. Las Cdk se activan por la unión de proteínas reguladoras de ciclina, así como por fosforilación y desfosforilación de la quinasa. Se desactivan por distintas proteínas inhibidoras de Cdk y por la degradación de las subunidades de ciclina en determinados estadios del ciclo (Ver: Alberts, B., et al., 2002; Dundr, M., Misteli T., 2001).

La Cdk de la fase M (M-Cdk), una quinasa dependiente de ciclina de 34 KDa, desencadena una cascada de fosforilaciones de proteínas que determinan el inicio de la fase M; dichas fosforilaciones son las responsables de los principales cambios morfológicos que se observan en la célula durante la mitosis, como son; la condensación de los cromosomas, la fragmentación de la envoltura nuclear y la

reorganización de los distintos filamentos que forman el citoesqueleto (Ver: Alberts, B., *et al.* 2002).

#### 1.2.1.1.1 Núcleo mitótico

Como ya se mencionó las células se reproducen duplicando sus contenidos y dividiéndose en dos; posteriormente a esta etapa de intensa actividad metabólica le sigue una corta etapa denominada mitosis, en la cual todo el material duplicado en la etapa anterior pasa a repartirse equitativamente entre las dos células hijas. Incluyendo por supuesto una copia idéntica del material genético, proceso conocido como segregación de los cromosomas, cabe mencionar algunas de las principales características que se observan en un núcleo mitótico; como son:

Condensación de la Cromatina. El genoma de los organismos eucariotas se encuentra organizado y empacado en forma de cromatina. En el interior del cromosoma metafásico se encuentra reducida la longitud del DNA en un factor de 104 veces. Dicha condensación de la cromatina, es mediada principalmente por la fosforilación de la histona H3 y la hiperfosforilación de la H1 (Ver: Bloom, J., Cross, F.R. 2007; Burke, D.J., Stukenberg, P.T. 2008).

Disgregación de la envoltura nuclear. Dicha fragmentación de la envoltura nuclear, se ve facilitada por la fosforilación de determinados residuos de serina de las laminas (nombre genérico que reciben las distintas proteínas que forman la lámina nuclear) (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002).

Desensamble del citoesqueleto y ensamble del huso Acromático. Esto ocurre al inicio de la mitosis ya que la Cdk-M, se encarga de que los distintos componentes del citoesqueleto se desorganicen para luego formar una estructura característica de la mitosis, el huso Acromático, el cual va a estar formado únicamente por microtúbulos (Ver: Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

La mitosis suele dividirse para su estudio en cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

#### **1.2.1.1.2.1 Profase**

En las células animales, al comienzo de la profase, el centriolo se divide en dos centriolos hijos, cada uno de los cuales migra a los extremos opuestos de la célula. Desde cada centriolo se proyectan unos filamentos dispuestos de manera radial, llamados áster; entre estos filamentos y los centriolos se forma un huso. Al mismo tiempo, se condensa la cromatina, mediado por la fosforilación de la histona H3 y la hiperfosforilación de la H1 (Bloom, J., Cross, F.R. 2007; Odde D. J., Gardner M. K. 2006).

El nucléolo desaparece; posteriormente durante la profase tardía, la envoltura nuclear comienza a disgregarse y algunos microtúbulos se asocian al par de cromátidas. En la mayoría de las células, comienza la disgregación de la envoltura nuclear la cual marca el final de la profase de la mitosis. (Odde D. J., Gardner M. K. 2006).

#### **1.2.1.1.2.2 Prometafase**

La prometafase puede dividirse en dos etapas principales:

Prometafase temprana la cual es caracterizada por la fragmentación de la envoltura nuclear, la cual se ve facilitada por la fosforilación de determinados residuos de serina de las laminas (nombre genérico que reciben las distintas proteínas que forman la lámina nuclear) (Odde D. J., Gardner M. K. 2006; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

Durante la prometafase tardía cada cromosoma ensambla dos cinetocoros hermanos sobre el centrómero, uno en cada cromátida (Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

#### **1.2.1.1.2.3 Metafase**

Durante la metafase, cuando los cromosomas se encuentran alineados en la placa metafásica, existe un equilibrio de fuerzas provocado por los microtúbulos. Los

cromosomas avanzan hacia adelante y hacia atrás en forma oscilatoria ajustando constantemente su posición metafásica; es en esta etapa de la mitosis donde se da un punto de control del mismo (check point), este consiste en que la mitosis se detiene hasta que cada uno de los cinetocoros que contiene cada cromátida hermana no se encuentre unido a los distintos microtúbulos cinetocóricos que nuclean a partir de sus respectivos polos (Odde D. J., Gardner M. K. 2006; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

#### **1.2.1.1.2.4 Anafase**

La anafase es la etapa de la mitosis con menor duración, suele dividirse en dos etapas la anafase temprana y la anafase tardía:

La anafase temprana comienza cuando todos los cromosomas están correctamente anclados a los microtúbulos del huso (microtúbulos cinetocóricos) y alineados en la placa metafásica. Luego de esto, las proteínas que mantienen unidas ambas cromátidas hermanas denominadas cohesinas, son cortadas, lo que permite la separación de las cromátidas. Esto por medio de un enzima de nombre separasa. Estas cromátidas hermanas, que de ahora en adelante se denominan cromosomas hijos, son separados por los microtúbulos del cinetocoro mediante la despolimerización de los mismos (Alberts, B., *et al.* 2002; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

Posteriormente durante la anafase tardía, los microtúbulos polares (también llamados solapados) se alargan empujando a los centrosomas y con ello a los cromosomas hijos a los que están asociados mediante el huso mitótico, hacia los extremos opuestos de la célula (Alberts, B., *et al.* 2002; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

En cuanto aspectos moleculares durante la anafase temprana, un complejo proteico denominado APC (Anaphase Promotor Complex) o complejo promotor de la anafase, una ubiquitina, es activado el cual tiene como diana la proteína securina, la cual inhibe a su vez al enzima separasa, además, se da la degradación de la ciclina que forma parte del complejo M-Cdk, por lo que todos los

acontecimientos regulados por está empiezan a revertirse (Alberts, B., *et al.* 2002; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

#### **1.2.1.1.2.5 Telofase**

Es la etapa final de la mitosis, en este periodo los fragmentos de la envoltura nuclear se asocian en la periferia de las cromátidas, rodeándolas parcialmente, posteriormente se fusionan entre sí formando dos núcleos, cada uno corresponderá a una célula hija. La repolimerización de la envoltura nuclear es dirigida por fosfatasas que desfosforilan las proteínas laminas, lo que determina su reconstrucción. Así mismo la desfosforilación de las histonas iniciado en la fase anterior culmina por lo que los cromosomas se descompactan a cromatina, el nucléolo es visible en cada núcleo hijo en esta etapa, además, de reanudarse la síntesis de RNA (Odde D. J., Gardner M. K. 2006; Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007).

#### **1.2.1.1.2 Núcleo interfásico**

Las células eucariontes, por definición y en contra parte de las células procariontes, tienen un núcleo (Eu = verdadero y caryon = núcleo). El núcleo almacena la mayor parte del DNA de la célula, el cual está rodeado por una doble membrana. Se puede decir que el núcleo almacena el patrimonio genético de la célula. Su envoltura lo protege en contra del estrés ambiental, asegurando su reparación, así como su duplicación y transcripción, dicha membrana no es continua a lo largo del núcleo, sino que es interrumpida en ciertas regiones conocidas como poros nucleares (complejos macromoleculares), los cuales regulan la entrada y salida de sustancias entre el citoplasma y núcleo. La membrana externa del núcleo es continua con el retículo endoplásmico rugoso y en ocasiones, al igual que éste, tiene adheridos ribosomas; la membrana interna contiene proteínas específicas que la unen a la lámina nuclear la cual le da soporte a todo el núcleo. Al espacio que hay entre ambas membranas se le llama

espacio perinuclear el cual es contiguo con el lumen del retículo endoplásmico (Ver: Spector, D. L., 1993; Dundr, M., Misteli T., 2007; Alberts, B., *et al.*, 2002).

A diferencia del citoplasma, el cual cuenta con compartimentos bien delimitados, en el núcleo, las membranas no delimitan los compartimentos nucleares, a los cuales se les conoce mejor con el nombre de dominios. No obstante, tras décadas de estudios minuciosos, algunos dominios nucleares han sido morfológicamente y algunos incluso han sido funcionalmente caracterizados (Ver: Spector, D. L., 2001; Dundr, M., Misteli, T., Meaburn, K. 2007).

Un claro ejemplo de esto es el nucléolo, el cual a grosso modo es responsable de la síntesis del rRNA así como del ensamble de las subunidades ribosómicas. Dicha relación entre la estructura del nucléolo y su función ha sido relativamente bien estudiada y comprendida. Existen otros dominios dentro del núcleo algunos de los cuales han sido morfológicamente caracterizados, pero sus funciones son parcialmente comprendidas y en algunos otros casos su función es todavía desconocida. (Ver: Spector, D. L. 2001; Alberts, B., *et al.* 2002).

#### 1.2.1.2 Nucléolo

El nucléolo es considerado por la mayoría de los autores como el dominio nuclear más claro y prominente a observar dentro de cualquier célula eucarionte, el cual observado a través del Microscopio Electrónico de Transmisión muestra tres diferentes regiones, las cuales reflejan el proceso vectorial de biogénesis de los ribosomas: la primera región comprende unas estructuras pequeñas y ligeramente contrastadas llamadas, centros fibrilares (FC); las cuales a su vez están rodeadas por áreas de material densamente contrastado llamado, componente fibrilar denso (DFC); el cual está a su vez cubierto por una región que contiene muchas partículas, llamada el componente granular (GC) (Ver: Spector, D. L., 1993; Dundr, M., Misteli T., 2001; Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004).

El centro fibrilar contiene rDNA, RNA polimerasa I, y factores asociados a la transcripción; la transcripción del rDNA ocurre en los **FCs**, principalmente en la

periferia de dichas estructuras y el pre-rRNA transcrito es modificado en el **DFC** en un proceso cotranscripcional. El rRNA transcrito es procesado en el **DFC** por medio de la adición de aproximadamente 115 2'-O-metil ribosas y la conversión de 95 uridinas en pseudouridinas, aunque algunos pasos del procesamiento también pueden ocurrir en el **GC**, junto con el ensamble del rRNA dentro de las subunidades ribosómicas, de hecho las partículas que conforman el **CG** son partículas pre-ribosómicas en diferentes etapas de maduración así como de las distintas subunidades grandes y pequeñas que conforman los ribosomas eucariontes (Ver: Spector, D. L., 1993; Lamond I. A., Earnshaw C. W., 1998; Alberts, B., *et al.* 2002).

En pocas palabras la principal función del nucléolo es la transcripción y procesamiento del rRNA y el ensamble de las subunidades ribosómicas 28S, 18S, y 5.8S características de las células eucariontes. La formación del nucléolo es dependiente de la transcripción así como del ciclo celular; en la mayoría de las células eucariontes el nucléolo entero se disgrega durante la mitosis y vuelve a formarse en la telofase alrededor de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR), ya que el nucléolo es una estructura dinámica que se forma en respuesta a los requerimientos para la síntesis de nuevos ribosomas (Ver: Lamond A. I., Earnshaw, W. C., 1998; Agredano-Moreno, L. T., 1991).

### 1.2.1.3 Cromatina

La cromatina es un complejo desoxiribonucleoproteico, formado de DNA y proteínas; estas últimas a su vez se dividen en dos tipos: histonas y proteínas no histónicas. Existen cinco tipos de histonas con base en la abundancia de dos aminoácidos en particular, lisina y arginina. A las histonas con alto contenido de lisina se les denomina H1; las histonas con poca lisina H2A; las histonas moderadamente ricas en lisina H2B; y las histonas ricas en arginina H3 y H4. Estas proteínas tienen la peculiaridad de ser las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución entre los seres vivos (Ver: Alberts, B., *et al.*, 2002).

La cromatina de las células eucariontes se divide en dos grandes grupos, heterocromatina y eucromatina, esta clasificación está basada en el estado de condensación de la misma, durante la interfase (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004).

La heterocromatina es el tipo de cromatina más condensada en el núcleo interfásico y es por lo tanto transcripcionalmente inactiva. Estando normalmente localizada formando bandas alrededor de la periferia del núcleo y rodeando al nucléolo, además, se encuentra formando parches a lo largo del nucleoplasma. La heterocromatina o cromatina compacta a su vez es dividida en constitutiva y facultativa (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004).

La heterocromatina constitutiva es rica en secuencias altamente repetidas (por ejemplo secuencias de DNA satélite) las cuales están ordenadas en tandem y en mamíferos llegan a representar hasta el 10 % del total del genoma. La función de este tipo de cromatina en la célula en interfase es aún desconocida, incluye a los telómeros y centrómeros del cromosoma que no expresan su DNA. (Ver: Spector, D. L., 1993; Cremer, T., *et al.*, 2004; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

La heterocromatina facultativa consiste en cromatina potencialmente activa; es decir contiene regiones del cromosoma que pueden estar activas, en estado laxo, en algunos tipos celulares; e inactivas, compactadas en otros tipos celulares, dentro del mismo organismo, a diferencia de la heterocromatina constitutiva cuyas regiones están siempre compactadas en todas las células del organismo. La heterocromatina facultativa contiene información sobre todos aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento. Teniendo como principal ejemplo en las hembras de los mamíferos al corpúsculo de Barr, el cual resulta de la inactivación total y azarosa de uno de los dos cromosomas X. (Ver: Spector, D. L., 1993; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

La cantidad de heterocromatina presente en el núcleo varía de acuerdo a que tan activa sea la célula transcripcionalmente hablando; por ejemplo, poca heterocromatina está presente en células cancerígenas las cuales son



transcripcionalmente activas, mientras que el núcleo de células inactivas; por ejemplo un espermatozoide, está prácticamente lleno de cromatina condensada (Ver: Spector, D. L., 1993; Griffiths, F. A. *et al.*, 2000).

El otro tipo de cromatina, la eucromatina o cromatina laxa, se encuentra distribuida formando asas en la periferia de los cúmulos de heterocromatina, dichas asas se prolongan dentro del nucleoplasma, hacia el espacio intercromatiniano. Con esta disposición hace que la región que rodea a los cúmulos de heterocromatina sea donde radica la transcripción más activa, de acuerdo a los experimentos realizados por Fakan y Bernhard, en 1971, mediante autorradiografía ultraestructural, después de un marcado con uridina tritiada, se demostró que la síntesis de RNA se realiza en la cromatina laxa. Además, de que aquí se encuentran algunas partículas ribonucleoproteicas, las cuales están asociadas directamente con la transcripción, y procesamientos post-transcripcionales. Aproximadamente el 10 % de la cromatina que es transcripcionalmente activa está siempre en su forma laxa, eucromatina, comprendiendo aquellos genes que la célula necesita transcribir activamente, los llamados genes de mantenimiento (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Spector, D. L., 1993).

#### 1.2.1.4 Cuerpos Nucleares y Partículas Ribonucleoproteicas (no nucleolares)

El núcleo de las células eucariontes es un compartimiento celular en el cual se lleva a cabo una gran variedad de procesos biológicos, tal como la replicación y reparación del DNA, la expresión génica a través de la transcripción y el splicing, así como la modificación y degradación de algunas proteínas, por citar algunos ejemplos. Dicha variedad de materiales biológicos dentro del núcleo no está distribuido aleatoriamente. Por ejemplo, en la interfase cada cromosoma ocupa un territorio distinto y particular, sugiriendo que dicha organización juega un papel regulatorio en la expresión génica de los cromosomas. Además, existen regiones bien definidas como el nucléolo, y diferentes tipos de cuerpos nucleares

identificados a través del uso de herramientas citológicas e inmunohistoquímicas (Ver: Fakan, S. 2004; Hozák, P., Fakan S., 2006).

El rango de tamaño de dichos cuerpos nucleares va desde la décima parte de un micrómetro hasta varios micrómetros; y cada tipo puede ser fácilmente identificado inmunológicamente con anticuerpos contra proteínas características y específicas de cada cuerpo nuclear; u otros factores como los RNAs pequeños nucleares, (snRNAs) (Ver: Spector, D. L. 1990).

Cabe mencionar que la mayoría de estas estructuras fueron caracterizadas gracias a que la citoquímica ultraestructural permitió la localización de complejos de RNA y proteínas de tamaño menor a la décima parte de un micrómetro. El uso de un procedimiento preferencial para la tinción de ribonucleoproteínas (Bernhard, 1969), hidrólisis enzimáticas y extracciones químicas, permitió la clara demostración de la naturaleza ribonucleoproteica de varios componentes nucleares externos al nucléolo (Monneron y Bernhard, 1969). Entre ellas están: las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados. Posteriormente se encontraron otras estructuras nucleares que probablemente también contengan RNA, los cuerpos nucleares, y se identificaron las polipartículas, que son componentes RNP no nucleolares previamente descritos por procedimientos bioquímicos (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

#### 1.2.1.4.1 Fibras Pericromatinianas (FC)

Estas fibras fueron descritas por primera vez por Monneron y Bernhard en 1969 con la técnica de tinción preferencial de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) para ribonucleoproteínas. Se encuentran ubicadas en los bordes de los distintos grumos de cromatina compacta, región llamada pericromatiniana, de ahí su nombre. En 1989 Jiménez-García y colaboradores demuestran su presencia universal en animales, plantas y hongos. Tienen un diámetro de 3 a 5 nm y pueden prolongarse hasta el espacio intercromatiniano y suelen estar en

ocasiones entremezcladas con los gránulos pericromatinianos (en: Jiménez, G. et al., 2003; Agredano-Moreno, L. T. 1991; Monneron, A., Bernhard, W. 1969).

Dichas fibras pericromatinianas no son estructuras rígidas, por el contrario se les ha visto por medio de estudios bioquímicos y autorradiografía migrar hacia el espacio intercromatiniano, en dicho proceso el RNA que las constituye sufre un proceso de maduración. Se encuentran muchas veces asociadas con los gránulos pericromatinianos. (en: Falcón, B., T. 2006; Jiménez, G. et al., 2003).

Experimentos hechos por Fakan y colaboradores en 1975, demostraron que incorporan uridina tritiada inmediatamente, por lo cual las asociaron con los transcritos nacientes de hnRNA (RNA heterogéneo nuclear), además, de su idónea ubicación, cerca de la cromatina laxa o transcripcionalmente activa. Por lo que la cantidad de fibras pericromatinianas dentro del núcleo es un reflejo de la tasa de síntesis de pre-mRNA, como lo demuestran experimentos hechos por Fakan y Bernhard, en los cuales, se trabajó con hepatocitos de ratas a las cuales se les había extirpado la glándula adrenal, y dividido en dos grupos; al primero se le inyectó cortisol con lo que al analizar los núcleos de dichas células se encontró que la cantidad de FC variaba enormemente en comparación con el segundo grupo, al que no le habían administrado cortisol; con esto dedujeron que ahí se encontraba la RNA polimerasa II (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

#### 1.2.1.4.2 Gránulos Pericromatinianos (GPC)

Los gránulos pericromatinianos son estructuras ribonucleoproteicas, puesto que son EDTA positivas, descritas por primera vez por Watson en 1962, son cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro, procedentes del enrollamiento de las FPCs y rodeados por un halo característico de exclusión de cromatina de 25 nm que los hace fáciles de distinguir en las micrografías electrónicas; habitualmente están ubicados en el borde de los grumos de cromatina compacta, pero también se les puede ver en la región intercromatiniana, aunque de una manera escasa. Hay evidencias de que los gránulos pericromatinianos almacenan y transportan mRNA, hacia el citoplasma para ser traducidos a proteínas; comparaciones morfológicas, morfométricas y citoquímicas hechas por Vázquez-Nin y colaboradores en 1978

han demostrado que los GPC son estructuras prácticamente idénticas a los gránulos de los anillos de Balbiani, por eso se dedujo que ambos gránulos cumplían la misma función (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Monneron, A., Bernhard, W. 1969).

Los experimentos que ayudaron a dilucidar el papel citofisiológico de los GPC fueron de dos tipos; el primero utiliza factores físicos o químicos que alteran el metabolismo del RNA y el segundo emplea hormonas en los organismos para inducir variaciones reversibles en el metabolismo del RNA (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

Una serie de experimentos hechos por Vázquez-Nin y colaboradores en 1978 consistió en ovariectomizar ratas, a las cuales después, se les dividió en dos grupos, a uno de los cuales se les inyectaba estradiol de rápido metabolismo (hemisuccinato de  $17\beta$  estradiol), el grupo de células al que se le había inyectado el estradiol, después, de 15 minutos presentaba una clarísima disminución de los GPCs en comparación con las células estudiadas de los ejemplares ovariectomizados sin administrarles posteriormente el estradiol, cabe destacar que tanto el volumen nucleolar, así como la frecuencia de otras partículas RNPs, relacionadas directamente con el metabolismo del RNA, no se vieron afectadas. De estas observaciones se sugirió que la cantidad de GPCs está regulada por la relación entre la síntesis de RNA y su salida al citoplasma, y permitieron formular la hipótesis de que el estradiol tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión genética, regulando la velocidad del pasaje de los mRNAs del núcleo al citoplasma (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

De igual manera posteriormente se compararon la densidad numérica de los GPCs y el marcado autorradiográfico del núcleo y del citoplasma de células epiteliales de la próstata ventral, en ratas normales y castradas, sin y con un tratamiento con hemisuccinato de testosterona, se encontró que la frecuencia de

GPCs aumenta con la castración y disminuye media hora después de la administración de la hormona (en: Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003).

#### 1.2.1.4.3 Gránulos Intercromatinianos (GIC)

La mayoría de los genes en las células eucariontes se encuentran segmentados, por lo que al ser transcritos por la RNA polimerasa II, se transcriben en lo que se conoce como pre-mRNA o hnRNA (RNA pre mensajero o RNA heterogéneo nuclear, respectivamente), dicho transcrito primario como había de esperarse es del mismo tamaño que el gen del que procede, para que dicho transcrito pueda ser llevado al citoplasma y entonces traducido a su correspondiente polipéptido, por los ribosomas, tiene que ser procesado o madurado, en tres reacciones principales las cuales son: a) una metilación en el extremo 5', b) la poliadenilación en el extremo 3', c) el splicing, proceso en el cual se eliminan las secuencias no codificantes (intrones) y se unen las secuencias que se van a codificar para dar origen a un polipéptido. Para que se lleve a cabo el splicing se requieren varios factores entre ellos proteínas y varios tipos de RNA, la mayoría de dichos factores son almacenados por los GICs (Ver: Cremer, T., 2004; Jiménez-García, L. F., et al., 2007).

Los gránulos intercromatinianos son estructuras nucleares polimorfas y en ocasiones se les encuentra en forma continua con fibrillas, están organizadas generalmente en cúmulos, localizados en el espacio intercromatiniano de las células animales, tienen un diámetro promedio entre 20-25 nm; dichos gránulos están unidos entre si, por fibras, y fueron descritos por primera vez por Swift en 1963, con la técnica convencional para microscopía electrónica; posteriormente Bernhard con la técnica preferencial para RNPs comprueba la naturaleza ribonucleoproteica de dichos gránulos, los gránulos están compuestos de RNA de larga vida media como los UsnRNAs, los cuales están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los pre-mRNA y proteínas, por esta razón se propuso que los GICs son el almacén de la maquinaria de splicing (Ver: Mintz, P. J. et al., 1999; Monneron, A., Bernhard, W. 1969; Spector, D. L. 1996).

Los gránulos intercromatinianos poseen la mayoría de los factores proteicos y diferentes tipos de RNA involucrados en el splicing. Entre los principales constituyentes de estos gránulos están 5 partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNPs), conocidas como U1, U2, U4, U5 y U6, las cuales son complejos nucleoplásmicos de RNA y proteínas que funcionan como unidades del spliceosoma. También, se encuentran más de 200 factores de splicing, entre ellos las proteínas de la familia SR, las cuales tienen unidos segmentos de RNA así como proteínas con regiones ricas en Serina y Arginina de ahí su nombre; las cuales son necesarias para el reconocimiento de los intrones, y por lo tanto definen la región perteneciente a los exones, además, de ensamblar el spliceosoma. También hay evidencia de que son esenciales para el splicing alternativo. Los GICs “speckles” se dispersan cuando la célula entra en mitosis, pero las snRNPs y los factores proteicos del splicing se reagrupan en estructuras muy parecidas a las anteriores “speckles” durante la telofase, para luego ser importadas al núcleo de la célula hija (Ver: Lamond A. et al., 1998; Jiménez, G. LF., Merchant, H., 2003; Mintz, P. J. et al., 1999).

#### 1.2.1.4.4 Cuerpos de Cajal

Basados estrictamente en un criterio morfológico, los estudios ultraestructurales han caracterizado varios tipos de cuerpos nucleares, uno de ellos son los cuerpos espiralados o cuerpos de Cajal, los cuales pueden ser claramente identificados en distintas especies de plantas y animales. Estas estructuras se observan al microscopio electrónico como bolas de fibras enredadas de 0.15 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Matera, A. G., 1999; Lamond I. A., Earnshaw C. W., 1998).

Aunque su nombre deriva de estudios hechos en el microscopio electrónico, los cuerpos espiralados fueron originalmente identificados en el microscopio de luz a inicios del siglo XX, por Santiago Ramón y Cajal; quien los nombró como “cuerpos accesorios nucleolares”, su función en ese entonces no estaba muy clara, ya que su caracterización molecular comenzó a inicios de la década de 1990, y el número

de componentes celulares reportado desde entonces ha ido creciendo (Matera A. G., 1999).

Los cuerpos de Cajal (CBs, coiled bodies por sus siglas en inglés) son encontrados dentro del núcleo, a través, de la filogenia de plantas y animales. En las plantas, están presentes en todas las especies y en todas las células de cada especie en los ejemplares hasta la fecha examinados. En algunos tipos celulares de mamíferos, se encuentran presentes los CBs, mientras que en otro tipo celular pueden estar ausentes. Los CBs son asociados frecuentemente con el nucléolo, debido a que algunos componentes son comunes a ambas estructuras (Ver: Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004.).

Los CBs son estructuras EDTA positivas, y probablemente estén envueltas en el transporte y maduración de RNPs pequeños nucleares (snRNPs) (U1, U2, U3, U4, U5, U6) y RNP pequeños nucleolares (snoRNPs), así como en el almacenamiento de ambos, antes de aparecer en los GICs o el nucléolo, respectivamente. En particular, la modificación de nucleótidos dentro de los snRNAs del spliceosoma es regulada por pequeños RNAs específicos de los cuerpos espiralados (scaRNAs) (Ver: Shaw, J. P., Brown WS. J., 2004.).

Los cuerpos de Cajal están altamente enriquecidos en varios tipos de snRNPs, proteínas nucleolares y proteínas que controlan el ciclo celular, además, de diversos factores de transcripción basal. Sin embargo, el único epítipo reportado a la fecha que puede ser usado como un marcador inequívoco para los CBs es una proteína llamada p80 coilina (Ver: Matera A. G., 1999).

Dichas partículas son continuas con las fibras pericromatinianas, y suelen estar cerca del nucléolo o de la envoltura nuclear pero, en la mayoría de los casos se encuentran en la región intercromatiniana, además, la abundancia de los cuerpos espiralados está asociada con un metabolismo alto de la célula (en: Agredano-Moreno, L. T. 1993).

#### 1.2.1.4.5 Polipartículas

Las polipartículas son complejos ribonucleoproteicos, por lo tanto son EDTA positivas, y están formadas por partículas con un coeficiente de sedimentación de 30S de una unidad de mRNA repetida múltiples veces, para formar lo que en el microscopio electrónico parece una estructura semejante a cuentas ensartadas en un hilo. También son conocidas como informóferos, y tienen un tamaño aproximado de 25 nm la principal característica de estas estructuras es que tienen tanto RNA mensajero como pre-mensajero, debido a que son de alto peso molecular y contienen una secuencia de poli-A en el extremo 3' y de marcado rápido. En un estudio de complejos transcripcionales se determinó que las moléculas de pre-mRNA aún unido a la matriz de DNA por RNA polimerasa, se unen a otras proteínas formando estructuras granulares de 20 a 35 nm, las cuales se encuentran relacionadas con las FCs y con los GIC, demostrando así la existencia de una migración de los factores de splicing hacia los lugares donde se activa la transcripción (Falcón, B. T., 2002).

### 1.2.2 Modelo Experimental

#### 1.2.2.1 Células HeLa

Las células HeLa constituyen una línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical, y las primeras células humanas de las cuales se estableció una línea celular permanente. Dichas células proceden de una intervención quirúrgica practicada a una paciente afroamericana de nombre Henrietta Lacks (de ahí el nombre), en la cual se extrajeron células de un carcinoma en el útero con la intención de evaluar su malignidad. La paciente falleció 8 meses después a causa de su tumor (Macville, M., *et al.* 1999).

Las células extraídas fueron invadidas por el virus del papiloma humano 18 (HPV18), transformándose en células tumorales (Macville, M., *et al.* 1999).



Aquellas células se dejaban cultivar tan bien, y proliferaban tan fácilmente en cultivos celulares, que desde entonces comenzaron a ser empleadas a gran escala en la investigación (Macville, M., *et al.* 1999).

La transferencia horizontal de genes del papilomavirus18 (HPV18) a células cervicales humanas crearon el genoma tan característico de las células HeLa el cual se diferencia claramente del genoma parental en varios aspectos incluyendo el número de cromosomas, según el análisis de SKY arroja que las células HeLa son hipertriploides (3n+) conteniendo un número total de entre 76 y 80 cromosomas y 22 a 25 cromosomas anormales por célula, entre los que se incluyen 4 copias del cromosoma 12 y tres copias de los cromosomas 6, 8 y 17 (Macville, M., *et al.* 1999).

#### 1.2.2.2 Hibridación *in situ* Ultraestructural

La técnica de Hibridación *in situ* fue desarrollada en 1969 por Gall y Pardue e independientemente por Jonh y colaboradores, en el mismo año. Gall y colaboradores describieron una técnica que formaba híbridos moleculares entre RNA y DNA. La técnica se llevó a cabo en ovocitos de *Xenopus laevis*, hibridando rRNA con rDNA extracromosomal. Detectaron la localización diferencial en las células, de los híbridos de ácidos nucleicos ha distintos estadíos. En ese momento la única forma de marcaje eran los radioisótopos, por lo que se usó tritio para el experimento y la forma de detección fue por autoradiografía (Vázquez Nin, G., *et al.* 2000; Segura Valdez, L. *et al.* 1997).

En la actualidad la hibridación *in situ* ha contribuido a originar una disciplina que denominamos citoquímica molecular moderna la cual incluye a la inmunolocalización. La parte innovadora de esta nueva disciplina es la detección de sustancias celulares con un grado de especificidad nunca antes logrado. De esta manera podemos saber de manera precisa la ubicación de determinadas moléculas dentro de la célula, generalmente ácidos nucleicos y proteínas. Con ello podemos estudiar la relación espacio-temporal existente entre ácidos nucleicos y

proteínas, dilucidando así, aspectos de la expresión génica *in situ* (Vázquez Nin, G., et al. 2000; Segura Valdez, L. et al. 1997).

La hibridación de ácidos nucleicos es quizás el método más poderoso para localizar, así como, cuantificar secuencias de DNA o RNA específicas, dentro de una célula. Esta técnica se basa en la peculiaridad de los ácidos nucleicos en formar una doble cadena entre dos hebras de secuencia complementaria. Dichas reasociaciones de hebras de secuencia complementaria puede ser llevada a cabo empleando sondas de DNA o RNA; siendo recomendable en la medida de lo posible el empleo de sondas de DNA, dadas las características químicas de éste, destacando la estabilidad de dicha molécula ante hidrólisis enzimáticas. (Vázquez Nin, G., et al. 2000).

El marcado de las sondas que se emplearán, se realiza incorporando un nucleótido generalmente marcado ya sea con Biotina o Digoxigenina, aunque también puede darse mediante la incorporación de un átomo radioactivo, lo cual le resta precisión a la técnica, esto en cuanto a la ubicación precisa de la sonda (Segura Valdez, L. et al. 1997).

Una vez que se tiene la sonda marcada, el siguiente paso es la desnaturalización de la misma en dos hebras; esto con la finalidad de permitir el reconocimiento de las secuencias complementarias en el corte ultra fino del material en estudio. Dependiendo del caso, si lo que se busca es DNA en la muestra, éste debe ser desnaturalizado previamente, además, de ser tratado con RNAsas para evitar señal inespecífica; pero si lo que se busca es RNA, no hace falta desnaturalizar (Vázquez Nin, G., et al. 2000; Segura Valdez, L. et al. 1997).

Posteriormente ya que se ha dejado hibridar la sonda con los cortes de material a estudiar, sigue el proceso de localizar la sonda la cual puede hacerse con un anticuerpo que reconozca la Biotina o Digoxigenina empleada para marcar la sonda, en el caso de la Biotina suele emplearse estreptoavidina, un compuesto que presenta una gran afinidad por la Biotina, la cual esta acoplada a granos de

oro coloidal de diámetro específico, haciendo entonces la sonda visible al microscopio electrónico (Vázquez Nin, G., *et al.* 2000).

### 1.2.2.3 Cromosomas Acrocéntricos

Un cromosoma acrocéntrico es aquel cromosoma en el que el centrómero o constricción primaria, se encuentra más cercano a uno de los telómeros, dando como resultado un brazo muy corto denominado p, del francés petit; y el otro largo denominado q por convención a la letra siguiente.

De los 23 pares de cromosomas humanos el cromosoma 13, 14, 15, 21 y el 22 son acrocéntricos teniendo como peculiaridad que poseen las regiones organizadoras nucleolares. En la siguiente tabla se ejemplifican algunas de las principales características de los 5 cromosomas acrocéntricos.

Tabla 1 Características generales de los cromosomas acrocéntricos.

<b>Cromosoma</b>	<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>		<b>21</b>		<b>22</b>	
<b>Longitud</b>	114,127, 980 bps		106, 360,585 bps		100, 338,915 bps		46,944,323 bps		49, 528,953 bps	
<b>Total de Genes</b>	924		1,347		921		578		1,092	
<b>Transcritos no Codificantes</b>	303		270		55		226		291	
<b>rRNA Genes</b>	10		11		7		3		2	
<b>snRNA</b>	28		42		47		11		17	
<b>snoRNA</b>	14		61		106		7		7	
<b>tRNA</b>	15		36		27		3		3	
<b>Total de Proteínas Codificadas</b>	316		624		622		224		446	
	conocidas	nuevas	conocidas	nuevas	conocidas	nuevas	conocidas	nuevas	conocidas	nuevas
	276	40	381	243	460	162	215	9	400	46
<b>Pseudogenes</b>	<b>305</b>		<b>453</b>		<b>244</b>		<b>128</b>		<b>355</b>	

Datos tomados de las páginas Web al 15 de Mayo del 2011.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>;  
[http://vega.sanger.ac.uk/Homo\\_sapiens/index.html](http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html); [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/index.html](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)

### 1.2.2.3.1 Cromosoma 22

El cromosoma 22 del genoma humano es el segundo cromosoma, más pequeño, representa entre el 1.5 y el 2% del total del genoma, en 1999 los investigadores del Proyecto del Genoma Humano anunciaron que se había secuenciado dicho cromosoma en su totalidad, convirtiéndolo en el primero en ser secuenciado totalmente (Dunham I, *et al.* 1999).

La siguiente tabla contiene un resumen de los principales genes ubicados en el cromosoma 22 de acuerdo al artículo de Dunham y colaboradores de 1999 en el que se publica la secuencia total de dicho cromosoma.

Tabla 2 Principales genes del Cromosoma 22

Locus	Genes	Descripción	Enfermedad
22q11.1- q11.2	IGL@	Cadenas ligeras de anticuerpos	
22q11.21	TBX1	Proteína T-box 1 (factor de transcripción)	
22q11	RTN4R	Receptor para una glicoproteína reticulon 4, oligodendrocytemyelin	Esquizofrenia
22q11.21- q11.23	COMT	Catecol-O-metil tranferasa	Degrada catecolaminas (dopamina, epinefrina, norepinefrina)
22q12.1- q13.1	NEFH	Proteína componente de los neurofilamentos	
22q12.1	CHEK2	Kinasa detiene ciclo celular al detectar un daño en DNA	
22q12.2	NF2	Proteína de anclaje entre el citoesqueleto y la membrana celular	neurinoma del acústico (tumor)
22q13	SOX10	Factor de transcripción SRY (sex determining region Y)-box 10	

## 1.3 Objetivos

- Determinar la distribución de los transcritos que se producen a partir de genes del cromosoma 22.

¿Se agrupan y ocupan un espacio tridimensional definido dentro del núcleo celular o se mueven a través del espacio intercromatiniano hacia otros dominios para procesamientos posteriores?

- Determinar las estructuras ribonucleoproteicas a las que se asocian estos transcritos.
- Ubicar una región determinada en la cual se distribuyen los transcritos primarios.
- Afinar los detalles necesarios para un estudio posterior en el cual se empleen sondas de genes específicos.

## 1.4 Metodología

### 1.4.1 Cultivo Celular

Se cultivaron células HeLa en una incubadora celular bajo las siguientes condiciones; temperatura 37°C, 5% CO<sup>2</sup> y 95% O<sup>2</sup>, el medio empleado para el cultivo celular fue Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), el cual tenía como factor de crecimiento suero fetal bovino al 10%, además, de glutamina al 3%; una vez que las células estaban en estado confluyente, eran despegadas con una mezcla de tripsina que contenía EDTA, para luego ser pasadas con ayuda de una pipeta a tubos eppendorf de 1.5 mL, donde eran centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos para retirar el medio de cultivo, e inmediatamente se le agregaba la solución fijadora correspondiente.

## 1.4.2 Obtención de las Muestras

Se utilizaron cultivos de células HeLa en monocapa, los cuales fueron despegados mediante la adición de tripsina, después de esto, las células fueron trasladadas con ayuda de una pipeta a tubos eppendorf de 0.5 mL y centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos; después era retirado el sobrenadante y agregada la solución fijadora de la siguiente manera; las muestras se dividieron en dos grupos. Las células contenidas en el primer grupo se fijaron con una solución de Glutaraldehído al 2.5% en un buffer o amortiguador de fosfatos salino, PBS a pH 7.3, siendo este procesamiento ideal para la inclusión en resina Epóxica.

Las células contenidas en el segundo tubo se fijaron con una mezcla de Paraformaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0.5% en un buffer de fosfatos a pH 7.3, siendo este procesamiento ideal para incluir en resina Acrílica (Lowicryl K4M).

## 1.4.3 Procesamiento de las Muestras

Una vez terminado el proceso de fijación, las células de ambos grupos eran centrifugadas a 700 rpm para formar un pellet y poder retirar la solución fijadora, después fueron sometidas a tres lavados de PBS de 10 minutos cada uno. Las células contenidas en los eppendorf correspondientes al primer grupo, fueron deshidratadas gradualmente con etanol a distintas concentraciones 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% durante 5 minutos con cada alcohol, para finalizar la deshidratación se les colocó alcohol absoluto (100%) por tres ocasiones con una duración de 5 minutos cada una. Después, se les colocó óxido de propileno al 100% y se realizaron con éste tres cambios de 5 minutos cada uno, a continuación del último cambio de óxido de propileno, se colocaron en una solución de óxido de propileno y resina epóxica 1:1 y permanecieron ahí a temperatura ambiente durante 2 días proceso llamado preinclusión. Por último las muestras se incluyeron en una resina epóxica y se polimerizaron en una estufa a 60 °C todo el fin de semana.

Por otro lado las células contenidas en los eppendorf correspondientes al segundo grupo, fueron deshidratadas gradualmente con metanol a distintas concentraciones 30% y 50% durante 10 minutos con cada alcohol, a 4 °C; posteriormente en metanol al 70% durante 10 minutos a una temperatura de -20 °C y por último en metanol al 80% y 90% durante media hora cada uno a una temperatura de -20 °C; luego se sometieron a una mezcla de metanol al 90% y Lowicryl 1:1 durante una hora a una temperatura de -20 °C, posteriormente se sometieron a una mezcla de metanol al 90% y Lowicryl 1:2 durante una hora a una temperatura de -20 °C y por último a una solución de lowicryl absoluta donde permanecieron dos días a una temperatura de -20 °C. Por último se incluyeron en una cámara UV a una temperatura de -20 °C durante dos días.

#### 1.4.4 Preparación de las Muestras para su Observación

De las células incluidas en Epón se obtuvieron cortes semifinos de 200-250 nm de espesor, con ayuda de un ultramicrotomo LEICA ultracut R, dichos cortes fueron fijados por calor sobre portaobjetos y teñidos con azul de toluidina, posteriormente se observaron en un microscopio óptico Zeiss con el objetivo de 40X, para seleccionar el área de mayor interés, para luego retallar la cara del bloque, delimitando un área precisa, y facilitar así la obtención posterior de cortes ultrafinos.

Una vez delimitada la cara del bloque se procedió a sacar los cortes ultrafinos de 60 o 70 nm de espesor (color gris a plateados) en el mismo ultra microtomo, dichos cortes se montaron en rejillas de cobre de 3.05 mm de diámetro y de mesh abierto, recubiertas anteriormente con una membrana de formvar.

Las rejillas que contenían los cortes se contrastaron por flotación, utilizando la técnica convencional para microscopía electrónica, en una cámara húmeda que contenía lentes de hidróxido de sodio; primero permanecían flotando en acetato de uranilo alcohólico al 3% durante 20 minutos, enseguida eran retiradas y enjuagadas por goteo con ayuda de una pisseta con agua bidestilada para luego flotarlas nuevamente en citrato de plomo al 0.3% durante 10 minutos, para finalizar



se enjuagaban nuevamente por goteo con agua bidestilada y se ponían a secar en papel filtro dentro de una caja petri para evitar que se contaminaran.

Posteriormente todas las rejillas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operando a 80 KV, a diferentes aumentos para localizar las rejillas y las zonas de interés para el presente trabajo.

Se seleccionaron las mejores rejillas en cuanto a espesor de los cortes montados y limpieza de la técnica de contraste, luego se tomaron micrografías electrónicas a distintos aumentos, para el registro de dichas imágenes se empleó la cámara MTI modelo CCD-300-RC y se utilizó el programa Scion Image for Windows para TEM camera, las imágenes obtenidas se guardaron en una carpeta en formato TIF.

En cuanto a las células incluidas en resina acrílica, en las cuales se realizó la hibridación *in situ* ultraestructural, se obtuvieron de igual manera cortes semifinos de 200-250 nm de espesor, con ayuda de un ultramicrotomo LEICA ultracut R, dichos cortes fueron fijados por calor sobre portaobjetos y teñidos con azul de toluidina, posteriormente se observaron en un microscopio óptico Zeiss con el objetivo de 40X, para seleccionar el área de mayor interés, para luego retallar la cara del bloque, delimitando un área precisa, y facilitar así la obtención posterior de cortes ultrafinos.

Ya delimitada la cara del bloque se procedió a sacar los cortes ultrafinos de 60 o 70 nm de espesor (color gris a plateados) en el mismo ultra microtomo, dichos cortes se montaron en rejillas de oro de 3.05 mm de diámetro y de mesh abierto, recubiertas anteriormente con una membrana de formvar.

La hibridación *in situ* se realizó de la siguiente manera; primero se preparaban las mezclas de hibridación; que consistían en la mezcla A, la cual contenía 2.5  $\mu$ L de la sonda marcada (cromosoma 22), 2.5  $\mu$ L de formamida y 0.5  $\mu$ L de tRNA de *Escherichia coli*; la mezcla B que contenía 1  $\mu$ L de Sulfato de Dextrán al 50%, 1  $\mu$ L de BSA y 0.5  $\mu$ L de buffer 20XSSC.

Posteriormente la rejilla de oro que contenía los cortes de material incluido en resina acrílica, se puso a hibridar por flotación en una cámara húmeda que contenía la mezcla de hibridación (mezclas A y B), durante 5 horas a 42 °C; al termino de las 5 horas se lavaba en cuatro ocasiones por 5 minutos cada uno en buffer 4X SSC; posteriormente seguía el proceso de revelado, el cual consistía en flotar la rejilla en una solución de estreptoavidina acoplada a oro coloidal 10 nm/ 4XSSC (1:10) e incubar 18 horas a 4 °C, al terminar, las rejillas eran sometidas a 4 lavados de 5 minutos cada uno en buffer 4X SSC, después se lavaba por goteo con buffer de fosfatos PBS a pH 7.3 y al terminar con agua bidestilada.

Posteriormente se contrastaba por flotación en una cámara húmeda durante 6 minutos con Acetato de Uranilo alcohólico al 3%, para después ser observada en el microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-1010 operando a 80 KV, a diferentes aumentos para localizar las rejillas y las zonas de interés.

Se seleccionaron las mejores rejillas en cuanto a espesor de los cortes montados, la limpieza de la técnica de contraste y la señal de la hibridación *in situ* ultraestructural, luego se tomaron micrografías electrónicas a distintos aumentos, para el registro de dichas imágenes se empleó la cámara MTI modelo CCD-300-RC y se utilizó el programa Scion Image for Windows para TEM camera, las imágenes obtenidas se guardaron en una carpeta en formato TIF.

## 1.5 Resultados

Los núcleos de células HeLa, presentan una forma irregular (Fig. 1), con una distribución de la heterocromatina en la periferia del mismo, así como pequeñas prolongaciones hacia el interior del núcleo (Figs. 3, 4, 5, 7 y 8) como lo demuestran las micrografías tomadas de material contrastado mediante una técnica específica para DNA (amina de osmio) (Figs. 7 y 8) cabe mencionar que dichas franjas de cromatina son muy delgadas debido a que por tratarse de una célula de tipo cancerígeno la cantidad de cromatina compacta es mínima. A bajos aumentos destaca un ambiente fibrogranular, el cual predomina a lo largo del núcleo (Fig. 2). El dominio más conspicuo corresponde al nucléolo (Figs. 1, 2, 3), el cual como habría de esperarse en una célula cancerígena es de gran tamaño, ocupando un gran volumen del núcleo y en ocasiones presentando más de dos estructuras por núcleo (Fig. 9), esto debido a su intensa actividad en la síntesis de ribosomas. En cuanto a su morfología presentan un nucléolo característico, con sus tres regiones claramente delimitadas (Fig. 4), primero están los centros fibrilares (FC), una región clara, que a su vez está rodeada por una región electrodensa denominada el componente fibrilar denso (DFC) y por último en la periferia del nucléolo apreciamos el componente granular (GC). Con respecto a los demás dominios, vemos poca presencia de gránulos pericromatinianos (Figs. 5 y 10), así como de gránulos intercromatinianos (Figs. 6 y 9); este aspecto atribuible sin duda a la intensa actividad transcripcional característica de esta línea celular. Cabe aclarar que los gránulos intercromatinianos presentan un patrón difuso, característico de una célula con un metabolismo elevado, lo cual los hace más difícil de apreciar al microscopio electrónico. El ambiente fibrogranular predominante en el nucleoplasma, corresponde a múltiples franjas de cromatina en un grado de compactación tal, que las hace visibles mediante una técnica de contraste específica (Figs. 7 y 8), además, de unos pocos gránulos pericromatinianos, así como unos cúmulos de gránulos intercromatinianos difíciles de apreciar (Figs. 6 y 9).

En cuanto a la distribución de los transcritos primarios del cromosoma 22, se observa como la hibridación de la sonda está prácticamente restringida a las inmediaciones de regiones del núcleo ligeramente electrondensas (Figs. 10, 13, 14), las cuales no serían más que pequeños manchones de cromatina en un estado de compactación adecuado tanto para la transcripción activa, así como para ser visibles mediante la técnica de contraste empleada (Acetato de Uranilo y Citrato de plomo), lo cual confinaría el área de distribución de los transcritos a la periferia de los manchones de cromatina de los cuales están siendo transcritos (Figs. 10, 12, 13 y 14). De igual manera encontramos señal dentro del nucléolo, (Fig. 11) esto debido al tipo de genes que se encuentran en dicho cromosoma, ya que como se detalla en la tabla 1, era de esperar respuesta en el nucléolo, ya que en este dominio es donde se da la transcripción del rRNA, así como la síntesis de distintas moléculas de tRNAs, y snoRNAs, cuyos genes se encuentran presentes en el cromosoma 22, así mismo encontramos hibridación por parte de la sonda en lo que sería gránulos pericromatinianos (Fig. 10) dada la naturaleza de ser sitios de almacén de mRNAs de tales estructuras; de igual forma se observa señal de hibridación en lo que correspondería a un patrón difuso de los cúmulos de gránulos intercromatinianos (Fig. 9), esto debido a la presencia de snRNAs en dichas estructuras, así como, la presencia de los genes a partir de los cuales son transcritos en el cromosoma estudiado.

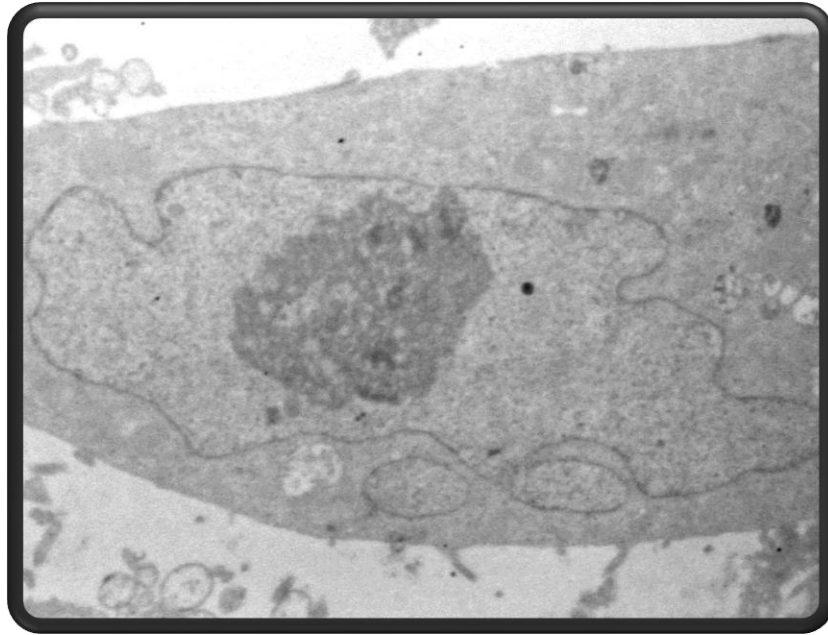


Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión donde se muestra a bajos aumentos el núcleo de una célula HeLa, nótese que hay muy poca heterocromatina, característico de las células cancerosas, 18 000 X.

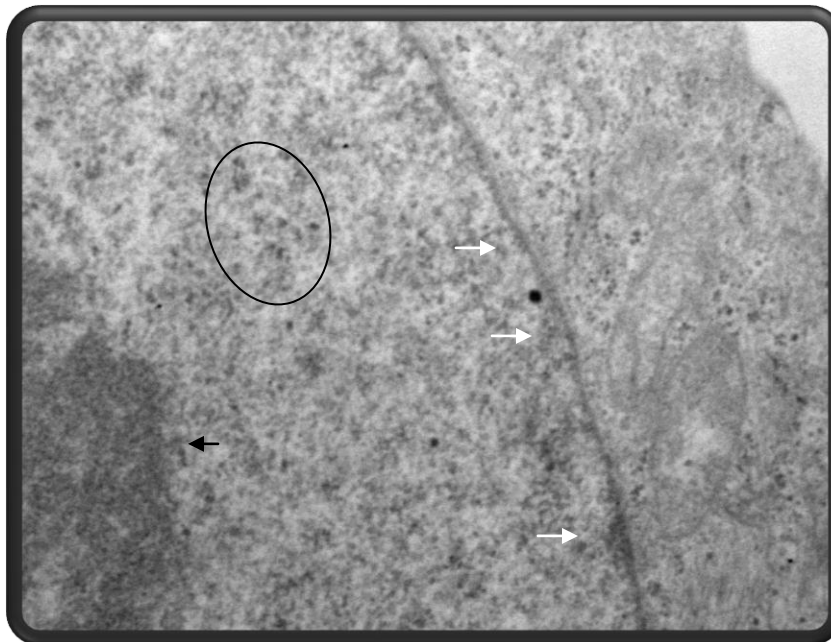


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión, se logra apreciar una parte del nucléolo (flecha negra) y un ambiente fibroso (elipse), una pequeña franja de heterocromatina adosada a la cara interna de la envoltura nuclear (flechas blancas), 25 000 X.

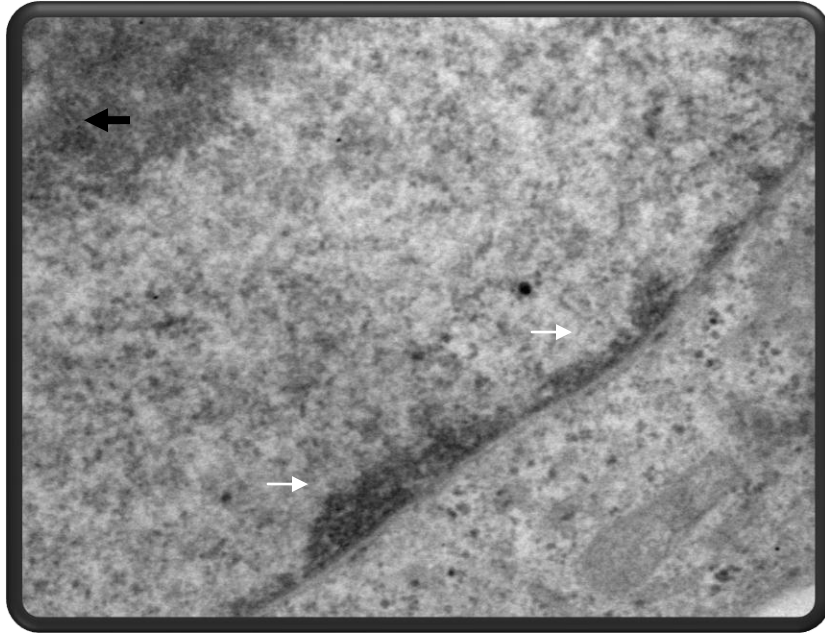


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión, donde se muestra una delgada franja de heterocromatina adosada a la membrana interna de la envoltura nuclear (flechas blancas) y una parte del nucléolo (flecha de negra), 30 000 X.

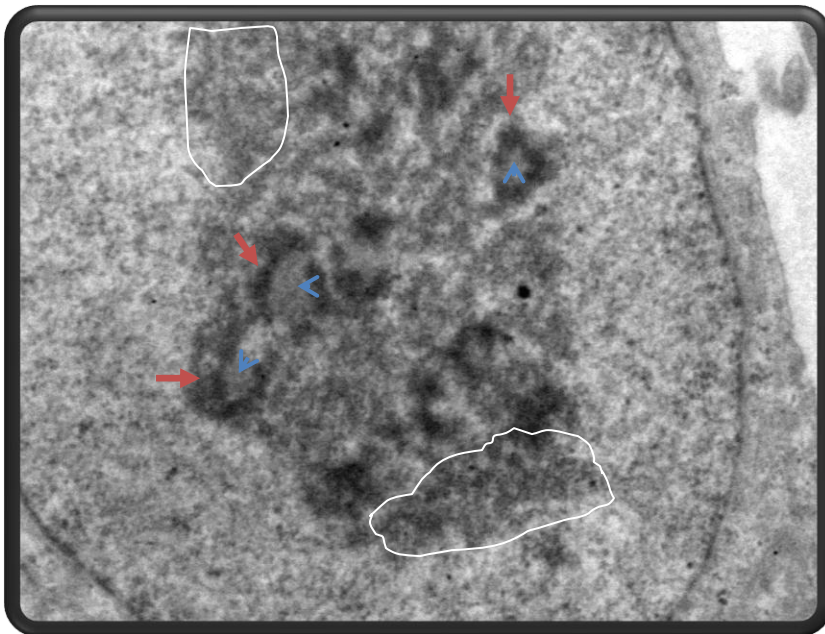


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión donde se muestra el nucléolo, se aprecian sus tres regiones características, centros fibrilares (cabezas de flecha), componente fibrilar denso (flechas) y componente granular (franja blanca), 20 000 X.

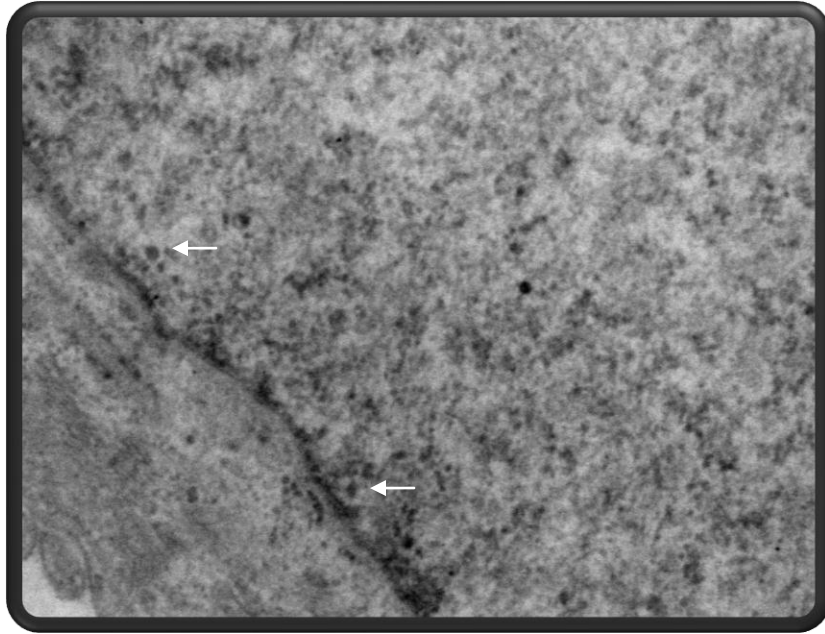


Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión, donde se hace un acercamiento al ambiente fibroso apreciado en las micrografías pasadas, se logran ver gránulos pericromatinianos (flechas blancas), 40 000X.

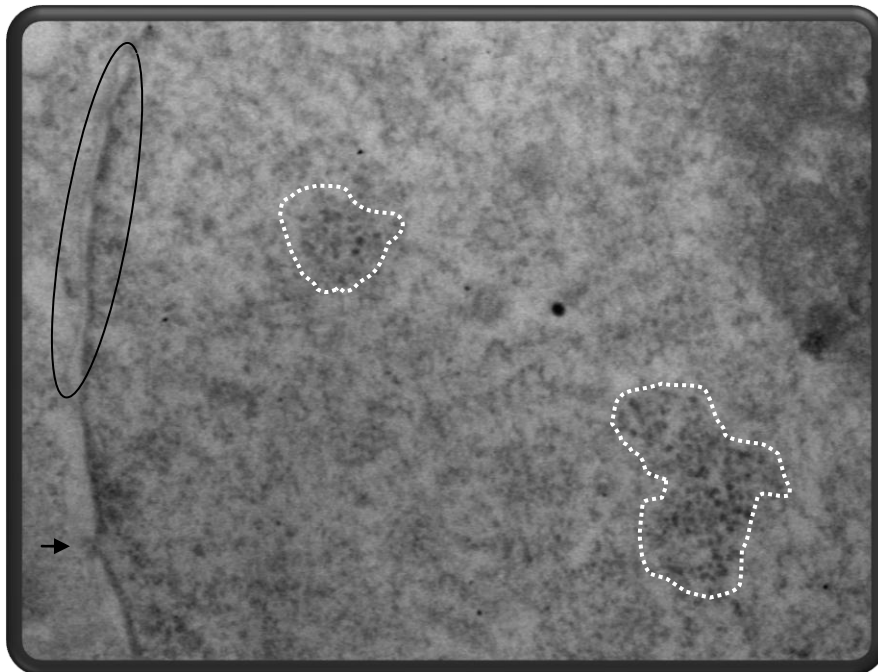


Figura 6. Electrónmicrografía, donde se muestra dos cúmulos de Gránulos intercromatinianos (franjas punteadas), se logra apreciar un poco de heterocromatina adosada a la membrana interna de la envoltura nuclear (elipse negra), y se observa un pro nuclear (flecha), 20 000X.

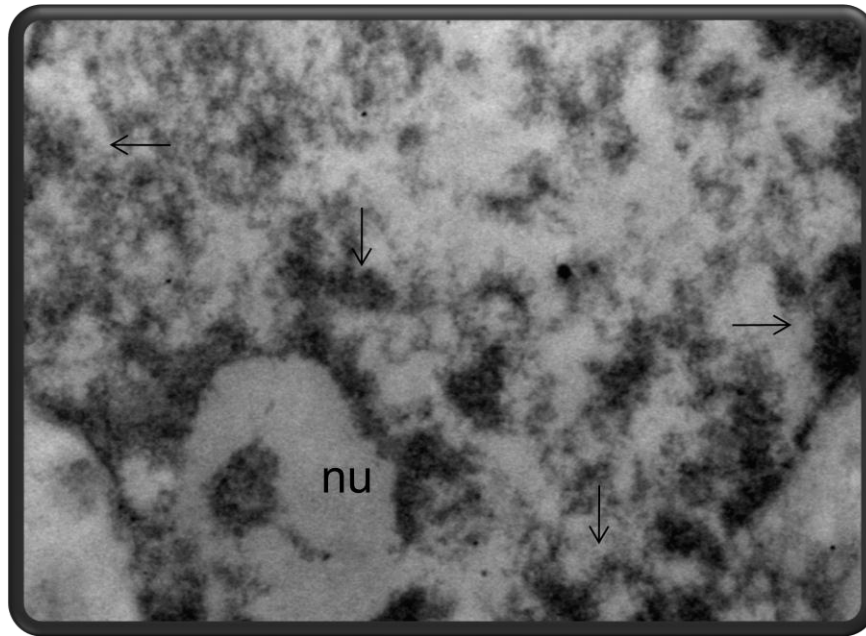


Figura 7. Electronmicrografía de un núcleo de célula HeLa, contrastado por una técnica específica para DNA. Obsérvese la distribución de la cromatina, las regiones más electrón-densas corresponden a un grado de compactación de la cromatina mayor, 25 000X.

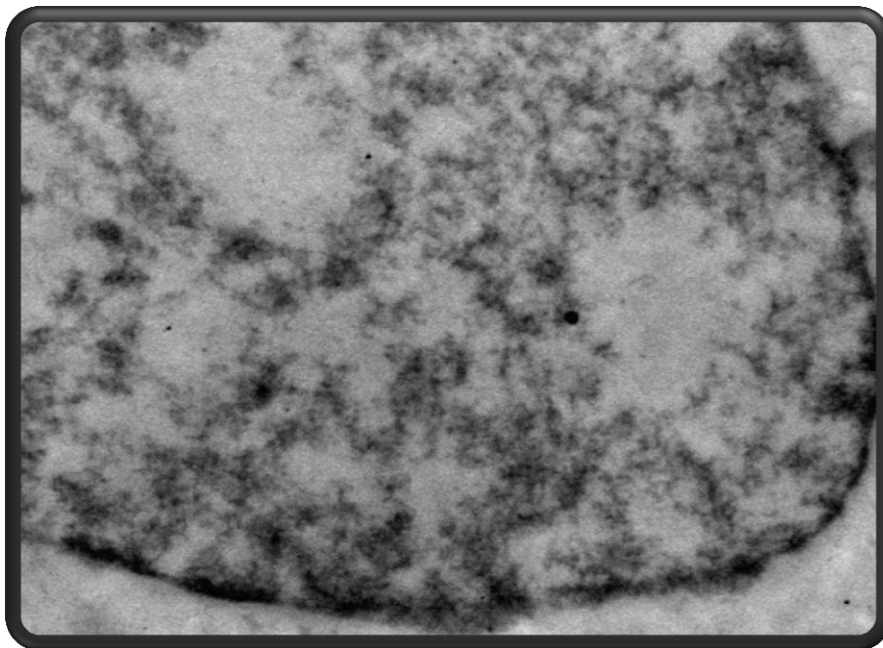


Figura 8. Micrografía electrónica de un núcleo de célula HeLa. Se muestra la peculiar distribución de la cromatina mediante una técnica específica 25 000X.



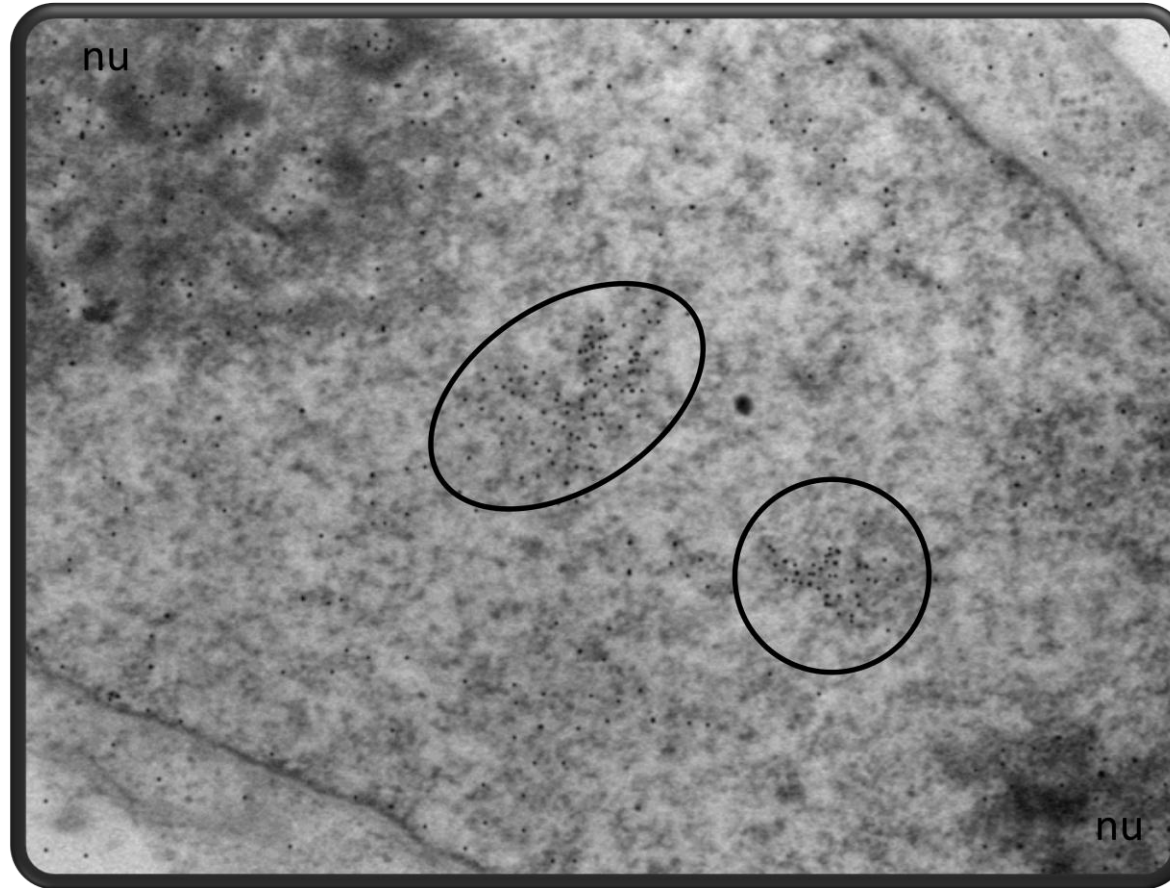


Figura 9. Electrónmicrografía, donde se muestra la localización de transcritos primarios en un núcleo de célula HeLa mediante la técnica de hibridación *in situ* ultraestructural; usando sondas de 500 nucleótidos de longitud del cromosoma humano 22 completo. Nótese que hay zonas donde se concentra la marca de oro coloidal (elipses), dichas zonas corresponden a cúmulos de gránulos intercromatinianos, también se aprecia una señal fuerte en ambos nucléolos (nu), 20 000X.

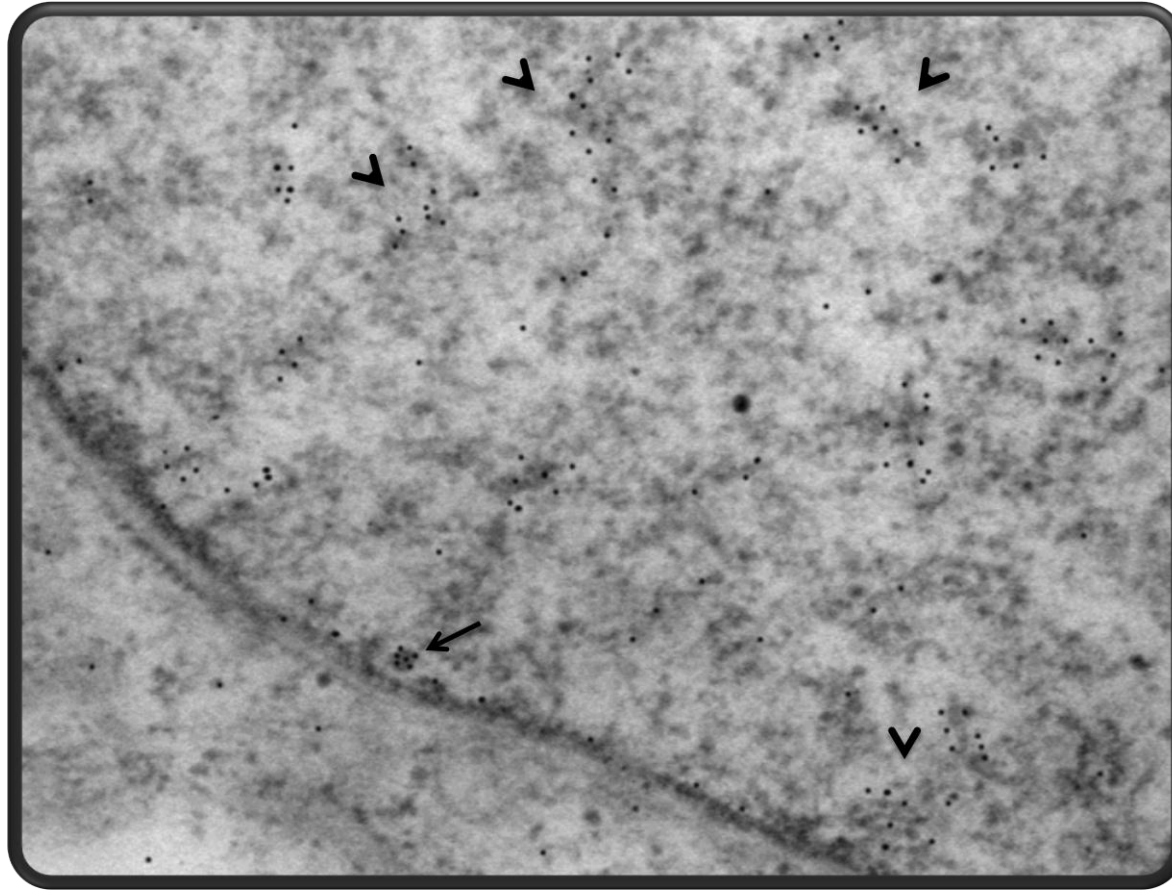


Figura 10. Micrografía electrónica de transmisión, se muestra la localización de transcritos primarios procedentes del cromosoma 22 en un núcleo de célula HeLa mediante la técnica de hibridación *in situ* ultraestructural; donde se aprecia como dichos transcritos se asocian a la periferia de los manchones de heterocromatina de los cuales proceden (cabezas de flecha), de igual manera se observa una fuerte señal sobre un gránulo pericromatiniano (flecha), 40 000X.

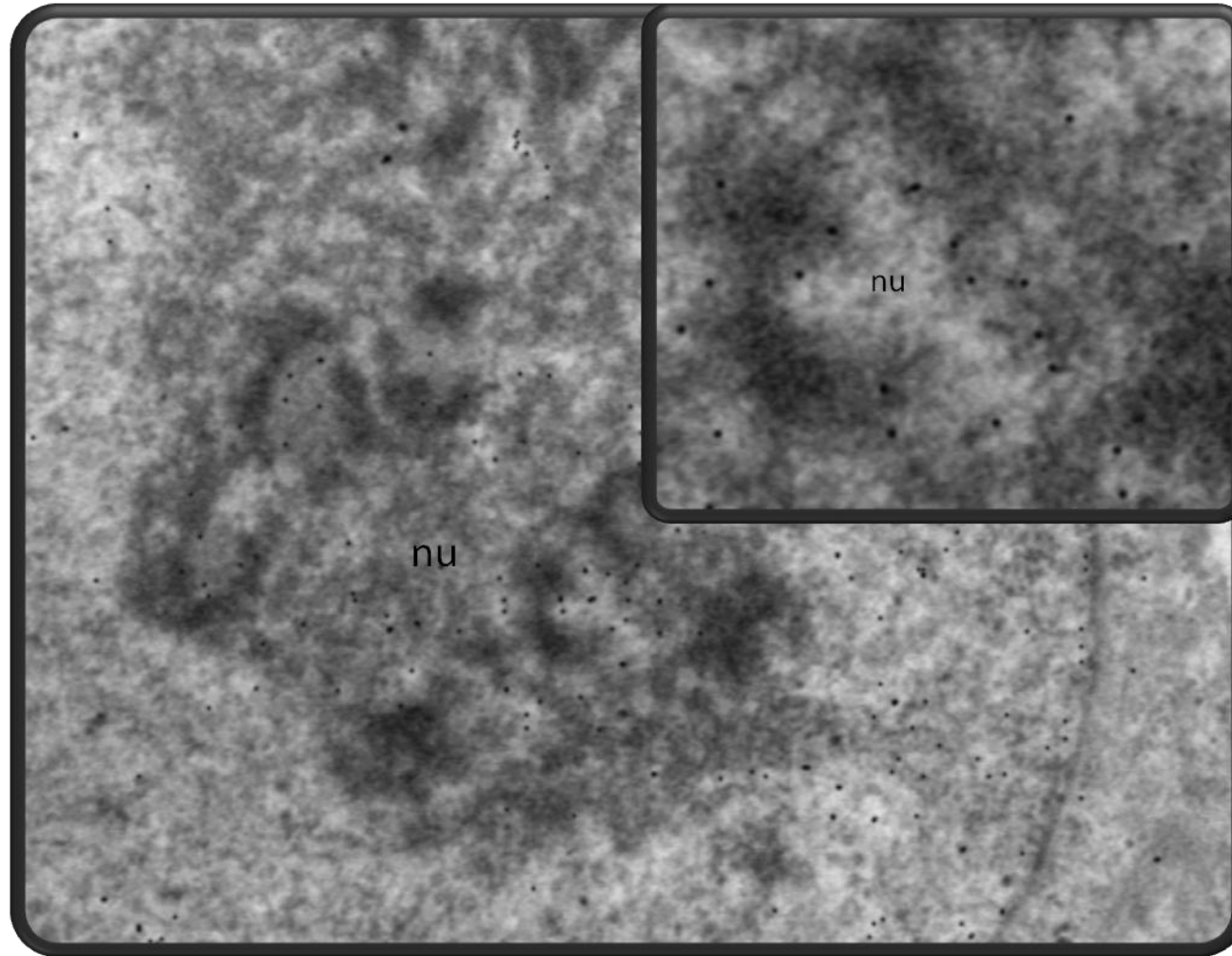


Figura 11. Electrónmicrografía, donde se encuentran transcritos primarios del cromosoma 22 en un núcleo de célula HeLa; como era de esperarse se observa una fuerte señal dentro del nucléolo, asociado al componente fibrilar denso del mismo, 20 000X, el recuadro muestra un acercamiento de un centro fibrilar 60 000X.

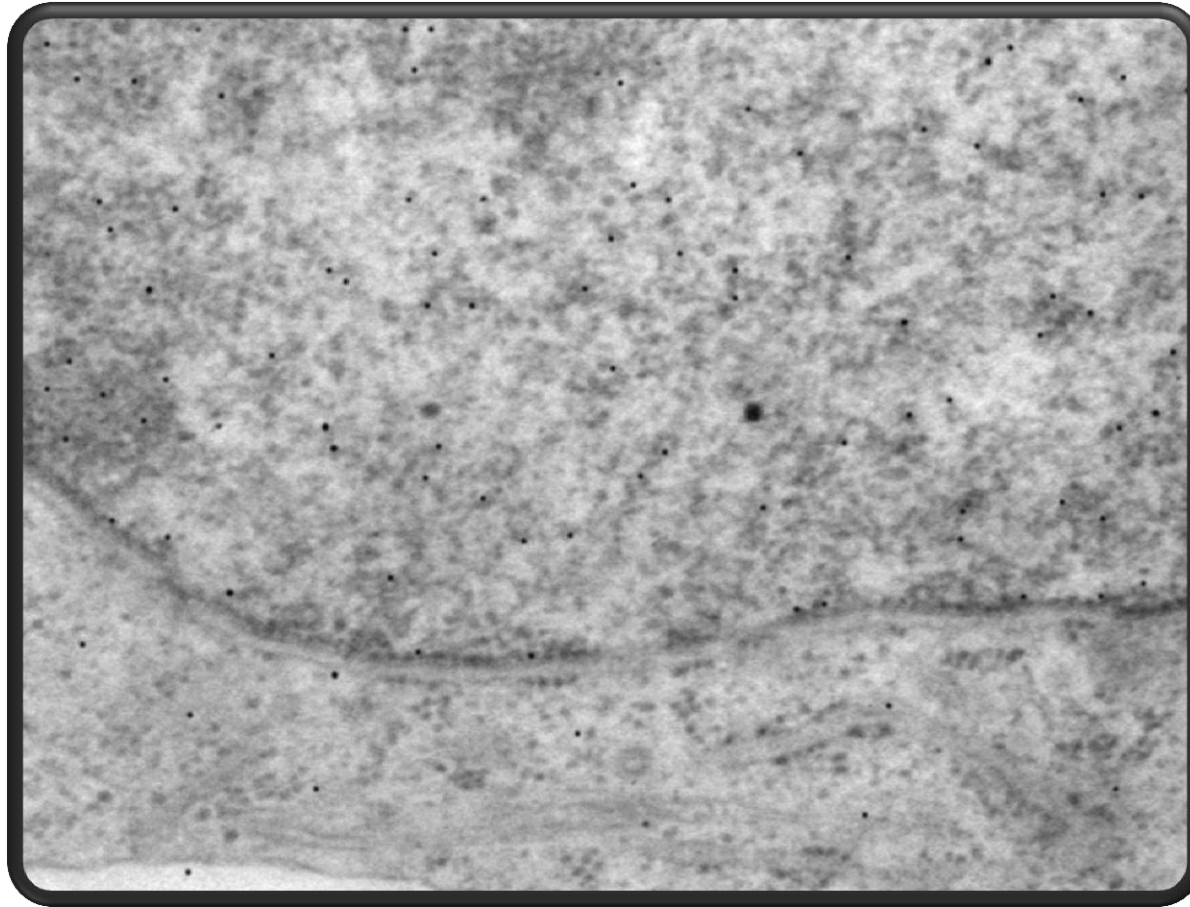


Figura 12. Electrónica, se muestra la localización de transcritos primarios en un núcleo de célula HeLa, se observa claramente como la distribución de dichos transcritos está asociada íntimamente con los manchones de cromatina a partir de los cuales proceden, 40 000X.

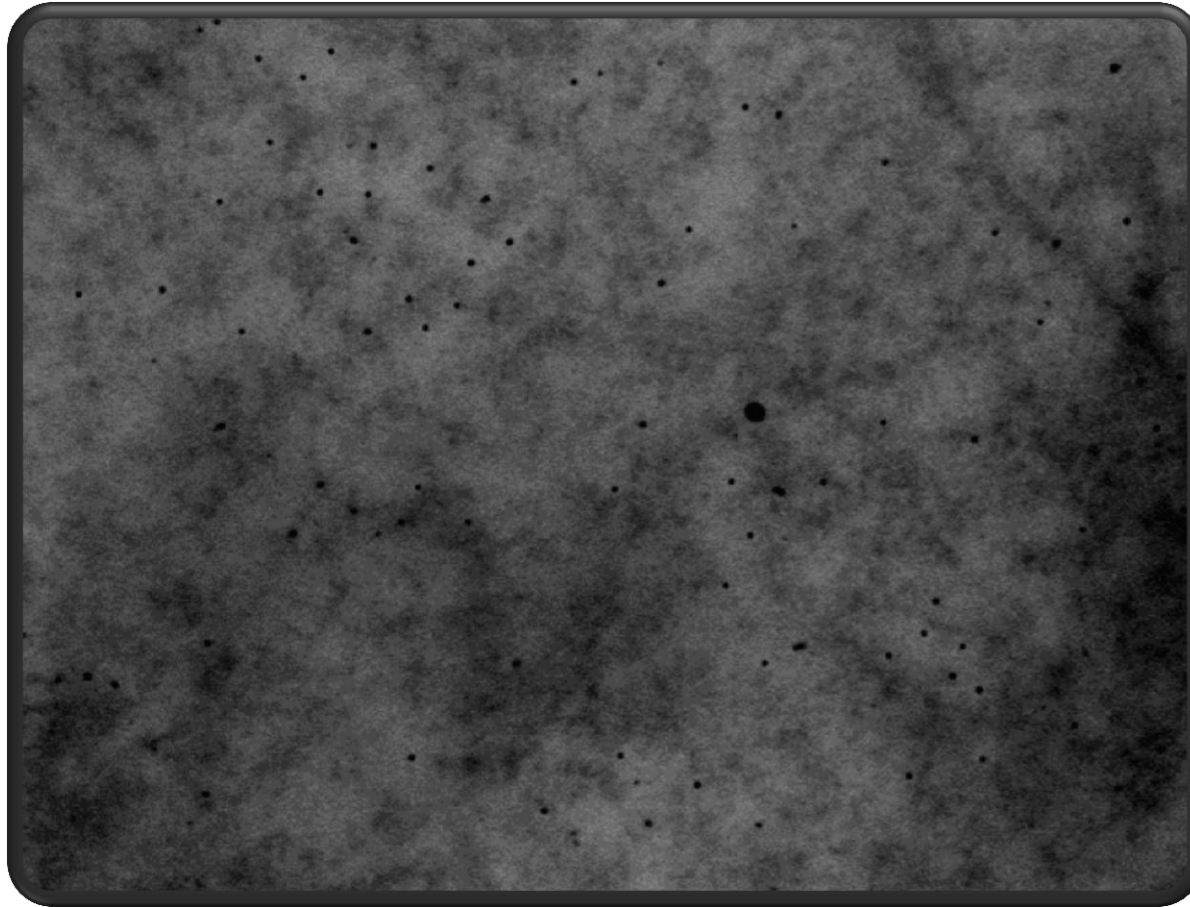


Figura 13. Electrónmicrografía, se muestra la localización de transcritos primarios en un núcleo de célula HeLa mediante la técnica de hibridación *in situ* ultraestructural; usando sondas de 500 nucleótidos de longitud del cromosoma humano 22 completo, 50 000X.

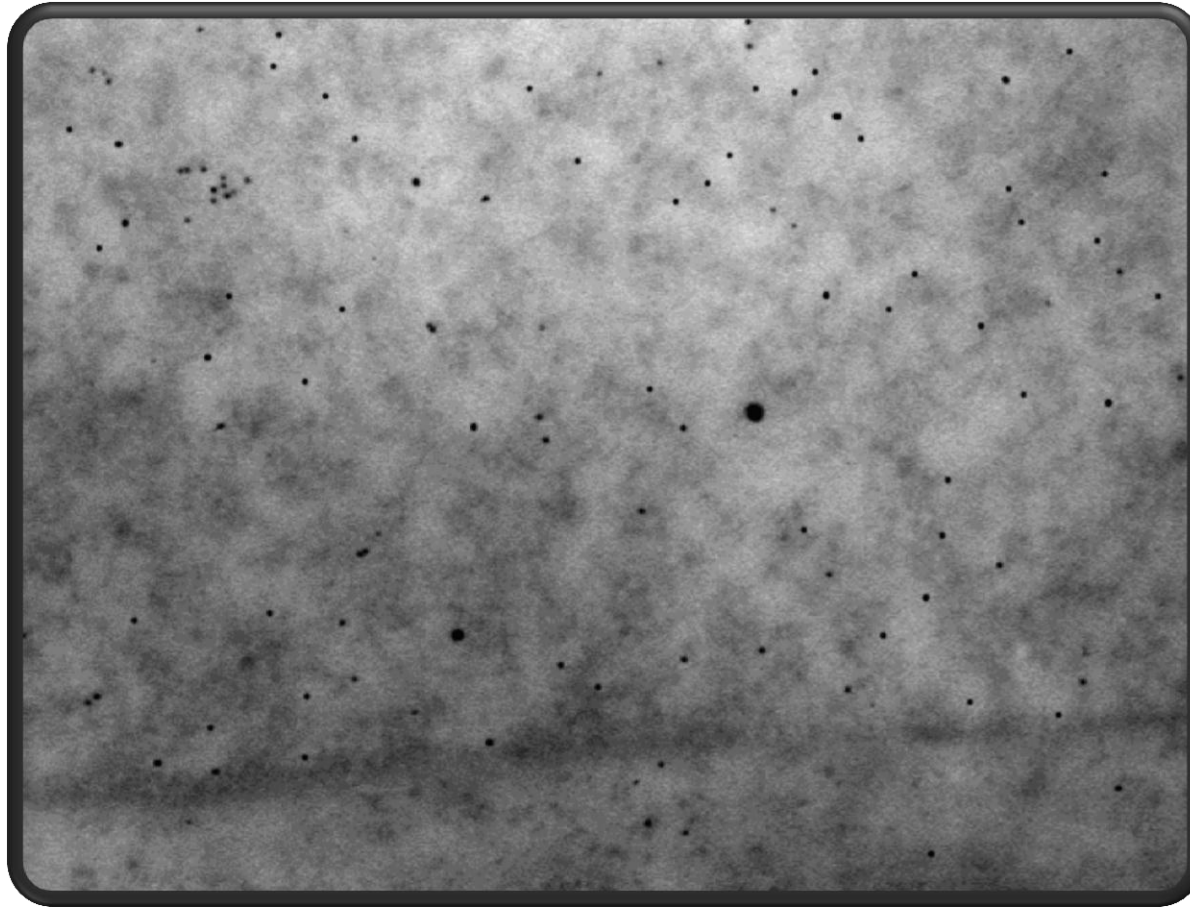


Figura 14. Electrónmicrografía. Donde se aprecia la distribución espacial de transcritos primarios procedentes del cromosoma 22, mediante la técnica de Hibridación *in situ* Ultraestructural. Nótese que la distribución de las marcas de oro coloidal está estrechamente asociada a regiones electro densas dentro del núcleo, correspondientes con regiones de cromatina en transcripción, 50 000X.

## 1.6 Discusiones

En el presente trabajo se logró determinar por medio del análisis de las distintas micrografías electrónicas, la distribución de transcritos primarios (hnRNA) procedentes del cromosoma 22, para ello, se empezó por describir la ultraestructura del núcleo de las células HeLa, por lo que se emplearon dos técnicas de contraste distintas, una específica para el DNA (amina de osmio) y otra general (acetato de uranilo y citrato de plomo); la primera nos permitió conocer la distribución de la cromatina en la línea celular empleada, mientras que la otra técnica de contraste nos permitió una determinación general de los distintos componentes del núcleo del mencionado modelo de estudio; una vez descrito el nucleoplasma de las células HeLa se procedió a implementar la técnica de Hibridación *in situ* Ultraestructural, usando sondas de 500 pares de bases del cromosoma 22 completo, de acuerdo al análisis de las distintas micrografías se sugiere que los transcritos primarios se almacenan en las inmediaciones de los manchones de cromatina de los cuales proceden; siendo las distintas estructuras encargadas de cualquier procesamiento, las que tienen que migrar hacia estas regiones para hacer las modificaciones que ya conocemos (residuo de 7-metilguanosa en el extremo 5', la poliadenilación en el extremo 3' y el splicing); el presente proyecto resultó ser un estudio meramente cuantitativo, ya que aunque se logró localizar los distintos transcritos procedentes únicamente del cromosoma 22, es difícil establecer un dominio o subvolumen dentro del núcleo más específico. Por lo que se recomienda el empleo de sondas de genes o familias génicas específicas, lo cual nos podría dar como resultado la caracterización de regiones dentro del núcleo, donde se almacenen transcritos primarios afines, dando un punto de apoyo a la existencia de vecindarios espaciales del genoma, ya que dicha teoría propone la existencia de regiones definidas de secuencias específicas que se congregan en un espacio tridimensional dado. Donde los juegos de genes que son regulados por los mismos factores de transcripción, por

ejemplo durante la diferenciación, pueden agruparse alrededor de compartimentos nucleares enriquecidos en estos factores en particular.

## 1.7 Conclusiones

- ✓ De acuerdo al análisis de las distintas micrografías se delimitó un subvolumen específico dentro del núcleo para los distintos transcritos procedentes del cromosoma 22, el cual puede extrapolarse y decirse que los transcritos primarios (hnRNA), antes de cualquier procesamiento (adición de un residuo de 7-metilguanosa en el extremo 5', la poliadenilación en el 3' y el splicing) están en estrecha relación con los manchones de cromatina de los cuales proceden.
  
- ✓ Se demostró la viabilidad de la técnica de hibridación *in situ* ultraestructural para la detección de transcritos procedente de grupos específicos de genes (cromosoma 22 completo), así como la línea celular HeLa como modelo de estudio.
  
- ✓ Se describió la ultraestructura del núcleo de la línea celular HeLa.

## 1.8 Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc, Nueva York.

Bloom, J., Cross, F.R. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 8: 149-160.

Burke, D.J., Stukenberg, P.T. 2008. Linking Kinetochores-Microtubule Binding to the Spindle Checkpoint. Developmental Cell. 14, 4: 474-479.

Cremer, T., Küpper, K., Dietzel, S., Fakan, S. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus. Biol. Cell 96, 555-567.



Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I., Fakan, S. 2006. Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 307-316.

Cremer, T., Cremer, C. 2001. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and gene Regulation in Mammalian Cells. *Nature*.

Dundr, M., Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356, 297-310.

Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates KN, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP 1999. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402, 489–95.

Fakan, S. 2004. Where do we go in the nucleus? *Biol. Cell* 96, 553-554.

Heilig R, Eckenberg R, Petit JL, Fonknechten N, Da Silva C, Cattolico L, Levy M, Barbe V, de Berardinis V, Ureta-Vidal A, Pelletier E, Vico V, Anthouard V, Rowen L, Madan A, Qin S, Sun H, Du H, Pepin K, Artiguenave F, Robert C, Cruaud C, Bruls T, Jaillon O, Friedlander L, Samson G, Brottier P, Cure S, Segurens B, Aniere F, Samain S, Crespeau H, Abbasi N, Aiach N, Boscus D, Dickhoff R, Dors M, Dubois I, Friedman C, Gouyvenoux M, James R, Madan A, Mairey-Estrada B, Mangenot S, Martins N, Menard M, Oztas S, Ratcliffe A, Shaffer T, Trask B, Vacherie B, Bellemere C, Belser C, Besnard-Gonnet M, Bartol-Mavel D, Boutard M, Briez-Silla S, Combette S, Dufosse-Laurent V, Ferron C, Lechaplais C, Louesse C, Muselet D, Magdelenat G, Pateau E, Petit E, Sirvain-Trukniewicz P, Trybou A, Vega-Czarny N, Bataille E, Bluet E, Bordelais I, Dubois M, Dumont C, Guerin T, Haffray S, Hammadi R, Muanga J, Pellouin V, Robert D, Wunderle E, Gauguet G, Roy A, Sainte-Marthe L, Verdier J, Verdier-Discala C, Hillier L, Fulton L, McPherson J, Matsuda F, Wilson R, Scarpelli C, Gyapay G, Wincker P, Saurin W, Quetier F, Waterston R, Hood L, Jean Weissenbach. 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature* 421, 601–607.

Hozák, P., Fakan S. 2006. Functional structure of the cell nucleus. *Histochem. Cell Biol.* 125, 1-2.

Jiménez, L.F. y H. Merchant. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México.

Jiménez-García, L. F., Martínez-Lara, R., Chavarria-Gil, I., Zamora-Cura, A. L., Salcedo-Alvarez. M., Agredano-Moreno, L. T., Moncayo-Sahagún, J. J., Segura-Valdez, M. L. 2007. *Biología Celular del Splicing*. Mensaje Bioquímico. XXXI.

Lamond A. I., Earnshaw, W. C., 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280, 547-553.

Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, M., Zimonjic, D., G., Zimonjic. 1999. Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping. *Cancer Research* 59, 141–150.

Matera, A. G. 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9, 302-309.

Mintz, J. P., Patterson, D. S., Neuwald, F. A., Spahr, S. C. Spector, L. D. 1999. Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18, 4308-4320.

Misteli, T. 2004. Spatial Positioning: A new Dimension in Genome Function. *Cell* 119, 153-156.

Misteli, T., Meaburn, K. 2007. Chromosome territories. *Cell Biology* 445, 379-381.

Misteli, T. 2007. Beyond the sequence: Cellular Organization of Genome Function. *Cell*.

Monneron, A., Bernhard, W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrast. Res.* 27, 266-288.

- Musacchio, A., Salmon, E. D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 379-393
- Odde D. J., Gardner M. K. 2006. Modeling of chromosome motility during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 639-647.
- Parada, L., Sotiriou, S., Misteli, T. 2004. Spatial genome organization. *Experimental Cell Research* 296, 64-70.
- Pederson, T. 2004. The spatial organization of the genome in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 203-209.
- Segura Valdez, M.L., López Velázquez, G., Jiménez García, L.F. 1997. Hibridación in situ ultraestructural. Plaza y Valdez, México.
- Spector, D. L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 265-315.
- Spector, D. L. 1990. Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 147-151.
- Spector, D. L. 2001. Nuclear domains. *J. Sci.* 114, 2891-2893.
- Spector, D. L. 1996. Nuclear Organization and Gene Expression. *Exp. Res.* 229, 189-197.
- Spector, D. 2003. the dynamics of Chromosome Organization and Gene Regulation. *Annual Review of Biochemistry* 72, 573-608.
- Tapia-Tapia, M., 2006. Estudio Ultraestructural de los Gránulos Intercromatinianos en Hepatocitos de Ratón y en Células HeLa. Tesis de Especialidad en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas. UNAM, Facultad de Ciencias, pp. 31.
- Vázquez Nin, G. H., Echeverría Martínez, O. M. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, México.

Verschure, P. 2004. Positioning the genome within the nucleus. *Biol. Cell* 96, 569-577.