

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

EFFECTO DE LA LEPTOMICINA-B (LMB)  
SOBRE LAS PARTÍCULAS  
RIBONUCLEOPROTEÍCAS  
INTRANUCLEARES

# TESIS

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

PRESENTA

MA. LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE DE 2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

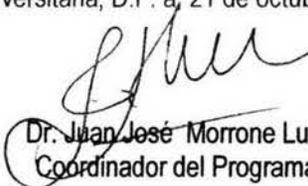
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Escobar Sánchez María Luisa**, con número de cuenta 87195295 con la tesis titulada: **"Efecto de la leptomicina-B (LMB) sobre las partículas ribonucleoproteicas intranucleares"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Olga M. Echeverría Martínez**.

Presidente:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Vocal:	Dra. María Isabel Soto Cruz
Secretario:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Suplente:	Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Suplente:	Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 21 de octubre del 2004

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

LA INVESTIGACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. OLGA MARAGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ Y CON LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ TUTORAL FORMADO POR LOS SIGUIENTES INVESTIGADORES:

DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN  
DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO PARCIALMENTE CON EL PROGRAMA PAPIIT 200101.

## DEDICATORIA

A MI FAMILIA: LUIS Y EDDY, POR QUE SON MI MAGNO TESORO Y MI MEJOR ESTÍMULO.

A MIS PADRES Y HERMANOS: PORQUE TODOS SON UN GRAN EJEMPLO DE PERSEVERANCIA, ENTUSIASMO Y TRABAJO.

## **AGRADECIMIENTOS:**

***MUY ESPECIALMENTE a la Dra. Olga M. Echeverría por el apoyo y formación recibidos durante el desarrollo del presente trabajo.***

***Al Dr. Vázquez Nin por sus invaluable comentarios.***

***A la Dra. Isabel Soto por la orientación otorgada para el presente trabajo.***

***A las doctoras Teresa Fortoul y Lourdes Segura por las aportaciones hechas a esta tesis.***

***A los compañeros de laboratorio que tanto me ayudaron: Rosario, Silvia, Lupita y Ernestina.***

***A los doctores Alejandro Zentella y Marina Macías por la donación de la línea celular HepG2.***

***A Luis Sánchez por todo su apoyo moral y académico, así como por la capacitación recibida.***

***A mis amigos Elena, Paty, David, Víctor, Susi y Daniel por su apoyo y amistad.***

***A todos muchas gracias.***

<b>ABREVIATURAS</b>	
<b>CC</b>	<b>cuerpo de Cajal</b>
<b>CPN</b>	<b>complejo de poro nuclear</b>
<b>CRM1</b>	<b>miembro de la familia de las importinas <math>\beta</math></b>
<b>DNA</b>	<b>ácido desoxirribonucleico</b>
<b>FPC</b>	<b>fibras pericromatinianas</b>
<b>GIC</b>	<b>gránulos intercromatinianos</b>
<b>GPC</b>	<b>gránulos pericromatinianos</b>
<b>LMB</b>	<b>leptomicina B</b>
<b>Pre-RNAr</b>	<b>RNA pre-ribosomal</b>
<b>RER</b>	<b>retículo endoplásmico rugoso</b>
<b>RNA</b>	<b>ácido ribonucleico</b>
<b>RNAhn</b>	<b>RNA heterogéneo nuclear</b>
<b>RNA<sub>t</sub></b>	<b>RNA de transferencia</b>
<b>RNPs</b>	<b>ribonucleoproteínas</b>
<b>SEN</b>	<b>secuencia de exportación nuclear</b>
<b>SLN</b>	<b>secuencia de localización nuclear</b>
<b>U RNA<sub>p</sub>n</b>	<b>RNA nucleares pequeños</b>
<b>Z-DNA</b>	<b>conformación Z del DNA</b>

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	2
<b>Introducción.</b>	
<b>La envoltura nuclear</b>	3
<b>Transporte núcleo-citoplasma</b>	4
<b>Partículas ribonucleoproteicas</b>	6
<b>Transcripción</b>	11
<b>Conformación Z-DNA</b>	13
<b>Splicing</b>	14
<b>Nucleolo</b>	16
<b>Antecedentes</b>	16
<b>Objetivos e hipótesis</b>	19
<b>Material y Métodos.</b>	
<b>Cultivo celular</b>	20
<b>Tratamiento con LMB</b>	20
<b>Procesamiento para Microscopía Electrónica de Transmisión.</b>	
<b>Fijación</b>	20
<b>Inclusión en Epón</b>	21
<b>Inclusión en LR White</b>	21
<b>Corte</b>	21
<b>Contraste Azul de toluidina</b>	22
<b>Contraste Ur-Pb</b>	22
<b>Contraste EDTA</b>	23
<b>Inmunolocalización electrónica de SC35</b>	23
<b>Procesamiento para Microscopía de Fluorescencia.</b>	
<b>Fijación</b>	24
<b>Anti-Z-DNA</b>	24
<b>Anti-SC35</b>	25
<b>4G3</b>	25
<b>Resultados</b>	
<b>Ur-Pb</b>	26
<b>Anti-Z-DNA</b>	28
<b>Anti-SC35 (M. Fluorescencia)</b>	30
<b>EDTA</b>	32
<b>Anti-SC35 (M. Electrónica)</b>	35
<b>4G3</b>	38
<b>Análisis de Resultados</b>	41
<b>Conclusiones</b>	44
<b>Bibliografía</b>	45

## ABSTRACT

The nuclear export inhibitor leptomycin B (LMB) prevents the export of ribonucleoprotein (RNPs) and other proteins by competing with their nuclear export signals. In this work the changes of two types of nuclear RNPs due to the administration of LMB 30 nM for 3 and 8 Hrs to cell cultures are studied. These particles are: the interchromatin granules (IG) which frequently form clusters visible with the light microscope (speckles) corresponding to a place for storing splicing factors; and the Cajal bodies (CB), which are very conserved structures containing snRNPs and proteins involved in the process of the pre-mRNA and the pre-rRNA. The changes of these particles were studied by means of ultrastructural analysis and immunocytochemistry at the level of light and electron microscope. The following antibodies were used: 4G3 reacting with the protein U2B a splicing factor mainly localized in the CBs, anti-SC35 a splicing factor concentrated in the ICs, and anti-Z-DNA to localize sites of transcription. All antibodies were localized with the fluorescence and confocal microscopes, and anti-SC35 also with the electron microscope. HeLa and HepG2 cells cultures were used. The treatment with LMB for 3 Hrs results in a reduction of the number of the speckles demonstrated by anti-SC35, accompanied by an increase of their size in both types of cells studied. After 8 Hrs of treatments these traits are more prominent. The high resolution immunolocalization of SC35 shows a decrease of the density of labeling. The number of labeled CBs decreases in 3 Hrs to less than a half of that of the control cells and after 8 Hrs of treatment their number is about 20% of that of the control cells. Transcription as revealed by anti-Z-DNA diminishes after 3 Hrs of treatment and is almost abolished by 8 Hrs of LMB. These results demonstrate that transcription and types of structures associated to splicing diminish with the inhibition of the nuclear export of RNPs and other proteins. The structures associated to splicing are clusters of ICs which correspond to the main storing place of the splicing machinery and the CB which represent an intermediary storage of some molecules associated with splicing and other nuclear functions.

## RESUMEN

La leptomicina-B (LMB), es un inhibidor del transporte núcleo-citoplasmático de proteínas, compite con la señal de exportación nuclear de RNPs y otras proteínas. En los núcleos interfásicos se encuentran las ribonucleoproteínas, dentro del grupo de las partículas ribonucleoproteicas se incluyen a los gránulos intercromatinianos, considerados como los sitios de almacén de factores de *splicing*; las fibras pericromatinianas (FP) las cuales son la manifestación morfológica de los transcritos nacientes y los cuerpos de Cajal (CC), los cuales son estructuras altamente conservadas que contienen ribonucleoproteínas (RNPs) involucradas en el procesamiento de pre-RNAr, así como RNPs spliceosomales; se ha encontrado que los CC se pueden inmunolocalizar con el anticuerpo 4G3 dirigido hacia ciertas proteínas humanas específicas como la U2B. En este trabajo, se analizó el efecto del inhibidor del transporte núcleo-citoplasma la leptomicina-B (LMB), sobre las partículas ribonucleoproteicas intranucleares, así como el efecto que esta droga causa sobre los factores de *splicing*, en especial SC35 localizado en los gránulos intercromatinianos (*speckles*) y en los lugares de almacenaje de RNPs involucradas en el *splicing* (cuerpos de Cajal); así como el efecto en el proceso de transcripción. Para esta investigación se utilizaron cultivos de células HeLa y HepG2, así como cultivos primarios de hepatocitos de rata, los cuales fueron tratados con LMB 30 nM durante 3 y 8 horas. Las células fueron inmunomarcadas para microscopía de fluorescencia con anti-SC35, 4G3 y anti-Z DNA; para conocer la ultraestructura, se realizaron tinciones generales, tinción preferencial para RNPs y se inmunolocalizó con anti-SC35 y un anticuerpo secundario acoplado a micelas de oro de 18 nm. Los resultados muestran alteración del patrón moteado normal de SC35 desde las 3 horas de tratamiento en células HeLa y HepG2 y a las 8 horas este efecto es más evidente. Las micrografías electrónicas muestran una disminución de la densidad numérica del marcado directamente relacionada con la reducción del tamaño de los cúmulos de gránulos intercromatinianos. El número de los cuerpos de Cajal también se ve afectado desde las 3 horas, ya que disminuye más de 50% en las líneas celulares HeLa y HepG2; después de 8 horas en contacto con la droga este descenso supera el 80%. El marcado del Z-DNA se ve disminuido y a las 8 horas la señal del marcado es sumamente débil. Estos resultados nos permiten inferir que el proceso de transcripción se ve disminuido y que los *speckles*, que son sitios de almacén del factor de *splicing* SC35, se ven alterados cuando la LMB inhibe el transporte núcleo-citoplasma, ya que se vuelven más brillantes y pierden el patrón difuso que los caracteriza. Así mismo, los cuerpos de Cajal, que son un almacén transitorio de ribonucleoproteínas involucradas en el *splicing*, se ven afectados en su frecuencia porque después del tratamiento, el número de puntos brillantes que indican a los cuerpos de Cajal es mucho menor e incluso después de 8 horas de tratamiento en HepG2 desaparecen.

## INTRODUCCIÓN.

Las células de eucariontes son estructuras altamente organizadas en su interior, constituidas por diferentes organelos, cada uno de ellos con funciones particulares. La estructura más conocida en casi todas las células animales y vegetales es el núcleo (descrito por primera vez por Brown en 1831), es el organelo más sobresaliente de la célula eucarionte. El núcleo puede tener diferentes localizaciones en la célula y algunas células pueden presentar más de un núcleo (por ejemplo algunos hepatocitos presentan dos núcleos, o varios como es el caso de los osteoblastos o fibras musculares estriadas) (Alberts y cols., 1996).

El núcleo contiene el ácido desoxirribonucleico (DNA) que es el material genético y los componentes necesarios para la transcripción de la información genética del ácido ribonucleico (RNA). Las observaciones al microscopio óptico, han permitido la descripción del núcleo y algunas de sus estructuras, en donde se aprecia un límite del compartimiento (envoltura nuclear), el nucleolo, cromatina en grumos y la región intercromatiniana; posteriormente, el microscopio electrónico, permitió la observación de otras estructuras ribonucleoproteicas mucho más pequeñas que el nucleolo, las cuales no se pueden observar al microscopio óptico (Maynard y Szathmáry, 1995).

### **La envoltura nuclear**

La envoltura nuclear está formada por dos membranas concéntricas perforadas por poros nucleares. A través de éstos se produce el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. La membrana más externa es continua y unida al retículo endoplásmico rugoso y el espacio entre las dos membranas se encuentra conectado con el lumen del retículo y sus características y funciones son similares a las del núcleo (Alberts y cols. 1996). Los poros nucleares son los lugares donde la membrana interior y exterior del núcleo se unen. Estos son capaces de transportar sustancias al interior del núcleo, pues poseen un diámetro de 10 nm. Estos poros nucleares permiten el intercambio de pequeños elementos entre el núcleo y el citoplasma como por ejemplo iones, moléculas polares y macromoléculas como proteínas y RNA. Es de notar que las proteínas requeridas para funciones nucleares (factores de transcripción) deben ser transportadas desde el citoplasma al núcleo (Alberts y cols. 1996). Todas las proteínas nucleares son sintetizadas en el retículo endoplásmico y pueden ser importadas al núcleo. Los RNAs transcritos en el núcleo son casi todos exportados al citoplasma en forma de ribonucleoproteínas (RNPs) (Mattaj y Elgmeier, 1998). Cada poro está constituido por una gran estructura discoidal conocida como el complejo del poro nuclear (CPN). El número de CPNs por célula depende de la demanda del transporte nuclear que varía grandemente con el tamaño celular y la actividad proliferativa y de síntesis. Hay 189 CPNs en células de levadura (Rout y Blobel, 1993), aproximadamente de 3000 a 5000 en células humanas en proliferación y de  $5 \times 10^7$  en ovocitos maduros de *Xenopus* (Cordes y cols., 1995). Aparte de la estructura de núcleo central considerablemente embebido en la membrana, los CPNs tienen fibras extendidas dentro y fuera de la membrana nuclear, pero en la superficie del nucleoplasma, las fibras son arregladas en estructuras tipo canasta (figura 1) (Kau y cols. 2004). Los CPNs de eucariontes superiores tienen una masa de aprox. 125 MDa (Reichelt y cols., 1990) y se estima que están compuestos de entre 50 a 100 diferentes proteínas llamadas nucleoporinas. La mayoría de las nucleoporinas contienen dominios característicos que consisten de numerosas repeticiones de péptidos cortos y que el extremo tiene el dipéptido Phe-Gly. Las

nucleoporinas no son simplemente componentes estructurales del CPN, sino que también funcionan como ancladores y sitios de interacción para los factores de transporte nuclear que están asociados transitoriamente con los CPNs (Görlich y Kutay, 1999).

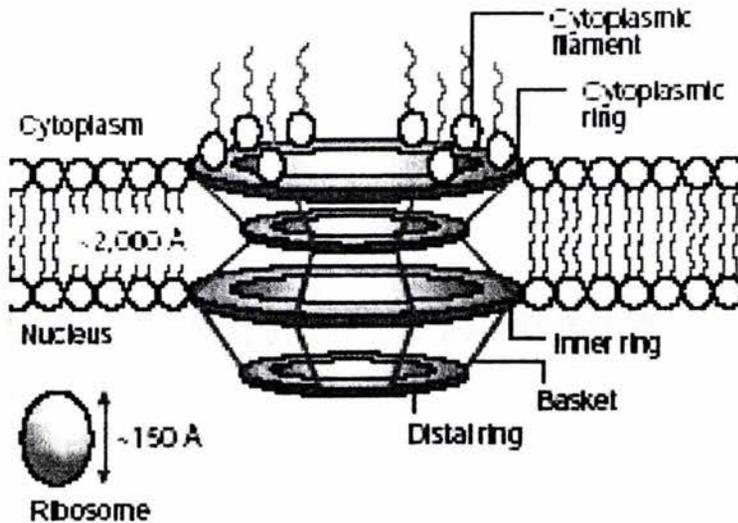


Fig. 1. Esquema del CPN, en donde se observan las extensiones citoplásmicas y nucleares que forman filamentos en el lado citoplásmico y canastas en el lado nuclear (Tomado de Kau y cols, 2004)

Los CPNs forman canales acuosos a través de los cuales se derivan todos los procesos de transporte nuclear (Dworetzky y Feldherr, 1988). Ellos permiten la difusión de pequeñas moléculas como los metabolitos y pueden permitir el transporte activo de muchas partículas grandes, el ejemplo mas extremo es la exportación de subunidades ribosomales las cuales tienen de  $1.4$  a  $2.8 \times 10^6$  Da o las partículas de anillos de Balbiani ( $>10^7$  Da) o la importación de partículas virales (Reichelt y cols., 1990). El transporte de proteínas grandes ensambladas o ribonucleoproteínas (RNPs) a través de los CPNs es diferente de la importación de proteínas en la mitocondria, cloroplastos o en el retículo endoplásmico rugoso (RER), en donde las proteínas simplemente cruzan la membrana en un estado totalmente desplegado (Reichelt y cols., 1990).

### Transporte núcleo-citoplasmático

*El transporte núcleo-citoplasmático*, es un aspecto importante de la función celular, el cual se refiere al movimiento de una gran variedad de macromoléculas dentro y fuera del núcleo (Quimby y Corbett, 2001). El dinámico transporte entre el núcleo y el citoplasma involucra primordialmente cuatro categorías: las proteínas del CPN (nucleoporinas), la RanGTPasa, los receptores de transporte llamados carioferinas (importinas y exportinas) que reconocen las moléculas cargo para ser transportadas y factores especializados que promueven el transporte de algunos complejos proteína-RNA (Kau y cols., 2004). El transporte núcleo-citoplasma, puede ser de dos formas: por difusión pasiva o por transporte activo mediado por señales.

*Difusión pasiva a través del complejo de poro nuclear (CPN).* Se cree que la difusión pasiva es efectiva con partículas de 9nm. A una escala fisiológica, las difusión pasiva es

sumamente lenta en el caso de la albúmina de suero bovino (aproximadamente 7 nm de diámetro, y 68 Kda), todavía insignificante para ovalbúmina (aprox. 6 nm de diámetro, 46 kDa) y razonablemente rápida solo para proteínas menores de 20-30 Kda. Incluso todavía las proteínas de RNAs que son tan pequeñas como las histonas (20-30 Kda) y RNAt (Arts y cols., 1998) normalmente atraviesan el CPN de un modo activo y mediado por un acarreador. Una razón para esto puede ser que los acarreadores permiten que el transporte ocurra en una forma controlada (Reichelt y cols., 1990).

*Transporte mediado por señales.* El transporte activo es un proceso selectivo iniciado por señales de transporte específicas. Las proteínas tienen funciones determinadas en el núcleo y para ser transportadas hacia él a través del poro necesitan señales específicas que son conocidas como señales de localización nuclear, las cuales están dadas por secuencias específicas de aminoácidos; éstas se caracterizan por ser regiones ricas en aminoácidos básicos, por ejemplo la señal de localización de la nucleoplasmina (una proteína involucrada en el ensamblaje de la cromatina) consiste de 2 partes, un par de Lisina-Arginina, seguidas de 4 lisinas localizadas 10 aminoácidos hacia el extremo carboxilo de las mismas. Ambas secuencias Lys-Arg y Lys-Lys-Lys-Lys son necesarias para este proceso de localización nuclear. El proceso de transporte de proteínas hacia el núcleo por el poro nuclear puede ser dividido en 2 partes diferenciadas en un proceso que requiere energía, mientras el siguiente paso no la requiere. En ausencia de ATP, las proteínas que contienen una señal de localización nuclear se unen al núcleo por medio del poro, pero no pasan a través de él. En este paso inicial estas señales son reconocidas por un receptor en el lado citosólico formando un complejo. Este receptor es conocido como importina, el cual consiste de 2 subunidades: una  $\alpha$  importina y una  $\beta$  importina, esta segunda subunidad parece mediar la asociación con el complejo de poro. El segundo proceso es dependiente de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) y guanosinatrifosfato (GTP). Aquí la  $\alpha$  importina parece ser transportada a través del poro con la proteína sustrato, en este proceso la  $\beta$  importina es disociada y queda en el citoplasma celular (Xu y Massagué, 2004).

Como se ha mencionado, para que las proteínas sean importadas al núcleo deben tener señales llamadas secuencias de localización nuclear (SLN) y las proteínas que van a ser exportadas del núcleo contienen secuencias de exportación nuclear (SEN). Estas señales son reconocidas por factores solubles que trabajan con el ciclo de la Ran GTPasa para coordinar la importación y exportación al núcleo (Quimby y Corbett, 2001). La Ran GTPasa es crítica en la generación de la asimetría de la importación o exportación al núcleo, por lo tanto, depende de la asociación entre el sustrato y su receptor en un sitio de la envoltura nuclear. La regulación del transporte núcleo-citoplasmático generalmente involucra una inhibición específica de la formación de un complejo de transporte (Mataj y Elgmeier, 1998). El transporte núcleo-citoplasmático es dirigido por la Ran GTPasa (una proteína de 25-kDa que se encuentra principalmente en el núcleo) (Moore, 1998), que hidroliza GTP muy lentamente y consecuentemente se encuentra en forma de trinucleótido y es regulado por la interacción con una variedad de proteínas efectoras (Quimby y Corbett, 2001). La estricta compartimentalización de RanGAP al citoplasma y RanGEF en el núcleo, sugiere que Ran se encuentra primordialmente unida con GTP en el núcleo y unida a GDP en el citoplasma. Como consecuencia Ran se puede mover del núcleo y al

citoplasma al pasar por un ciclo completo de unión e hidrólisis de GTP (figura 2). Otro grupo importante de proteínas que se unen a Ran es la familia de proteínas importina- $\beta$ , las cuales funcionan como receptores de transporte. Además del tráfico de proteínas, también se lleva a cabo el intercambio de una gran variedad de clases de RNAs, incluyendo RNA mensajero (RNAm), RNA de transferencia (RNAt) y RNA nucleares pequeños involucrados en el *splicing* de RNA (U RNApn), los cuales deben ser transportados a sus sitios de acción en el citoplasma. Estos RNA nucleares pequeños son sintetizados en el núcleo y posteriormente exportados al citoplasma en donde se asocian con pequeñas ribonucleoproteínas maduras, estos complejos son finalmente exportados del núcleo por un miembro de la familia de las  $\beta$  importinas la CRM1.

CRM1 fue el primer receptor de exportación de RNA en ser identificado: reconoce SEN ricas en leucina de la proteína Rev del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, HIV1 (una proteína adaptadora que se une a la región estructurada de RNA dentro de un intrón de HIV y de este modo facilita la exportación del pre-RNAm en HIV) (Moore y Rosbash, 2001).

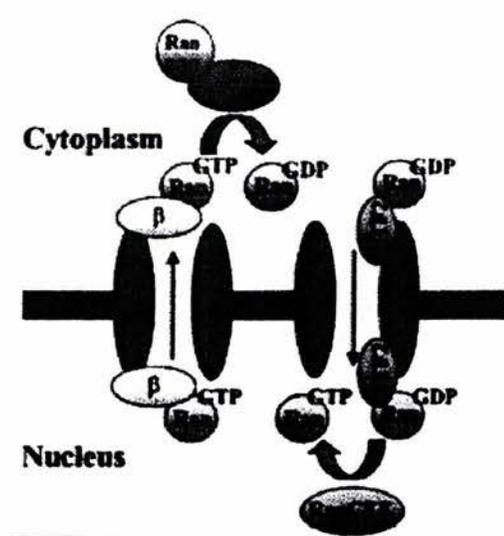


FIGURA2. El ciclo de Ran. RanGDP es importado al núcleo por NTF2. Una vez en el núcleo, el factor intercambiador de nucleótidos RanGEF intercambia GDP por GTP. RanGTP se intercambia por GTP, entonces RanGTP interactúa con miembros de la familia de proteínas importinas- $\beta$  y es exportado al citoplasma en forma de complejo con las proteínas importina- $\beta$ . En el citoplasma, la actividad de la Ran GTPasa es estimulada por la proteína activadora Ran GAP, Ran GAP forma un complejo con RanBP1, resultando en la producción de RanGDP. Tomado de Quimby y Corbett, 2001.

Mientras muchas proteínas son transportadas desde el citoplasma al núcleo, los RNA son exportados del núcleo al citoplasma. Hay muchas partículas ribonucleoproteicas que son exportadas del núcleo (RNPs) que pueden tener una composición grande y compleja. Las subunidades ribosomales son un ejemplo obvio y los mRNPs otro.

### Partículas ribonucleoproteicas

En un núcleo interfásico, se encuentran las diferentes partículas ribonucleoproteicas no nucleolares como son las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados. Tales estructuras fueron

caracterizadas por medio del microscopio electrónico de transmisión utilizando métodos de citoquímica ultraestructural, que permitió la localización de los complejos de RNA y proteínas de tamaño menor a la décima parte de una micra.

### *Fibras pericromatinianas*

Las fibras pericromatinianas (FPC), fueron sin duda el hallazgo más importante hecho por Monneron y Bernhard (1969) junto con la tinción que emplea acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo de Bernhard (1969), las que se contrastan en la periferia de la cromatina compacta. Las FPC están altamente enrolladas e irregularmente entremezcladas. Su diámetro es variable de 3 a 5 nm e incluso arriba de 20 nm. Algunas pueden formar gránulos transitoriamente. La longitud total de estas fibras es muy difícil de determinar, pero en los hepatocitos de rata tratados con hidrocortisona se ha mostrado una longitud aproximada de 120 nm. Estas fibras se caracterizan por ser ricas en RNA y su presencia ha sido descrita en varios tipos celulares eucariotes. Las FPC están en contacto con los bordes de cromatina compacta. Esta región es comúnmente llamada región pericromatiniana, y representa una región nucleoplasmática donde la síntesis de RNA heterogéneo tiene lugar. Monneron y Bernhard (1969), sugieren una relación de estas estructuras con la síntesis de RNA extranucleolar. Esto fue corroborado por Petrov y Bernhard (1971), quienes utilizando sustancias que inducen modificaciones de la síntesis de RNA observaron variaciones en la cantidad de FPC como respuesta temprana; Fakan y Bernhard (1971), observaron la incorporación de uridina tritiada luego de breves administraciones del precursor. La demostración definitiva de que las FPCs, contienen RNA pre-mensajero, también llamado heterogéneo nuclear (RNAhn), proviene de la correlación de estudios bioquímicos y ultraestructurales de fracciones de núcleos. En una de estas fracciones coexisten el RNAhn de marcado rápido y las FPCs (Bachelierie y cols, 1975; Fakan y otros, 1976). El RNAhn es una copia del gen y está formado por secuencias en las que están codificadas partes de un polipéptido (exones) y otras (intrones) cuya secuencia de bases no corresponden a los aminoácidos del polipéptido. Para que se forme el RNA mensajero maduro traducible por los ribosomas en secuencias de aminoácidos, es necesario quitar los intrones y unir los exones (*splicing*). Además del *splicing*, la maduración del mensajero requiere otras dos modificaciones que son el agregado de capucha (cap) en el extremo 5' del RNA naciente y la adición de 100 a 200 unidades de ácido adenílico (poli-A) al extremo 3'. La capucha de guanina deriva del GTP y se une con su extremo 5' al extremo 5' del RNA, luego se metila, así como también la primera base de RNAhn. Esta adición otorga estabilidad a la molécula, impidiendo su pronta degradación por RNAasas (Vázquez-Nin y cols., 2003). En los trabajos donde se analizaban hepatocitos de rata adrenalectomizadas e inmediatamente inyectadas con cortisona, se observaba un rápido incremento en la cantidad de FPC después de la administración de la hormona. Además, su densidad disminuye después de someter a ratas a  $\alpha$ -amanitina, que actúa como un inhibidor de la RNA polimerasa II. Otros experimentos mostraron el decremento de las FPC utilizando inhibidores de la síntesis de RNAm análogos de adenosina como la diaminoribofuranosilbencimidazol (RBD). También se ha observado un notable incremento en la densidad de fibras pericromatinianas durante la embriogénesis de mamíferos, con nuevas fibras formadas en la periferia de la cromatina compacta donde se lleva a cabo la síntesis de RNAhn en el embrión. Experimentos con autorradiografía de alta resolución pusieron de manifiesto una rápida marca de RNA asociada a fibras pericromatinianas en cromatina activa aislada. En experimentos posteriores, se vio que la ausencia de suero

propicia un decremento en las FPC, y que éstas reaparecen análogamente con la síntesis de RNAhn en la periferia de la cromatina compacta después de la estimulación con cortisol. Este tipo de experimentos indicaron que las FPCs son el constituyente estructural nucleoplasmático que contiene los RNA extranucleolares recién sintetizados. (Pérez, 2001).

Evidencias directas de la naturaleza de las FPC fueron obtenidas por la combinación de estudios autorradiográficos y análisis bioquímicos de subfracciones nucleares aisladas enriquecidas en RNP extranucleolares. Estas fracciones contenían FPC bien caracterizadas morfológicamente asociadas con pre-RNA<sub>m</sub> y sus productos de maduración podían ser seguidos por pruebas específicas. Posteriormente se hicieron pruebas inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ* que revelaron la presencia sobre las fibras pericromatinianas de snRNP, U1, U2, RNA<sub>p</sub>ns, así como de RNA polimerasa. En conclusión estos resultados mostraban claramente que las FPC son la expresión morfológica de los transcritos nacientes, así como las estructuras sobre las cuales ocurre el *splicing* de los pre-RNA<sub>m</sub>. (Pérez, 2001).

#### *Gránulos intercromatinianos*

Los gránulos intercromatinianos (GIC) fueron descritos por primera vez por Swift (1959) como gránulos agrupados en cúmulos en la región intercromatiniana. Monneron y Bernhard (1969), los describieron como gránulos de 20 a 25 nm de diámetro, polimorfos, a veces continuos con fibrillas. El uso del contraste preferencial para ribonucleoproteínas y de hidrólisis enzimáticas y químicas del RNA demostró que los GICs están compuestos de RNA y proteínas (Monneron y Bernhard, 1969). Cuando se comprobó que los cúmulos de GIC incorporan muy poca uridina marcada con tritio en tiempos cortos y medios, se dedujo que el RNA de estos gránulos es de larga vida media (Bachelierie y cols., 1975). Los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina (RNA<sub>bpmU</sub>) son los de vida media más larga y constituyeron los mejores candidatos para explicar la falta de incorporación del precursor, en experimentos relativamente breves con respecto al tiempo generacional de las células. Para poner a prueba esta hipótesis se buscó por medio de inmunolocalización si las proteínas que se unen a dichos RNAs están presentes en los cúmulos de GIC. Los resultados fueron positivos (Fakan, 1986; Puvion y cols., 1984). Posteriormente se logró inmunolocalizar en los cúmulos de GIC la caperuza de guanosina trimetilada de los RNA<sub>bpmU</sub>. Cuando la hibridación *in situ* se pudo realizar a nivel de microscopía electrónica se comprobó nuevamente la presencia de RNA<sub>bpmU</sub> en los cúmulos de GIC (Visa y cols., 1993a). Como estos RNAs están relacionados con el procesamiento postranscripcional de los pre-RNA<sub>m</sub> y los GICs no contienen RNA de marcado rápido, ni proteínas que se asocian a los RNA pre-mensajeros o mensajeros (Fakan, 1986), se concluyó que los cúmulos de GIC son almacenes de la maquinaria del *splicing* que carecen del sustrato de dicho proceso, los RNA pre-mensajeros. Un dato que no concuerda con este punto de vista es el hallazgo de poli-A en los cúmulos de GIC usando hibridación *in situ* de alta resolución con biotinado (Visa y cols., 1993b). (Tomado de Vázquez-Nin y cols., 2003).

Los GICs existen en plantas, animales y hongos y son muy abundantes en las células de vertebrados, en las que se agrupan en grandes cúmulos. En cefalocordados, invertebrados, plantas y hongos no se han encontrado en tal abundancia (Jiménez-García y cols., 1989). Medina y cols. (1989) utilizaron la técnica de contraste preferencial para los GICs con

oxinitrato de bismuto, el cual favorece su localización en células que tienen gránulos poco abundantes y esparcidos en el nucleoplasma sin formar grumos, pudieron estudiarlos en la cebolla corroborando que tienen la misma talla, forma y propiedades histoquímicas que las descritas por Monneron y Bernhard (1969) en células de mamíferos.

#### *Gránulos pericromatinianos*

Los Gránulos Pericromatinianos (GPC), fueron descritos por primera vez por Watson (1962). La morfología y citoquímica de estos gránulos fue definida por Monneron y Bernhard (1969), quienes los describieron como cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro rodeados de un halo claro de 20 a 25 nm. La naturaleza ribonucleoproteica de los GPCs fue demostrada por primera vez por Monneron y Bernhard (1969) mediante un procedimiento preferencial para el contraste de ribonucleoproteínas (RNP), complementado por el empleo de hidrólisis enzimáticas y extracciones químicas.

La subestructura de los GPCs está compuesta por una fibrilla de 3 nm de diámetro, retorcida dentro del gránulo (Monneron y Bernhard, 1969). Recientemente, el uso del microscopio electrónico provisto de filtro de energía de electrones ha permitido demostrar la arquitectura atómica de varias estructuras nucleares, entre ellas, la de los GPCs (Vázquez-Nin y cols., 1996). La elaboración de cartografías de los átomos de fósforo demostró que el RNA se distribuye dentro de los GPCs en forma de fibrilla de 2 a 3 nm. Monneron y Bernhard (1969) postularon que estos gránulos se relacionan con el transporte de información del núcleo al citoplasma y que contienen posible de RNAm. Comparaciones morfológicas, histoquímicas y citoquímicas de los GPCs con los gránulos de Balbiani demostraron que ambos tipos de estructuras son esencialmente idénticas (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Estos resultados condujeron a los autores a sostener que ambos tipos de gránulos cumplen la misma función en diferentes tipos celulares, esta es la de almacenar RNA de alto peso molecular pre-mensajero. El empleo de pruebas histoquímicas dio lugar a dos tipos de experimentos: los que utilizan factores físicos y químicos que alteran el metabolismo del RNA y los que emplean hormonas normales en los organismos para inducir variaciones reversibles del metabolismo del RNA (tomado de Vázquez-Nin y cols, 2003).

El significado citofisiológico de estas partículas se hizo evidente en un trabajo en el que se compararon las características estructurales, morfométricas, histoquímicas y autorradiográficas de estos gránulos en hepatocitos de rata y en los gránulos de los anillos de Balbiani en los núcleos con cromosomas politénicos de las células de las glándulas salivales de *Chironomus sp.* Se sugirió entonces que actuarían almacenando y/o transportando intranuclearmente el RNAm o pre-RNAm. Posteriormente se realizaron diferentes estudios tratando de apoyar la hipótesis. Se analizaron los efectos de diferentes inhibidores metabólicos, las deficiencias alimenticias y agentes físicos sobre el número y disposición de los gránulos pericromatinianos y otros cuerpos RNP. Se utilizó cortisol, alfa-amanitina, ciclohexamida, mitomicina, cloruro de cadmio, bleomicina, hipoadministración y realimentación, temperaturas supranormales e hipotermia. El uso de estos agentes, debido a efectos colaterales (toxicidad), no aporta evidencias claras del mecanismo por el cual estas partículas se alteran en número, calidad y disposición. El estudio de los efectos de las variaciones de estradiol sobre las RNP de las células epiteliales endometriales, se encontró que una disminución del nivel de la hormona produce un

aumento significativo del número de GPC por unidad de volumen nuclear mientras que la administración de estradiol tiene un efecto contrario. Esto llevó a proponer un efecto postranscripcional del estradiol y apoya los efectos postulados sobre la síntesis de RNA. Se pensó también que los gránulos pericromatinianos forman un almacén intranuclear de RNP en equilibrio entre la síntesis de RNA mensajero y su salida al citoplasma. Esto se confirmó experimentalmente cuando se diseñó un método para el cultivo primario de células epiteliales endometriales de rata, que permitió estudiar la síntesis y transporte de RNA al citoplasma mediante el marcado de uridina tritiada y autorradiografía estructural cuantitativa. Esta técnica demostró que la abundancia de GPC depende de la relación entre la velocidad de síntesis de RNA y su migración al citoplasma. Los datos morfométricos sugieren que en artrópodos y vertebrados, estos gránulos contienen RNA producto de la transcripción del gen al cual son adyacentes (Pérez, 2001).

### *Cuerpos Espiralados (Cuerpos de Cajal)*

Los cuerpos espiralados inicialmente se describieron como cuerpos accesorios del nucleolo y después fueron redescubiertos por microscopistas electrónicos (Hardin y cols., 1969; Monneron y Bernhard, 1969; Hervás y cols., 1980). El nombre "cuerpo espiralado" fue introducido debido a que cuando esta estructura subnuclear es observada con el microscopio electrónico da esa apariencia (Monneron y Bernhard, 1969). Estos desaparecen durante la mitosis y se forman en G1 después del reinicio de la transcripción (Lamond y ERNAshaw, 1998). Estas estructuras miden entre 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y consiste de hilos de fibrillas enredados de 40 a 60 nm de espesor (Monneron y Bernhard, 1969; Moreno Díaz de la Espina y cols., 1982). La tinción citoquímica de ribonucleoproteínas por el método regresivo de EDTA (Bernhard, 1969) mostró que estos cuerpos espiralados contienen RNPs; se ha mostrado que estas estructuras contienen iones ortofosfato y actividad ácido fosfatasa (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1980). Sin embargo, la falta de DNA (Monneron y Bernhard, 1969), la incorporación de uridina tritiada (Moreno Díaz de la Espina y cols., 1980b), proteínas RNPpn (Carmo-Fonseca y cols., 1991b; Raska y cols., 1991) y varios factores de *splicing* no RNPpn en cuerpos espiralados apoyan la idea de que esas inclusiones no son esenciales para el *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub>. (Huan y Spector). Hoy en día los cuerpos espiralados han sido renombrados como cuerpos de Cajal (Gall y cols., 1999) y son conocidos por contener tres grandes clases de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares. Estas son las RNPpns *spliceosomales* U1, U2, U4, U5 y U6 (Carmo-Fonseca y cols., 1991; Carmo-Fonseca y cols., 1992; Huang y Spector, 1992; Matera y Ward, 1993), el RNA<sub>p</sub>n U7, y los U3 y U8 pequeños nucleolares RNAs (RNA<sub>s</sub>) involucrados en el procesamiento de pre-RNA<sub>r</sub> (Wu y cols., 1993; Jiménez-García y cols., 1994; Bauer y cols., 1994). La función de los cuerpos de Cajal todavía es desconocida, algunas de esas estructuras se localizan cerca del grupo de genes de histonas replicativas (Gall y cols., 1981; Frey y Matera, 1995) en donde por medio del procesamiento de factores pueden reclutar histonas a los sitios de transcripción de pre-RNA<sub>m</sub> de la histona (Bellini y Gall, 1998; Abbott y cols., 1999).

Muchos otros antígenos nucleares han estado localizados a los cuerpos de Cajal. Esto incluye a la DNA topoisomerasa I y a la proteína fibrilarina nucleolar U3 así como a las RNPpn (Raska y cols., 1991). Hay otros componentes nucleares que no están presentes en los cuerpos de Cajal como son DNA, nucleolina, proteína nucleolar B23, 5S RNPr, la proteína L RNPpn y el SC35 (Bellini y Gall, 1998; Moreno Díaz de la Espina y cols.,

1980b). Usando el anticuerpo p80-coilina, Raska y cols. (1991) determinaron que el número de cuerpos de Cajal varía entre diferentes tipos celulares. Spector y cols. (2002) identificaron diferencias en la presencia de cuerpos de Cajal en células transformadas, células inmortales y células de número de paso definido. Los cuerpos de Cajal fueron encontrados en un menor porcentaje (2-3%) en fibroblastos con un número definido de pasajes, en número intermedio de células inmortales (4-40%), pero fueron más abundantes en células transformadas (81-99%). Por lo tanto, una correlación directa se encontró entre el porcentaje de células conteniendo cuerpos de Cajal y transformaciones oncogénicas. Lafarga y cols. (1983) han mostrado un incremento en el número de cuerpos de Cajal en neuronas supra-ópticas de rata, después de una estimulación de la transcripción nucleolar. Un estudio más reciente de Ochs y cols. (1994) demostraron que los cuerpos de Cajal están presentes dentro del nucleolo de varias líneas celulares derivadas de tejidos de cáncer de pecho. Estos hallazgos sugieren que los cuerpos de Cajal pueden estar involucrados en el procesamiento, transporte y almacenamiento de metabolitos nucleolares (Raska y cols., 1990). Sin embargo la presencia de otros componentes nucleares no involucrados en la función nucleolar ha sugerido un papel más general para este organelo nuclear (Raska y cols., 1991).

Se ha encontrado que los cuerpos de Cajal se conservan a lo largo de la evolución de los eucariontes ya que se presenta tanto en plantas como en animales. El que se contrasten fuertemente con la técnica para RNPs, indica la presencia de RNA en esa zona, se marcan intensamente con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas que se asocian a los RNAs de bajo peso molecular ricos en uridina que intervienen en el *splicing* del pre-mensajero (Agredano-Moreno y cols., 1994.).

Varios autores han sugerido una relación funcional entre los cuerpos de Cajal y el nucleolo, basados en la presencia de proteínas nucleolares en los cuerpos de Cajal, la frecuente asociación de cuerpos de Cajal con el nucleolo, la aparición de cuerpos de Cajal en el nucleolo bajo ciertas condiciones y el incremento en el número de cuerpos de Cajal después de la estimulación de transcripción nucleolar (Ochs y cols., 1994; Lafarga y cols., 1991; Malatesta y cols., 1994). El número de cuerpos de Cajal está influenciado por diversos factores tales como la actividad metabólica general, el ciclo celular, drogas, etc., estos cuerpos de Cajal, se pueden inmunolocalizar con diferentes anticuerpos como son la coilina p80, el anticuerpo 4G3 que identifica proteínas humanas específicas U2B. (Boundonck y cols., 1998)

### *Transcripción*

En las células eucarióticas, la transcripción (proceso durante el cual se genera una sola cadena de RNA idéntica a una de las cadenas de DNA), se realiza por acción específica de las RNA polimerasa I, II y III; estas enzimas se localizan en diferentes compartimentos celulares y cada una de ellas transcribe las distintas clases de moléculas de RNA (Cortés, 2003) Las polimerasas nucleares tienen cinco subunidades comunes, con un residuo mostrando una fuerte similitud entre las enzimas eucarióticas y de *Arquea* (Lee y Young, 2000; Bell y Jackson, 1998).

La organización del DNA genómico incluye secuencias específicas denominadas promotores, sitios de iniciación, motivos, sitios de amplificación, secuencias específicas de

transcripción hacia la izquierda o a la derecha del sitio de iniciación, así como sitios de terminación de la transcripción (Cortés, 2003).

La transcripción es llevada a cabo por la enzima RNA polimerasa (Pol) junto con otros factores denominados factores generales de transcripción. Los factores generales están involucrados en el reconocimiento de secuencias promotoras, que responden a factores reguladores y cambios conformacionales esenciales para la actividad de la polimerasa durante el ciclo de transcripción. (Hampsey, 1998).

La transcripción es un evento regulado y muy conservado en eucariontes. La transcripción con Pol II (Pol II participa en la transcripción de pre-RNA<sub>m</sub> o RNA y algunos tipos de RNA<sub>p</sub>) típicamente empieza con la unión de factores reguladores gen-específicos cerca del sitio de iniciación de transcripción. Estos factores pueden actuar indirectamente en la maquinaria de transcripción por el reclutamiento de factores que modifican la estructura de la cromatina o directamente por interacción con componentes de la maquinaria de transcripción. En la forma más simple de la activación del gen, ambos mecanismos tanto directo como indirecto resultan en incorporación de maquinaria de transcripción a un sitio promotor (la secuencia mínima de DNA necesaria para una transcripción basal) (Cosma, 2002). El promotor permite que la Pol II este en un estado denominado complejo de preiniciación (PIC). En este estado, la Pol II y los factores generales están todos unidos al promotor pero no están en conformación activa para iniciar la transcripción. También ocurre un marcado cambio conformacional en el cual unas 11-15 pares de bases (pb) de DNA alrededor de el sitio de inicio de la transcripción son fusionados y la plantilla de la hebra del promotor son posicionados dentro del sitio activo de la Pol para formar el complejo abierto (Wang y cols., 1992). La iniciación de la transcripción empieza con la síntesis del primer fosfodiéster unido a RNA. En muchos sistemas, múltiples RNAs cortos (de 3 o 10 bases), denominados productos abortivos, son sintetizados después de que la Pol inicia la síntesis de RNAs completos (Luse y Jacob, 1987; Holstege y cols., 1997). Después de la síntesis de aprox. 30 bases de RNA, se cree que la Pol libera sus contactos con el núcleo promotor y el resto de la maquinaria de transcripción y entra en estado de elongación de la transcripción. Los factores que promueven la síntesis de cadenas de RNA, procesamiento de RNA, exporte de RNA y modificación de cromatina pueden ser reclutados para la elongación de la Pol II (Bentley, 2002). Después de la iniciación de la transcripción por la Pol II *in vitro*, muchos de los factores de transcripción generalmente permanecen cerca del promotor en un complejo (Yuckovsdy y cols., 2000), que puede reclutar rápidamente los factores generales sobrantes para promover la reiniciación de la transcripción.

Algunos elementos encontrados en el centro promotor incluyen el elemento TATA (sitio de unión de TBP), BRE (elemento de reconocimiento TFIIB), Inr (elemento iniciador) y DPE (elemento promotor del extremo N) (Smale y Kdonaga, 2003). Los elementos promotores son unidos a los sitios de unión por subunidades de la maquinaria de transcripción y sirven para orientar la maquinaria de transcripción al promotor asimétricamente para dirigir la transcripción unidireccionalmente. El TBP (proteínas de unión al promotor) consiste de dos repeticiones que forman una molécula en forma de silla que se una a una secuencia menor de 8 pb del elemento TATA, separándose cerca de la tercera vuelta helical y curvando al

DNA en aproximadamente 80 Å hacia el extremo mayor de la cadena de DNA (Kim y cols., 1993). Para los promotores conteniendo TATA, la formación de este complejo de proteínas-DNA es el paso inicial de ensamble de la maquinaria de transcripción. El TBP forma una interfase proteína-DNA muy asimétrica, creando una plataforma de unión para otros componentes de la maquinaria de transcripción. El elemento BRE fue reconocido como una secuencia que contribuye a la alta afinidad de unión de TFIIB y TFB al complejo TBP-DNA en humanos y *Arquea* (Qureshi y Jackson, 1998). Los otros dos elementos promotores, Inr y DPE, probablemente sirven como sitios de unión para TAF (factor asociado a TBP) (Chalkley y Verrijzer, 1999). La unión específica de la maquinaria de transcripción a un núcleo promotor deriva de uniones cooperativas de dos o más subunidades de factores de transcripción que degeneran a elementos promotores de baja especificidad. La combinación de estos elementos varía entre promotores y, en algunos casos, los elementos del centro promotor determina la especificidad del activador y aumenta la especificidad (Butler y Kadonaga, 1997).

### *Conformación Z-DNA*

El superenrollamiento generado por la transcripción, origina al Z-DNA, ya que durante la torsión negativa de la cadena inducida por el movimiento de la RNA-Pol estabiliza la formación de Z-DNA cerca de los sitios de inicio de transcripción. Cuando cesa la transcripción, el Z-DNA pasa rápidamente a B-DNA. Se ha estudiado la asociación entre Z-DNA y la transcripción usando células de mamíferos y utilizando anticuerpos monoclonales biotinilados contra Z-DNA, método con el cual Wittig y cols. (1991) mostraron la torsión de la cadena, además de que se observó que un incremento en la actividad transcripcional en los núcleos genera un incremento paralelo de la cantidad de Z-DNA.

La torsión negativa de la cadena inducida por el movimiento de la RNA-Pol (Liu y Wang, 1987) estabiliza la formación de Z-DNA cerca de los sitios de inicio de transcripción. Cuando el Z-DNA se encuentra en conformación metaestable depende de las actividades fisiológicas. Otros autores (Liu y cols, 2001) indican que la transcripción es disparada por la formación de Z-DNA. El predominio de secuencias que favorecen la formación de Z-DNA cerca de los sitios de transcripción, indican la posibilidad de que estos mecanismos sean generalizados (Schroth y cols., 1992).

En la estructura del Z-DNA, el carbono en posición 8' de la guanina y el carbono en posición 5' de la citosina quedan expuestos en la región del surco mayor de esta forma del polímero. Mediante la unión de átomos de bromo a un 30-40% de los carbonos en posición 8' de la guanina, o de radicales metilo a un 15-20 % de los carbonos en posición 5' de las citosinas, se facilita la formación de Z-DNA sin tener que recurrir a concentraciones salinas altas. Las células vivas cuentan con diversos tipos de metilasas capaces de reemplazar el hidrógeno por un metilo en el carbono en posición 5' de la citosina. Es por lo tanto factible que a través de la metilación de las citosinas puedan producirse condiciones favorables para la aparición de Z-DNA en las células vivas.

El Z-DNA es altamente antigénico: se pueden añadir anticuerpos policlonales y monoclonales a moléculas de Z-DNA, por lo que los anticuerpos dirigidos contra Z-DNA,

permiten identificar un patrón de distribución del Z-DNA en los núcleos celulares (Rich y Zhang, 2003). Cuando las células son inmunomarcadas con fluorescencia, la distribución de Z-DNA se observa como una fluorescencia difusa en el nucleoplasma, así como algunos puntos más brillantes, indicando las fábricas de transcripción.

### *Splicing*

En células de mamíferos, la maquinaria de *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub> –incluyendo las partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (RNPPn), que son subunidades del spliceosoma y otras proteínas factores de *splicing* no RNPPn, muestran un patrón de localización nuclear moteado que es usualmente llamado un “patrón de *speckles*”, pero también ha sido referidos como dominios SC35 o compartimentos del factor de *splicing*. (Lamond y Spector, 2003). Las motas son estructuras subnucleares que están enriquecidas con factores de *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub> y se localizan en las regiones intercromatinianas del nucleoplasma de células eucariontas. Sin embargo, la primera conexión entre el *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub> y las motas nucleares vienen del examen de la distribución RNPs pn utilizando anticuerpos específicos para estos factores de *splicing* (Cmarko y cols, 1999).

El *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub> es un proceso fundamental en la expresión génica regulada y constitutiva en eucariontes. Durante el *splicing*, los intrones presentes en los genes transcritos primeramente son removidos y los exones son ligados para producir RNA<sub>m</sub> traducidos, que sean funcionales. Este mecanismo básico de escisión de intrones es similar en todos los eucariontes. La reacción es mediada por el *spliceosoma*, un gran complejo de ribonucleoproteínas (RNP), el cual es ensamblado nuevamente a cada intrón de partículas RNP pequeñas nucleares (U-RNPPn) y numerosas proteínas. El *splicing* del *spliceosoma* es una reacción altamente ordenada y dinámica, involucrando hidrólisis de varias moléculas de ATP y muchos rearrreglos estructurales (figura 3). Diferentes clases de proteínas, incluyendo proteínas unidoras de RNA, RNA dependientes de ATPasas, RNA helicasas y proteínas cinasas, son responsables de la precisión y regulación de este proceso. Durante el *splicing*, las secuencia de exones e intrones tienen que ser eficientemente distinguidas y sitios de *splicing* apropiados 5' y 3' tienen que ser seleccionados y yuxtapuestos antes del paso catalítico. El reconocimiento de los límites de intrones y exones requieren una multitud de elementos *cis*-actina, cada cual con un relativo bajo nivel de información que son reconocidos por los factores *trans*-actina (Lorkovic y cols., 2000).

Muchos factores de *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub> –incluyendo RNPs pn y proteínas SR, han sido localizados en motas nucleares por técnicas de inmunofluorescencia, con proteínas etiquetadas con fluoresceína y/o por medio de inmunolocalización electrónica. De hecho esta localización de patrón moteado es un buen diagnóstico para proteínas que están involucradas en el *splicing* de pre-RNA<sub>m</sub>. Esto apoya la idea de que las motas pueden estar involucradas en la regulación del grupo de factores que son accesibles para la maquinaria de transcripción en el procesamiento de pre-RNA<sub>m</sub> (Lamond y Spector, 2003).

Aunque la transcripción no tiene lugar dentro de la mayoría de los motas nucleares (Cmarko y cols., 1999), y el DNA no está localizado en esas regiones nucleares, una población de serina-2-fosforilada de la RNA polimerasa II, ha sido localizada en esas regiones por medio de microscopia de inmunofluorescencia.

Por lo tanto, aunque poco o ninguna transcripción tenga lugar en las motas nucleares, un subgrupo de proteínas que están involucradas en este proceso están asociadas con las motas, y por ende a la existencia presente en sitios de transcripción. Aunque, hasta ahora, no esta claro que determina los subgrupos de factores de transcripción que se localizan en las motas nucleares, su presencia puede estar relacionada al ensamblado de complejos de alto orden y/o a pasos reguladores afectando el estado de modificación o la accesibilidad de factores de transcripción específicos (Lamond y Spector, 2003). Por lo tanto, a menos que el exporte de RNAm sea inhibido es cuando la transcripción es inhibida, como se ha propuesto (Shopland y cols, 2002), cada uno de estas motas representan especies con función nuclear específicas.

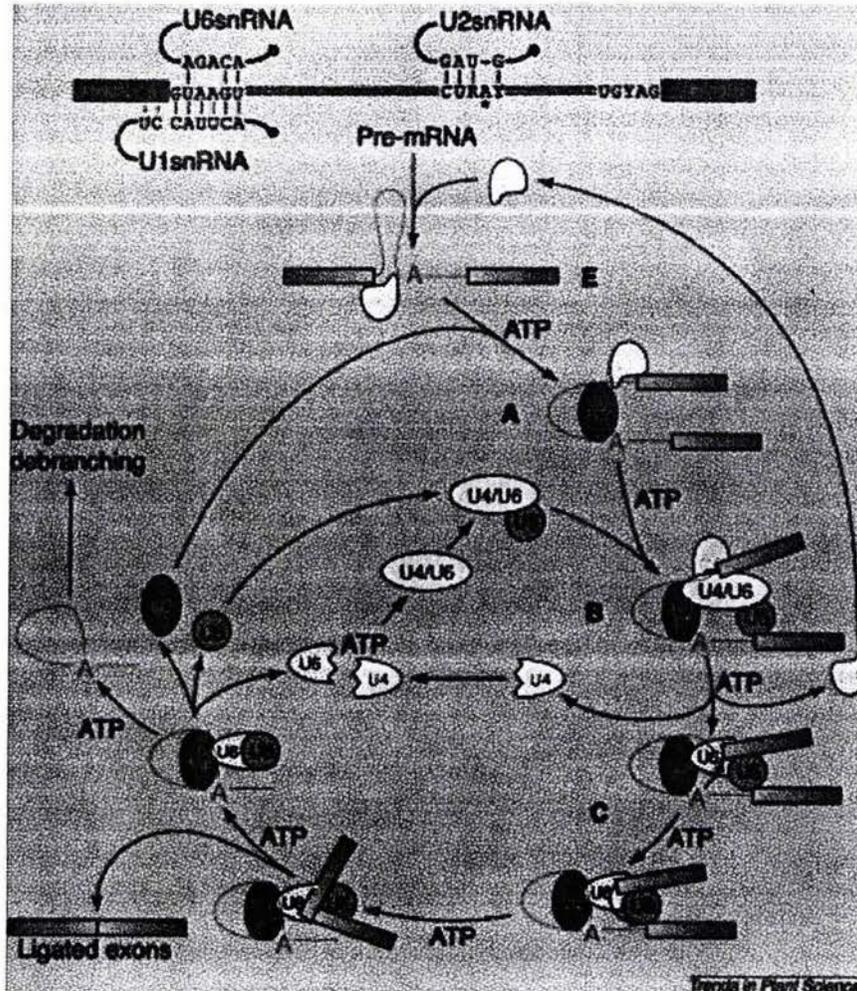


FIGURA 3. Ciclo de *splicing*. Este esquema muestra un solo intrón conteniendo pre-RNAm. En este diagrama se observa la participación de cinco RNPpn y sus interacciones, las cuales están indicadas en los distintos pasos durante la formación del *spliceosoma* y la catálisis. Todos los pasos requieren ATP excepto la formación del complejo del paso E. Las flechas indican las transiciones entre los complejos y el reciclamiento de las RNPpn. Después de dos reacciones de transesterificación (flechas rojas), los dos exones ligados son liberados como RNAm. Posteriormente, el intrón es liberado y finalmente desramificado y degradado. Tomado de Lorkovic y cols. 2000.

Aquellas motas nucleares que empiezan a redondearse e incrementan en tamaño en inhibición transcripcional apoyan la opinión de que las motas pueden funcionar en el almacén, ensamble y modificación de factores de *splicing*, y que ellos no son sitios directos de *splicing* (Lamond y Spector, 2003).

### *Nucleolo*

El compartimiento nuclear mejor caracterizado y el único que tiene una función claramente identificada es el nucleolo. Es el sitio de síntesis y procesamiento de RNAr y de ensamble de las subunidades del ribosoma (Scheer y Hock, 1999; Olson y cols., 1994).

En el núcleo interfásico los nucleolos son fácilmente identificables con el microscopio de luz como cuerpos densos, con un diámetro aproximado de 0.5-3.0  $\mu\text{m}$ . El nucleolo puede definirse como la expresión morfológica de la transcripción del RNA pre-ribosómico por los organizadores nucleolares (o sus copias) y de la maduración posterior de ese RNA hasta convertirse en los RNAr. Por eso, el nucleolo es mucho más visible en los momentos de mayor síntesis de ribosomas, y cuando no hay transcripción se dispersa, como ocurre durante la mitosis. En el nucleolo, se llevan a cabo tres diferentes procesos: transcripción específica de los genes ribosomales por la RNA polimerasa I, procesamiento de los transcritos primarios por partículas RNPs nucleolares específicas y ensambles de las partículas pre-ribosomales (Hozák y cols., 1994; Shaw y Jordan, 1995). Ultraestructuralmente el nucleolo consta de los siguientes componentes: centros fibrilares, componente fibrilar denso y la región granular. Los centros fibrilares son muy evidentes en algunos nucleolos, donde puede haber varios centros fibrilares y de densidad inferior a la de las partes granular y fibrilar. El centro fibrilar está constituido por fibras de 7-9 nm; contiene DNA y algo de RNA. Debido al contenido en DNA, se ha considerado que los centros fibrilares corresponden a organizadores nucleolares en fase activa o de transcripción. Otros autores le atribuyen función de almacén de reservas proteicas para la síntesis ribosómica. Los centros fibrilares, contienen genes de RNAr en forma de cromatina parcialmente condensada (Smith y Wood, 1997).

El componente fibrilar denso rodea los centros fibrilares y la región granular la cual rodea a su vez al componente fibrilar denso. Esta región granular consiste en masas de partículas pre-ribosómicas en las últimas etapas de maduración. El nucleolo contiene muchas proteínas no ribosómicas y moléculas de RNA.

### **Antecedentes**

El transporte núcleo-citoplasmático ha sido un tema muy estudiado, utilizando varios modelos en donde este se inhibe o estimula dependiendo de las necesidades de la investigación. En este sentido se han utilizado algunos compuestos que inhiben directamente el transporte núcleo-citoplasmático como es la Leptomomicina B (LMB). La LMB es un antibiótico con actividad antifúngica y antitumoral que fue inicialmente descubierta y purificada de *Streptomyces* (Hamamoto y cols., 1983a; Hamamoto y cols., 1983b; Hamamoto y cols., 1983c; Yoshida y cols., 1990). La LMB ( $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_6$ , con peso molecular de 540) es un ácido graso de cadena insaturada, ramificada, con un anillo terminal de lactona (Yoshida y cols., 1990) (fig.4). Este antibiótico ha sido una herramienta importante para el estudio de la localización nuclear y el tráfico en células eucarióticas, debido a la inhibición específica de la CRM1/exportinal en la ruta de exportación nuclear (Watson, 2001). La LMB es un inhibidor de la SEN y es receptor de CRM1 exportinal,

proteína que media la exportación nuclear (Watanabe y cols., 2001; Yoshida y Horinouchi, 1999; Fukuda y cols., 1997; Kudo y cols, 1999). La LMB inhibe la translocación núcleo-citoplasmática de virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) (Kuhnt y cols., 1998).

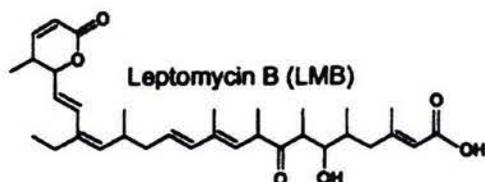


FIGURA 4. Estructura química de Leptomicina B (LMB)

Como se ha mencionado, la LMB ha sido una herramienta sumamente útil para seguir de cerca el transporte núcleo-citoplasmático. Este antibiótico ha sido utilizado para varios modelos entre los que podemos encontrar el de Sleeman y cols. (2001), utilizando microscopía confocal y líneas celulares (HeLa), encontraron que en las células tratadas con LMB se inhibía tanto la acumulación de RNppn en cuerpos de Cajal como su subsecuente acumulación en motas. Seta y cols. (2002) utilizaron la LMB en células CHO-K1 para contrarrestar la sobreexpresión de la importina Crm-1, ya que es un inhibidor de esta importina, observaron que los mecanismos de señalización dependientes e independientes de la proteína heterotrimérica G realizan distintas funciones en las respuestas celulares mediadas por Ang II (Angiotensina II, es un receptor tipo 1 que activa las tirosinas cinasas). Poupon y cols. (2002) observaron una actividad de exportación nuclear sensible a la LMB unida a la CRM1 y que son dependientes de residuos de leucina. Silins y cols. (2001) inhibieron la exportación nuclear con LMB en hepatocitos de ratas con lesiones hepáticas preneoplásicas de carcinomas inducidos, utilizando métodos inmuno-histológicos y Western Blot, para inducir la respuesta de p53 (la fosforilación de p53 genera condiciones adversas para el crecimiento de los hepatocitos dañados). Lam y cols. (2001) usaron fluorescencia después de fotoblanqueado en células vivas de parótida, encontrando que el tratamiento con LMB redujo significativamente la velocidad de exportación nuclear de 4 a 10 veces. Buck y cols. (2001), mostraron que el tratamiento de TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa) en hepatocitos primarios de ratón con sobre expresión de este TNF-alfa, induce estrés oxidativo, que trae consigo una cascada de reacciones que inhiben la transcripción para el gen de la albúmina, provocando un estado de degeneración en los modelos; tales anomalías también se encontraron en pacientes con agotamiento ligada a cáncer, por lo que el tratamiento con LMB resulta ser un bloqueador de la actividad de CRM1 y por lo tanto permite salvar esta anomalía en la expresión génica de albúmina. Woods y su grupo (2001) utilizando espectrometría de masas identificaron proteínas que fueron co-inmunoprecipitadas con paxilina (una proteína adaptadora implicada en la ruta mediada por señalización de integrinas de movilidad integral). La inhibición de la exportación con LMB causó que la paxilina y la proteína 1 poly (A) se acumularan en el núcleo, indicando que ellos se transportaron a cortos intervalos entre el compartimento nuclear y el citoplasmático.

La LMB es una droga que ya se utiliza clínicamente para combatir enfermedades como son algunos tipos de cáncer (próstata, mama y cérvico-uterino) y pacientes infectados con VIH-

1 y como hemos podido ver, la información acerca de los ensayos que se han realizado respecto a la LMB nos permite visualizar que los estudios realizados con esta LMB, son amplios. Es importante notar que si bien es cierto se han realizado a nivel molecular y celular, los estudios realizados para conocer los cambios ultraestructurales que tal compuesto ocasiona a las células, no son abundantes, por lo que es importante conocer una localización ultraestructural de estos factores y su afectación con la droga.

Por lo anterior, consideramos que es importante conocer el impacto de la inhibición de la exportación de RNAm sobre los procesos de transcripción y *splicing*, para lo cual se analizó el comportamiento del Z-DNA, los sitios de almacén del factor de *splicing* SC35 (motas) y los lugares considerados como almacenes transitorios de ribonucleoproteínas involucradas en el *splicing* (cuerpos de Cajal). Esta información pudo ser obtenida a nivel de microscopia de luz así como a nivel de microscopia electrónica. Para cubrir los objetivos del presente trabajo, utilizamos cultivos primarios de hepatocitos de rata, ya que experiencias pasadas en nuestro grupo de trabajo con éste modelo, nos permiten saber que los hepatocitos de rata poseen un núcleo grande y en un porcentaje alto, son binucleados. El uso de líneas celulares como las HeLa (fibroblastos de cáncer cérvico-uterino) y HepG2 (hepatocarcinoma humano), también son una adecuada opción, ya que poseen núcleos bastante grandes así como uno o varios cuerpos de Cajal.

## OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de la LMB en las partículas ribonucleoproteicas en monocapas de hepatocitos de rata, células HeLa y HepG2.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones óptimas para el cultivo primario de hepatocitos de rata, líneas celulares estables HeLa (fibroblastos de cáncer cérvico-uterino) y HepG2 (hepatocarcinoma humano).
- Determinar las características ultraestructurales de los núcleos de hepatocitos en monocapa, células HeLa y HepG2 con técnicas de tinción general (acetato de uranilo y citrato de plomo) y preferencial (acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo) para ribonucleoproteínas a nivel de microscopía electrónica.
- Evaluar el efecto de la LMB en el proceso de transcripción, utilizando un anticuerpo dirigido contra DNA Z, para microscopía de fluorescencia.
- Evaluar el efecto de la LMB en el factor de *splicing* SC35, utilizando la técnica de inmunolocalización para microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica (anti-SC35), en las diferentes líneas celulares.
- Evaluar el efecto de la LMB sobre los cuerpos de Cajal en cada uno de los tipos celulares, utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia (anticuerpo 4G3).

## HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado que la Leptomicina-B (LMB) a nivel celular es un inhibidor específico de proteínas que contienen señales de exportación nuclear e inhibe la translocación citoplásmica de moléculas, proponemos que utilizando ésta droga en cultivos de hepatocitos de rata, células HeLa y HepG2, afecte a las partículas ribonucleoproteicas conllevando así un efecto en el proceso de transcripción y/o de *splicing*, analizando esto a nivel de microscopía óptica con técnicas de inmunofluorescencia y a nivel ultraestructural con técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) convencionales e inmunocitoquímica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Cultivo Celular.**

#### *Obtención de monocapas de hepatocitos de rata.*

Se utilizan ratas "Wistar" macho, con peso de 180-200 g, con un ayuno mínimo de 12 horas.

#### *Perfusión.*

Se anestesia la rata con 200 µl de (pentobarbital) vía peritoneal y se coloca en una charola de disección, sujetando las cuatro extremidades. Se hace una incisión en forma de ojal en la parte baja del abdomen y se descubre toda la cavidad abdominal. Se hace una perfusión por la vena porta y la vena cava inferior se corta 5 segundos después de iniciada la perfusión para drenar las soluciones.

Se realizan las siguientes operaciones:

1° Perfusión lavadora con 70 ml. de solución Td salino con rojo fenol y 100 µM de EGTA, a una velocidad de 15 ml/minuto; a 37°C.

2° Perfusión con 70 ml. de solución enzimática (Colagenasa tipo IV diluida en Td salino con rojo fenol y CaCl<sub>2</sub> 2.55µM, en una concentración de 75-100 unidades de colagenasa/ml) a 37°C.

3° El hígado se extrae y se coloca en una caja de Petri estéril, posteriormente se enjuaga con medio (DMEM) y se agita durante 5 minutos a 37°C en la campana de flujo laminar.

4° La suspensión de las células se filtra con una gasa y éstas precipitan por gravedad.

#### *Preparación de monocapas.*

Se realiza un conteo de células vivas utilizando azul tripano. Si la viabilidad es mayor a un 95%, se cultivan.

El cultivo se lleva a cabo en cajas Petri de cristal estériles de 3.5 cm. de diámetro, con una densidad de 800,000 células. Se utiliza medio de cultivo (DMEM con rojo fenol) adicionado con 7% de suero fetal bovino (SFB) y 15 unidades de insulina por cada 100ml de medio (las células vivas se adhieren en 2 horas). Se realiza el primer cambio de medio a las 12 horas y después cada 24 hrs.

#### *Cultivo de células HeLa y HepG2.*

Las células HeLa, se cultivan en RPMI adicionado con 7% de suero fetal bovino en cajas de vidrio y en cubreobjetos (para microscopía óptica).

Para las células HepG2 se utiliza DMEM con 10% de suero fetal bovino y se cultivan sobre cajas de vidrio y cubreobjetos.

### **Tratamiento con leptomicina-B (LMB).**

Se hace una dilución de LMB en medio de cultivo con una concentración de 30nM de LMB y se sustituye el medio por ésta solución incubando durante 3 y 8 horas.

### **Procesamiento para microscopia electrónica.**

#### *Fijación para microscopia electrónica.*

Las células se fijan con glutaraldehído 2.5% para ser incluidas en resina epóxica y con paraformaldehído al 4% para incluirlas incluidas en LR White.

- Se sustituye el medio de cultivo por 3 ml. de fijador durante 60 minutos. A los 15 minutos de empezada la fijación, se raspan las células con un rastrillo de goma (gendarme), se pasan a un microtubo epéndorff y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos.
- Se hacen tres lavados con amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2 durante 10 minutos cada uno.

**Inclusión.** Para incluir las muestras se desarrollan los siguientes protocolos:

*Inclusión en Epón.*

- Se deshidrata de la siguiente forma:
  - Etanol 60% durante 10 minutos
  - Etanol 70% durante 10 minutos
  - Etanol 80% durante 10 minutos
  - Etanol 96% durante 10 minutos
  - Etanol absoluto 2 cambios de 20 minutos cada uno
- Óxido de propileno 2 cambios de 15 minutos cada uno
- **Pre-inclusión**
  - Óxido de propileno + Epon en proporción 2:1 durante 24 horas
  - Óxido de propileno + Epon en proporción 1:1 durante 24 horas
  - Óxido de propileno + Epon en proporción 1:2 durante 24 horas
- Se incluye en cápsulas de gelatina, sin tapar. Polimerizar a 60°C durante 24 horas

*Inclusión en LR White.*

- Se deshidrata de la siguiente forma:
  - Etanol 60% durante 10 minutos
  - Etanol 70% durante 10 minutos
  - Etanol 80% durante 10 minutos
  - Etanol 96% durante 10 minutos
  - Etanol absoluto 3 cambios de 1 hora cada uno
- **Pre-inclusión**
  - LRW-etanol en proporción 1:2 durante 3 horas
  - LRW-etanol en proporción 2:1 durante 3 horas
  - LRW durante 24 horas a 4° C
  - LRW 3 cambios de 1 hora cada uno
- Se incluye en cápsulas de gelatina, tapadas. Polimerizar a 60°C durante 24 horas

**Corte.**

Una vez polimerizadas las muestras se hacen cortes semifinos, los cuales se montan en portaobjetos de vidrio y se contrastan con azul de toluidina con el fin de examinar todas las muestras, para conocer las condiciones en las que se encuentran las células. Posteriormente, se define un área de trabajo para obtener la superficie de corte más pequeña posible y de esta forma lograr cortes que no tengan vibraciones o mellas.

*Cortes semi-finos.*

Los cortes semi-finos tienen espesor de aproximadamente ½ micra, se montan en portaobjetos de vidrio, para ubicar las zonas de interés observándolos en el microscopio óptico.

### *Cortes ultrafinos.*

Los cortes ultrafinos (espesor de 60-90 nm) se montan en rejillas de cobre o níquel las cuales están cubiertas por una membrana plástica (formvar), para permitir el soporte y la adherencia de los cortes. Los cortes de las rejillas de cobre se utilizan para los contrastes con uranilo-plomo y EDTA; los cortes sobre rejillas de níquel son para las inmunolocalizaciones electrónicas.

### *Contrastes.*

#### *Azul de toluidina.*

Contraste utilizado para microscopía óptica, para ubicar las zonas de interés y utilizando cortes semifinos, montados en portaobjetos de vidrio.

- Se recogen los cortes con un asa de cobre y colocarlos en el portaobjetos
- Se coloca el portaobjetos en una parrilla de calentamiento, con la finalidad de que los cortes se adhieran.
- Se pone una gota de Azul de toluidina y nuevamente se pone a calentar (hasta la formación de una aureola esmeralda en la gota del colorante)
- Se enjuaga con agua desionizada y se seca con calor
- Se observa en el microscopio óptico

#### *Acetato de uranilo-citrato de plomo.*

El contraste con acetato de uranilo (2-4%)-citrato de plomo (0.4%), se utiliza para los cortes ultrafinos como un colorante inespecífico, técnica utilizada para microscopía electrónica. Previa centrifugación de los contrastantes, se preparan cámaras húmedas libres de polvo, aire, CO<sub>2</sub> y de luz. Para el acetato de uranilo se prepara una cámara poniendo un algodón húmedo en una caja de Petri, se pone un trozo de parafilm adherido al fondo en el cual se colocan las gotas del contrastante para flotar las rejillas y se cubre con una tapa metálica para evitar la entrada de luz. Para el citrato de plomo se coloca un algodón húmedo, unas 6 lentes de hidróxido de sodio (las lentes de NaOH y el agua, atrapan el CO<sub>2</sub> y en ausencia de este, no se forman precipitados de plomo, las lentes deben ser pocas, ya que de otra forma provoca la formación de cristales de plomo que contaminan los cortes de las rejillas) y el parafilm en el fondo cubriéndola con la tapa de la misma caja para evitar tanto el polvo como el CO<sub>2</sub>.

- Se recogen los cortes en las rejillas de cobre para microscopio electrónico con ayuda de unas pinzas de relojero
- Se colocan las rejillas en una caja de petri con papel filtro en el fondo
- Acetato de Uranilo: con una pipeta Pasteur se toma una cantidad muy pequeña de uranilo y se colocan dos gotas en el parafilm de la cámara húmeda y oscura (proceso que debe llevarse a cabo lo más rápido posible)
- Se flota la rejilla sobre la segunda gota y se deja durante 5 minutos para las muestras incluidas en Lowicryl y 20 para las incluidas en Epon
- Se lava con agua desionizada por goteo y se seca con papel filtro.
- Citrato de Plomo: con una pipeta Pasteur con punta larga, se toma una pequeña cantidad del tubo contenedor y se corta la punta a la pipeta ya que el tubo presenta una capa oleosa que impide el contacto del aire con el reactivo y la punta queda impregnada del mismo

- Se colocan dos gotas del reactivo sobre el parafilm e inmediatamente se flotan las rejillas con los cortes y se cubre todo. Para los cortes de Lowicryl se flotan durante 3 minutos y para Epon 10
- Se enjuaga con agua desionizada y se deja secar
- Se observa al Microscopio Electrónico

#### *EDTA.*

La técnica de contraste con ácido etilendiamino-tetra-acético al 0.2 M (EDTA), puede realizarse sobre cortes incluidos en epon o Lowicryl. Es importante que los cortes sean de diferentes espesores, ya que esto proporciona una mayor posibilidad de éxito de la técnica, debido a que si no resulta en un corte grueso es posible que en un delgado si, o viceversa.

- Acetato de Uranilo: con una pipeta Pasteur se toma una cantidad muy pequeña de uranilo y se colocan dos gotas en el parafilm de la cámara húmeda y oscura (proceso que debe llevarse a cabo lo más rápido posible)
- Se flota la rejilla sobre la segunda gota
- Se lava con agua desionizada por goteo y se seca con papel filtro
- EDTA: se flotan las rejillas en EDTA (0.2M) en una cámara húmeda
- Se enjuaga con agua desionizada y se seca.
- Citrato de Plomo: con una pipeta Pasteur con punta larga, se toma una pequeña cantidad del tubo contenedor y se corta la punta a la pipeta ya que el tubo presenta una capa oleosa que impide el contacto del aire con el reactivo y la punta queda impregnada del mismo
- Se colocan dos gotas del reactivo sobre el parafilm e inmediatamente se flotan las rejillas y se cubre todo.
- Se enjuaga con agua desionizada y se seca
- Se observa al Microscopio Electrónico

#### ***Inmunolocalización electrónica de SC35.***

Para este procedimiento se utilizan cortes ultrafinos montados en rejillas de níquel, cubiertas de formar. Se prepara una cámara húmeda de la siguiente forma: en una caja pequeña de plástico, se ponen varias capas de papel humedecido y sobre éste se coloca una plataforma en donde se adhiere un parafilm o una cera de dentista en donde se van a colocar las gotas de los diferentes reactivos y se tapa.

Durante este procedimiento, se debe cuidar que las rejillas con los cortes nunca se sequen. Se quita el exceso de los reactivos con papel filtro y se introducen inmediatamente en el siguiente.

El procedimiento se realiza de ésta forma:

- Se flotan las rejillas durante 3 minutos en Suero Normal de Cabra (*Normal Goat Serum* NGS) diluido 1:150 en PBS ( *Phosphate Buffer Saline* PBS 0.1 M, pH 7.3-7.4%; con 5.84 gr de NaCl por cada 1000 ml de agua)
- Se incuban durante 2 horas en anticuerpo monoclonal primario anti-SC35 diluido 1:5 en PBS-BSA (Albúmina de Suero Bovino 1%)-Tween 20 (5%)
- Se lavan con PBS-Tween por goteo
- Se lavan con PBS solo por goteo
- Se flotan 10 minutos en PBS

- Se flotan 3 minutos en Suero Normal de Cabra (*Normal Goat Serum* NGS) diluido 1:150 en PBS ( *Phosphate Buffer Saline* PBS 0.1 M, pH 7.3-7.4%; con 5.84 gr de NaCl por cada 1000 ml de agua)
- Se incuban 30 minutos a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra desarrollado contra IgG de ratón, acoplado a micelas de oro de 18 nm de diámetro) diluido 1:20 en PBS. Se centrifuga antes de poner las gotas.
- Se lavan con PBS por goteo
- Se lavan con PBS por flotación 5 min.
- Se lavan con agua desionizada y se flotan 15 minutos en agua desionizada. Se dejan secar medio día antes de contrastar.
- Se contrasta con uranilo 1 minuto

### **Procesamiento para microscopía óptica.**

Para llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia, se utilizan células cultivadas en cubreobjetos.

### ***Fijación para microscopía óptica.***

Se hizo una fijación débil con paraformaldehído al 2% en PBS, durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Se hacen 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y posteriormente se les hace el tratamiento correspondiente para cada tipo de anticuerpo:

### ***Inmunofluorescencia para Microscopía óptica.***

#### ***Anti-Z-DNA***

- Permeabilizar las células con Tritón X-100 al 0.5% durante 5 minutos a 4°C
- Lavar con PBS-Tween 5 minutos a 4°C
- Lavar con PBS durante 5 minutos
- Bloquear con PBS-BSA-Tween durante 3 minutos
- Incubar con anticuerpo primario diluido 1/100 en PBS durante 12 horas a 4°C, en cámara húmeda
- Lavar con PBS-Tween durante 3 minutos
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con anticuerpo secundario (RAS IgG acoplado con FITC) diluido 1/200 en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora en una cámara oscura
- Lavar con PBS-Tween durante 3 minutos
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con DAPI durante 3 minutos en una cámara oscura
- Lavar con PBS-Tween durante 3 minutos
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Montar utilizando medio de montaje “antifading”
- Observar en microscopio de fluorescencia

### *Anti-SC35*

- Permeabilizar las células con Tritón X-100 al 0.5% durante 5 minutos a 4°C.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con anticuerpo primario diluido 1/1000 en PBS durante 2 y media horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con anticuerpo secundario (GAM IgG acoplado a FITC) diluido 1/200 en PBS a temperatura ambiente durante 1 y media horas en una cámara oscura.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con DAPI durante 3 minutos en una cámara oscura.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Montar utilizando medio de montaje "antifading".
- Observar en microscopio de fluorescencia.

### *4G3*

- Permeabilizar las células con Tritón X-100 al 0.5% durante 5 minutos a 4°C.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con anticuerpo primario diluido 1/10 en PBS durante 2 y media horas a temperatura ambiente
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con anticuerpo secundario (GAM IgG acoplado a FITC) diluido 1/200 en PBS durante 1 y media horas a temperatura ambiente en una cámara oscura.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Incubar con DAPI durante 3 minutos en una cámara oscura.
- Lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada lavado
- Montar utilizando medio de montaje "antifading"
- Observar en microscopio de fluorescencia

## RESULTADOS

Se examinó el efecto de la LMB sobre las partículas ribonucleoproteicas de núcleos de células HeLa, HepG2 y en cultivos primarios de hepatocitos de rata.

**Tinción general para Microscopía Electrónica con Acetato de Uranilo-Citrato de Plomo.** La técnica de contraste general Ur-Pb, nos permitió observar las condiciones y características de las células HeLa, HepG2 y hepatocitos.

*HeLa.* El análisis ultraestructural en esta línea celular, nos permitió notar que tiene un núcleo grande con respecto al citoplasma y un nucleolo sumamente activo, ya que el tamaño es muy grande (imagen 1). Poseen grandes grumos de cromatina perinucleolar, también se observa fuertemente contrastado un cuerpo de Cajal y es de notar su cercanía al nucleolo; se distingue la cromatina compacta y discontinuidades en la cromatina las cuales podrían corresponder a los poros nucleares. En este núcleo se observa un gran ambiente fibrogranular.

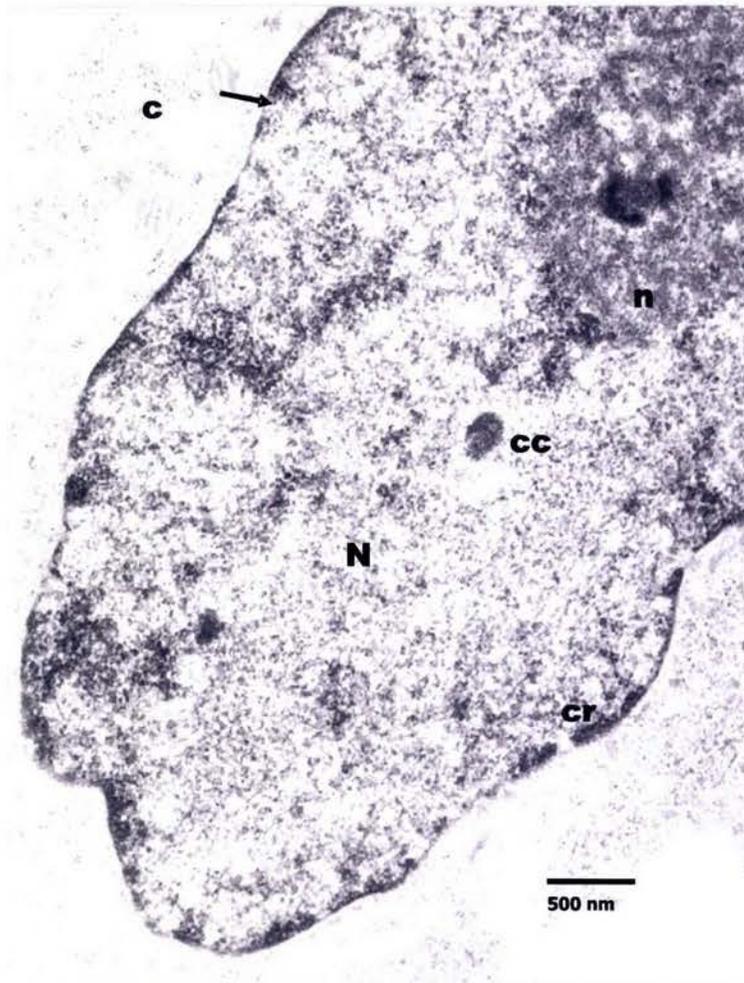


IMAGEN 1. Célula HeLa control. Se observa un núcleo (N), el cual presenta cromatina compacta (cr), cromatina perinucleolar alrededor de nucleolo (n), un cuerpo de Cajal (cc) muy cercano al nucleolo y la flecha indica un espacio correspondiente a un poro nuclear. Ur-Pb. 85 Kv.

*HepG2*. El núcleo de estas células es de gran tamaño, en el núcleo de la imagen 2 se observa un enorme nucleolo, así mismo se puede ver la cromatina compacta y las interrupciones de la misma, indicando los sitios de los poros nucleares.

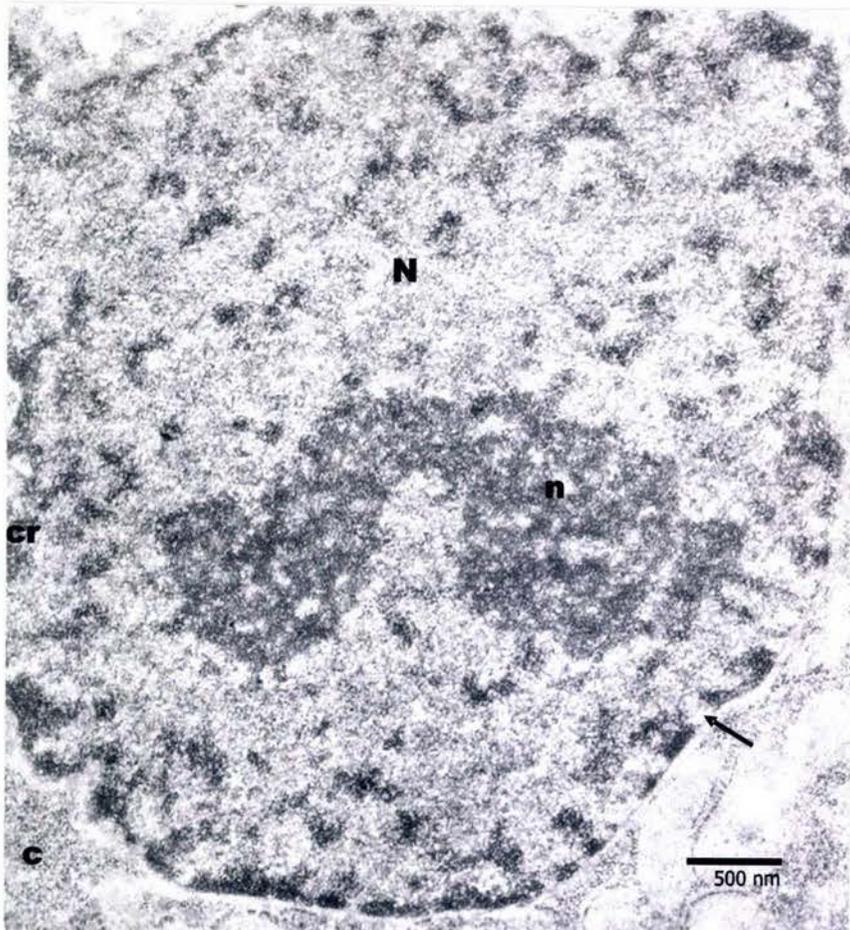


IMAGEN 2. Núcleo (N) celular de HepG2 control. Mostrando un gran nucleolo (n) , cromatina (cr) e interrupciones de ésta indicando los poros nucleares (flecha). Ur-Pb.

*Hepatocitos*. Estas células muestran las características ultraestructurales típicas, ya que presentan núcleos muy redondeados, con un nucleolo relativamente grande rodeado con algunos grupos de cromatina, así mismo se encuentra cromatina compacta y las interrupciones de la misma indicando los sitios de los poros nucleares. También se observa en el núcleo un gran ambiente fibrogranular (imagen 3).

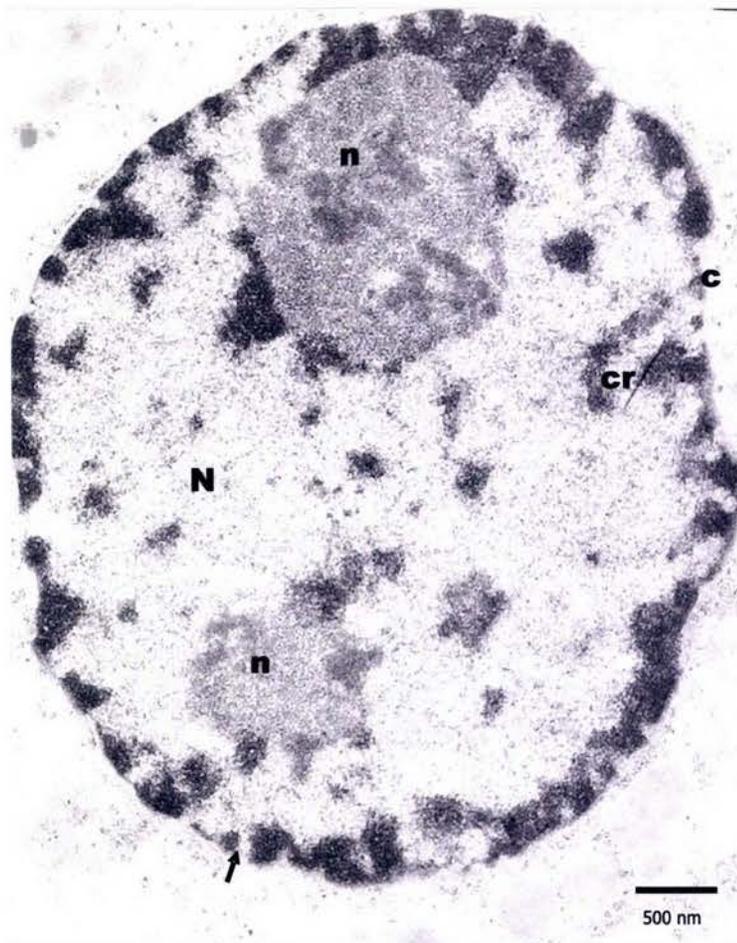


IMAGEN 3. Hepatocito control, en el núcleo (N) se observa cromatina periférica (c) y dos fragmentos de dos nucleolos (n). La flecha indica el espacio correspondiente a un poro nuclear. Ur-Pb.

**Z-DNA.** Se inmunolocalizó la conformación Z-DNA empleando el anticuerpo anti-Z-DNA a nivel de microscopía de fluorescencia, usando anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. El patrón de marcado de éste anticuerpo es de tipo disperso, con algunos puntos más brillantes, correspondientes a las fábricas de transcripción. Este anticuerpo sólo se distribuye en el nucléoplasma, por lo que el citoplasma se encuentra libre de marcado. Para las técnicas de microscopía de fluorescencia, se utilizaron células cultivadas sobre cubreobjetos, por lo que las imágenes corresponden a células enteras, por otro lado, los hepatocitos no fueron procesados para microscopía de fluorescencia debido a que la permeación de éstos fue imposible.

*HeLa.* En la imagen 4 se puede observar a las células control, que presentan una fluorescencia intensa, sin embargo a las 3 horas de tratamiento con LMB, la marca disminuye (imagen 5), siendo esta disminución mucho más drástica a las 8 horas de

tratamiento (imagen 6), en donde la marca es aún menor. Éstos resultados indican una disminución en el proceso de transcripción.

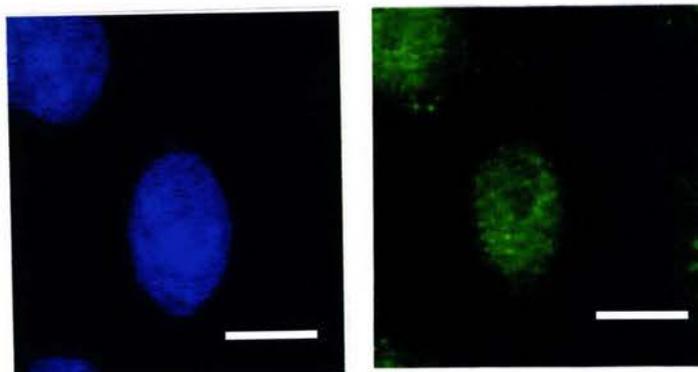


IMAGEN 4. Células HeLa control. La imagen del cuadro de la izquierda muestra el contraste DAPI, a la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo Z-DNA, en donde se observa un patrón definido e intenso. Barra 10 $\mu$ .

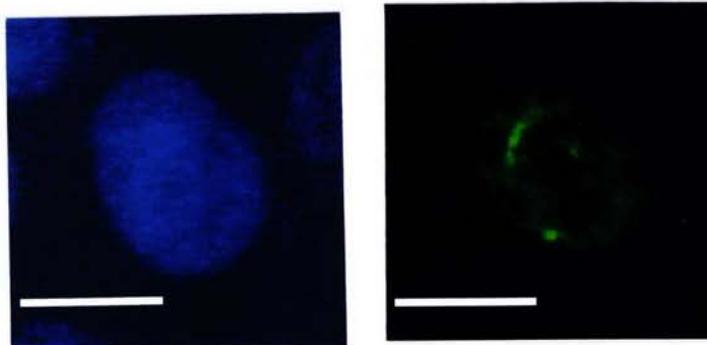


IMAGEN 5. Células HeLa con 3 horas de LMB. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo Z-DNA. En esta imagen se aprecia una disminución de la marca del anticuerpo. Barra 10 $\mu$ .

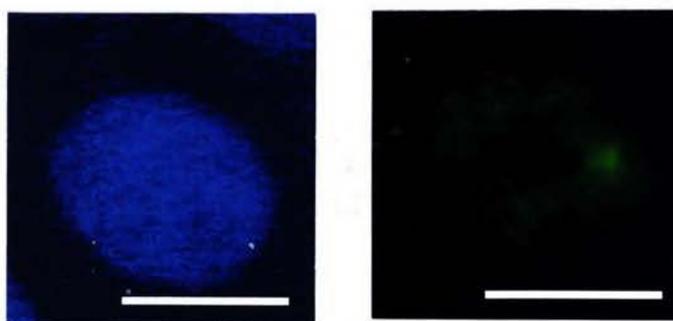


IMAGEN 6. Células HeLa después de 8 horas con LMB. A la izquierda DAPI. A la derecha los mismos núcleos con Z-DNA mostrando un débil marcado. Barra 10 $\mu$ .

*HepG2*. Estas células muestran un comportamiento similar a las células HeLa durante el tratamiento con LMB. En este tipo celular la sensibilidad a la droga es mayor que en HeLa, ya que mientras las células control presentan un marcado amplio en todo el nucleoplasma (imagen 7), en las células con 3 horas de tratamiento el marcado es muy bajo (imagen 8),

incluso en las células con 8 horas con LMB, ya no hay señal del anticuerpo por lo que no mostramos imagen.

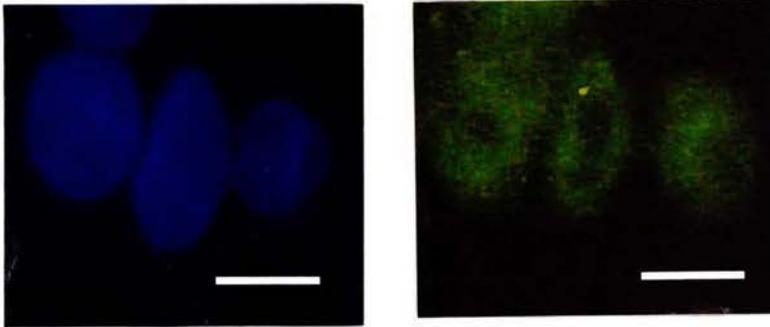


IMAGEN 7. Células HepG2 control. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo Z-DNA. Se puede apreciar la marca intensa en el nucleoplasma. Barra 10 $\mu$ .

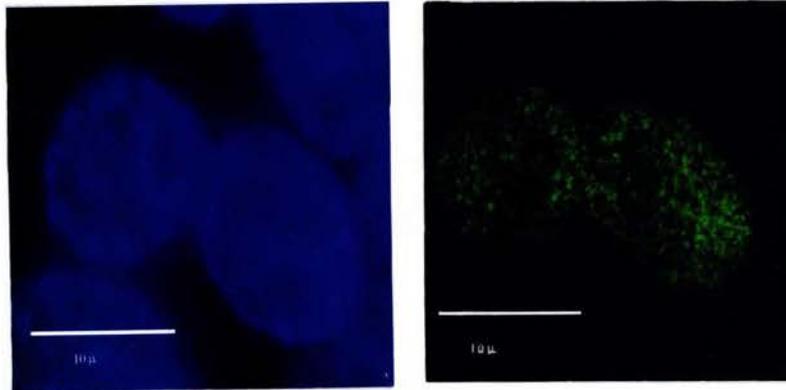


IMAGEN 8. Células HepG2 con 3 horas de tratamiento de LMB. El cuadro izquierdo indica DAPI y a la derecha, núcleos marcados con anti-ZDNA, en estos núcleos la marca es casi nula, muy disminuida con respecto al control. Barra 10 $\mu$ .

**Factor de *splicing* SC35 (fluorescencia).** Para analizar el efecto de la LMB sobre el patrón de distribución de SC35, en las células HeLa y HepG2. Se inmunolocalizó este factor con un anti-SC35 como anticuerpo primario y un secundario acoplado a fluoresceína.

*HeLa.* El patrón presentado por las células control, es el clásico patrón moteado de los factores de *splicing*, en donde se observan las motas y una distribución dispersa, además las motas parecen tener contacto entre sí (imagen 9). Es importante observar que el nucleolo está libre de marca, como era esperado. El patrón moteado se ve afectado en las células tratadas con 3 horas de LMB, ya que el patrón observado es menos disperso y las motas se ven más condensadas (imagen 10).

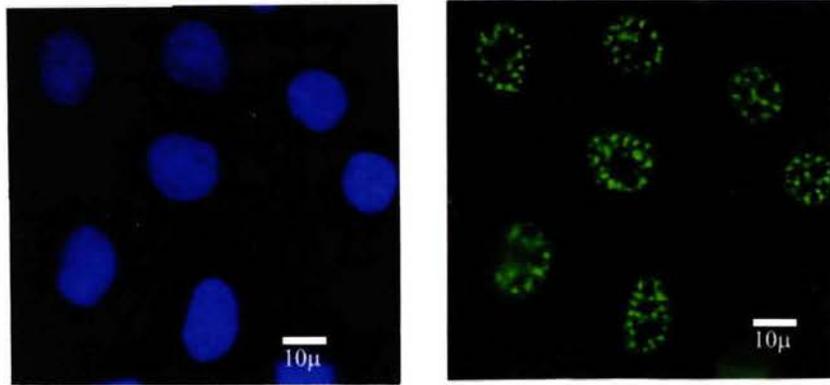


IMAGEN 9. Células HeLa control. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo SC35 (factor de *splicing*), en donde se observa el clásico patrón moteado.

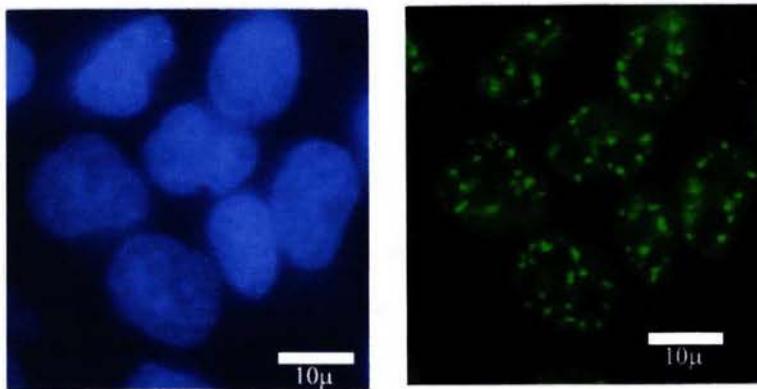


IMAGEN 10. Células HeLa de 3 horas con tratamiento de LMB. El primer cuadro muestra los núcleos contrastados con DAPI y el segundo cuadro los mismos núcleos con anti-SC35, en donde se evidencia la notable disminución del patrón disperso de las motas.

El patrón clásico de moteado disperso de SC35, es totalmente alterado después de 8 horas de tratamiento con LMB en células HeLa, ya que se observa una disminución en el número, forma y dispersión de las motas con respecto al control (imagen 11).

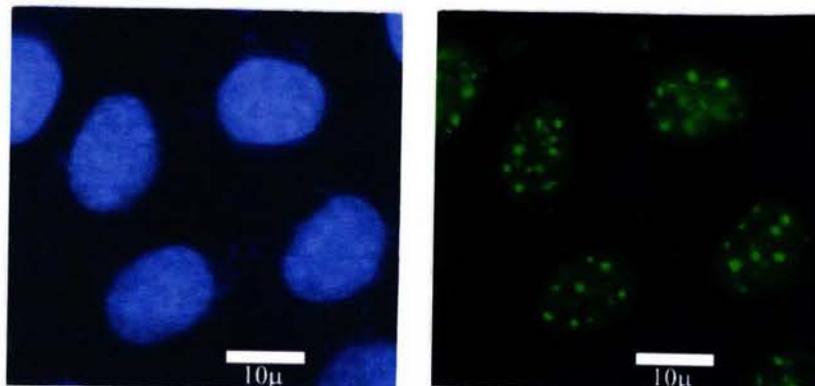


IMAGEN 11. Células HeLa tratadas con LMB durante 8 horas. El cuadro izquierdo, muestra los núcleos contrastados con DAPI y a la derecha se observan los mismos núcleos con el anticuerpo SC35, en donde podemos apreciar que las motas han cambiado su patrón disperso.

*HepG2*. La inmunolocalización de SC35 en estas células, permitió la observación de un patrón moteado y disperso característico de este factor de *splicing* cuando es

inmunomarcado. En las células control se observa que incluso las motas pueden tocarse una con otra (imagen 12), en cambio en las células tratadas tanto de 3 horas (imagen 13) como de 8 horas de tratamiento, las células pierden ese patrón característico, siendo más evidente en las células con tratamiento más largo (8 horas, imagen 14).

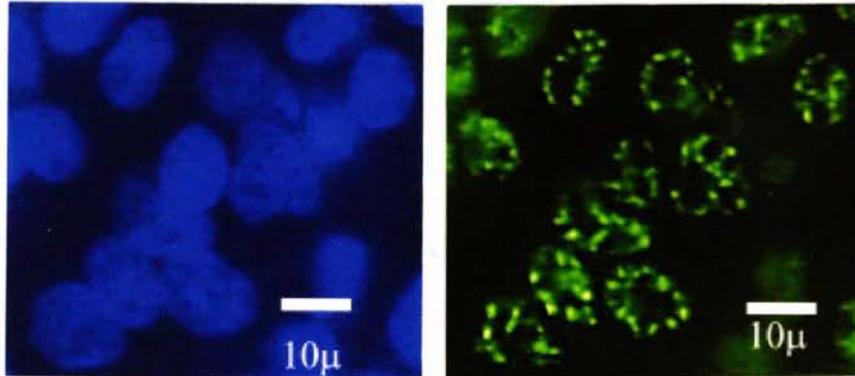


IMAGEN 12. Células HepG2 control. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo SC35 (factor de *splicing*), en donde se observa el clásico patrón moteado excluyendo al nucleolo.

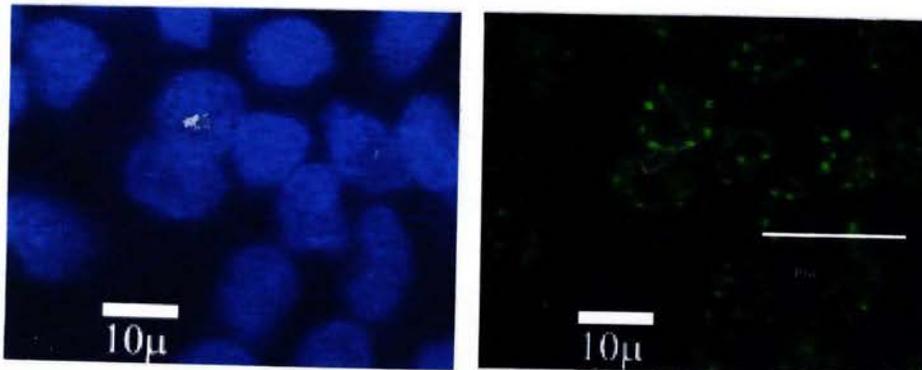


IMAGEN 13. Células HepG2 de 3 horas con tratamiento de LMB. El primer cuadro muestra los núcleos contrastados con DAPI y el segundo cuadro los mismos núcleos con anti-SC35, en donde se evidencia la notable disminución del patrón disperso de las motas.

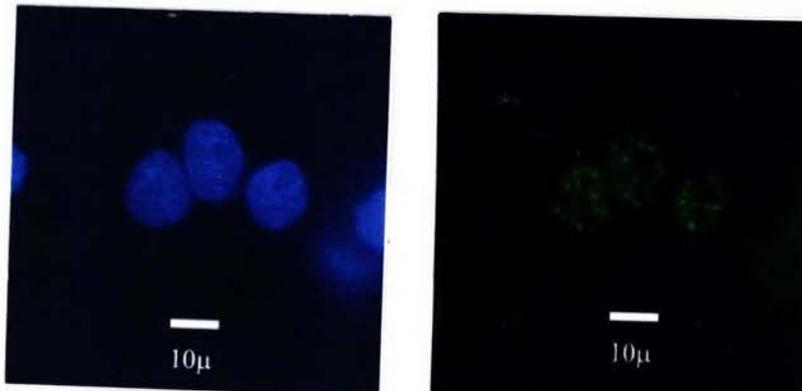


IMAGEN 14. Células HeepG2 tratadas con LMB durante 8 horas. El cuadro izquierdo, muestra los núcleos contrastados con DAPI y a la derecha se observan los mismos núcleos con el anticuerpo SC35 que como podemos apreciar las motas han cambiado y se observan compactas.

**EDTA.** El uso de la técnica de EDTA para evidenciar ribonucleoproteínas, no permitió obtener información a nivel de microscopía electrónica en lo referente a los transcritos nacientes (fibras pericromatinianas) y a los sitios de almacén de factores de *splicing* (gránulos intercromatinianos).

*HeLa*. La imagen 15 muestra que estas células tienen un núcleo grande y en él se observa un nucleolo, cúmulos de gránulos intercromatinianos y un gran ambiente fibrogranular. Es importante notar que las ribonucleoproteínas se encuentran amplia y densamente dispersas en el nucleoplasma, así mismo, el nucleolo presenta características de una alta actividad, ya que se pueden apreciar los diferentes compartimientos nucleolares. En el lado citoplasmático se observan las microvellosidades citoplasmáticas.

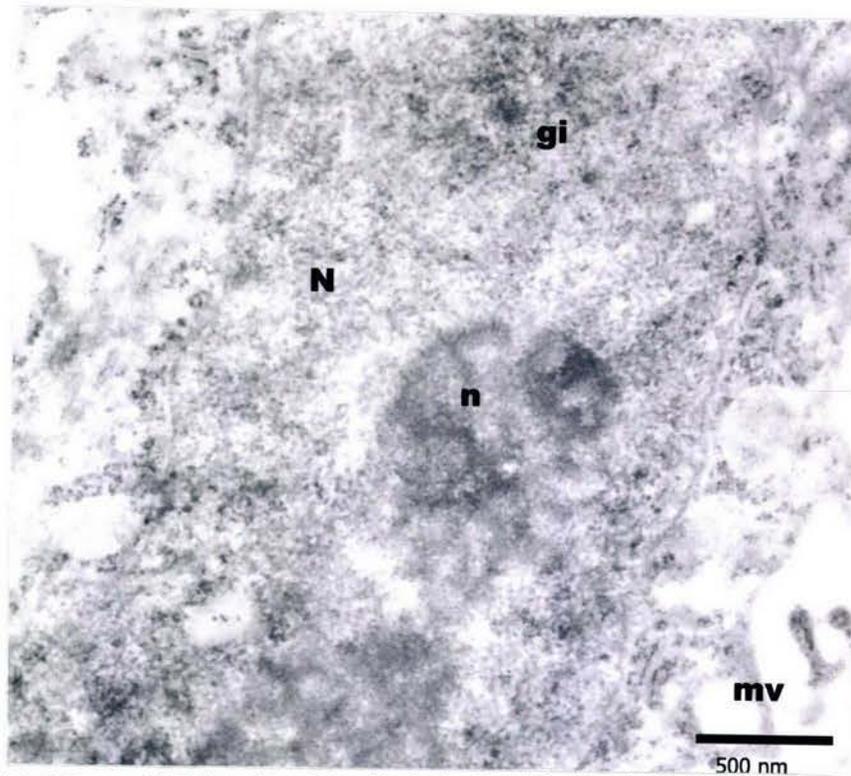


IMAGEN 15. Célula HeLa control. Núcleo celular (N), evidenciando el nucleolo (n), cúmulos de gránulos intercromatinianos (gi) y un gran ambiente fibrogranular. Es importante notar que las ribonucleoproteínas se encuentran amplia y densamente dispersas en el nucleoplasma. En el lado citoplasmático se observan microvellosidades citoplasmáticas (mv). EDTA.

Después de 8 horas de tratamiento con LMB, las células HeLa (imagen 16) presentan diferencias evidentes con respecto a las control en lo referente a la cantidad de fibras pericromatinianas y a los cúmulos de gránulos intercromatinianos, pues después del tratamiento de 8 horas, estas estructuras son mucho menos evidentes. Los cúmulos de gránulos intercromatinianos se ven drásticamente alterados, porque estos son mas pequeños en cuanto a distribución espacial en el nucleoplasma y son menos frecuentes que en las células control. Estos resultados implican que la LMB afecta a las fibras pericromatinianas que son la manifestación morfológica de los transcritos nacientes, así como a los gránulos intercromatinianos los cuales corresponden a los sitios de almacén de factores de *splicing*.

*HepG2*. Las imágenes de las células control, muestran un gran ambiente fibrogranular, así como grandes cúmulos de gránulos intercromatinianos, los cuales se distribuyen muy ampliamente en el nucleoplasma (imagen 17). Cuando estas células se exponen al tratamiento con LMB (imagen 18), el ambiente fibrogranular se ve drásticamente disminuido, ya que no se presentan tantas fibras pericromatinianas y los cúmulos de gránulos intercromatinianos son más pequeños y su frecuencia se ve disminuida, al igual que en HeLa.

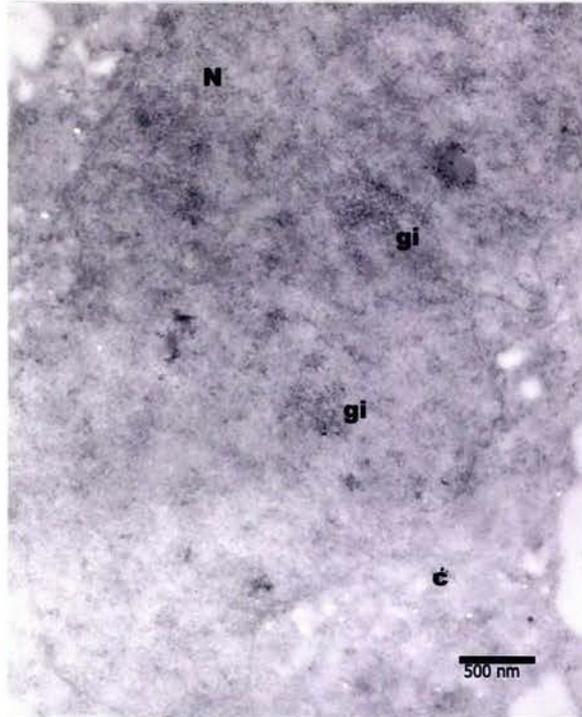


IMAGEN 16. Célula HeLa con 8 horas de LMB. Se puede apreciar el núcleo (N), pequeños cúmulos de gránulos intercromatinianos (gi). Obsérvese como los cúmulos de gránulos intercromatinianos son más pequeños que en el control. C: citoplasma. EDTA.

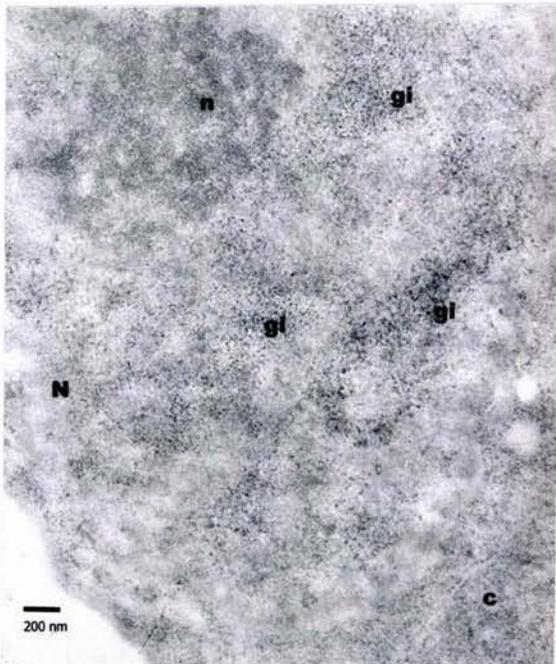


IMAGEN 17.. Célula HepG2 control. Núcleo celular (N), evidenciando el nucleolo (n), cúmulos de gránulos intercromatinianos (gi) Es importante notar que los cúmulos de GI se encuentran ampliamente dispersos en el nucleoplasma. C: citoplasma. EDTA

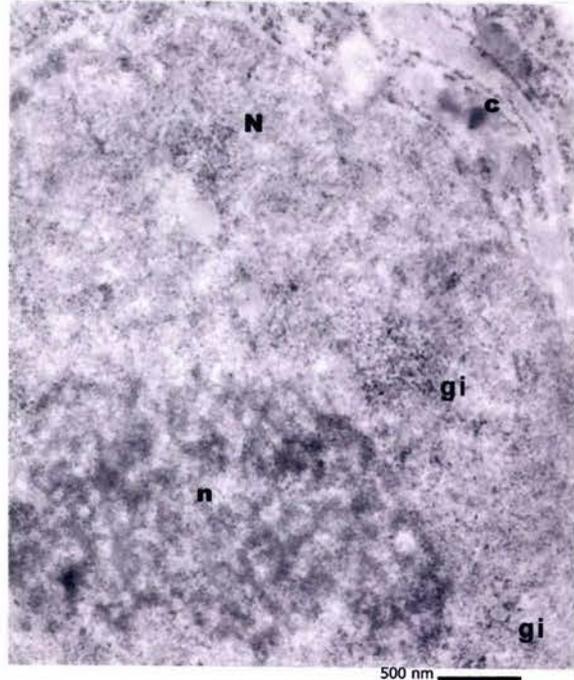


IMAGEN 18. Célula HepG2 con 8 horas de LMB. Se puede apreciar el núcleo (N) y una fracción del nucleolo (n), pequeños cúmulos de gránulos intercromatinianos (gi). Obsérvese como los cúmulos de gránulos intercromatinianos son más pequeños que en el control. C: citoplasma. Aumentos. EDTA.

*Hepatocitos de rata.* Éstos solo se sometieron a 3 horas con LMB 30, debido a que no resisten tanto tiempo en el cultivo y se empieza a presentar una alta muerte celular. En el contraste para evidenciar ribonucleoproteínas se pudo observar un gran ambiente fibrogranular en el núcleo, así como un evidente nucleolo (imagen 19). Una vez que los hepatocitos son tratados con LMB durante 3 horas, este ambiente es alterado, observándose menos fibras pericromatinianas, así como una disminución del ambiente fibrogranular (imagen 20), coincidiendo este comportamiento con el de las líneas celulares HeLa y HepG2.

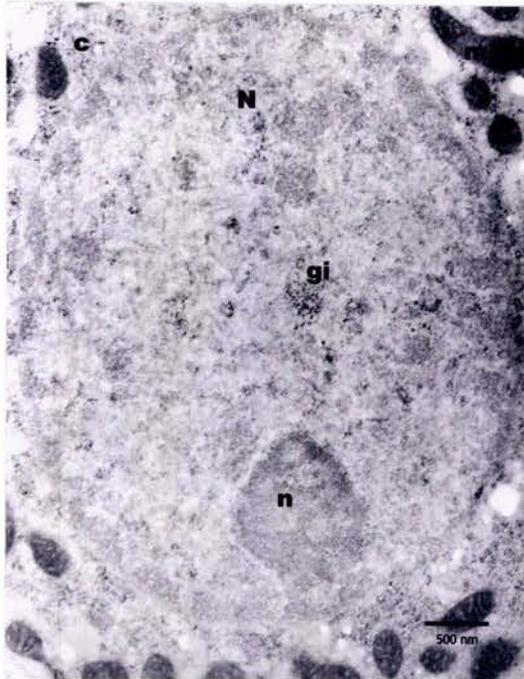


IMAGEN 19. Hepatocito de rata control. Núcleo celular (N), evidenciando el nucleolo (n) y un gran ambiente fibrogranular. EDTA

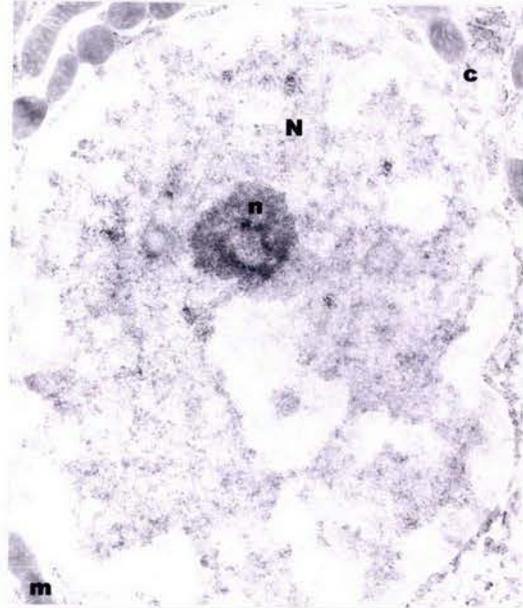


IMAGEN 20. Hepatocito con 3 horas de LMB. Se puede apreciar el núcleo (N) y una fracción del nucleolo (n), pequeños cúmulos de gránulos intercromatinianos (gi). Obsérvese como el ambiente fibrogranular se ve disminuido con respecto al control. EDTA.

**Factor de *splicing* SC35 (microscopía electrónica).** La inmunolocalización se hizo usando un anticuerpo secundario acoplado a micelas de oro de 18 nm de diámetro.

*HeLa.* Los cambios más evidentes fueron dados a las 8 horas de tratamiento, ya que el número de micelas de oro encontradas en los núcleos celulares fue menor que en el control (imagen 21 y 22).

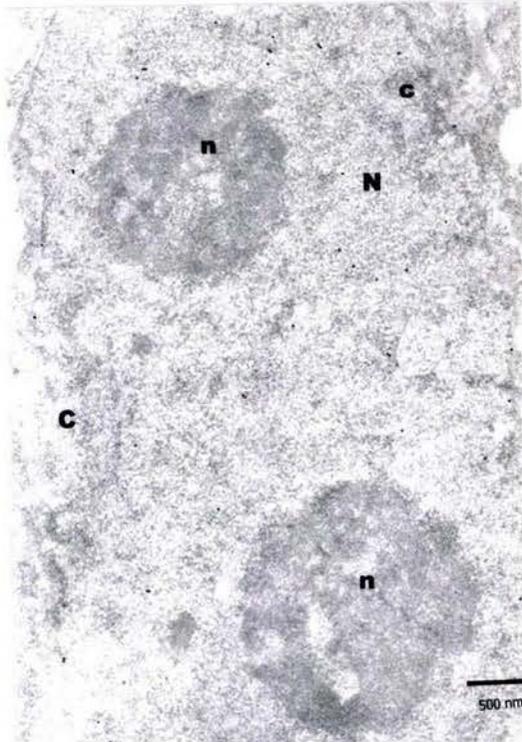


IMAGEN 21. Célula HeLa control. En donde se observa el núcleo (N) con dos nucleolos (n) así como cromatina compacta (c). Se pueden observar los granos de oro, los cuales están marcando el SC35.

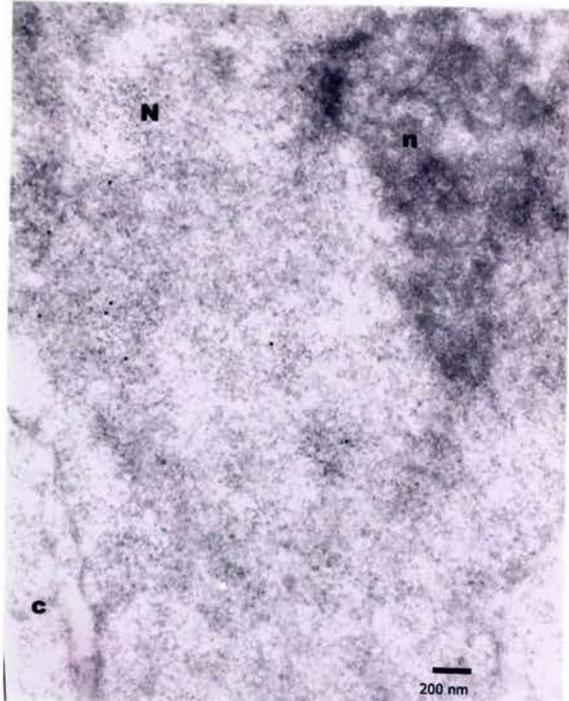


IMAGEN 22. Célula HeLa con 8 horas de tratamiento con LMB. En esta célula se observa al núcleo (N) con una fracción del nucleolo. Esta micrografía nos permite apreciar la marca de granos de oro indicando SC35. Existe una evidente disminución en la cantidad de marcado con respecto al control.

*HepG2.* En estas células, el patrón de distribución de marcado de SC35 se ve afectado con el tratamiento de LMB ya que la marca disminuye conforme al tiempo de exposición con la droga, siendo a las 8 horas de tratamiento, el efecto mayor, pues los granos de oro son menos numerosos (imágenes 23 y 24).

*Hepatocitos.* Estas células también se ven afectadas con el tratamiento, ya que después de 3 horas con LMB, la marca de granos de oro es menor que en las células control (imágenes 25 y 26).

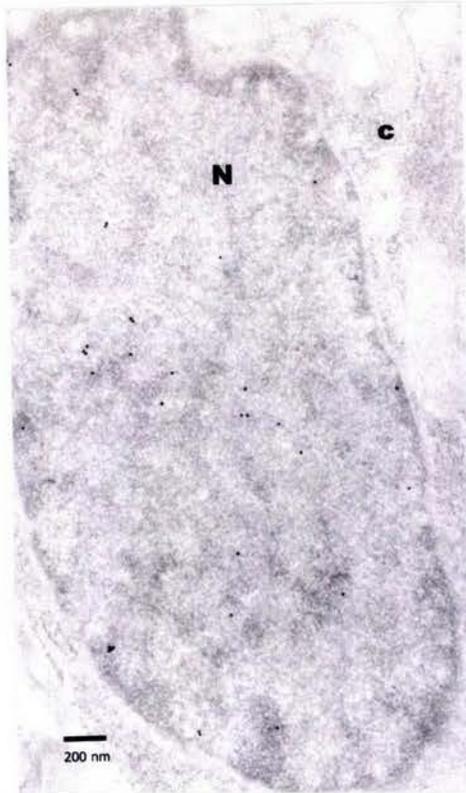


IMAGEN 23. Célula HepG2 control. En donde se observa que en el núcleo (N) están presentes los granos de oro, los cuales están marcando el SC35.

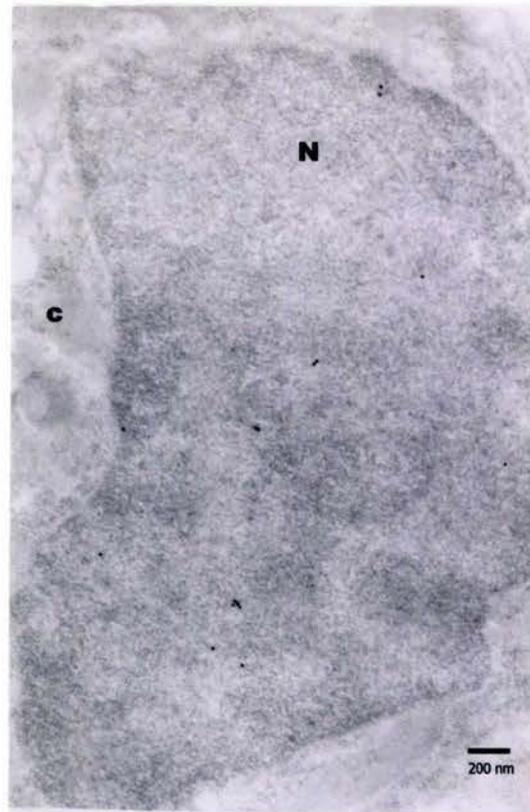


IMAGEN 24 Célula HepG2. con 8 horas de tratamiento con LMB. En esta célula se observa al núcleo (N) en el cual se puede apreciar la marca de granos de oro sobre el SC35. Existe una evidente disminución en la cantidad de marcado con respecto a las células control.

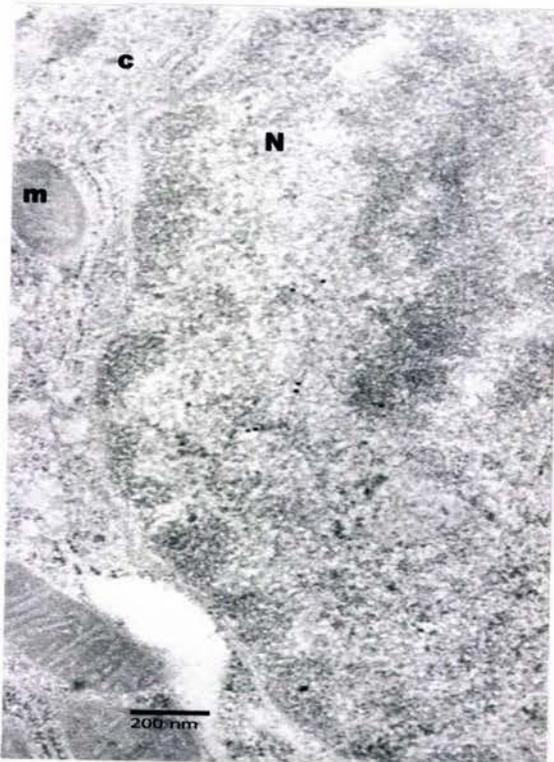


IMAGEN 25. Hepatocito control. En donde se observan granos de oro en el núcleo (N), que marcan al SC35. En el lado citoplasmático (c) se aprecian algunas mitocondrias.

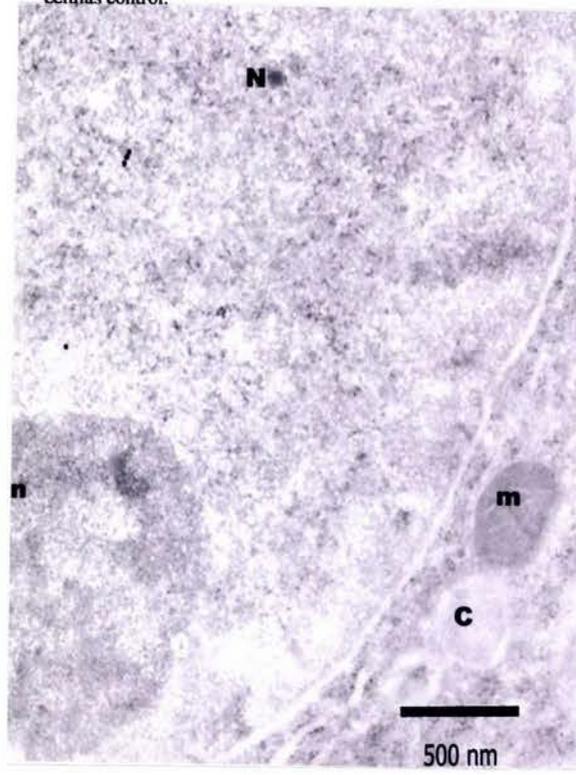


IMAGEN 26. Hepatocito con 3 horas de tratamiento de LMB. En esta célula se observa al núcleo (N) en el cual se puede apreciar la marca de granos de oro marcando al SC35. Existe una evidente disminución en la cantidad de marcado con respecto a las células control. En el citoplasma (c) hay mitocondrias (m)..

**Cuerpos de Cajal (4G3).** Finalmente, para conocer qué sucedía en los sitios de almacén transitorio de los factores de *splicing*, los cuerpos de Cajal, se hizo una inmunolocalización con microscopía de fluorescencia de la proteína de *splicing* U2B, que se encuentra en los cuerpos de Cajal que se inmunomarcaron con el anticuerpo 4G3, se evidencian como puntos brillantes en el núcleo y cada punto brillante indica un cuerpo de Cajal.

*HeLa.* En la imagen 27 se muestran células control, en donde se observan puntos brillantes que corresponden a los cuerpos de Cajal. En esta imagen, se puede apreciar que las células HeLa tienen varios cuerpos de Cajal.

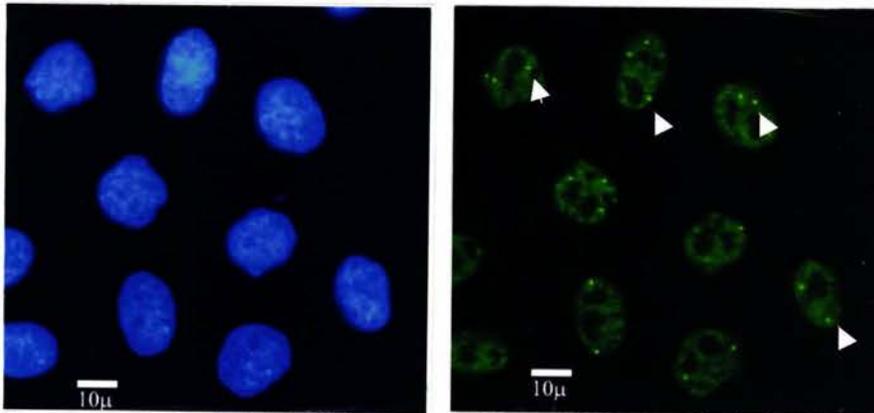


IMAGEN 27. Células HeLa control. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo 4G3, que permite observar los cuerpos de Cajal (flechas).

En las células HeLa que fueron tratadas con LMB 30 durante 3 y 8 horas, se observaron patrones diferentes a los de los controles, ya que los puntos brillantes que indicaban cuerpos de Cajal fueron menos evidentes en las células tratadas principalmente después de 8 horas de tratamiento; en este tiempo de incubación con la droga, la marca de puntos brillantes fue notablemente baja, de tal forma que solo algunas células presentaban algún punto brillante (imágenes 28 y 29).

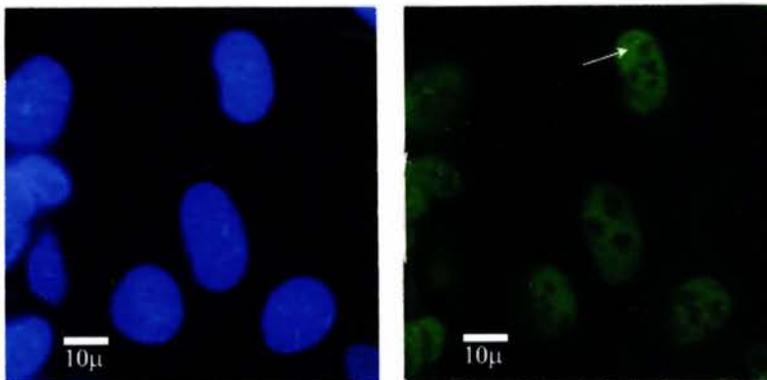


IMAGEN 28. Células HeLa de 3 horas con tratamiento de LMB. El primer cuadro muestra los núcleos contrastados con DAPI y el segundo cuadro los mismos núcleos con 4G3 que evidencia la notable disminución de cuerpos de Cajal (flecha).

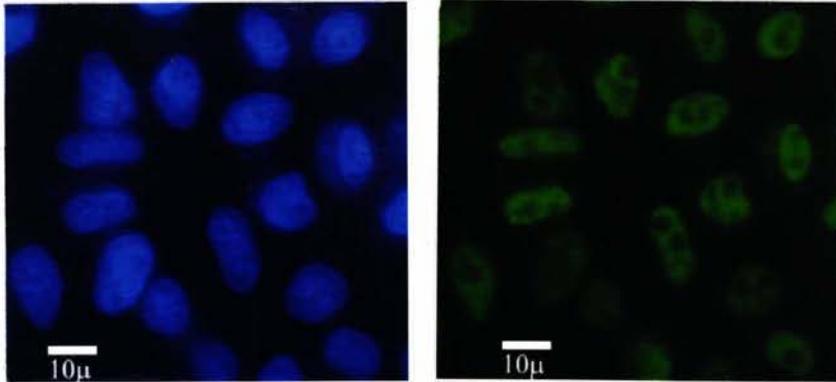


IMAGEN 29. Células HeLa tratadas con LMB durante 8 horas. El cuadro izquierdo, muestra los núcleos contrastados con DAPI y a la derecha se observan los mismos núcleos con el anticuerpo 4G3 que como podemos apreciar, no hay cuerpos de Cajal.

*HepG2*. Para éstas células, se obtuvieron resultados similares a los señalados para HeLa, ya que las células control, presentaban evidentes puntos brillantes, indicando cuerpos de Cajal (imagen 30), sin embargo, tras los tratamientos con LMB por 3 (imagen 31) y 8 horas, la marca que evidencia a los cuerpos de Cajal, se ha ido perdiendo, de tal forma que a las 8 horas con la droga, no se observaba ningún punto brillante que indicara cuerpos de Cajal (imagen 32).

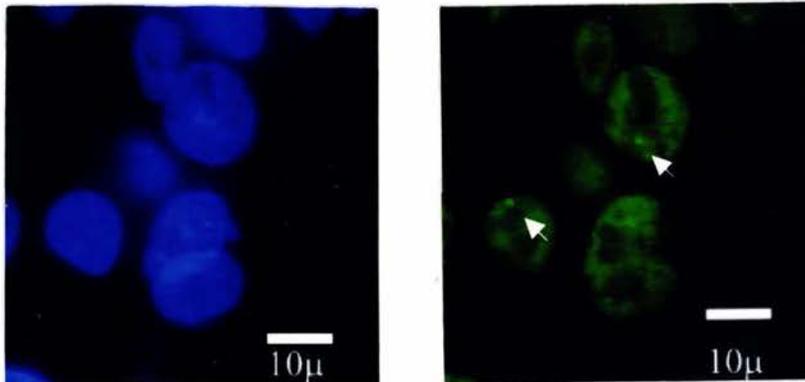


IMAGEN 30. Células HepG2 control. El cuadro de la izquierda nos muestra el contraste DAPI, para evidenciar los núcleos y el cuadro de la derecha los mismos núcleos con el anticuerpo 4G3, que permite observar los cuerpos de Cajal (flechas).

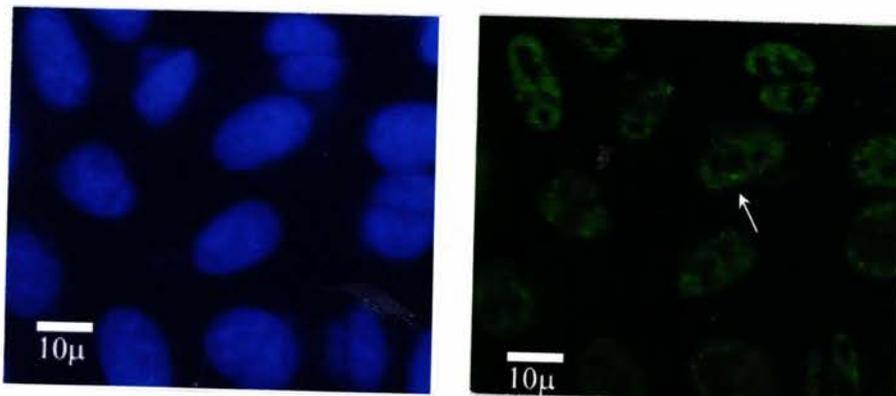


IMAGEN 31. Células HepG2 de 3 horas con tratamiento de LMB. El primer cuadro muestra los núcleos contrastados con DAPI y el segundo cuadro 4G3 que evidencia la notable disminución de cuerpos de Cajal (flecha).

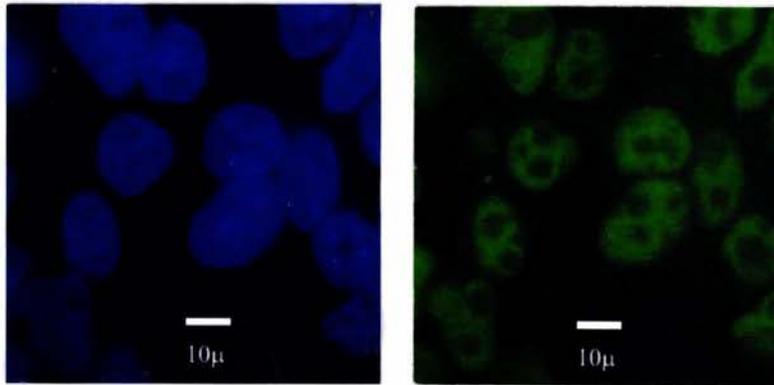


IMAGEN 32. Células HepG2 tratadas con LMB durante 8 horas. El cuadro izquierdo, muestra los núcleos contrastados con DAPI y a la derecha se observa el anticuerpo 4G3 que como podemos apreciar, no se ha presentado marca del anticuerpo.

Después de tomar imágenes para microscopía de fluorescencia, se hizo un conteo del número de cuerpos de Cajal en los diferentes tiempos de tratamiento en las líneas celulares HeLa y HepG2. En la línea celular HeLa todas las células tenían por lo menos un cuerpo de Cajal y no se presentaron células carentes de cuerpos de Cajal; si comparamos con las células después de 3 horas de tratamiento con LMB, el número de células que no tuvieron cuerpos de Cajal, aumenta considerablemente (84%), revelando así, un efecto de disminución en el número de cuerpos de Cajal con respecto al control. En el tiempo más largo de tratamiento con LMB el número de células que no tienen cuerpos de Cajal aumenta drásticamente con respecto al control, ya que aumenta a un 89%.

Los cuerpos de Cajal, también fueron examinados para la línea celular HepG2 y obtuvimos resultados similares que para HeLa, solo que a diferencia de éstas, HepG2 parece ser más sensible al tratamiento con LMB, ya que a las 8 horas de tratamiento no se encontró un solo cuerpo de Cajal, mientras que el control presentaba un 18% de células que no tenían cuerpo de Cajal. A las 3 horas de tratamiento con LMB, las células HepG2 aumentaron este 18% a un 83% de células sin cuerpos de Cajal.

Todos estos resultados nos indican que además de afectar al transporte núcleo-citoplasma, la LMB altera el procesamiento transcripcional así como a los sitios de almacén del factor de *splicing* SC35 y a los sitios de almacenamiento transitorio de factores de *splicing*, los denominados cuerpos de Cajal.

## DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron por medio de la microscopía electrónica de transmisión, nos permitieron conocer que las características ultraestructurales de los diferentes tipos celulares con que se realizó el presente trabajo eran adecuadas para nuestros objetivos, es decir que las células presentaban una alta cantidad de mitocondrias, una buena conservación de membranas y un gran ambiente fibrogranular en el núcleo.

Ya sabido el efecto de la LMB en el transporte núcleo-citoplasma (Xu y Massagué, 2004), en nuestro grupo surgió la necesidad de conocer el efecto que esta droga causa sobre la síntesis y el procesamiento del ARN hasta llegar a ARNm; esto es decir, de qué manera se alteran las manifestaciones morfológicas de los primeros transcritos (FP), los sitios de almacén de factores de splicing (gránulos intercromatinianos y motas) y los sitios de almacenamiento transitorio de algunos factores de splicing (cuerpos de Cajal).

Los resultados obtenidos con respecto a la ultraestructura de las partículas ribonucleoproteicas llamadas fibras pericromatinianas, indican una disminución del ambiente fibrilar de células tratadas con la droga, siendo más evidente esta alteración después de 8 horas de tratamiento con LMB. Esto implica una afectación sobre el proceso de transcripción, lo cual fue corroborado a nivel de microscopía de fluorescencia, utilizando un anticuerpo dirigido contra el Z-DNA (anti-Z DNA), ya que se ha encontrado que la formación de Z-DNA *in vivo* se puede localizar en genes que están transcribiendo y produciendo ARNm (Herbert y cols., 1997; Rich y Zhan, 2003). Wittig y cols. (1991) observaron que un incremento en la actividad transcripcional en los núcleos, genera un incremento paralelo de la cantidad de Z-DNA. La torsión negativa de la cadena inducida por el movimiento de la ARN-Pol estabiliza la formación de Z-DNA cerca de los sitios de inicio de transcripción (Liu y cols. 1987). Otras observaciones (Liu y cols., 2001) indican que la transcripción se inicia con la formación de Z-DNA. El predominio de secuencias que favorecen la formación de Z-DNA cerca de los sitios de transcripción, genera la posibilidad de que estos mecanismos sean generalizados (Schroth y cols., 1992). En los resultados obtenidos en el presente experimento con respecto al Z-DNA, encontramos que efectivamente la LMB afecta al proceso de transcripción, ya que el marcado que indica la presencia de esta conformación del ADN durante la transcripción, se ve drásticamente disminuido conforme avanza el tiempo de acción de la LMB sobre las células.

Después de conocer que la LMB afecta al proceso de transcripción, surge la necesidad de saber qué sucede con los sitios de almacén de *splicing*. Cuando se han examinado células tratadas con inhibidores de *splicing* a nivel ultraestructural, se ha encontrado alteraciones en los gránulos intercromatinianos, así como una reducción significativa en la cantidad de fibras pericromatinianas en el núcleo (O'Keefe y cols., 1994). Las técnicas desarrolladas para microscopía electrónica en este trabajo, nos permiten identificar las alteraciones que la LMB provoca en los cúmulos de gránulos intercromatinianos, encontrando que los cúmulos de gránulos intercromatinianos en los núcleos de las células control, se distribuyen ampliamente en el nucleoplasma, sin embargo, después de 8 horas con la LMB, éstos cúmulos se ven disminuidos en cuanto a su distribución, ya que se presentan solo unos pequeños cúmulos. Estos resultados se observan en los tipos celulares estudiados en este trabajo.

Las regiones correspondientes a gránulos intercromatinianos y fibras pericromatinianas a nivel de microscopía electrónica, corresponden a la distribución moteada de RNPpn en microscopía de fluorescencia (Huang y Spector, 1997). Una comparación de inmunomicroscopía óptica y electrónica, muestran que los factores de *splicing* se localizan en grupos de gránulos intercromatinianos, fibras pericromatinianas, zonas asociadas con gránulos intercromatinianos y cuerpos de Cajal. Los factores de *splicing* pueden presentar estas estructuras (Sleeman y Lamond, 1999). En nuestro trabajo, el factor de *splicing* SC35, se ve alterado después del tratamiento, ya que se observa una reducción del tamaño de las motas y se pierde el patrón moteado difuso en las dos líneas celulares (HeLa y HepG2). Este efecto es mucho más evidente después del tratamiento de 8 horas con LMB. Sleeman y cols. (2001) encontraron que la LMB puede inhibir la acumulación normal de RNPpn en motas. En células de mamíferos, la LMB bloquea el exporte nuclear, incluyendo el exporte de ARNpn dentro del citoplasma y es por lo tanto predecible que bloquea el importe de proteínas Sm al núcleo, debido a que el ensamble de la proteína Sm en ARNpn es un evento citoplasmático que ocurre antes del re-importe de RNPpn dentro del núcleo (Fornerod y cols., 1997; Carvalho y cols., 1999). Dependiendo del tiempo de adición, la LMB también puede conducir a la acumulación de RNPpn nuevamente importados en cuerpos nucleares residuales conteniendo la proteína Sm pero sin coilina p80. La respuesta de las motas frente a la LMB podría deberse a una deficiencia en un factor o factores que requieren CRM1 para su función, ya que la LMB es un inhibidor específico de CRM1, un receptor esencial para el exporte nuclear de factores con SEN, que es una secuencia rica en leucina (Ullman y cols., 1997). La LMB también puede interferir con eventos de transporte nuclear requeridos para la localización de RNPpn dentro del núcleo como un distinto evento de exportación. El efecto que nosotros hemos observado tanto en las motas, como en los gránulos intercromatinianos, indica que la afectación de LMB al transporte, trae consigo una serie de alteraciones a la maquinaria de *splicing*, como lo indican otros trabajos como el de Chen y cols. (2001), afectando a su vez al proceso de transcripción. También existen varias evidencias de que las motas funcionan como compartimentos de almacenaje de factores de *splicing*, que pueden ser suministrados a los sitios de transcripción activa. Por ejemplo, estudios con células vivas muestran que los factores de *splicing* son reclutados de las motas a sitios de transcripción (Misteli y cols., 1997), por el contrario, los factores de *splicing* acumulados en motas alargadas y redondas cuando se inhiben la transcripción (Spector y cols., 1983) o el *splicing* de pre-ARNm (O'Keefe y cols., 1994). La localización de patrón moteado es un buen diagnóstico para proteínas que están involucradas en el *splicing* de pre-ARNm. Esto apoya la idea de que las motas pueden estar involucradas en la regulación del grupo de factores que son accesibles para la maquinaria de transcripción en el procesamiento de pre-ARNm, ya que se ha encontrado que cuando las células son tratadas con drogas que inhiben la transcripción, las motas se ven más redondeadas y pierden el contacto entre sí (O'Keefe y cols, 1994; Alvarez y cols., 2003; Sleeman y Lamond, 1999).

A nivel ultraestructural, la inmunolocalización de SC35, nos permitió observar que el número de micelas de oro disminuye con respecto al tiempo de tratamiento, siendo obviamente, mas abundante en las células control de todos los tres tipos celulares y disminuyendo drásticamente en el tiempo de mayor incubación con la droga (8 horas). Lo anterior, coincide totalmente con los resultados obtenidos con las técnicas con inmunofluorescencia, corroborando un efecto de la LMB en la maquinaria de *splicing* y en la transcripción, ya que los factores de *splicing* están constantemente conectados entre los

sitios de *splicing* activos y los sitios de almacén y/o reensamble, en respuesta a la actividad transcripcional (Huang y Spector, 1997). La inhibición de la transcripción o del *splicing* abate la necesidad de la regulación de factores de *splicing*, dando como resultado una acumulación de estos factores en los grupos de gránulos intercromatinianos, indicando que la respuesta de los GI está relacionada con la actividad transcripcional de la célula.

Existen varios factores de transcripción requeridos para la expresión de ARN<sub>p</sub>n que son detectados en cuerpos de Cajal (Jordan y otros, 1997; Schul y cols., 1998). El hecho de que los cuerpos de Cajal sean una característica celular altamente conservada (Moreno Díaz-de la Espina y cols., 1980) y que además se encuentran en mayor número en células tumorales (Spector y cols., 2002), hace de ellos un adecuado parámetro de medición, ya que estos contienen ARN<sub>p</sub>n y RNP<sub>p</sub>n las cuales se encuentran en los GI (Carmo-Fonseca y cols., 1991). Los resultados obtenidos en nuestro experimento, muestran un evidente efecto de la LMB sobre los CC en donde el número de estos se ve disminuido. Cuando la exportación núcleo-citoplasma es inhibida por LMB, esta bloquea la exportación de ARN<sub>p</sub>n y consecuentemente el reimporte de TMG-ARN<sub>p</sub>n ensamblado con proteínas Sm (Fornerod y cols., 1997), lo cual implica una afectación a los CC, también Sleeman y cols. (2001), incubaron células HeLa con LMB durante 8 horas y encontraron que este tratamiento de células con LMB impide la acumulación de RNP<sub>p</sub>n en CC, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Otro trabajo que apoya nuestros hallazgos es el de Carvalho y cols. (1999), quienes después de tratar células Huh7 con LMB, observaron una depleción de RNP<sub>p</sub>n de CC, lo cual sugiere que las RNP<sub>p</sub>n *spliceosomales* nuevamente importadas del citoplasma se almacenan transitoriamente en los cuerpos de Cajal. Después de la exposición a la LMB los cuerpos de Cajal fallan para concentrar RNP<sub>p</sub>n. Ya que la LMB inhibe el exporte nuclear de UARN<sub>p</sub>n, el ensamble de nuevas partículas RNP<sub>p</sub>n en el citoplasma y su subsiguiente transporte al núcleo también es bloqueado. La exposición de las células a la LMB afecta a los cuerpos de Cajal ya que el número decrece. Al igual que nosotros otros grupos han encontrado que el inhibidor LMB causa una depleción de RNP<sub>p</sub>n del CC, indicando que la acumulación de RNP<sub>p</sub>n en estas estructuras es transitoria.

Lo anterior, nos permite inferir una franca afectación de la droga tanto en el proceso de transcripción así como en el proceso de almacén del factor de *splicing* SC35, de igual forma, se ven afectados los CC, ya que los puntos brillantes que los marcan en inmunofluorescencia, se ven drásticamente disminuidos. Todo esto tiene una afectación directa sobre la maduración de los ARNm y su posterior salida del núcleo.

La bibliografía consultada, así como nuestros resultados, impiden dilucidar que evento ocurre primero: si la inhibición del transporte núcleo-citoplasma o la síntesis y procesamiento de ARNm. Para conocer la secuencia de tales eventos, existe la técnica de autorradiografía que se utiliza a nivel de microscopía electrónica, que permite saber cuál fenómeno ocurre primero, por lo que consideramos que el desarrollo de la misma es una excelente opción para un análisis más profundo del tema.

## CONCLUSIONES

- El anticuerpo anti-ZDNA, nos indica un efecto de la LMB en el proceso de transcripción, teniendo un mayor efecto en los periodos de incubación más largos.
- La utilización del anticuerpo 4G3 (cuerpos de Cajal) indica una disminución de los cuerpos de Cajal en las líneas celulares HeLa y HepG2, tratadas con LMB, observándose un mayor efecto a las 8 horas de tratamiento.
- La utilización del anti-SC35 (factor de *splicing*) en células tratadas con LMB, muestra un patrón moteado modificado, ya que las motas son más redondeadas y pierden prácticamente el contacto entre sí, puesto que pierden el patrón difuso, indicando así una disminución en la actividad de *splicing* de ARNm.
- Las micrografías electrónicas, muestran que las fibras pericromatinianas, se ven disminuidas en aquellas células que han sido tratadas con LMB, indicando una disminución en los transcritos nacientes
- La inmunolocalización electrónica de SC35 muestra una disminución de la marca que está directamente relacionada con el tiempo de tratamiento con LMB, ya que en aquellas células tratadas por 8 horas, la marca es menor que en los controles
- Existe un claro efecto de la LMB el proceso de transcripción, en la maquinaria de *splicing* y en los sitios de almacenamiento transitorio de RNPs (cuerpos de Cajal).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J., W. F. Marzluff y J. G. Gall. 1999. The stem loop binding protein (SLBP1) is present in coiled bodies of the *Xenopus* germinal vesicle. *Mol. Biol. Cell.* 10:487-499.
- Agredano-Moreno, L., L. F. Jiménez-García, O. M. Echeverría, E. Martínez, C. Ramos y G. H. Vázquez-Nin. 1994. Cytochemical and immunocytochemical study of nuclear structures of *Lacandonia schismatica*. *Biol. Cell.* 82:177-184.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis y M. Raff. 1996. Biología Molecular de la célula. 3ª edición.
- Alvarez M., X. Estivill y S. De la Luna. 2003. DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *Jour. of Cell Sci.* 116:3099-3107.
- Arts, G. J, M. Fornerod y I. W. Mattaj. 1998. Identification of a nuclear export receptor for tARN. *Curr. Biol.* 8:305-14
- Bachellerie, J. P. E. Puvion y E. Zalta. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58:329-337.
- Bauer, D. W., C. Murphy, Z. Wu, C.-H.H. Wu y J. G. Gall. 1994. In vitro assembly of coiled bodies in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell.* 5:633-644.
- Bell, S. D. y S. P. Jackson. 1998. Transcription in *Archaea*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63:41-51.
- Bellini, M. y J. G. Gall. 1998. Coilin can form a complex with the U7 small nuclear ribonucleoprotein. *Mol. Biol. Cell.* 9:2987-3001.
- Bentley, D. 2002. The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:336-342.
- Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27:250-265.
- Boudonck, K. L. Dolan y P. J. Shaw. 1998. Coiled body numbers in the *Arabidopsis* root epidermis are regulated by cell type, developmental stage an cell cycle parameters. *J. of Cell Sci.* 111:3687-3694.
- Buck M., L. Zhang, N. A. Halasz, T. Hunter y M. Chojkier. 2001. Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *EMBO J.* 20(23):6712-23.
- Butler, J. E. y J. T. Kadonaga. 1997. The downstream core promoter element, DPE, es conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11:3020-3031
- Carmo-Fonseca, M., D. Tollervey, R. Pepperkok, S. M. L. Barabino, A. Merdes, C. Brunner, P. D. Zamora, M. R. Green, E. C. Hurt y A. I. Lamond. 1991. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J.* 10:195-206.
- Carmo-Fonseca, M. R. Pepperkok, B. S. Sproat, W. Ansorge, M. Swanson y A. I. Lamond. 1991b. *In vivo* detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *EMBO J.* 10:1863
- Carmo-Fonseca, M., R. Pepperkok, M. T. Carvalho y A. I. Lamond. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J. Cell Biol.* 117:1-14.

- Carvalho, T., F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M. T. Berciano y M. Carmo-Fonseca. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. of Cell Biol.* 147(4):715-727.
- Chalkiey, G. E. y C. P. Verrijzer. 1999. DNA binding site selection by RNA polymerasa II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.*: 18:4835-4845.
- Chen, L., G. Liao, M. Fujimoro, O. J. Semmens y S. D. Hayward. 2001. Properties of two EBV Mta nuclear export signal sequences. *Vir.* 288:119-128.
- Cmarko, D., P. J. Verschure, T. E. Martin, M. E. Dahmus, S. Krause, X. D. Fu, R. Van Driel y S. Fakan. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell.* 10:211-223.
- Cordes, V. C., S. Reidenbach y W. W. Franke. 1995. High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of *Xenopus oocytes*. *Eur. J. Cell Biol.* 68:240-55.
- Cortés H. J. 2003. *Ácido ribonucleico, RNA*. Capítulo 2 en: Biología Celular y Molecular. Jiménez, L. F. y Merchant H. L. Ed. Pearson Educación. 853pp.
- Cosma, M. P. 2002. Ordered recruitment: gene specific mechanism of transcription activation. *Mol. Cell.* 10:227-236.
- Dworetzky, S. I. y C. M. Feldherr. 1988. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* 106:575-84.
- Fakan, S. 1986. *Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus*. En Methods and achievements in experimental pathology. Jasmin, G y R. Simard. Eds. Nuclear submicroscopy, Karger, Basel. 12:102-140.
- Fakan, S. y W. Bernhard. 1971. Localization of rapidly labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell. Res.* 67:129-141.
- Fakan, S., E. Puvion y G. Sphr. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 99:155-164.
- Fornerod M., M. Ohno, M. Yoshida y I. W. Mattaj. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90:1051-1060.
- Franke, W. W. y U. Scheer. 1974. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 28:249-82.
- Frey M. R. y A. G. Matera. 1995. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:5915-5919.
- Fukuda M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida y E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature.* 390:308-11
- Gall, J. G., E. C. Stephenson, H. P. Erba, M. O. Diaz y G. Barsacchi-Pilone. 1981. Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. *Chromosoma.* 84:159-171.
- Gall, J., M. Bellini, Z. Wu y C. Murphy. 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell.* 10(12):4385-4802.
- Görlich, D. y Ul Kutay. 1999. Transport Between The Cell Nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:607-60).

- Hamamoto T., S. Gunii, H. Tsuji y T. Beppu. 1983a. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J. Antibiot.* (Tokyo). 36:639-645.
- Hamamoto T., H. Seto y T. Beppu. 1983b. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structural elucidation. *J. Antibiot.* (Tokyo). 36:646-650.
- Hamamoto T., K. Watanabe y H. Ikemoto. 1983c. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action on *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Antibiot.* (Tokyo). 36:639-645.
- Hampsey, J. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:465-503
- Hardin, J. W., S. S. Spicer y W. B. Green. 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.
- Herbert, A., J. Alfken, Y. G. Kim, I. S. Mian, K. Nishikura y A. Rich. 1997. A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8421-8426.
- Hervás, J. P., J. Villegas, D. Crespo y M. Lafarga. 1980. Coiled bodies in supraoptic nucleus of the rat hypothalamus during the postnatal period. *Am. J. Anat.* 159:447-454.
- Holstege, FCP., U. Fiedler y H. T. M. Timmers. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J.* 16:7468-7480.
- Hozák P., P. R. Cook, C. Schöfer, W. Mosgöller y F. Wachtler. 1994. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells, *J. Cell Sci.* 107:639-648.
- Huang S. y D. L. Spector. 1992. U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:305-308.
- Jiménez-García, L. F., M. L. Segura-Valdez, R. L. Ochs, L. I. Rothblum, R. Hannan y D. L. Spector. 1994. Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 5:755-966.
- Jiménez-García, L. F. , J. M. Elizundia, B. López-Zamorano, A. Maciel, G. Zavala, O. M. Echeverría y G. H. Vázquez-Nin. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, funge and protoctists. *BioSystems.* 22:103-116.
- Jordan P. C. Cunha y M. Carmo-Fonseca. 1997. The cdk7-cyclin H-MAT1 complex associated with TFIIF is localized in coiled bodies. *Mol. Biol. Cell.* 8:1207-1217.
- Kau, T. W., J. C. Way y P. A. Silver. 2004. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nature.* 4:106-117.
- Kim, Y, J. H. Geiger, S. Hahn y P. B. Sigler. 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature.* 365. 512-520
- Kudo N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida y S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Cell Biol.* 96(16): 9112-9117.
- Kuhnt, M., F. Bitsch, M. Ponelle, J. J. Sanglier, Y. Wang, y B. Wolff. 1998. Microbial Conversion Products of Leptomycin B. *Appl Environ Microbiol.* 64(2):714-720.

- Lafarga, M., J. P. Hervas, M. C. Santa-Cruz, J. Villegas y D. Crespo. 1983. The accessory body of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. *Anat. Embryol.* 166:19
- Lafarga, M., M. A. Andres, M. T. Berciano y E. Maquiera. 1991. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308:329-339.
- Lam M. H., B. Henderson, M. T. Gillespie y D. A. Jans. 2001. Dynamics of leptomycin B-sensitive nucleocytoplasmic flux of parathyroid hormone-related protein. *Traffic.* 2(11):812-9.
- Lamond, A. I. y D. L. Spector. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Rev.* 4:605-612.
- Lamond, A. I. y W. C. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science.* 280:547-553.
- Lee, T. I. y R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 34:77-137.
- Liu R., H. Liu, X. Chen, M. Kirby, P. O Brown y K. Zhao. 2001. Regulation of CSF1 promoter by the SW1/SNF-like BAF complex. *Cell.* 106:309-318.
- Liu, L. F. y J. C. Wang. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7024-7027.
- Lorkovic Z. J., D. A. Wiczorek, M. H. L. Lambermon y W. Filipowicz. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in plant sci.* 5 (4): 1360-1385.
- Luse, D. S & G. A. Jacob. 1987. Abortive initiation by RNA polymerase II *in vitro* at the adenovirus 2 major late promoter. *J. Biol. Chem.* 262:14990-14997.
- Malatesta, M., C. Zancanaro, T. E. Martin, E. K. L. Chan, F. Amalria, R. Luhrmann, P. Vogel y S. Fakan. 1994. Is the coiled body involved in nucleolar functions? *Exp. Cell Res.* 211:415-419.
- Matera, A. G. y D. C. Ward. 1993. Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J. Cell Biol.* 121:715-727.
- Mattaj I. W. y L. Englmeier. 1998. Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67:265-306.
- Maynard J. S. y E. Szathmáry. 1995. The major transitions in evolution. Oxford University Press, Great Britain. Pags. 119-145.
- Medina, M. A., S. Moreno Díaz de la Espina, M. Martín y M. E. Fernández-Gómez. 1989. Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol. Cell.* 67:331-339.
- Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. of Cell Sci.* 113:1841-1849.
- Misteli. T. J. F. Cáceres y D. L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature.* 387:523-527.
- Monneron, A. y W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27:266-288.
- Moore M. J. y M. Rosbash. 2001. TAPping into mRNA export. *Science.* 294:1841-1842.
- Moore M. S. 1998. Ran and nuclear transport. *J. Biol. Chem.* 273:22857-22860.
- Moreno Díaz de la Espina, S. , A. Sánchez-Piña y M. C. Risueño. 1982. Localization of acid phosphatase activity, phosphate ions and inorganic cations in plant nuclear coiled bodies. *Cell Biol. Int. Rep.* 6:601.

- Moreno Díaz de la Espina, S., A. Sánchez-Piña, M. C. Risueño, F. J. Medina y M. E. Fernández-Gómez. 1980b. The role of plant coiled bodies in the nuclear RNA metabolism. *Electron Microsc.* 2:240-241
- O'Keefe, R. T., A. Mayeda, C. L. Sadowski, A. R. Krainer y D. L. Spector. 1994. Disruption of pre-mRNA splicing *in vivo* results in reorganization of splicing factors. *J. Cell Biol.* 124:249-260.
- Ochs, R. L., T. W. J. Stein y E. M. Tan. 1994. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J. Cell Sci.* 107:385.
- Olson, R. L., T. W. J. Stein y E. M. Tan. 1994. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. *J. Cell Sci.* 107: 385-399.
- Pérez V. J. 2001. *Partículas ribonucleicas no nucleolares* en Biología del Núcleo Celular Edts. Echeverría O. M. y F. Ontiveros. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Petrov, P. y W. Bernhard. 1971. Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoproteic components of interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.* 35:486-502.
- Poupon V., S. Polo, M. Vecchi, G. Martin, A. Dautry-Varsat, N. Cerf-Bensussan, P. Di Fiore y A. Benmerah. 2002. Differential nucleocytoplasmic trafficking of the related endocytic proteins Eps15 and Eps15R. *J Biol Chem.* 277(11):8941-8948.
- Puvion, E., A. Viron, C. Assens, E. Leduc y Ph. Jeanteur. 1984. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNP in isolated liver cells. *J. Ultrastruct. Res.* 87:180-189.
- Quimby B. B. y A. H. Corbett. 2001. Nuclear transport mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1766-1773.
- Qureshi, S. A. y S. P. Jackson. 1998. Sequence-specific DNA binding by the *S. Shibatae* TFIIB homolog TFB, and its effect on promoter strength. *Mol. Cell.* 1:389-400.
- Raska, I., L. E. C. Andrade, R. L. Ochs, E. K. L. Chan, C-M Chang y G. Roos. 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 195:27-37
- Raska, I., R. L. Ochs, L. E. C. Andrade, E. K. L. Chan, R. Burlingame y C. Peebles. 1990. Association between the nucleolus and the coiled body. *J. Struct. Biol.* 104:120.
- Reichelt, R., A. Holzenburg, E. L. Buhle Jr., M. Jarnik, A. Engel y U. Aebi. 1990. Correlation between structure an mass distribution of the nuclear pore complex and distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* 110:883-94.
- Rich, A. y S. Zhang. 2003. Z-DNA: the long road to biological function. *Nature.* 4:566-572
- Rout M. P. y G. Blobel, 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 123:771-83.
- Sadava, D. E. 1992. Cell Biology Organelle, Structure and function. Ed. Jones and Bartlett Publishers. U. S. A. 698 p.
- Scheer, U. y R. Hock. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr.Opin. Cell Biol.* 11:385-390.
- Schroth, G. P. P. J. Chou y P. S. Ho. 1992. Mapping Z-DNA in the human genome computer aided mapping reveals a non-random distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. *J. Biol. Chem.* 267:11846-11855.

- Schul W. R. Van Driel y L. De Jong. 1998. coiled bodies and U2 snRNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. *Mol. Biol. Cell.* 9:1025-1036.
- Seta K., M. Nanamori, J. G. Modrall, R. R. Neubig y J. Sadoshima. 2002. AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem.* 277(11):926-977.
- Shaw P. J. y E. G. Jordan. 1995. The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev.* 11:93-121.
- Shopland, L. S., C. V. Johnson y J. B. Lawrence. 2002. Evidence that all SC35 domains contain mRNAs and that transcripts can be structurally constrained within these domains. *J. Struct. Biol.* 140:131-139.
- Silins I., N. Finnberg, A. Stahl, J. Hogberg y U. Stenius. 2001. Reduced ATM kinase activity and an attenuated p53 response to DNA damage in carcinogen-induced preneoplastic hepatic lesions in the rat. *Carcinogenesis.* 22(12):2023-31
- Sleeman, J. E. and A. I. Lamond. 1999. Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 11:372-377.
- Sleeman, J.E., P. Ajuh, y A. I. Lamond. 2001. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci.* 114:4407-4419.
- Smale, S. T. y J. T. Kadonaga. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72:449-479
- Smith, C. A. y E. J. Wood. 1997. Biología Celular. Ed. Addison-Wesley. Iberoamericana, S. A. 367 p.
- Spector, D. L., G. Lark y S. Huang. 2002. Differences in snRNP localization between transformed and nontransformed cells. *Mol. Biol. Cell.* 3:555
- Spector, D. L., W. H. Schrier y H. Busch. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell.* 49:1-10.
- Ullman, K. S., M. A. Powers y D. J. Forbes. 1997. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 90:967-970.
- Vázquez-Nin G. H., O. M. Echeverría y L. F. Jiménez-García. 2003. *El núcleo interfásico. Morfología y función.* Cap. 12. en. Biología Celular y Molecular. Jiménez, L. F. y Merchant H. . Ed. Pearson Educación. 853pp.
- Vázquez-Nin, G. H. y W. Bernhard. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct.* 36:842-860.
- Vázquez-Nin, G. H., S. Abolhassani-Dadras, O. M. Echeverría, V. Boutinard Rouelle-Rossier y S. Fakan. 1996. Phosphorus distribution in perichromatin granules and surrounding nucleoplasm as visualized by electron spectroscopic imaging. *Biol. Cell.* 87:171-177.
- Visa, N., F. Puvion-Dutilleul, J. P. Bachellerie y E. Puvion. 1993a. Intranuclear distribution of U1 y U2 snRNAs visualized by high resolution in situ hybridization : revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60:308-321.
- Visa, N. F. Puvion-Dutilleul, F. Harper, J. P. Bachellerie y E. Puvion. 1993b. Intranuclear distribution of poly(A) RNA determined by electron microscope *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.* 208:19-34.
- Wang, W., M. Carey y J. D. Gralla. 1992. Polymerase II promoter activation: closed complex formation an ATP-driven start site opening. *Science.* 255:450-453.

- Watanabe K, N. Takizawa, M. Katoh, K. Hoshida, N. Kobayashi y K. Nagata. 2001. Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res.* 77(1):31-42.
- Watson, M. L. 1962 "Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat an mouse. *J. Cell Biol.* 13:162-167.
- Watson, N. 2001. Leptomycin B: a powerful antibiotic tool for studying nuclear transport. *LifeScience.* 2:9-11.
- Wittig, B., T. Dorbic y A. Rich. 1991. A transcription is associated with Z-DNA formation in metabolically active permeabilized mammalian cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2259-2263.
- Woods A. J., M. S. Roberts, J. Choudhary, S. T. Barry, Y. Mazaki, H. Sabe, S. J. Morley, D. R. Critchley y J. C. Norman. 2001. Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem.* 277(8):6428-6437.
- Wu Z., C. Murphy, C-H. H. Wu, A. Tsvetkov y J. G. Gall. 1993. Snurposomes and coiled bodies. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:747-754.
- Xu L y J. Massagué. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nature. Mol. Cell Biol.* 5:1-11.
- Yoshida M y S. Horinouchi. 1999 Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci.* 886:23-36
- Yoshida, M., M. Nishikawa, K. Nishi, K. Abe, S. Horinouchi y T. Beppu. 1990. Effects of Leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp. Cell Res.* 187:150-156.
- Yuckovsdy, N. J. A. Ranish y S. Hanh. 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature.* 408:225-229