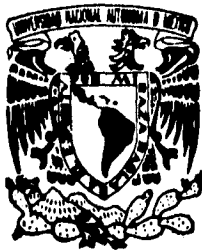


00346

2
Ley



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERIZACION INMUNOCITOQUIMICA DEL
NUCLEO INTERFASICO DE *Lacandonia schismatica*
(LACANDONIACEAE: TRIURIDALES)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
**MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**
P R E S E N T A
BIOLOGA LOURDES TERESA AGREDANO MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

MEXICO, D. F.

ABRIL 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

ESTA TESIS FUE ELABORADA BAJO LA DIRECCION DEL DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

ESTE TRABAJO SE REALIZO CON EL APOYO BRINDADO POR LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA).

A MIS PADRES Y HERMANOS

A OSCAR S.

A MARIANA Y JUAN JOSE

AGRADECIMIENTOS

AL DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA POR SU AMISTAD, PACIENCIA, APOYO INCONDICIONAL Y POR IMPULSARME SIEMPRE A SEGUIR ADELANTE.

AL DR. GERARDO H. VAZQUEZ-NIN, Y A LA DRA. OLGA ECHEVERRIA POR SU APOYO A LO LARGO DE ESTE TRABAJO.

AL DR. ALFONSO CARABEZ TREJO POR ACEPTAR FORMAR PARTE DEL COMITE TUTORIAL Y POR SUS SUGERENCIAS A LO LARGO DEL TRABAJO DE INVESTIGACION.

A LOS DEMAS MIEMBROS DEL JURADO: DRA. JUDITH MARQUEZ GUZMAN, DRA. CLARA ESQUIVEL Y M. EN C. SONIA VAZQUEZ SANTANA POR LA REVISION DEL MANUSCRITO Y SUS VALIOSAS SUGERENCIAS.

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: GUADALUPE, MARCO, RAFAEL, ERNESTINA, ELIZABETH, FRANCIS, LOURDES Y ODALIS POR SU AMISTAD.

A LA DIRECCION GENERAL DE APOYO AL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) POR LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

A GUADALUPE BARAJAS Y ANGELICA GONZALEZ POR SU APOYO Y AMISTAD.

INDICE

I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCION	3
II.1. <i>Lacandonia schismatica</i> E. Martínez & C.H. Ramos	3
II.2. El núcleo interfásico	5
II.2.1. Componentes fosfolipídicos	6
II.2.2. Componentes proteicos	7
II.2.3. Componentes desoxirribonucleoproteicos	10
II.2.4. Componentes ribonucleoproteicos	12
II.3. El núcleo celular interfásico de <i>Lacandonia schismatica</i>	25
II.3.1. Ultraestructura general	25
II.3.2. Estructuras ribonucleoproteicas	26
II.3.3. Estructuras no ribonucleoproteicas	28
II.4. Modificaciones covalentes del RNA premensajero (pre-mRNA)	30
II.4.1. Metilación del extremo 5' o "capping"	30
II.4.2. Adición de la "cola" de poli-A en el extremo 3'	32
II.4.3. Eliminación de intrones o "splicing"	35
III. OBJETIVOS	45
IV. METODOLOGIA	46
IV.4.1. Descripción ultraestructural	46
IV.4.2. Inmunolocalización ultraestructural	46
IV.4.3. Morfometría	47
V. RESULTADOS	51
V.5.1. Cromatina compacta	51
V.5.2. Distribución de los factores de splicing	54
V.5.3. Estructuras anulares	58
V.5.4. Estructuras tipo complejo sinaptonémico	63
VI. DISCUSION	73
VII. CONCLUSIONES	84
VIII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	87

I. RESUMEN

En este estudio analizamos la distribución del DNA y de los factores esenciales de "splicing" SC35, SF2 y los snRNPs, en los núcleos de *Lacandonia schismatica*. Se puso énfasis a la composición molecular *in situ* de las estructuras anulares y las estructuras tipo complejo sinaptonémico características de los núcleos de esta especie. Se utilizaron técnicas de citoquímica clásica {EDTA preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) y desoxiribonucleoproteínas (DNP) así como la tinción de acetato de uranilo-citrato de plomo} y citoquímica molecular moderna (inmunolocalización ultraestructural con los anticuerpos α -DNA, α -snRNPs, α -SF2, α -SC35 y α -p80-coilina).

Los snRNPs, y los factores SC35 y SF2, comparten dominios de distribución intranuclear con los encontrados para otras plantas y animales como son las fibras pericromatinianas (FPCs) y las fibras entremezcladas con los gránulos de *Lacandonia*. Además, los factores de splicing snRNPs se presentan en las estructuras anulares y en la cromatina compacta. En esta última, los factores de splicing SC35 y SF2 presentan una organización similar a la de los "gránulos de cromatina" descritos en este trabajo. Las estructuras anulares y la cromatina compacta podrían representar sitios adicionales o alternativos de almacén y/o ensamblaje de factores de splicing.

La reconstrucción tridimensional de las estructuras anulares y la ausencia de la proteína p80-coilina en las mismas, muestra que son estructuras similares a las descritas en núcleos de células estimuladas con estradiol y referidas como "ring shaped bodies". Con base en su contenido de snRNPs, sugerimos que las estructuras anulares constituyen un subdominio de ensamblaje y/o transporte de factores de splicing.

Por otra parte, la distribución del DNA y las RNPs en las estructuras tipo complejo sinaptonémico con un patrón de distribución similar al que presentan los complejos sinaptonémicos típicos de la profase meiótica, así como la unión de los extremos de estas estructuras a la envoltura nuclear, indican una fuerte similitud en cuanto a su composición molecular y organización estructural se refiere entre ambas.

II. INTRODUCCION

II.1. *Lacandonia schismatica* E. Martínez & C.H. Ramos

Lacandonia schismatica fue descubierta en 1985 por el Biólogo Esteban Martínez y descrita formalmente en 1989 por él mismo y por la Bióloga Clara Ramos.

Su ubicación taxonómica de acuerdo con Cronquist (1981) es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Alismatidae

Orden: Triuridales

Familia: Lacandoniaceae

Género: *Lacandonia*

Especie: *L. schismatica*

Es una planta saprófita que vive en el sotobosque de la región Lacandona, en lo que se conoce como selva alta subperennifolia inundable de *Calophyllum brasiliense* Camb, con *Terminalia amazonia* (J.F. Gmel) Exell y *Cryosophila argentea* Bartlett. La observación cuidadosa de su hábitat permitió determinar que vive sobre substratos de materia orgánica muy húmedos pero no inundados, en lugares muy sombreados. Florece todo el año si las condiciones de humedad son adecuadas y es muy abundante en noviembre y diciembre después de la temporada de lluvias (Martínez y Ramos, 1989). La primera localidad encontrada (en 1985), se sitúa en el borde de la zona núcleo de la reserva Integral de la Biosfera Montes Azules en el municipio de Ocosingo, Crucero Corozal, a 170 Km al sureste de Palenque, camino a Boca Lacatum, sobre la carretera fronteriza del Sur, Chiapas, México (Martínez y Ramos, 1989).

La característica morfológica más conspicua de *L. schismatica* es la inversión de los verticilos sexuales, con los carpelos rodeando al androceo (Martínez y Ramos, 1989). Márquez-Guzmán y col., (1989), demostraron que la posición central del androceo con respecto al gineceo no se debe a una torsión de los verticilos sexuales durante el desarrollo, ya que en cortes longitudinales de botones florales se observa la continuidad de la epidermis desde la base de las anteras hasta el receptáculo. De acuerdo con Martínez y Ramos (1989), las flores de esta especie son perfectas, generalmente con seis tépalos papilosos, cada uno con una cauda linear laminar en el ápice. El gineceo y el androceo se localizan sobre un receptáculo deprimido centralmente. El gineceo apocárpico puede tener de 60 a 80 carpelos papilosos con un estilo subapical. Generalmente presentan tres estambres centrales persistentes insertos en el borde de la depresión del receptáculo y anteras biloculares generalmente introrsas, con una sola línea de dehiscencia longitudinal.

Dos características de *L. schismatica* indican que esta especie posiblemente se originó por un proceso macroevolutivo de acuerdo con modelos propuestos para otros organismos (Grant, 1985): 1) la inversión espacial de los verticilos sexuales y 2) el hecho de que los individuos de esta especie conforman una población muy pequeña, localizada dentro de un área muy restringida de la región Lacandona en Chiapas, México. De acuerdo a Davidse y Martínez (1990), *L. schismatica* posiblemente se originó por una macromutación del gen o genes que controlan la morfogenesis floral en una pequeña población de un Triuridaceaeo ancestral y en donde posiblemente está involucrada una mutación que invierte el control de la diferenciación primordial de pistilos y estambres.

Debido a la inversión de los verticilos sexuales y a su posible origen macroevolutivo esta planta ha sido motivo de gran interés y actualmente conocemos algunos aspectos de su biología: Los estudios genéticos permitieron determinar que el número cromosómico de *L. schismatica* es $n=9$. El complemento cromosómico se caracteriza por cuatro pares de cromosomas grandes y cinco pares de cromosomas pequeños. Los estudios sobre su anatomía reproductiva han permitido describir un nuevo tipo de

fecundación para la familia Lacandoniaceae en la cual, antes de la antesis, los granos de polen germinan dentro de la antera indehiscente, los tubos polínicos crecen entre las células del receptáculo y después se dirigen hacia los óvulos, de tal modo, que uno de ellos entra al saco embrionario por el micrópilo a través de una de las sinérgidas, presentándose la doble fecundación. Una vez efectuada la doble fecundación, la flor abre (Vázquez, 1992; Márquez-Guzmán y col., 1993).

Por otra parte, Coello y col., en 1993, utilizando técnicas electroforéticas no encontraron variación genética en *L. schismatica*, la cual, de acuerdo a los autores puede explicarse por el sistema de fecundación autogámica de la planta (Márquez-Guzmán y col., 1993).

II.2. El núcleo interfásico

Las células eucariontes contienen numerosos compartimientos que consisten de organelos limitados por membranas. De éstos, el más característico es el núcleo, que caracteriza a todas las células de animales y plantas. La presencia del material genético en el núcleo es la razón fundamental del interés en este organelo, ya que aproximadamente el 95% del DNA celular está en el núcleo. Los estudios que se tienen sobre la ultraestructura de los núcleos en interfase se han enfocado básicamente a los núcleos de mamíferos (Monneron y Bernhard, 1969) y han permitido establecer la presencia de un patrón estructural muy conservado en eucariontes. Sin embargo, a pesar de la similitud observada, se han puesto de manifiesto algunas diferencias en animales y plantas en relación a la disposición de la cromatina y de las partículas ribonucleoproteicas (Jiménez-García y col., 1989a). Los estudios sobre los núcleos en interfase de plantas son menos numerosos que los realizados en mamíferos y se enfocan principalmente a los núcleos con patrón reticulado. En interfase el núcleo consta de diversos componentes que pueden ser agrupados molecular y ultraestructuralmente, en cuatro categorías: a) componentes fosfolípidicos, b) componentes proteicos, c) componentes desoxirribonucleoproteicos y d) componentes ribonucleoproteicos.

II.2.1. Componentes fosfolipídicos

Membrana nuclear interna y externa

Los compartimientos nuclear y citoplásmico de las células eucariontes están separados por una doble envoltura nuclear, la cual mantiene el genoma y las actividades del mismo dentro del núcleo. La presencia de esta envoltura es la principal característica morfológica que distingue a los eucariontes de los procariontes. Su aparición permitió la separación de la transcripción de la traducción en los organismos eucariontes, ya que en los procariontes ambos procesos se llevan a cabo simultáneamente. En eucariontes, la transcripción (en el núcleo) está separada espacial y temporalmente de la traducción (en el citoplasma). Los transcritos de RNA en el núcleo forman complejos con proteínas dando lugar a partículas ribonucleoproteicas que sufren el proceso de "splicing" o eliminación de intrones, que es un paso intermedio importante en la transferencia de información genética en eucariontes. La envoltura nuclear consiste de la membrana nuclear interna y externa, los complejos de poro nuclear y la lámina nuclear. La membrana nuclear interna y externa son los componentes fosfolipídicos de la envoltura nuclear y están constituidas por dos bicapas lipídicas separadas entre sí por el espacio perinuclear que es continuo con el lumen del retículo endoplásmico. La envoltura nuclear presenta una organización asimétrica: la membrana nuclear externa está en continuidad con el retículo endoplásmico rugoso y ambos son similares funcionalmente, mientras que la superficie nucleoplásmica de la membrana nuclear interna está en contacto estrecho con la lámina nuclear. Los poros nucleares atraviesan la membrana nuclear en sitios donde la membrana interna y externa se unen, constituyendo una unión entre el citoplasma y el interior del núcleo.

II.2.2. Componentes proteicos

Lámina nuclear

La lámina nuclear es una capa rica en proteínas que está en contacto estrecho con la membrana nuclear interna e interconecta los complejos de poro (Scheer y col., 1976). Se une a receptores asociados con la membrana nuclear interna (Gerace y Burke, 1988; Nigg, 1992), está involucrada en la reorganización de la envoltura nuclear después de la mitosis (Burke y Gerace, 1986), en la organización de la cromatina (Gerace y Burke, 1988; Yuan y col., 1991) y en la replicación del DNA en células en interfase (Newport y col., 1990).

La lámina nuclear es una estructura extremadamente insoluble que resiste las extracciones excepto cuando se usan altas concentraciones de sales o urea (Gerace y col., 1984). A pesar de esta aparente estabilidad *in vitro*, la lámina es rápidamente desensamblada y re-ensamblada durante la división celular (Gerace y Blobel, 1980). Este proceso es simultáneo con el desensamblaje y reorganización de la envoltura nuclear.

Las laminas nucleares constituyen el mayor componente proteico de la lámina nuclear y muestran una fuerte homología con las proteínas de los filamentos intermedios citoplásmicos (Nigg, 1992). Las laminas nucleares se dividen en dos grandes subgrupos dependiendo de su secuencia de aminoácidos y de su distribución subcelular durante la mitosis. Un subgrupo contiene las laminas nucleares A y C las cuales son solubles durante la división celular, mientras que el otro subgrupo contiene las laminas del tipo B que permanecen asociadas con las vesículas lipídicas durante la mitosis (Nigg, 1992). Se han descrito varias isoformas de las laminas, por ejemplo, se han reportado más de 5 laminas en hígado de rata, incluyendo las laminas A y C y tres isoformas de la lamina B (Kaufmann, 1989).

Matriz nuclear

La matriz nuclear se define como el componente estructural del núcleo que permanece insoluble después de tratamientos secuenciales con detergentes no-iónicos, nucleasas y amortiguadores de alta y baja fuerza iónica (Verheijen y col., 1988). Berezney y Coffey la aislaron por primera vez en 1974, a partir de células de hígado de rata. La matriz nuclear o "material residual" mantiene la forma del núcleo y consiste de la envoltura nuclear residual, la lamina nuclear residual, el complejo de poro residual, nucléolo residual, ribonucleoproteínas (los gránulos intercromatinianos) y una red fibrogranular que se extiende desde el nucléolo hasta la envoltura nuclear (Berezney y Coffey, 1977; Kaufmann y col., 1981).

La matriz nuclear constituye un esqueleto nuclear al cual se asocian varias enzimas activas (Tubo y Berezney, 1987; Claude y col., 1991) y en las células animales, receptores de hormonas esteroides (Barrack y Coffey, 1980). En la interfase, esta estructura juega un papel importante en la replicación del DNA (Berezney y Bucholtz, 1981; Cook, 1991), en la transcripción (Cook, 1989), en el control de la expresión génica (Bode y col., 1992) y en el procesamiento del RNA (Carmo-Fonseca y col., 1991b). Durante la división celular, la matriz nuclear se desensambla y la cromatina se agrupa alrededor de los componentes de la matriz.

Complejo de poro nuclear

El complejo de poro nuclear es el único sitio conocido de intercambio bidireccional de material a través de la envoltura nuclear. En vertebrados, es un cilindro (~ 100 nm de diámetro) con simetría octagonal, con el eje corto (~70 nm de largo) perpendicular al plano de la envoltura nuclear. Esta arquitectura general está muy conservada en los eucariontes (Miller y col., 1991).

Estudios recientes al microscopio electrónico han permitido una descripción más precisa de la estructura del complejo de poro nuclear en el cual 8 ruedas radian a

partir de un anillo redondo interno, que rodea a su vez a un tapón central, al cual el anillo interno está unido por delgados sostenes. Cada anillo está unido a su vecino por cuatro anillos coaxiales: la rueda interna, la rueda externa dentro del lumen de la envoltura nuclear, un anillo citoplásmico y un anillo nucleoplásmico. Una porción considerable de cada rueda atraviesa el poro de la membrana y reside en el lumen de la envoltura nuclear. Las estructuras periféricas citoplásmicas y nucleoplásmicas son morfológicamente distintas. Ocho filamentos citoplásmicos y partículas están unidas al anillo citoplásmico. La canasta nuclear consiste de ocho filamentos unidos al anillo nucleoplásmico que convergen en un anillo distal. Con las estructuras periféricas incluídas, la masa del complejo de poro nuclear puede exceder los 100 MDa y puede estar compuesto de ~100 proteínas diferentes (Forbes, 1992; Reichelt y col., 1990). Son estructuras macromoleculares que median el intercambio activo de proteínas y ribonucleoproteínas (RNPs) entre el núcleo y el citoplasma.

Ocurren diferentes mecanismos de intercambio núcleo-citoplasma a través de estas estructuras. Los iones y pequeñas moléculas difunden pasivamente a través de los canales acuosos de ~9 nm de diámetro. Por el contrario, las macromoléculas de 20 kDa a 100 MDa son transportadas activamente por el complejo de poro. Estas incluyen proteínas importadas y snRNPs, RNPs capturadas y proteínas repetidamente importadas y exportadas. El transporte es rápido, saturable, dependiente de energía, regulado y altamente selectivo. Todos los poros nucleares parecen funcionar tanto en la exportación como en la importación de moléculas al núcleo (Dworetzky y Feldherr, 1988).

El complejo de poro está unido a la lámina nuclear y a la matriz nuclear, ayudando a mantener la estructura nuclear. Interactúa y posiblemente se une a la cromatina. Se ha propuesto que es el sitio de unión a "carriles", los cuales se extienden a través del nucleoplasma para formar rutas para el movimiento de macromoléculas hacia y desde el complejo de poro.

El complejo de poro nuclear es una estructura dinámica. Durante la mitosis en la mayoría de las células eucariontes, la envoltura nuclear se vesiculariza y el complejo de poro se desensambla (Forbes, 1992). La conservación de los complejos de poro entre diferentes phyla divergentes evolutivamente se pone de manifiesto por su similitud estructural (Miller y col., 1991; Rout y Blobel, 1993), por las señales de importación aparentemente universales en las moléculas transportadas a través de ellas. La ubicuidad del complejo de poro apoya su origen temprano en la evolución de los eucariontes (Rout y Went, 1994).

II.2. 3 Componentes desoxirribonucleoproteicos

Cromatina

En los organismos eucariontes, el material genético existe como un complejo formado por DNA, histonas y proteínas no histonas denominado cromatina y la cual se define como el material nuclear que toma las tinciones básicas. Las histonas, cuya estructura primaria está conservada en la evolución, son los componentes proteicos de los nucleosomas y como tales están asociadas a casi todas las secuencias de DNA del genoma. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman el complejo octamérico denominado nucleosoma, que consiste de dos de cada una de las histonas mencionadas alrededor de las cuales se enrollan dos vueltas de DNA (146 pares de bases de DNA). La unidad nucleosomal básica está muy conservada en la evolución y está compactada en estructuras de orden superior tales como el filamento de 10 nm y la fibra de 30 nm. La cromatina se descondensa y recondensa para facilitar procesos biológicos tales como la transcripción, replicación y recombinación.

La histona H1 puede funcionar como un regulador de la expresión génica (Croston y col., 1991), variando el estado de condensación de regiones localizadas de cromatina, se une al nucleosoma sellando los puntos de entrada y salida del DNA. Los estudios *in vitro* sugieren que las interacciones electrostáticas entre la histona H1 y el DNA juegan un papel importante en el plegamiento de la cromatina (Clark y Kimura, 1990).

Los cambios en los niveles de fosforilación de esta histona pueden modular la condensación /descondensación de la cromatina. Se ha propuesto también que la interacción de la histona H1 con la cromatina puede estar también modulada por la unión de las proteínas no histonas a la histona H1 (Kohlstaedt y Cole, 1994). Entre las proteínas no histonas que se ha propuesto que juegan este papel se encuentran la HMG1 y HMG2 y algunos estudios las han implicado en la regulación de la transcripción o replicación.

Se ha propuesto que las proteínas no histonas juegan papeles específicos en la organización de la estructura de la cromatina de orden superior y en el control de la expresión génica. Proteínas específicas no histonas están involucradas en la compactación de los nucleosomas en dominios, en la formación de estructuras especializadas tales como centrómeros y telómeros y en la condensación de la fibra de cromatina en la estructura del cromosoma mitótico (Cartwright y col., 1989). La presencia o ausencia de varias proteínas no histonas puede también ser crítica en establecer las diferencias en la estructura entre la eucromatina y la heterocromatina en el núcleo interfásico (Tharappel y col., 1986).

Las proteínas no-histonas del grupo de alta movilidad (HMG-14, HMG-17 y HMG-1) se encuentran entre las proteínas no-histonas más abundantes, ubicuas y evolutivamente más conservadas. Reconocen curvaturas en el DNA (Landsman y Bustin, 1993) y pueden estar involucradas en diversas funciones, incluyendo la determinación de la estabilidad y estructura del nucleosoma, así como en la transcripción y/o replicación (Einck y Bustin, 1985; Bustin y col., 1990).

La cromatina puede dividirse en dos categorías de acuerdo a las variaciones locales en la densidad de tinción de la misma. La cromatina difusa que es débilmente teñida y la cromatina densa que es fuertemente teñida. Estas dos formas de cromatina realizan diferentes funciones en el núcleo. La transcripción activa del RNA se asocia con la cromatina difusa débilmente teñida, más que con la cromatina densa. La cromatina en

interfase se condensa en la mitosis en los cromosomas densamente teñidos y bien definidos.

Por otra parte, el núcleo en interfase puede clasificarse en cromocéntrico o reticulado de acuerdo al arreglo de la cromatina. El patrón cromocéntrico es característico de todas las células animales y de algunas plantas. Se caracteriza por presentar segmentos de cromatina adosados a la cara interna de la envoltura nuclear y segmentos ocasionales de cromatina en el nucleoplasma. El patrón reticulado es característico de muchas plantas monocotiledóneas y se caracteriza por presentar la cromatina en forma de retículo o red en el nucleoplasma entremezclado con fibras y gránulos en el nucleoplasma (Jordan y col., 1980).

II.2.4 Componentes ribonucleoproteicos

Los núcleos de animales, plantas y hongos presentan un patrón estructural básico común muy conservado, con una gran similitud en los rasgos morfológicos generales de las estructuras ribonucleoproteicas (RNPs): las fibras pericromatinianas (FPCs), los gránulos intercromatinianos (GICs), los gránulos pericromatinianos (GPCs), el nucléolo y los cuerpos espiralados, no obstante de algunas variaciones en tamaño y abundancia de los diferentes componentes (Jiménez-García y col., 1989a).

Fibras pericromatinianas (FPCs)

Las fibras pericromatinianas fueron descritas por Monneron y Bernhard en 1969. Su diámetro varía de 30 a 50 Å. Pueden encontrarse fibras entremezcladas con gránulos pericromatinianos y transiciones de fibras a gránulos. Son estructuras ribonucleoproteicas que se encuentran en los núcleos de animales, plantas y hongos y que se localizan en el borde de la cromatina compacta. Se marcan rápidamente con uridina tritiada y representan la contraparte morfológica de los transcritos nacientes de las moléculas de pre-mRNA (Bachelierie y col., 1975; Fakan y col., 1976). Los estudios autorradiográficos con uridina tritiada demostraron que la síntesis de RNA

en el núcleo se asocia con la cromatina difusa adyacente a la periferia de la cromatina compacta, en lo que se conoce como región pericromatiniana (Bouteille y col., 1974). Las fibras pericromatinianas se forman en la periferia de la cromatina compacta y por lo menos una parte de ellas migran hacia el espacio intercromatiniano (Fakan y col., 1976; Puvion y Moyne, 1978), su RNA sufre procesamiento durante ese periodo. La frecuencia de fibras pericromatinianas en el núcleo refleja la tasa de síntesis de hnRNA en diferentes sistemas celulares (Fakan y Odartchenko, 1980).

Estudios realizados al microscopio electrónico con anticuerpos anti-snRNPs y anti-SC35 para conocer la organización de estos factores de splicing en el núcleo celular muestran que estos factores esenciales de splicing son componentes de las fibras pericromatinianas (Spector y col., 1983; Fakan y col., 1984; Puvion y col., 1984., Spector y col., 1990; Spector y col., 1991). Recientemente se ha propuesto que los snRNPs localizados en los cúmulos de gránulos intercromatinianos se mueven a los sitios de transcripción activa, es decir, a las fibras pericromatinianas para que se lleve a cabo el proceso de splicing de los transcritos de pre-mRNA nacientes (Jiménez-García y Spector, 1993).

Gránulos pericromatinianos (GPCs)

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por primera vez en núcleos de mamíferos por Watson en 1962, quien los describió como cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro, rodeados por un halo claro de 25 nm. Son estructuras ribonucleoproteicas que generalmente se localizan en el borde de la cromatina compacta (Monneron y Bernhard, 1969) y que forman parte de los núcleos de células de animales, plantas y hongos (Jiménez-García y col., 1989a). Están constituidos por fibras delgadas de 12 a 15 Å, enrolladas irregularmente y embebidas en una matriz difusa. Los GPCs resisten la digestión con RNAsa, pero la extracción secuencial con proteasa y RNAsa decrece su contraste o los destruye completamente (Monneron y Bernhard, 1969), lo que sugiere la existencia de RNA embebido en una matriz proteica voluminosa. Los gránulos de Balbiani presentes en los núcleos de las

glándulas salivales de *Chironomus thummi* son el equivalente morfológico de los gránulos pericromatinianos (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971) y un buen modelo para el estudio de estos últimos debido a la abundancia de los gránulos de Balbiani en los núcleos de los anillos de Balbiani.

Es posible observar variaciones en el número de gránulos pericromatinianos cuando ocurren diferentes modificaciones del metabolismo celular (Daskal y col., 1981; Fakan y Puvion, 1980; Vázquez-Nin y col., 1979; Vázquez-Nin y col., 1983).

El estudio de la distribución de los snRNPs en los núcleos de las glándulas salivales de *Chironomus Thummi* sugiere que los gránulos pericromatinianos contienen RNA mensajero maduro (mRNA) libre de intrones (Vázquez-Nin y col., 1990).

Gránulos intercromatinianos (GICs)

Los gránulos intercromatinianos fueron descritos por Swift en 1963 con las tinciones convencionales para microscopía electrónica de acetato de uranilo-citrato de plomo. Posteriormente Monneron y Bernhard en 1969 sugirieron su naturaleza ribonucleoproteica. Tienen un diámetro de 20 a 25 nm y pueden estar interconectados por fibrillas delgadas (Puvion y Moyne, 1981). Incorporan muy poca o ninguna uridina tritiada (Fakan y Bernhard, 1971; Fakan y Nobis, 1978) y representan sitios de almacén y/o ensamblaje de factores de splicing.

Los gránulos intercromatinianos contienen proteínas fosforiladas y RNA (Buchwalow y Unger, 1977; Wassef, 1979). Son componentes insolubles del núcleo ya que no se extraen con tratamientos sucesivos con RNAsa y pronasa (Monneron y Bernhard, 1969) y aparecen en preparaciones de matrices nucleares sin cambios en su morfología (Berezney y Coffey, 1977).

En los núcleos de mamíferos, los gránulos intercromatinianos se presentan como cúmulos de forma irregular localizados entre masas de cromatina compacta. Por el

contrario, en los núcleos de plantas no forman cúmulos y son escasos y dispersos (Jiménez-García y col., 1989a; Medina y col., 1989). Los estudios al microscopio de fluorescencia de la distribución de los factores esenciales de splicing que forman snRNPs y que no forman snRNPs, permitió determinar que éstos presentan un patrón moteado (Spector, 1992). Al microscopio electrónico se demostró que el patrón moteado visto al microscopio de fluorescencia corresponde a dos componentes ribonucleoproteicos: las fibras pericromatinianas y los gránulos intercromatinianos, lo que demuestra la presencia de factores de splicing (snRNPs y SC35) en estas estructuras y la importancia que estas estructuras tienen en la maduración del pre-mRNA. Recientemente se ha propuesto un mecanismo de reclutamiento de factores de splicing, desde los cúmulos de gránulos intercromatinianos hasta la región pericromatiniana que representa la zona de transcripción activa para la participación de éstos en el procesamiento del pre-mRNA (Jiménez-García y Spector, 1993).

Nucléolo

El nucléolo es la estructura morfológica más conspicua en el núcleo. Las técnicas convencionales para microscopía electrónica revelan que morfológicamente está constituido por: 1) los centros fibrilares, 2) el componente fibrilar denso y 3) el componente granular. Los centros fibrilares aparecen como estructuras redondeadas con bajo contraste, contienen fibras de aproximadamente 5 nm de espesor, probablemente pertenecientes a la cromatina de organizador nucleolar (NOR). Contienen los genes ribosómicos (rDNA 18s, 5.8s, 28s), la RNA polimerasa I, las proteínas del organizador nucleolar que se tiñen con plata, fibrilarina y las fosfoproteínas C23, y B23 y pueden ser el sitio donde tienen lugar la actividad transcripcional más abundante y el procesamiento temprano del pre-rRNA. Están rodeados por el componente fibrilar denso constituido por fibras delgadas. El componente fibrilar denso está rodeado a su vez por el componente granular que presenta gránulos de 15 a 20 nm de diámetro y representa el sitio de procesamiento más tardío, maduración y almacenamiento de preribosomas. Bioquímicamente, el

nucléolo es una estructura compuesta de DNA, RNA y proteínas. La mayoría de los eventos involucrados en la biogénesis del ribosoma ocurren en el nucléolo, donde se efectúa la síntesis y procesamiento del RNA pre-ribosomal (pre-rRNA) 45S y su ensamblaje en las partículas preribosomales (Busch y Smetana, 1970). En este evento participan los snRNAs nucleolares U3, U14, snR30 y snR10 que están involucrados en el procesamiento de los transcritos del rRNA.

En eucariontes, el nucléolo se disgrega al inicio de la mitosis y su reformación subsecuente es un proceso dinámico y complejo. La nucleogénesis, en la telofase involucra la distribución precisa de material derivado de la célula madre hacia las regiones activas del organizador nucleolar (NORs) de los núcleos hijos. En la telofase temprana están presentes dos entidades separadas: 1) el NOR que tiene los genes del rRNA repetidos en tandem, los cuales se unen fuertemente a la RNA polimerasa I (Scheer y Rose, 1984) y a las moléculas de topoisomerasa I (Guldner y col., 1986) y 2) los cuerpos prenucleolares que contienen varias proteínas nucleolares (Jiménez-García y col (b)., 1989).

Cuerpos nucleares (CNs)

El estudio del núcleo de células animales y de plantas ha permitido la observación en el espacio intercromatiniano de diversas estructuras heterogéneas cuya función específica se desconoce y las cuales se han agrupado con el término general de cuerpos nucleares (CNs), debido a su localización intranuclear (Bouteille y col., 1974; Puvion y Moyne, 1981; Padykula y Clark, 1981). El término incluye una gran variedad de estructuras que se definen generalmente como regiones electrodensas en el núcleo, que difieren entre sí en cuanto a su morfología y que se han observado en células animales y plantas bajo condiciones normales y anormales (Bouteille y col., 1974; Chaly y col (a) y (b)., 1983; Faure y col., 1987 y Jensen y col., 1985). La mayoría de los CNs pertenecen a una de tres categorías: 1) Algunos están claramente asociados con infecciones virales y/o condiciones patológicas relacionadas (Bouteille y col., 1974; Dupuy-Coin y col., 1972; Vagner-Capodano y col., 1982, Puvion-

Dutilleul y col., 1992), 2) otros CNs se derivan del nucléolo y participan en la maduración de los ribosomas y su exportación (Bouteille y col., 1974; Vagner-Capodano y col., 1982) y 3) la tercera clase de CNs es característica de núcleos hiperestimulados, tales como los de linfocitos activados con concavalina A (Chaly y col (a) ., 1983) y muchos tejidos estimulados con hormonas (Brasch y col., 1989; Ochs y col., 1995).

Los cuerpos nucleares más estudiados son los cuerpos espiralados, ya que en la actualidad se dispone de marcadores específicos de los mismos y han adquirido gran importancia, ya que contienen elementos de maduración del pre-mRNA y del pre-rRNA (Fakan y col., 1984; Raska y col., 1991; Carmo Fonseca y col., 1991; Matera y Ward, 1993; Jiménez-García y col., 1994).

Cuerpos espiralados

El cuerpo nuclear que actualmente conocemos como cuerpo espiralado fue observado por primera vez en 1903 al microscopio de luz por el Histólogo español Ramón y Cajal quien lo describió en los cuerpos de células nerviosas diciendo:

“ El mencionado acúmulo granular constituye el nucleolo principal; mas todas las neuronas, sin excepción, exhiben otro corpúsculo especial esférico, pequeñísimo, generalmente único, á veces doble y triple, situado á distancia, casi invariable, del nucleolo, como se aprecia en la figura 6b. Tales esferas atraen menos vivamente el color que las nucleolares, y de ordinario ostentan tono diferente; así, mientras las nucleolares se muestran negras ó de café rojizo, éstas otras exhiben color amarillo ó anaranjado. Semejantes granitos, que por llamarlos de algún modo los denominaremos *cuerpos intranucleares accesorios*, no sabemos si corresponden á ciertos granos acidófilos irregulares, figurados por Levi en diversas partes del núcleo. Lo que nos parece indudable es que su composición química no es idéntica á la de las esferas nucleolares. Su tamaño también es muy superior (el doble ó triple) á los granos de que consta el nucleolo principal” (Ramón y Cajal, 1903).

Los cuerpos intranucleares accesorios de Cajal fueron redescubiertos al microscopio electrónico en 1969 por Monneron y Bernhard quienes los describieron como cuerpos esféricos de 0.5-1 μ m de diámetro compuestos de fibras enrolladas densamente empaquetadas positivas a la técnica de Bernhard (EDTA) preferencial para ribonucleoproteínas.

Los cuerpos espiralados descritos por primera vez por Ramón y Cajal con la técnica de impregnación de plata y posteriormente por Monneron y Bernhard, son organelos nucleares universales que se han encontrado tanto en células animales (Raska y col., 1990a, 1991; Andrade y col., 1991, 1993) como en plantas (Lafontaine, 1965; Moreno Díaz de la Espina y col., 1982a,b; Williams y col., 1983; Chamberland y Lafontaine, 1993), no incorporan uridina (Fakan y Bernhard, 1971; Fakan y col., 1976; Moreno Díaz de la Espina y col., 1982a) y carecen de DNA (Monneron y Bernhard, 1969, Raska y col., 1991).

Los cuerpos espiralados se observan ya sea en el nucleoplasma o en estrecha asociación con el nucléolo, y en algunas ocasiones se han observado fibras que interconectan ambas estructuras (Hardin y col., 1969, Seite y col., 1982). Los cuerpos espiralados tienen una morfología similar a las regiones fibrilares del nucléolo, por lo que se podría pensar que tienen un origen nucleolar o que se fusionan con él en alguna etapa (Lamond y Carmo-Fonseca, 1993).

Los cuerpos espiralados y el nucléolo comparten la característica de presentar la proteína fibrilarina y el U3 snRNA (involucrados en el procesamiento del pre-rRNA), como componentes comunes, sin embargo en los primeros no se ha detectado rRNA, RNA polimerasa I, la proteína B23 y nucleolina (Raska y col., 1991).

La primera evidencia de que los snRNPs están presentes en los cuerpos espiralados se obtuvo con inmunolocalización ultraestructural al utilizar anticuerpos anti-Sm, que reconocen proteínas comunes a todos los snRNPs (Fakan y col., 1984). Usando hibridación *in situ* con sondas específicas, se ha mostrado por microscopía de

fluorescencia que los snRNAs U2, U4, U5, U6, y U12 son componentes de los cuerpos espiralados (Carmo-Fonseca y col., 1991 a y b; Matera y Ward, 1993). Recientemente, Frey y Matera (1995) usando hibridación *in situ* y oligonucleotidos complementarios al extremo 5' del U7 snRNA encontraron que en células de ratón y células humanas los cuerpos espiralados también contienen U7 snRNA. La posibilidad de que los cuerpos espiralados participen en el metabolismo del pre-rRNA fue reforzado por el descubrimiento de que contienen U3snRNA (Jiménez-García y col., 1994).

Por otra parte, Andrade y col (1991), describieron un nuevo autoantígeno denominado p80-coilina y el cual es muy abundante en los cuerpos espiralados. p80-coilina representa el primer ejemplo de una macromolécula que es marcador específico de los cuerpos espiralados.

El número de cuerpos espiralados por núcleo se incrementa cuando las células son estimuladas para crecer rápidamente o cuando se inducen niveles altos de la expresión génica (Brasch, y Ochs, 1992). Además, son más frecuentes en líneas celulares transformadas, lo que sugiere que su formación responde a niveles incrementados de la expresión génica (Carmo-Fonseca y col., 1993). Spector y colaboradores en 1992, compararon el porcentaje de células con cuerpos espiralados en líneas celulares humanas con varios grados de transformación, notando que el porcentaje más bajo de células con cuerpos espiralados se daba en las células inhibidas por contacto, se incrementaba en células inmortales y el porcentaje más alto correspondía a las células completamente transformadas. Esto indica que existe una correlación entre el grado de transformación y la presencia de cuerpos espiralados. La asociación de los snRNPs con los cuerpos espiralados es dinámica y se lleva a cabo principalmente cuando están siendo sintetizados nuevos transcritos. Además, estos datos indican que es poco probable que los cuerpos espiralados sean sitios de almacenamiento de snRNPs inactivos que se "acumulan" en ausencia de transcripción.

Los cuerpos espiralados son estructuras dinámicas que sufren ciclos de ensamblaje desensamblaje. Durante el ciclo celular, se observan cambios en el tamaño y número de estos (Carmo-Fonseca y col., 1993; Brasch. y Ochs, 1992; Andrade y col., 1993). En mitosis, los cuerpos espiralados se desensamblan y la proteína p80-coilina y los snRNPs se distribuyen en el citoplasma mitótico. En metafase y anafase se observan remanentes de estos cuerpos. Después de la división celular, los cuerpos espiralados no se observan en los núcleos hijos durante los periodos tempranos de G1 pero son prominentes posteriormente y persisten a través de la interfase.

Los marcadores de cuerpos espiralados son: 1) la proteína p80-coilina de la cual se conoce su secuencia parcial de cDNA (Andrade y col., 1991); 2) la proteína nucleolar fibrilarina asociada al U3 snRNP; 3) las proteínas de la región del organizador nucleolar (NOR) que se tiñen con plata; 4) la DNA Topoisomerasa I; 5) los snRNPs U1, U2, U4 U6 y U7 involucrados en el splicing, 6) el factor auxiliar de splicing U2AF (que no forma snRNPs) del snRNP U2 (Fakan y col., 1984; Eliceiri y Ryerse, 1984; Raska y col., 1990a, 1991; Zhang y col., 1992) y 7) la proteína ribosomal S6 y el U3snRNA (Jiménez-García y col., 1994).

Organelos "esferas"

Otros organelos denominados "esferas" han sido observados en los núcleos de ovocitos de anfibios y de insectos, lo que sugiere que son estructuras comunes a todos los núcleos de ovocitos animales (Gall y Callan, 1989). Los estudios de los núcleos de ovocitos han revelado un componente proteico específicamente localizado en las esferas llamado Sph-1, el cual tiene un peso molecular de 80 kDa (Tuma y col., 1993). Dicha proteína comparte una similitud estructural significativa con la proteína p80-coilina de los cuerpos espiralados. Además, recientemente se encontró que U7 snRNA es componente de las "esferas" y de los cuerpos espiralados (Wu y Gall, 1993; Frey y Matera, 1995). La similitud entre p80-coilina y Sph-1, así como la presencia de U7 snRNA, sugiere que ambas estructuras están relacionadas (Roth, 1995).

Cuerpos nucleares en forma de anillo

Recientemente se han comenzado a estudiar otro tipo de cuerpos nucleares que actualmente se conocen como estructuras en forma de anillo o "ring shaped bodies". Estas estructuras parecen haber sido observadas por primera vez por de Thé en 1962. En la literatura hay reportes aislados de estas estructuras a las que se han dado diversos nombres de acuerdo al criterio del autor. Su composición molecular ya se ha empezado a dilucidar gracias al empleo de marcadores específicos de otros cuerpos nucleares con los que se están comparando: los cuerpos espiralados.

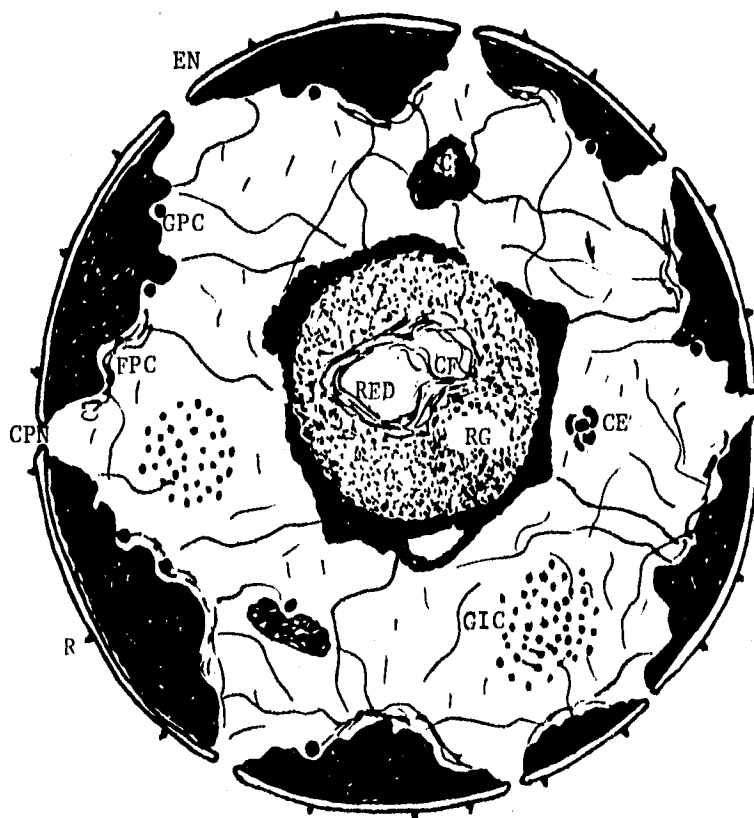
Las estructuras anulares se han observado tanto en células animales como en plantas bajo condiciones normales (Jiménez-García, 1988; Jiménez-García y col., 1992), en células asociadas con infecciones virales (Puvion-Dutilleul y Puvion, 1991), bajo condiciones patológicas (Popoff y Stewart, 1968) y en muchos tejidos estimulados por hormonas (Brasch y col., 1989; Ochs y col., 1995).

Los primeros estudios citoquímicos, inmunocitoquímicos y autorradiográficos que se tienen sobre las estructuras anulares fueron realizados por Chaly y col., (1983b) en linfocitos de ratón estimulados con concavalina A. Los autores encontraron: 1) que la parte central de las estructuras anulares contiene ribonucleoproteínas 2) la tinción de plata para el organizador nucleolar no tiñe estos cuerpos nucleares, 3) no se marcan con un anticuerpo específico de los centrómeros 4) no incorporan ^3H -uridina, ^3H -timidina o ^3H -Leucina aún después de pulsos largos y 5) se co-aislan junto con la matriz nuclear. Posteriormente, los estudios de Jiménez-García y col (1992), indican que las estructuras anulares de la planta *L. schismatica* contienen RNPs en el centro del anillo, pero no en el anillo externo. En 1994 se encontró que las estructuras anulares de *L. schismatica* contienen snRNPs en el anillo externo y que carecen de DNA (Agredano-Moreno y col., 1994). Con el hallazgo de un marcador específico de los cuerpos espiralados Ochs y col., (1995) encontraron que las estructuras anulares inducidas por estrógenos en las células blanco de las hormonas esteroides no contienen la proteína p80-coilina característica de los cuerpos espiralados, el análisis

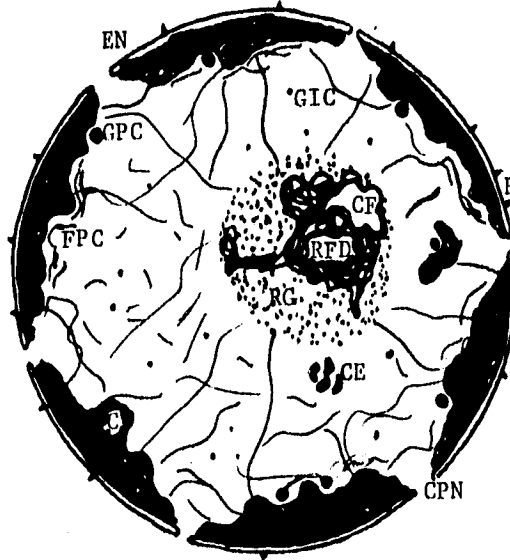
de proteínas de estas estructuras realizada por los autores revela un patrón complejo de polipéptidos, algunos aparentemente únicos y probablemente derivados de los CNs. Otra aportación realizada por el grupo de Ochs y col (1995) consiste en demostrar, por medio de la reconstrucción tridimensional de las estructuras anulares que son estructuras esféricas aparentemente "huecas" con una cubierta fibrosa que rodea a una zona electrodensa (Ochs y col., 1995). Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran que en la planta *L. schismatica*, las estructuras anulares no contienen la proteína p80-coilina y que son estructuras esféricas que contienen un material fibroso.

Recientemente se ha descrito un cuerpo nuclear en forma de anillo de morfología y tamaño similar a las estructuras en forma de anillo descritas por Jiménez-García en 1992 en células de plantas y por Ochs y colaboradores en 1995 en células animales. Este cuerpo nuclear contiene la proteína PML (proteína producida en la leucemia promielocítica) y es sensible a los efectos del morfogen tipo hormona, al ácido retinoico y promueve la diferenciación de las células con leucemia promielocítica aguda en granulocitos maduros (Dyck y col., 1994, Koken y col., 1994; Weis y col., 1994).

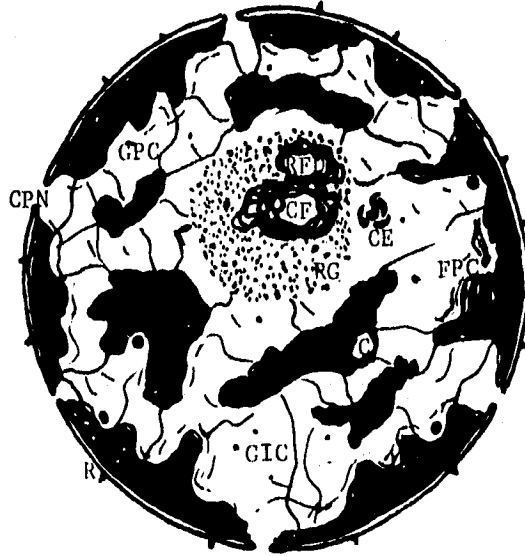
Los esquemas 1, 2 y 3, representan el núcleo celular interfásico de una célula de mamífero, un núcleo cromocéntrico de una planta y, un núcleo reticulado característico de muchas plantas, respectivamente.



Esquema 1. Núcleo celular interfásico de mamíferos. Se observa el patrón cromocéntrico del arreglo de la cromatina característico de todos los núcleos animales con los componentes que los caracterizan. Envoltura nuclear (EN), con los ribosomas (R) adosados a la cara externa de la envoltura nuclear, los gránulos pericromatinianos (GPC); los gránulos intercromatinianos formando cúmulos (GIC); las fibras pericromatinianas (FPC); cuerpos espiralados (CE). El nucléolo con los centros fibrilares (CF); la región fibrilar densa (RFD) y la región granular (RG). La cromatina perinucleolar rodea al nucléolo (CPN). Cromatina (C).



Esquema 2. Núcleo cromocéntrico de una planta. Los componentes de éste son los mismos que en el anterior, por lo que las abreviaturas son las mismas. En este tipo de núcleos los gránulos intercromatinianos son escasos y dispersos.



Esquema 3. Núcleo con un arreglo de la cromatina reticulado característico de muchas monocotiledóneas. Los gránulos intercromatinianos son escasos y dispersos.

II.3. EL NUCLEO CELULAR INTERFASICO DE *Lacandonia schismatica*

II.3.1. Ultraestructura general

El núcleo interfásico de *L. schismatica* es de tipo reticulado y en él se presentan diversos componentes característicos de muchas otras especies de animales y plantas como son la lámina nuclear, la envoltura nuclear externa e interna, las fibras pericromatinianas, cuya presencia es universal (Jiménez-García y col., 1989a), nucléolos compactos, cuerpos nucleolares, centrómeros en el retículo de cromatina y cuerpos espiralados. Sin embargo, en los núcleos de esta especie no se observan los gránulos intercromatinianos típicos y los gránulos pericromatinianos son poco frecuentes. En el espacio intercromatiniano y pericromatiniano de los núcleos de esta especie son abundantes los gránulos de *Lacandonia* descritos por primera vez en esta planta, y los cuales son una característica privativa de los miembros del orden Triuridales y que no habían sido observados antes en ninguna otra especie animal ni en plantas (Jiménez-García y col., 1992). Además, en los núcleos de esta especie es común la observación de las estructuras tipo complejo sinaptonémico y las estructuras anulares. Estas últimas se encuentran también en otras especies saprófitas.

Cromatina

Al microscopio óptico con la tinción de azul de toluidina, los núcleos de *L. schismatica* muestran un retículo en el nucleoplasma, el cual se tiñe con la reacción de Feulgen específica para DNA, lo que demuestra que los núcleos de esta especie son reticulados. Al microscopio electrónico se corrobora esta observación y se evidencian algunos filamentos de cromatina extendiéndose del borde de la cromatina compacta, cuando se emplea la técnica de ácido fosfotúngstico preferencial para DNA así como segmentos de cromatina intranucleolar compacta. Con la técnica mencionada se evidencian también diferentes grados de compactación del retículo de cromatina. En las regiones alejadas del borde de la heterocromatina, la cromatina está muy compactada y en el borde de la misma, conocida como región pericromatiniana, se

observa la cromatina semicompacta en una forma más relajada que se extiende como hebras delgadas hacia el espacio intercromatiniano.

Centrómeros

Se encuentran en estrecha asociación con el nucléolo, formando zonas de mayor y menor densidad electrónica en segmentos de cromatina compacta.

II.3.2. Estructuras ribonucleoproteicas

Nuécleo

En los núcleos de *L. schismatica* generalmente se presentan dos nucléolos esféricos y compactos con los componentes característicos de los nucléolos típicos, es decir, los centros fibrilares, el componente fibrilar denso, el componente granular y los centros fibrilares heterogéneos. Los nucléolos se observan asociados a centrómeros y pueden estar asociados a karyosomas, estos últimos son cuerpos nucleares laxos y esféricos.

Fibras pericromatinianas (FPCs)

Las fibras pericromatinianas se localizan en el borde de la heterocromatina en estrecha asociación con los gránulos de *Lacandonia* formando un arreglo fibrogranular. Son estructuras EDTA positivas, lo que indica su naturaleza ribonucleoproteica, su presencia en esta especie corrobora su ubicuidad y su importancia como primera expresión del fenotipo.

Cuerpos espiralados

Estos cuerpos nucleares pueden estar en asociación con el nucléolo o bien en el espacio intercromatiniano entre segmentos de heterocromatina. Del borde de estas

estructuras se extienden fibras delgadas que forman conexiones con segmentos de cromatina compacta. Los cuerpos espiralados son positivos a la técnica de EDTA y a la tinción de plata para la región del organizador nucleolar.

Los gránulos de *Lacandonia*

Los gránulos de *Lacandonia* son partículas intranucleares intermedias en tamaño (32 ± 3 nm de diámetro) y distribución entre los gránulos intercromatinianos y los gránulos pericromatinianos, ya que se localizan en el espacio intercromatiniano y pericromatiniano, entremezclados con las fibras intercromatinianas y pericromatinianas. Son positivos a la técnica de EDTA lo que indica su naturaleza ribonucleoproteica y a diferencia de los gránulos pericromatinianos no presentan el halo claro característico de estos últimos (Jiménez-García y col., 1992).

A diferencia de los gránulos intercromatinianos de plantas, en donde se encuentran dispersos, los gránulos de *Lacandonia* forman cúmulos. Además los estudios citoquímicos e inmunocitoquímicos indican que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras diferentes de los GICs por las siguientes características: a) son bismuto negativos, b) no contienen snRNPs y c) son relativamente insensibles a la digestión con RNAsa pero son muy sensibles al pretratamiento con pronasa seguido de la extracción con RNAsa. Estas características indican similitud entre los gránulos de *Lacandonia*, los GPCs y los gránulos de los anillos de Balbiani (Agredano y col., 1994).

Por su distribución espacial, tamaño y sus características citoquímicas e inmunocitoquímicas los gránulos de *Lacandonia* son partículas diferentes a las descritas anteriormente para plantas y animales. Como fue sugerido por Jiménez-García y col., en 1992, los gránulos de *Lacandonia* podrían representar estructuras alternativas del procesamiento post-transcripcional y pueden representar un rasgo metabólico muy especial de este grupo que pudiera estar relacionado a un cambio macroevolutivo.

II.3.3. Estructuras no ribonucleoproteicas

Estructuras tipo complejo sinaptonémico

Las estructuras tipo complejo sinaptonémico son estructuras de baja densidad electrónica que se extienden a lo largo de segmentos paralelos de heterocromatina en células somáticas de diversos órganos de *L. schismatica*. El espacio claro de estas estructuras es de aproximadamente 40 nm de ancho y contiene un material fibroso. En algunas ocasiones el espacio claro adquiere formas irregulares y partes de esta estructura se ensanchan.

La ultraestructura de las estructuras tipo complejo sinaptonémico es similar a la de un complejo sinaptonémico típico pero a diferencia de estos últimos no tiene la estructura tripartita característica de los complejos sinaptonémicos (Esponda y col., 1977). La diferencia estructural fundamental entre ambas estructuras es la ausencia del elemento central en las estructuras tipo complejo sinaptonémico y la presencia en los mismos de un material fibroso. La interpretación que Esponda hace de las estructuras tipo complejo sinaptonémico es que estas pueden representar un relicto del complejo sinaptonémico.

Con base en las semejanzas ultraestructurales entre los complejos sinaptonémicos típicos de la profase meiótica descritos por primera vez por Moses (1965) y las estructuras tipo complejo sinaptonémico de *L. schismatica*, en el presente trabajo estudiamos con detalle el componente fibroso del espacio claro de las estructuras tipo complejo sinaptonémico con técnicas convencionales para microscopía electrónica y nos planteamos la interrogante de si ambas estructuras presentan también similitud en su estructura molecular, con este propósito, analizamos el posible contenido de DNA y ribonucleoproteínas en las estructuras tipo complejo sinaptonémico, ya que estos son componentes característicos de los complejos sinaptonémicos típicos (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976; Vázquez-Nin y col., 1993). En el presente trabajo utilizamos anticuerpos dirigidos contra el DNA, la tinción preferencial para ribonucleoproteínas

de Bernhard y la tinción convencional para microscopía electrónica de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Estructuras anulares

Las estructuras anulares están constituidas de un anillo externo denso al haz electrónico que rodea a una zona clara de menor densidad electrónica y tienen un diámetro de $\sim 0.5 \mu\text{m}$, no son estructuras abundantes, pero su presencia es constante en los núcleos de esta especie. Además, se encuentran en estrecha asociación con el nucléolo y con los gránulos de *Lacandonia*. El centro de estas estructuras es EDTA positivo lo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica mientras que el anillo externo no se contrasta con esta técnica.

Las estructuras anulares también están presentes en los núcleos de otras plantas saprófitas como *Voyria aphylla* (Gentianaceae: Gentianales) y *Gymnosiphon divaricatus* (Burmaniaceae: Orchidales) así como en otras especies del orden Triuridales como *Triuris brevistylis* (Triuridaceae: Triuridales).

En el presente trabajo comparamos las estructuras anulares con los cuerpos espiralados característicos de animales y plantas ya que ambas estructuras comparten características de distribución y tamaño, es decir, ambos cuerpos nucleares se asocian frecuentemente con el nucléolo aunque también pueden encontrarse en el nucleoplasma en asociación con fibras y gránulos, los cuerpos espiralados y las estructuras anulares tienen un diámetro similar (de 0.5 a 1.0 μm y de 0.5 μm respectivamente) y además, ambos cuerpos nucleares contienen ribonucleoproteínas. En este trabajo utilizamos dos marcadores específicos de los cuerpos espiralados: 1) anticuerpos dirigidos contra la proteína p80-coilina y 2) anticuerpos dirigidos contra los snRNPs.

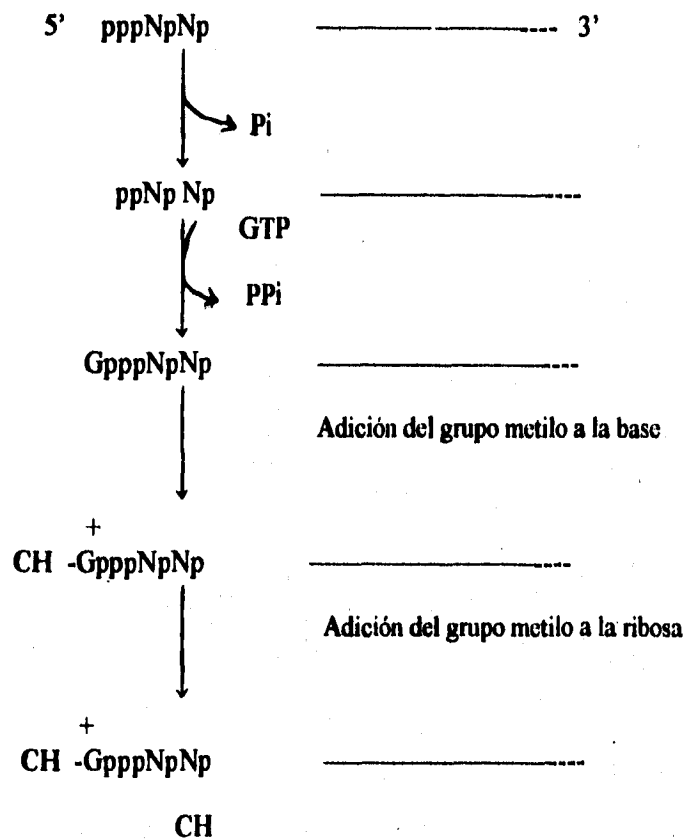
II.4. Modificaciones covalentes del pre-mRNA

La maduración de las moléculas de RNA pre-mensajero (pre-mRNA) incluye: 1) la adición de una estructura de 7-metil-guanosin cap al extremo 5' de los transcritos de RNA nacientes, 2) el proceso de splicing o eliminación de intrones y 3) la poliadenilación en el extremo 3' (Krainer y Maniatis, 1988; Steitz y col., 1988).

II.4.1. Metilación del extremo 5' o "capping"

La estructura llamada cap se encuentra en el extremo 5' de todos los mRNAs que se han observado en las células eucariontes. El componente más distintivo del cap es un nucleotido de guanina (G) al cual se ha añadido un grupo metilo. El capping ocurre casi inmediatamente después de que aproximadamente 30 nucleotidos de RNA se han sintetizado e involucra la condensación del grupo trifosfato al extremo 5' del transcrito naciente. El cap del extremo 5' juega un papel importante en la iniciación de la síntesis de proteínas y al parecer también protege al transcrito de RNA creciente de la degradación (Esquema 4).

Extremo 5' del transcrito de RNA



Esquema 4. Reacciones de capping del extremo 5' de cada molécula de RNA sintetizada por la RNA polimerasa II (en Alberts 1994). El cap final contiene una unión 5' a 5' entre el residuo 7 metil guanosin cargado positivamente y el extremo 5' del transcrito de RNA. Las reacciones indicadas ocurren casi inmediatamente después de la iniciación de cada cadena de RNA. La letra N se usa para representar cualquiera de los 4 ribonucleotidos, aunque el nucleotido que comienza una cadena de RNA es generalmente una purina (una A o una G).

II.4.2. Adición de la "cola" de poli-A en el extremo 3'

Casi todos los mRNAs de las células eucariontes terminan en un homopolímero de 20 a 250 nucleótidos de adenosina (A). Esta "cola" de poli (A) se agrega en el núcleo después de la transcripción y generalmente se reduce en tamaño una vez que el mRNA sale al citoplasma. La cola de poli (A) estimula la traducción y estabiliza al RNA mensajero o mRNA (Wickens, 1990).

La poliadenilación requiere de la presencia de la secuencia AAUAAA. Este hexanucleotido se localiza de 15 a 25 nucleótidos río arriba o "upstream" del sitio de adición de poli (A) de los mRNAs y está muy conservado (Zarkower y col., 1986; Manlie y col., 1985). La única variante común: AUUAAA es casi tan activa como la secuencia canónica. La reacción de rompimiento que precede normalmente a la poliadenilación requiere tanto de la secuencia AAUAAA como de secuencias adicionales localizadas río abajo o "downstream" del sitio de adición del poli (A). Estos elementos "downstream" son generalmente ricos en bases de U o UG, pero están menos conservados que la secuencia AAUAAA. La poliadenilación de RNAs requiere de dos componentes: 1) un factor de especificidad de AAUAAA y 2) una enzima que polimerice ATP en poli (A): la poli (A) polimerasa.

El factor de especificidad tiene un peso molecular de 250 a 300 kDa (Gilmartin y Nevins, 1989; Takagaki y col., 1989; Christofori y Keller, 1989) y parece contener una ribonucleoproteína de tamaño pequeño (snRNP) (Hashimoto y Steitz, 1986), la cual pudiera ser requerida para el rompimiento y poliadenilación: U11 snRNA. Sin embargo, también es posible que, a diferencia del splicing, el rompimiento y poliadenilación pueda ser catalizado por una proteína.

Wickens, en 1990 propuso el siguiente modelo en cinco pasos para la adición de la "cola" de poli (A) a los RNAs (Esquema 5):

Paso 1. Ensamblaje del complejo. Antes del rompimiento, por lo menos cinco moléculas forman un complejo con el precursor molecular del RNA mensajero. Estas moléculas incluyen un factor de especificidad de AAUAAA y una poli (A) polimerasa.

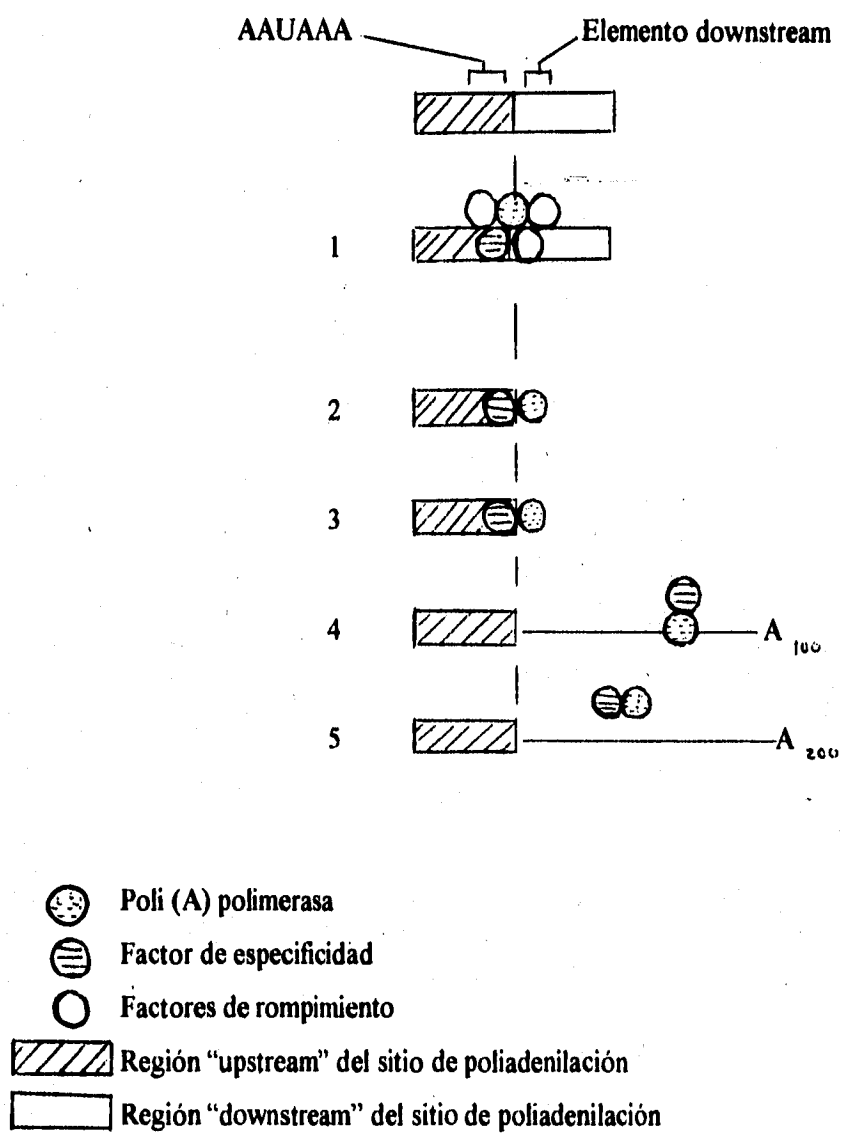
Paso 2. Rompimiento. El RNA se rompe en o cerca del sitio de poli (A), generando "mitades de moléculas" que portan extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. Las mitades de moléculas "downstream" son liberadas y degradadas rápidamente. Las mitades de moléculas "upstream" son retenidas.

Paso 3. Fase de iniciación de la poliadenilación. Se añade poli (A) a la mitad de molécula "upstream" nucleotido a nucleotido, esta reacción es catalizada por la poli (A) polimerasa en asociación física con el factor de especificidad unido a AAUAAA. En esta fase temprana, la adición de cada adenosina es dependiente de esta interacción.

Paso 4. Fase de elongación de la poliadenilación. Después de que se han añadido ~10 nucleótidos, el factor de especificidad ya no tiene compromiso con la secuencia AAUAAA. La adición de poli (A) posterior es independiente de la secuencia AAUAAA y es dependiente del segmento oligo (A) ya polimerizado. El factor de especificidad, puede continuar en contacto con la polimerasa aún después de esta transición.

Paso 5. Terminación. Después de que ~250 nucleótidos han sido añadidos, se libera la polimerasa y el factor de especificidad que pueden participar en el rompimiento y poliadenilación de otro RNA.

Sitio de poliadenilación



Esquema 5. Modelo en cinco pasos para la adición de la cola de poli (A) a los RNAs.

El mecanismo se detalla en el texto.

II.4.3. "Splicing" o eliminación de intrones

Los transcritos primarios o RNAs premensajeros (pre-mRNAs), resultantes de la transcripción de genes específicos por la RNA polimerasa II (PolII), contienen secuencias de intrones que deben ser removidos antes de que los pre-mRNAs sean transportados al citoplasma. El proceso de remoción de los intrones y la unión de los exones resultantes se conoce con el nombre de "splicing".

Componentes de la maquinaria de splicing

El splicing es catalizado por partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNPs) y por factores de splicing que no forman snRNPs (Dreyfuss y col., 1988; Lührmann y col., 1990). Es un evento de maduración dependiente del ensamblaje del spliceosoma (Maniatis y Reed, 1987), el cual es un complejo macromolecular formado por los snRNPs (Lührmann y col., 1990; Mattaj y col., 1993), otros factores proteicos esenciales (Fu y Maniatis, 1990) y el pre-mRNA.

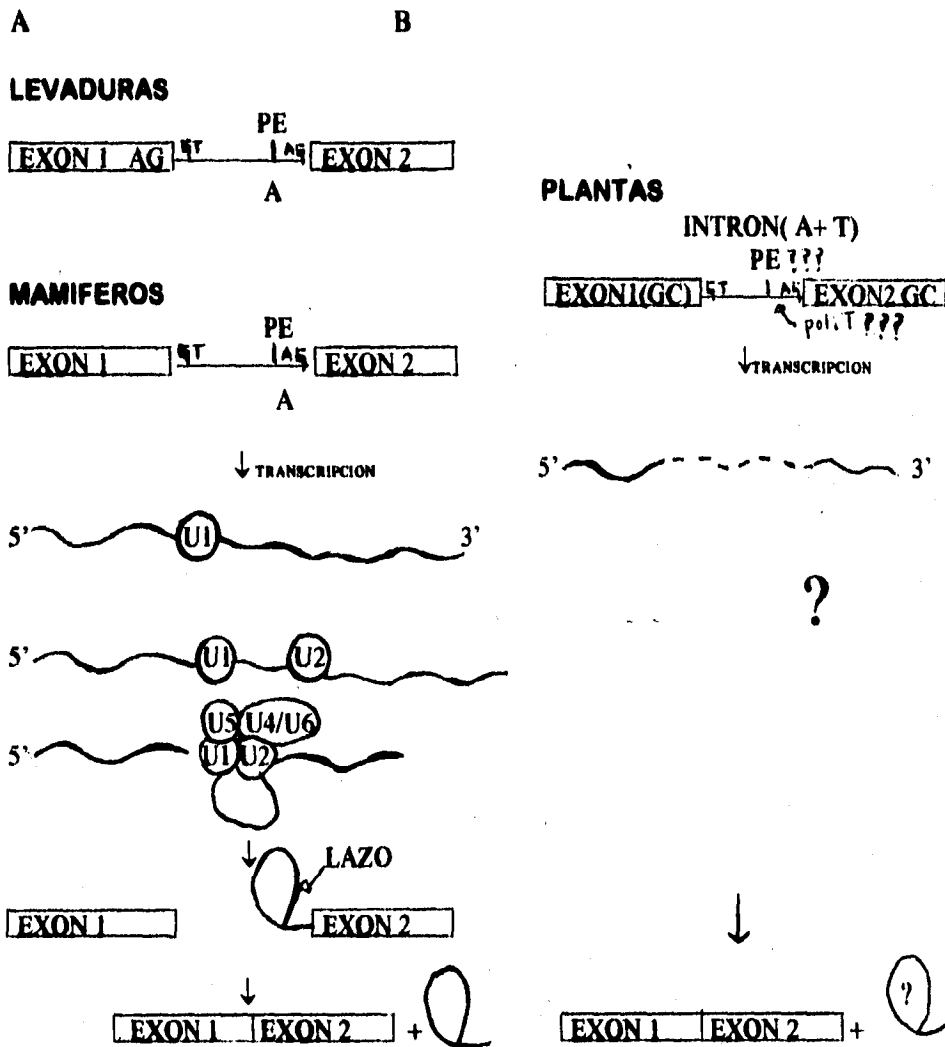
Los pre-mRNAs contienen secuencias conservadas en los sitios de splicing 5' y 3' y una región conservada cerca del sitio de splicing 3' del intrón llamada el punto de empalme o "branchpoint". Estas secuencias conservadas en mamíferos y levaduras son reconocidas por los factores de splicing, los cuales se ensamblan al pre-mRNA para formar el spliceosoma.

Estudios recientes con células que permiten la visualización de genes activos demuestran que el ensamblaje del spliceosoma es un proceso cotranscripcional *in vivo*, es decir, que el splicing puede ocurrir durante la transcripción cuando las moléculas de pre-mRNA están siendo transcritas y están unidas a la molécula de RNA polimerasa y al molde de DNA (Baurén y Wieslander, 1994).

La interacción ordenada de RNAs y proteínas hace posible que la maquinaria de splicing celular remueva los intrones de las moléculas de pre-mRNAs de manera eficiente (Esquema 6).

En mamíferos y levaduras, la formación del spliceosoma ocurre de la siguiente manera: 1) El primer paso es la unión de los snRNPs U1 y U2 al pre-mRNA. U1 reconoce secuencias específicas del pre-mRNA en el sitio de splicing 5'. Posteriormente U2 se une al sitio de empalme o "branchpoint". 2) El complejo pre-ensamblado U4/U6/U5 se asocia con los snRNPs unidos y el pre-mRNA, con U5 interactuando con las secuencias 5' y 3' de los exones. 3) La asociación de U1 se desestabiliza, U5 se une al extremo 5' del intrón y la hélice U4/U6 se desaparece parcialmente resultando en la asociación de U6 con U2, formando un complejo U2/U4/U6. 4) Finalmente el U4 snRNP se libera del complejo dejando un complejo U2/U6 con U2 unido al sitio de ramificación y U6 asociado al extremo 5' del intrón. Se ha propuesto que el complejo U2/U6-pre-mRNA es un componente del sitio activo spliceosomal (Madhani y Guthrie, 1992).

Además de los snRNPs, se han identificado varios factores esenciales de splicing que no forman snRNPs y los cuales se requieren para el ensamblaje del spliceosoma y el splicing: Los factores U2AF (Ruskin y col., 1988; Zamore y Green, 1989); SF1 y SF3 (Kramer y Utans, 1991) se requieren para la unión del U2 snRNP al punto de ramificación y el ensamblaje del complejo pre-splicing. Para el primer paso del splicing y el ensamblaje del spliceosoma se requieren otros dos factores de splicing que no forman snRNPs: el factor SF2/ASF (Krainer y col., 1990b) y el SC-35 (Fu y Maniatis, 1990; Spector y col., 1991). Los factores SF2/ASF y SC-35 también están involucrados en la selección del sitio de splicing 5' de los pre-mRNAs con splicing alternativo (Ge y Manley, 1990; Krainer y col., 1990a; Fu y col., 1992). SF2/ASF y otros miembros de la familia de proteínas SR son requeridos para el splicing general



Esquema 6. Proceso de splicing del pre-mRNA en levaduras, mamíferos y plantas (Luehrsen et al., 1994). Se muestran las secuencias consenso para el splicing del RNA en levaduras, mamíferos y plantas. La secuencia dada es la de la cadena de RNA. Los dinucleótidos GU y AG en los extremos de la secuencia intrónica, están muy conservados. (A) Se presenta la estructura generalizada de los intrones de levadura y mamíferos. Después de la transcripción, el U1 snRNP es el primero que se une al intrón (Línea discontinua). El U2 snRNP se une cerca del punto de empalme (PE), seguido por la adición de U4/U6-U5 para formar el spliceosoma funcional. El primer rompimiento libera el exón 5' y el intermediario lariat-exón2. La segunda reacción de rompimiento resulta en la unión de los exones 1 y 2 y la liberación del intrón en forma de lazo. (B) Un gen típico de una planta está compuesto de intrones ricos en (A+T) adyacentes a exones ricos en (G+C). El signo de interrogación indica que el mecanismo de reacción para el splicing en plantas no se ha determinado. Región de politimidina (poli T), región de polipirimidina poly Y; PE, punto de empalme (ramificación).

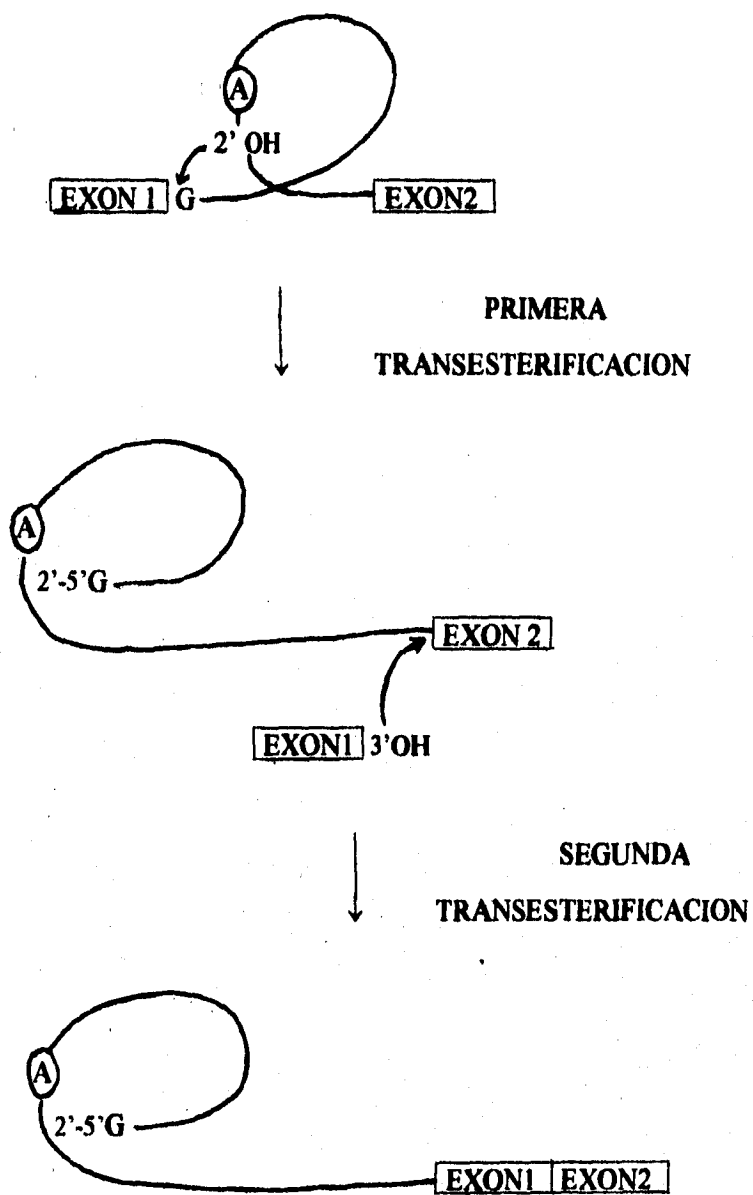
in vitro y también regulan el splicing alternativo *in vivo* promoviendo el uso de sitios de splicing 5' proximales (Cáceres y col., 1994). Por el contrario, algunos otros factores de splicing tales como hnRNP A1 antagonizan el efecto de la proteína SF2/ASF promoviendo el uso de sitios de splicing 5' distales de manera que las actividades antagonistas de las proteínas SR y de hnRNP A1 son fundamentales en la selección del sitio de splicing 5' (Cáceres y col., 1994).

El mecanismo bioquímico

Los intrones del pre-mRNA son eliminados por un mecanismo de dos pasos que involucra dos reacciones de transesterificación (Esquema 7). El primer paso es una reacción de rompimiento en el sitio de splicing 5', simultáneo con la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' característica. Esta unión es entre el primer nucleótido del intrón y un nucleótido intrónico interno en el sitio de ramificación, el cual es invariablemente un residuo de Adenosina. Los productos intermedios de la reacción de splicing son el exón río arriba (exón 1) con un extremo 3'-OH libre y la molécula intrón-exón2 en la cual el nucleótido del sitio de ramificación está involucrado en tres uniones fosfodiéster, formando una estructura en forma de lazo "lariat" de la molécula. No se requiere fuente de energía exógena para las reacciones de rompimiento ya que las reacciones conservan la energía de las uniones fosfodiéster (Moore y col., 1993). El splicing del pre-mRNA depende estrictamente de la presencia de magnesio.

Durante la segunda reacción de transesterificación, la unión del sitio de splicing 3' se rompe y se ligan los dos exones. Los productos finales de las reacciones de splicing son el RNA maduro o mRNA (exones unidos) y el intrón liberado en forma de lazo que finalmente adquiere una forma lineal.

Actualmente sabemos que algunos intrones liberados durante el procesamiento de las moléculas de pre-mRNA forman snoRNAs cruciales para la maduración del RNA pre-ribosomal. U14 snRNA es el primer ejemplo de un snRNA con actividad biológica



Esquema 7. Eliminación de intrones a través de una reacción de transesterificación en dos pasos. El mecanismo bioquímico se describe en el texto. .

que es producto de un evento de procesamiento de los intrones 5, 6 y 8 del gen *hsc70*, que codifica para la proteína de stress *hsc70* (heat shock protein). El evento de procesamiento del intrón ocurre independientemente de la excisión del intrón y de la unión de los exones. Lo anterior indica que un snRNA esencial requerido para el procesamiento del rRNA y que es derivado del procesamiento del pre-rRNA une y regula los eventos de splicing del pre-mRNA y el procesamiento del rRNA (Liu y Maxwell, 1990; Leverette y col., 1992). Cada vez son más numerosos los ejemplos de snoRNAs que se originan a partir del procesamiento de un intrón como es el caso de los snoRNAs U15 (RNA κ), U16, U17, U18, U20, U21, U9. Es interesante hacer notar que todos los RNAs pequeños (originados a partir de un intrón) que se han identificado a la fecha están en relación con el nucléolo. El hecho de que algunos intrones sean procesados para producir RNAs funcionales en la célula modifica el concepto de intrón el cual era considerado como "chatarra génica" que se degradaba una vez que era liberada de la molécula de pre-mRNA.

Los snRNPs y algunos factores de splicing que no forman snRNPs han sido localizados en los núcleos celulares de mamíferos. Los snRNPs están organizados en una distribución específica dentro del núcleo que se ha denominado el patrón moteado (Spector y col., 1983, Habets y col., 1989), compuesto de regiones de forma irregular en el núcleo conectadas entre sí. El uso de sondas antisentido contra los snRNAs (Carmo-Fonseca y col., 1992; Huang y Spector, 1992) revelan que los componentes de RNA de los snRNPs se organizan también en el núcleo como un patrón moteado. Además, el factor esencial de splicing SC-35 que no forma snRNPs presenta una distribución moteada en el núcleo que colocaliza con los snRNPs, excepto en que no da un marcaje nuclear difuso (Fu y Maniatis, 1990; Spector y col., 1991).

La inmunolocalización ultraestructural con anticuerpos contra los snRNPs y el factor SC-35 muestran que el patrón moteado visto por inmunofluorescencia corresponde a los GICs y a las fibras pericromatinianas (Spector y col., 1983; Fakan y col., 1984; Puvion y col., 1984; Spector, 1990; Spector y col., 1991). Se ha propuesto que los snRNPs localizados en los cúmulos de GICs se mueven a los sitios de transcripción

activa (fibras pericromatinianas) para participar en el splicing de los transcritos nacientes de pre-mRNA (Jiménez-García y Spector, 1993).

El splicing en plantas

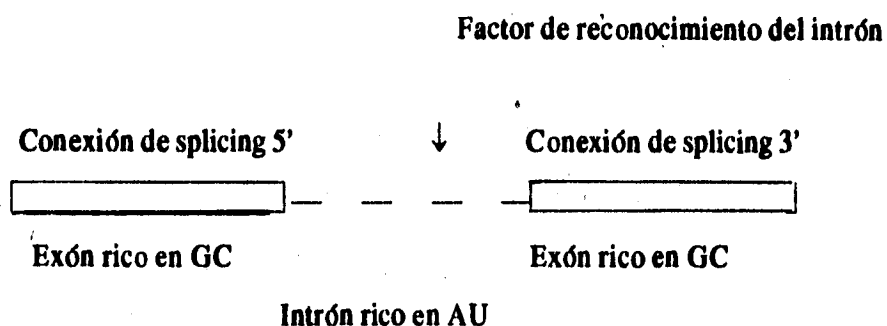
Poco es lo que se sabe acerca del mecanismo de splicing en plantas, pero debido a que las levaduras, animales y plantas contienen los mismos snRNAs, es posible que los intrones de las plantas sean eliminados por un mecanismo similar a los intrones de los otros reinos (Luehrsen y col., 1994). Actualmente se desconocen muchos aspectos acerca de la estructura y función de los snRNAs de plantas. Estas contienen los snRNAs U1, U2, U4, U5 y U6 que son homólogos a los snRNAs de mamíferos y están involucrados muy posiblemente en el splicing del pre-mRNA. Cada snRNA de plantas puede plegarse en la misma estructura secundaria que su contraparte en animales o levaduras, lo que sugiere una función similar en animales y plantas. Al igual que en mamíferos, los U1, U2, U4 y U5 son transcritos por la RNA polimerasa II, mientras que U6 es transcrito por la RNA polimerasa III. U1, U2, U4 y U5 de plantas contienen el m³GCap, indicador de una modificación post-transcripcional en el citoplasma y su subsecuente importación al núcleo. Al igual que U6 de mamíferos, U6 de plantas no tiene la estructura de m³GCap.

A diferencia de lo que sucede en mamíferos, los snRNAs de plantas están presentes en solo ~10⁴ copias por célula, contra el típico 10⁶ por célula en mamíferos. La heterogeneidad en longitud y secuencia distingue los snRNAs de plantas de los de mamíferos y levaduras. Las variaciones en secuencia en los snRNAs de plantas no están en regiones involucradas en interacciones de apareamiento de bases RNA•RNA intermoleculares lo que sugiere que las interacciones snRNA-pre-mRNA descritas en mamíferos y levaduras posiblemente se mantienen en plantas. Como se puede ver en el esquema 6, los intrones de levaduras, animales y plantas presentan secuencias consenso conservadas en ambos extremos del intrón: los dinucleótidos AU en el extremo 5' y los dinucleótidos AG en el extremo 3' del intrón. Otra secuencia conservada es el punto de ramificación. En levaduras es la secuencia UACUAAC y en

mamíferos UNCURAC. En plantas, no se ha identificado una secuencia conservada en el punto de ramificación. Una diferencia importante entre los intrones de plantas y animales es el requerimiento de que los intrones de plantas sean ricos en A+U para ser eliminados eficientemente. La similitud estructural de los intrones de animales, plantas y levaduras, así como la presencia de U2 snRNA en plantas sugiere que la bioquímica del splicing es similar entre los diferentes phyla, pero no hay evidencia directa de la formación del lazo en plantas. El nucleótido del punto de empalme en levaduras y mamíferos es una A generalmente, si se forma un lazo intermediario durante el splicing en plantas, los resultados obtenidos en este sistema indican que otros nucleótidos diferentes a A podrían funcionar como aceptor en el punto de ramificación.

Los genes de plantas y animales difieren mucho en la longitud promedio de sus intrones. Los de animales tienen un diámetro promedio desde 31 nucleótidos (nt) a más de 10^5 nt, pero los intrones de plantas se agrupan en un rango de tamaño mucho más restringido desde 66 nt hasta menos de 10^4 nt. El mínimo tamaño de los intrones de plantas es similar a la longitud mínima requerida de ~80 nt requerida para el splicing eficiente en mamíferos, lo que sugiere que probablemente sea necesaria una mínima longitud del intrón para permitir la unión de multi-snRNP a una región pequeña del pre-mRNA. A diferencia de los intrones de mamíferos, los intrones de plantas son generalmente ricos en G+C y se ha propuesto que esta disparidad es esencial para que el splicing sea eficiente en plantas. Luehrsen et al (1994), propusieron un modelo de reconocimiento del intrón en plantas. Debido a que un gen típico de plantas está compuesto de intrones ricos en (A+U) rodeados por exones ricos en (G+C) proponen que un factor de unión rico en U o (A+U) reconoce y cubre la secuencia intrónica, dejando las conexiones 5' y 3' de splicing expuestas para la unión de los snRNPs. Los exones ricos en (G+C) son deficientes en los motivos ricos en (A+U), los cuales son sustrato para las proteínas de unión hipotética y por lo tanto no son cubiertas. Falta por descubrir si hay proteínas involucradas en el splicing en plantas que no se encuentren en mamíferos y levaduras y dilucidar el mecanismo de splicing en plantas. En el esquema 8 que se ilustra a

continuación, se esquematiza el mecanismo de reconocimiento propuesto por Luehrsen y colaboradores en 1994.



Esquema 8. Modelo de reconocimiento del intrón en plantas. El mecanismo se describe en el texto.

Debido a que el procesamiento del RNA es esencial para la función celular, recientemente, se han realizado numerosos estudios sobre la organización de los factores esenciales de splicing en los núcleos de células animales, sobre todo en los núcleos de células de mamíferos, lo que ha permitido grandes avances tendientes a esclarecer las preguntas ¿Cómo se lleva a cabo el procesamiento del pre-mRNA en los núcleos de las células animales? y ¿Qué elementos moleculares intervienen?. En los núcleos celulares de plantas, los estudios sobre la organización de los factores de splicing son escasos y se han enfocado básicamente a la distribución de los snRNPs (Vázquez-Nin y col., 1992; Chamberland & Lafontaine, 1993; Testillano y col., 1993; Beven y col., 1995). Se ha propuesto que los snRNPs en los núcleos cromocéntricos de plantas se localizan en las fibras pericromatinianas, pero no se ha podido establecer con certeza si son componentes de los gránulos intercromatinianos (Vázquez-Nin y col., 1992) debido a que estos últimos son escasos y dispersos en el área intercromatiniana (Jiménez-García y col (a)., 1989). En los núcleos reticulados de plantas, los estudios de inmunofluorescencia indican que este factor se localiza en las fibras pericromatinianas e intercromatinianas, pero no en asociación con las partículas

ribonucleoproteicas presentes en el espacio intercromatiniano. A diferencia de lo que ocurre en los núcleos de mamíferos la fluorescencia vista al microscopio óptico cuando se emplean anticuerpos dirigidos contra este factor no es un patrón moteado, sino una distribución homogénea en el nucleoplasma. De lo anterior se puede deducir que los factores de splicing en animales y plantas se encuentran presentes en las fibras pericromatinianas, lo que indica que el splicing del pre-mRNA ocurre en el sitio de transcripción en animales y plantas, pero que la sublocalización de los factores de splicing en el espacio intercromatiniano difiere en ambos sistemas.

Uno de los objetivos planteados en el presente trabajo es conocer como es la distribución de los factores de splicing en una planta tan peculiar como *L. schismatica* que carece de los gránulos intercromatinianos típicos (involucrados en el proceso de splicing) y que además se originó por un posible proceso macroevolutivo.

Con el propósito de estudiar la organización ultraestructural de los factores de splicing en los núcleos celulares de *L. schismatica*, realizamos estudios de inmunolocalización, usando anticuerpos dirigidos contra los snRNPs y contra dos factores de splicing esenciales que no forman snRNPs: SF2 y SC35.

Para conocer la composición molecular de las estructuras anulares, las estructuras tipo complejo sinaptonémico y la distribución de los factores de splicing SC35, SF2 y snRNPs en los núcleos de *L. schismatica* en el presente trabajo empleamos citoquímica clásica (EDTA, Ur-Pb) y citoquímica molecular moderna (inmunolocalización ultraestructural) con anticuerpos dirigidos contra el DNA y contra los factores esenciales de splicing SF2 y SC-35.

III. OBJETIVOS

1) Conocer la distribución del DNA y de las ribonucleoproteínas en las estructuras tipo complejo sinaptonémico y establecer el grado de homología en cuanto a su composición molecular se refiere entre estas estructuras y los complejos sinaptonémicos típicos, mediante el empleo de técnicas de inmunolocalización del DNA y la técnica preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard.

2) Determinar la composición molecular de las estructuras anulares por medio de inmunolocalización ultraestructural. La utilización de un anticuerpo monoclonal contra DNA y un anticuerpo contra snRNPs permitirá conocer su composición y por lo tanto su papel en el metabolismo del RNA intranuclear.

3) Conocer la distribución de los factores esenciales de splicing SC-35, SF2 y snRNPs en los núcleos de esta especie.

IV. METODOLOGIA

IV.4.1. Descripción ultraestructural. Los botones florales y flores de *L. schismatica* se fijaron en glutaraldehído al 2.5% diluido en amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2; en algunos casos las muestras se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 1% diluido en el mismo amortiguador y se procesaron para microscopía electrónica convencional como se muestra en el diagrama de flujo No. 1.

IV.4.2. Inmunolocalización ultraestructural. Los botones y flores de *L. schismatica* se fijaron en paraformaldehído 4% diluido en PBS (amortiguador de fosfatos salino) o en una mezcla de paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.5% diluido en el mismo amortiguador por 1 hora a 4°C y se procesaron para su inclusión en las resinas acrílicas hidrosolubles LR White y Lowicryl K4M, como se indica en el diagrama de flujo 2 y 3 respectivamente. Se hicieron cortes de 60 a 90 nm de grosor, los cuales se colocaron sobre rejillas de oro o de níquel. Las rejillas se flotaron por 60 minutos sobre amortiguador de Tris salino (TBS), compuesto de 20 mM de Tris (pH 7.6), 150 mM de NaCl, 20 mM de azida de sodio, 1.0% Tween-20 y 10% de albúmina de suero de bovino (BSA), y 10% de suero normal de cabra (NGS). Posteriormente los cortes se incubaron en el anticuerpo primario diluido en PBS en una cámara húmeda durante la noche a 4°C. Al día siguiente las rejillas se dejaron llegar a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron en TBS durante 15 minutos. Las rejillas se colocaron en el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 o 30 nm diluido en TBS por 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la incubación, el anticuerpo marcado con oro coloidal se centrifugó en una microfuga por 1 minuto a temperatura ambiente para precipitar el oro coloidal que forma racimos. Después de la incubación, las rejillas se lavaron durante 15 minutos en TBS, 10 minutos en agua, se dejaron secar y se tñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas se observaron a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como las concentraciones de los mismos se enlistan a continuación:

Anticuerpo Primario	Fuente	Dilución	Anticuerpo secundario
anti-p80-coilina	policlonal conejo	en 1:5	GAR IgG 10 nm
anti-snRNPs (Y12)	Monoclonal ratón	en 1:10	GAM IgG 10 nm
anti-SC35	Monoclonal ratón	en puro*	GAM IgG 30 nm
anti-SF2	desarrollado ratón	en puro*	GAM IgM 10 nm
anti-DNA	monoclonal en ratón	1:50	GAM IgM 10 nm

* Los anticuerpos α -SC35 y α -SF2 fueron utilizados a partir de una dilución stock de fluido ascítico donada por el Dr. A. Krainer y cuya concentración se desconoce. Es por esto que utilizamos el término "puro" para definir la dilución.

IV.4.3. Morfometría. Las mediciones del diámetro de los "gránulos de cromatina" se realizaron en micrografías electrónicas de núcleos contrastados con la técnica de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas. Se midieron gránulos de cromatina en 25 núcleos provenientes de diferentes organismos. Las mediciones de las estructuras anulares se realizaron en micrografías electrónicas teñidas con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se midió el diámetro promedio del anillo externo, la parte central de esta estructura y el diámetro promedio de la estructura completa, incluyendo el anillo externo y la parte central. El aumento total de las micrografías electrónicas analizadas fue igual o mayor a 25 000 X. La medición se llevó a cabo con una lupa graduada en décimas de milímetros. Posteriormente se convirtieron estas unidades a nanómetros. Los datos se analizaron estadísticamente en el programa Statgraphics.

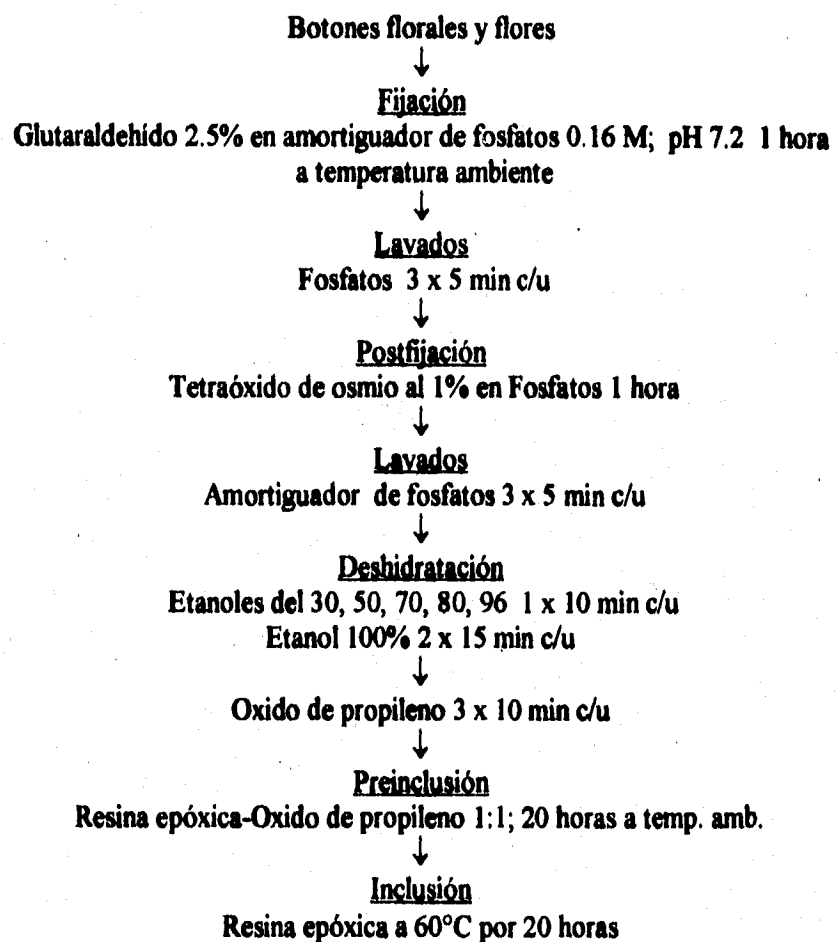
Diagrama de Flujo No. 1**Descripción Ultraestructural**

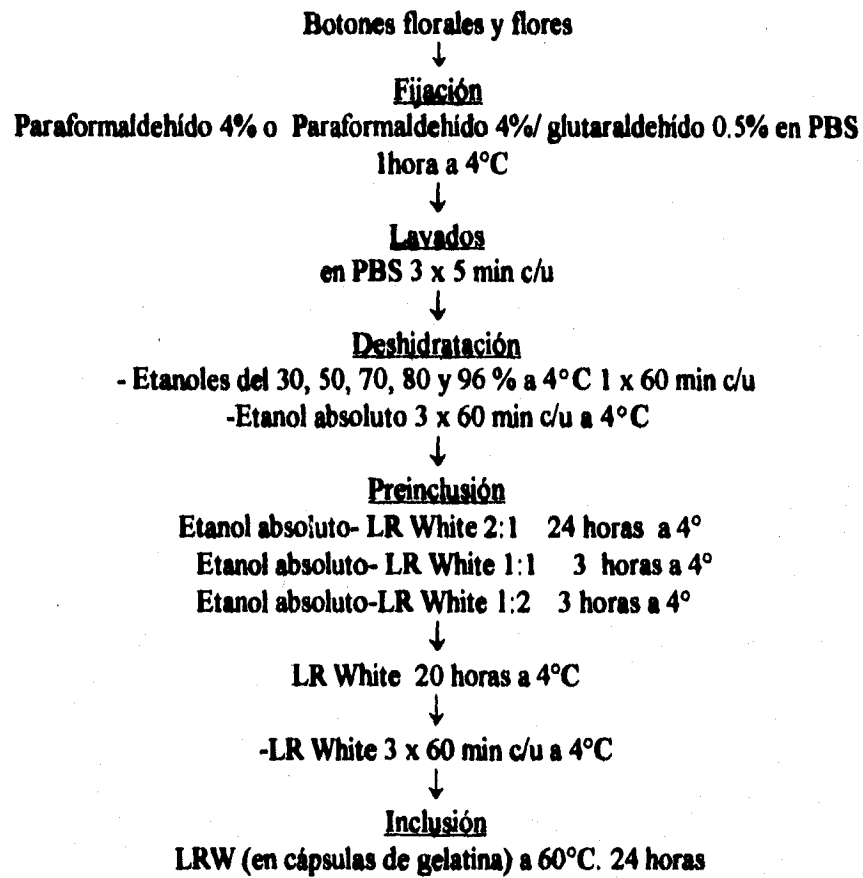
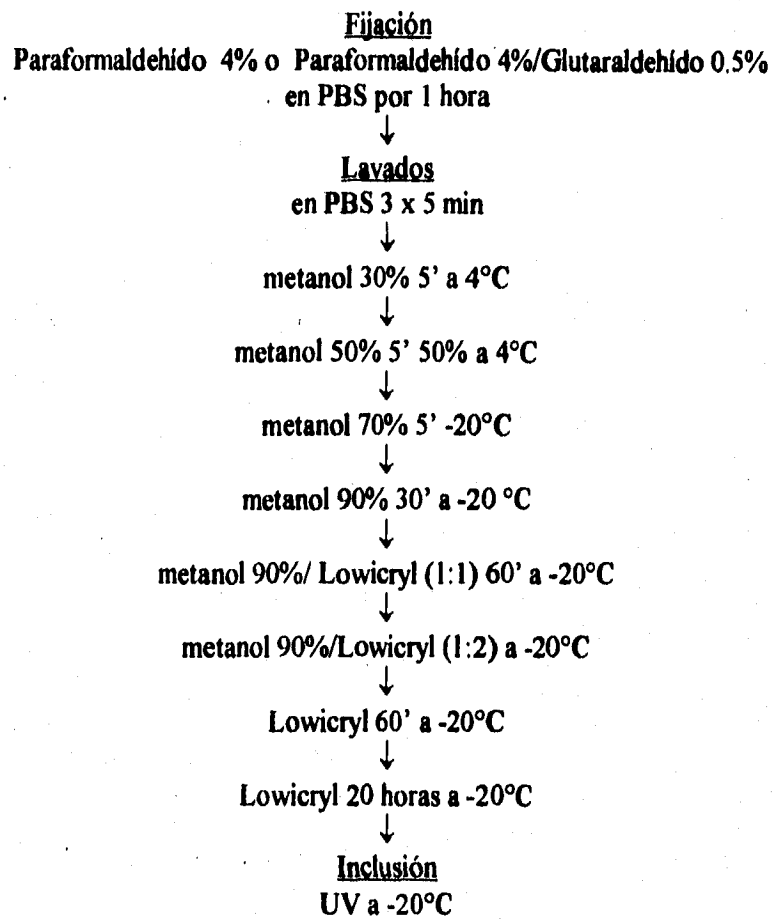
Diagrama de Flujo No. 2**Immunolocalización ultraestructural (LR White)**

Diagrama de Flujo No. 3**Inmunolocalización ultraestructural (Lowicryl K4M)**

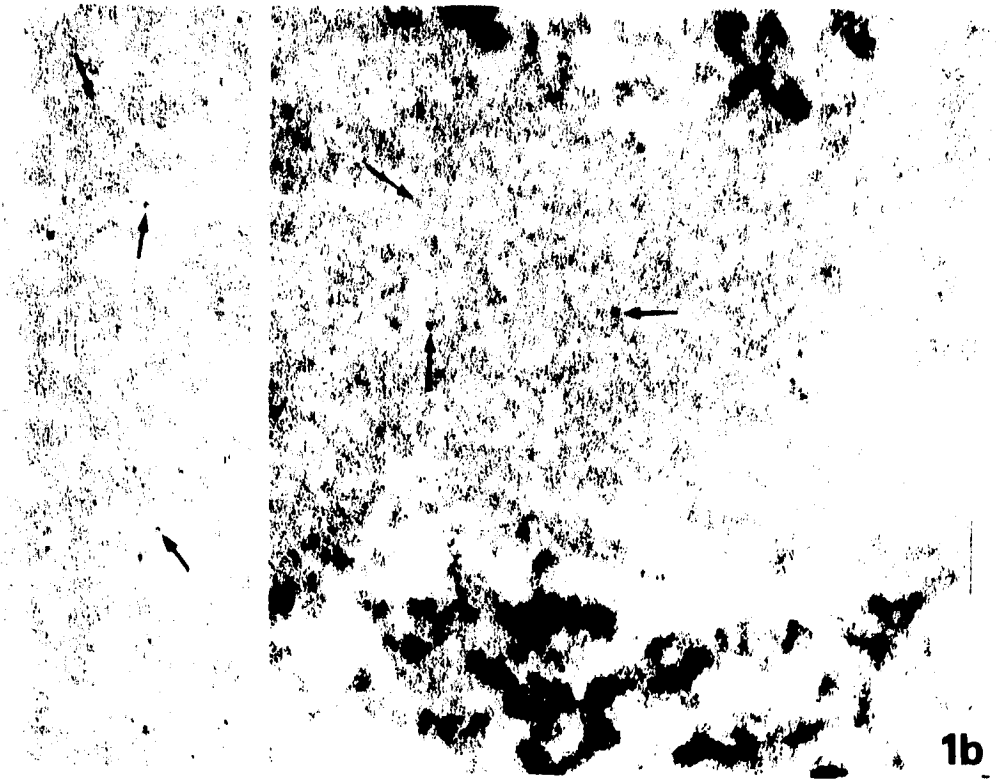
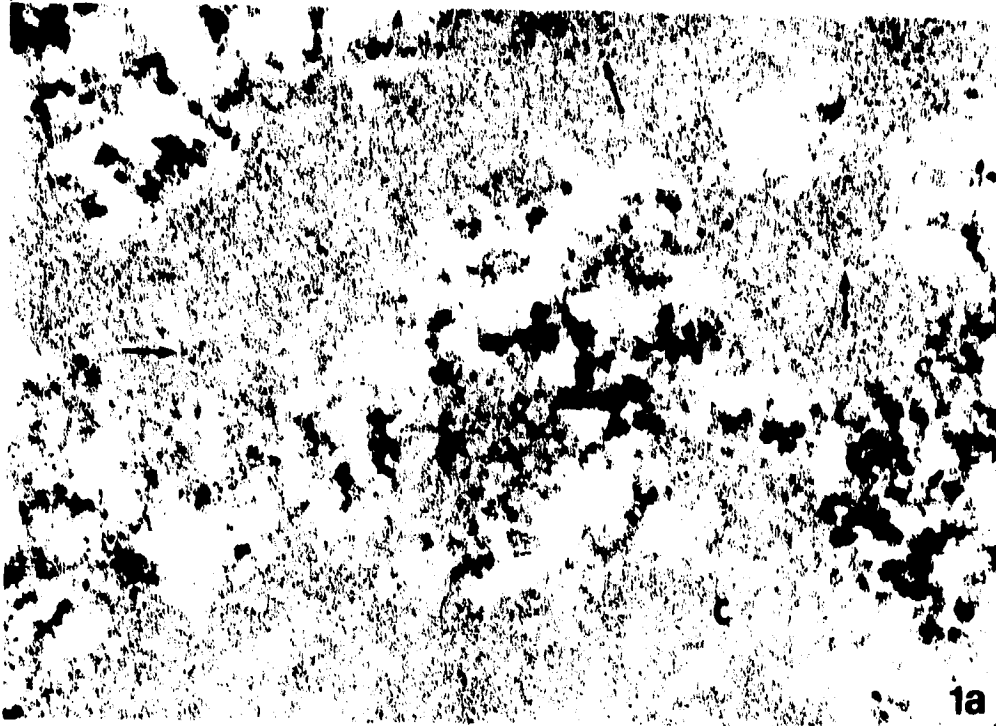
V. RESULTADOS

V.5.1. La cromatina compacta

En la figura 1a se ilustra una porción de un núcleo de *L. schismatica* teñido con la tinción de Bernhard preferencial para ribonucleoproteínas, en el cual se observa un blanqueo diferencial de la cromatina con pequeñas partículas fuertemente contrastadas inmersas en la cromatina blanqueada. En la figura 1b se observan a gran aumento las partículas mencionadas y las cuales pueden observarse al microscopio electrónico en cortes ultrafinos sin contrastar de diversos órganos de *L. schismatica* incluidos en resinas epóxicas (inset), lo que demuestra que tienen contraste propio y que su presencia no es un artefacto producido por la tinción de EDTA. Un estudio detallado de las partículas presentes en la cromatina compacta indica que no se encuentran distribuidas homogéneamente, pudiendo encontrarse dispersas o formando agrupaciones. El estudio morfométrico revela un tipo de gránulos con un diámetro promedio de 17 ± 0.8 nm, los cuales son escasos y se localizan aislados en la cromatina compacta y otro tipo de gránulos con un diámetro promedio de 9 ± 0.5 nm. Estos últimos generalmente se encuentran formando cúmulos en la cromatina. Al aplicar la prueba de T de Student se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de partículas inmersos en la cromatina compacta ($p > 0.01$) (Tabla 1 al final de esta sección), lo que indica que hay dos tipos de gránulos inmersos en la cromatina compacta con características de tamaño y abundancia diferentes.

Fig. 1a. Micrografía electrónica de un núcleo de *L. schismatica* teñido con la técnica de EDTA preferencial para ribonucleoproteínas. En el retículo de cromatina blanqueado se observan pequeñas partículas ("gránulos de cromatina"), positivas a la tinción (Flechas). Cromatina (c). 38 750 X

Fig. 1b. Gran aumento de una pequeña porción de un núcleo de *L. schismatica*. Se observa un segmento de cromatina blanqueado con pequeños gránulos EDTA positivos (Flechas). En al periferia de la cromatina compacta se observan fibras entremezcladas con los gránulos de *Lacandonia* con la misma densidad de tinción que las partículas de cromatina. 152 000 X. En el inset se muestra un segmento de cromatina sin contraste y en cual están inmersos los "gránulos de cromatina" (flechas) 150 000 X



V.5.2. Distribución de los factores esenciales de splicing SC35, SF2 y snRNPs en los núcleos de *L. schismatica*

Distribución del factor esencial de splicing SC35.

En la figura 2a se observa que el factor esencial de splicing SC-35 se distribuye principalmente en el borde de la cromatina compacta en la llamada región pericromatiniana en asociación con las fibras pericromatinianas y en una proporción muy baja se distribuye en el espacio intercromatiniano en donde se asocia con fibras pero no así con los cúmulos de gránulos de *Lacandonia* los cuales carecen de marcaje.

Es interesante hacer notar, que en los núcleos de *L. schismatica*, el factor esencial de splicing SC35, además de asociarse a las estructuras ya mencionadas también se encuentra asociado a regiones particulares de cromatina compacta, donde su distribución no es homogénea, sino que se localiza, en la mayoría de las veces, formando cúmulos asociados a regiones particulares de cromatina. El factor esencial de splicing SC35 también puede encontrarse disperso en el retículo de cromatina aunque esto último con menor frecuencia. Estos resultados se visualizan al microscopio electrónico como cúmulos de partículas de oro entremezclados con partículas de oro dispersas en la cromatina compacta. La frecuencia baja de estructuras anulares en los núcleos de *L. schismatica* no permitió determinar si estas estructuras contienen el factor de splicing SC35. Los anticuerpos α -SC35 y α -SF2 fueron utilizados a partir de una dilución stock donada por el Dr. A. Krainer y cuya concentración se desconoce.

Localización del factor de splicing SF2.

El estudio de la distribución del factor SF2 en los núcleos de *L. schismatica* indica que este factor tiene una distribución muy similar a la del factor SC35, es decir, se asocia principalmente a la periferia de la cromatina compacta. En el nucleoplasma se

Fig. 2a. Inmunolocalización ultraestructural del factor esencial de splicing SC35 en un núcleo de *L. schismatica*. Abundantes partículas de oro en la periferia de la cromatina compacta se señalan con flechas. Las cabezas de flecha muestran partículas de oro en forma de racimos o como partículas aisladas en la cromatina compacta. Cromatina (c). 30 000 X

Fig. 2b. Inmunomarcaje del factor esencial de splicing SF2. Este factor se encuentra formando pequeñas agrupaciones en la cromatina compacta o de manera aislada (cabezas de flecha) y en la periferia de la cromatina compacta (flechas) 44 000 X

Fig. 2c. Inmunolocalización de los snRNPs que intervienen en la maduración del pre-mRNA. En la cromatina compacta (c) se presentan cúmulos de partículas de oro entremezclados con partículas aisladas (cabezas de flecha). Nótese el inmunomarcaje en la periferia de la cromatina compacta y en el espacio incromatiniano (flechas) 45 000 X

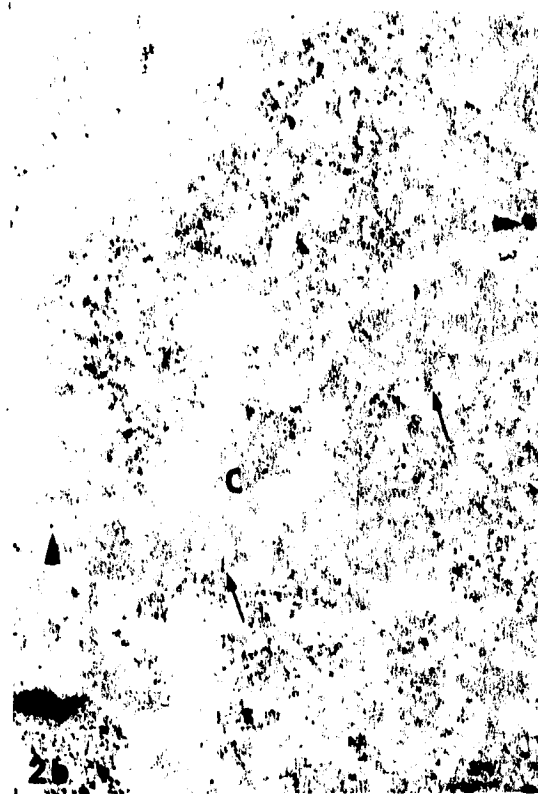
Fig. 2d. Núcleo de *L. schismatica* contrastado con la tinción de Bernhard. Las "partículas de cromatina" presentan una distribución similar a la de los factores de splicing de las figuras 2a-c (cabezas de flecha) encontrándose como agrupaciones de partículas o como partículas aisladas. 36 000 X



2a



2c



2b



2d

asocia a las fibras entremezcladas con los gránulos de *Lacandonia*, sin embargo, la proporción del factor SF2 localizado en el espacio intercromatiniano es muy baja y no tiene relación con los gránulos de *Lacandonia* como puede observarse en la figura 2b. Al igual que el factor SC35, es evidente la asociación de SF2 a regiones particulares de cromatina compacta principalmente en forma de cúmulos y en menor proporción como partículas aisladas. A diferencia de lo que ocurre con el factor SC35 la proporción de partículas de oro localizadas en la periferia de la cromatina compacta y en la cromatina compacta es menor. Debido a que las estructuras anulares son escasas en los núcleos de *L. schismatica*, no pudimos establecer si hay relación entre éstas y el factor SF2.

Distribución de los snRNPs en los núcleos de *L. schismatica*

Como se puede observar en la figura 2c, los snRNPs tienen un patrón de distribución similar al de los factores esenciales de splicing que no forman snRNPs. Este factor forma pequeños agregados en algunas regiones de cromatina y en otras zonas de la misma se encuentra como partículas dispersas. En el espacio intercromatiniano se observan algunas partículas de oro asociadas a las fibras que están en contacto estrecho con los gránulos de *Lacandonia*. Los snRNPs también se encuentran distribuidos en el anillo externo de las estructuras anulares. Sin embargo, a pesar de que se observan partículas de oro distribuidas a lo largo del anillo externo también se presentan algunos espacios en el mismo que no presentan partículas de oro.

Resumiendo, los tres factores de splicing muestran una distribución muy similar agrupándose en tres dominios: 1) La periferia de la cromatina compacta en asociación con las fibras pericromatinianas, 2) la región intercromatiniana en donde se asocian básicamente en dos subdominios: las fibras entremezcladas con los gránulos de *Lacandonia* en una proporción muy baja y con las estructuras anulares en el caso de los snRNPs y 3) inmersos en la cromatina compacta con una distribución heterogénea en la misma. Los resultados obtenidos en el último dominio mencionado son

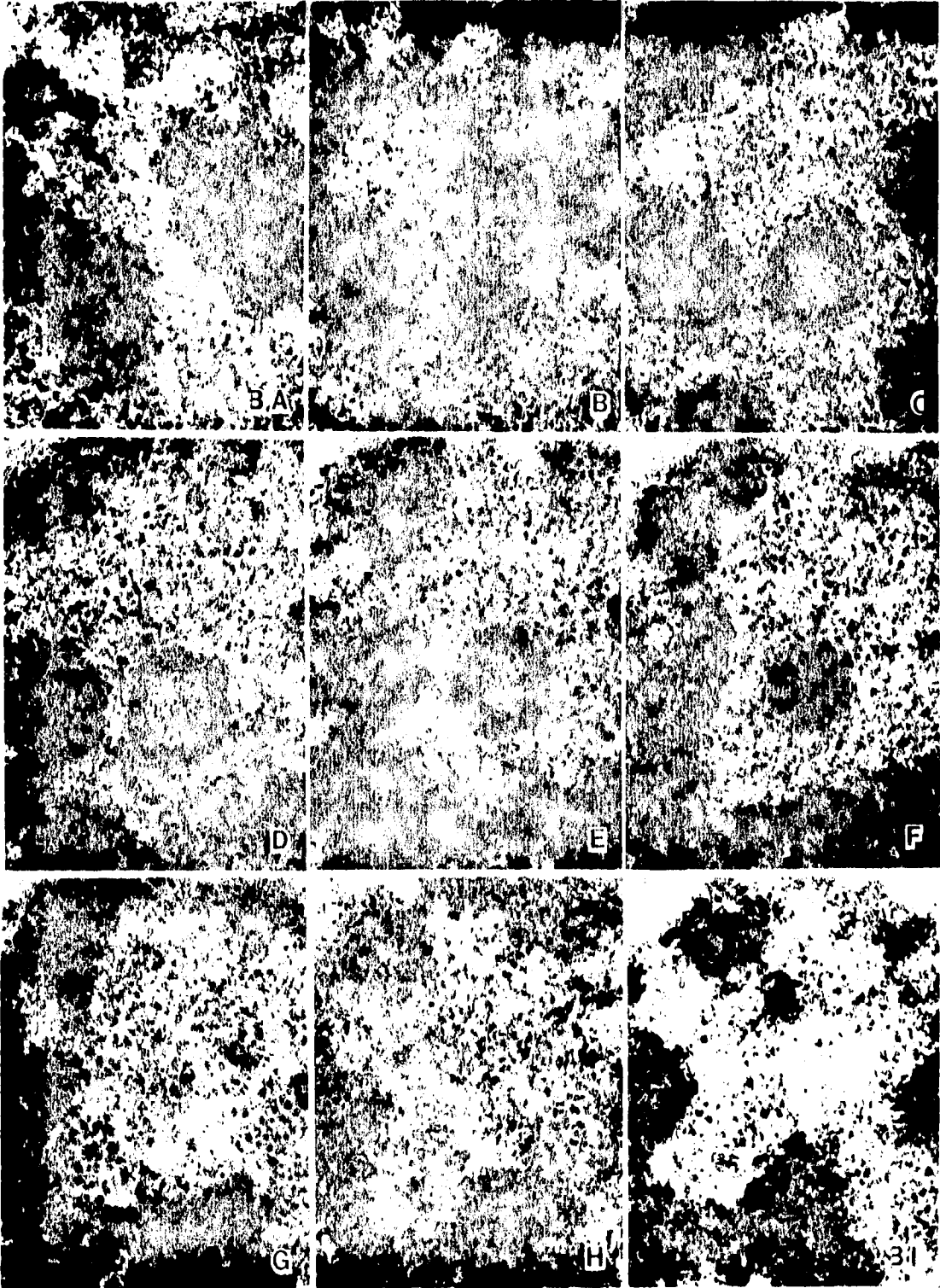
sorprendentes y parecen tener relación con los resultados obtenidos en la cromatina compacta al aplicar la tinción de Bernhard preferencial para ribonucleoproteínas.

Es interesante hacer notar que los factores de splicing SC35, SF2, los snRNPs, y las partículas localizadas en la cromatina compacta presentan un patrón de distribución muy similar (Fig 2d), es decir, formando cúmulos y en menor proporción de manera aislada.

V.5.3. Estructuras anulares

En el presente trabajo realizamos un estudio citoquímico e inmunocitoquímico detallado de las estructuras anulares. La figura 3 ilustra la reconstrucción tridimensional de una estructura anular que demuestra que tales estructuras son esferas "huecas" que consisten de una cubierta fibrosa. Un corte ultrafino a través de la mitad del hueco de la esfera dará la imagen de una estructura anular (figs. 3C-E), pero un corte a través de la cubierta fibrosa proporcionará la imagen de una estructura muy similar a un cuerpo espiralado como se puede apreciar en la figura 3B y 3F. Las figuras 3A, 3G, 3H, Y 3I muestran imágenes de los cortes anteriores y posteriores a esta estructura e ilustran el ambiente fibrogranular en el cual estas estructuras están inmersas. Es decir, las estructuras anulares están entremezcladas con fibras y gránulos de *Lacandonia*. En la figura 4A se muestra la ultraestructura de un cuerpo espiralado y en la figura 4B se ilustra la cubierta fibrosa de una estructura anular al mismo aumento donde se muestra con detalle su similitud. Además la reconstrucción tridimensional permite corroborar que en realidad, el interior de la esfera no está vacío sino que está compuesto por un material electrodenso de naturaleza fibrosa. El anillo externo de las estructuras anulares tiene un diámetro promedio de 89 ± 5.7 nm, el componente central tiene un diámetro promedio de 144 ± 7.4 nm y la estructura anular completa mide en promedio 626 ± 99 nm de diámetro (Tabla 2 al final de esta sección).

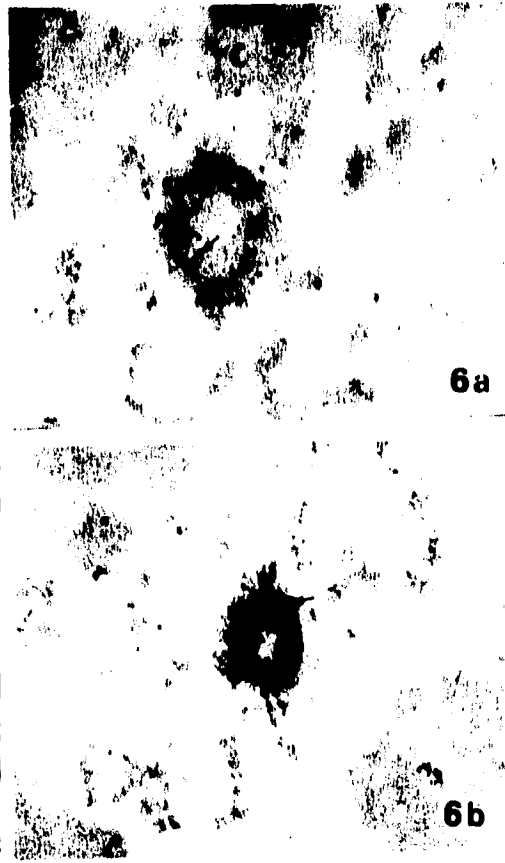
Fig. 3. Reconstrucción tridimensional de una estructura anular. Las figuras A, G, H e I ilustran cortes anteriores y posteriores a la estructura anular y muestran el ambiente fibrogranular en el cual está inmersa esta estructura. Las figuras 3B y F muestran un corte a través de la cubierta fibrosa. Las figuras 3C, D y e ilustran cortes a través de la mitad de la estructura anular. 43 200 X



Figs. 4 A y 4B. Micrografías electrónicas de un cuerpo espiralado de *L. schismatica* (A) 50 000 X, y una estructura anular cortada a través de la cubierta fibrosa (B) 49 600 X, contratastados con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Figs. 5 a y 5b. Inmunolocalización ultraestructural con anti-DNA de las estructuras anulares de *L. schismatica*. La cromatina (c) se marca con abundantes granos de oro. Sin embargo, las estructuras anulares (flechas) carecen de marcaje. 64 000 X

Figs. 6a y 6b. Inmunolocalización de snRNPs en las estructuras anulares. El anillo externo de estas estructuras contiene abundantes partículas de oro (flechas). En la figura 6b se observa que las partículas de oro no se distribuyen siempre homogéneamente en el anillo externo. 64 000 X



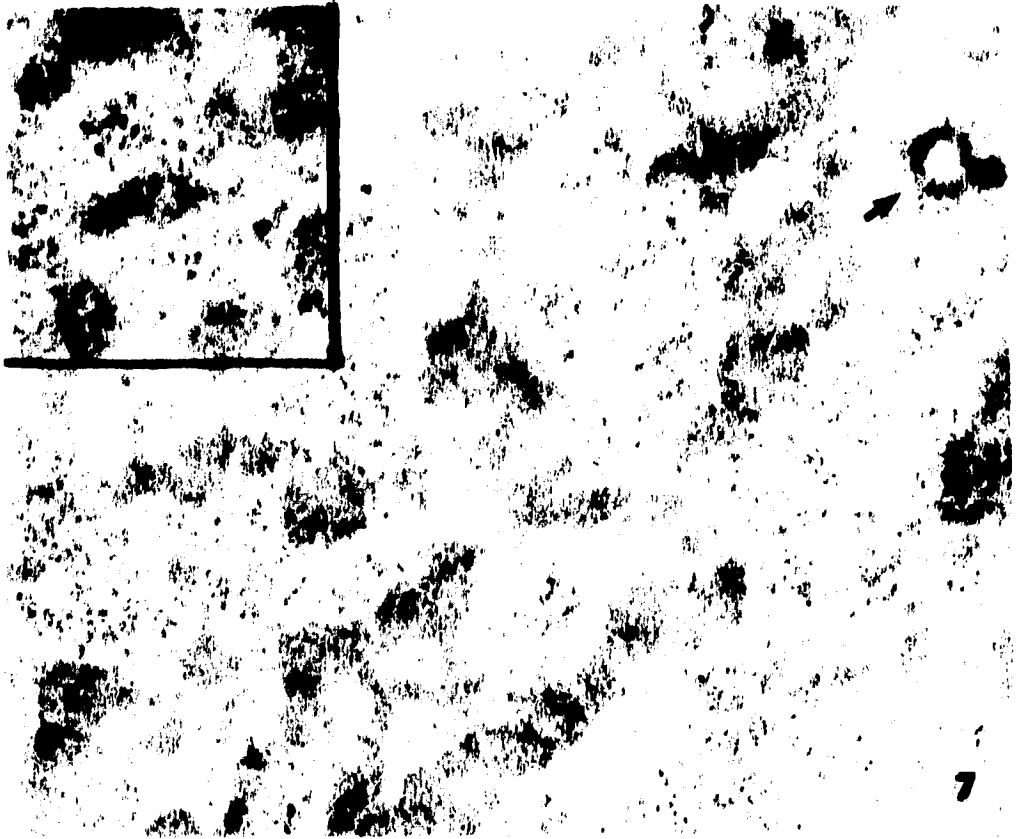
Por otra parte, el uso del anticuerpo α -DNA en los núcleos de *L. schismatica* demuestra que el anillo externo y la parte central de estas estructuras no contiene DNA como se muestra en las figuras 5a y 5b. Las estructuras anulares están en contacto estrecho con fibras de cromatina que se extienden al nucleoplasma y que pueden estar en contacto con masas de cromatina compacta. Además, como se aprecia en las figuras 6a y 6b, las estructuras anulares contienen snRNPs en su componente externo pero no así en el interno. La distribución de los snRNPs en el anillo externo no es homogénea aunque se localiza a lo largo del anillo externo.

El uso del anticuerpo α -p80-coilina demuestra que esta proteína, específica de cuerpos espiralados, no es componente de las estructuras anulares como puede observarse en la figura 7. En la misma figura se observa la asociación del anticuerpo anti-p80 coilina a un cuerpo espiralado (inset).

V.5.4. Estructuras tipo complejo sinaptonémico

En este trabajo realizamos un estudio detallado del espacio claro de las estructuras tipo complejo sinaptonémico con técnicas convencionales para microscopía electrónica. Como ya había sido mencionado en trabajos anteriores, contiene un material fibroso como se aprecia en la figura 8a. A gran aumento el material fibroso se observa como dos filamentos delgados que se extienden a lo largo del espacio claro de estas estructuras uniéndose en el extremo de la estructura tipo complejo (Fig. 8b). Los dos filamentos mantienen un contacto estrecho pudiéndose observar puntos de unión entre ambos elementos. Para detectar posibles puntos de unión de las estructuras tipo complejo sinaptonémico con la envoltura nuclear realizamos la reconstrucción tridimensional de estas estructuras (Fig. 10) observándose claramente la forma de guirnalda o herradura, unida por sus extremos a la envoltura nuclear, lo que demuestra la estrecha relación que las estructuras tipo complejo sinaptonémico guardan con la envoltura nuclear. En la figura 8a se observa la unión de una estructura tipo complejo sinaptonémico con la envoltura nuclear. Al aplicar la tinción de Bernhard a estas estructuras se observa que hay una región de posible naturaleza

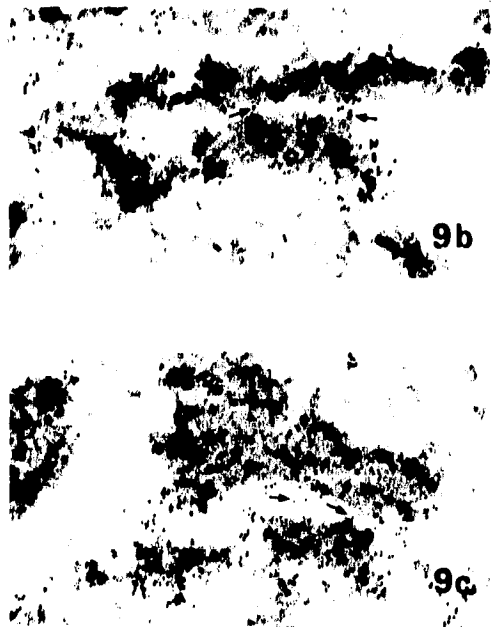
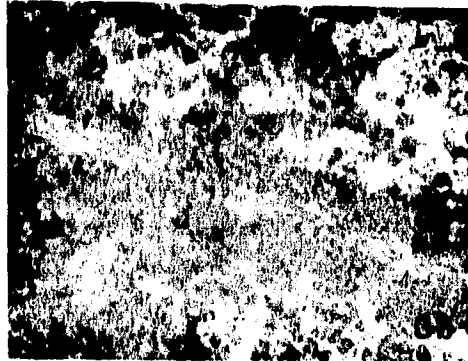
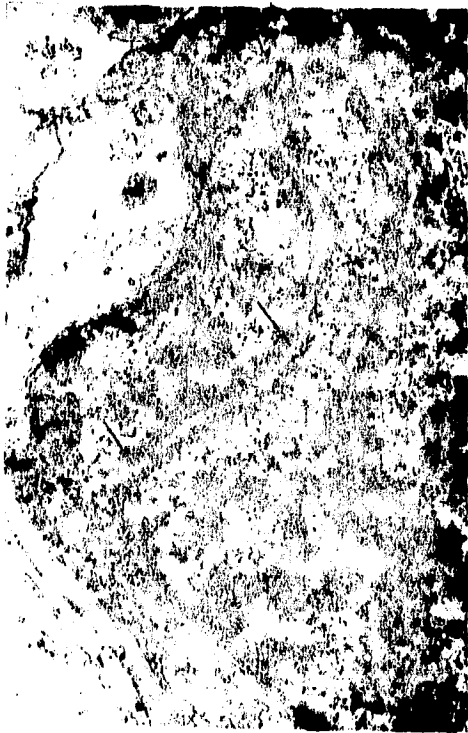
Fig. 7. Inmunolocalización del anticuerpo anti-p80 coilina. Las estructuras anulares (flecha) no contienen esta proteína 50 000 X, se observan abundantes partículas de oro en un cuerpo espiralado en formación (inset), 86 000 X.



Figs. 8a-c. Micrografía electrónica de una estructura tipo complejo sinaptonémico teñida con acetato de uranilo-citrato de plomo. El espacio claro de estas estructuras (Fig 8a) contiene un material fibroso (flechas) 14 400 X. En la Figura 8b se observan a gran aumento dos filamentos que se extienden paralelos en el espacio claro (cabezas de flecha) y la unión de los dos filamentos en el extremo de estas estructuras. (flecha). 56 700 X. En la figura 8c se observa un detalle de los filamentos del espacio claro así como algunas regiones donde dichos filamentos están en contacto estrecho 34 000 X (flechas).

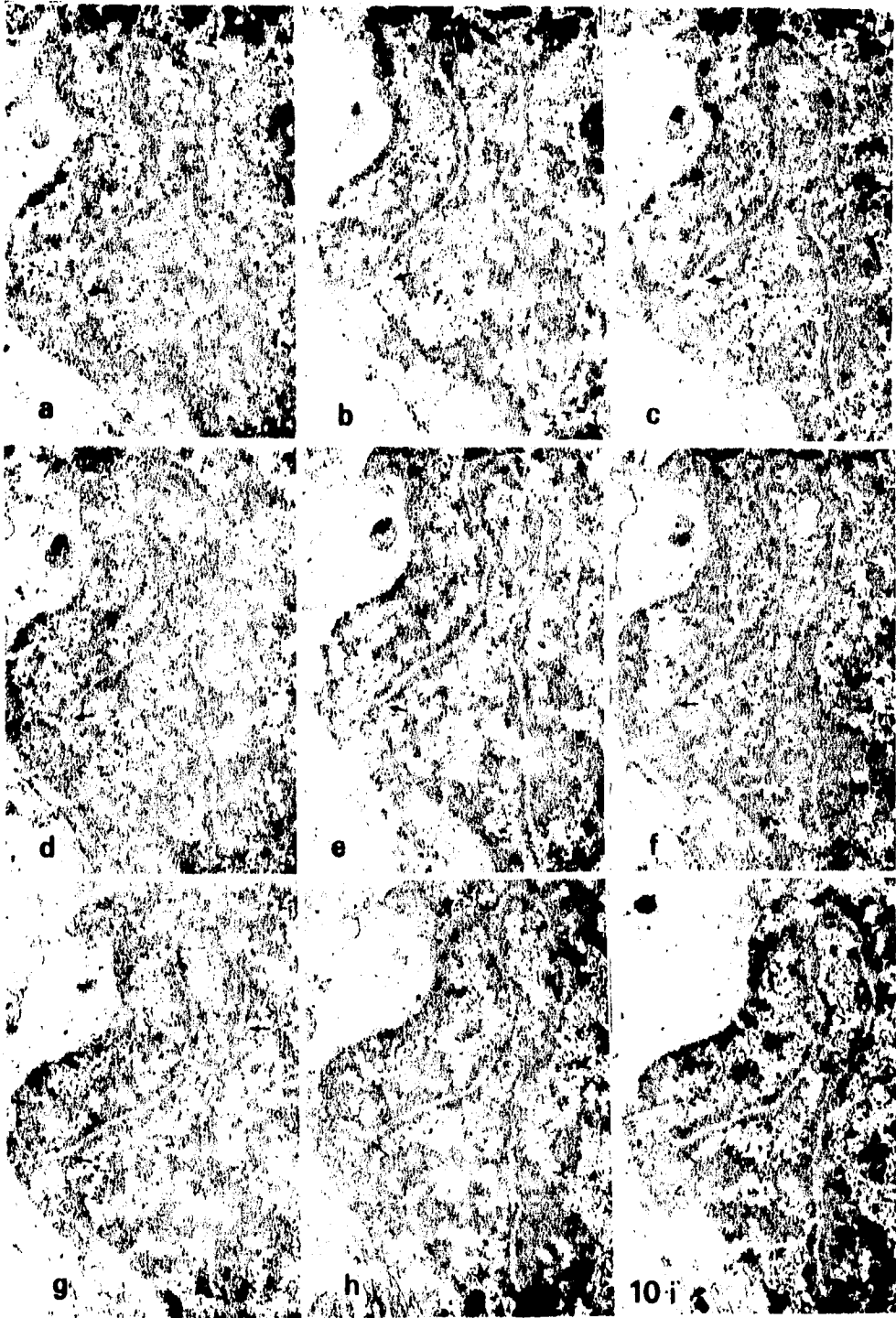
Fig. 9a. Estructura tipo complejo sinaptonémico contrastada con la tinción preferencial de Bernhard. Se observan regiones positivas a la técnica en lo que parece corresponder a los brazos laterales de un complejo sinaptonémico típico (flechas). 45 000X.

Figs. 9b-c. Inmunolocalización del DNA en las estructuras tipo complejo sinaptonémico. En el espacio claro de estas estructuras se observan algunas partículas de oro. La cromatina (c) se marca con abundantes partículas de oro. 48 000 X y 30 000 X respectivamente.



ribonucleoproteica que se extiende a ambos lados de la región fibrosa de esta estructura en lo que parece corresponder a los brazos laterales de una estructura tipo complejo sinaptonémico típica, observándose zonas de mayor positividad a la técnica (Fig. 9a). En la figura 9b se observa que las estructuras tipo complejo sinaptonémico contienen escasos filamentos de DNA que se observan como partículas de oro que se extienden e interconectan las masas de cromatina compacta (Figs. 9b y 9c).

Figs. 10 a-q. Reconstrucción tridimensional de una estructura tipo complejo sinaptonémico. Nótese que los extremos mantienen un contacto estrecho con la envoltura nuclear (flechas), 9 600 X





"Gránulos de Cromatina"				
	Media promedio X (nm)	error estandard	desviación estandard	grados de libertad
Gránulos dispersos en la cromatina	17.4	0.8	3.62	40
Gránulos que forman cúmulos	9.21	0.48	2.18	

Tabla 1. Prueba de T de Student para el diámetro de los "gránulos de cromatina" en los núcleos de *L. schismatica*. Hay diferencias significativas entre los gránulos dispersos en la cromatina y los gránulos pequeños que forman acúmulos, en cuanto a su diámetro ($t=33.4355$; $p < 0.001$).

Estructuras anulares			
	Media promedio X (nm)	error estandard	desviación estandard
Anillo externo	88.8	98.8	241.9
Parte central	143.5	74.7	182.9
Estructura anular completa	626	98.8	241.9

Tabla 2. Diámetro de los diferentes componentes ultraestructurales de las estructuras anulares en los núcleos de *L. schismatica*.

VI. DISCUSION

Presencia de partículas de posible naturaleza ribonucleoproteica en la cromatina compacta de los núcleos de *L. schismatica*

En el presente trabajo describimos dos tipos de partículas, aparentemente ribonucleoproteicas, asociadas con la cromatina compacta, que consideramos no habian sido descritas con anterioridad. Para fines de referencia, las denominamos por ahora "gránulos de cromatina" ("chromatin granules").

Los "gránulos de cromatina" que tienen contraste propio, se observan muy bien cuando se destiñe la cromatina con la tinción de EDTA. El hecho de que los "gránulos de cromatina" se observen en cortes sin teñir, podría indicar que representan átomos de elevado peso atómico que forman pequeños conglomerados en la cromatina compacta y cuyo contraste no se debe a la tinción de EDTA, sino a características propias que los hacen visibles al microscopio electrónico, aún en preparaciones sin contrastar. Sin embargo, para establecer si efectivamente los "gránulos de cromatina" contienen ribonucleoproteinas, es necesario realizar digestiones enzimáticas con RNAsa y con pronasa seguida de RNAsa.

Alternativamente, los "gránulos de cromatina" podrían representar iones bivalentes inmersos en la cromatina compacta. Para analizar esta posibilidad, sería útil realizar digestiones enzimáticas con DNAsa en los núcleos de tejidos incluidos en la resina LRW y posteriormente analizar las regiones digeridas por la enzima (cromatina compacta) con el microscopio de pérdida de energía de electrones (EELS), con el propósito de rastrear iones bivalentes tales como Ca^{2+} o Mg^{2+} .

Es interesante hacer notar que el patrón de distribución de los "gránulos de cromatina" es similar al de los factores de splicing estudiados, lo que podría indicar una relación espacial estrecha entre ambos. Sugerimos que los factores SC35, SF2 y los snRNPs están asociados o son componentes de los "gránulos de cromatina".

Estos factores podrían representar sitios adicionales de almacén y/o ensamblaje de factores de splicing que participan activamente en el splicing de los RNAs pre-mensajeros, los cuales se sintetizan en el borde de la cromatina compacta, movilizándose a las regiones de transcripción activa, en un proceso similar al propuesto por Spector y colaboradores en 1993. La asociación de los factores de splicing SC35, SF2 y snRNPs a la cromatina compacta no había sido descrita antes en los núcleos de otra especie de plantas ni ha sido descrita en los núcleos de células animales.

Distribución de los factores esenciales de splicing snRNPs, SF2y SC35 en los núcleos de *L. schismatica* y su relación con la distribución de estos factores en los núcleos de mamíferos y otras plantas.

Los estudios sobre la organización de los factores de splicing en los núcleos celulares de mamíferos realizados al microscopio electrónico han permitido proponer un modelo en el cual los factores de splicing, están asociados a tres componentes estructurales del núcleo. Estos componentes son: los cúmulos de gránulos intercromatinianos, las fibras pericromatinianas y los cuerpos espiralados (Spector y col., 1983; Fakan y col., 1984; Puvion y col., 1984; Spector, 1990 ; Spector y col., 1991). Por otra parte, se ha propuesto que en los núcleos reticulados de plantas, los snRNPs se encuentran asociados con las fibras pericromatinianas e intercromatinianas pero no así con las partículas ribonucleoproteicas presentes en el espacio intercromatiniano (Testillano y col., 1993), presentando un patrón difuso al microscopio de fluorescencia. En los núcleos reticulados, los snRNPs se encuentran asociados con las fibras pericromatinianas, pero no se ha podido establecer si son componentes de los gránulos intercromatinianos (Vázquez-Nin y col., 1992). Beven y colaboradores en 1995 encontraron que en plantas, estos factores se distribuyen en los cuerpos espiralados y en una red intercromatiniana que sugieren son las fibras y gránulos intercromatinianos.

En este estudio encontramos que los factores de splicing en los núcleos de *L. schismatica* se localizan en los dos dominios de distribución propuestos para estos factores en los sistemas de plantas y animales estudiados hasta ahora: las fibras pericromatinianas y el espacio intercromatiniano aunque en este último encontramos un subdominio nuevo para los snRNPs: las estructuras anulares. Sin embargo, además de encontrarse asociados a estos sitios, los factores de splicing (snRNPs, SC35 y SF2) se distribuyen también en un tercer dominio que hasta ahora no había sido descrito: la cromatina compacta. Lo anterior indica que a pesar de que los factores de splicing en los núcleos de la especie en estudio comparten características de distribución similares con los factores de splicing publicados en la literatura para plantas y animales, difieren en algunos aspectos de la observada en estos sistemas por su asociación a la cromatina compacta. Estos resultados son inesperados y no habían sido descritos con anterioridad. La cromatina compacta parece constituir una región enriquecida en elementos moleculares relacionados con la maduración del pre-mRNA.

Debido a que la proporción de factores de splicing en el nucleoplasma es muy baja, y en el caso de los snRNPs también se asocia a las estructuras anulares, proponemos que los "gránulos de cromatina" unidos a la cromatina compacta (que de acuerdo a nuestros resultados parecen tener una relación con los factores de splicing) y al anillo externo de las estructuras anulares, representan sitios adicionales de almacén y/o ensamblaje de factores de splicing que responden a la actividad transcripcional activa en el borde de la cromatina compacta, enviando o transportando (en el caso de las estructuras anulares) a esta zona, los factores de splicing que contienen. Este mecanismo de movilización de los factores de splicing a los sitios de transcripción activa (la región pericromatiniana) fue propuesto para los factores de splicing localizados en los cúmulos de GICs y los cuales responden a la activación de alguna señal (Jiménez-García y col., 1993).

A pesar de las discrepancias encontradas en cuanto a la distribución de los factores de splicing en los núcleos de *L. schismatica* con respecto al de otras plantas y animales, no puede dejar de advertirse que hay una conservación de la distribución nuclear de

los elementos que intervienen en el splicing de los pre-mRNAs en los diferentes grupos de animales y plantas. La presencia de factores de splicing en la cromatina de los núcleos de *L. schismatica* parece representar un mecanismo adicional de almacén y / o ensamblaje para el procesamiento del RNA.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo indican claramente la distribución de los factores de splicing en los núcleos de *L. schismatica* y permiten establecer comparaciones con otros sistemas de plantas y animales, así como proponer hipótesis sobre su dinámica dentro del núcleo, son necesarios estudios de inmunofluorescencia e hibridación *in situ*, que proporcionen información sobre la dinámica de los factores de splicing en los núcleos de esta especie y que junto con la información de inmunomarcaje ultraestructural, permitan tener una visión más completa de los elementos moleculares que intervienen en el splicing del pre-mRNA, de las relaciones que estos factores guardan con los diferentes dominios intranucleares y de su organización intranuclear.

Por otra parte, en el presente trabajo aportamos evidencias adicionales de que los gránulos de *Lacandonia* no son partículas equivalentes a los GICs, ya que no contienen el factor esencial de splicing SC35, que es marcador específico de los gránulos intercromatinianos. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los gránulos de *Lacandonia* son estructuras equivalentes a los gránulos pericromatinianos y a los gránulos de Balbiani y los cuales son estructuras que parecen contener RNA mensajero libre de intrones (Vázquez-Nin y col., 1990).

A pesar de algunas variaciones en tamaño y abundancia de los diferentes componentes ribonucleoproteicos, los núcleos de animales, plantas y hongos presentan un patrón morfológico común para el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA (Jiménez-García y col., 1989a), por lo que la presencia de estructuras ribonucleoproteicas diferentes a las estructuras canónicas de esos reinos, podrían definir un grupo de organismos con un mecanismo alternativo de procesamiento del pre-mRNA. Los gránulos de *Lacandonia* son estructuras ribonucleoproteicas que si

bien son equivalentes a los GPCs y a los gránulos de los anillos de Balbiani, presentan características únicas de tamaño y distribución que podrían contribuir a definir a los miembros del Orden Triuridales como un grupo natural. Los gránulos de *Lacandonia* pueden tener relación con un cambio macroevolutivo el cual podría verse reflejado en la aparición de un mecanismo alternativo de procesamiento con su contraparte morfológica: los gránulos de *Lacandonia*; sin embargo, su presencia no puede ser explicada a la luz de los conocimientos actuales por lo que es necesario conocer la dinámica de estas partículas en el núcleo y determinar su composición molecular por técnicas bioquímicas.

La ausencia de los GICs característicos de plantas y animales en el área intercromatiniana de los núcleos de *L. schismatica* (Jiménez-García y col., 1992) y la presencia de cúmulos de abundantes gránulos de *lacandonia* equivalentes a los GPCs que carecen de factores de splicing parece explicar la baja frecuencia de los factores de splicing snRNPs, SF2 y SC35 en el espacio intercromatiniano aunque no explica el significado funcional de la organización de los factores de splicing en los núcleos de esta especie en la cromatina compacta y en las estructuras anulares.

Las estructuras anulares: cuerpos nucleares involucrados en el procesamiento del RNA

En el presente trabajo demostramos que las estructuras anulares son cuerpos nucleares diferentes de los cuerpos espiralados típicos de animales y plantas, ya que a diferencia de estos últimos, son estructuras compartimentalizadas molecular y estructuralmente que difieren en su composición molecular con respecto a los cuerpos espiralados ya que no contienen la proteína p80-coilina característica de los mismos. No obstante estas diferencias, ambos cuerpos nucleares presentan características de tamaño, distribución y composición molecular similares como se ilustra en la tabla 3 al final de esta sección.

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre las estructuras anulares en los núcleos de *L. schismatica* concuerdan y amplían los obtenidos recientemente por Ochs y col., (1995), en núcleos de hepatocitos de gallo estimulados con estradiol. Sus resultados en un sistema con núcleos animales y los nuestros, en un sistema de plantas indican que las estructuras anulares no contienen la proteína p80-coilina y además, el estudio de la formación de las estructuras anulares en ambos sistemas por medio de cortes seriados, indica que son estructuras esféricas con un componente fibrilar externo que rodea a una zona fibrogranular de menor densidad. Además, nuestros resultados amplían los obtenidos por Ochs y colaboradores en 1995, al demostrar que las estructuras anulares en los núcleos de la planta *L. schismatica* contienen snRNPs en el anillo externo y aunque se desconoce el significado funcional de esta observación, la presencia de los snRNPs en el anillo externo involucra a estas estructuras en el procesamiento del pre-mRNA. Las estructuras anulares representan un compartimiento intercromatiniano enriquecido en snRNPs al contrario de lo que sucede con las fibras que se extienden en el nucleoplasma y en las cuales este factor de splicing no es tan abundante. La ausencia de DNA en las estructuras anulares descarta la posibilidad de que el anillo externo sea cromatina.

Ochs y col., en 1995, propusieron que las estructuras anulares pueden representar un cuerpo nuclear hueco "cargado", en el proceso de transportación del contenido que encierra para su "descarga" en alguna localización específica. En este estudio, proponemos que las estructuras anulares pueden representar sitios de ensamblaje y/o transporte de factores de splicing involucrados en el procesamiento del pre-mRNA. Sin embargo, son necesarios estudios definitivos al microscopio electrónico para poder establecer si los cuerpos nucleares en forma de anillo descritos por Ochs y col., (1995), Jiménez-García y col., (1992); Agredano y col., (1994) y por Puvion-Dutilleul y col., (1993), son estructuras involucradas en el procesamiento del pre-mRNA y el pre-rRNA como es el caso de los cuerpos espiralados, y si además, representan sitios de síntesis y/o vía de transporte para transcritos producidos por la RNA pol III como fue propuesto por Jiménez-García y col., (1993).

En este estudio se ha mostrado que las estructuras anulares contienen snRNPs. Sin embargo, el anticuerpo Y-12 que utilizamos reconoce un epítipo común a las partículas ribonucleoproteicas que contienen los snRNAs U1, U2, U4, U5 y U6 (anti-Sm). Sin embargo, no proporciona información de cuáles son, exactamente, los snRNAs presentes en las estructuras anulares o "ring shaped bodies" por lo que es necesario llevar a cabo estudios de hibridación *in situ* con sondas específicas para cada snRNA y conocer el contenido de snRNAs de las estructuras anulares y determinar si contienen todos los snRNAs comunes a los cuerpos espiralados y a los organelos esféricos que como ya sabemos son los siguientes: los snRNAs U1, U2, U4, U5 y U6 (involucrados en el splicing del pre-mRNA) y U7 (involucrado en el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA de las histonas). También, es importante conocer si las estructuras anulares contienen elementos nucleolares como el U3 snRNA, involucrado en el procesamiento del rRNA y la proteína ribosomal S6 como ha sido descrito para los cuerpos espiralados. Además, es necesario establecer si las estructuras anulares o "ring shaped Bodies" que contienen la proteína PML son similares a los observados en las células animales sensibles a estrógenos y a las estructuras anulares de plantas.

Por otra parte, los cuerpos espiralados están involucrados en el procesamiento del pre-mRNA, sufren cambios (ciclos de ensamblaje-desensamblaje) durante el ciclo celular y estos rearrreglos parecen tener relación con el evento transcripcional el cual también se modula a través del ciclo celular (Brasch, 1992; Carmo-Fonseca, y col., 1993, Lamond y Carmo-Fonseca, 1993). Las estructuras anulares parecen estar involucradas en el metabolismo del pre-mRNA, por lo que es necesario conocer la dinámica de estas estructuras a través del ciclo celular lo cual contribuirá a conocer su papel en el metabolismo del RNA.

Recientemente se ha propuesto que los anillos compactos ricos en RNA viral observados por hibridación *in situ* ultraestructural en células infectadas con el adenovirus Ad5 (Puvion-Dutilleul y col., 1992) corresponden a las inclusiones virales que contienen VAI RNAs (RNA asociado al adenovirus 2 vistas como cuerpos

esféricos en el nucleoplasma en células HeLa infectadas con el adenovirus 2 (Ad2)) y que la presencia de VA RNAs pueden estar relacionadas a un sitio de síntesis y/o vía de transporte para transcritos producidos por la RNA pol III (Jiménez-García y col., 1993).

La revisión de la literatura sobre cuerpos nucleares permite establecer que las estructuras anulares son estructuras universales que están presentes en células de animales y plantas. En células animales se han encontrado en células PtK2 (Jiménez-García, 1988), en núcleos de células estimuladas con estrógenos (Brasch, y col., 1989; Ochs, 1995), en los núcleos de las glándulas salivales estimuladas con ACTH (Weber y col., 1964); en núcleos de células del tejido nervioso central de hamster, tratados con el carcinógeno 1,2,5, 6-dibenzantroceno, así como con un extracto del hamster-passage virus derivado de la línea inicial SL1 del linfoma Burkitt (Popoff & Stewart, 1968), en linfocitos de ratón estimulados con concavalina A (Chaly y col., 1983a; Chaly y col., 1983b); en núcleos de células tumorales humanas y en núcleos de bazo de pacientes con leucemia y con la enfermedad de Hodgkin (Krishan, y col., 1967).

En plantas, se han encontrado en los núcleos de plantas saprófitas como, *L. schismatica* (Lacandoniaceae), *Voyria aphylla* (Gentianaceae) y *Gymnosiphon divaricatus* (Burmaniaceae) (Jiménez-García y col., 1992). Estos cuerpos nucleares se encuentran en los núcleos de células de animales y plantas bajo condiciones normales, patológicas, en células estimuladas con hormonas y en infecciones virales. Lo anterior indica que las estructuras anulares o "ring shaped bodies" son estructuras universales presentes en el reino Animalia y Plantae por lo que sería interesante conocer si también se presentan en el reino Fungi, lo cual corroboraría la importancia de estas estructuras en el metabolismo del RNA. La presencia de las estructuras anulares en los núcleos de células animales y plantas y la presencia de snRNPs en las estructuras anulares de *L. schismatica* indica que estas estructuras juegan un papel importante en el procesamiento del RNA.

Las estructuras tipo complejo sinaptonémico

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan evidencias citoquímicas e inmunocitoquímicas de similitud, en la estructura molecular de las estructuras tipo complejo sinaptonémico con los complejos sinaptonémicos típicos de la profase meiótica, debido a la presencia de ribonucleoproteínas y DNA distribuidos de una manera similar a la que se encuentra en los complejos sinaptonémicos típicos (Vázquez-Nin y col., 1993). Sería útil conocer si las estructuras tipo complejo sinaptonémico presentan componentes moleculares proteicos relacionados con los complejos sinaptonémicos, sin embargo, los anticuerpos desarrollados contra los componentes proteicos (SCP1, SCp3, SCp4, SC48) de los complejos sinaptonémicos de especies relacionadas han mostrado una reactividad variable y limitada. Por otra parte, no se han observado reacciones cruzadas entre vertebrados, invertebrados, plantas y hongos, lo que dificulta el uso de los anticuerpos disponibles (Moens, 1993).

Nuestros resultados indican un fuerte punto de similitud entre las estructuras tipo complejo sinaptonémico y los complejos sinaptonémicos típicos: su asociación a la envoltura nuclear. La similitud (en algunas regiones), de las estructuras tipo complejo sinaptonémico con la envoltura nuclear, podría sugerir que estas estructuras se forman como resultado de una invaginación de la envoltura nuclear hacia el interior del núcleo. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada ya que el espacio claro de esta estructura no se extiende de manera azarosa atravesando por igual componentes nucleoplásmicos, cromatina o el cuerpo nucleolar, sino que solo se extiende a lo largo de segmentos de cromatina compacta.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, podrían sugerir que las estructuras tipo complejo sinaptonémico de los núcleos del tegumento del óvulo de *L. schismatica*, pueden representar complejos sinaptonémicos con una ultraestructura y composición de escasa complejidad, los cuales se forman con elementos moleculares como los filamentos de DNA que interconectan a los cromosomas y regiones

ribonucleoproteicas apenas distinguibles que parece corresponder a los brazos laterales de los complejos sinaptonémicos típicos de la profase meiótica.

Además, las estructuras tipo complejo sinaptonémico de los núcleos en interfase pudieran representar un apareamiento somático en los núcleos interfásicos de *L. schismatica* mediado por un mecanismo parecido al de la profase meiótica y que en las células meióticas alcanza un grado de complejidad mayor con la formación de elementos estructurales (elementos laterales y elemento central) y moleculares (elementos proteicos), bien definidos que caracterizan a los complejos sinaptonémicos de animales, plantas y hongos.

Las estructuras tipo complejo sinaptonémico podrían representar relictos de complejos sinaptonémicos presentes en células somáticas que posiblemente pertenezcan a la misma estirpe celular que las células reproductoras diferenciadas y que a diferencia de estas no alcanzaron un grado de diferenciación celular completo.

CUERPOS ESPIRALADOS	ESTRUCTURAS ANULARES
Generalmente se encuentran en estrecha asociación con el nucléolo (Raska y col., 1990 a).	Se encuentran en asociación con el nucléolo o en el nucleoplasma en asociación con los gránulos de <i>Lacandonia</i> . (Jiménez-García y col., 1992)
El componente ribonucleoproteico está distribuido homogéneamente en toda la estructura	Compartimentalización del componente ribonucleoproteico en la parte central de esta estructura
No contienen DNA (Monneron y Bernhard, 1969, Raska y col., 1991).	No contienen DNA (Agredano-Moreno y col., 1994)
Cuerpos esféricos de 0.5 a 1.0 μm	Cuerpos esféricos de 0.5 a 1 μm
Estructuras universales	Estructuras universales
<u>Composición Molecular</u>	<u>Composición Molecular</u>
1) snRNAs U2, U4, U5, U6, U7, 2) proteína p80-coilina, 3) proteínas del organizador nucleolar (NOR) teñidas con plata, 4) DNA topoisomerasa I, 5) El factor U2AF, y 4) la proteína ribosomal S6	1) snRNPs en el anillo externo 2) Ribonucleoproteínas positivas a la tinción de Bernhard en la parte central
No hay compartimentalización molecular y ultraestructural de sus componentes	Compartimentalización ultraestructural y molecular de sus componentes
Cuerpos nucleares involucrados en el procesamiento del pre-mRNA y del pre-rRNA.	Cuerpos nucleares involucrados en el procesamiento del pre-mRNA.

Tabla 3. Ultraestructura y composición molecular de los cuerpos espiralados y las estructuras anulares

VII. CONCLUSIONES

Factores de splicing

1) Los factores de splicing SF2, SC35 y los snRNPs se localizan en las fibras pericromatinianas y en el espacio intercromatiniano en asociación con fibras. Además, los factores de splicing estudiados se localizan en la cromatina compacta y en las estructuras anulares (en el caso de los snRNPs).

2) Los factores de splicing parecen ser componentes de los "gránulos de cromatina" ya que hay una relación espacial estrecha entre ambos elementos.

3) Los "gránulos de cromatina" y las estructuras anulares pueden jugar un papel muy importante en el splicing del pre-mRNA que se sintetiza en el borde de la cromatina compacta.

Estructuras anulares

1) Las estructuras anulares son cuerpos nucleares diferentes a los cuerpos espiralados ya que:

- Son estructuras compartimentalizadas molecular y ultraestructuralmente
- No contienen la proteína p80-coilina específica de los cuerpos espiralados

2) Las estructuras anulares de los núcleos de *L. schismatica* son homólogas a las encontradas por Ochs y col., (1995) en núcleos de hígado de gallo estimulados con estradiol ya que:

- En ambos sistemas las estructuras anulares carecen de la proteína p80-coilina y corresponden a esferas "huecas" con una cubierta fibrosa.

3) Con base en su contenido de snRNPs, las estructuras anulares pueden ser sitios de ensamblaje y/o transporte de estos componentes y cuya función es importante para el metabolismo del RNA.

4) Las estructuras anulares son cuerpos nucleares universales que se presentan en los núcleos de las células animales y plantas bajo condiciones normales, patológicas, en células sensibles a estrógenos y en células con infecciones virales.

5) A pesar de que las estructuras anulares son cuerpos nucleares diferentes de los cuerpos espiralados que contienen elementos moleculares involucrados en el procesamiento del pre-mRNA y el pre-rRNA, es importante conocer si a semejanza de estos últimos, las estructuras anulares también están involucradas en el procesamiento del pre-rRNA y determinar su contenido de snRNAs por medio de estudios de hibridación *in situ* con sondas específicas para cada uno de los snRNAs que intervienen en el splicing del pre-mRNA y para el U3 snRNA involucrado en el procesamiento del pre-rRNA. Por otra parte, es importante conocer si estas estructuras puedan representar sitios de síntesis y/o vía de transporte para transcritos producidos por la RNA pol III.

Estructuras tipo complejo sinaptonémico

1) Las estructuras tipo complejo sinaptonémico presentan elementos moleculares similares a los complejos sinaptonémicos como son la presencia de DNA y ribonucleoproteínas distribuidos de manera similar.

2) La asociación de las estructuras tipo complejo sinaptonémico a la envoltura nuclear es una fuerte evidencia de similitud entre ambas estructuras.

3) Dada la similitud, en algunas regiones, de la estructura tipo complejo sinaptonémico a la envoltura nuclear, es posible que las primeras representen complejos sinaptonémicos con un grado de complejidad menor.

VIII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Agredano-Moreno., L.T., Jiménez-García, L.F. Echeverría, O.M. Ramos, C.H. Martínez, E. and Vázquez-Nin, G.H. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. Biol. Cell. 82: 177-184.

Ajey, C.W. & Radermacher, M. 1993. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by threedimensional cryo-electron microscopy. J. Cell Biol. 122: 1-19.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York & London.

Andrade, L.E.C., Chan, E.K.L., Raska, I., Peebles, C.L. Roos, B. and Tan, E.M. 1991. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. J. Exp. Med. 173: 1407-1419.

Andrade, L.E.C., Tan, E.M., and Chan, E.K.L. 1993. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1947-1951.

Bachelierie, J.P., Puvion, E. and Zalta, J.P. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. Eur. J. Biochem. 58: 327-337.

Baldwin, J.P., Boseley, P.G., Bradbury, E.M., and Ibel, K. (1975). The subunit structure of the eukaryotic chromosome. Nature 253: 245-249.

Barrack, E.R. & Coffey, D.S. 1980. The specific binding estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues. J. Biol. Chem. 255: 7265-7275.

Baurén, G. & Wieslander L. 1994. Splicing of Balbiani Ring 1 Gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. Cell 76: 183-192.

Berezney, R. Coffey, D.S. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. Biochem. Biophys Res. Commun.60: 1410-1417.

Berezney, R. & Coffey, D. 1977. Nuclear matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. 73: 616-637.

Berezney, K. & Bucholtz, L.A. 1981. Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid. Biochemistry 20: 4995-5002.

- Beven, A.F., Simpson, G.G., Brown, J.W.S. and Shaw P.J. 1995. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. *J. of Cell Science*. 108: 509-518.
- Bode, J. Kohwi, Y. Dickinson, L. Joht, T., Klehr, D. Micke, C. , Kohwi-Shigematzu, T. 1992. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*. 255: 195-197.
- Bouteille, M., Laval, M., and Dupuy-Coin, A. M. 1974. Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. in *The Cell Nucleus* (Busch, H. 8ed) Vol. 1 (part 1): pp 3-71, Academic Press, New York.
- Buchwalow, I.B. & Unger, E. 1997. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exp. cell Res*. 106: 139-150.
- Brasch, K., Harrington, S., and Blakem H. 1989. Isolation and Analysis of nuclear bodies from estrogen-stimulated chick liver. *Exp. Cell Res*. 182: 425-435.
- Brasch, K. and Ochs, R.L. 1992. Nuclear bodies (NBs): A newly 'rediscovered' organelle. *Exp. Cell. Res*. 202: 211-223.
- Burke, B. and Gerace, L. 1986. A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44: 639-652
- Busch, H. & Smetana K. 1970. *The Nucleolus*. Academic Press. Inc., New York. p.p 160-2208.
- Bustin, M., Lehn, D.A., and Landsman D. 1990. Estructural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1049: 231-243.
- Cáceres, J. F.; Stamm, S., Helfman, D.M., and Krainer, A.R. 1994. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265: 1706-1709.
- Cajal, S.R. 1903. Un sencillo método de coloración del reticulo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 2: 129-221.
- Carmo-Fonseca, M. , Tollervey, D. Peeperkok, R., Barabino, S.M.L., Merdes, A. Brunner, C., Zamore, P.D. Green, M.R., Hurt, E., Lamond, A.I. 1991a. Mammalian nuclei contain foci wich are enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *Embo J*. 19: 195-206.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Sproat, B.S., Ansonge, W: Swanson, M.S. and Lamond, A.I. 1991b. In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *Embo. J*. 10: 1863-1873.

Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T., and Lamond, A.I. 1992. Transcription-dependent co-localization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell. Biol.* 117: 1-14.

Carmo-Fonseca, M., Ferreira, J. and Lamond, A.I. 1993. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis-evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J. Cell. Biol.* 120: 841-852.

Cartwright, I.L., Keene, M.A., Howard, G.C. Abmayr, G., Fleischmann, Lowenhaupt, K. & Elgin S.C.R. 1989. Chromatin structure and gene activity: The role of nonhistone chromosomal proteins. *Crit. Rev. Biochem.* 13: 1-86.

Chaly, N., Setterfield, G., Kaplan, G.J., and Brown, D.L. 1983a. Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes:II-Cytochemistry and autoradiography during stimulation by concanavalin A. *Biol. Cell.* 1983 49: 35-44.

Chaly, N., Setterfield, G., Kaplan, J.G. and Brown, D.L. 1983b. Nuclear bodies in mouse splenic lymphocytes: I-ultrastructural changes during stimulation by Concanavalin A. *Biol. Cell* 47: 275-284.

Chamberland, H. and Lafontaine, J.G. 1993. Localization of snRNP antigens in nucleoli-associated bodies: study of plant interphase nuclei by confocal and electron microscopy. *Chromosoma.* 102: 220-226.

Christofori, G. and Keller, W. 1988. 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors in vitro requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. *Cell* 54: 875-889.

Clark, D.J. and Kimura, T. 1990. Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J. Mol. Biol.* 211: 883-889.

Claude, A., Arenas, J., Hurwitz, J. 1991. The isolation and characterization of an RNA helicase from nuclear extracts of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 266: 10358-100367.

Coello, G., Escalante, A. and Soberón J. 1993. Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) in its only known locality. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 898-901.

Cook, P.R. 1989. The nucleoskeleton and the topology of transcription. *Eur. J. Biochem.* 185: 487-501.

Cook, P.R. 1991. The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell.* 66: 627-636.

Cordes, V.C., Reidenbach S., Kohler, A., Stuurman N., Vandriel R., and Kranke W.W. 1993. Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. *J. Cell Biol.* 123: 1333-1344.

- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York pp 1031-1076.
- Croston, G.E., Kerrigan, L.A. Lira, L.M., Manhak, D.R., and Kadanaga J.T. 1991. Sequence-specific antirepression of histone h1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 251: 643-649.
- Daskal, Y. 1981. Perichromatin granules. In: *The Cell Nucleus*. Vol. VIII, H. Busch (ed) Academic Press, New York pp 117-137.
- Davidse, G. & Martínez, E. 1990. The chromosome number of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Systematic Botany*. 15: 635-637.
- de Thé, H. Riviere, M. and Bernhard, W. 1960. *Bull Cancer* 47: 570-584.
- Dreyfuss, G., Swanson, M. and Piñol-Roma 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends. Biochem. Sci.* 13: 86-91. I. 13:
- Dupuy-Coin, A.M., and Bouteille, M. 1972. Developmental pathway of granular and beaded nuclear bodies from nucleoli. *L. Ultrastruct. Res.* 40: 55-67.
- Dworetzky, S.I. and Feldherr, C.M. 1988. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* 106: 575-584.
- Dyck, J.A. Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A., and Evans, R.M. 1994. A novel macromolecular structure is the target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*. 76: 333-343.
- Einck, L., and Boutin M. 1983. Inhibition of transcription in somatic cells by microinjection of antibodies to chromosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 6735-6739.
- Einck, L. & Bustin M. 1985. The Intracellular distribution and function of the High Mobility Group Chromosomal proteins. *Experimental Cell Research*. 156: 295-310.
- Eliceiri, G.L. and Ryerse, J.S. 1984. Detection of intranuclear clusters of Sm antigens with monoclonal anti-Sm antibodies by immunoelectron microscopy. *Cell Physiol.* 121: 449-451.
- Esponda, P. 1977. Fine structure of synaptonemal-like complexes in *Allium cepa* microspores. *Protoplasma* 93: 1-6.
- Fakan, S., & Bernhard, W. 1971. Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 113: 327-337.

Fakan, S. & Bernhard, W. 1973. Nuclear labelling after prolonged ^3H -Uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 79: 431-444.

Fakan, S., Puvion E. and Spohr G. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99: 155-164.

Fakan, S., and Nobis, P. 1978. Ultrastructural localization of transcription sites and of RNA distribution during the cell cycle of synchronized CHO cells. *Exp. Cell Res.* 113: 327-337.

Fakan, S. & Puvion, E. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.* 65: 255-262.

Fakan, S., and Odartchenko, N. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol Cell* 37: 211-218.

Fakan, S., Leser, G. and Martin, T.E. 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry of thin sections. *J. Cell Biol.* 98: 358-363.

Feldherr, C.M. 1975. The uptake of endogenous proteins by oocyte nuclei. *Exp. Cell Res.* 93: 411-419.

Felsenfeld, G. 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355: 219-224.

Forbes, D.J. 1992. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 495-527.

Franke, W.W. & Scheer U. 1974. Structures and functions of the nuclear envelope. *The Cell Nucleus.* 1: 219-347.

Franke, W.W. 1987. Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell.* 48: 3-4.

Frey, M.R. & Matera, A.G.- 1995. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5915-5919.

Fu, D.X. & Maniatis T. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature (Lond)* 343: 437-441.

Fu, X.D., Mayeda, A., Maniatis T. and Krainer A.R. 1992. General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11224-11228.

- Gall, J.G. & Callan H.G. 1989. The sphere organelle contain small nuclear ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6635-6639.
- Ge, H., and Manley, J.L. 1990. A protein factor, ASF, controls cell specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell*. 62: 25-34.
- Gerace, L. & Blobel G. 1980. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19: 277-287.
- Gerace, L., Comeau, C., and Benson, M. 1984. Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J. Cell Sci.* 1: 137-160.
- Gerace, L. and Burke, B. 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 335-374.
- Gilmartin, G.M. and Nevins, J.R. (1988). Multiple factors are required for specific RNA cleavage at a poly(A) addition site. *Genes Dev.* 2: 578-587.
- Grant, V., 1985. *The evolutionary process*. Columbia Univ. Press., New York.
- Guldner, H.H., Szostecki, H.P., Vosberg, H.J., Lakomek, E., Penner, E. and Bautz, F.A. 1986. Sc170 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA-Topoisomerase I *Chromosoma*. 94: 132-138.
- Habets, W.J., Hoet, M.H., DeJeng, B.A.W. Vander Kemp, A. and Van Venroij, W.J. 1989. Mapping of B cell epitopes on small nuclear ribonucleoproteins that react with human autoantibodies as well with experimentally induced mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 143: 2560-2566.
- Hardin, J.H., Spicer, S.S. and Greene, W.B. 1969. The paranucleolar structure, Accessory body of Cajal, sex chromatin and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: a cytochemical and ultrastructural study. *Anat. Rec.* 164: 403-432.
- Hashimoto, C. and Steitz, J.A. 1986. A small nuclear ribonucleoprotein associates with the AAUAAA polyadenylation signal in vitro. *Cell*. 45: 581-591.
- Huang, S. and Spector, D.L. 1992. U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 305-308.
- Jiménez-García, L.F. 1988. *El Nucléolo: Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Jiménez-García, L.F., Elizundia, J.M., López-Zamorano, B., Maciel, A., Zavala, G., Echeverría, O.M. and Vázquez-Nin G.H. 1989a. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocists. *BioSystems* 22: 103-116.

Jiménez-García, L.F., Rothblum, L.L., Busch, H. and Ochs, R.L. 1989b. Nucleologenesis: use of non-isotopic in situ hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biol. Cell* 65: 239-246.

Jiménez-García, L.F., Agredano-Moreno, L.T., Segura-Valdez, M.L., Echeverría, O., Martínez, E., Ramos, C.H. Vázquez-Nin, G.H. 1992. The ultrastructural study of the interphase cell nucleus of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae:Triuridales) reveals a non-typical extranucleolar particle. *Biol. Cell* 75: 101-110.

Jiménez-García, L.F. and Spector D.L. 1993. In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell*. 73: 47-59.

Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R. and Spector, D.L. 1994. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Molecular Biology. of the Cell*. 5: 955-966.

Jordan, E.G., Timmis, J.N. Trewavas, A.J. 1980. The plant nucleus. In: Tolbert NE (ed) *The Biochemistry of plants. I. The plant Cell*. Academic Press, New York London pp 489-588.

Kaufmann, S.H., Coffey, D.S., Shaper, J.H. 1981. Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* 132: 105-123.

Kaufmann, S. 1989. Additional members of the rat liver lamin polypeptide family. *J. Biol. Chem.* 264: 3946-3955.

Kohlstaedt A.L. & Cole D.R. 1994. Specific Interaction between H1 histone and High Mobility protein HMG1. *Biochemistry* 33: 570-575.

Koken, M.H.M., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M.C., Viron, A., Linarez-Cruz, G., Stuurman, N., Jung, L., Szostecki, C., Calvo, F. Chomienne, C., Degos, L., Puvion E., and de Thé, H. 1994. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J.* 13: 1073-1083.

Kramer, D.R., Wozniak W., Blobel G. and Radu A. 1994. The human CAN protein, a putative oncogen be product asociated with myeloid leukemogenesis is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1519-1523.

Krainer, A.R. and Maniatis, T. 1988. RNA splicing. In: *frontiers in Molecular Biology: Transcription and splicing*, ed. B.O. Hames, and D.M. Glover, Washington, D.C.: IRL Press, 131-296.

- Krainer, A.R., Conway, G.C. and Kozak D. 1990a. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* 62: 35-42.
- Krainer, A.R., Conway G.C. and Kozak D. 1990b. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes & Dev.* 4: 1158-1171.
- Krämer, A., and Utans U. 1991. Three protein factors (SF1, SF3 and U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO. (Eur. Mol. Biol. Organ) J.* 10: 1503-1509.
- Krishan, A., Uzman, B.G. and Hedley-Whyte, E.T. 1967. Nuclear bodies: A component of cell nuclei. *J. Ultrastruc. Res.* 19: 563-572.
- Lafontaine, J.G. 1965. A light and electron microscope study of small, spherical nuclear bodies in meristematic cells of *Allium cepa*, *Vicia faba* and *Raphanus sativus* *J. Cell Biol.* 26: 1-17.
- Lamond, A.I., and Carmo-Fonseca, M. 1993. The coiled body. *Trends Cell Biol.* 3: 198-209.
- Landsman, D. and Bustin, M. 1993. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *BioEssays.* 15: 539-546.
- Leverette, R.D., Andrewa, M.T. and Maxwell, E.S. 1992. Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc70 heat shock pre-messenger RNA. *Cell.* Vol. 71: 1215-1221.
- Liu, J., and Maxwell, E.S. (1990). Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 heat shock gene. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6565-6571.
- Luehrsen, K. R., Taha, S. and Walbot, V., 1994. Nuclear Pre-mRNA processing in higher plants. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 17: 149-193.
- Lührmann, R., Kastner, B., and Bach, M. 1990. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochem. Biophys. Acta* 1087: 265-292.
- Madhani, H.D. and Guthrie, C. 1992. A novel base pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* 71: 803-817.
- Maniatis, T. and Reed, R. 1987. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 325: 673-678.

- Manley, J.L. Yu, H. and Ryner, L. 1985. RNA sequence containing hexanucleotide AAUAAA directs efficient mRNA polyadenylation in vitro. *Mol. Cell Biol.* 5: 373-379.
- Márquez-Guzmán, J., Engleman, M., Martínez-Mena, A., Martínez, E. & Ramos, C. 1989. Anatomía Reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 124-127.
- Márquez-Guzmán J., Vázquez-Santana S., Engleman E.M. Martínez-Mena, A. and Martínez E. 1993. Pollen development and fertilization in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 891-897.
- Mardian, J. K., Paton A.E., Bunick G.J., and Olins D.E. 1980. Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17. *Science* 26: 1534-1536.
- Martínez, E. & Ramos, C.H. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): Una nueva familia de México. *Annals of the Missouri Bot. Gard.* 76: 128-135.
- Mattaj, I.W. Boelens, W. Izaurralde, E. Jarmolowski, A. and kambach, C. 1993. Nucleocytoplasmic transport and snRNP assembly. *mol. Biol. Rev.* 18: 79-83.
- Medina, M., Moreno Díaz de la Espina, S. Martín, M. and Fernandez-Gomez M.E. 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. *Biology of the Cell* 67: 331-339.
- Mehlin, H., Daneholt, B. and Skoglund, U. 1992. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell.* 69: 605-613.
- Miller, M., Park. M.K. and Hanover, J.A. 1991. Nuclear pore complex: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71: 909-949.
- Moens, P.B. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays.* 16: 101-106.
- Monneron, A. & Bernhard, W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266-288.
- Moore, M.J. & Sharp, P.A. 1993. Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature (Lond)* 364-368.
- Moreno Díaz de la espina, S., Risueño, M.C., and Medina, F.J. 1982a. Ultrastructural, cytochemical and autoradiographic characterization of coiled bodies in the plant cell nucleus. *Biol. Cell* 44: 229-238.

Moreno Diaz de la Espina, S., Sanchez-Pina, M.A. and Risueño, M.C. 1982b. Localization of acid phosphatase activity, phosphate ions and inorganic cations in plant nuclear coiled bodies. *Cell Biol. Int. Rep.* 6: 601-607.

Moses, M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 215-218.

Newport, J., Wilson, K.L. and Dunphy W.G. 1990. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* 111: 2247-2259.

Nigg, E. 1992. Assembly-disassembly of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 105-109.

Ochs, R.L., Stein, T.W., Andrade, L.E.C., Gallo, D., Chan, E.K.L., Tan, E.M., and Brasch, K. 1995. Formation of nuclear bodies in hepatocytes of estrogen-treated roosters. *Molecular Biology of the Cell.* 6: 345-356.

Padykula, H.H., and Clark, J.H. 1981. In *the Cell Nucleus* (Busch, H. Ed.) Vol. 9, pp309-339, Academic Press. New York.

Popoff, N. and Stewart, S. 1968. The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamsters. *J. Ultrastruct. Res.* 23: 347-361.

Puvion, E. & Moyne G. 1978. Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exp. Cell. Res.* 115: 79-88.

Puvion E. and Moyne, G. 1981. In situ localization of RNA structures. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch. Ed. Academic Press. New York. Vol VIII (part 2): 59-115.

Puvion, E.A. Viron, C. Assens, Leduc, E.H., and Jeanteur. 1984. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells. *J. Ultrastruct. Res* 87: 180-189.

Puvion-Dutilleul F., Puvion, E. 1991. Sites of transcription of adenovirus type 5 genomes in relation to early viral DNA replication in infected HeLa cells. A high resolution in situ hybridization and autoradiographical study.

Puvion-Dutilleul, F. Rousseu, R. and Puvion, E. 1992. Distribution of viral RNA molecules during the adenovirus 5 infections cycle in HeLa cells. *J. struct. Biol.* 108: 209-220.

Raska, I., Ochs, R.L., Andrade, L.E. C., Chan, E.K.L., Burlingame, R., Peebles, C., Groul, D. and Tan, E.M. 1990a. Association between the nucleolus and the coiled body *J. Struct. Biol.* 104: 120-127.

Raska, I., Ochs, R.L., and Salamin-Michel, L. 1990b. Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microscop. Rev.* 3: 301-353.

Raska, I., Andrade, L.E.C., Ochs, R.L., Chan, E.K.L., Cjhang, C.M., Roos, G. and Tan, E.M., 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 1995: 27-37.

Reed, R., Griffith, J., Maniatis, T. 1988 *Cell* 53: 949.

Reichelt, R. Holzenburg, A., Buhle, E.J., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U. 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex, and of distinct pore complex proteins. *J. Cell Biol.* 110: 883-894.

Ris, H. 1991. The three-dimensional structure of the nuclear pore complex as seen by high voltage electron microscopy and high resolution low voltage scanning electron microscopy. *EMSA bulletin.* 21: 54-56.

Roth, M.B. 1995. Spheres, coiled bodies and nuclear bodies. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 7: 325-328.

Rout, M.P. and Blobel, G. 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 123: 771-783.

Rout, M.P. and Wentz, S.R. 1994. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4: 357-365.

Ruskin, B., Zamore, P.D. and Green M.R. 1988. A Factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell.* 52: 207-219.

Sandeen, G.W., Wood, I. and Felsenfeld G. 1980. The interaction of high mobility proteins HMG-14 and 17 with nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 8: 3757-3778.

Sharp, P. 1991. TFIIB or not TFIIB?. *Nature* 351: 16-18.

Scheer, U., Kartenbeck, J. Trendelenburg, M.F., Stadler J., and Franke W.W. 1976. Experimental desintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connections fibrils. *J. Cell. Biol.* 69: 1-18.

Scheer, U. & Rose, R. (1984). Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electronic microscopy immunocytochemistry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 1431-1435.

Scheer, U., Dabauvalle M.C., Markert H., Benavente R. 1988. The nuclear envelope and the organization of the pore complexes. *Cell Biol. Int. Rep.* 12: 669-689.

Seite, R., Pebusque, M.J. and Vio-Cigna, M. 1982. Argyrophilic proteins on coiled bodies in sympathetic neurons identified by Ag-NOR. *Biol. Cell* 46: 97-100.

Shick, V.V., Belyousky and Mirzabekov A.D. 1985. Primary organization of nucleosomes interaction of non-histone high mobility group proteins 14 and 17 with

nucleosomes as revealed by DNA-protein crosslinking and immunoaffinity isolation J. Mol. Biol. 185: 329-339.

Soliner-Webb B. 1993. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. Cell. 75: 403-405.

Spector, D.L., Schrier, W.H. and Busch, H. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. Biol Cell. 49: 1-10.

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., Fu D.X. y Maniatis T: 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. EMBO J. 10: 3467-3481.

Spector, D.L., Lark, G. and Huang, S. 1992. Differences in snRNP localization between transformed and nontransformed cells. Mol. Biol. Cell 3: 555-569.

Steitz, J.A., Black, D.L., Gerke, V., Parker, K.A., Kramer, A., Frendewey, D., and Keller, W. 1988. Functions of the abundant u-snRNPs. In: Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles. ed. M.L. Birnstiel, Berlin: Springer Verlag. 115-154.

Sukegawa, J. & Blobel G. 1993. A nuclear pore complex protein that contains zinc fingers motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. Cell. 72: 29-38.

Takagaki, Y., Ryner, L.C. and Manley, J.L. 1988. Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. Cell 52: 731-742.

Testillano, P.S., Sánchez-Pina A.M., Olmedilla, A., Fuchs, J.P., and Risueño. M.C. 1993. Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain containing snRNPs in plant cells. A cytochemical and immunoelectron microscopy study. European Journal of Cell Biology. 61: 349-361.

Tharappel, C.J. & Elgin S.C. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. Molecular and cellular Biology. 6: 3862-3872.

Tubo, R.A., Berzney, R. 1987. Nuclear matrix-bound DNA primase. Elucidation of an RNA priming system in nuclear matrix isolated from regenerating rat liver. J. Biol. Chem. 262: 6637-6642.

Tuma, R., Stok, J.A. & Roth, M.B. 1993. Identification and characterization of a Sphere organelle protein J. Cell. Biol. 1993. 122: 767-773.

Vagner-Capodano, A.M., Bouteille, M., Stahl, A., and Lissitzky, S., 1982. J. nucleolar ribonucleoprotein release into the nucleoplasm as nuclear bodies in cultured

thyrotropin-stimulated thyroid cells: autoradiographic kinetics. *Ultrastruct. Res.* 78: 13-25.

Vázquez-Nin, G.H. and Bernhard, W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36: 842-860.

Vázquez-Nin, G.H. and Echeverría, O.M. 1976. Ultrastructural study on meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anat.* 96: 218-231.

Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O.M. and Pedron J. 1979. Effects of estradiol on ribonucleoproteic constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35: 221-228.

Vázquez-Nin, G.H., Ortega-Rangel, J.A., Echeverría, O.M., Parra, M.R. and Jiménez-García, L.F. 1983. Changes in the nuclear ribonucleoproteic differentiation and maturation. *Biol. Cell.* 48: 17-24.

Vázquez-Nin, G.H; Echeverría, O.M., Fakan S., Leser G., and Martin T.E. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus Thummi*. *Chromosoma* 99: 44-51.

Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., Mínguez, A., Moreno Díaz de la Espina, S., Fakan, S. and Martin, T.E. 1992. Ribonucleoprotein components of root meristematic cell nuclei of the tomato characterized by application of mild loosening and immunocytochemistry. *Exp. Cell Res.* 200: 431-438.

Vázquez-Nin, G.H. Flores, E. Echeverría, O.M. Merkert, H., Wettstein, R. and Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes. *Chromosoma.* 102: 457-463.

Vázquez, S.S. 1992. Estudio estructural e histoquímico de *Lacandonia schismatica* Martínez-Ramos (Lacandoniaceae). Familia, Genero y especie nuevos para la ciencia. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Verheijen, R., Van Venrooij, W. V. and Ramaekers, F. 1988. The nuclear matrix: structure and composition. *J. Cell Sci.* 90: 11-36.

Wassef, m. 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 121-133.

Weber, A. Whipps, S., Usenik, E. and Frommes, S. 1964.. Structural changes in the nuclear body in the adrenal zona fasciculata of calf following the administration of ACTH. *J. Ultrastruct. Res.* 11: 564-576.

Weintraub, H., and Groudine M., (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193: 848-856.

Wies, K., Rambaud, S., Lavav, C., Jansen, J., Caarvalho, T., Carmo-Fonseca, M. Lamond, A., and Dejean, A. 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76: 345-356.

Weisbrod, S. 1982. Active chromatin. *Nature (London)* 297: 289-295.

Weisbrod, S. 1982. Properties of active nucleosomes as revealed by HMG-14 and HMG-17 chromatography. *Nucleic Acids Res.* 10: 2017-2042.

Westermann, R., and Grossbach V. 1984. Localization of nuclear proteins related to high mobility group protein 14 (HMG-14) in polytene chromosomes. *Chromosome.* 90: 355-365.

Wickens, M. 1990. How the messenger got its tail: addition of poly (A) in the nucleus. *TIBS* 15: 277-281.

Wilken, N., Kossner u., SenecaJ.L., Scheer U. and Dabauvalle. 1993. Nup 180, a novel nuclear pore complex protein localizing to the cytoplasmic ring and associated fibrils. *J. Cell Biol.* 123: 1345-1354.

Williams, L.M., Jordan, E.G., and Barlow, P.W. 1983. The ultrastructure of nuclear bodies in interphase plant cell nuclei. *Protoplasma.* 118: 95-103.

Wu, Z., Murphy, C. & Gall, J.G. 1994. Human p80-coilina is targeted to sphere organelles in the amphibian germinal vesicle. *Mol. Biol. Cell* 1994 5: 1119-1127.

Wu C-HH & Gall, J.G. 1993. U7 small nuclear RNA in C snurposomes of the *Xenopus* germinal vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6257-6259.

Yuang, J., Simos, G., Blobel, G. & Georgatos, S.D. 1991. Binding of lamin A to polynucleosomes *J. Biol. Chem.* 266: 9211-9215.

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: 9243-9247.

Zarkower, D.L., Stephenson, P. Shets and Wickens. 1986. The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus 40 pre-mRNA in vitro. *Mol. Cell Biol.* 6: 2317-2323.

Zhang, M., Zamore, P.D., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A. and Green, M.R. 1992. Cloning and intracellular localization of the U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor small subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8769-8773.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropica
cDNA	DNA complementario
CNs	Cuerpos nucleares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
FPCs	Fibras pericromatinianas
GPCs	Gránulos pericromatinianos
GICs	Gránulos intercromatinianos
HMG	Proteínas no histonas del grupo de alta movilidad
hnRNPs	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
PML	Proteína producida en la leucemia promielocítica
pre-mRNA	RNA pre-mensajero
pre-rRNA	RNA pre-ribosomal
m3GCap	Trimetilguanosin-cap
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
RNA	Acido Ribonucleico
RNA pol III	RNA polimerasa III
RNPs	Ribonucleoproteínas
snRNAs	RNAs pequeños nucleares
snoRNAs	RNAs pequeños nucleolares
snRNPs	Ribonucleoproteínas de pequeño tamaño