

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

LA DISTRIBUCION DE LOS FACTORES DE
SPLICING EN EL HEMICORDADO

Balanoglossus, sp.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

PRESENTA

JOSE DE JESUS MONCAYO SAHAGUN

DIRECTOR: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 2005

m 345673



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.

AGRADECIMIENTOS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JOSE DE JESUS

MONCAYO SAHAGUN

FECHA: 15-06-2005

FIRMA: 

A mis padres: **Esther Sahagún Carrillo y Antonio Moncayo Vizcaíno. (q e p d);**

Al igual que ayer; hoy con profundo amor, admiración y respeto.

A mi esposa **Luz del Carmen Gómez Salazar**; Inseparable amiga y compañera con quien he compartido jornadas intensas llenas de amor en lo familiar y profesional, con el fin de construir un entorno social más justo.

A mis Hijas **Luz Elena y Gabriela** e hijos **Víctor y Alejandro**, que con su amor y compañía y alegría han sabido ser inspiración en mi vida. Con lo cual me permite el concretar proyectos pendientes en los ámbitos familiares y profesionales .

A mis hermanas **Leticia, Guadalupe y Esther**; y Hermano **Eduardo**, que junto con sus familias han sido estímulo constante en lo profesional y familiar.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García

Incansable promotor del saber científico en el ámbito de la biología; con la sonrisa y amabilidad infinitas siempre dispuestas al servicio del prójimo, en aras de construir una comunidad en el campo de la biología molecular, con el fin de descubrir sus innumerables secretos. Le agradezco su amistad y paciencia durante la elaboración de esta tesis.

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdez

Gracias mil, por compartir sus conocimientos en las partes teórica y experimental de este estudio; también por su gentileza, comentarios y orientaciones atinadas acerca de la elaboración de la tesis.

A la **Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales**

Le agradezco sus enseñanzas y apoyo para el conocimiento del material histológico de este estudio; así mismo por su trato amable y revisión de la tesis.

Al **M en C Gerardo Rivas Lechuga**

Con gratitud por su trato amigable y por haber compartido sus conocimientos sobre la biología del organismo objeto de estudio y el haber compartido su material bibliográfico y la revisión minuciosa de la tesis.

Al **Dr. José de Jesús Bazán Levy**, Director General del Colegio de Ciencias y Humanidades, de la UNAM por su amistad y apoyo desinteresado para la realización de esta tesis; la cual me permitirá optar por el grado de maestro en ciencias (Biología) y al mismo tiempo mi actualización disciplinaria; con la cual creo yo, hará posible que mi labor decente en el plantel Oriente sea mejor.

Al **Maestro Miguel Ángel Rodríguez Chávez**, Director del plantel Oriente del Colegio de Ciencias y Humanidades, compañero de innumerables batallas en le CCH por la educación de gratuita y por su apoyo en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

	pag
RESUMEN	1
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	2
INTRODUCCIÓN	4
1. NÚCLEO	
1.1 Procesos moleculares intranucleares	4
1.2 Replicación	6
1.3 Transcripción	13
pre-mRNA-----mRNA	
2. BIOLOGÍA CELULAR DE LOS PROCESOS MOLECULARES INTRANUCLEARES	
2.1 Compartimientos nucleares relacionados-	22
(Speckles: Fibras pericromatinianas, poliparticulas, gránulos pericromatinianos, gránulos intercromatinianos, cuerpos de Cajal, cuerpos nucleares, matriz nuclear y la lamina,	
3. LOS HEMICORDADOS	32
3.1 Diagnósis del phylum	
3.2 Plan corporal de Enteropneusta	

3.3 Anatomía interna de Enteropneustos

3.4 Filogenia de Hemichordata

4. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	41
5. OBJETIVOS	44
6. MATERIAL Y MÉTODOS	45
6.1 Organismos	
6.2 Histología	
6.3 Inmunofluorescencia	
6.4 Tinción con dapi	
7. RESULTADOS	51
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS	65

RESUMEN

El núcleo interfásico es un organelo compartimentalizado y dinámico. Las moléculas relacionadas con el metabolismo del RNA intranuclear se localizan en dominios, dentro de los que destacan aquellos relacionados con la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA y del pre-rRNA. Para el pre-mRNA se ha observado el patrón moteado que contiene un patrón difuso y otro de grandes cúmulos, en tanto que para el pre-rRNA esos dominios corresponden esencialmente al nucléolo y a los cuerpos de Cajal. Aunque la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en células de mamíferos en cultivo, recientemente se han observado esos dominios en células de varios tejidos de vertebrados pero no se conoce si también se presentan en otros cordados e invertebrados. En este trabajo se estudio la distribución de los factores de splicing por inmunofluorescencia con anticuerpos contra las proteínas de la familia SR y la distribución de los factores de maduración del pre-rRNA con tinción de plata para organizador nucleolar en el hemicordado *Balanoglossus* sp. Los resultados indican que los núcleos de balanogloso contienen un patrón moteado intranuclear para los factores de splicing y un patrón nucleolar y de cuerpos de Cajal para las proteínas del nucléolo. Se concluye que el patrón moteado está presente en balanogloso y se sugiere que antecede el origen de los cordados.

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	PÁGINA
FIGURAS	
Figura 1 Modelo de replicación de DNA	10
Figura 2 Modelo de procesamiento del pre-mRNA	17
Figura 3 Modelo de intervención de pol II	20
Figura 4 Modelo de síntesis del pre-mRNA fibrila y granular	22
Figura 5 Hemicordados: Enteropneusto y Pterobranquio	33
Figura 6 Morfología externa y Habitat de Enteropneusto	34
Figura 7 Corte sagital de un enteropneusto	36
Figura 8 Cladograma de los Deuterostomados	38
Figura 9I Microscopio de Fluorescencia	41
Figura 10 Técnica histológica para <i>Balanoglossus</i>	47
Figura 11 Técnica de inmunolocalización para <i>Balanoglossus</i>	48
Figura 12 Técnica de tinción en plata para <i>Balanoglossus</i>	49
Figura 13 Corte histológico transversal en la región faríngea de <i>Balanoglossus</i> , sp. con tinción hematoxilina-eosina y núcleo interfásico con inmunotinción para proteínas SR.	53
Figura14 Corte histológico transversal en la región faríngea de <i>Balanoglossus</i> , sp con tinción hematoxilina-eosina y núcleos interfásicos con inmunotinción para proteínas SR.	54
Figura 15 Corte histológico transversal en región de la proboscis de <i>Balanoglossus</i> , sp. con tinción de hematoxilina-eosina y núcleos interfásicos con inmunotinción para proteínas SR.	55
Figura16 Corte histológico transversal en región de la proboscis <i>Balanoglossus</i> , sp. con tinción de hematoxilina-eosina y núcleos interfásicos con inmunotinción para proteínas SR.	56

Figura 17 Tinción 1 en plata de epitelio de <i>Balanoglossus</i> , sp.	57
Figura 18 Tinción 2 en plata de epitelio de <i>Balanoglossus</i> , sp.	58
Figura 19 Tinción 3 en plata de epitelio de <i>Balanoglossus</i> , sp.	59

CUADROS

Cuadro 1 Polimerasas de la replicación de DNA	6
Cuadro 2 Actividad bioquímica de polimerasas	7
Cuadro 3 Polimerasas de eucariontes	19
Cuadro 4 Tipos de polimeras mRNA	20

INTRODUCCIÓN

1. NÚCLEO

1.1 PROCESOS MOLECULARES INTRANUCLEARES

En organismos eucariontes el núcleo celular en interfase es un organelo altamente compartimentalizado y dinámico. Está compuesto por complejos multimoleculares, involucrados en el almacenamiento del DNA y en los primeros sucesos del control de la expresión genética como son la replicación, la transcripción y la maduración del RNA. La transcripción y la maduración incluyen la síntesis, procesamiento y transporte hacia el citoplasma de diferentes tipos de RNA, que son requeridos para la síntesis de proteínas y demás funciones metabólicas de la célula.

Los complejos ribonucleoproteicos comprenden varios compartimentos como son el nucléolo y diversas partículas nucleares. Dentro de ellas destacan las fibras pericromatinianas, que están involucradas en la síntesis y maduración del pre-mRNA, en tanto que los gránulos intercromatinianos representan sitios de almacenamiento de factores de maduración del mismo tipo de RNA, en particular de los factores de **splicing**¹. Con el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos como la fluoresceína, la distribución de los factores de splicing en la célula se observan como un patrón moteado (speckled), en donde estos grandes cúmulos representan a los gránulos intercromatinianos y la localización difusa a las fibras pericromatinianas. Este patrón

¹ Expresión inglesa comúnmente usada para indicar el proceso de eliminación de intrones y ligado de los exones en el pre-mRNA, a través de la transcripción y maduración en diversos compartimentos nucleares.

varía morfológicamente dependiendo del estado transcripcional y de la maduración del pre-mRNA. Aunque esta información deriva del estudio de células en cultivo, recientemente se ha extendido a células presentes en tejidos diferenciados de mamíferos. más aún, hay datos recientes de la presencia de este patrón en otros vertebrados como peces (incluyendo la lamprea), anfibios, aves y reptiles. Sin embargo, no se conocen la presencia de este tipo de distribución celular de factores de splicing en otros grupos o incluso de Deuterostomados, que nos permitan generalizar a nivel celular los eventos moleculares en los que participan.

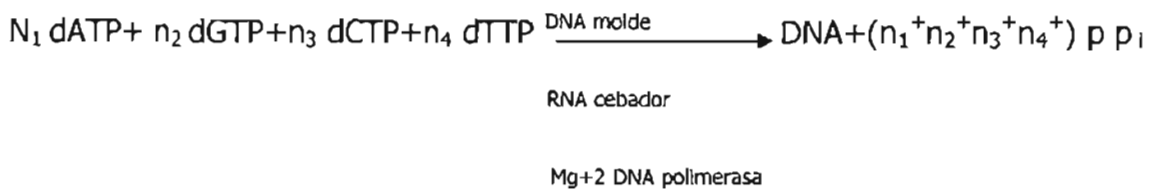
En este trabajo se estudia la distribución celular de los factores de splicing en procordados primitivos como es el caso del género *Balanoglossus*, utilizando inmunolocalización y anticuerpos contra la familia de factores de splicing conocidas como **proteínas SR (ricos en arginina (R) y serina (S))**. Los resultados previos de experimentos piloto, indican la presencia de patrones moteados en diferentes tipos celulares de esos organismos, lo que extiende las observaciones a grupos de invertebrados. Se sugiere que la organización celular de los factores de maduración antecede al origen de los cordados y representa una característica genotípica celular involucrada en el control de la expresión genética.

A continuación se describe más ampliamente dos procesos de la expresión genética como la replicación y principalmente la transcripción y maduración del RNA, en el ánimo de entender mejor la conformación y origen de los factores de splicing y el patrón moteado (speckled).

1.2 Replicación (DNA → DNA)

Es el proceso mediante el cual a partir de una molécula de DNA parental se sintetiza una nueva, dando origen a dos moléculas de DNA hijas de secuencia idéntica al DNA original. La replicación forma parte del metabolismo del DNA y relacionado directamente o indirectamente con la recombinación, mutación y la reparación de las alteraciones o daños en el DNA; se produce de manera coordinada con la división celular, durante la fase S. Este proceso se lleva a cabo sin necesidad de la separación completa de la cadena progenitora; la doble hélice se desarrolla gradualmente y sus dos hebras se van separando a la par que se produce su replicación, de carácter bidireccional, discontinuo y semiconservador y de origen monofocal en procariontes y multifocal en eucariontes. El proceso de la replicación fue observado por primera vez en *E coli*, pero es válido también para eucariontes. Estos estudios se han llevado a cabo a través de la utilización de precursores radiactivos como la timidina tritiada para marcar DNA de nueva síntesis que se puede detectar por medio de autorradiografía.

La síntesis inicia en los puntos denominados "Origen de replicación" con el alargamiento progresivo en ambas direcciones, una en dirección 3' hacia 5' y para la otra en sentido 5' hacia 3'. La reacción de síntesis del DNA requiere de un fragmento de hebra denominado cebador que aporte un grupo 3' OH libre, por lo común RNA, apareado a la hebra progenitora de DNA complementario y antiparalelo, de tal forma que la replicación elonga las moléculas preexistentes y utiliza dATP, dGTP, dCTP y dTTP con cofactores de Mn^{+2} y Mg^{+2} ; la reacción se resume así:



La reacción de síntesis de DNA es catalizada por diversas polimerasas según se indica en el **cuadro No 1** siguiente²:

Molécula Sintetizada	Molécula molde	Nombre completo	Ejemplos(nombre común)
DNA	DNA	Polimerasa de DNA Dirigida por DNA	DNA polimerasas
RNA	DNA	Polimera de RNA Dirigida por DNA	RNA polimeras o transcriptasa primasas
DNA	RNA	Polimerasa de DNA Dirigida por RNA	Transcriptasa inversa Telomerasas
RNA	RNA	Polimerasa RNA Dirigida por RNA	Replicasas

En los eucariontes las DNA polimerasas con más de cinco enzimas, la DNA pol_α posee actividad primasa, forma el cebador y de polimerasa de elongación, esta actividad se

² En Herraéz y Luque (2001)¹⁵

cede luego a DNA pol δ y ϵ , responsables de la mayor parte de la elongación de las dos hebras, la DNA pol β no interviene en la replicación, sino que está implicada en la reparación de los errores o de daños en el DNA, donde también intervienen la δ y ϵ . Estas cuatro enzimas son las responsables de la replicación, reparación y recombinación del DNA nuclear; otras polimerasas como la ξ , η y ι son poco conocidas y están implicadas sobre todo en reparación y recombinación.

La actividad exonucleasa de la DNA polimerasa sólo tres de ellas se encargan de la elongación δ , γ y ϵ , también poseen actividad 3' exonucleasa, son responsables de la reparación de errores cometidos, en el proceso ninguna polimerasa eucariota posee actividad 5' exonucleasa, la eliminación de los cebadores se hace con nucleasas independientes. Las actividades bioquímicas y funcionales de las polimerasas de eucariontes se resumen en el **cuadro No 2** siguiente³:

POLÍMERASA	α	β	δ	ξ
Ubicación subcelular	núcleo	núcleo	núcleo	núcleo
Actividad enzimática "primasa" (inicio)	si	no	no	no
Polimerasa 5' \rightarrow 3' elongación	si	si	si	si
3' exonucleasa de 3' \rightarrow 5' corrección	no	no	no	no
5' exonucleasa de 3' \rightarrow 5' eliminación del cebador	no	no	no	no
Función en la célula: replicación hebras nuevas; conductora y retardada	Solo inicialmente	no	si	si

³ Idem¹⁵

La replicación como tal posee un ritmo o una velocidad que varía según el tipo celular. En procariontes llega a 1000 nucleótidos por minuto, en eucariontes su velocidad no es tan elevada dado la existencia de varios orígenes de replicación en cada cromosoma; este proceso de incorporación de nucleótidos se le denomina procesividad y las polimerasas con mayor procesividad son las que intervienen en la elongación de la hebras de DNA y las de menor valor se encargan de la síntesis y eliminación del cebador, reparación, etc., entre otras funciones.

La replicación sucede con la apertura de la doble hélice creando dos horquillas, se sintetizan los cebadores y se unen las "proteínas de inicio"(helicadas) que facilitan la separación de las hebras. En procariontes hay un origen único llamado ori^c , en eucariontes existen varios puntos de inicio llamados "replicones" con control de inicio, elongación y terminado de cada replicón. Una vez formado el complejo de iniciación se da el desenrollamiento, relajamiento y enrollamiento con intervención de proteínas especializadas. Al complejo multiproteico junto con las DNA polimerasas se les conoce como "replisomas".

Con las hebras separadas por la helicasa intervienen proteínas de unión al DNA de la hebra sencilla, que evitan reapareamiento de hebras, facilitando la incorporación de nucleótidos, son llamadas proteínas "SSB" en procariontes y en eucariontes "RPA". La separación de hebras provoca superenrollamiento positivo delante de la horquilla, situación que puede impedir el avance de la replicación, esta situación se resuelve por la acción de las topoisomerasas, enzimas que alteran el estado de superenrollamiento del DNA; existen dos tipos de topoisomerasas: la topo I que corta una sola hebra del DNA y

la topoisomerasa II que corta dos hebras; esto provoca un superenrollamiento negativo, facilitando la replicación. El consumo energético del proceso es importante, se consume una molécula de ATP por cada corte de la cadena.

La elongación en la replicación no sólo depende de la DNA polimerasa sino de varias enzimas y factores proteicos; en *E. coli* son más de 20, como hemos dicho a este conjunto se le denomina replisoma participando en la síntesis ambas hebras.

En la replicación ambas hebras son copiadas de forma simultánea a medida que avanza la horquilla mediante DNA polimerasas, que solo son capaces de sintetizar en sentido 5' → 3', así que al abrirse la horquilla una de las hebras progenitoras se expone en sentido 3' → 5', el cual es un molde correcto, por lo que la síntesis de su hebra complementaria transcurre por el simple avance de la polimerasa, a la par que avanza la horquilla. A esta hebra se le denomina "líder". Por otro lado la otra hebra progenitora se expone en sentido 5' → 3' por lo que no puede actuar como molde a medida que avanza la horquilla, para su síntesis supone un desfase con la hebra conductora por lo que se le denomina hebra "retardada". La síntesis de esta hebra se reveló al observar que durante la replicación era posible aislar moléculas de pequeño tamaño de DNA recién sintetizado, más pequeño en eucariontes que en procariontes, conocidos como fragmentos de Okazaki (por Reiji y Okasaki)⁴; quienes lo descubrieron. El mecanismo para explicar la síntesis de la hebra retardada en paralelo al desplazamiento de la horquilla de replicación; consiste en la síntesis discontinua de la hebra retardada, cada fragmento de Okazaki corresponde a una porción de dicha hebra, cuya síntesis se da cuando el avance de la horquilla ha liberado suficiente longitud de hebra sencilla para

⁴ Idem¹⁵, Karp (2001)²⁰ y Lodish (1998)²¹

que la polimerasa la utilice como molde, en sentido $3' \rightarrow 5'$, por lo que se propone para ello que la hebra sencilla forme un bucle, enrollado sobre su propia enzima para permitir la síntesis en sentido $5' \rightarrow 3'$, propio de la polimerasa, de tal forma que la síntesis conjunta de la hebras conductora de forma continua y la retardada, de forma discontinua, por la DNA polimerasa, se dice que es "semidiscontinua" (fig. 1).

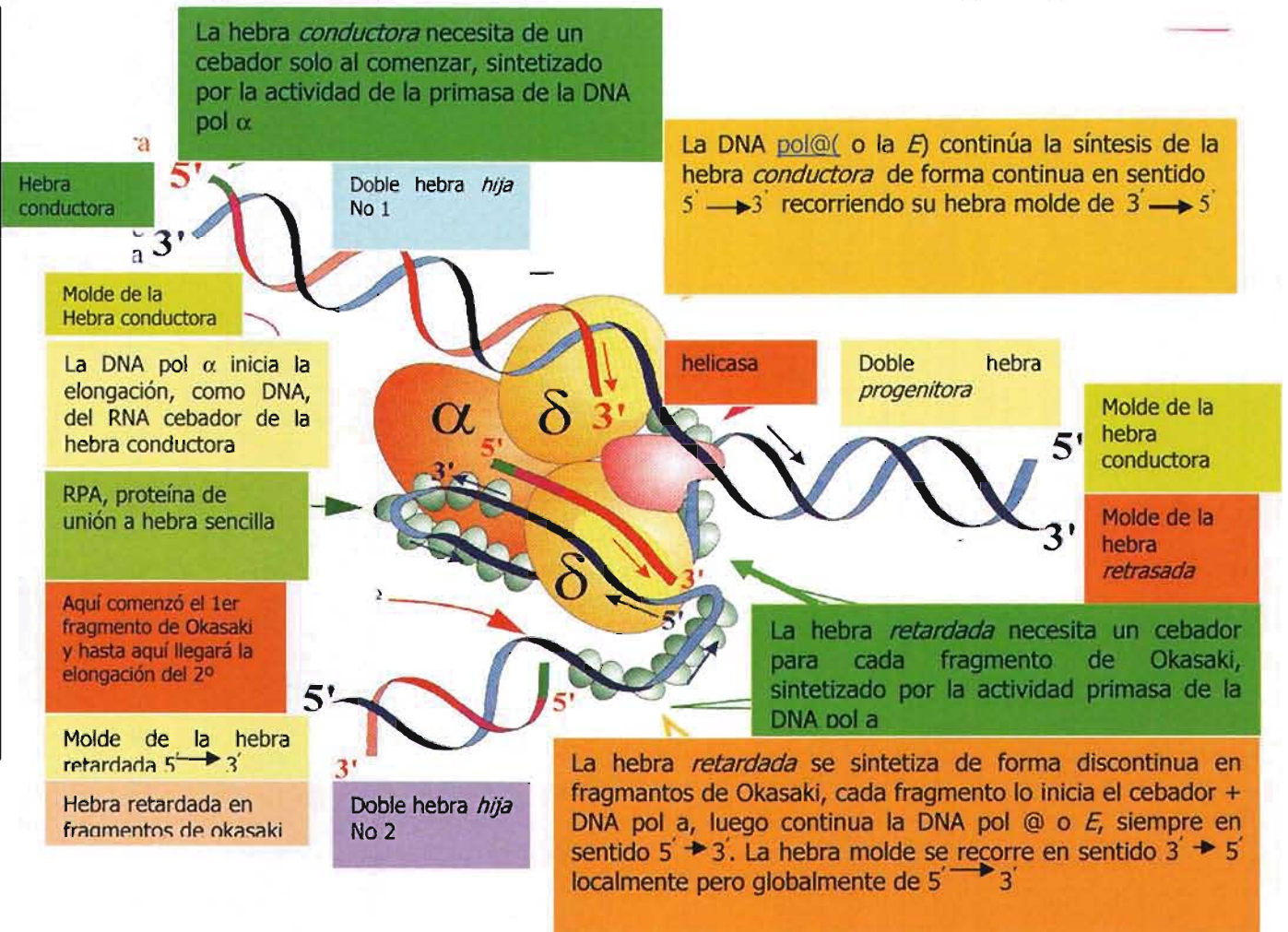


Figura 1 Modelo de replicación del DNA, tomado de Herraéz y Luque (2001)¹⁵

La síntesis completa de la hebra retardada sucede al unirse los fragmentos de Okasaki, este proceso denominado maduración, el cual requiere la eliminación de cebadores, elongación del fragmento adyacente, rellenar con ADN el hueco del RNA cebador, puede

tener lugar en las proximidades de la horquilla o lejos de ella. Para lo cual intervienen un sistema de nucleasas FEN 1 + RNAasaH1 que elimina el RNA cebador entre fragmentos; la DNA pol δ o DNA pol ϵ elonga el extremo 3' del fragmento contiguo, rellenoando el lugar que ocupaba el cebador hasta alcanzar el extremo 5' ; la DNA ligasa I sella la mella resultante, uniendo 5'P de un fragmento con 3'OH del otro fragmento.

La terminación de la replicación que se hace desde el punto de vista lógico, con insuficiente información experimental, comprende varios aspectos; el primero es el fin de la elongación por la DNA polimerasa, que se verifica en la horquillas de replicación de cada replicón, presumiblemente cuando se alcancen las horquillas de replicones adyacentes. Este proceso es prácticamente desconocido, pero se intuye que su resolución es precedido a la unión de fragmentos de Okasaki; el segundo es que falta de aclarar cual es el número de replicones implicados simultáneamente en la replicación de cada cromosoma, sus mecanismos de control que coordinan el proceso de todos ellos. En este proceso de terminación de la elongación todos los cebadores intermedios son eliminados por nucleasas FEN1 y RNAasaH1 y sustituidos con la elongación del fragmento de Okasaki adyacente.

Los cebadores de los extremos 5' de hebras nuevas pueden ser eliminados, pero no sustituidos, por ello la hebra nueva queda más corta en 5' que su molde; el tercero es la replicación de los extremos del cromosoma, ya que no se lleva a cabo por elongación por DNA polimerasa.

Los telómeros situados en los extremos de cromosomas lineales de la mayoría de los eucariontes, los que tienen unidos ciertas proteínas, contiene DNA no codificante

conformado en bloques de 1 a 112 Kb de longitud con una unidad de 6 a 8 pb repetidas en tándem centenares o miles de veces, con dos características principales; abundancia de repeticiones en tándem y el carácter cohesivo de sus extremos. El dicho carácter cohesivo en forma de salientes 3' en los extremos del cromosoma se va reduciendo en cada replicación con la consecuente pérdida de la información genética.

Este problema se puede resolver durante la fase S del ciclo celular gracias a la acción de la telomerasa que alarga telómeros, compensando así la pérdida anterior, esta telomerasa es considerada una reminiscencia dentro del proceso evolutivo de la ribosita; se trata de una enzima tipo DNA polimerasa, es una transcriptasa inversa que induce a la síntesis de DNA con dos componentes, el primero " RNA de la telomerasa"(TR Oter) de tamaño variable, incluye una secuencia característica para cada especie de 9 a 28 nt y complementaria a la secuencia telomérica respectiva; y un segundo componente proteico con actividad enzimática o transcriptasa inversa de la telomerasa TRT o TERT, con actividad telomerasa, sintetiza DNA telomerasa *de novo* sin necesidad de cebador

1.3 Transcripción (DNA \rightarrow pre-mRNA) y maduración (pre-mRNA \rightarrow mRNA)

La transcripción en organismos eucariontes tiene que ver con un proceso de síntesis, para lo cual se elabora una copia fiel de la información hereditaria contenida en el DNA; para tal efecto la célula sintetiza mRNA como una forma precursora denominada pre-mRNA cuando se encuentra en el periodo de la interfase.

Es así que para un mejor entendimiento del proceso, comenzaremos indicando que el RNA es una macromolécula polinucleótida de una sola cadena con dirección 5' a 3', constituida por citosina, guanina, adenina y uracilo; fosfato y azúcar ribosa. Con cuatro tipos de RNA, los cuales se sintetizan como precursores; el mRNA el cual representa 3-5% del total; el tRNA con 5-7%; el rRNA que oscila entre 85-90% y un pequeño grupo de RNA localizados en el núcleo; el snoRNA en el nucleolo y el scRNA del citoplasma que representan 1% del total.

El rRNA maduro proveniente del precursor pre-rRNA es ensamblado con numerosas proteínas para formar los ribosomas, los cuales se acoplan en el citoplasma con mRNA (proveniente de la forma precursora pre-mRNA), en un dominio catalítico dentro del cual el tRNA entra con sus aminoácidos.

El tRNA forma enlaces covalentes con aminoácidos y reconoce la secuencia codificante del mRNA y así lograr la inserción correcta de ellos en la elongación de la cadena polipéptido.

Los snRNA_s pequeños del núcleo poseen varias funciones en el procesamiento de los precursores de mRNA, tRNA y rRNA; que son producidas como moléculas inmaduras conocidas como transcritos primarios (incluido el pre-mRNA) y son procesados dentro del núcleo hacia moléculas funcionales que son exportadas al citosol (como el mRNA); varios snRNA forman parte del spliceosoma que participa en la conversión del RNA pre-mensajero (pre-mRNA) en RNA mensajero (mRNA) por medio de una serie de reacciones entre las que se encuentran la metilación del extremo 5', la poliadenilación

del extremo 3' y el splicing (eliminación de secuencia no codificante o intrones y ligado de los exones resultantes).

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

Es interesante comentar que el RNA es el único polímero biológico que sirve en la catálisis (ribozimas) y como almacén de la información, por esta razón se ha postulado como las moléculas que fueron la base de la vida temprana en la evolución.

Para la transcripción del RNA se considera que ocurre una reacción de polimerización; en los procariontes la copia de todos los RNAs es mediada por una enzima la RNA polimerasa y en los eucariontes son tres tipos, una para cada tipo de RNA, con intervención de cofactores como Mg^{+2} y Mn^{+2} . El **cuadro No 3** siguiente⁵ resume lo antedicho:

RNA polimerasas de los eucariontes

Tipo de RNA polimerasa	Tipos de RNA que transcribe	Requerimientos iónicos
RNA pol I	RNA _{rs} : 28 _s , 18 _s y 5.8 _s	Mg^{+2}
RNApol II	RNA _{ms} ; muchos _{sn} RNA _s	Mg^{+2}
RNApol III	RNA _{rs} : 5 _s , un _{sn} RNA(_{u6} _{sn} RNA) _{sc} RNA _s y tRNA	Mn^{+2}

⁵ En George(2001)¹⁰

La RNA pol II actúa a la izquierda del sitio de inicio, se localiza en el núcleo y fuera del nucleolo, es responsable de la síntesis del pre-mRNA y de algunos snRNAs (U1,U2 ,U3, U4, U5) relacionados con el splicing. La polimerasa no actúa sola, ya que requiere de factores transcripcionales, agregados en orden específico al promotor, conforme se indica:

1. TFIID (proteína) que se enlaza a la secuencia TATA box y más de otras ocho subunidades.

2. TIFA(proteína), que estabiliza el enlace TFIID.

3. TFIIB

TFIIF-RNA complejo polimerasa II

4. TFIIE,TFIIJ, factores que pueden ser incluidos para que ocurra la transcripción.

Según (Conoway y Conoway, 1993; Ospow et al,1995; Reiberg Roeder,1997; Sheva y Shenk, 1994;Zewel Reiberg,1995; Young, 1991)⁶; la transcripción sucede en tres etapas, la primera es la de iniciación: enlace de RNA pol al molde de DNA; la segunda corresponde al proceso de elongación: agregación de nucleótidos al molde de DNA y la tercera concluye con la liberación de enzimas y RNA del molde de DNA.

El procesamiento del pre-mRNA y su tamaño dependen del gene transcrito. En procariontes el pre-mRNA es transcrito y traducido en el mismo sitio. La forma madura del pre-mRNA, es decir el mRNA, codifica varias proteínas es decir es policistrónico, en

⁶ En Cortés (2003)⁶

la región terminal 5' y en 3' terminal hay un trifosfato en la última base de mRNA; posee una vida media de cinco minutos. Antes del codón de inicio hay un segmento de polipurinas denominadas Shine-val germo con codon de inicio de AUG y la terminación UAA, además poseen regiones intercistrónicas no codificantes y en algunos procariontes no la poseen y se regulan por aspectos conformacionales de mRNA.

En los eucariontes el mRNA es monocistrónico, es decir codifica una sola proteína en el núcleo y es transportado al citoplasma para su traducción. En 5' posee una caperuza (cap) metilada por acción enzimática. En 3' el mRNA posee un tallo poli(A) de 200 nucleótidos de longitud que no es codificado por el DNA, se asocia con proteínas ABP las cuales le confieren estabilidad al mRNA por cuatro horas (Galhe, 1991, Nevin, 1983, Sach, 1993⁷).

El pre-mRNA, que es la forma precursora del mRNA ocurre en el nucleoplasma y para su maduración son necesarias ribonucleoproteínas pequeñas (snRNP). El proceso de maduración del pre-mRNA involucra corte y unión de regiones codificantes denominadas exones y la eliminación de regiones no codificantes o intrónicas. Este proceso en dos pasos se denomina splicing y se realiza en el spliceosoma. El spliceosoma contiene cinco RNA pequeños nucleares (snRNAU₁, U₂, U₄, U₅ y U₆), los cuales son ayudados por proteínas. La reacción cis-splicing sucede en dos pasos; el primero con un ataque nucleofílico en la región del corte 5' por interacción hidroxílica 2' de la adenosina cercana a 3' del intrón, lo que origina la liberación del exón 1 y un producto intermediario intrón-exón 2. En el paso 2 los exones unidos por ataque nucleofílico del radical hidroxílico libre 3' del exón 1 al sitio de corte de la región 3',

⁷ Idem⁶

permitiendo liberar al intrón denominado lazo (lariat) (Reed y Mauratis, 1985; Sharp, 1985 y 1994)⁸ (Fig 2).

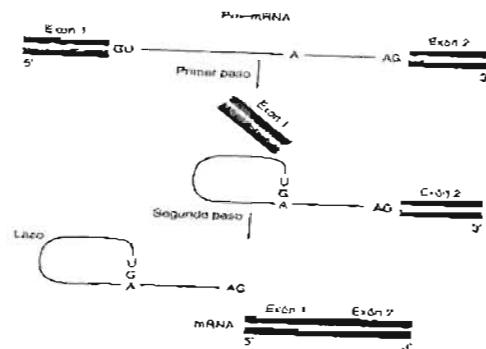


Figura 2 Modelo de procesamiento del pre- mRNA cis-splicing, tomado de Cortés (2003)⁶

Las interacciones filogenéticas conservadas involucran interacción pre-mRNA con los UsnRNA y han permitido definir que U₁ y U₅nRNA están involucrados con reconocimiento en 5' y 3' y U₂mRNA con el corte del pre-mRNA. Las interacciones RNA-RNA ocurren por apareamiento de bases (Cortés et al⁹, 1993).

Los snRNAU₁, U₂, U₄, U₅, U₆, U₇, U₁₁ y U₁₂ se encuentran asociados con proteínas **Sm** con estructura secundaria evolutivamente conservadas; las snRNA son producto de la transcripción de la RNA pol II con región 5' con caperuza la cual es trimetilada(trimetil guanosina) (m3G), una excepción es la U₆snRNA que la sintetiza la RNA pol III y es metilada. En los vertebrados los snRNA son codificados por genes multicopia, en levadura son por un solo gene. Los snRNA asociados con la síntesis del pre-mRNA(splicing) debido a la complementariedad snRNAU₇ y el sitio de corte en la región 5' del pre-mRNA e incluso interactúa con la región 3'; situación similar con snRNAU₅

⁸ Idem⁶

⁹ Idem⁶

(Neins, 1991, Heng et al, 1980, Numan y Norman, 1991, Reach et al 1992 y Sharp, 1994)¹⁰.

El snRNA₇ es de clase **s m**, es necesario para las histonas; snRNA₇ +HDE son necesarios para el pre-RNA de histonas (Bond , et al; 1991)¹⁰.

Los snRNA₁ y U₁₂ relacionados con los cortes intrones de la región 5' y su ramificación de algunos tipos de pre-mRNA han sido estudiados en humanos. Wasserman y Steitz, 1994; Tarn y Steitz, 1995¹⁰. En mamíferos los sn RNA₃, U₈, U₁₃, U₁₄, U₁₅, U₁₆, U₁₇, U₁₈, U₂₀, U₂₁, U₂₂, U₂₃, U₂₄, U₂₅, U₂₆, U₂₇, U₂₈ y U₂₉ son precipitados por el anticuerpo fibrilarina (Fb), poseen extremo 5' y caparuzo 2-2,7 trimetil guanósina(m³G). La estructura secundaria de los snoRNA con dos sitios llamados cajas C y D que son sitios de unión de proteínas comunes, que son necesarias para el transcrito primario del rRNA, interactúan con EYS y ITS, participan remoción de secuencias no codificantes en la regiones 5' y 3' ya sea en rRNA 28s, 18s, 5.8s (Baserga, et al 1991, Li, et al 1990, Sorbenoy Gerbi, 1990, Steitz, 1989 y Tykowsky et al 1993)¹⁰.

Una familia de factores de splicing denominadas proteínas **SR**, están involucradas en el splicing, a través de sus motivos altamente conservados de reconocimiento del RNA; el dominio **SR** con múltiples repeticiones de serina y arginina (Mestli, et al, 1997)¹¹; los cuales son fosforilados por cinasas específicas como SRPKs, CLKs, PITs, LRE, PIKs desfosforilados por fosfatasa como PP1, PP2A, PP2C (Misteli 2000 **Cuadro 4**).

¹⁰ Idem⁶

¹¹ Idem¹⁰

	Localización en los Compartimentos de splicing(SFCs)	Sustratos	Referencias
SRPK-1	+	Proteínas SR Proteínas parecidas a las SR	Gui et al., 1994
SRPK-2	+	Proteínas SR Proteínas parecidas a las SR	Kuroyanagi et al.,1998; Wang et al., 1998
Clk/Sty1	+	Proteínas SR Proteínas parecidas a las SR	Colwill et al., 1996
Clk/Sty2	+	Proteínas SR	Duncan et al.,1998
Clk/Sty3	+	Proteínas SR	Duncan et al., 1998
PITSLRE	+	N D	Loyer et al., 1998
PIP	+	N D	Boronenko et al., 1998
Topoisomerasa I	-	Proteínas SR	Rossi et al., 1996
U 1-70k Kinase	N D	U 1-70	Woppmann et al., 1993
S. pombe Prp4p	-	Proteínas SR	Gross et al., 1997
S. pombe Dsk 1p	-	Proteínas SR Proteínas parecidas a las SR	Takeuchi y Yanagida 1998
S. cerevisiae	N D	Proteínas SR	Siebel et al., 1996
Sky1p	-	Proteínas parecidas a las SR	Misteli y Spector. 1996
PP 1 activity	N D	Proteínas SR	Mermound et al., 1992
PP2 activity	-	Proteínas SR	Mermound et al., 1994
SCF1(PP2Cy)		N D	Murray et al., 1999

Cuadro 4 Cinasas y fosfatasas de los factores de splicing (según Mistelli 2000; en George)¹⁰

Los motivos altamente conservados de reconocimiento para el RNA se unen a secuencias del RNA de una manera coordinada para determinar la eficiencia del splicing y encausar a los RNA-pre-mensajero en el evento de splicing(Fu, 1993): Los dominios SR median interacciones proteína-proteína en los diferentes pasos del ensamblaje del spliceosoma (Tronchre, et al, 1997)¹²(Fig 3) .

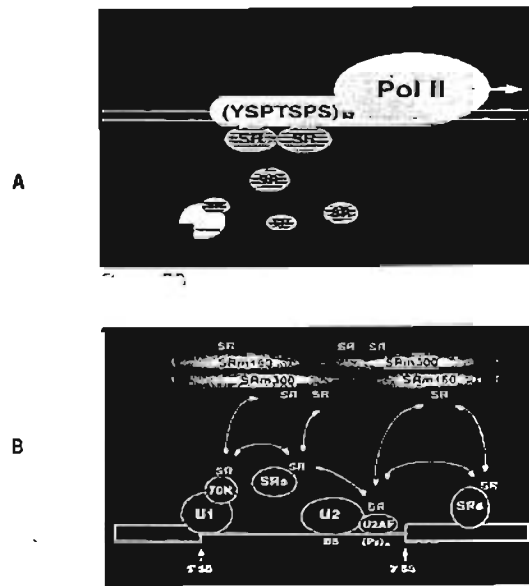


Figura 3 que nos muestra : Modelo (A) para la función del RNA pol II asociada a la proteínas S R en el splicing; Modelo (B) para la función de las proteínas S Rm 160/300 en el splicing; según Blencowe Lab. ; (En George)¹⁰

Los factores S F 2/ A S F y S C 35 están involucrados en la selección del sitio de splicing 5' del RNA pre-mensajero con splicing alternativo.

Los procesos moleculares intranucleares se relacionan con el mantenimiento y la replicación del DNA, con la producción y el transporte de los diferente tipos de RNA; para la regulación y coordinación de estos procesos son necesarias muchas macromoléculas, la cuales se localizan en compartimentos morfológicamente reconocibles. El nucléolo es el sitio donde se realiza la síntesis del RNA pre-ribosomal y

¹² Idem¹⁰

de su maduración, el RNA pre-mensajero es sintetizado y procesado en las fibras pericromatiniana, con la participación de factores de splicing almacenados en los gránulos intercromatinianos (IGCs), también conocidos como compartimentos de factores de splicing (SFG). Estos factores sin embargo, también se localizan en los gránulos pericromatinianos y en los cuerpos de Cajal.

2. BIOLOGÍA CELULAR DE LOS PROCESOS MOLECULARES INTRANUCLEARES

2.1 Compartimientos nucleares relacionados

Fibras pericromatinianas (FPC)

Son fibras de RNP de 3 a 5 nm de diámetro situados sobre la superficie de los IGN, en la periferia de la cromatina condensada en forma difusa, en el nucleoplasma (Fakan y Puvion, 1980)¹³. Descubiertos por Monneron y Bernhard (1969)¹⁴, quienes propusieron que estas fibras representan la expresión morfológica de la transcripción. La demostración definitiva de que los FPC contienen RNA pre-mensajero, también llamado heterogéneo nuclear(hnRNA), proviene de la correlación de estudios bioquímicos y ultraestructurales de fracciones de núcleos, donde coexisten hnRNA de marcado rápido y los FPCs (Bachelliere et al, 1975; Fakan et al, 1976)¹⁵. El proceso de maduración del pre-RNAmensajero el FPCs , es en forma simultánea al proceso de transcripción (cotranscripcional). A nivel ultraestructural, existe evidencia de que nucleoproteínas hnRNPs se agregan a las fibras de modo cotranscripcional (Economides y Pederson, 1983; Matunes et al, 1993)^{Ibidem6}. El hnRNA es copia del gene, formado por secuencias en las que están codificados partes de un polipéptido de exones y otras de intrones,

¹³ En Echevarria, et al⁸

¹⁴ Idem⁸

¹⁵ Idem⁸

de su maduración, el RNA pre-mensajero es sintetizado y procesado en las fibras pericromatiniana, con la participación de factores de splicing almacenados en los gránulos intercromatinianos (IGCs), también conocidos como compartimentos de factores de splicing (SFG). Estos factores sin embargo, también se localizan en los gránulos pericromatinianos y en los cuerpos de Cajal.

2. BIOLOGÍA CELULAR DE LOS PROCESOS MOLECULARES INTRANUCLEARES

2.1 Compartimientos nucleares relacionados

Fibras pericromatinianas (FPC)

Son fibras de RNP de 3 a 5 nm de diámetro situados sobre la superficie de los IGN, en la periferia de la cromatina condensada en forma difusa, en el nucleoplasma (Fakan y Puvion, 1980)¹³. Descubiertos por Monneron y Bernhard (1969)¹⁴, quienes propusieron que estas fibras representan la expresión morfológica de la transcripción. La demostración definitiva de que los FPC contienen RNA pre-mensajero, también llamado heterogéneo nuclear(hnRNA), proviene de la correlación de estudios bioquímicos y ultraestructurales de fracciones de núcleos, donde coexisten hnRNA de marcado rápido y los FPCs (Bachelliere et al, 1975; Fakan et al, 1976)¹⁵. El proceso de maduración del pre-RNA mensajero en los FPCs , es en forma simultánea al proceso de transcripción (cotranscripcional). A nivel ultraestructural, existe evidencia de que nucleoproteínas hnRNPs se agregan a las fibras de modo cotranscripcional (Economides y Pederson, 1983; Matunes et al, 1993)^{Ibidem6}. El hnRNA es copia del gene, formado por secuencias en las que están codificados partes de un polipéptido de exones y otras de intrones,

¹³ En Echevarria, et al⁸

¹⁴ Idem⁸

¹⁵ Idem⁸

cuya secuencia de bases no corresponde a los ácidos aminados del polipéptido. Para formar el mRNA maduro traducible por los ribosomas en secuencia de ácidos aminados, es necesario quitar los intrones y unir los exones; este proceso se denomina splicing. Además de splicing y la maduración del mensajero se requiere del agregado de una caperuza (cap) en el extremo 5' y la adición de 100 a 200 unidades de ácido adenílico (poli A) hacia el extremo 3'. Los experimentos de Fajan, et al en 1984 y 1986 y los de Puvion, et al en 1984¹⁶ muestran que las FPC es el lugar donde se realiza el splicing, detectable por inmunocitoquímica a nivel de microscopio electrónico.

Sin embargo en algunas unidades transcripcionales un porcentaje de fibras no sufre ningún acortamiento y la fibras crecen en forma de un único gradiente de principio a fin, sin evidencia morfométrica del quitado de intrones. Estas observaciones confirman con datos bioquímicos de que el splicing nos es siempre cotranscripcional; y puede ser de forma postranscripcional en fibras de RNP alejados de zona pericromatiniana, que corresponde al lugar de síntesis más activo de mRNA(fig 4).

¹⁶ Echevarria et al⁸

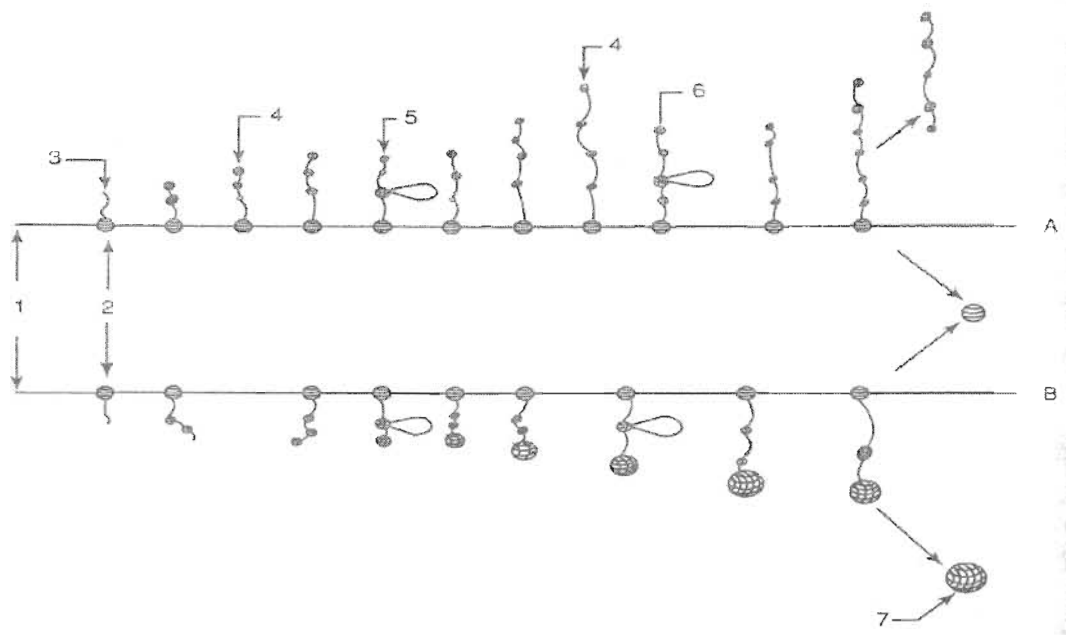


Figura 4 A Modelo que ilustra pre-mRNA naciente en forma de fibra y B muestra pre-RNA en forma de gránulo; tomada de Echevarria, et al (2003)⁸
Poliparticulas

Son complejos poliribosómicos que contienen mRNA (Somorina, et al 1996)¹⁷, obtenidos de núcleos purificados con NaCl 0.1M a pH 7.2 y pH 8.0 con unidades 30s (Semorina y col. 1998), llamados informoros, miden 25nm (Maneron y Moule, 1968)¹⁸; esta partícula es una unidad que se repite en forma de cuenta en hilo (Samorina y Krichevskaya, 1981; (Le Sturgeon, et al 1981; Sommerville, 1981; Jacob, et al 1981)¹⁹. Los RNA poseen secuencia Poli A en extremo 3' y de marcado rápido, es decir pre-mensajero o mensajero, peso molecular de proteínas de 28 a 38000 daltones, con RNA de bajo peso molecular rico en uridina, que indica que parte del proceso postranscripcional se lleva a cabo en las poliparticulas. En *Drosophila melanogaster* se determinó que el mRNA aún unido a matriz de DNA, se unen a proteínas, formando gránulos de diversos tamaños,

¹⁷ Idem⁸

¹⁸ Idem⁸

¹⁹ Idem⁸

llamados spliceosomas, los cuales intervienen en el retiro de intrones y unión de exones (Osheim, et al,1985), lo que corrobora que gran parte del splicing es cotranscripcional. Vázquez Nin, et al 1989)²⁰ demostraron que las polipartículas localizadas en la periferia de cromatina compacta corresponden a FPC; Vázquez Nin et al en 1994, mostraron que la fibras en forma de sarta de cuentas contienen componentes de splicing y proteínas, que se unen al pre-mRNA y en 1992 demostraron la presencia de polipartículas en vegetales(*Lycoparsicum sculatum*), quedando de manifiesto que esta estructuras son muy conservadas durante la evolución. La inmunolocalización de factores de splicing, la RNA polimerasaII y de proteínas relacionadas con los pre-mRNA, demostró una cercana asociación de sitios de transcripción y del splicing y de la existencia de migración de los factores de splicing hacia lugares en donde se inicia o se activa la transcripción (Jiménez García y Spector, 1993)²¹.

Gránulos pericromatinianos (GPC)

Los gránulos pericromatinianos fueron descritos por Watson (1962)²², su morfología y histoquímica fue hecha por Monneron y Bernhard (1969)²³, descritos como cuerpos esféricos de 30-50 nm de diámetro, rodeados de un halo de 20-25 nm de naturaleza ribonucleoproteínica. Los GPCs con subestructura de una fibrilla de 3 nm de diámetro con rRNA descubierto por cartografía de átomos de fósforo(Vázquez Nin, et al 1996)²⁴, los gránulos con ciclos de formación y maduración, que se originan por enrollamiento

²⁰ Ídem⁸

²¹ Ídem⁸

²² Ídem⁸

²³ Ídem⁸

²⁴ Ídem⁸

de una fibra pericromatiniana; (Vázquez Nin et al 1996; Bernhard 1971)²⁵. Estos gránulos se relacionan con el transporte de información del núcleo al citoplasma; almacenan RNA de alto peso molecular en forma de pre-mensajero (Vázquez Nin et al 1971)²⁶, con pruebas histoquímicas se corrobora la hipótesis hecha por Vázquez-Nin y colaboradores; con experimentos con factores físicos y químicos y el uso de hormonas, nos aportan datos complementarios.

Los experimentos con hormonas se hacen para estudiar la densidad numérica de los GPCs mediante estereología cuantitativa ultraestructural y la estimación simultánea de la síntesis y el transporte del RNA del núcleo al citoplasma, mediante auto radiografía cuantitativa; con marcado del ARN utilizando uridina tritiada con animales normales y hormonoprivos, con y sin tratamiento de restitución de hormona, evaluados a varios tiempos. Los GPCs aumentan en las células del epitelio de útero de la rata con supresión de la hormona y bajan su producción con la adición de la hormona (estradiol) (Vázquez Nin et al 1978 y 1979)²⁷. Esto nos indica que la hormona tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión genética modulando la velocidad de salida de mRNAs del núcleo al citoplasma. Este experimento se hace con ratas castradas y normales; la hormona en curso es la testosterona y los resultados son equivalentes con las ratas hembras.

El significado de las variaciones del volumen nuclear fue estudiada en diversas células animales y vegetales, utilizando en los estudios de los GPCs, demostraron que cambios de la transcripción sin que se haya encontrado signos de velocidad de salida de rRNA

²⁵ Idem⁸

²⁶ Idem⁸

²⁷ Idem⁸

(Vázquez Nin et al 1986)²⁸. También se estudio el efecto de otras hormonas en ratas macho, como la folículo estimulante(FSH), la leutinizante (LH), la terotrópica(TSH) y la adrenocorticotrópica(ACTH), con el propósito de observar si la salida de los mRNAs es exclusiva de algunas hormonas o es una propiedad más general de los GPCs. En todos los casos se demostró que la supresión de la hormona produce un aumento del número de GPCs, acompañado de una disminución de la transcripción; la reposición de la hormona correspondiente causa disminución rápida de la frecuencia de los GPCs y un incremento de la migración de los mRNAs hacia el citoplasma.

Con estos hallazgos se puede deducir que el número de GPC está regulado por la relación entre síntesis del pre-mRNA y la exportación del mRNA maduro hacia el citoplasma. Por otra parte, los resultados demuestran que dichas hormonas que actúan por medio de mecanismos intermedio muy diferentes, producen efectos similares sobre el transporte de mensajeros hacia el citoplasma; este hecho de que los tipos de hormonas que actúen mediante mecanismos tan diferentes pero coinciden en sus efectos en la regulación del pasaje de los mRNAs por el poro de la envoltura nuclear, sugiere que es un mecanismo de control postranscripcional de la expresión genética muy frecuente en la naturaleza.

Las células poco diferenciadas como el mioblasto y células motrices del sistema nervioso, durante su diferenciación a fibras musculares estriadas y neuronas, respectivamente producen poca cantidad de gránulos GPCs, excepto durante la sinaptogénesis, sin gran cambio de volumen nuclear ni de otras particulas RNP. Estos datos nos indican que los GPCs no poseen todos los tipos de mensajeros y que muchas

²⁸ Idem⁸

de la fibras pericromatinianas no se pliegan a gránulos GPCs. Las células diferenciadas en cambio producen gran cantidad de GPCs y con aumento de volumen nuclear, quizá debido a que tienen más tipos de mensajeros maduros y proteínas que los acompañan. Un trabajo reciente demuestra que la hibridación *in situ* a nivel del microscopía electrónica, que los GPCs no son los único compartimiento del mRNA intranuclear, regulado por el estradiol, ya que la cantidad de mRNA asociado a fibras pericromatinianas, también aumenta con la supresión hormonal y desciende rápidamente después de su reposición (Vázquez Nin et al 1999)²⁹.

El transporte intranuclear de las partículas que contienen mRNA, los estudios nos indica del desplazamiento de fibras o gránulos pericromatinianos desde el sitio de transcripción hasta el poro de la envoltura nuclear; puede deberse a posibles trayectos y a mecanismos fisicoquímicos del movimiento. Los experimentos de hibridación *in situ*, sugieren que los mRNA están desde sitios de transcripción hasta la periferia del núcleo, por canales definidos y por una difusión simple, lo mismo sucede a la proteínas que lo acompañan; (Ling et al 1995; Polito et al, 1998; Zinc et al, 1999)³⁰.

²⁹ Idem⁸

³⁰ Idem⁸

Gránulos intercromatinianos (GICs)

Descritos por primera vez por Switt (1959)³¹ como gránulos en cúmulos en la región intercromatiniana: Monneron y Bernhard (1969)³² los describen como gránulos de 20 a 25nm de diámetro, polimorfos y a veces contiguos con fibras. Los GICs poseen proteínas y RNA, incorporan poca cantidad de uridina marcada con tritio, esto les confiere una vida media larga (Fakan y Bernhard, 1971)³³. Los RNA de bajo peso molecular ricos en uridina RNAbpmd son de vida media más larga y constituyen el mejor candidato para explicar la falta de incorporación del precursor, en experimentos breves con respecto al tiempo generacional (de las células). La hipótesis se puso a prueba por inmunolocalización de proteínas, que están presentes en los cúmulos GICs, (Visa, et al,1993). Como estos RNAs están relacionados con procesamiento postranscripcional de los pre-mRNA y lo GICs no contienen RNA de marcado rápido ni proteínas que se asocien a los pre-mensajeros (Fakan et al, 1989)³⁴.

Se concluyó que los cúmulos GICs son almacenes de la maquinaria del splicing, que carecen de RNA mensajero.

Los GICs existen en plantas, animales y hongos y son abundantes en células de vertebrados, en céfalocordados e invertebrados; en plantas y hongos no se ha encontrado tal abundancia (Jiménez -García et al, 1999)³⁵.

³¹ Idem⁸

³² Idem⁸

³³ Idem⁸

³⁴ Idem⁸

³⁵ Idem⁸

Cuerpos de Cajal (espiralados)(CBs)

Descritos por Cajal en 1903 al estudiar las neuronas; Monneron y Bernhard (1969)³⁶ dicen que son agregados esféricos de 0.3 a 0.5 μm de diámetro, con fibras de 40 a 60 nm de espesor, situados en la región intercromatiniana. Los cuerpos espiralados desaparecen durante la mitosis y se forman en G1, Harden los llama cuerpo para nucleolar(Raska, et al, 1990)³⁷; pueden estar en el nucléolo o cerca de él. Sus componentes relacionados con el procesamiento de los RNAs pre-mensajeros, proteínas nucleares. Entre ellos están RNAbpm U (U₁, U₂, U₄, U₅,U₆) y las proteínas asociadas (Carmo y Fonseca et al 1991_a y 1991_b), también U₃ , U₇ y fibrilarina (Ochs et al, 1994; Lamond y Earnshaw, 1998) contiene proteína 180 coilina de 80 K Da. Se encuentran en plantas (Moreno Díaz de la Espina, et al 1982; Jiménez García et al 1992)³⁸, de mostrándose que son estructuras antiguas y conservada por la evolución.

Cuerpos nucleares

Son estructuras esferoides de 0.5 a 2 μm de diámetro, compuesto por fibras y gránulos, presentes en células normales y más en patológicas (neoplasias) ; en células de la monocotiledónea, *Lacandonia schismatica* (Jiménez -García et al, 1992); la región interna de estas estructuras tiñe con EDTA preferencial para RNP, indicando RNA. La parte laminar externa aparece clara y se marca intensamente con anticuerpos monoclonales, dirigido a proteínas que se asocian a RNAs de bajo peso molecular ricos

³⁶ Idem⁸

³⁷ Idem⁸

³⁸ Idem⁸

en uridina, que intervienen en el splicing del pre-mensajero (Agredano-Moreno et al, 1994 ; Kopeny et al, 1996)³⁹.

Matriz nuclear

Está compuesta por tres elementos, descrita por Berezney y Coffey, 1974 y antes por Zborskii y Debov, 1948⁴⁰. El primero es un conjunto de lámina complejo de poro, segundo por restos nucleolares y tercero por estructuras fibro granulares. llamada red interna; contiene proteínas que se asocian al RNA mensajero o pre-mensjero.

La lámina

Capa proteica de 10 a 20 nm de espesor adosada a la cara interna de la membrana nuclear, con número variable de proteínas, en mamíferos con tres, dos en aves y cuatro en anfibios, con peso molecular entre 65 y 75 KDa. Reciente mente se ha encontrado que la lamina contiene componentes del splicing en los cúmulos de los granos intercromatinianos (Jagatheesan et al 1999)⁴¹.

Matriz nuclear interna

La composición molecular de la red interna contiene proteínas que se unen al RNA mensajero y pre-mensajero y RNA de bajo peso molecular, ricas un uridina y de restos de dichos RNA, aparecen enzimas topoisomerasas que reconocen secuencias del DNA. Las funciones nucleares que han sido localizadas en la matriz interna son: duplicación del DNA, la transcripción no nucleolar y el procesamiento postranscripcional del pre-RNA mensajero (Driel et al, 1991); se han encontrado DNA polimerasa, DNAs nacientes relacionados con la replicación, la polimeras II, factores proteicos de la transcripción y

³⁹ Idem⁸

⁴⁰ Idem⁸

⁴¹ Idem⁸

sus reguladores, como los receptores de esteroides, proteínas y RNAbpm U relacionados con splicing (Driel et al, 1991)⁴². La distribución de diversas estructuras y funciones nucleares nos indican regiones bien definidas y compartimentos subnucleares, descubiertos por inmunofluorescencia y ultraestructura, demuestra que la replicación, transcripción y de splicing están en sitios definidos. También se han logrado distinguir lugares de almacenamiento de los componentes del splicing en forma de cúmulos de GICs y reservas de RNA mensajeros maduros en GPCs. Los GICs están asociados a matrices nucleares, la posición del nucléolo es estadísticamente constante en dos o tres lugares en el mismo tipo celular y estado citofisiológico, (Vázquez et al 1983). En el espacio intercromatiniano se localiza gran parte de cromatina laxa, parte de la transcripción y el splicing y lugar de tránsito de complejos RNP, sintetizados en la región pericromatiniana. La mayor parte del splicing se realiza en sitios de transcripción por lo que el resto de espacio nuclear es lugar de tránsito de los complejos RNP hacia los poros de la envoltura nuclear.

3. LOS HEMICORDADOS

Después de haber relatado los procesos de replicación del DNA y la transcripción del DNA a RNA, comentaré a continuación con el propósito de continuar ampliando el marco teórico de la tesis en cuestión, algunas generalidades de los Hemicordados; a través de la diagnosis de dicho phylum; más adelante se describirá la clase Enteroneusta, su plan corporal, anatomía interna y ubicación dentro de los Deusterostomados ; en virtud de que nuestro organismo de estudio *Balanoglossus*, sp. pertenece a dicha clase.

⁴² Idem⁸

sus reguladores, como los receptores de esteroides, proteínas y RNAbpm U relacionados con splicing (Driel et al, 1991)⁴². La distribución de diversas estructuras y funciones nucleares nos indican regiones bien definidas y compartimentos subnucleares, descubiertos por inmunofluorescencia y ultraestructura, demuestra que la replicación, transcripción y de splicing están en sitios definidos. También se han logrado distinguir lugares de almacenamiento de los componentes del splicing en forma de cúmulos de GICs y reservas de RNA mensajeros maduros en GPCs. Los GICs están asociados a matrices nucleares, la posición del nucléolo es estadísticamente constante en dos o tres lugares en el mismo tipo celular y estado citofisiológico, (Vázquez et al 1983). En el espacio intercromatiniano se localiza gran parte de cromatina laxa, parte de la transcripción y el splicing y lugar de tránsito de complejos RNP, sintetizados en la región pericromatiniana. La mayor parte del splicing se realiza en sitios de transcripción por lo que el resto de espacio nuclear es lugar de tránsito de os complejos RNP hacia los poros de la envoltura nuclear.

3. LOS HEMICORDADOS

Después de haber relatado los procesos de replicación del DNA y la transcripción del DNA a RNA, comentaré a continuación con el propósito de continuar ampliando el marco teórico de la tesis en cuestión, algunas generalidades de los Hemicordados; a través de la diagnosis de dicho phylum; más adelante se describirá la clase Enteroneusta, su plan corporal, anatomía interna y ubicación dentro de los Deusterostomados ; en virtud de que nuestro organismo de estudio *Balanoglossus*, sp. pertenece a dicha clase.

⁴² Idem⁸

3.1 Diagnósis de los Hemicordados

Los hemicordados son organismos de marinos bénticos, de aguas poco profundas y zonas de mareas, son solitarios o coloniales, su distribución es casi cosmopolita, bilaterales y enterocelomados, con una condición tripartita del celoma, que se evidencia en tres regiones: en prosoma, mesosoma y metasoma. Con poros o hendiduras faríngeas ciliadas, sistema circulatorio abierto, sistema excretor con una estructura exclusiva del grupo; el glomérulo, gónadas en el metasoma, con una larva exclusiva para el phylum: la larva tornaria.

Con una cavidad celomática en la probóscide y con dos cavidades en las otras regiones; con un divertículo bucal en la parte posterior de la probóscide, con estomocorda, que durante mucho tiempo se manejó como una estructura análoga a la notocorda de los cordados. El sistema nervioso es subepidérmico con dos cordones nerviosos, dorsal y ventral con un anillo que los conecta en le collar.

Con dos morfotipos claramente diferenciados correspondientes a las clases Enteropneusta (gusanos bellota) y los Pterobranquia, hemicordados con lofóforo.

Figuras **5 A y B**

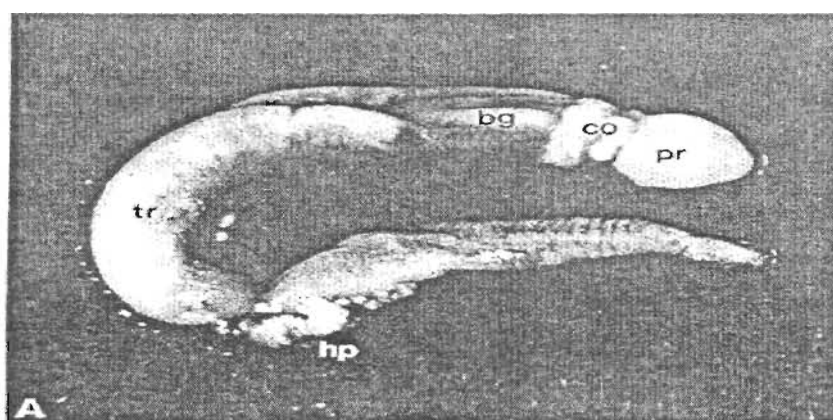


Fig 5 **A** Enteropneusto *Glossusbalanos minutus* , **pr** Proboscis; **co** Collar; **bg** Región branquial; **tr** Tronco; **hp** Región hepática.

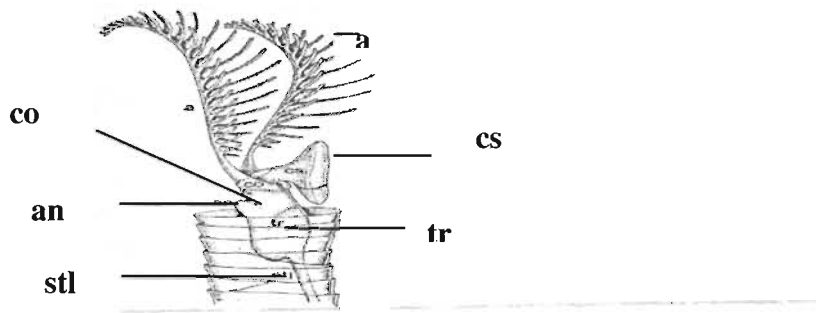


Figura 5 B Pterobranquio *Rhabdopteura*, sp; **a** brazo con tentáculos; **an** ano; **co** collar; **cs** escudo cefálico; **tr** tronco; **stl** cuello

Una tercera clase Planctosphaeridea, fue erecta por Spengel (1932), que comprende organismos pelágicos, esféricos, bilaterales y transparentes. Dicha clase no es reconocida por varios autores ya que posiblemente se trate de un estado larvario de algún adulto de la clase enteropneusta.

3.2 Plan corporal de Enteropneusta

Son nombrados comúnmente como gusanos bellota, con tres regiones corporales claramente distinguibles: Probóscide, collar y tronco que corresponden al protosoma, mesosoma y metasoma; respectivamente; con celoma relativamente reducido; intestino largo, recto; boca ventral anterior al final del collar, con un endoestilo; ano posterior terminal; con cuerpo blando y viscoso, viven en galerías o bajo las piedras, en el fango de la zona intermareal o formando madrigueras de algas, son alimentadores de depósito. La clase comprende cerca de 75 especies, agrupadas en cinco géneros (*Balanoglossus*, *Protoglossus*, *Saccoglossos*, *Saxipendin* y *Xenopleura*). *Balanoglossus* (G. balanos, bellota+glossa, lengua) y *Saccoglossus* (G. Sakkos, saco+glossa, lengua), son los géneros más comunes; miden de unos pocos centímetros a 2.5 m como es el caso de *Balanoglossus gigas*, fig. 6

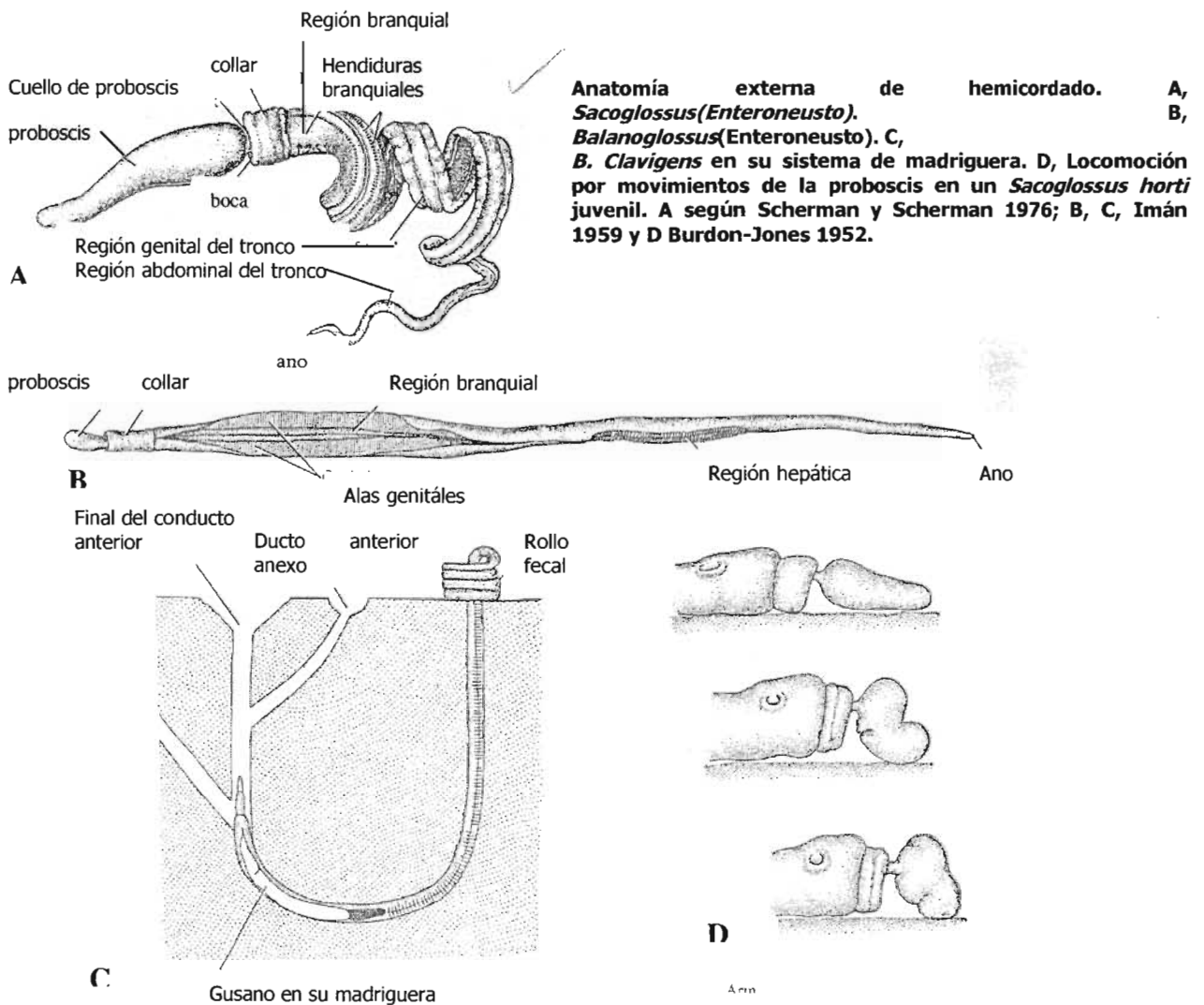


Figura 6 Modificada de Hyman¹⁷; que nos muestran morfología externa, habitat y modo de desplazamiento de *Balanoglossus*; Enteropneustos.

3.3 Anatomía interna Enteroneustos

La probóscide es la parte activa del animal, con ella mueve el fango y analiza el medio que lo rodea, recoge alimento por medio de tiras de moco que secreta en superficie. El alimento es transportado por cilios al borde anterior del collar donde está la boca ventral, es ingerido. Los que viven en galerías la probóscide es excavadora, el fango es desplazado hacia atrás por cilios y el moco. Las galerías están revestidas de moco y tienen forma de **U**, generalmente con dos aberturas; la probóscide puede salir por la

apertura anterior y los restos de alimento son expulsados por la abertura del tubo posterior. El divertículo bucal (estomatocorda) se localiza en la parte posterior de la probóscide, en forma de saco ciego que por algunos autores fue considerada como notocorda y razón por la cual Hemichordata era considerado como un subphylum dentro de Chordata.

El collar con un par de cavidades celómicas que se comunican al exterior mediante poros; estos se turgen, facilitando la excavación de las galerías. Con contracciones musculares del cuerpo para expulsar el exceso de agua, a través de las hendiduras faríngeas, permitiendo el desplazamiento del animal.

El sistema respiratorio consta de una fila de poros, dispuestos dorsolateralmente a cada lado del tronco, detrás de collar, que abren a las cámaras, que a su vez se comunican con las hendiduras faríngeas internas; que intervienen en el intercambio gaseoso. Mediante corriente ciliares se mantiene una corriente constante de agua desde la boca a través de la faringe.

El tubo digestivo está relacionado con la alimentación, que lo hace por corrientes ciliares y moco que producen. Por detrás de la cavidad bucal hay una gran faringe, donde dorsalmente se dispone la hendidura en forma de **U**, capturan partículas alimenticias recogidas en el moco y llevadas hacia la boca por la acción de los cilios de la probóscide y el collar separa el agua, que sale por las hendiduras y son redirigidas a la zona ventral de la faringe, esófago y llegar al intestino donde tiene lugar la digestión y la absorción. El circulatorio es un vaso mediodorsal, sobre el digestivo, conduce la sangre hacia delante; en el collar este vaso origina un seno y una vesícula cardíaca, situada sobre el divertículo bucal. La sangre entra en una red de senos sanguíneos que constituyen el glomérulo; el cual realiza funciones de excreción. La sangre es conducida a la región caudal por el vaso ventral, dispuesto debajo de intestino, pasando a través de extensos senos al epitelio digestivo y al plexo lagunar de la pared del cuerpo.

El sistema nervioso y sensorial, está constituido principalmente por un plexo subepitelial de células nerviosas y fibras que están en contacto con prolongaciones nerviosas epiteliales, los engrosamientos de este plexo forman los cordones nerviosos dorsal y ventral que se unen en el collar mediante el conectivo anular. El cordón dorsal

llega hasta la probóscide. El plexo nervioso primitivo se asemeja a los cnidarios y equinodermos. Poseen foto y quimiorreceptores en la epidermis de la probóscide.

La reproducción se da por sexos separados, las gónadas están en hileras dorsolaterales a ambos lados en la parte anterior del tronco la fecundación es externa y en algunas especies se desarrolla una larva tornaria ciliada, parecida a las larvas de los equinodermos. **Fig. 7**

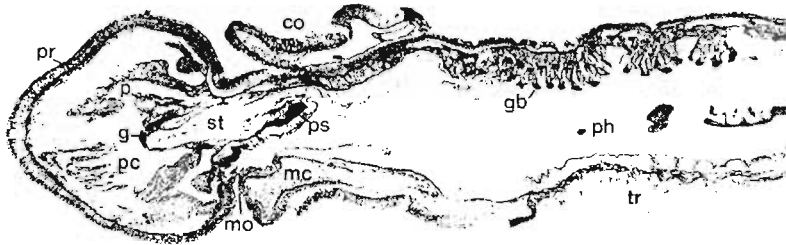


Fig. 7. *Glossobalanus* (Balanus) *glossatus* (Linn.)

Figura 7; Tomada de Harrison¹⁴ nos muestra a *Glossobalanus* en sección parasagital a través de la proboscis, collar y parte anterior de tronco, mostrando su organización general. L M de Heidenhain Azocarmin X7.5 **co**, collar; **g**, glomerulos; **gb**, barras de los poros faríngeos; **mc**, mesocelo; **mo**, boca; **pc**, protocelo; **ph**, faringe; **pr**, proboscis; **ps**, esqueleto de la proboscis; **st**, estomocorda; **tr**, tronco. Cortesía de E. Balser.

3.4 Filogenia de Hemichordata

La filogenia de los hemicordados representa un problema, ya que comparten características con los cordados y los equinodermos. Con los primeros tienen en común las hendiduras faríngeas utilizadas en la filtración y en la respiración, como ocurre en algunos cefalocordados. Además el corto y grueso cordón nervioso dorsal del collar puede ser homólogo al tubo nervioso de los cordados. El divertículo bucal de hemicordados por mucho tiempo fue considerado como homólogo de la notocorda; actualmente se considera una sinapomorfía propia de los hemicordados. Por otra parte las primeras fases de la embriogénesis son parecidas a las de los equinodermos y la larva tornaria es parecida a la bipinnaria de los asterideos. Sin embargo las relaciones

hipotéticas que sitúan a los lofoforados como el grupo hermano de hemicordados y cordados, como resultado de sinapomorfismo.

Harrison y Rupert(1997)¹¹, consideran los phyla Chaetognata, Hemichordata y los Chordata invertebrados, junto con los equinodermata, constituyen los Deuterostomados; en una sistemática tradicional dentro de metazoarios. En avances recientes, según Nielsen, (1995), los phyla Phoronida y Brachiopoda son Deuterostomados y las clases Enteropneusta y Pterobranchia, de los Hemichordata podrían alcanzar el estatus de phylum; el mismo autor cambia a los Quetognatos de los Deuterostomados a los Protostomados; y también cuestiona el origen monofilético de los Pterobranquios y Enteropneustos. La evolución de los phyla de Deuterostomados, plantea varios enigmas y controversias desde el punto de vista filogenético; entre otras cosas por su evidente contrastante diversidad de patrones corporales, reflejados por ejemplo, en la simetría pentarradiada de los equinodermos, la vida sésil de los perobranquios y ascidias, la segmentación en cefalocordados y la condición tripartita del celoma de los enteropneustos.

Cabe señalar que a pesar de lo anterior Brusca y Brusca (1990) proponen una filogenia para los Deuterostomados, donde incluso, se incluyen a todos los lofoforados, es decir a Braquiópodos, Briozoa y Phoronida fig **8**.

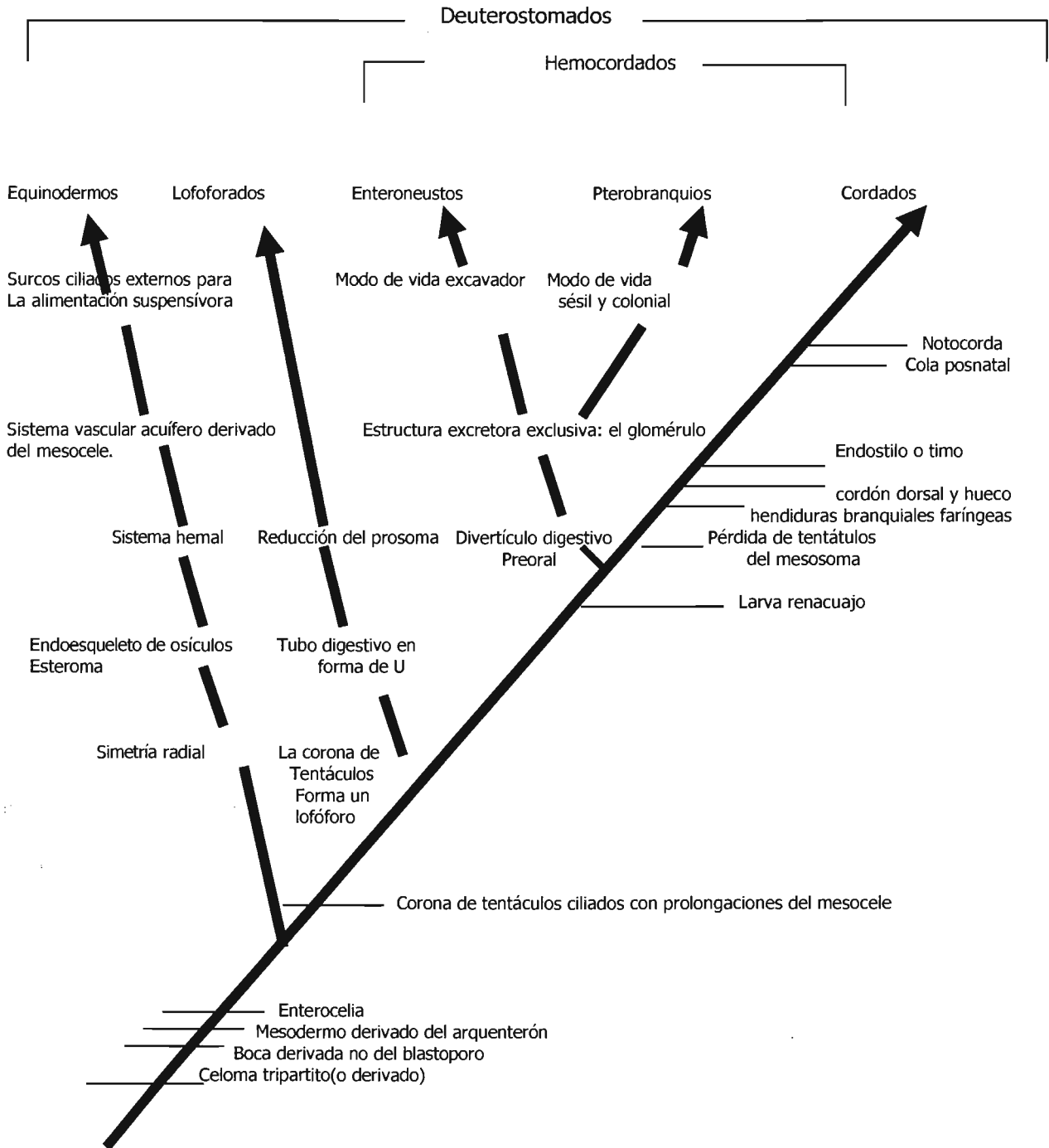


Figura 8 Cladograma que muestra las hipotéticas relaciones entre los filos de deuterostomados. La corona de tentáculos ciliados, se considera como un carácter presente en los ancestros de lofoforados, hemicordados y cordados. Esta corona se habría perdido en la línea que conduce a los cordados y en los hemicordados, en los enteropneustos; y en los pterobranquios retienen este carácter primitivo. Fuente: modificado de Brusca, R C y Brusca G J; *Invertebrates*. Sinauer, Inc, Sunderland, MA. 1990.

Por otro lado Cameron et al.,(2000)⁴³, consideran que Deuterostomados sólo incluyen a los equinodermos, hemicordados y cordados. Chordata está conformado por tres subphyla; Vertebrata, Cefalochordata (*Branchiostoma*) o comúnmente llamado Anfioxus) y Urochordata (tunicados). Este análisis cuidadoso es con base en el estudio de rRNA 18s e indica que los deuterostomados están conformados por dos clados mayores: cordados y (equinodermos+ hemicordados). Este análisis indica un origen monofilético de cada uno de los cuatro taxa mayores de los deuterostomados: vertebrados+cefalocordados, urocordados, hemicordados y equinodermos. Los hemicordados incluyen dos clase distintas; los gusanos enteropneustos y los pterobranquios: La hipótesis más fuerte del origen de los deutreostomados ha asumido que la morfología de los pterobranquios coloniales vivientes son parecidos a los deuterostomados ancestrales: Ellos presentan un análisis filogenético molecular de hemicordados que merece atención. Ellos utilizaron rRNA 18s para inferir la relaciones evolutivas de las clases de pterobranquios y enteroneustos. Los datos muestran que los pterobranquios pudieron ser derivados de los gusanos enteropneustos. El anidamiento de Pterobranchia muestra que los Enteropneustos cambian la visión de la evolución de los cordados y sugiere que los deuterostomados ancestral más cercanamente parecido a un gusano móvil enteropneusto que a un pterobranquio colonial sésil.

⁴³ En Cameron⁴

4. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Descritos los procesos de replicación del DNA y de la transcripción y maduración del pre-mRNA en la célula, como se mencionó previamente, los productos de los mismos se detectan ayudándose de técnicas diversas, que incluyen el uso de microscopía, que en nuestro caso es de epifluorescencia para la cual es necesario la utilización de fluorocromos acoplados a anticuerpos, que reaccionaran con proteínas específicas (SR), que participan en la maduración de los pre-mRNA resultantes de la transcripción; dos colorantes fluorescentes comúnmente utilizados para estos propósitos, son la fluoresceína, la cual emiten fluorescencia verde intensa cuando son excitadas con luz azul y la rodamina, que emite una fluorescencia roja profunda cuando es excitada con luz verde amarilla, formando enlaces covalentes SH y NH₂ de la proteínas.

Las moléculas fluorescentes absorben una determinada longitud de onda y emiten una longitud de onda más larga. Si una mezcla es iluminada está absorbiendo una longitud de onda y vista a través de un filtro que permita el paso de la longitud de onda emitida, es vista brillar otra vez en un fondo oscuro. Por que el fondo es oscuro, uniforme en un instante una cantidad de color brillante puede ser detectado.

Los colores fluorescentes usados para teñir células son detectados con la ayuda de este microscopio de fluorescencia. El microscopio es similar a uno de luz ordinaria; excepto por la luz de iluminación, con una potente fuente de luz, que es pasada a través de dos filtros; uno de los filtros está antes de llegar al espécimen y el otro filtro de luz está desde el espécimen. El primer filtro es *seleccionador* de longitudes de onda que excitan a un color fluorescente en particular, tiempo después el segundo filtro "bloquea" por

fuera esta luz y pasan solamente aquellas longitudes de onda emitidas con los colores fluorescentes.

El sistema óptico moderno de un microscopio de fluorescencia consiste de dos barreras de filtros(1 y 3) y un dicróico (haz-hendedor), un espejo (2). En este ejemplo el juego filtrante para la detección de moléculas fluorescentes; las fluoriceínas son mostradas. La apertura elevada de los lentes de los objetivos son específicamente importantes en este tipo de microscopio, para dar una magnificación de la brillantez de la imagen fluorescente es proporcional a los valores de la apertura numérica, ver también fig. 9

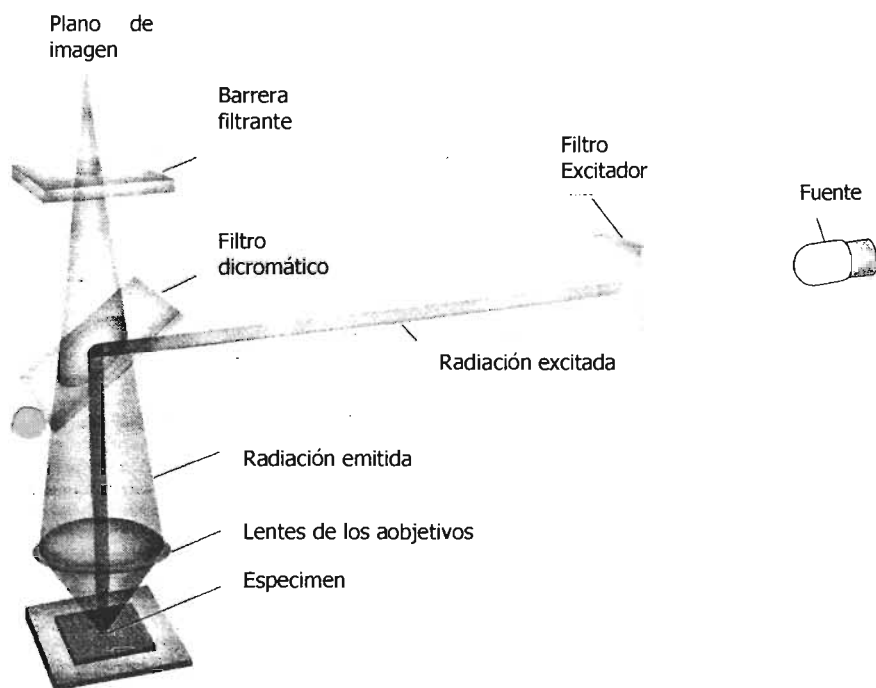


Figura 9 Esquema de los componentes microscopio de fluorescencia y formación de imágenes; tomado de Albert¹.

El microscopio de fluorescencia puede ser usado a monitorear cambios en la concentración y localización de moléculas específicas en célula vivas, también puede medir concentraciones locales de Ca^{+2} en un pH intracelular.

5.OBJETIVOS

General: Conocer la distribución intranuclear de los factores de splicing en *Balanoglossus* sp. (Hemichordata: Enteropneusta)

Particular:

Determinar la organización celular, homogénea o en forma de speckles, de factores de splicing de la familia SR en núcleos de varios tipos celulares de *Balanoglossus* sp. por medio de procedimientos de inmunolocalización por microscopía de epifluorescencia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Organismo

Individuos de *Balanoglossus* sp fueron recolectados en la Isla de Sacrificios en Veracruz, México. Y fueron donados por Gerardo Rivas L. del Laboratorio de Invertebrados, de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

6.2 Histología.

Algunos fragmentos de los balanoglossos fueron fijados con paraformaldehído fresco al 4% en PBS(preparado en el momento) (amortiguador de fosfatos salino: 0.01 M, pH 7.2) durante dos horas a 4⁰ C. Las muestras se enjuagaron tres veces en PBS durante 10 minutos cada vez. Posteriormente las muestras se deshidrataron en alcoholes etílicos a concentraciones graduales hasta llegar al 100% y xilol al 100% durante una hora en cada solución. Se incluyeron en parafina, para posteriormente obtener los cortes de tres μm de grosor, se montaron en portaobjetos tratados con silano par asegurar su adherencia. Los cortes histológicos se desparafinan a 60⁰C, durante 15 minutos, a fin de eliminar el exceso de parafina, se tratan con xilol al 100% durante cinco minutos, aproximadamente. Los cortes se rehidratan sucesivamente con alcoholes etílicos graduales de 100%, 96%, 70% y 50%, respectivamente; sumergiendo las muestras durante cinco minutos en cada solución, hasta completar con dos baños en agua destilada de cinco minutos cada uno de ellos. Alguna muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina, con la colaboración del Dr. Miguel Gaxiola y de Guadalupe Hiriart, del Instituto nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

6.2 Inmunolocalización y 6.3 Tinción dapi

La localización de proteínas SR se llevó a cabo por inmunofluorescencia indirecta. Los cortes histológicos desparafinados se permeabilizaron con TRIS (Tritón al 0.01 M, pH 7.6) tres veces por cinco minutos cada una. Después se llevó a cabo la recuperación antigénica con un tratamiento de proteinasa K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en Tris-HCl 0.01 M, pH 8). Después se enjuagó con el buffer de TBST y solución de TWEEN, durante 30 minutos, a la temperatura ambiente. Se drena el exceso y se adiciona el anticuerpo primario monoclonal (3C5) contra factores de splicing de la familia de proteínas SR (donado por el Dr. David Spector, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) en dilución de 1:20 en PBS mas suero normal de cabra (NGS), incubándolo durante toda la noche a 4⁰C, en cámara húmeda. Se enjuagaron con TBST, tres veces por diez minutos cada uno de ellos. Se agrega el anticuerpo secundario (de conejo anti-ratón RAM), acoplado con fluoresceína (isotiocianato de fluoresceína, FITC) en dilución de 1:10 en TBST; las muestras se incubaron debajo de un cubreobjetos, durante una hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lava con TBST, tres veces por diez minutos cada uno de ellos. Se realizó una tinción adicional con DAPI al 0.05%. Las muestras se montan con medio de montaje antidesvanecimiento; y se observaron con el microscopio de epifluorescencia a 60X (Nikon E800).

Tinción Ag-NOR

Se hicieron tinciones con nitrato de plata amoniacal para organizador nucleolar y cuerpos de Cajal en muestras histológicas, de acuerdo con procedimientos descritos previamente.

Registro y procesamiento de imagen

Las imágenes se capturaron en un microscopio de epifluorescencia marca Nikon, Modelo Eclipse E800, equipado con objetivos PlanFluar, a 60 o 100 X. Las imágenes histológicas se obtuvieron utilizando un objetivo planapocromático de A.N. 1.4. Las imágenes digitales fueron obtenidas con una cámara acoplada al microscopio (MTI3 CCD). Las imágenes capturadas se procesaron con el programa Power point (Microsoft) versión 2000.

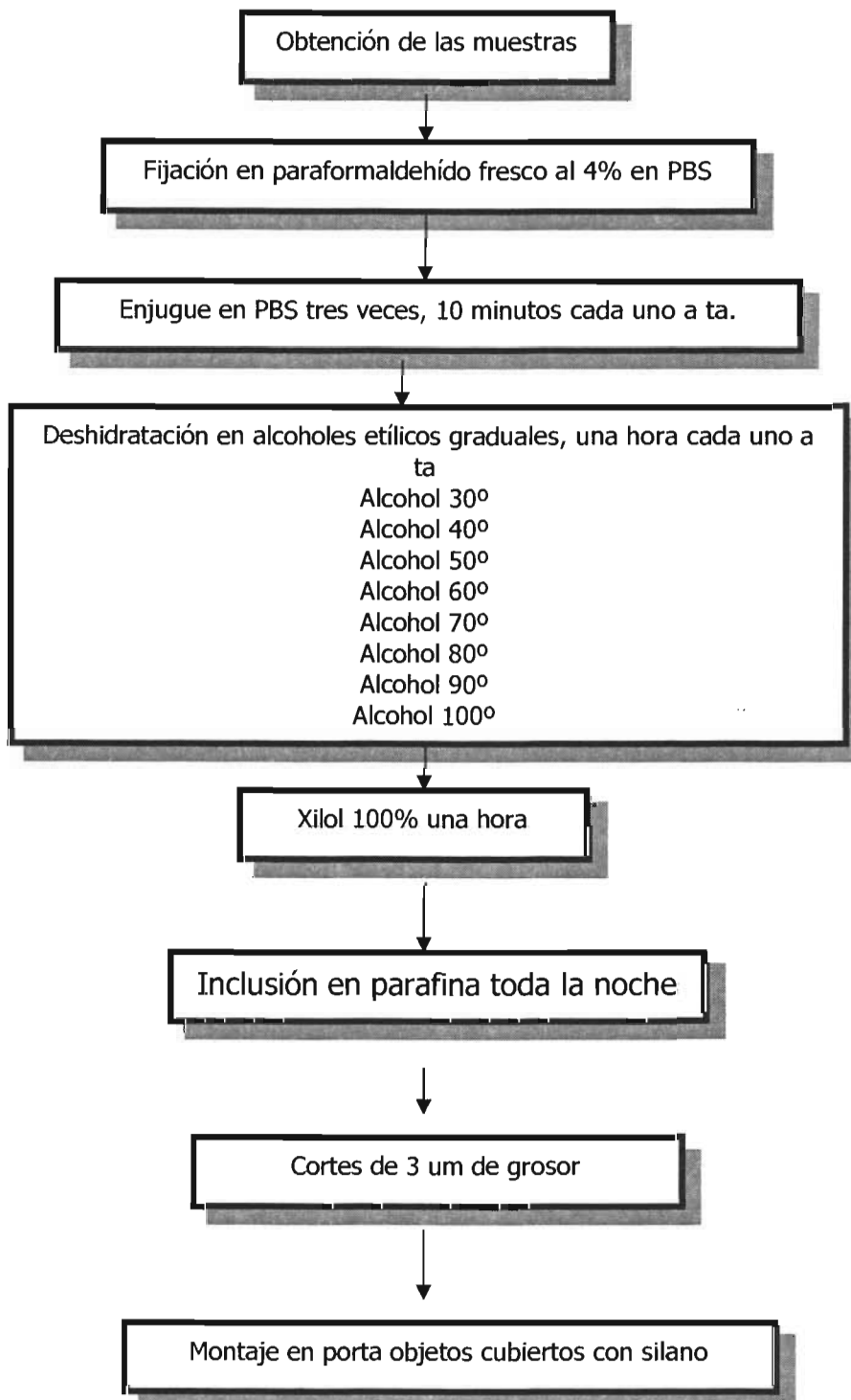
Diagrama 1 Técnica histológica para *Balanoglossus* sp

Figura 10 Diagrama de la técnica histológica para *Balanoglossus* sp. Modificada por Jiménez -García, Segura y Moncayo

Diagrama 2 para inmunofluorescencia en *Balanoglossus* sp

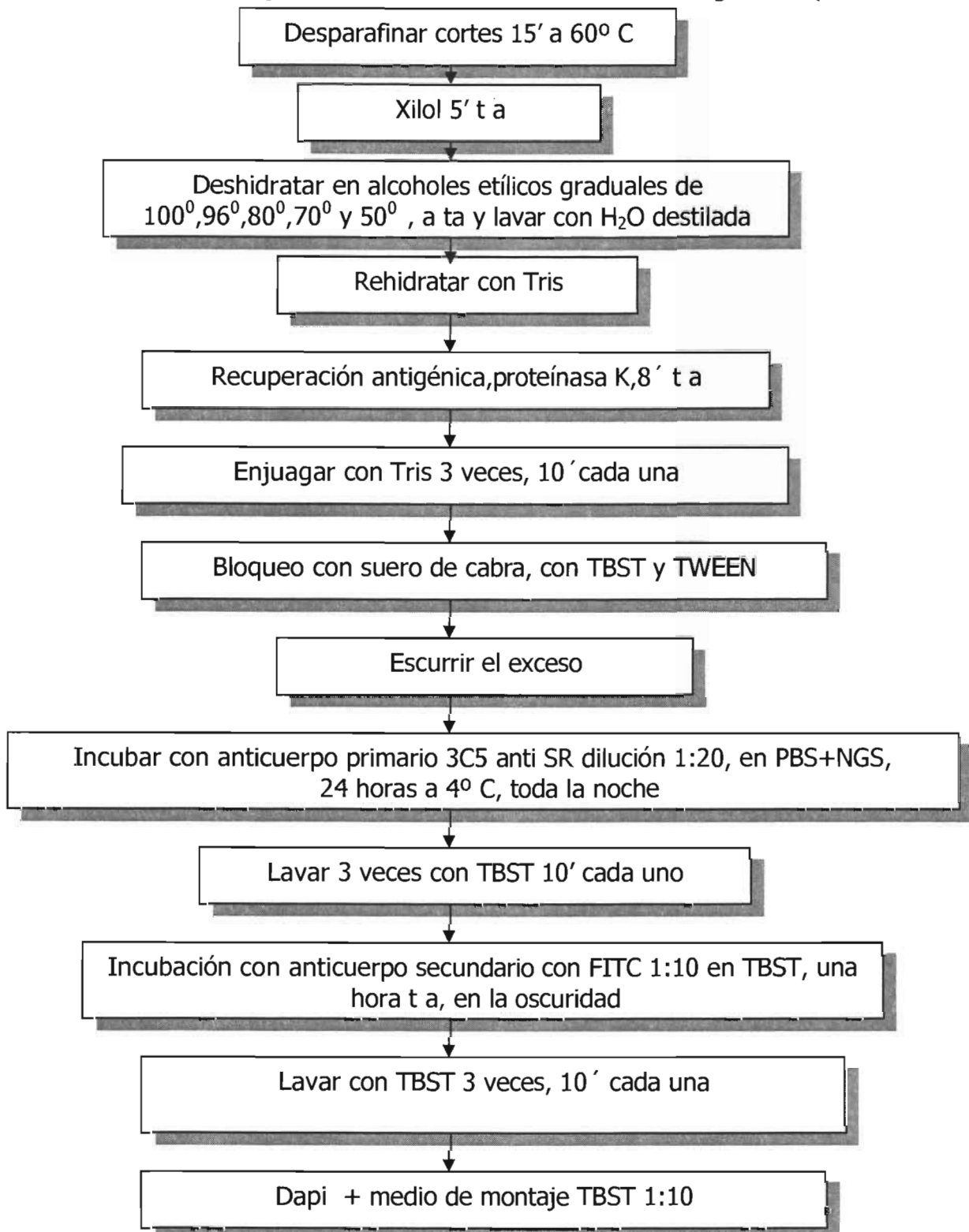
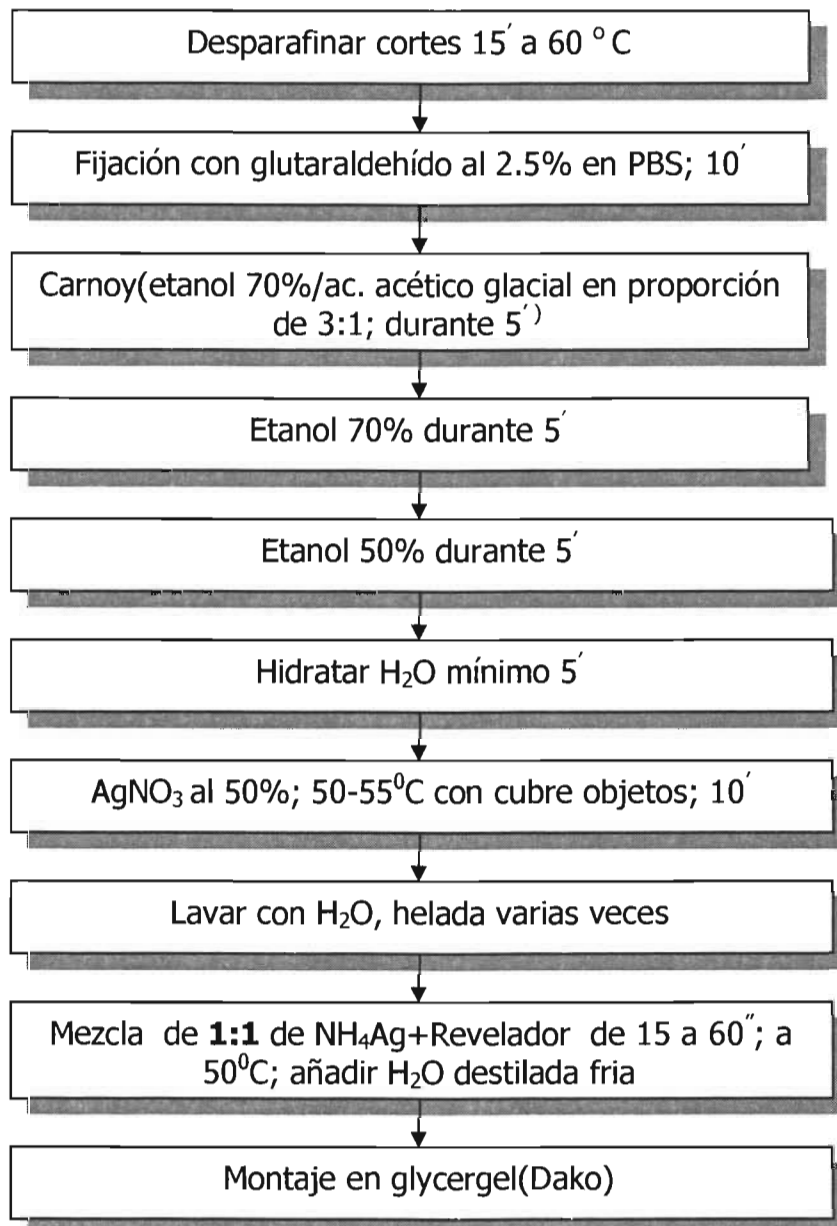


Figura 11 Diagrama de la técnica de inmunofluorescencia para *Balanoglossus* sp. Modificada por Jiménez -García, Segura y Moncayo

Diagrama 3 para Tinción en plata en *Balanoglossus*



Preparación del **NH₄Ag** : 4 g de AgNO₃+5ml H₂O destilada+5ml de NH₄OH concentrado, con pH final de 12. **Revalador**: formalina al 3% a 37°C neutralizar con cristales de CH₃-COONa; a pH 7. Ajustar pH a 5-6 con HCOOH al 88%. Cubri dre la luz a 4° C

Figura 12 Diagrama de la técnica de tinción en plata para *Balanoglossus* sp. Modificada por Jiménez -García, Segura y Moncayo

7.RESULTADOS

El análisis histológico de los ejemplares de *Balanoglossus* sp. permitió distinguir los diferentes tipos celulares; como granulocitos, células ciliadas, nerviosas, glandulares y epiteliales que indicaron la presencia de capas de tejido similar al reportado para otras especies del género. En efecto, los cortes histológicos muestran tejidos como epitelial, con células ciliadas y glandulares; gran cantidad de células con granulaciones (granulocitos): Después de la epidermis se distingue la membrana basal y pegada a esta se aprecia red nerviosa, más adelante una gran cavidad celómica atravesada por fibras de colágena; también se pueden apreciar amibocitos (Figuras 13, 14, 15 y 16). Las figuras representan reconstrucciones a partir de varios cortes. Algunos cortes fueron usados para inmunolocalización de las proteínas SR para conocer la distribución intranuclear de los factores de splicing. Asimismo, esas células fueron teñidas con el colorante DAPI para DNA para mostrar que las inmunotinciones correspondían al interior nuclear.

En el recuadro de la Figura 13 se aprecia un núcleo interfásico de *Balanoglossus* sp. con inmunomarcado para proteínas de la familia SR, donde se destacan factores del splicing.

También en las Figuras 13, 14 y 15 se destacan granulocitos, células glandulares y fibras de colágena, células ciliadas, membrana basal, red nerviosa y cavidad celómica. En los recuadros inferiores de las figuras 14 y 15 se aprecian los núcleos teñidos con anticuerpos contra proteínas SR (verdes) y núcleos teñidos con DAPI para DNA.

En la Figura 16 se aprecia una gran cantidad de amibocitos. Los recuadros inferiores de la misma figura se indican también inmunomarcaje para proteínas del splicing y para DNA en el interior nuclear.

En dichas figuras se observa otra región histológica del *Balanoglossus* sp. De igual manera, los factores de splicing se observan en verde y el DNA en azul, indicando la presencia de factores de splicing arreglados en el interior nuclear como un patrón moteado que excluye al nucléolo.

Para conocer la distribución de los factores de maduración del pre-rRNA se llevó a cabo tinción de plata amoniacal para NOR. Los resultados indican la presencia de material fuertemente contrastados en los nucleolos y en cuerpos nucleares pequeños del orden de 0.5 μm (Figuras 17, 18 y 19).

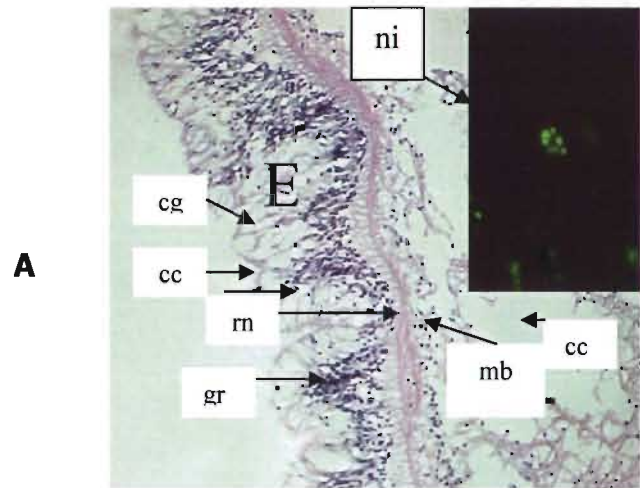
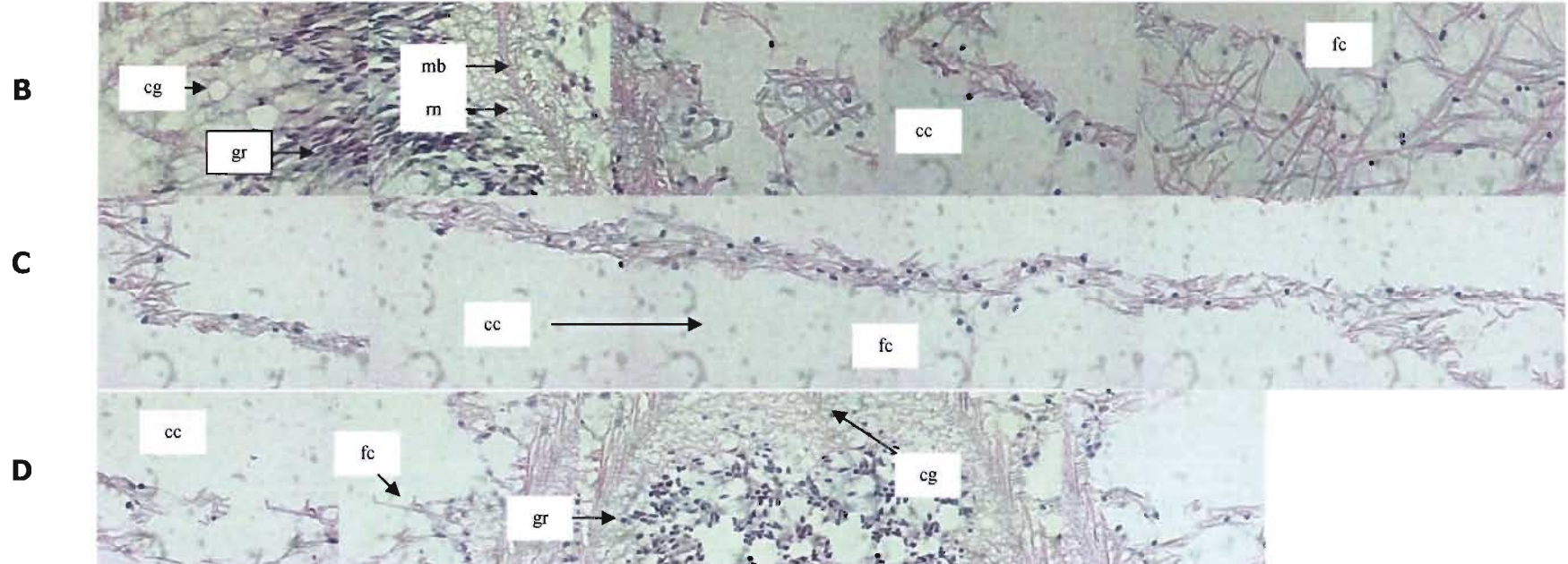


Figura 13. A: Corte histológico transversal en la región faríngea de *Balanoglossus*, sp a 20x, con tinción hematoxilina-eosina, donde se aprecia el tejido epitelial (**E**) y gran cantidad de granulocitos(**gr**); después de la **epidermis(E)** se distingue la membrana basal(**mb**) y unida a esta se aprecia red nerviosa(**rn**), más adelante una gran cavidad celómica(**cc**) atravesada por fibras de colágena(**fc**); en el recuadro un núcleo interfásico(**ni**) a 100x con inmunotinción para proteínas SR.

En las fig **B**, **C** y **D** representan imágenes a 100x del corte transversal.

La fig B nos muestran células glandulares (**cg**), granulocitos(**gr**), mebrana basal (**mb**), red nerviosa (**rn**), cavidad celómica (**cc**), atravezada por fibras de colágena(**fc**).

En la fig C se observan cavidad celómica(**cc**) y fibras de colágena(**fc**) ; y en **la fig D** se distinguen cavidad celómica(**cc**), fibras de colágena(**fc**), células glandulares(**cg**) y granulocitos(**gr**).



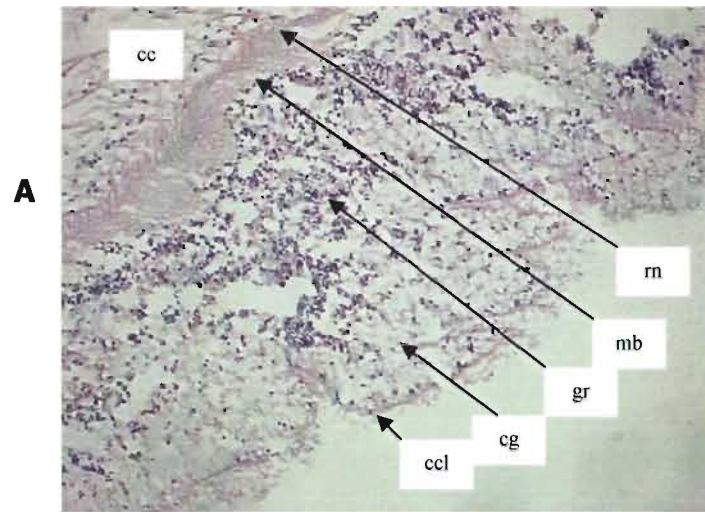


Figura 14. A: Corte histológico transversal de la región faríngea de *Balanoglossus*, sp a 20x con tinción de hematoxilina-eosina, en donde se distingue tejido epitelial (**E**), células ciliadas (**ccl**) y glandulares (**cg**); gran cantidad granulocitos(**gr**), después de la epidermis (**E**) se distingue la membrana basal(**mb**) y unida a esta se aprecia red nerviosa(**rn**), más adelante una gran cavidad celómica(**cc**) atravesada por fibras de colágena(**fc**).

B y C nos muestran fibras de colágena (**fc**) y granulocitos(**gr**).

En la fig D nos muestra dos recuadros donde se notan fibras de colágena (**fc**) y la cavidad celómica(**cc**); después se observan núcleos interfásicos a 100x con inmunotinción para proteínas SR y tinción dapi.

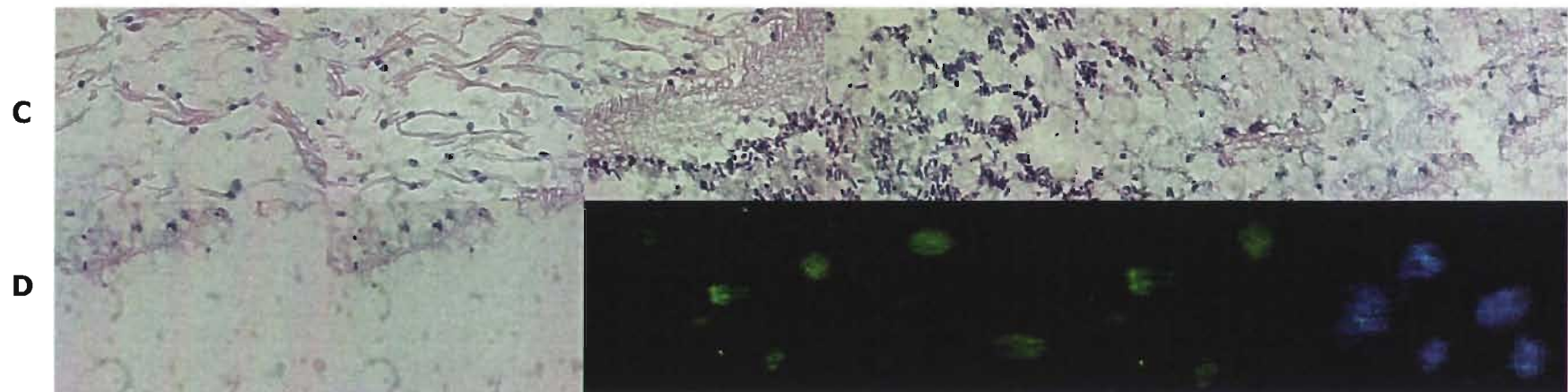
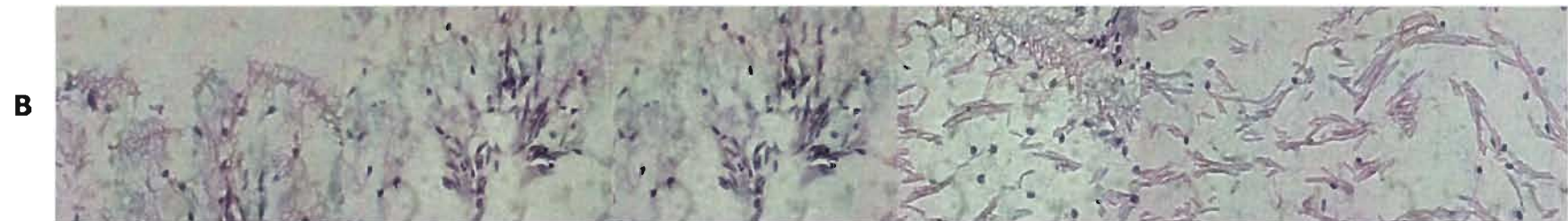


Figura 15. De A a la E: Se observa Corte histológico transversal de la región de la proboscis *Balanoglossus*, sp con tinción de hematoxilina-eosina a 100x, donde se aprecian una gran cantidad de granulocitos(**gr**), células glandulares(**cg**) cavidad celómica y fibras de colágena(**fc**); Al final de la fig. **E**, se observan núcleos interfasicos a 100x teñidos contra proteínas SR y dapi.

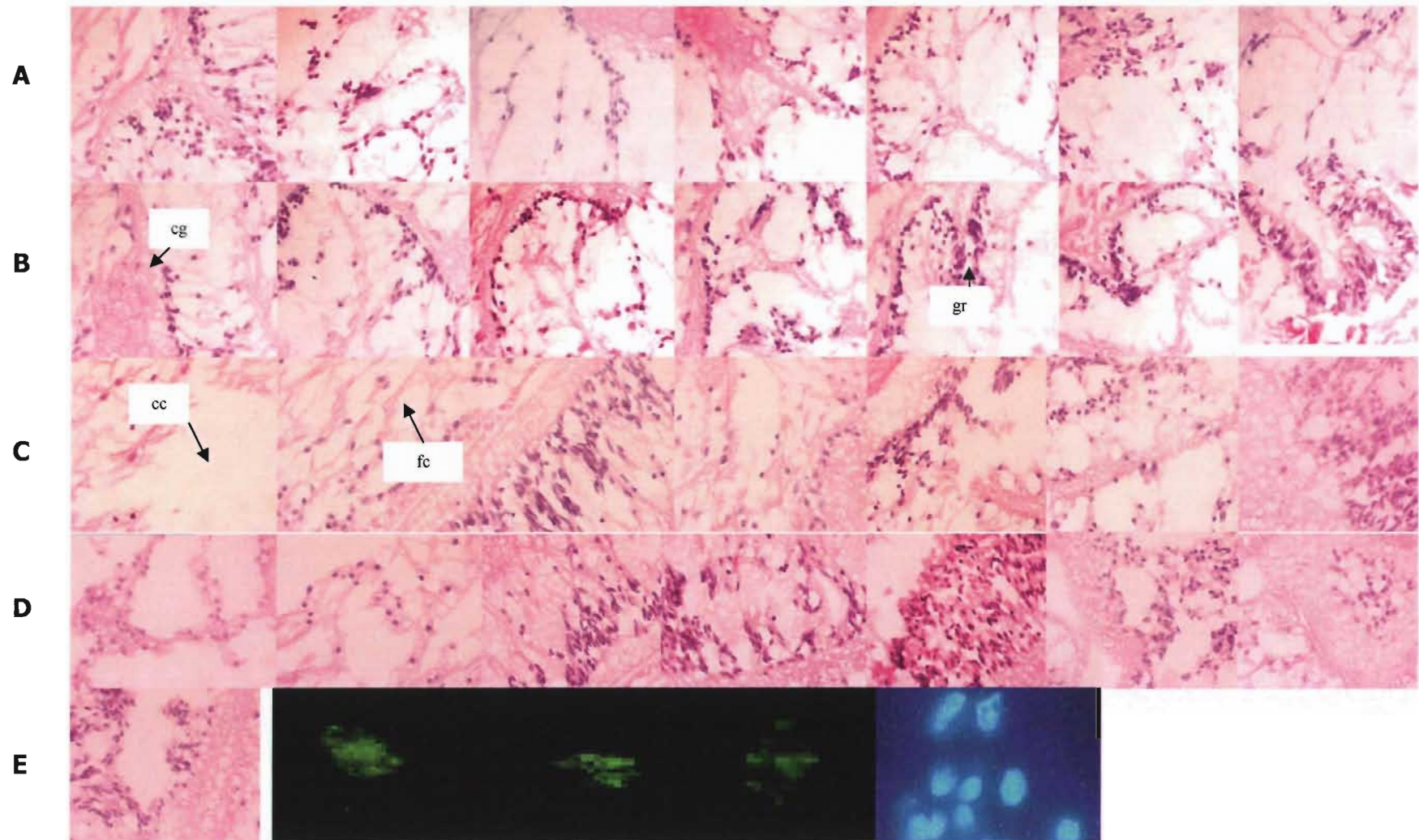


Figura 16. De A a la C : se observa Corte histológico transversal de la región de la proboscis *Balanoglossus*, sp con tinción de hematoxilina-eosina a 100x, donde se observan una gran cantidad de células glandulares (**cg**), fibras de colágena (**fc**) y en menor proporción los granulocitos (**gr**). En la fig **C** con núcleos interfásicos a 100x, teñido con anticuerpos para proteínas SR y dapi

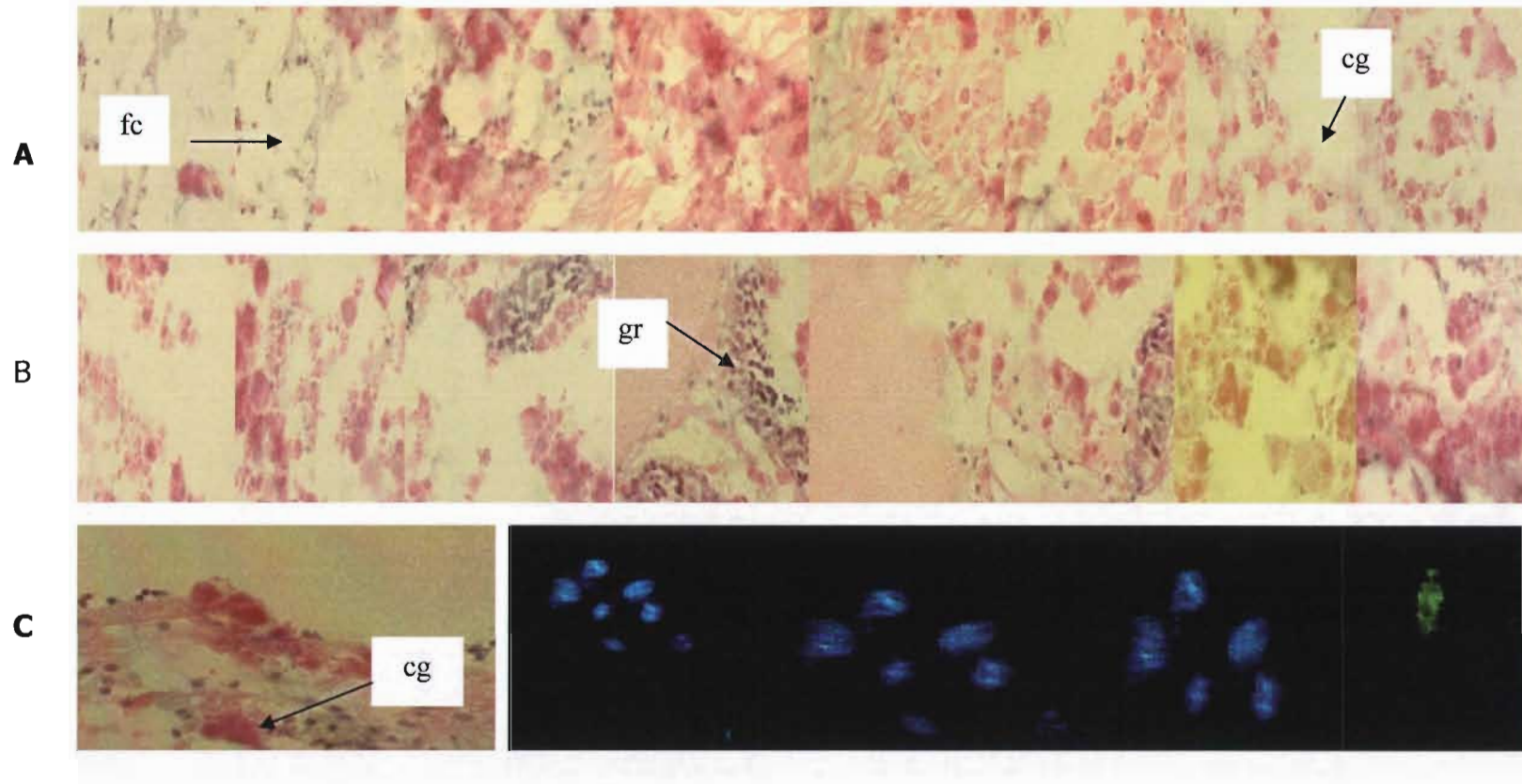


Figura 17. Tinción 1 en plata de epitelio de *Balanoglossus*, sp a 100x ; donde se muestran los núcleos de los granulocitos con nucleolo conspicuo y cuerpos espiralados (corpúsculo de Cajal); también se aprecian células ciliadas y fibras de colágeno entrelazadas con los granulocitos

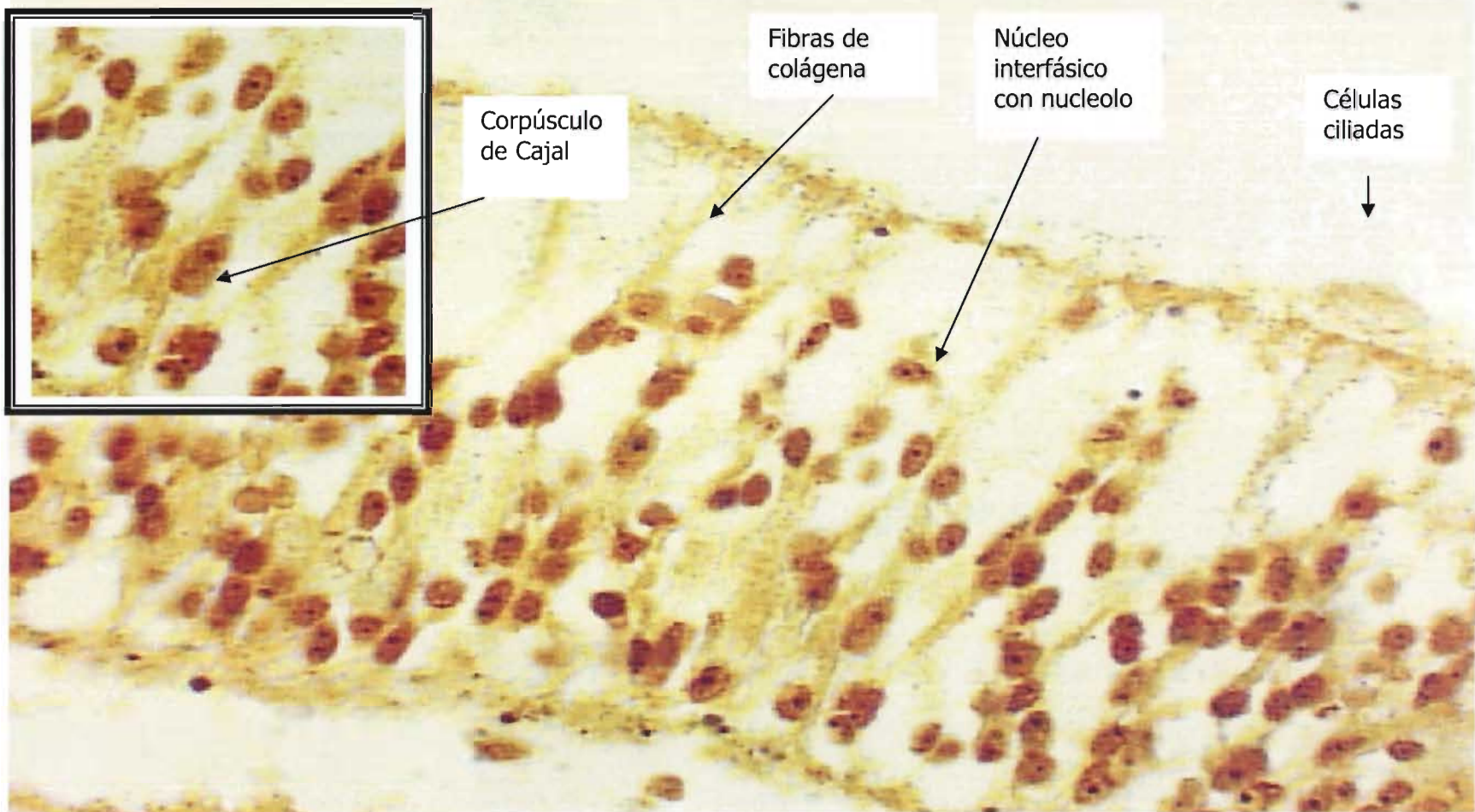


Figura 18. Tinción 2 en plata de epitelio de *Balanoglossus*, sp a 100x, donde se distinguen los núcleos de los granulocitos, con nucleolos y cuerpos espiralados; además fibra de colágena entrelazadas con los granulocitos

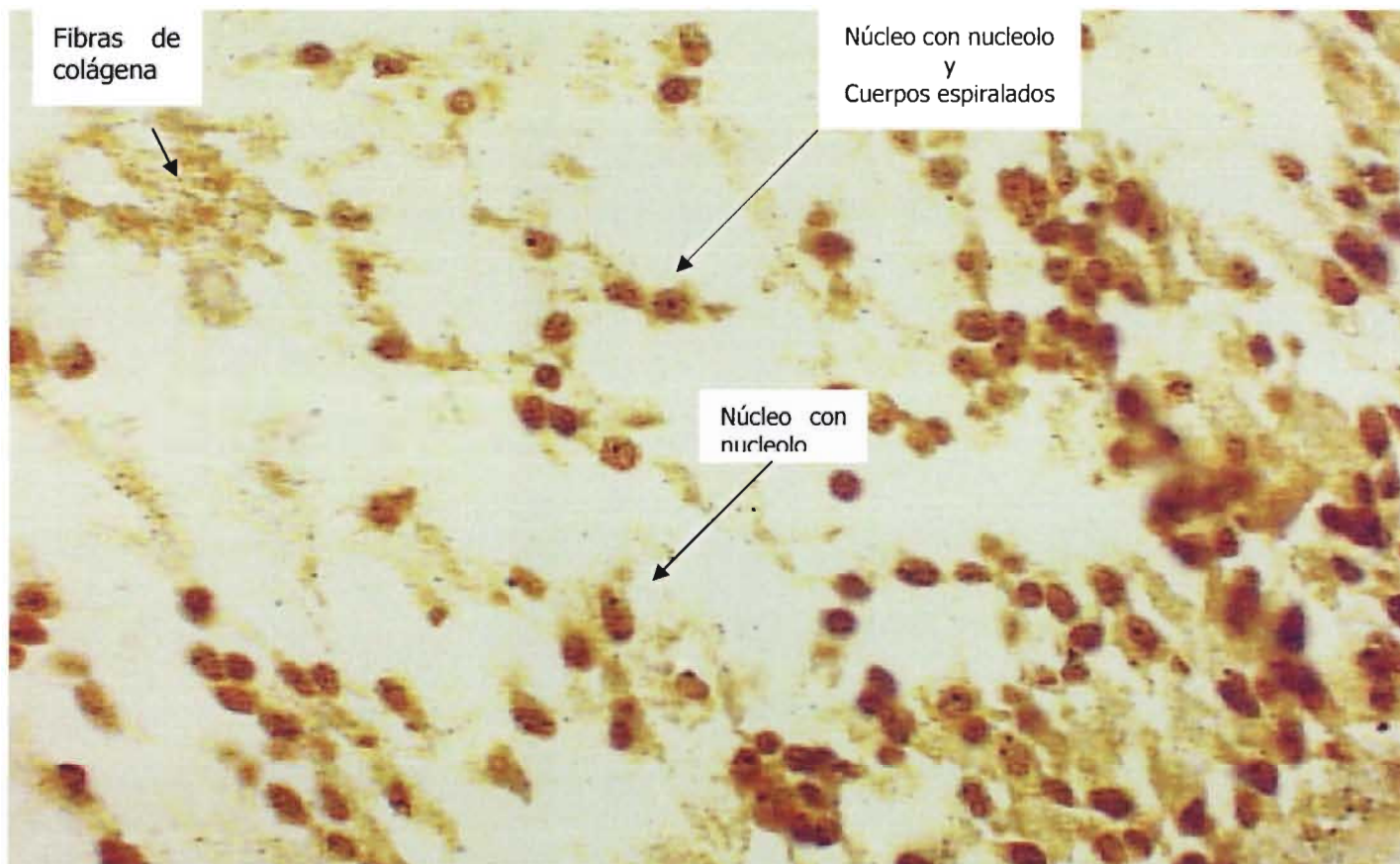
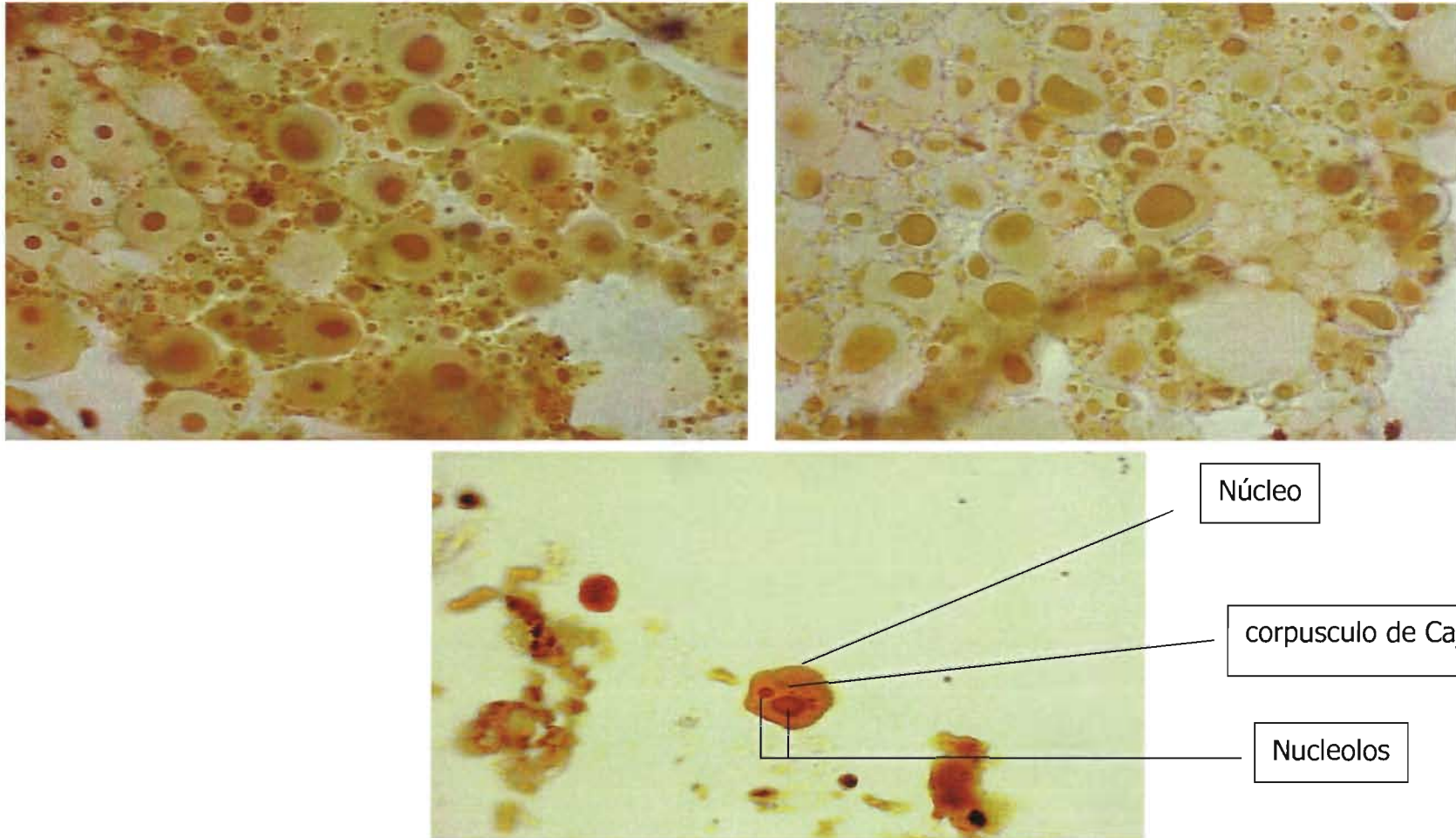


Figura 19. Tinción 3 en plata de células glandulares de *Balanoglossus*, sp a 100x, de la región de la proboscis donde se aprecia el núcleo con nucleolo y cuerpos espiralados(corpúsculo de Cajal).



8. DISCUSIÓN

Los estudios microscópicos y ultraestructurales de *Balanoglossus* son escasos. Sin embargo, se han abordado aspectos de estructura fina de las mitocondrias (Castresana, 1998 et al⁵; Cameron, 2000)⁴, del sistema nervioso en tornarios (Nezlin y Yushin, 2004)²³, del sistema digestivo (Dautov et al., 1994)⁷ y de las uniones septadas (Green, 1981)¹². El estudio de la organización celular de moléculas intranucleares -como los factores de splicing- en *Balanoglossus* no se conocen.

En este trabajo se muestra que los núcleos interfásicos de *Balanoglossus* sp contienen factores de splicing de la familia SR arreglados en forma de motas o speckles en la interfase. A la fecha, la mayoría de los estudios sobre el arreglo de las "speckles" o motas se ha llevado a cabo en células de mamíferos en cultivo (en George, 2001)¹⁰ y sólo recientemente se ha estudiado si este patrón morfológico está presente en células organizadas en tejidos (George et al., 2002)⁹. Estos estudios indicaron la presencia de un arreglo similar en forma de motas en diferentes tipos celulares presentes en órganos como el hígado el páncreas, el intestino, etc. Los datos sugieren que el fenotipo celular de almacenamiento de proteínas relacionadas con un evento fisiológico particular está conservado en la evolución y se puede suponer que estará presente en otros grupos de cordados o incluso de Deuterostomados (Brusca y Brusca, 2001)¹⁶. En este trabajo observamos que este es el caso. En efecto, el arreglo de los factores de splicing monitoreado a través de técnicas inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos contra la familia SR de factores, indicó un arreglo en forma de parches en diferentes tejidos del

Balanoglossus sp. Aunque la morfología del patrón moteado cambia dependiendo del estado transcripcional y de splicing tanto en células en cultivo como en tejidos (en George, 2001)¹⁰, los cambios ocurren como reducción del número de motas y de su forma, siendo redondas en células inactivas e irregulares en células activas. Aunque en este trabajo no llevamos a cabo experimentos que indujeran cambios metabólicos, sí notamos la presencia de patrones moteados en varios tipos celulares como son epiteliales, granulocitos y amebocitos, indicando que el fenotipo principal no cambia. Debido a la poca posibilidad de experimentar con *Balanoglossus* sp. en ese sentido, no se abordó en este trabajo un diseño experimental que incluyera protocolos de inhibición de la transcripción por ejemplo con actinomicina D o algún otro fármaco o droga. Sin embargo, la diferencia en intensidad de señal fluorescente en diferentes capas del organismo, sugiere que la señal podría depender del estado metabólico de las células.

Otro aspecto a tomar en cuenta es el de conocer si los cúmulos de factores de splicing en realidad están compuesto de cúmulos de gránulos intercromatinianos. Lo anterior queda por resolverse debido a que trabajos previos indicaron que grupos como el balanogloso no contiene grumos de gránulos intercromatinianos bien definidos sino dispersos, como en otros invertebrados (Jiménez-García et al., 1989; en Echeverría et al., 2003)⁸. Este aspecto podría resolverse utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión estándar o de citoquímica como la utilización de la técnica regresiva para ribonucleoproteínas a base de EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético), de acuerdo con

Bernhard (1969)⁸, o bien con técnicas de inmunolocalización ultraestructural e hibridación *in situ*.

Por otro lado, algunos factores de splicing también se distribuyen en los cuerpos de Cajal (en Echeverría et al., 2003)⁸ y aunque no se han reportado en muchos grupos biológicos, estos cuerpos se han observado incluso en plantas (en Echeverría et al., 2000)⁸ y en este trabajo se aportan evidencias de que se presentan en *Balanoglossus*.

Para conocer la otra parte de la organización nuclear relacionada con el metabolismo del pre-rRNA, se llevó a cabo tinción de plata amoniacal para organizador nucleolar (NOR) debido a que esta técnica contrasta fuertemente el material nucleolar (Goodpasture y Bloom, 1975)¹³. Los resultados indican la presencia de un material intranuclear abundante que corresponde al nucléolo y en algunos núcleos se observó también la presencia de corpúsculos del orden de media micra que concluimos que corresponden a los cuerpos de Cajal.

Estos resultados en conjunto, claramente indican que los componentes moleculares del núcleos de las células epiteliales, granulares, y glandulares del balanogloso, se encuentran organizados en dominios nucleares como las speckles, los nucléolos y los cuerpos de Cajal.

Finalmente, los resultados sugieren que el arreglo intranuclear en motas para los factores de splicing debe ser un fenotipo celular que se originó antes del surgimiento de los cordados y actúa en mecanismos de regulación genética dependientes de localización subcelular

9. CONCLUSIONES

Todos los tipos celulares analizados de los tejidos de *Balanoglossus* sp. presentaron proteínas SR en el interior del núcleo.

La distribución intranuclear de las proteínas SR corresponde a un arreglo en forma de motas o speckles.

La distribución intranuclear de los elementos de maduración del pre-rRNA se distribuyen en forma de nucléolos y de cuerpos de Cajal.

Los datos anteriores sugieren que los factores de splicing se distribuyen como un patrón moteado o speckled en el núcleo de los hemicordados, por lo que se propone que este fenotipo antecede el origen de los cordados.

10. REFERENCIAS

1. Alberts, B. (et al)(1994) **Molecular Biology of the Cell** Ed. Garland Publishing, Inc. New York and London, pag. 139-159; 335-339.
2. Barnes, R.D. (1987) **Zoología de los Invertebrados**, Ed. Interamericana, ed. 3^a , pag. 1084-1095.
3. Brusca, G. y Brusca, R. C. (1990) **Invertebrates**, Ed., Sunderland, Sinauer Associates. Inc.; Massachusetts, ed., 1^a , pag. 841-845; 850-854.
4. Cameron; Gary, J.R.; Swella, B.J. (2000) **Evolution of Chordata Body Plan: New Insights From Phylogenetic Analysis of Deuterostome Phyla: Proc.Natl Acad Sci USA**, vol 97 No 9 pp 4469-4474, april.
5. Catresana, J. (et al) (1998) **The mitochondrial genome of the hemichordate *Balanoglossus carnosus* and the evolution of deuterostome mitochondria.** Genetics, 150. 1115-1123.
6. Cortés, H.J. (2003) **RNA. en Jiménez.García, L.F. y Merchand, H. (eds). Biología Celular y Molecular**, Ed., Prentice Hall, ed., 1a, cap 2, pag. 23-42.

- 7.** Dautov, (et al) (1992) **Nervous system of the tornaria larva in Enteropneusta (Hemichordata)** : A histochemical and structural study. (BIOL. BULL. LAB. WOODS HOLE), vol. 183, no. 3, pp.463-475.
- 8.** Echevarria, M.O.; Jiménez García, L.F.; Vázquez, N G.(2003) **El Núcleo Interfasico, Morfología y Función. En Jiménez-García, L. F y Merchand, H (eds). Biología Celular y Molecular**, Ed., Prentice Hall, ed., 1ª , cap 12 pag. 341-394.
- 9.** George, T. R.; Segura-Valdez, M.L.; Gonzalez-Santos, L. y Jiménez-García, L.F. (2002) **Cellular Organization of the pre.mRNA-splicing Factors in Several Tissues Changes in the Utero by Hormone Action**, *Biology of the Cell* 94: 98-108.
- 10.** George, T. R. (2001) **Organización de los Factores de maduración del RNA pre—mensajero en Distintos Tipos Celulares Diferenciados en Tejidos**, Tesis Doctoral, Fac. Ciencias, UNAM pag 61.
- 11.** Grasse, P. P. ; Brien, P. y Dalcq (1961), **Zoologie I Invertébrés**, Masson Et Cⁱe Editeurs ; Tomo XII, pag 785-793.
- 12.** Green, C.R.(1981) **Septate junctions of the phylum Hemichordata** (cell junctions ; electron microscopy ; cell membranes ; *Balanoglossus australiensis* ; adhesion). (J. ULTRASTRUCT, RES.), vol. 75, no. 1, pp. 1-10.

.
13. Goodpasture, C. and Bloom, S. E. (1975) **Visualitation of molecular organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.** Chromosoma 53: 37-50.

14. Harrison, F. W. y Rupert, E. E. (1997) **Microscopio Anatomy of Invertebrates** (Hemichordata, Chaetognatha and the Invertebrate and Chordates), Vol. 15, Ed Wiley Liss, New York, USA, pag 1-101.

15. Herráez, S.A. y Luque, C. J. (2001) **Biología Molecular e Ingeniería Genética** (Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud), Ed., Harcourt, S.A. pag 141-160.

16. Hickman, C. P.; Roberts, L.S.; y Larson, A. (1998) **Principios integrales de Zoología** Ed., Mac Graw Hill, ed 6ª pag 476-483.

17. Hyman, L. H. (1959) **The Invertebrates** (Hemichordata), vol V, ED Mc Graw Hill Book Company, Inc. pag 72-154.

18. Jimenez-García, L. F.; Elizundia, J. M.; López-Zamorano, B.; Maciel, A.; Zavala, G.; Echevarria, O. M.; Vazquez Nin, G. H.(1989). **Implications for evolution of**

molecular structures of animal, plants, fungi and protocists. Biosystems 22, 103-116.

19. Jiménez-Ramirez, J.; Agredano-Moreno, L.T.; Segura-Valdez, M. L.; and Jiménez-García, L.F. (2002). **Lacandonia granules are present in Gingo biloba Cell Nuclei.** Biology of the cell 94: 511-518.

20. Karp, G. (2001) **Biología Celular y Molecular** (Conceptos y Experimentos). Ed., Mc Graw Hill Interamericana, ed., 1ª pag 546-579.

21. Lodish, H. (et al) (1998) **Molecular Cell Biology**, Scintific American Book, pag. 148-162; 485-542.

22. Meghitsch, R.A, y Schram, F. R. (1991) **Invertebrate Zoology**, Ed., Oxford University, London Press, ed., 3ª ,pag. 566-572.

23. Neslin, L. P. and Yuhin, V.V.(2004) **Structure of the system in the tornaria larva of *Balanoglossus proterogonius* (Hemichordata : Enteropneusta) and its phylogenetic implications.** Zoomorphology (Berlin) 123(1), Febrbruary 2004: 1-13.

24. Recillas, F. T. (2003) **Control de la Expresión Genética en Eucariontes.** En **Jiménez García, L.F. y Merchant, H (eds).** **Biología Celular y Molecular,** Ed., Prentice Hall, ed. 1ª, pag. 63.96.

25. Shu, D.; Shang; Chen, L. (1999) **Reinterpretation of Yunnozoom as the earliest Known Hemichordate.** *J. Zool Syst Eval Res* vol 37 No pag 93-100, Jun.