



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DISTRIBUCIÓN DE LOS GRÁNULOS  
INTERCROMATINIANOS Y ELEMENTOS DE  
MADURACIÓN DE mRNA DURANTE LA  
DIFERENCIACIÓN DE NEUROBLASTOS DE  
EMBRIÓN DE POLLO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**M. en C. MARTHA OFELIA SALCEDO ÁLVAREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN**

**CO-DIRECTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**

**MÉXICO D.F.**

**OCTUBRE 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Universidad Nacional  
AUTÓNOMA DE  
México

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

OFICIO FCIE/DEPI430/10

ASUNTO: Asignación de Jurado

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Aff: LIC. BALFRED SANTAELLA HIJOSCA.

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) M. EN C. MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ, el jurado para presentar Examen de Grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

PRESIDENTE	DR.	GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN
PRIMER VOCAL	DRA.	SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
SEGUNDO VOCAL	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
TERCER VOCAL	DRA.	GUDALUPE TRINIDAD ZAVALA PADILLA
SECRETARIO	DRA.	MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA
SUPLENTE	DRA.	OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
SUPLENTE	DRA.	MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDÉS

El trabajo aprobado como tesis es:

**Distribución de los gránulos intercromatinianos y elementos de maduración de mRNA durante la diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D. F., 21 de septiembre del 2010  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

JNFAB/100



El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM  
siendo el director de tesis el Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM  
siendo el codirector de tesis el Dr. Luis Felipe Jiménez García.

## **Agradecimientos institucionales**

- Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios de esta nación, mi formación académica y permitirme formar parte de su personal docente.
- Agradezco al Consejo Técnico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala autorizar en su momento continuar la estancia por un año más en la Facultad de Ciencias, al término del periodo sabático.
- Al jurado de mi trabajo de tesis le agradezco respetuosamente:

Su amable disposición y ayuda en todo momento para ajustar sus agendas y buscar un espacio con el fin de atenderme.

La cuidadosa revisión del manuscrito, fiel reflejo de su excelencia académica y rigor científico.

Las acertadas sugerencias que se fueron complementando para mejorar la versión final del trabajo.

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Dra. María del Carmen Méndez Herrera

Dra. María de Lourdes Segura Valdez

## Agradecimientos personales

- Agradezco a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez con admiración y aprecio el haberme permitido ingresar a su laboratorio durante mi primera estancia sabática; para iniciarme en la Microscopía Electrónica. El aceptar que pudiera desarrollar mi trabajo de tesis, además de todo el apoyo que me brindó en todo momento, las enseñanzas, así como su confianza y aprecio.
- Ha sido un honor haber tenido como profesor en el posgrado y director de mi tesis al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, maestro e investigador de la Microscopía Electrónica, la Biología Celular con especialidad en núcleo en nuestra Universidad. Él ha formado decenas de personal altamente especializado que contribuyen a mejorar la enseñanza, la investigación y el servicio para tener una mejor sociedad. Le agradezco todas sus enseñanzas, su paciencia y su compromiso.
- He tenido la fortuna de encontrar en mi camino al Dr. Luis Felipe Jiménez García, distinguido académico, excepcional universitario, siempre dispuesto en diferentes órdenes de complejidad a la enseñanza e investigación y la comunicación de sus amplios conocimientos sobre: Biología Celular, en especial núcleo y nucléolo, así como la Microscopía. Le agradezco con la cabeza y el corazón haber aceptado ser el codirector de mi tesis, sus enseñanzas, su paciencia, su compromiso y sobretodo, la dicha de su amistad.
- Le agradezco con sincero aprecio a la Dra. María de Lourdes Segura Valdez, quien se convirtió en mi “maestra” de inmunolocalización óptica. Las enseñanzas, su ayuda y el apoyo que me ha proporcionado fueron muy importantes en la realización de este trabajo; el estar en su laboratorio fue una grata experiencia de aprendizaje.
- Le agradezco en forma especial a la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla, quien me enseñó muchas de sus “artes técnicas” en el manejo del modelo experimental, el procesamiento de los organismos y todo su apoyo. Dra. Lupita, mi reconocimiento y cariño siempre.
- Le agradezco a la M en C. Ernestina Ubaldo Pérez (EUP) quien en todo momento y con el estilo que caracteriza, me enseñó los detalles (azul de toluidina, Epon, osmio, contrastantes, fotografías, cuchillas y negativos, entre otros) que hacen del trabajo de Microscopía Electrónica un reto y una delicia.
- Le agradezco al profesor José del Carmen Benítez Flores su ayuda y enseñanza en el procesamiento de los tejidos para obtener los cortes utilizados en los ensayos de inmunolocalización
- Un agradecimiento especial a la Dra. Hortensia González Gómez, coordinadora del Taller de Biofísica de Sistemas Excitables de esta facultad, quien amablemente nos proporcionó los organismos utilizados

en el presente trabajo, sin otro interés que no fuera el de cooperar con nosotros.

- Mi agradecimiento para los profesores que siempre estuvieron atentos y siendo un excelente equipo de trabajo me entregaron en tiempo y forma coordinada los organismos utilizados en el presente trabajo, su ayuda fue excepcional.
- Biólogo Jaime García Ruiz. Técnico Académico del Laboratorio de Biofísica de Sistemas Excitables
- QFB María Alicia Falcón Neri. Técnico Académico del Taller de Biofísica del Tlahuizcalpan
- QFB Araceli Torres Pérez. Técnico Académico del Laboratorio de Biofísica de Sistemas Excitables
- Le agradezco a la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro. Técnico Académico del Laboratorio de Microscopía Confocal en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por habernos permitido el uso del microscopio confocal para obtener las imágenes del presente trabajo.

## **Agradecimientos personales**

- Agradezco a mis amigos profesores de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala su apoyo y solidaridad de siempre y en especial, durante el desarrollo del presente trabajo:
- M en C. Ana Lilia Muñoz Viveros, Dr. Manuel Mandujano Piña, Dr. Hugo Perales Vela, Dr. Gerardo Ortiz Montiel, M en C Alberto Arriaga Frías, Biol. José del Carmen Benítez Flores, M en C Antonia Trujillo Hernández, M en C Graciela Molina González, M en C Martín Martínez Torres, M en C Socorro Sánchez Correa y Mtra. Diana Herrera Rojas, con quienes hemos logrado formar un excelente equipo de trabajo.
- Un agradecimiento especial por todas sus atenciones y apoyo a mis compañeros de laboratorio de Microscopía Electrónica en la Facultad de Ciencias: Dra. Rosario Ortiz Hernández, C a Dra. Reina Lara Martínez, M en C Marco Antonio González, Dra. María Luisa Sánchez Escobar, M en C Silvia Juárez Chavero, C a Dr. Christian Valdez Quezada, Dr. Abrahám Hernández Hernández y Biólogo Rafael Jaimes.



## **Dedicatorias**

Como un humilde homenaje a la memoria de los distinguidos maestros e investigadores:

Don Santiago Ramón y Cajal  
Dr. Ricardo Sotelo  
Dres. Ariane Monneron y W. Bernhard  
Dr. Setsuya Fujita

Con todo mi amor y agradecimiento a quienes son la alegría y la bondad de mi vida.

Mi esposo, el Dr. Sergio González Moreno  
Mis amados hijos Larisa Andrea y Alfie Sergio

Con cariño y agradecimiento a muchos de los estudiantes de Biología de la FES Iztacala a quienes he tenido el privilegio de ser su profesora y actualmente son excelentes profesionistas.

# Índice

Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Núcleo	1
Partículas ribonucleoproteicas	8
Transcripción en células eucariontes	15
Procesamiento del mRNA y Splicing	18
Objetivos	30
Material y Métodos	31
Microscopía Electrónica	31
Microscopía Óptica	33
Resultados	36
Microscopía Electrónica	36
Microscopía de Fluorescencia y Confocal	51
Discusión	62
Conclusiones	68
Bibliografía	70

## **Resumen**

El núcleo celular es una estructura altamente compartimentalizada y dinámica. La morfología de sus compartimientos refleja el estado citofisiológico celular expresado en la transcripción y procesamiento del RNA. Los compartimientos incluyen distintas partículas ribonucleoproteicas que han sido analizadas en diferentes sistemas experimentales. Por ejemplo, se han analizado cambios en estructuras nucleares durante la diferenciación de diversos tejidos embrionarios. Aunque se han estudiado las variaciones del volumen nuclear, la cromatina compacta y los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación y maduración neuronal, las variaciones de otras estructuras nucleares como los gránulos intercromatinianos (GIC) -que contienen factores de splicing- están menos conocidas. En este trabajo se estudiaron los cambios de los GIC durante la diferenciación y maduración de las neuronas del asta anterior de la médula espinal cervical del embrión de pollo, por medio de microscopía electrónica utilizando técnicas estándar y preferenciales para ribonucleoproteínas. También se evaluó la distribución intranuclear de factores de splicing mediante ensayos de inmunofluorescencia y análisis con microscopía confocal. Los resultados indican cambios drásticos en la abundancia, así como en la distribución y forma de los cúmulos de GIC. Estas variaciones concuerdan con aquellas que se presentan en el patrón moteado de factores de splicing. Los hallazgos sugieren un re-arreglo intenso de los GIC, asociado a etapas críticas de la diferenciación del neuroblasto y la maduración de las motoneuronas.

## **Summary**

The cell nucleus is a highly compartmentalized and dynamic structure. The morphology of its compartments reflects the cell physiology expressed in transcription and RNA processing. The compartments include different ribonucleoprotein particles which have been analyzed in different experimental systems. For example, changes in nuclear structures have been studied during differentiation of several embryonic tissues. Although the variations of nuclear volume, condensed chromatin and perichromatinic granules have been studied during neuronal differentiation and maturation, the changes of other nuclear structures such as interchromatinic granules (ICG) –which contain splicing factors- are less known. In this work the changes of ICG during differentiation and maturation of the anterior horn of the cervical spinal cord neurons have been studied by means of electron microscopy using standard and preferential techniques for ribonucleoproteins. The intranuclear distribution of splicing factors has been evaluated by means of immunofluorescence assays and confocal microscopy analysis. The results show drastic changes in the abundance, as well as in the distribution and shape of ICG clusters. These variations coincide with those presented in the pattern of the clusters of splicing factors. The findings suggest an intense rearrangement of ICG, associated with critical stages of neuroblast differentiation and motoneuron maturation.

## Introducción

Es la presencia del núcleo celular interfásico la que define a los organismos eucariontes, actualmente se tiene una idea clara de su organización morfofisiológica y su contenido molecular (DNA, RNA y proteínas).

El núcleo fue descubierto por Brown hacia 1833 y ha sido objeto de múltiples estudios, desde ese tiempo hasta la fecha. En este organelo residen los procesos de regulación de la expresión genética; posee los sistemas de control del ciclo celular y los cambios propios del mismo a lo largo de la vida celular como son: la síntesis del DNA y de los RNAs (Becker y col., 2000). Los diferentes RNAs (RNA ribosomal, RNA de transferencia, RNA mensajero y los RNA pequeños nucleolares: rRNA, tRNA, mRNA y UsnRNA, respectivamente), los que han sido estudiados por diversos grupos de investigación (Vázquez Nin y col., 2003 en Merchant y Jiménez eds. 2003)

La organización interna del núcleo está demostrada por la localización de procesos nucleares en regiones diferentes del mismo; una variedad de sus componentes se localizan en estructuras o dominios subnucleares concretos cuya comprensión es un campo de estudio de la Biología Celular (Vázquez Nin y col., 2003).

**La envoltura nuclear**, separa el contenido del núcleo del citoplasma, como un compartimiento bioquímico diferenciado que alberga el material genético y es el lugar de la transcripción y el procesamiento del RNA. Dicha envoltura está formada por una doble membrana; interna y externa, unidas a nivel de los complejos de los poros nucleares y por la lámina nuclear subyacente. Los poros contienen más de cien polipéptidos llamados nucleoporinas, que forman

una estructura de simetría octagonal de unos 125 nm de diámetro (Becker y col., 2003).

La envoltura nuclear consta de dos membranas organizadas en paralelo una con la otra y separadas por un espacio de 10 a 50 nm. Las dos membranas se fusionan en ciertos sitios para formar los complejos del poro. La envoltura nuclear es una estructura con gran actividad relacionada con el movimiento de los RNA y las proteínas en ambas direcciones, entre el núcleo y el citoplasma. La replicación y la transcripción del material genético requieren la participación de diferentes proteínas, las cuales se sintetizan en el citoplasma y se transportan al núcleo a través de la envoltura nuclear mediante complejos del poro. Estas estructuras están constituidas por un aparato en forma de canastilla integrada por una red supramolecular característica, la cual presenta simetría octagonal. Las proteínas y los RNA pasan por los canales centrales del complejo del poro y las diferentes macromoléculas se importan de forma selectiva hacia el núcleo; las importinas mueven macromoléculas hacia el interior y las proteínas exportinas participan selectivamente en los procesos de salida de moléculas al citoplasma (Karp, 2006).

**La lámina nuclear** es una red fibrosa que forma una capa proteica de 10 a 20 nm. de espesor, proporciona un soporte estructural al núcleo y está constituida por filamentos intermedios asociados en distintas direcciones que cuando se ensamblan, se organizan para establecer la estructura generalmente esférica del núcleo, dando un soporte a la envoltura nuclear. Las células de mamíferos contienen cuatro tipos distintos de proteínas llamadas laminas y son: A, B1, B2 y C las cuales forman una matriz de laminas que se extiende hacia el interior del núcleo. Se ha visto que algunas de estas laminas sirven como sitios de

unión para la cromatina (Vázquez Nin y col., 2003). Los estudios de extracción de las laminas mostraron una inhibición del ensamble de la envoltura nuclear (Peter y col., 1990).

Las proteínas de la lámina nuclear que se han caracterizado en vertebrados e invertebrados tienen un peso molecular entre 60000 y 80000 daltons; tienen regiones altamente conservadas para las diferentes laminas, A, B y C. Las laminas nucleares presentan una gran homología en secuencias y estructura molecular con los filamentos intermedios; las moléculas de la lamina B forman dímeros que se sitúan unos a continuación de otros dispuestos antiparalelamente conformando un tetrámero. Las laminas A y C se combinan entre sí y se organizan como las laminas B. Esta organización produce una malla cuadrangular (Alberts y col., 2008). Al hacer ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de laminas se observó que hay variaciones en un mismo organismo dependiendo del tipo de célula y tejido (Krohne y Benavente, 1986).

La lámina nuclear está asociada a proteínas que la interconectan con la envoltura nuclear y con la cromatina subyacente. Entre estas proteínas destacan las LAP (proteínas asociadas a la lamina nuclear) que presentan varias isoformas. Otro grupo importante, son las proteínas LBR (receptoras de la lamina nuclear), la emerina, las MAN1 y la otefina; la disposición de estas proteínas indica que las laminas guían las interacciones de la cromatina con la envoltura nuclear, contribuyendo a la organización de la misma.

Durante la interfase las laminas nucleares aumentan al igual que como crecen las membranas, incluidas las de la envoltura nuclear duplicando su tamaño, preparándose para la división celular. En el proceso de muerte celular por

apoptosis las laminas se degradan por acción de las caspasas (Alberts y col., 2008). Se ha visto la presencia de mutaciones en el humano en genes que codifican las laminas A y C y que dan lugar a enfermedades como: la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, una forma de cardiopatía y la lipodistrofia congénita de Dunnigan; además están involucradas también en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (Spector, 2003).

La lámina nuclear está involucrada en la regulación de la actividad genética, como lo demostraron Spann y col. (2002) al trabajar con núcleos embrionarios que presentaban mutaciones en las laminas. Estos autores encontraron que había inhibición de la actividad de la RNA polimerasa II, en células transcripcionalmente activas.

**Nucléolo.** La estructura que más destaca en el núcleo, es el nucléolo que es el sitio donde tiene lugar la transcripción y el procesamiento del rRNA así como el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas. Este organelo ribonucleoproteico contiene tres componentes: centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular.

Con el desarrollo de la tinción de plata, Cajal describió el nucléolo como un conjunto de esferas; décadas después con el empleo de técnicas histoquímicas se estableció que el nucléolo contiene básicamente RNA y proteínas. Esta estructura se puede teñir con la pironina que es negativa a la tinción de Feulgen, la que es selectiva para el DNA. La proporción de RNA del nucléolo es variable, puede haber desde el 10% hasta un 30% de su contenido (De Robertis, 2005). La presencia de RNA y de fosfoproteínas ácidas le da un carácter basófilo, aunque en ocasiones predominan proteínas básicas dándole



un carácter acidófilo. En el nucléolo siempre se encuentra del 1-3% de DNA que se localiza en los centros fibrilares y en la heterocromatina asociada al nucléolo, ésta corresponde a los cromosomas que poseen regiones organizadoras nucleolares. En este organelo hay enzimas que son necesarias para la síntesis y el procesamiento del rRNA; en particular hay presencia de RNPs<sub>snU3</sub>; esto puede considerarse como una prueba molecular de la transcripción y procesamiento del rRNA. La actividad nucleolar está unida a la necesidad de ribosomas en la célula y por tanto a la síntesis de proteínas (Pollard y Earnshaw, 2002. Karp, 2006).

Con el desarrollo de técnicas de microscopía electrónica se han estudiado los componentes nucleolares: a) La parte amorfa llamada nucleoplasma que corresponde a los espacios de escasa densidad y que tiene cavidades en contacto con la parte densa; b) La parte densa denominada nucléolonema que corresponde a la región más compleja está formada por: una parte granular en donde hay acumulaciones de ribonucleoproteínas que contienen gránulos de 25 nm; una parte fibrilar constituida por fibrillas de unos 8 a 10 nm constituidas por ribonucleoproteínas y por los centros fibrilares con una densidad inferior a las partes granulares y fibrilares. Estos centros contienen DNA y RNA y consisten en finas fibrillas de entre 7 y 10 nm. Todos los RNA originados en el nucléolo provienen del transcrito primario de 45s, el cual se transcribe a partir del DNA de los organizadores nucleolares en los centros fibrilares. Este RNA 45s se encuentra asociado a diversas proteínas y pasa por una fase de maduración para obtener las subunidades ribosómicas de 60s y 40s. Los diferentes tipos de RNA (18s, 28s, 5.8s y 5s) son parte del proceso. El RNA 5s

es sintetizado en forma separada por la RNA polimerasa III fuera del nucléolo y no requiere de modificaciones químicas (Alberts y col., 2008).

La organización molecular del nucléolo está en concordancia con la organización nuclear, ya que participa en las modificaciones del rRNA y está relacionado con los diferentes tipos de UsnRNAs (Spector, 1993).

**Los denominados cuerpos espiralados o cuerpos de Cajal (CE)** (Monneron y Bernhard, 1969) son componentes ribonucleoproteicos esporádicamente asociados al nucléolo. Estas estructuras de aproximadamente un micrómetro de diámetro contienen proteínas nucleolares y RNA diversos, los cuales son importantes para el procesamiento del rRNA (Jiménez García y col., 1993). Estudios de inmunolocalización para microscopía de fluorescencia permitieron detectar la presencia de la proteína marcadora de estas estructuras, la cual se denomina P80 coilina (Raska, 1991).

**Cromatina.** El empaquetamiento del DNA en las células eucariontes permite su funcionamiento; el proceso se realiza teniendo como base la formación de nucleosomas, los cuales arman la cromatina dentro del núcleo, permiten la compactación y protección de la información genética, además de la conservación y funcionamiento de la misma, durante la vida celular (Derenzini y col., 1978).

Los términos heterocromatina y eucromatina fueron propuestos por Heitz (1928) para referirse a segmentos de cromatina que aparecían intensamente teñidos (heterocromatina) o menos teñidos (eucromatina) en preparaciones de microscopía de luz. Estos términos se aplicaron posteriormente al núcleo en

interfase visto con el microscopio electrónico, dada su organización estructural y su papel citofisiológico. (Karp, 2006)

En el núcleo interfásico existen dos tipos de cromatina, la compacta y la laxa. La primera se denomina heterocromatina tiene una estructura condensada, es transcripcionalmente inactiva y se distribuye en forma irregular en la zona periférica nuclear, en el nucleoplasma y en la periferia del nucléolo. Hay dos tipos de heterocromatina, la constitutiva y la facultativa. La primera posee un alto contenido de secuencias repetidas (DNA satélite), se localizan en la región centromérica y forman los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos; en el ser humano corresponden casi al 10% del genoma (De Robertis y col., 2005). La heterocromatina facultativa es variable entre los diferentes tipos celulares y contiene los genes que no se están expresando en ese tipo celular, dado que todo el genoma no se transcribe en todas las células. La heterocromatina facultativa llega a representar entre el 80 y 90% de toda la heterocromatina dejando de 10 a 20% para la heterocromatina constitutiva. Esta cromatina se replica tardíamente y en muchos mamíferos, incluido el ser humano, la mayor parte de la cromatina constitutiva es centromérica y telomérica. Esta cromatina tiene algunos genes importantes como los genes que transcriben tRNA y el rRNA no nucleolar; tiene la característica de presentar secuencias cortas repetidas dispuestas en *tándem* las cuales se han relacionado con el llamado “silenciamiento genético” (Alberts y col., 2008). La eucromatina corresponde a la región de cromatina laxa, está con frecuencia transcripcionalmente activa y es expresada en forma de RNA. La cromatina se puede observar en el microscopio electrónico con la técnica preferencial del ácido fosfotúngstico acuoso (PTA) propuesta por Vázquez Nin y col. (1973).

La cromatina en la mayoría de las células mantiene un grado de compactación (Becker, 2003). En células nerviosas Vázquez Nin y col. (1983) estudiaron los depósitos de cromatina y las ribonucleoproteínas nucleares durante la diferenciación y maduración neuronal; posteriormente este grupo de trabajo continuó el análisis en las células musculares, observando los cambios de estos componentes nucleares, durante la diferenciación del embrión de ave (Zavala y col., 1992).

**Partículas ribonucleoproteicas (RNPs). Gránulos pericromatinianos GPC.**

Los GPC fueron descubiertos por Watson en 1962 y su estudio se profundizó con el desarrollo de la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) de Bernhard (1969). Los GPC fueron descritos en detalle por Monneron y Bernhard en 1969 como cuerpos esféricos de 30 a 50 nm de diámetro rodeados de un halo claro de 20 a 25 nm de diámetro. Los GPC se forman por plegamiento de las fibras pericromatinianas (Vázquez Nin y Bernhard, 1971). Esto ha sido abordado por experimentos en diferentes vías: estudios que utilizan factores físicos para alterar el metabolismo del RNA e investigaciones que emplean sustancias químicas que inducen cambios, por ejemplo: el estudio de Moyne, Nash y Puvion de 1977 demostró que el efecto de la administración de drogas que alteran el metabolismo del RNA, afecta la producción de fibras pericromatinianas y a su vez modifica la cantidad y distribución de los GPC. Por otra parte, la supresión y administración de hormonas como el estradiol que incrementan la transcripción en las células blanco como las del epitelio endometrial de rata ovariectomizadas producen variaciones del número de GPCs (Vázquez Nin y col., 1978). Estos hallazgos demuestran que el número de GPC está regulado por la relación entre la

síntesis del pre-mRNA y la exportación del RNA maduro al citoplasma. Se encontró en las células del epitelio endometrial de ratas ovariectomizadas una velocidad de salida de mRNA menor que con la que se produce, por lo que se deduce los GPC actúan como un almacén intranuclear de mensajeros maduros (Vázquez Nin y col., 1979). Otras investigaciones han sido realizadas, con modelos animales en etapas embrionarias, estudiando el comportamiento de estas partículas durante la diferenciación celular y se detectó un aumento en la frecuencia de GPC durante la diferenciación y maduración de los neuroblastos (Vázquez Nin y col., 1980). Con el uso de métodos modernos como el microscopio electrónico provisto con el filtro de energía de electrones, Vázquez Nin y col en 1996 demostraron que los GPC tienen RNA y proteínas asociadas en forma de fibrillas plegadas de 2 a 3 nm de diámetro. La hipótesis es que los GPC almacenan RNA de alto peso molecular. Por otra parte, Puvion y col. (1984) demostraron en células de hígado de rata que los GPC del nucleoplasma tienen una relación con la formación de moléculas de RNAUsn. Al hacer un análisis de los GPC durante la diferenciación y maduración de la notocorda (Zavala y Vázquez Nin, 2000) encontraron variaciones de estas partículas que concuerdan con cambios importantes en el núcleo, durante la diferenciación de motoneuronas del asta anterior del embrión de pollo. Estos autores describen cuatro períodos de cambio, en el primero al inicio de la diferenciación existe un aumento de los GPC y para el día tres del desarrollo se da una baja en el número de ellos. Estas partículas vuelven a incrementarse para el día seis y finalmente la frecuencia de los GPC disminuye al terminar la maduración de la notocorda, que es en el día diez de desarrollo.

**Fibras Pericromatinianas (FPCs)** Las fibras pericromatinianas se localizan en la región pericromatiniana y están asociadas a los GPC y a los gránulos intercromatinianos. Las fibras pericromatinianas representan la expresión morfológica de la transcripción (Monneron y Bernhard, 1969). Lo anterior se apoya en los cambios que sufren las fibras por efecto de factores que estimulan la transcripción actuando específicamente sobre el RNA recién sintetizado. Fakan y col. (1976) demostraron que las FPC se forman en ciertas regiones periféricas de la cromatina compacta y que algunas de estas fibrillas migran a la región intercromatiniana. Las FPC son marcados con pulsos cortos de uridina tritiada ( $^3\text{H}$ ), lo cual demostró que son la representación ultraestructural de los sitios donde se localiza el RNA recientemente transcrito (Fakan y col., 1984).

**Gránulos intercromatinianos (GIC).** Los gránulos intercromatinianos se han descrito en plantas y animales, son muy abundantes en células de vertebrados, en las cuales se agrupan formando grandes cúmulos; se ha visto que en células de invertebrados son menos abundantes (Jiménez y col., 1989). Los GIC son estructuras polimorfas su diámetro varía entre 20 y 25 nm se distribuyen en el núcleo de manera dispersa o en cúmulos irregulares en el espacio intercromatiniano, pueden estar unidos por pequeñas fibras de 9 a 10 nm que conforman una fina red. Su naturaleza ribonucleoproteica fue establecida por Monneron y Bernhard (1969) debido a que dichos gránulos se contrastan con la tinción preferencial de EDTA para RNPs. Se ha demostrado que los GIC están asociados con RNA intranuclear de tamaño pequeño ricos en uridina (UsnRNA) (Spector, 1983). Por su parte, Puvion y col. (1984) estudiaron por radioautografía la dinámica de los GIC en hepatocitos de rata

pretratados con Actinomicina D. Fakan y col. (1984) proponen que tienen un papel estructural activo en el funcionamiento del núcleo. Se demostró que los GIC no son marcados después de pulsos cortos de uridina tritiada ( $^3\text{H}$ ) y tienen abundantes RNPs pequeñas nucleares (snRNPs) además de factores de splicing no ribonucleoproteicos (Spector, 1993), algunos de estos últimos pertenecen a la familia de proteínas SR. Las proteínas SR representan una familia de factores de splicing que se ha reportado en organismos vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el splicing, como son la definición de los sitios de splicing y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. (Jiménez y col 2007). Haciendo estudios sobre la bioquímica de cúmulos de GIC en células de hígado de ratón, Mintz en 1999 purificó al menos 75 diferentes proteínas, se sabe que son sitios de almacenamiento y ensamblaje de factores de splicing; no obstante este proceso no se lleva a cabo en ellos. Cuando hay transcripción activa, el splicing se realiza en las fibras pericromatinianas (FPCs) las cuales se localizan asociadas a los GIC y fueron marcadas con pulsos de uridina tritiada ( $^3\text{H}$ ) muy cortos, lo cual sugiere que son la representación ultraestructural de los sitios donde se localiza el RNA recientemente transcrito (Fakan, 1994).

Los GIC de plantas se presentan en pequeños cúmulos, los cuales han sido observados con la técnica de contraste para microscopía electrónica que utiliza el oxinitrato de bismuto, además se detectó que son resistentes a la digestión con pronasa y RNAasa I y se comprobó la presencia de fosfoproteínas (Moreno Díaz de la Espina, 1992).

Los GIC en células animales cambian durante el ciclo celular, como lo demostró (Thiry, 1995) al realizar estudios de contraste preferencial para RNPs, con la técnica de tinción de plata amoniaca y utilizando anticuerpos contra de snRNPs, observó que en las células en división los GIC se dispersan, siendo más abundantes durante la interfase. En el cuadro 1 se presenta en forma comparativa las características de los GPC, FPC y los GIC.

**Los Cuerpos de Cajal (CBs)** se encuentran en núcleos de células animales y de plantas, se les llama también cuerpos espiralados, se ubican en la región intercromatiniana y varían en su forma y contenido molecular. Estas estructuras pueden medir de 0.2 hasta 1.5 micrómetros; y son un dominio subnuclear que contiene variados componentes, pueden tener factores de transcripción y procesamiento de RNA, diversas ribonucleoproteínas (RNPs) y los UsnRNA como: U1, U2, U4, U5 y U6 los cuales son necesarios para el proceso de splicing (Gall y col., 1999). Estudiando con sueros autoinmunes que tiñen a los cuerpos espiralados, Raska y col. (1991) encontraron una proteína a la que denominaron P-80 coilina, la cual se consideró específica de dichos cuerpos. Esto permitió usar la P80 coilina como marcador de estos cuerpos en células humanas (Matera, 1999).

Los CBs no contienen RNA, rRNA, ni mRNA (Gall, 2000), pero tienen algunas cinasas, como cinasa A, la CDK7, y la CDK2.



	FPC	GIC	GPC
EDTA	+	+	+
PTA, AO	-	-	-
Sensible a Proteasa + RNasa	+	poco	+
Aumento de transcripción	Aumento	N.D.	Disminución
Disminución de transcripción	Disminución	N.D.	Aumento
Incorporación Ur. 3H T.C.	+	-	+
Inmunolocalización hnRNPs	+	-	+
Inmunolocalización snRNPs	+	+	Escasa
Inmunoloc. 3metil-Guanosina	+	+	Escasa
Hibridación in situ U1, U2	+	+	Escasa

Cuadro 1. Resumen del comportamiento de las partículas ribonucleoproteicas en la dinámica del núcleo interfásico. Cortesía del doctor Vázquez Nin.

En las imágenes de la figura 1a y 1b se muestran los esquemas de los núcleos propuestos por Monneron y Bernhard, 1969 y Spector, 2003, donde se integran todos los componentes intranucleares.

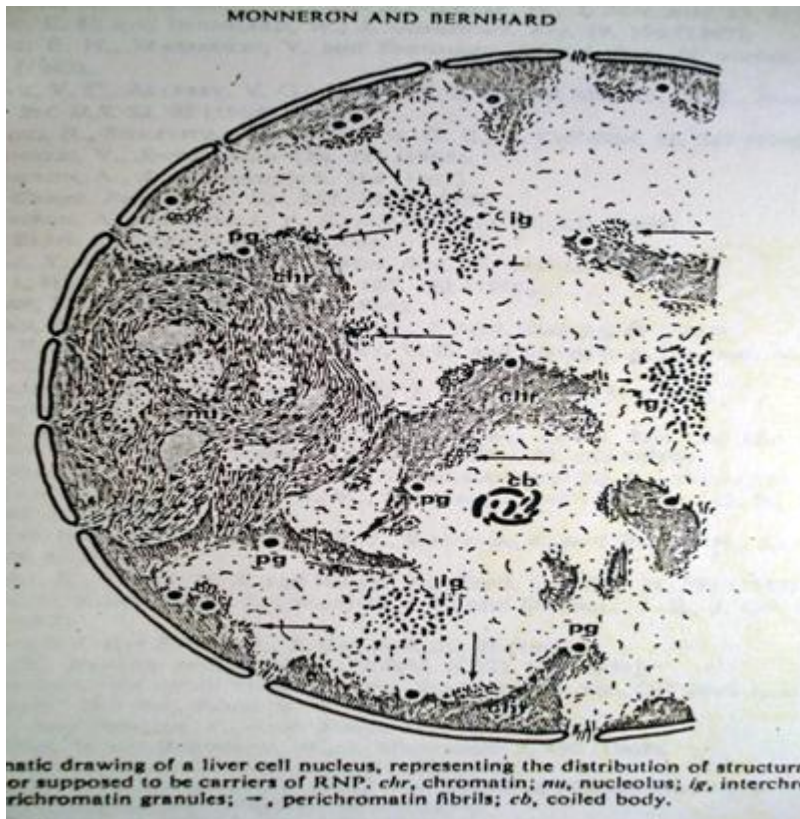


Figura 1a. Monneron y Bernhard. 1969.

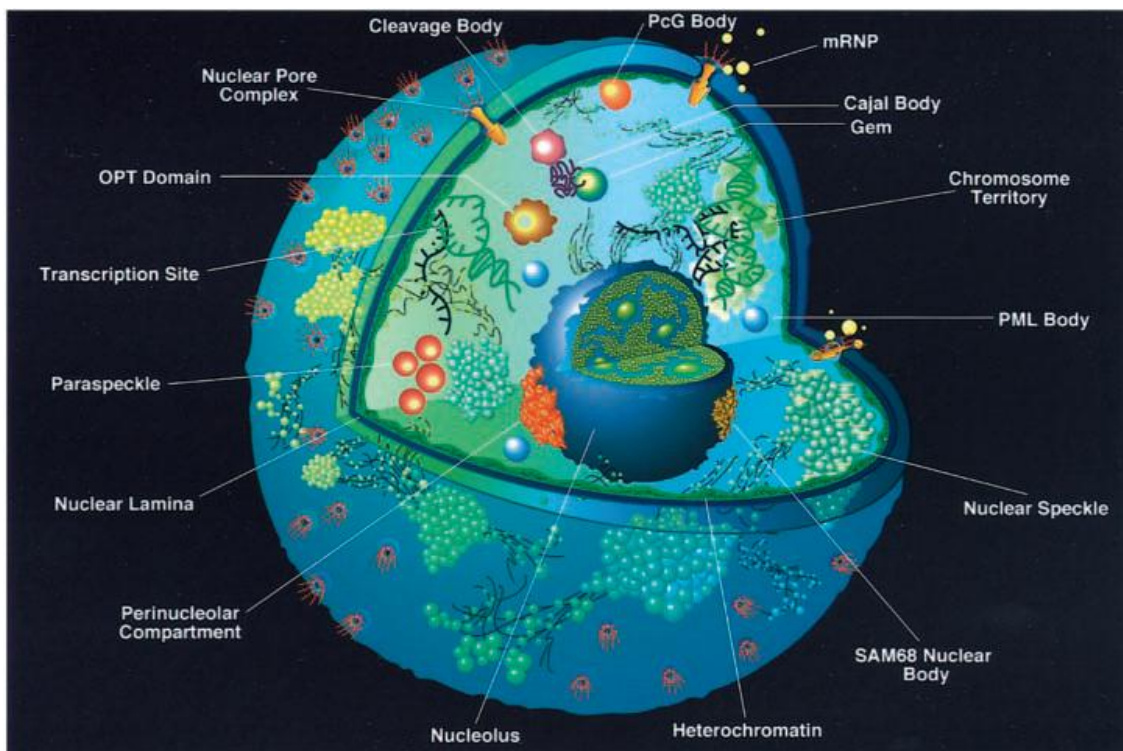


Figura 1b. (Spector, 2003)

## **Transcripción en células eucariontes.**

La transcripción es un proceso en el cual una cadena de DNA, provee la información de secuencias para la síntesis de una cadena de RNA. La síntesis de RNA es un proceso cíclico, que se realiza por la actividad de las enzimas RNA polimerasas y puede ser dividido en tres eventos: la iniciación, la elongación y la terminación; cada uno de ellos, consiste en múltiples procesos individuales durante los cuales se requiere la participación de diferentes proteínas. La iniciación es un proceso en el que la RNA polimerasa y un grupo de proteínas (complejo de preiniciación) localizan donde se empieza el gen a transcribir. El complejo de preiniciación se activa con el promotor; cuando hay cambios conformacionales en el complejo promotor-polimerasa se da lugar a un complejo abierto. Después la RNA polimerasa incorpora bases de nucleótidos que son complementarios al mensaje, enseguida se da la formación del enlace fosfodiéster entre los primeros dos ribonucleótidos complementarios, la polimerasa transloca una base y se repite el evento dando como resultado la elongación de la cadena de RNA, este proceso ocurre en ciclos con cerca de 20 a 30 nucleótidos por segundo. La etapa final de la transcripción es la terminación, que se da cuando la polimerasa recibe una señal de terminación. En el caso de la transcripción del mRNA la RNA polimerasa II sigue transcribiendo uno cientos de nucleótidos más allá del lugar donde el DNA tiene la información de los aminoácidos de la proteína. Para este proceso se requiere la participación de la polimerasa y de diversas proteínas conocidas como factores de transcripción (Karp, 2006).

Las células eucariontes tienen tres distintas enzimas para la transcripción. La RNA polimerasa I sintetiza el RNA ribosómico 28s, 18s y el 5.8s; la RNA

polimerasa III sintetiza varios RNA de bajo peso molecular, el RNA de transferencia y el RNA ribosómico 5s.

La transcripción de los pre-mRNA se realiza por la acción de la enzima RNA polimerasa II, la cual está constituida de doce subunidades diferentes y con la participación de los factores de transcripción y las moléculas promotoras. Marjoelin y col. (1997) estudiaron los factores de transcripción TFIIH, BRG1, E2F1 y el receptor de glucocorticoides en células HeLa y encontraron que no hay una relación entre la distribución espacial de los receptores de glucocorticoides y estos factores.

La caja TATA del DNA es el punto donde se ensambla el complejo de preinicio de la transcripción que contiene los factores de transcripción y la RNA polimerasa II. El primer paso en el ensamble del complejo de preinicio, es la asociación de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), la cual está presente como una subunidad del complejo mayor fracción D. Este factor de transcripción de la polimerasa II (TFIID) completa el ensamble del complejo de preinicio. Por otra parte, se da la interacción de otros factores generales de transcripción (TBP el TFIIA y TFIIIB) que unidos al promotor proveen una base para la multisubunidad de la RNA polimerasa II.

Cuando el complejo RNA polimerasa- TFIIIF se encuentra en posición, dos factores más actúan, el TFIIIE y el TFIIH se unen al complejo y activan a la polimerasa. Una de las nueve subunidades de TFIIH actúa como una proteína cinasa para fosforilar a la polimerasa II y otras dos subunidades funcionan como helicasas del DNA, esto separa las cadenas del DNA de los promotores (Karp, 2006).

La región carboxilo terminal (CTD) de la subunidad más grande de la polimerasa II tiene un heptapéptido formado por tirosina-serina-prolina-treonina-serin-prolina y serina; el cual se repite varias veces y puede fosforilarse en la serinas dos y cinco, cuando la polimerasa II está muy activa (Pollard y Earnshaw, 2002).

En los eucariontes gran parte del mRNA de la célula es producido por un complejo proceso que empieza en el núcleo con la síntesis y el procesamiento del RNA, que en diferentes momentos de las investigaciones se ha denominado RNA precursor, RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) o transcrito primario. Este RNA contiene segmentos que se traducirán (exones) y segmentos no codificantes (intrones); además de secuencias reguladoras en las que se unirán diferentes proteínas.

El hnRNA se une a proteínas a medida que se va sintetizando y se forman los complejos recubiertos de proteínas denominados ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) de 30s y unos 20 nm de diámetro. Además existen otras partículas que pueden ser vistas al microscopio electrónico de transmisión y son las denominadas ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) el tamaño de estas partículas es de unos 25 nm. Hay seis snRNP designadas con la letra U (U1-U6) cada una de ellas contiene una secuencia distinta de cerca de 200 nucleótidos de (snRNA), algunos de éstos también son transcritos por la RNA polimerasa II; hay desde snRNA U1 hasta snRNAU6.

## Splicing

### Procesamiento del mRNA.

El RNA premensajero o transcrito primario sufre un proceso de maduración, en el cual se cortan y empalman largas secuencias de RNA, para eliminar los intrones y formar el mRNA maduro que será transportado al citoplasma; en este proceso una buena parte del transcrito primario es eliminado y en su mayoría degradado en el núcleo.

Los transcritos primarios son procesados en tres diferentes formas son:

- a) En el extremo 5' se añade el grupo trifosfato 7-metilguanosina (Cap).
- b) Poliadenilación en el extremo 3', esto es la adición de la cola del poliA que está formada por secuencias de hasta 200 nucleótidos.
- c) Splicing proceso de eliminación de intrones y la unión de los exones que forman el mRNA maduro.

Para la constitución de la estructura denominada Cap, al extremo 5' del transcrito se añade un nucleótido especial de marca compuesto de una guanosina metilada (7 metil guanosina) unida a trifosfato; esta caperuza se añade cuando se llevan sintetizados de unos 20 a 30 nucleótidos y sirve para que la subunidad pequeña del ribosoma reconozca el mRNA y se una a él durante la síntesis proteica.

En la localización del punto donde debe terminarse la síntesis del mRNA intervienen varias proteínas, entre ellas la CsiF (Factor de estimulación de lectura) y el CPSF (Factor específico de ruptura y poliadenilación). Estas proteínas viajan con la RNA polimerasa II, entre 10 y 30 nucleótidos después de la secuencia AAUAAA en el RNA, cortan el transcrito en donde aparecen las bases CA y antes de las secuencias ricas en G y U o donde se encuentra el

U6snRNA. En el extremo 3' cortado se añade una cadena de unos 200 residuos de adenina, esto sucede por la acción de la enzima polimerasa poli A. Probablemente la cola del poli A participa en estas funciones.

1.- Contribuye a la estabilidad del mRNA en el citoplasma.

2.- Facilita la eficiente traducción del mRNA por los ribosomas (Karp, 2006. Voet y col., 2007).

El splicing es un proceso que consiste en dos reacciones sucesivas de transesterificación, que son dependientes de la hidrólisis de ATP; para ello es necesaria la formación de un gran complejo de ribonucleoproteínas y varios elementos conocido como "spliceosoma". Importantes estudios a nivel ultraestructural permitieron localizar los 6 primeros tipos de UsnRNAs, situados en diferentes compartimientos de los núcleos en interfase; el U3 se localizó en el nucléolo, el U2 se encontró asociado a la cromatina, además el U1, U2, U4, U5, y U6 se observaron unidos a partículas ribonucleoproteicas en el espacio extranucleolar (Spector y col., 1983. Puvion y col., 1984).

En relación a las investigaciones de tipo bioquímico, Lührmann y col. (1990) hicieron un análisis del RNA, las proteínas y las ribonucleoproteínas que constituyen el spliceosoma, por medio de columnas de afinidad revisaron la composición de las proteínas y de los snRNP (U1, U2, U4/U6 y el U5); estudiaron las interacciones RNA-proteínas y las interacciones proteína-proteína e identificaron 30 diferentes proteínas asociadas a la estructura del spliceosoma. Por otra parte Vankan y col. (1992) con ensayos de complementación analizaron el splicing en ovocitos de *Xenopus* y vieron el efecto de las mutaciones en las secuencias del U4/U6 sobre el ensamble del complejo molecular del splicing.

Rosbarh y Seraphin (1996) trabajaron con la RNPsnU1 y comprobaron su participación e importancia en el ensamble del spliceosoma, los experimentos se realizaron con mutantes de levaduras, tanto in vivo como in vitro.

Huang y Spector (1996) estudiaron, en células HeLa transfectadas, la distribución espacial de los RNA recién formados y los factores de splicing snRNA y no-snRNP cuando éstos son reclutados a los sitios de transcripción, demostrando que se requiere la presencia de los intrones.

Para que se realice el splicing son necesarios varios factores, que incluyen diferentes tipos de RNA y proteínas que son:

- 1) Los RNA pequeños nucleares formados de entre 60 y 300 nucleótidos, ricos en residuos de uracilo (UsnRNA). Existen cinco tipos de ellos que son: el U1snRNA, el U2snRNA, el U4snRNA, el U5snRNA y el U6snRNA. El U3snRNA participa en el proceso de maduración del pre-rRNA (el precursor del RNA ribosomal). Estos RNA son transcritos por la RNA polimerasa II salvo el U6snRNA que lo transcribe la RNA polimerasa III.

En el núcleo, los UsnRNAs se asocian con proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs), estos componentes realizan un ciclo de salida al citoplasma para sufrir algunos cambios y regresar después al núcleo y establecer un pasaje de maduración por los Cuerpos de Cajal. Las hnRNPs son proteínas que contienen el llamado RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) se asocian a los intrones del pre-mensajero y son estabilizadoras. Su función radica en asociarse al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias, dadas por el apareamiento de bases.

- 2) Las proteínas SR representan una familia de factores de splicing que se ha reportado en organismos vertebrados, invertebrados y plantas. La



secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina(R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el splicing, como son la definición de los sitios de splicing y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Las proteínas SR varían de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) de tipo I, las que presentan un solo motivo de reconocimiento a RNA (RRM) en el extremo amino terminal y su dominio SR carboxilo terminal y B) de tipo II, las cuales presentan dos motivos de reconocimiento a RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal SR. (Jiménez y col., 2007)

En la figura 2 del texto y que se presenta como figura 1, se ilustra el proceso de splicing. En resumen, el pre-mRNA se forma a partir de un gen segmentado y tiene varios sitios de acción cis o elementos de la misma secuencia, los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitios de splicing 5') e intrón-exón (sitios de splicing 3'). El punto de empalme (branchpoint) es en general una adenina y mantiene una secuencia consenso (en levaduras). Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos y citosinas) llamado región Py. En el primer paso de transesterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de empalme, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de splicing 5', generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con el lado 2' del residuo de adenina en el sitio de empalme. Después ocurre la segunda

reacción de transesterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de splicing 3'. Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de reata o *ariat*, se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) (Jiménez y col., 2007).

La figura 3 muestra como los factores de splicing interaccionan con el pre-mRNA secuencialmente, armando los complejos ribonucleoproteicos transitorios para que ocurran las dos reacciones de transesterificación. Primero se localiza el complejo E que está formado por la unión de U1snRNA de la U1snRNP al sitio de splicing 5', este sitio de reconocimiento está dado por una secuencia complementaria de U1snRNA con el sitio de unión exón-intrón1; segundo la unión del factor U2AF (que posee un dominio SR) con el sitio Py; tercero la participación del complejo de factores SC35, SF2/ ASF, SF1/BBP y el U2snRNP.

Después el complejo E se transforma en el complejo A, cuando el U2 snRNP se une al sitio de empalme. El complejo B1 se estructura cuando se asocia el trímero U4/U5/U6snRNP preensamblado. El U5snRNA se une al sitio de splicing 5' y el U6snRNA se une al U2snRNA. Este complejo forma un "spliceosoma maduro". Luego se ensambla el complejo B2 en donde se libera el U1snRNA, el U5snRNA se mueve del exón hacia el intrón y el U6snRNA se une al sitio de splicing 5'. Este paso se realiza por el apareamiento de 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. Como consecuencia se activa el spliceosoma para realizar la catálisis. La función

del U5snRNA es interactuar con secuencias del exón en el sitio del procesamiento 5' y 3'.

El complejo C1 se estructura cuando se libera el U4snRNA y el U5snRNA se une al exón en el sitio de splicing 3'. En este punto se cataliza la transesterificación, es decir rompe el sitio de splicing 5' y se produce el *lariat*. Al final se arma el complejo C2, que contiene el trímero U2/U5/U6snRNAs que permite el rompimiento del sitio de splicing 3' y se ligan los exones (Jiménez y col., 2007).

### **Splicing alternativo**

La célula eucarionte puede presentar un proceso denominado maduración alternativa del mRNA, en el cual partiendo de un mismo gen se pueden obtener polipéptidos finales diferentes. Una proporción sustancial de los genes de eucariontes superiores generan varias proteínas de esta manera. El splicing alternativo del RNA es la elaboración de diferentes mRNAs para algunos genes que se expresan en distintas células o tejidos y se estima que una proporción sustancial de genes animales (del 40 al 75% en seres humanos) son para la formación de proteínas múltiples (Alberts y col., 2008).

Cuando existen variadas posibilidades de maduración en varias posiciones del transcrito partiendo de un solo gen se pueden generar varias proteínas diferentes. En algunos organismos como *Drosophila* en la cual se han identificado cerca de 14000 genes con regulación genética basada en el splicing alternativo, este mecanismo es muy importante en diversos procesos celulares como: la determinación del sexo, la apoptosis y la orientación axónica, entre otros. Los patrones de exclusión o inclusión del

splicing alternativo determinan el arreglo de las secuencias codificantes de los mRNA maduros de un mismo gen produciendo isoformas proteicas que poseen diferentes características biológicas (Grabowsky y Black, 2001).

El spliceosoma está integrado principalmente por 5 ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) y numerosos componentes proteicos formando los complejos A, B y C. El ensamble del spliceosoma se realiza en secuencias consenso del pre mRNA, aunque no es la única información utilizada para el ensamble. Los patrones de splicing alternativo pueden involucrar la interacción con otras regiones del pre mRNA y factores que afectan la construcción del spliceosoma o pueden interactuar con algún exón en un proceso conocido como definición exónica. La actividad del spliceosoma está regulada por algunas proteínas por ejemplo las proteínas SR que pueden actuar como amplificadores (reguladores positivos), represores o silenciadores (reguladores negativos) sobre exones o intrones del pre mRNA (Black, 2003).

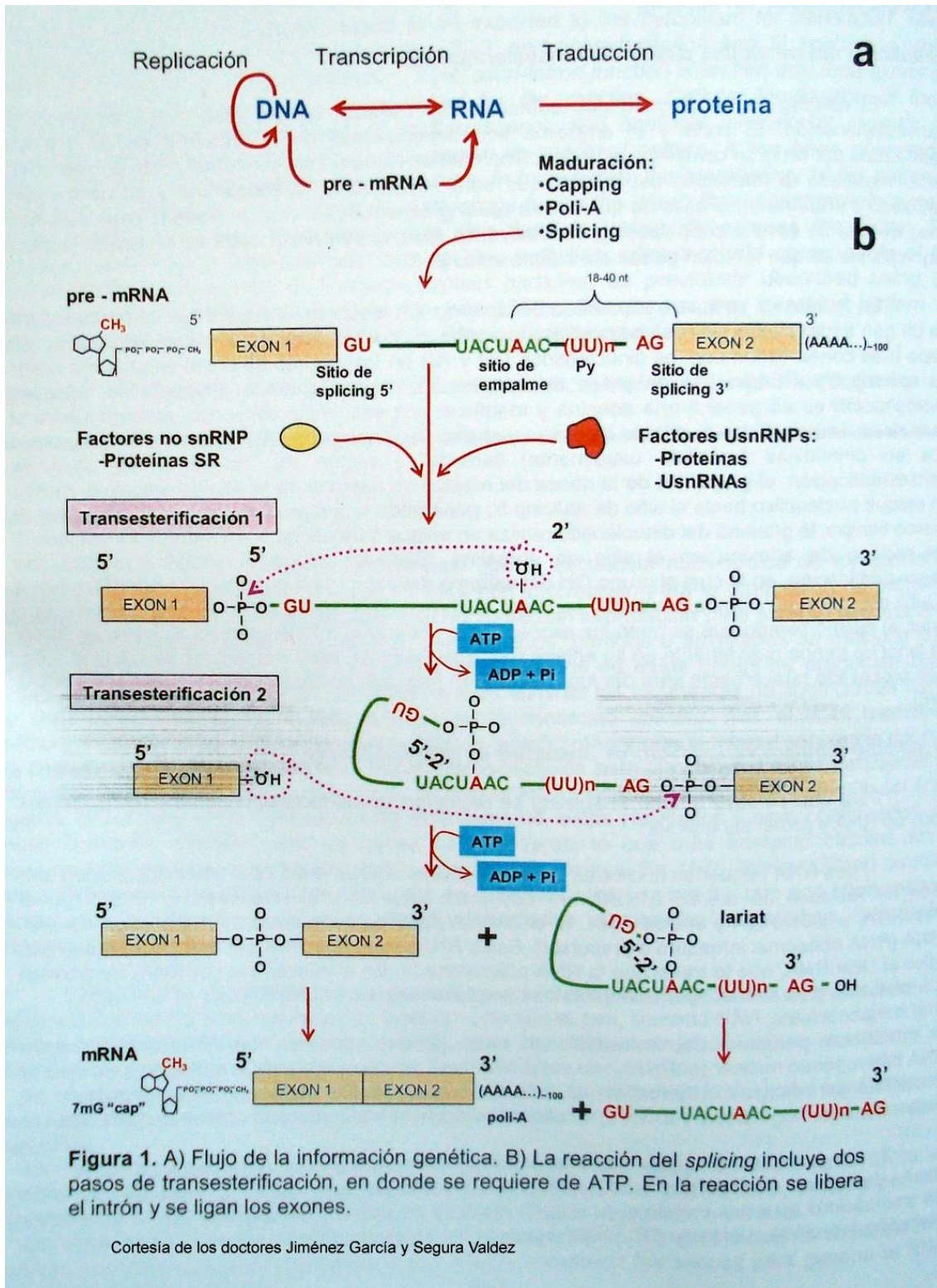
La maduración alternativa es muy frecuente en las moscas y poco frecuente en las células de levadura. Este organismo contiene cerca de 6200 genes y solo 327 son objetos de maduración por corte y empalme (Alberts y col., 2004).

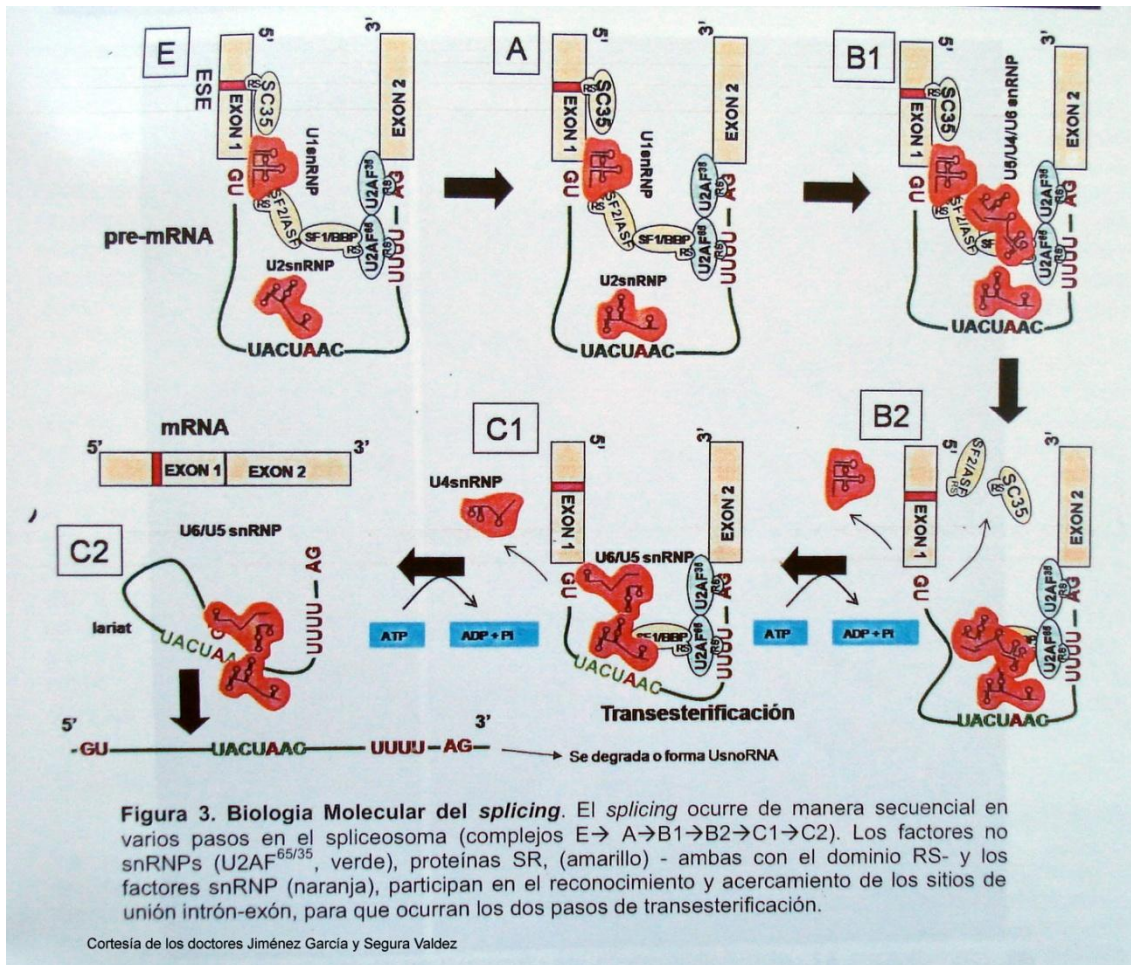
En este escenario molecular se puede presentar la llamada maduración alternativa constitutiva que sucede cuando el spliceosoma que elimina los intrones no distingue entre dos o más apareamientos alternativos, como resultado se producen varias versiones de proteínas codificadas por el gen en todas las células en las que éste se expresa. En la mayoría de los casos

la maduración alternativa está regulada y permite pasar de proteínas no funcionales a proteínas funcionales en la célula (Alberts y col., 2004).

En seres humanos, en el síndrome de cromosoma X frágil el gen 1 de retraso mental se localiza en la banda q27.3 del cromosoma X. Tiene 40 kb y el mRNA codificante es de 3kb; éste a su vez presenta 17 exones y la transcripción está sujeta al proceso de splicing alternativo en los exones 12 y 14 con el exón 15 (Brouwer y col., 2007).

En células de mamíferos creciendo en cultivo, los anticuerpos contra factores de splicing producen imágenes con el microscopio de epifluorescencia con un patrón en forma de manchas embebidas en un ambiente difuso; este patrón se ha denominado patrón moteado (*speckled pattern*) el cual consta de 25 a 50 motas de entre 0.8 a 1.8 micrómetros de tamaño (Spector, 1993, 2003). Si se usan anticuerpos contra factores de splicing también se tiñen los cuerpos de Cajal estructuras ribonucleicas de 0.5 micrómetros de diámetro. Las motas o *speckles* son estructuras amorfas que contienen altas concentraciones de snRNPs y proteínas relacionadas con el splicing (Spector, 1993, 1997, 2003).





## **Modelo de desarrollo y estudio de la dinámica de los componentes nucleares.**

El estudio del núcleo, la organización de la cromatina, las RNPs y los componentes de la maquinaria de splicing, durante el desarrollo embrionario, ha permitido obtener información relacionada a la formación y maduración del RNA; lo anterior se ha implementado mediante el uso de metodologías especiales de microscopía electrónica y microscopía de fluorescencia.

Con el modelo de desarrollo embrionario de pollo se ha trabajado, para evaluar cambios en la arquitectura nuclear, dinámica de la cromatina y de las diferentes RNPs (GPC, FPC y GIC) durante la diferenciación de diversos tejidos (Vázquez Nin y Sotelo, 1966. Jiménez García, 1983. Ortega Rangel, 1986. Zavala Padilla y Vázquez Nin, 1997, 2002).

En el desarrollo del embrión de pollo, al final de la gastrulación, se integra la placa neural, formada por la diferenciación de células ectodérmicas, de la línea media dorsal del embrión. Al inicio del desarrollo del tubo neural, se forman las células matrices descritas por Fujita (1964), las que corresponden a los primeros neuroblastos del embrión de pollo cuando éste se encuentra en la etapa de 22 somitas. Los neuroblastos primitivos son parecidos a las células matrices, pero al avanzar el desarrollo cambian, en ese momento tienen núcleos y nucléolos grandes, la cromatina está dispersa y hay pocos GPC (Fujita, 1963).

Al diferenciarse el neuroblasto tenemos abundante desarrollo de retículo endoplásmico y complejo de Golgi (Fujita, 1963, 1964), además de la formación de neurofibrillas (Vázquez Nin y Sotelo, 1966). Esos procesos se observan en las siguientes etapas de diferenciación:



- a) neuroblastos primitivos parecidos a células matrices
- b) neuroblastos bipolares con una prolongación proximal y una prolongación distal que será el axón
- c) neuroblastos unipolares con la prolongación proximal atrofiada. Los que serán motoneuronas se ven a partir de quinto día del desarrollo.

Los neuroblastos del asta anterior se forman entre el segundo y sexto día del desarrollo, como resultado de la actividad mitótica de la placa basal. Ellos darán lugar a las neuronas motoras de los músculos del ala.

En un estudio sobre la diferenciación de motoneuronas donde se evaluaron células desde el estadio de 33 horas hasta 8 días de desarrollo, se observó que durante la diferenciación inicial morfológica del neuroblasto (estadios 15-19 de la serie HH) las células presentan sus núcleos y nucléolos con sus componentes bien marcados. La cromatina compacta y las ribonucleoproteínas son muy abundantes. En el citoplasma se encuentran bien desarrollados el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, resalta la presencia de mitocondrias y vacuolas. Se observaron cambios en estos organelos celulares conforme avanza la diferenciación del neuroblasto y hay desarrollo del axón y las dendritas (Lyser, 1964).

En este trabajo presentamos los cambios de los GIC durante la diferenciación y maduración de neuroblastos de embrión de pollo, así como la distribución de factores de splicing que no forman parte de partículas RNPs para establecer el patrón moteado “*speckles*” o cúmulos de gránulos intercromatinianos o compartimientos de factores de splicing.

## **Objetivos**

Evaluar la presencia y distribución de gránulos intercromatinianos (GIC) durante la diferenciación y maduración de neuroblastos de embrión de pollo.

Estudiar la distribución de factores de splicing que no forman parte de complejos RNPs, para establecer el patrón moteado “*speckles*”, cúmulos de gránulos intercromatinianos o compartimientos de factores de splicing, durante la diferenciación y maduración de neuroblastos de embrión de pollo.

Correlacionar los hallazgos obtenidos por los estudios de ultraestructura, sobre los GIC con los resultados sobre distribución de factores de splicing.

## **Material y métodos.**

Se trabajó con el modelo de desarrollo neuronal de embrión de pollo de siete edades diferentes: 2, 4, 7, 9, 12, 17 y 21 días, que corresponden a los estadios HH12-13, HH21-22, HH31, HH35, HH38, HH43, y HH46 de la clasificación de Hamilton Hamburger (1952) y que marcan etapas críticas de la diferenciación y maduración neuronal.

Las muestras de tejido se obtuvieron de la mitad ventral de la región cervical de la médula espinal de los embriones de las edades arriba citadas.

Para el estudio de ultraestructura se utilizó microscopía electrónica de transmisión. Se evaluó la distribución de los GIC con una técnica de contraste convencionales de uranio plomo (Ur Pb) y la técnica preferencial para RNP de EDTA (Bernhard, 1969).

**Fijación:** Las muestras de los tejidos fueron fijadas con paraformaldeído al 4 % y glutaraldeído al 2.5 % en PBS y se procesaron para su inclusión en resina epóxica.

En las muestras de los embriones de 2 y 4 días, el fijador primero se goteó sobre el blastodisco mientras a los tejidos se les retiraban los restos de membranas y después se continuó la fijación por inmersión hasta completar dos horas. Las muestras de 7 y 9 días se disecaron estando sumergidos en la solución fijadora, después se les cambió a fijador limpio dejándose en él hasta completar las 2 horas.

Los embriones de 12, 17 y 21 días se perfundieron, por el ventrículo izquierdo; primero pasando cuidadosamente la solución de PBS y después se pasó la

solución fijadora dejándola actuar por 20 minutos y se hizo la disección de la médula colocando los trozos de tejido hasta dos horas más en el fijador.

Al final de la fijación las muestras de tejido fueron lavadas y deshidratadas de acuerdo al siguiente protocolo:

Se hicieron tres lavados con PBS de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente

**Deshidratación:** los tejidos se pasaron en alcoholes de 30, 50, 70, 80, 90 y 96% 15 minutos, luego se procedió a hacer dos cambios de alcohol absoluto durante 20 minutos cada uno a temperatura ambiente.

**Preinclusión:** para permitir la penetración de la resina epóxica, usando un intermediario que sea disolvente de la resina y con bajo punto de ebullición, se hicieron dos cambios de 20 minutos con óxido de propileno, se cambiaron las muestras a una mezcla 2:1 de óxido de propileno y EPON dejando 24 horas. Luego se pasaron a un tubo que contenía una solución de óxido de propileno-EPON en una relación 1:1 por toda la noche. Al final las muestras de tejido se pasaron a moldes planos que contenían EPON puro y se incubaron en estufa a 60 °C por 24 horas para la polimerización de la resina y se procedió al corte.

Los cortes semifinos de 150 nm de espesor se hicieron en ultramicrotomo Leica Ultracut y se tiñeron con azul de toluidina para su observación al microscopio óptico, los cortes ultrafinos de 60 nm de espesor se contrastaron con la técnica convencional de Ur-Pb durante 20 y 10 minutos respectivamente y la técnica de EDTA de Bernhard (1969) ajustada a nuestro modelo, con 3 minutos de acetato de uranilo, 13 a 15 minutos del EDTA y máximo 3 minutos de el plomo (Vázquez Nin y Echeverría Martínez, 2000). Las imágenes se

obtuvieron con el microscopio electrónico Jeol 1010 en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

### **Microscopía Óptica**

Para la evaluación de factores de splicing se desarrollaron ensayos de inmunolocalización fluorescente; los tejidos se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS y se procesaron para obtener cortes de parafina de 4 micrómetros de espesor. Se realizaron técnicas histológicas generales para poner de manifiesto la morfología, como la de Hematoxilina y Eosina e inmunolocalizaciones fluorescentes usando un anticuerpo primario, donado por el Dr. David Spector de Cold Spring Harbor Laboratories, en contra de la proteína 3C5, que pertenece a la familia de las proteínas SR y un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (Sigma Chemical). Las muestras se estudiaron con el microscopio confocal Leica LiteLCS de la Unidad de Investigación Biomédica, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

### **Procesamiento de muestras de tejido para los cortes de parafina.**

Las muestras de tejido obtenidas de los embriones de 2, 4, 7, 9, 12, 17 y 21 días de desarrollo se procesaron en la siguiente forma:

**Fijación.** El tejido fue fijado con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 ½ horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 15 minutos con PBS.

### **Deshidratación**

Los tejidos se pasaron por el tren de deshidratación que contenía alcoholes de concentración creciente: 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 96% durante 30 minutos cada

uno. Dos cambios de etanol absoluto de 30 minutos cada uno, etanol absoluto-xilol durante 30 minutos, xilol solo por 20 minutos.

### **Preinclusión.**

Los tejidos se pasaron por:

Parafina-xilol en proporción 1:1 durante una hora, dos baños de parafina de 1 una hora cada uno. La inclusión se hizo en moldes de plástico. Se procedió a realizar los cortes de 4 micrómetros de espesor en microtomo de parafina; todos los cortes se pusieron en portaobjetos recubiertos con el silano (Sigma-S4651), el cual es un soporte que permite la adhesión de los cortes al vidrio.

Los ensayos de inmunolocalización se realizaron con el siguiente protocolo.

Previo al ensayo a los cortes se le retiró la parafina metiéndolos en la estufa por 10 minutos a 60°C y se les rehidrató en la forma siguiente. Las muestras se pasaron por xilol, alcohol absoluto, alcoholes del 96, 70, 50, 30% y agua desionizada.

Las muestras se hidrataron con amortiguador Tris por 5 minutos, luego se aplicó proteinasa K por 8 minutos, enseguida se hicieron tres lavados con TBST, el cual es un amortiguador salino que se prepara con Tris 1M, NaCl 3M y Tween 20, agua desionizada y ajustado a pH 7.6, de 10 minutos cada uno.

Se bloquearon con suero normal de cabra (*Vectastain blocking serum*) durante 15 minutos.

Se puso el anticuerpo primario contra la proteína 3C5, en contra de proteínas SR diluido con PBS 1:20 un mínimo de 16 horas a 4°C o toda la noche en cámara húmeda.

Las muestras se lavaron en cajas de copling con TBST 3 veces durante 10 minutos.

El anticuerpo secundario anti-mouse IgG FITC (Dako) diluido 1:10 se dejó actuar en los cortes puestos en cámara húmeda de una hora hasta hora y media en oscuridad a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con TBST de 10 minutos cada uno.

Las laminillas fueron teñidas con DAPI diluido 1:10 con TBST y luego se lavaron para finalmente montarlas con medio de montaje (Veko) y selladas con barniz de uñas cosmético de secado rápido.

## **Resultados.**

Se estudiaron con el microscopio electrónico los núcleos de neuroblastos y neuronas en diferentes etapas de maduración de las siete edades seleccionadas para este trabajo, las cuales corresponden a eventos importantes de la diferenciación y maduración de las neuronas motoras. Las imágenes de los núcleos se obtuvieron desde 15 000 hasta 25 000 aumentos. Para evaluar la distribución de los GIC (Gránulos Intercromatinianos) las imágenes se obtuvieron desde 30 000 aumentos hasta 80 000 en algunos casos con el microscopio electrónico Jeol 1010. Es importante hacer notar que conforme avanza el desarrollo embrionario, el volumen nuclear y el tamaño de la médula espinal aumenta, así tenemos que a los dos días de desarrollo el volumen nuclear y el tubo neural son pequeños, la médula espinal a los cuatro días es tres veces más grande que a los dos, para el día doce la médula es treinta veces el tamaño del tubo neural de dos días y cuando el pollo eclosiona del huevo el tamaño es cuarenta veces mayor (Jiménez, 1983).

En los cortes semifinos de embriones de dos días de incubación, se puede observar el tubo neural y el ectodermo superficial. Hacia la luz del tubo se observan células en mitosis (Cajal, 1909-1911) que funcionalmente se comportan como las denominadas células matrices (Fujita, 1963, 1964).

A los dos días de incubación, las células matrices realizan una intensa actividad mitótica, comienza a formarse el retículo endoplásmico rugoso (REr) como signo de inicio de la diferenciación hacia la formación de neuroblasto (Fujita, 1963, 1964).



## **Resultados de microscopía electrónica**

Las observaciones con el microscopio electrónico se centran en los núcleos y las RNPs particularmente los GIC. Los núcleos celulares son voluminosos y están muy cercanos debido a la escasa cantidad de citoplasma que los separa, su aspecto es compacto y presentan gran cantidad de partículas RNP distribuidas en forma irregular que llena una parte del espacio intercromatiniano, los nucléolos son grandes, con sus componentes bien definidos. Al realizar la tinción del EDTA Bernhard (1969) resalta la notable baja frecuencia de gránulos pericromatinianos (GPC). En general en estos núcleos se observan cúmulos discretos de cromatina compacta localizados en la periferia de los mismos y cerca de los nucléolos, en los cuales están muy bien marcados sus componentes. Los GIC son abundantes algunos están dispersos y otros forman cúmulos irregulares orientados hacia el nucléolo. Los GPC son escasos y por el gran número de GIC se infiere que las células están realizando una elevada transcripción. La figura No. 4 muestra las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de las células de la médula cervical en los embriones de dos días de desarrollo que corresponden a los estadios HH11-HH13 de la serie Hamilton y Hamburger (1951).

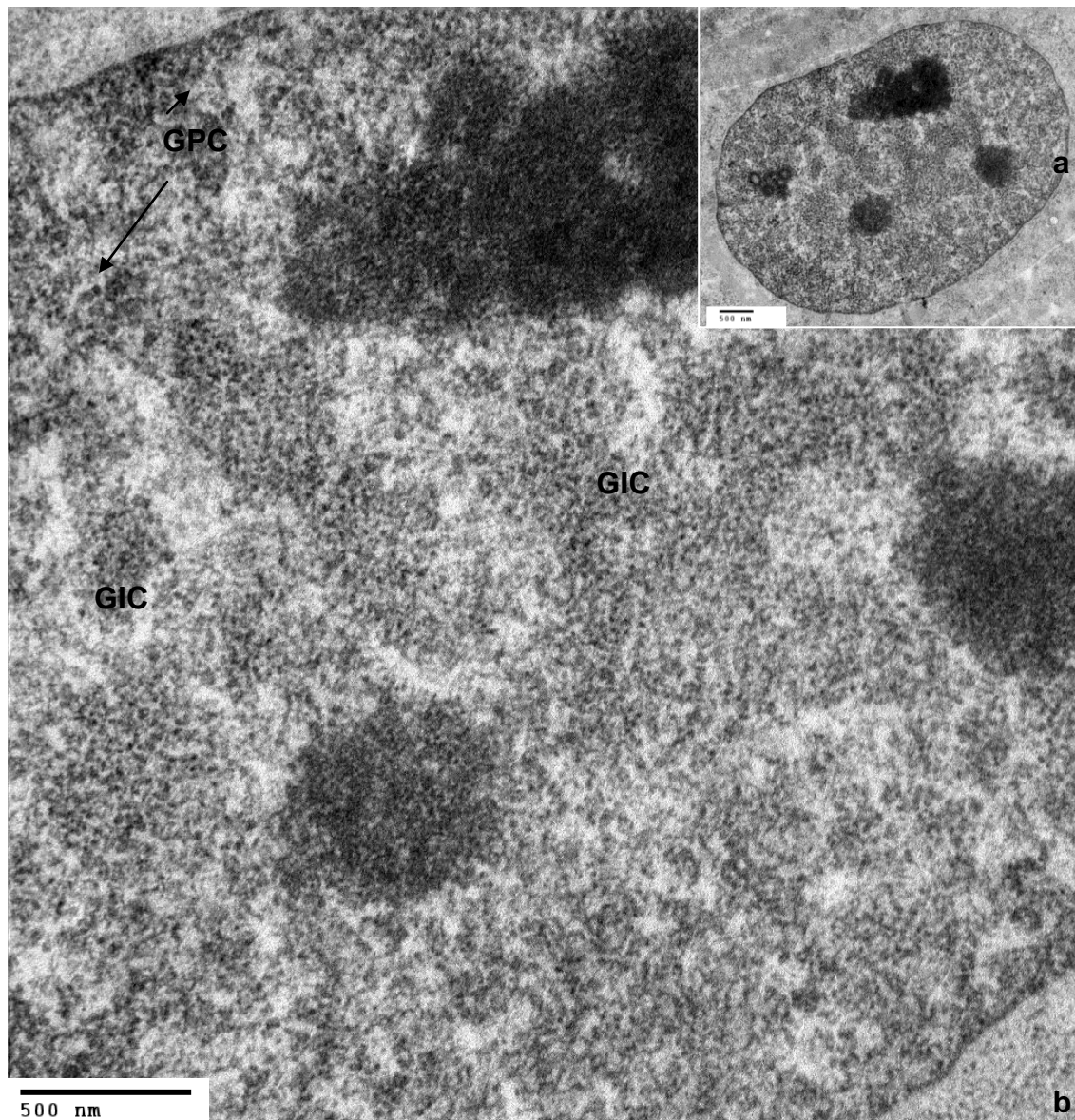


Figura 4. Micrografía electrónica del núcleo (a). Núcleo de neuroblasto de médula de embrión de pollo de 2 días; el cual es grande y ovoide. Los nucléolos presentan muy marcados sus componentes. Las partículas ribonucleoproteicas son abundantes y están formadas por gránulos y fibras distribuidos en todo el nucleoplasma. En el citoplasma se observa retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. Imagen obtenida a 20 000 aumentos. La figura b muestra los gránulos intercromatinianos (GIC) de médula cervical de embrión de pollo de 2 días de incubación, contrastados con EDTA para ribonucleoproteínas. Hay poca frecuencia de gránulos pericromatinianos (GPC). Los gránulos intercromatinianos son abundantes, algunos están dispersos y otros forman grandes cúmulos irregulares en el espacio intercromatiniano entre y alrededor de los nucléolos. La imagen se obtuvo a 50 000 aumentos.

En los embriones de cuatro días de incubación, se ha establecido el programa de la diferenciación del neuroblasto a neurona. La médula cervical muestra la luz endotelial alargada; las células son pequeñas y con citoplasmas claros y los núcleos presentan sus componentes bien delimitados siendo los nucléolos parecidos a la etapa anterior. Hay presencia de células matrices indiferenciadas, neuroblastos bipolares, monopolares y algunos neuroblastos multipolares. La ultraestructura de los núcleos de las células matrices y los neuroblastos bipolares es parecida a la de dos días, al observar los núcleos más periféricos, éstos tienen mayor tamaño; el nucléolo es grande los GPC aumentan. Los GIC son muy abundantes algunos se encuentran dispersos y otros forman cúmulos de forma irregular, lo anterior indica que las células tienen gran necesidad de la maquinaria de splicing. En la Figura No. 5 se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de núcleos de neuroblastos en distintas etapas de diferenciación, que forman parte de la médula en embriones de 4 días de desarrollo, que corresponden a los estadios HH20-HH22 de la serie Hamilton y Hamburger 1951.

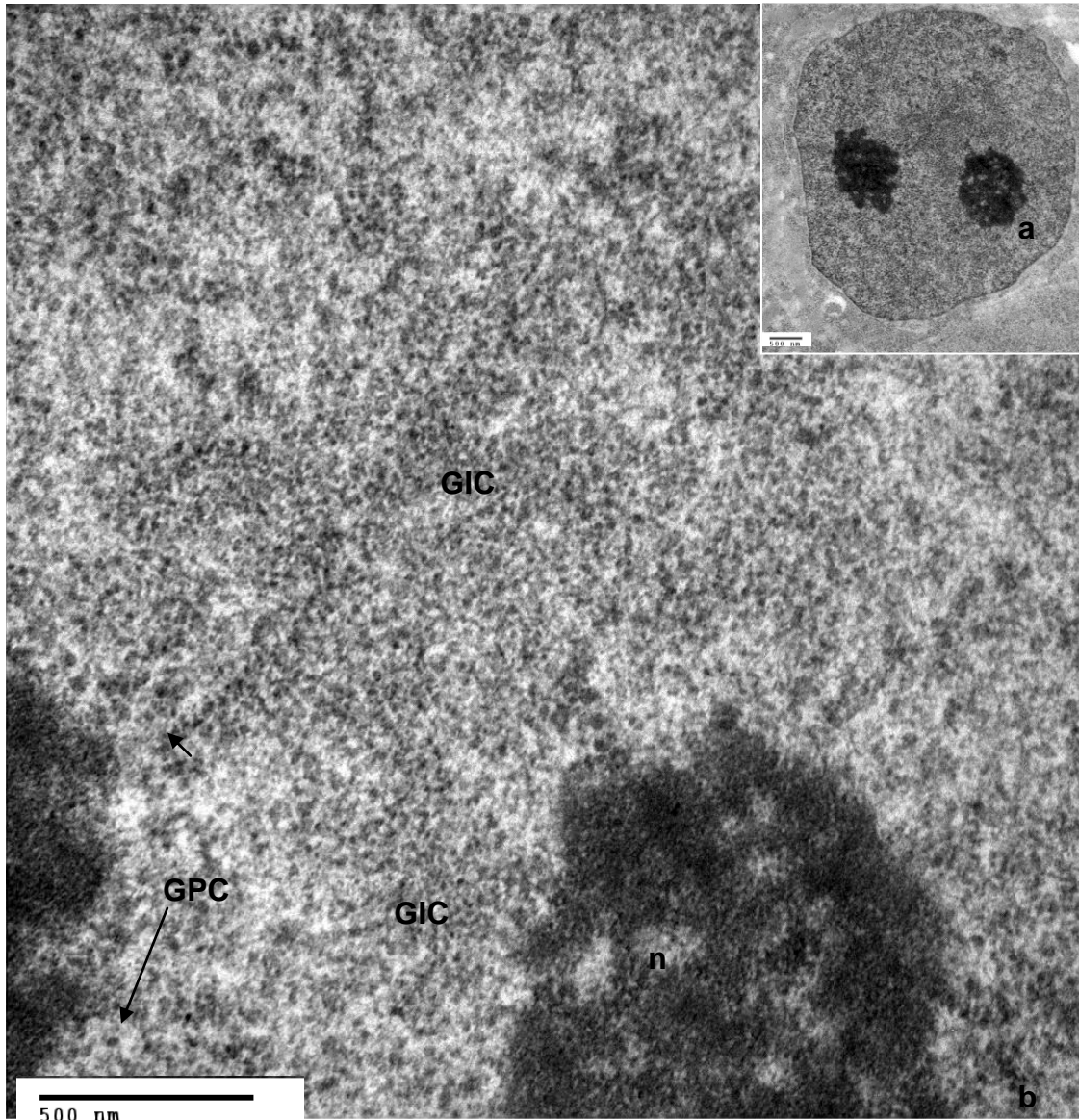


Figura 5. Micrografía electrónica de núcleo (a) obtenida a 20 000 aumentos de neuroblasto multipolar de médula cervical de embrión de pollo de 4 días de incubación. Los núcleos son grandes y ovoides. Ocupan gran parte del volumen celular. Los dos nucléolos están bien definidos en sus componentes en el espacio intercromatiniano. Las partículas ribonucleoproteicas formadas por gránulos y fibras son muy abundantes y se encuentran distribuidas en todo el nucleoplasma. En el citoplasma se observa retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. La figura b muestra los gránulos intercromatinianos (GIC) contrastados con EDTA formando grandes cúmulos irregulares. En el nucleoplasma es notoria la presencia de partículas ribonucleoproteicas, aumentan los GPC y hay predominio de fibras pericromatinianas. Imagen obtenida a 40 000 aumentos.

En los embriones de siete días de incubación, las células ya han establecido contactos especializados (sinapsis) como resultado de la diferenciación del neuroblasto, los primeros contactos axodendríticos se forman antes del día seis y luego aparecen las sinapsis axosomáticas, el día siete se establecen movimientos reflejos cutáneos (Oppenheim, 1975). Las células presentan núcleos ovoides un poco mayores a los de cuatro días, el nucléolo aumenta su tamaño. La distribución de las partículas ribonucleoproteicas cambia; las fibras pericromatinianas son más abundantes y se distribuyen en el nucleoplasma, hay algunas regiones que contienen cromatina compacta. Los GPC incrementan su número; mientras que los GIC son todavía abundantes, pero menos numerosos que en la edad anterior, algunos forman cúmulos pequeños y medianos mientras que muchos están dispersos en el nucleoplasma. La Figura No. 6 muestra las imágenes de los núcleos de neuronas inmaduras y los GIC de la médula cervical de embriones de 7 días de desarrollo estadio HH31 observados con el microscopio electrónico.

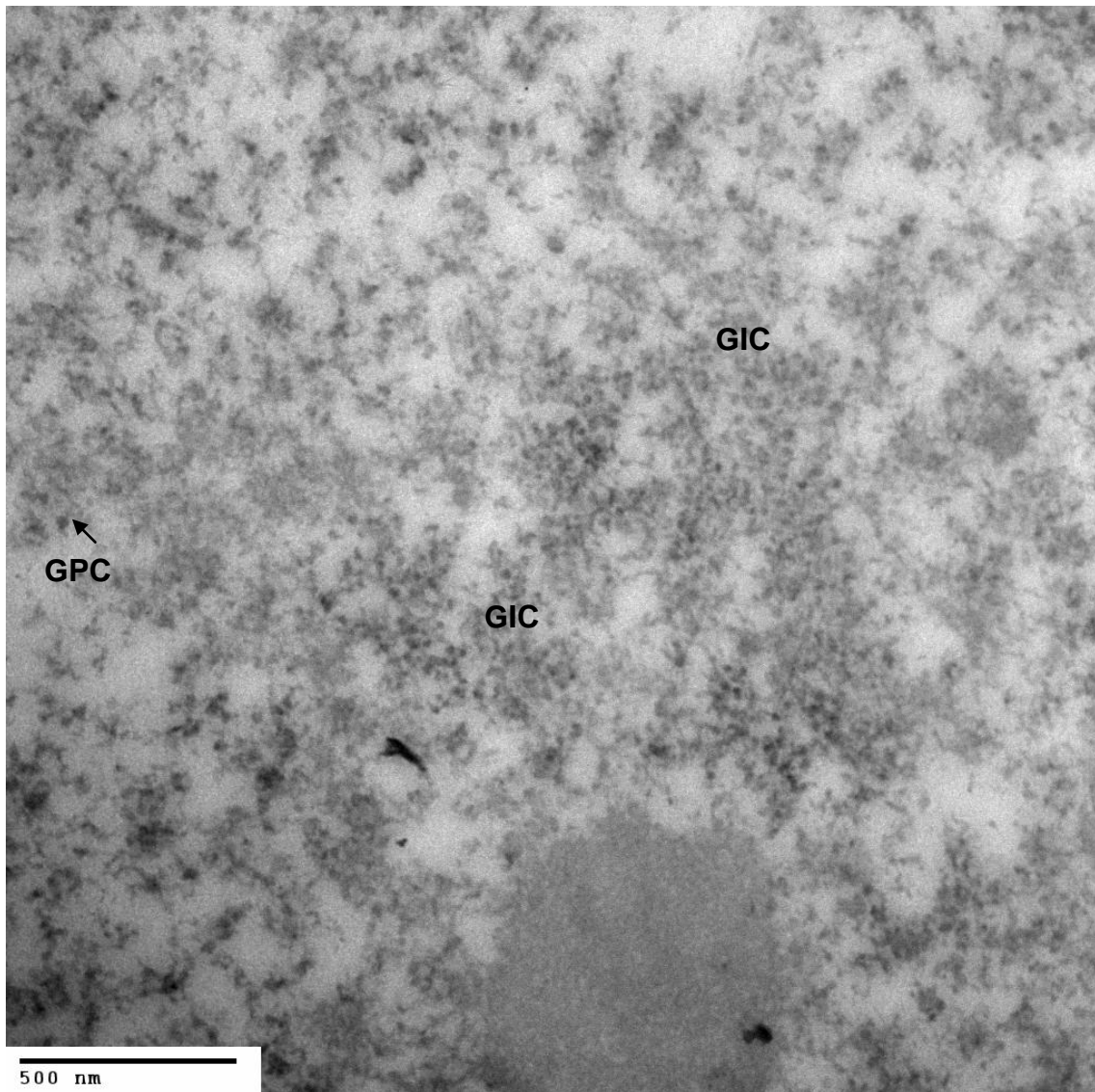


Figura 6. Micrografía electrónica de neuronas inmaduras de médula cervical de embrión de polio de 7 días de incubación, contrastados con EDTA. En el espacio intercromatiniano se observa los GPC. Los gránulos intercromatinianos son todavía abundantes, pero menos prominentes que la edad anterior, algunos forman pequeños o medianos cúmulos y otros están dispersos en el nucleoplasma. Imagen obtenida a 50 000 aumentos

A los nueve días de desarrollo, los embriones muestran una médula espinal con cambios importantes, el epéndimo se ha reducido y es casi circular las neuronas de las astas anteriores son más grandes y presentan nucléolos pequeños en relación al tamaño del núcleo. En esta etapa se distinguen células pequeñas con citoplasma escaso cuyos núcleos condensados corresponden a las primeras células de la neuroglía; en ese momento ya no hay producción de neuroblastos (Fujita, 1963, 1964). Las neuronas motoras han completado la sinaptogénesis estableciendo contacto con sus tejidos efectores y están en vías de maduración (Fujita, 1963, 1964); (Vázquez Nin y col., 1980, 1983). Los cambios ultraestructurales son más acentuados, los núcleos son más voluminosos, los nucléolos se ven extendidos, la distribución de las ribonucleoproteínas cambia, mientras que los GPC son mucho más numerosos, lo cual concuerda con los hallazgos de Ortega, R (1986). Quien trabajo con el mismo modelo experimental. Las fibras pericromatinianas están dispersas en el nucleoplasma y la cromatina condensada ha disminuido predominando la cromatina laxa. En nuestro estudio encontramos una disminución de los gránulos intercromatinianos con respecto a la edad anterior y cuando hay cúmulos, éstos son pequeños. En la Figura No. 7 se muestran imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de núcleos y GIC en neuronas inmaduras de embriones de 9 días de desarrollo, estadio HH-35.

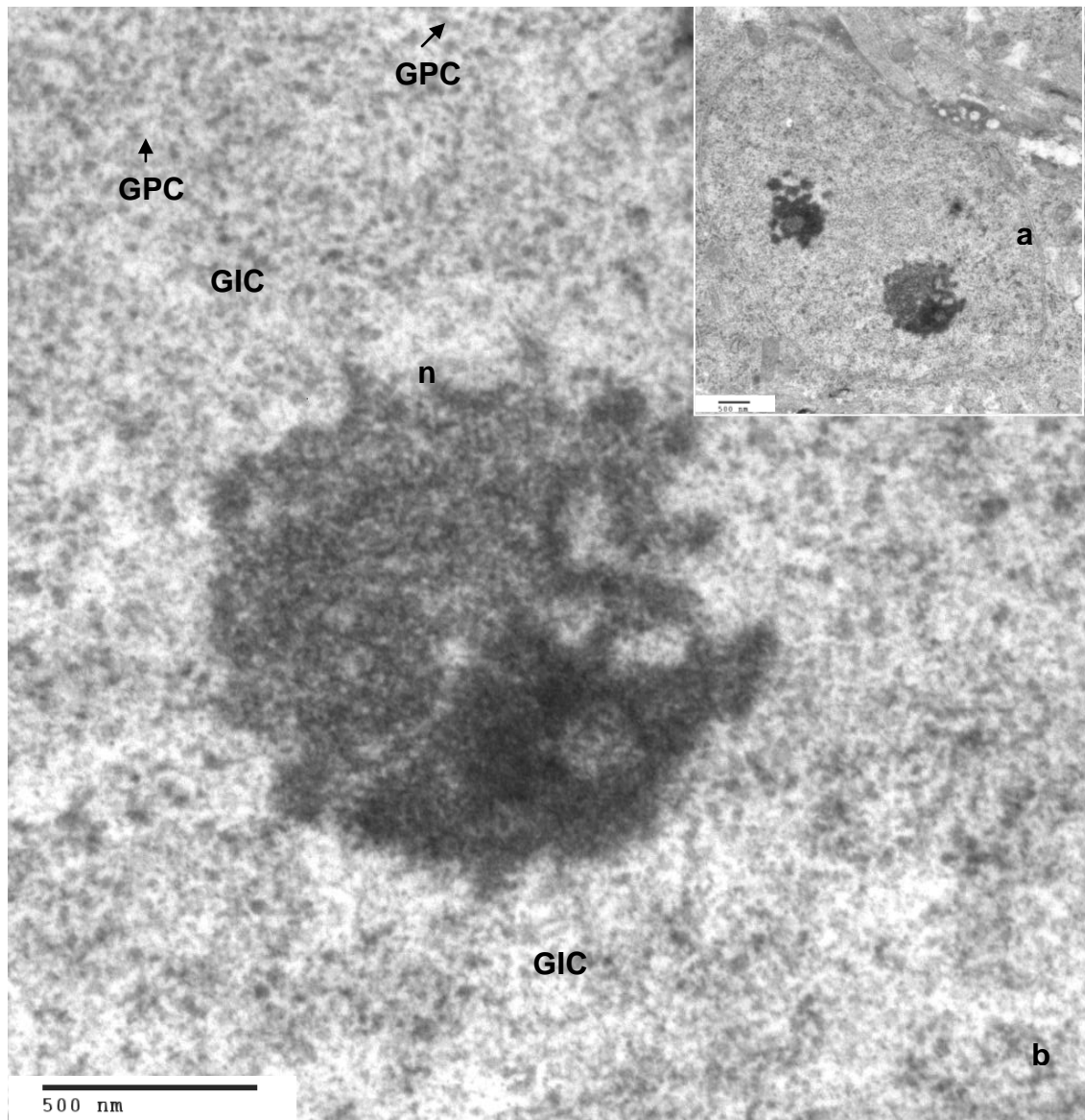


Figura 7. Micrografía electrónica de núcleo de embrión de pollo de 9 días de desarrollo. Motoneurona (a) cuyo cuerpo celular es notorio. El núcleo es grande y ovoide. Los nucléolos distribuidos en la parte central del espacio intercromatiniano con sus componentes bien marcados. Hay menos retículo endoplásmico rugoso y ribosomas en el citoplasma y algunas vacuolas. Imagen obtenida a 15 000 aumentos. En la figura 7b observamos numerosos GPC y algunas áreas claras sin partículas ribonucleoproteicas que corresponderían a cromatina. Los GIC de neuronas inmaduras son menos abundantes, contrastados con EDTA. La distribución de ribonucleoproteínas cambia. Los gránulos pericromatinianos (GPC) son más abundantes y tenemos una disminución de los gránulos intercromatinianos, cuando hay cúmulos, éstos son discretos. Imagen obtenida a 40 000 aumentos.



En los embriones de doce días de desarrollo, la médula cervical presenta un mayor desarrollo. Hay mayor crecimiento de los axones y las dendritas, un mayor número de células gliales y se observan pequeños vasos sanguíneos.

Las neuronas del asta anterior se preparan para iniciar la mielinización, una vez que ha habido un proceso de degeneración masiva celular. Las observaciones ultraestructurales muestran neuronas voluminosas con núcleos grandes, hay mayor espacio entre las células debido al crecimiento de axones y dendritas. Los GPC y las fibras pericromatinianas aumentan ligeramente; su distribución presenta un patrón semejante a lo observado a los nueve días de incubación. Los GIC disminuyen, no forman cúmulos y están escasamente dispersos en el espacio intercromatiniano. Es importante hacer notar que en esta etapa se pueden encontrar en la médula espinal en células nerviosas el proceso de apoptosis, el cual forma parte del proceso natural del desarrollo. La Figura 8 muestra imágenes del microscopio electrónico de núcleos (8a) y GIC (8b) de neuronas inmaduras en embriones de 12 días de desarrollo, estadio HH38.

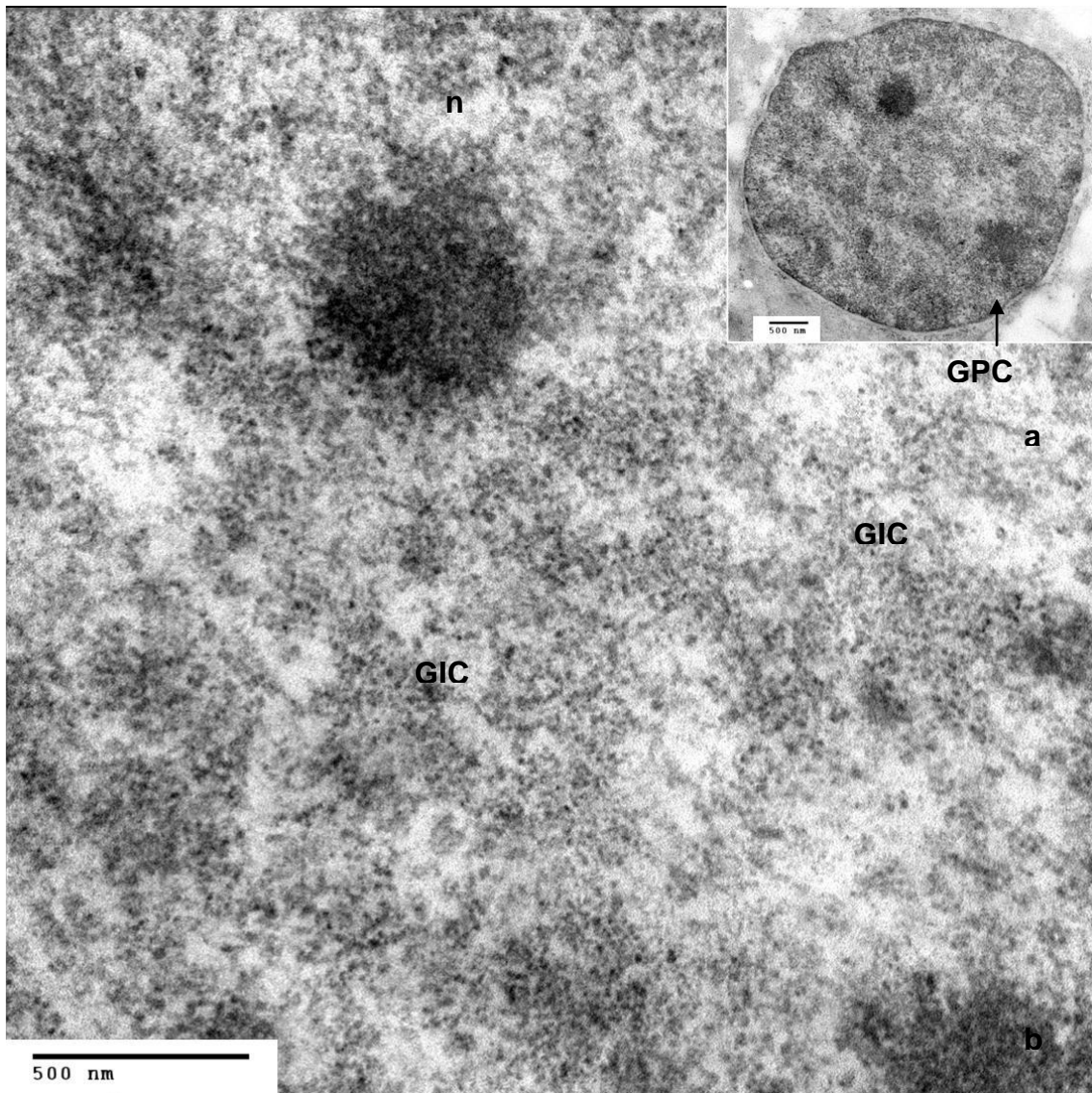


Figura 8 a. Microscopía electrónica del núcleo de una neurona del asta anterior de embriones de 12 días de desarrollo contrastados con EDTA. Las neuronas van a iniciar la mielinización y tanto el núcleo y el nucléolo son más grandes, éste último es compacto. Las partículas ribonucleoproteicas están distribuidas en todo el nucleoplasma, el cual contiene zonas claras que corresponderían a cromatina. El citoplasma contiene algunas vacuolas. Imagen obtenida a 20 000 aumentos. En la figura 8 b se muestra en el espacio intercromatiniano marcadas zonas claras que corresponderían a cromatina laxa. Los GPC aumentan y los GIC disminuyen, formando cúmulos discretos dispersos en el espacio intercromatiniano. Imagen obtenida a 40 000 aumentos.

El proceso de mielinización, el cual inicia desde el día catorce de desarrollo, se incrementa en forma importante hasta el día veintiuno para completar la maduración de las motoneuronas (Oppenheim, 1975). Lo anterior se refleja en el desarrollo de la médula, ya que en los embriones de diecisiete días de incubación las neuronas presentan mayor crecimiento del axón y tienen más dendritas. Además, hay más células gliales. A nivel ultraestructural lo anterior se ve reflejado en que los núcleos de las neuronas incrementan su tamaño, se presenta un aumento del número de los GPC y es muy notorio nuevamente el incremento de los GIC con respecto a los núcleos de doce días.

Al día veintiuno se completa el desarrollo del pollo y éste sale del cascarón, la médula cervical tiene el patrón general de organización de animales adultos. En las astas anteriores, los núcleos de las neuronas motoras presentan incremento del volumen nuclear y nucleolar, hay descompactación de la cromatina y hay más partículas de GPC durante el desarrollo (Jiménez, 1983 y Ortega, 1986). En nuestra evaluación detectamos un incremento del tamaño de los cúmulos de GIC con respecto a los de diecisiete días, otros están dispersos en el espacio intercromatiniano. La Figura No. 9 muestra las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de los núcleos y GIC de neuronas motoras maduras que han completado su desarrollo en el huevo a los 21 días de incubación (HH46) y que corresponden al final de estadios de la serie Hamilton y Hamburger.

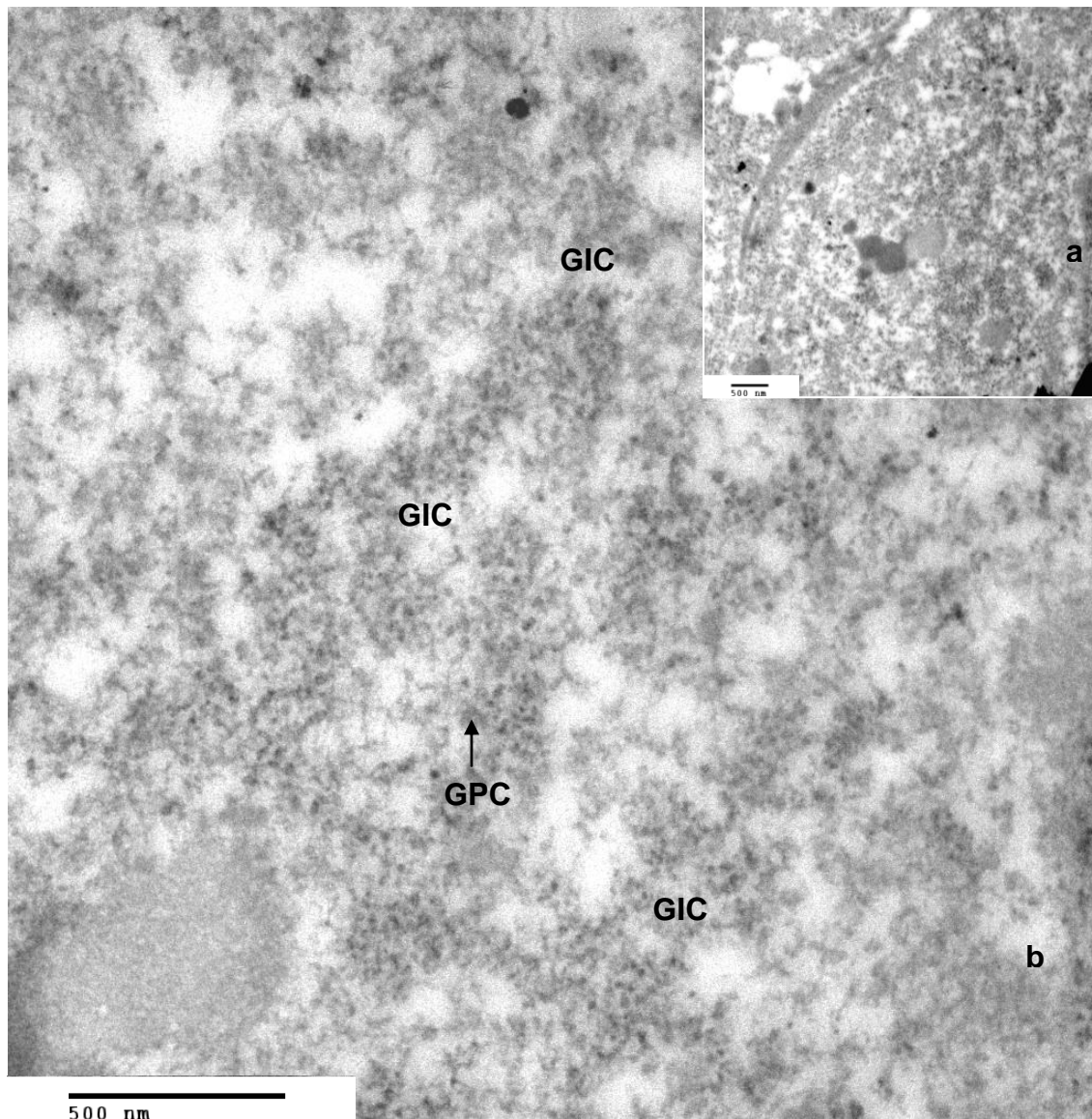


Figura 9 a. Micrografía electrónica de neuronas del asta anterior en médula cervical en pollos de 21 días de incubación antes de la eclosión contrastados con EDTA. El núcleo de la motoneurona es grande y presenta zonas claras en el nucleoplasma. Las partículas ribonucleoproteicas son abundantes, los gránulos y las fibras se encuentran distribuidos en el nucleoplasma. En el citoplasma hay presencia de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. Imagen obtenida a 15 000 aumentos. En la figura 9 b se observa un mayor número de GPC y también hay un incremento de los GIC formando cúmulos irregulares. Imagen obtenida a 40 000 aumentos.

En el cuadro 2 se resume de manera comparativa la variación que presentan los GIC que se agrupan formando un típico cúmulo como los describe Spector (2003).

<b>Edad en días de desarrollo</b>	<b>Estadíos de la serie Hamilton-Hamburger 1951</b>	<b>Presencia de cúmulos irregulares y densidad de gránulos intercromatinianos</b>
2	HH12-14	++++
4	HH20-22	++++
7	HH31	+++
9	HH35	+++
12	HH38	++
17	HH43	+++
21	HH46	+++

Cuadro 2. El cuadro resume la variación que presentan los cúmulos irregulares de gránulos intercromatinianos. En los días 2 y 4 de desarrollo los cúmulos se observan grandes y con una alta densidad de GIC. Para la edad de 7 y 9 días el tamaño de los cúmulos es menor y la densidad de GIC también. Es en el día 12 de desarrollo cuando los cúmulos, si los hay, son pequeños y con baja densidad de GIC. En el día 17 se tiene una mayor presencia de cúmulos y con una mayor densidad. Para el día 21 se incrementa la densidad de los GIC.

## **Resultados de microscopía de fluorescencia y confocal.**

Para los ensayos de inmunolocalización, realizados en cortes de parafina con el anticuerpo contra la proteína 3C5 dirigido a proteínas SR, se trabajaron las mismas edades de los embriones seleccionados para los estudios de ultraestructura. Se estudió la distribución de los factores de splicing en el modelo de diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo; tomando como antecedente que en los núcleos de mamíferos se ha visto que los factores de splicing se concentran en cerca de cincuenta compartimientos nucleares conocidos como motas (speckles) o compartimientos de factores de splicing los cuales tienen su correspondencia ultraestructural con los GIC (Spector 1993).

La figura 10 presenta cortes de microscopía de campo claro, y de fluorescencia de la zona de estudio mediante ensayos de inmunomarcaje. En este caso la médula cervical y a mayor aumento la zona de las astas anteriores.

A los dos días de incubación en corte transversal de la médula cervical del embrión de pollo la capa de células endimarias y alrededor las células matrices y neuroblastos iniciando la diferenciación. Los núcleos presentan el típico patrón moteado muy abundante que forma a veces conjuntos de motas. En la médula de cuatro días hay células matrices y diferentes neuroblastos bi, mono y multipolares. En los núcleos de todos estos neuroblastos la marca es muy abundante. En las células de embriones de pollo de siete y nueve días de desarrollo, ya hay neuronas inmaduras, se tiene un patrón moteado formando puntitos discretos.

En los núcleos de las células del día doce, el patrón moteado es más discreto y en los núcleos del día diecisiete se presenta una marca más aparente. Al final del desarrollo en la médula espinal del día veintiuno, los núcleos presentan un patrón moteado típico que refleja una alta actividad transcripción y de splicing.

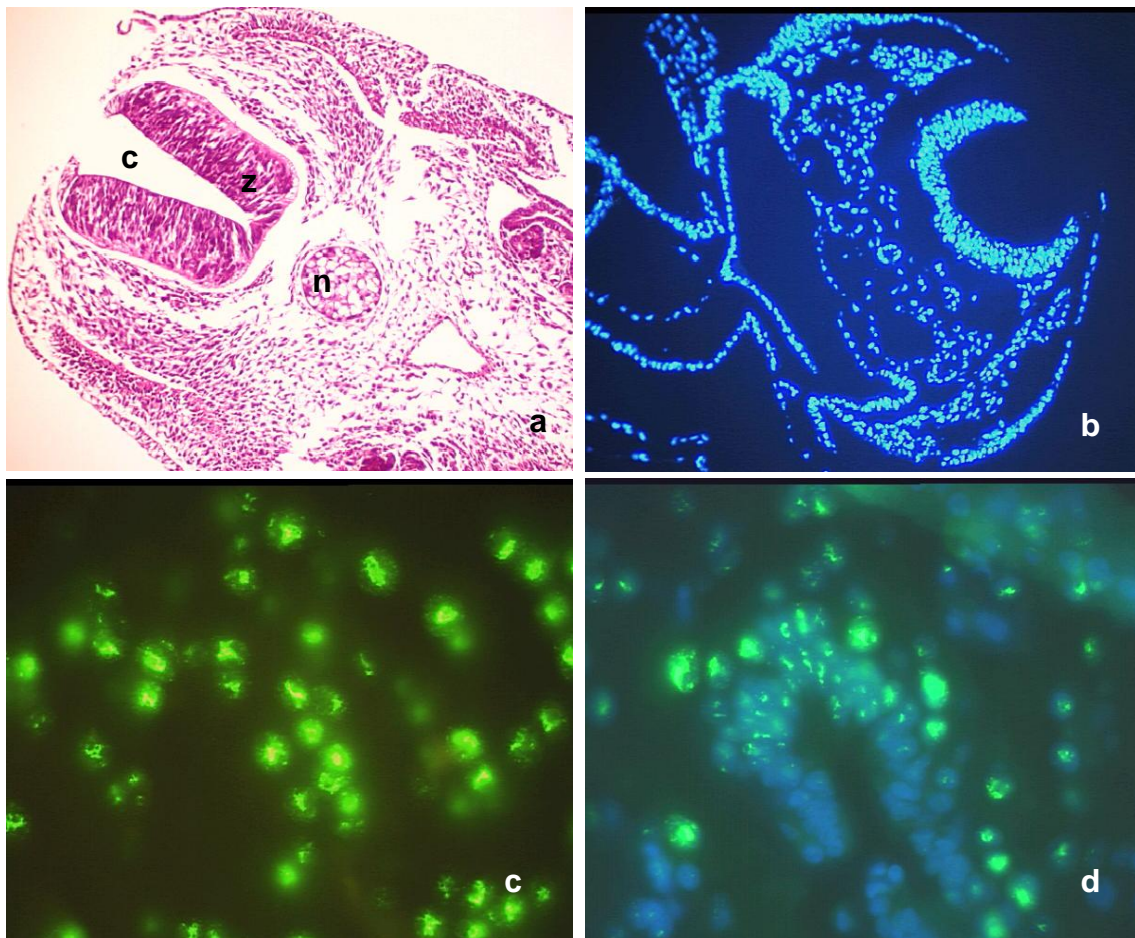


Figura 10. Corte transversal de la médula cervical del embrión de pollo de dos días de desarrollo en a: Tinción de hematoxilina-eosina de la médula donde c es el canal ependimario, n la notocorda y z es la zona de estudio para los ensayos de inmunomarcaje. En la imagen b se presenta una tinción de núcleos cercanos a dos días con DAPI donde se observa lo que será el tubo neural. Ambas imágenes fueron obtenidas a 20X. La imagen c muestra un inmunomarcaje con el anticuerpo contra la proteína 3C5 en células neuronales



de 21 días. La imagen d evidencia un doble inmunomarcaje para DAPI y fluoresceína. Las imágenes c y d se obtuvieron a 100x

La Figura 11 muestra imágenes de los ensayos de inmunomarcaje con el anticuerpo que reconoce a la proteína 3C5 obtenidas con el microscopio de epifluorescencia donde se observa el patrón moteado irregular de las células de médula cervical en diferentes edades del embrión de pollo.

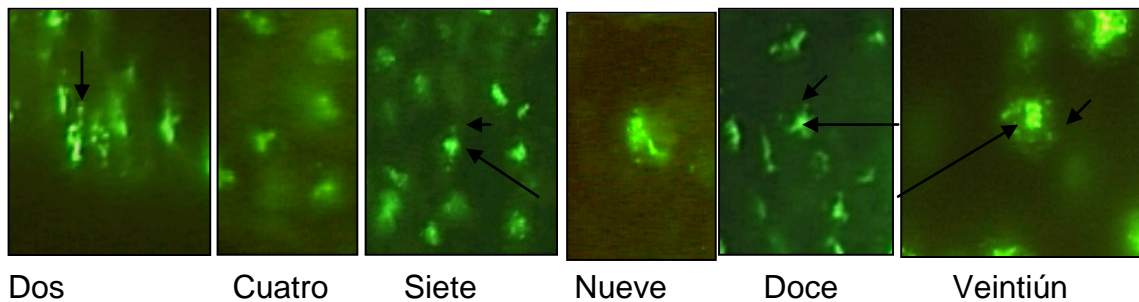


Figura 11. Resultados de los ensayos de inmunomarcaje realizados con el anticuerpo 3C5 en cortes transversales de la médula cervical, de las diferentes edades estudiadas. Se aprecia un patrón moteado irregular -que incluye motas pequeñas (flechas chicas) y grandes (flechas grandes) inmersas en una tinción difusa. Representan la variada distribución de factores de splicing y la presencia de maquinaria de maduración activa. Imágenes obtenidas con microscopio de epifluorescencia a 100X.

La figura 12 muestra imágenes de bajo (a) o alto aumento (b) obtenidas con el microscopio confocal en las que se aprecia el patrón moteado producido por la distribución del factor de splicing 3C5 en células del asta anterior de la médula cervical de embrión de pollo de siete días de incubación, estadio HH31. Esta imagen representa la zona de estudio de los ensayos de inmunomarcaje, para las diferentes edades y de las cuales se hicieron los cortes ópticos de 100 nm.

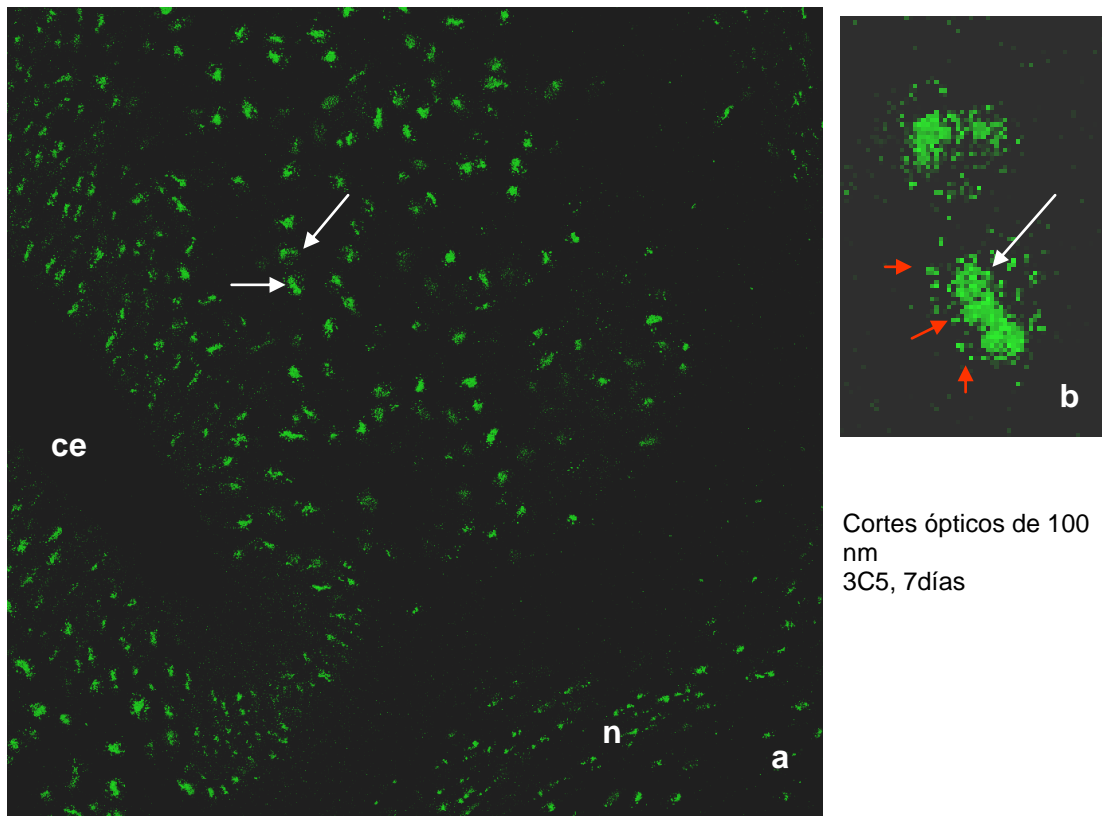


Figura 12 a. Imagen de microscopia confocal obtenida a 60X, representativa de la zona de estudio de la médula cervical espinal del embrión de pollo. Se observa el canal endimario (ce), parte de la notocorda (n). En el asta anterior donde indican las flechas vemos los núcleo marcados que se presentan a mayor aumento para hacer evidente el patrón moteado irregular producido por la distribución de los factores de splicing en cada uno de los núcleos. En la figura 12b observamos dos de esos núcleos a 100X; las motas alargadas e

irregulares, indican una gran actividad de splicing. Estas imágenes son del estadio HH31 correspondiente a siete días de incubación.

La Figura 13 muestra las imágenes obtenidas a 100X de los cortes ópticos de neuroblastos de la médula cervical espinal del embrión de pollo de las edades de dos y cuatro días de desarrollo. En estas edades, los neuroblastos que han iniciado el programa de diferenciación celular presentan una alta actividad de transcripción y con ello gran necesidad de la utilización de la maquinaria de splicing.

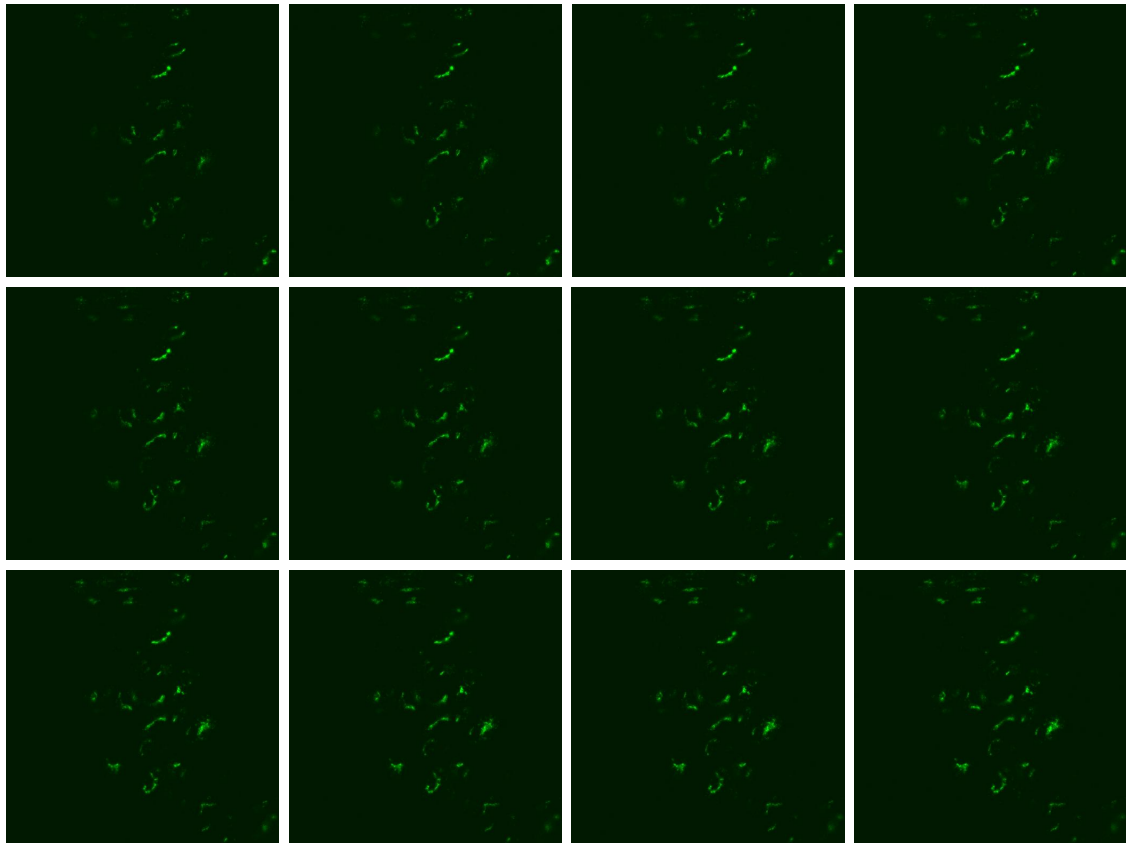


Figura 13 a. 2 días

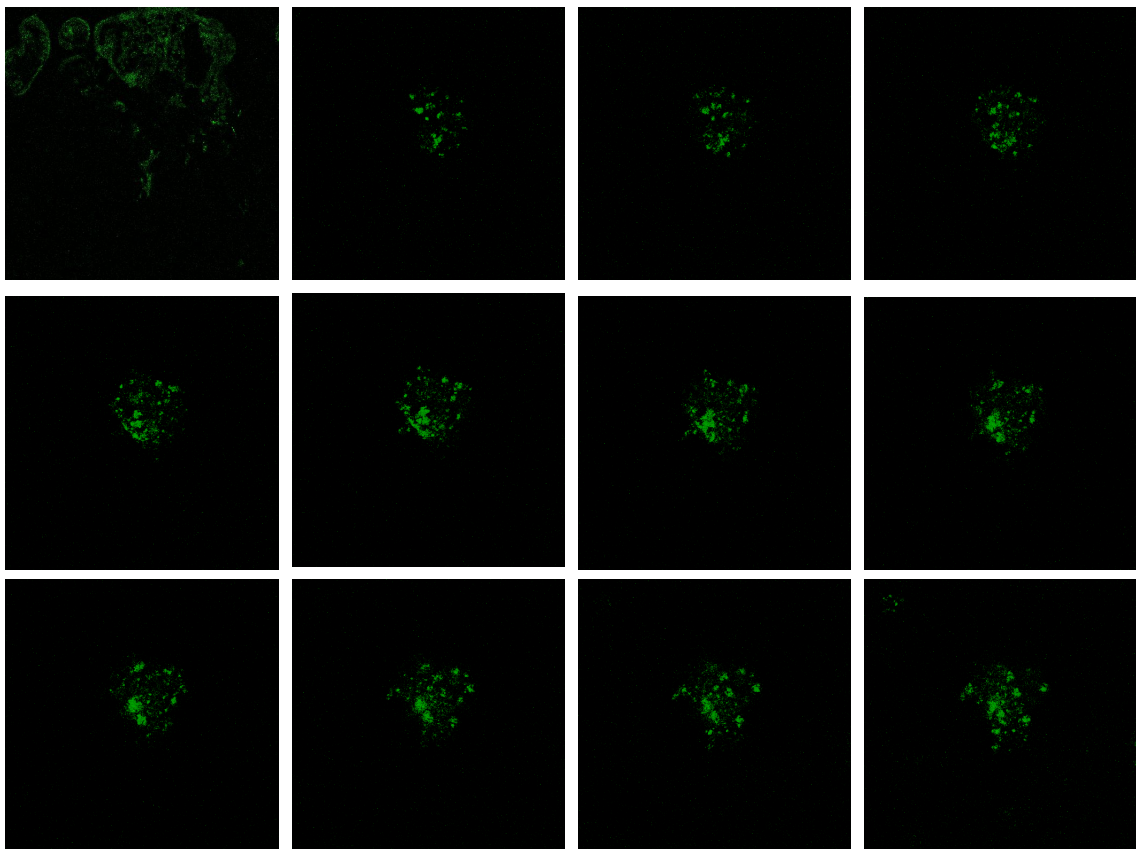


Figura 13 b. 4 días

Figura 13. En la imagen (a) de microscopía confocal obtenida a 100X se observan cortes ópticos del patrón moteado irregular producido por la distribución de factores de splicing, evaluado con el anticuerpo 3C5. Las motas corresponden a embriones de estadio HH12-14. EL patrón moteado se presenta en cada uno de los cortes ópticos. En la figura (b) se nota en los cortes ópticos la variación de la maquinaria de splicing, al hacer el seguimiento en las motas de embriones de los estadios HH18-20. El patrón moteado se presenta en cada uno de los cortes ópticos.

La Figura 14 muestra las imágenes de los cortes ópticos obtenidas a 100X de la médula espinal cervical del embrión de pollo de las edades de siete y nueve días de desarrollo.

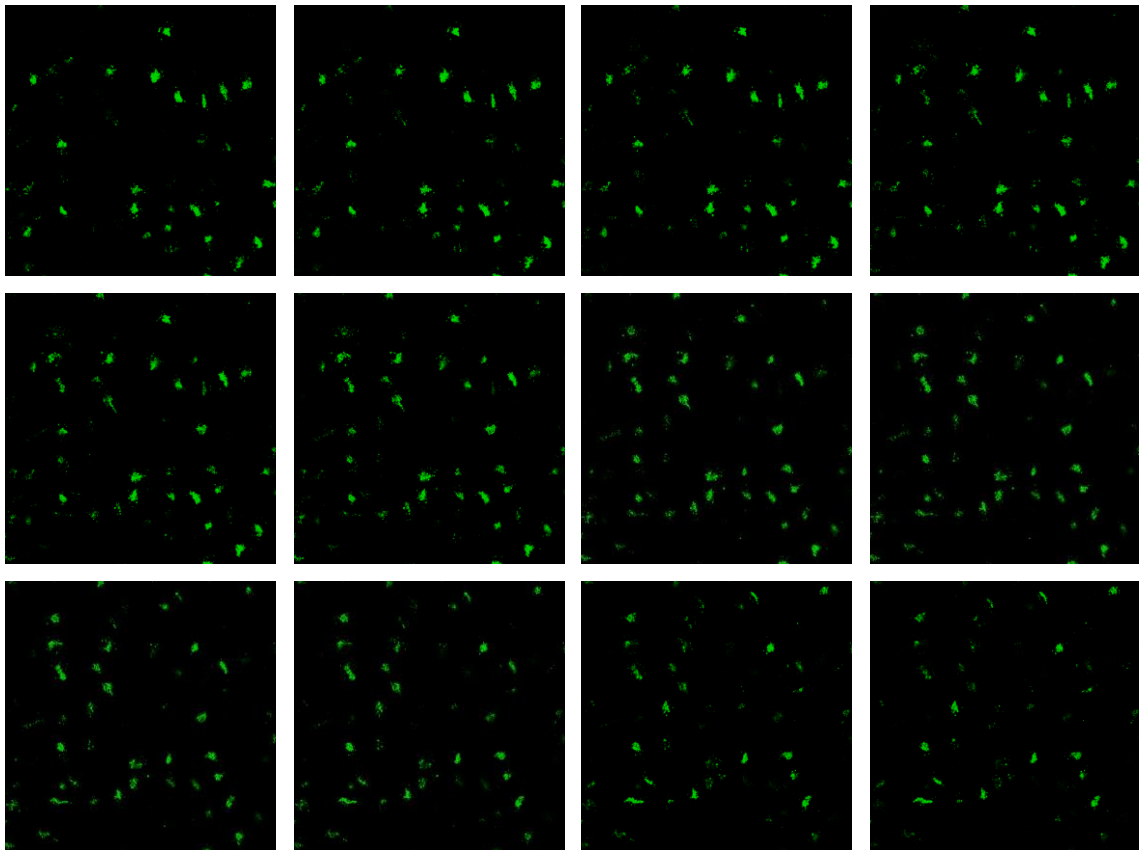


Figura 14 a. 7 días

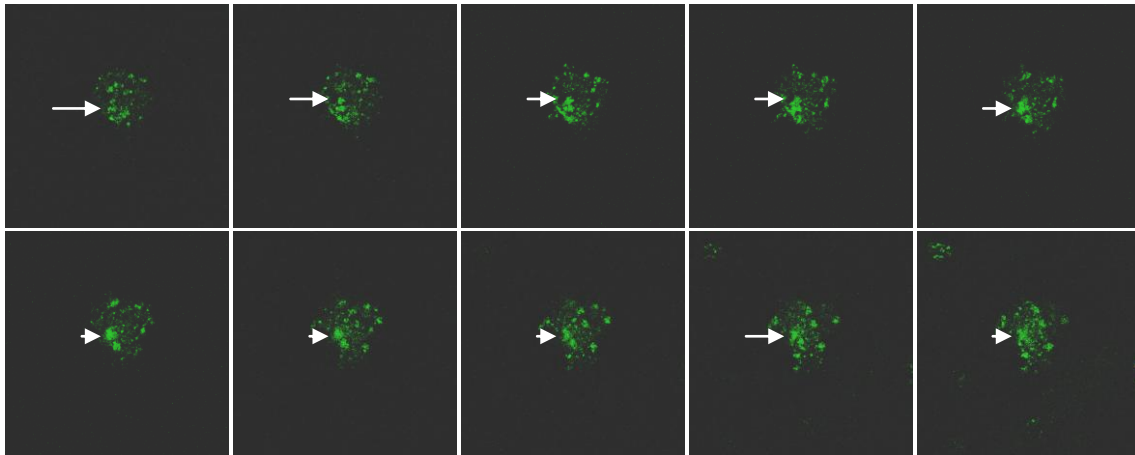


Figura 14 b. 9 días

Figura 14. Cortes ópticos a 100X. En todos los cortes se observa un patrón moteado irregular producido por la distribución de factores de splicing. Inmunomarcaje con el anticuerpo 3C5. En la figura 14a se observan motas de embriones de 7 días de desarrollo que corresponden al estadio HH31. En la figura b se notan en los cortes ópticos la variación de la maquinaria de splicing al hacer el seguimiento de las motas. Las flechas muestran el cambio que se tiene en los diferentes cortes ópticos y que expresan la dinámica de la biología celular del splicing. Esta imagen se obtuvo de embriones de 9 días de desarrollo y que corresponden al estadio HH35.

La figura 15 muestra neuronas de las edades de doce y diecisiete días de desarrollo. En estas imágenes se observa un patrón moteado más discreto ya que para el día 12 del desarrollo ocurre en la médula cervical un programa de revisión genética, que se refleja por el fenómeno de apoptosis; esto es previo al proceso de mielinización, el cual inicia a partir del día 14. Para el día 17 de desarrollo, el patrón es más abundante.

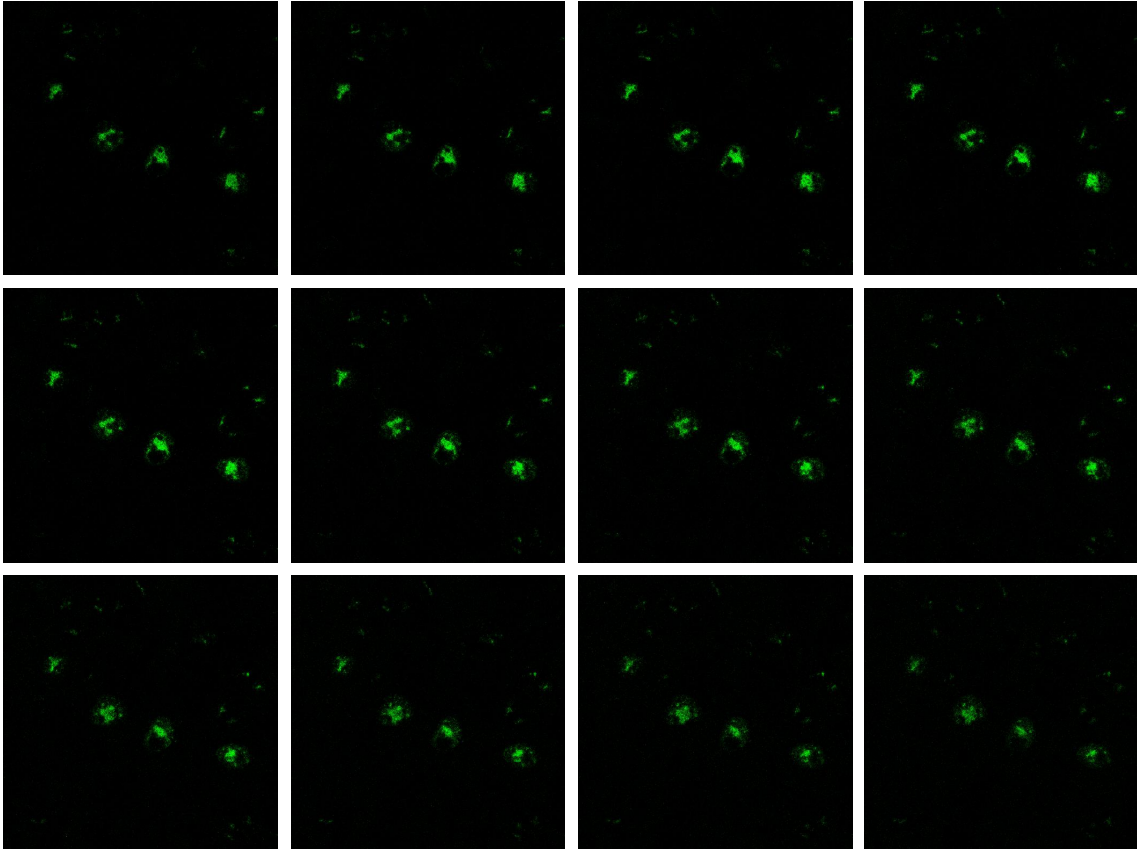


Figura 15 a. 12 días

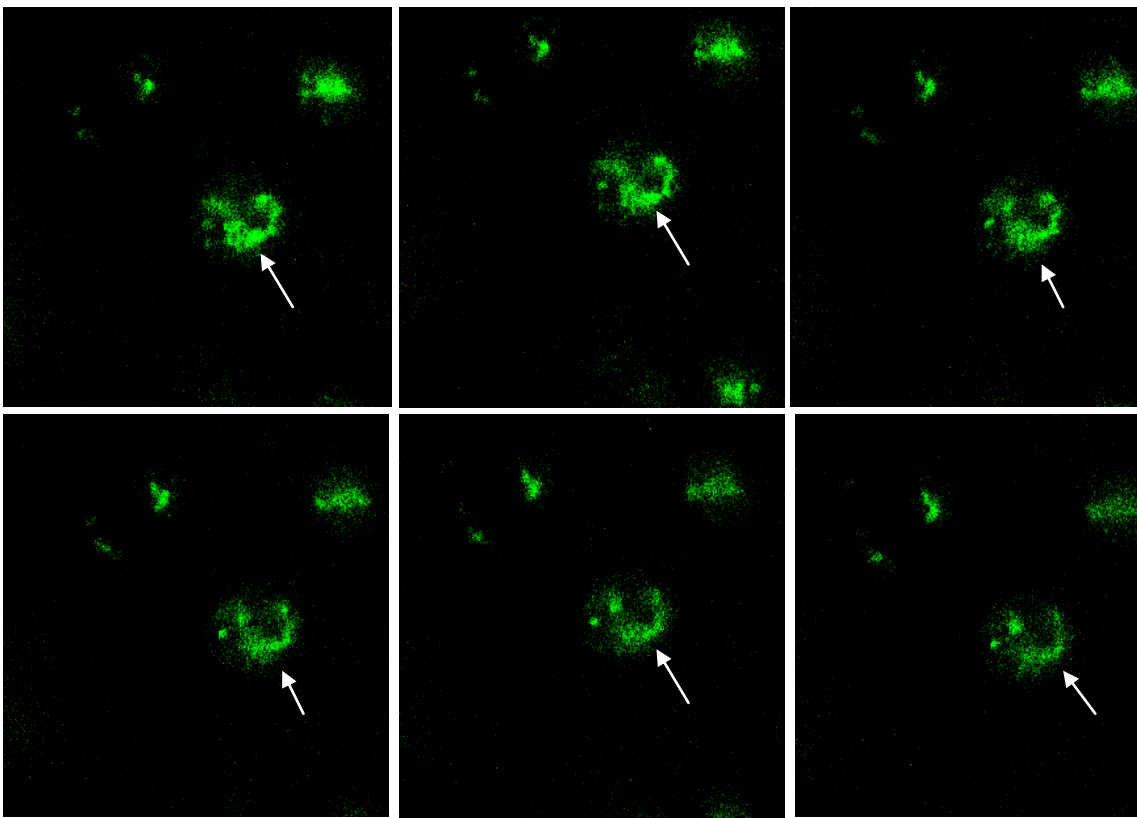


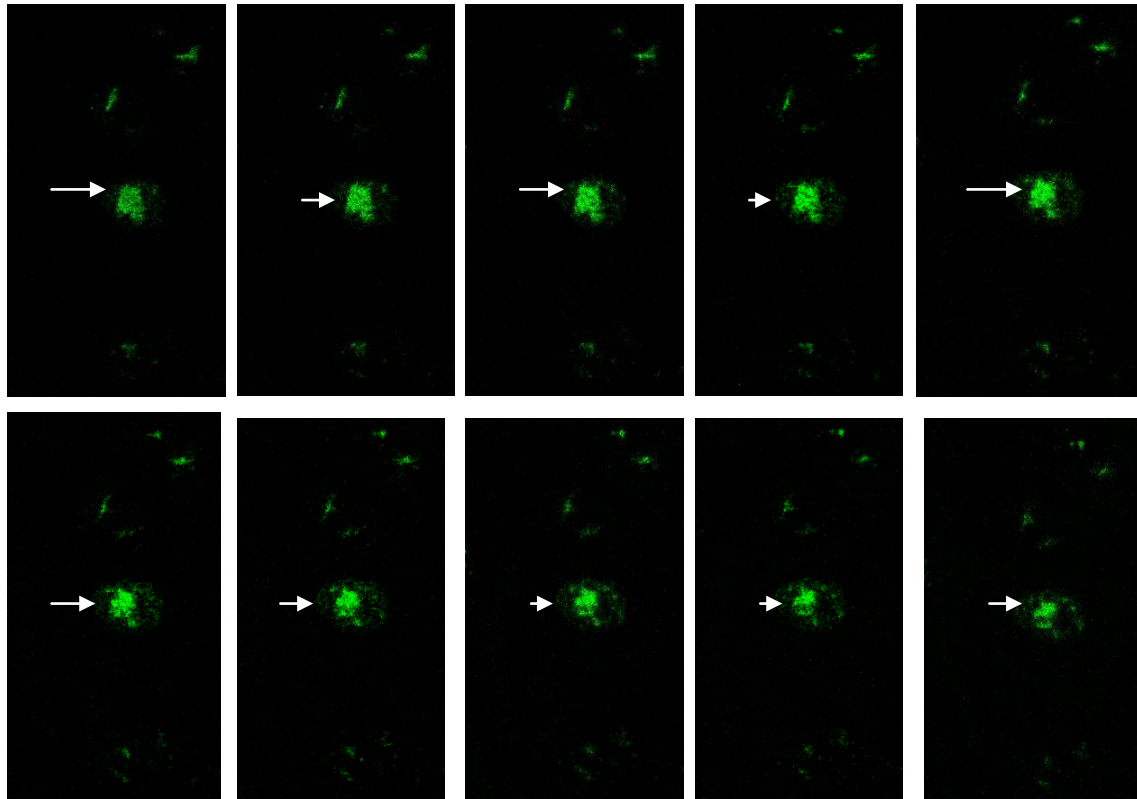
Figura 15 b. 17 días

Figura 15. Imagen de microscopía confocal obtenida a 100X. Se observa un patrón moteado irregular producido por la distribución de factores de splicing. Inmunomarcaje con el anticuerpo 3C5. En la figura 15a se ven motas de embriones de 12 días de desarrollo que corresponden al estadio HH38. En la figura b se pone de manifiesto la variación de la maquinaria de splicing al hacer el seguimiento de las motas. Las flechas muestran el cambio que ocurre en la morfología de una mota. La irregularidad de las motas es indicador de intensa actividad de splicing. Esta imagen se obtuvo de embriones de 17 días de desarrollo y que corresponden al estadio HH43.

La Figura 16 muestra las imágenes de los cortes ópticos, obtenidos con el microscopio confocal de las neuronas maduras, de la médula cervical espinal del embrión de pollo de la edad de veintiún días de desarrollo. Los ensayos de inmunomarcaje se realizaron cuando el pollo estaba en el proceso de ruptura del cascarón.

En general, durante todas las edades de los embriones de este estudio, se observaron cambios de tamaño y forma del patrón moteado. La morfología irregular de las motas es un indicador de actividad de transcripción y splicing.





21 días

Figura 16. Imagen de microscopía confocal obtenida a 100X. Las motas corresponden a neuronas de organismos de estadio HH-46. Se observan cortes ópticos con el patrón moteado irregular producido por la distribución de factores de splicing. En la figura se nota en los cortes ópticos la variación en la tercera dimensión de la maquinaria de splicing, al hacer el seguimiento con las flechas en las motas.

## Discusión

El desarrollo de la microscopía electrónica en la Biología Celular brindó la oportunidad de realizar hallazgos relevantes para contribuir con los estudios de Biología Molecular en la comprensión de los mecanismos de regulación de la expresión genética. Con el desarrollo de la técnica preferencial para partículas ribonucleoproteicas descrita por el profesor Bernhard en 1969 se ha llegado a conocer una parte importante de los diferentes dominios subnucleares para componentes ribonucleoproteicos como son: fibras pericromatinianas, gránulos pericromatinianos, fibras intercromatinianas y gránulos intercromatinianos, además del nucléolo. La cromatina que es la expresión morfológica del DNA, las proteínas y RNAs asociados en las células con núcleo, se ha caracterizado en microscopia electrónica empleando la técnica del ácido fosfotúngstico (PTA) desarrollada por Vázquez Nin y col. (1973). El estudio de la morfología de los núcleos con cromosomas politénicos permitió relacionar el proceso de transcripción, el procesamiento y el transporte del RNA mensajero (Vázquez Nin y Echeverría, 1996).

El contribuir a la comprensión de la dinámica de los componentes ultraestructurales de ribonucleoproteínas (RNPs), especialmente de los gránulos intercromatinianos (GICs) y su equivalente a nivel óptico denominado *speckles* o motas por estudios de inmunolocalización óptica, ha sido el motivo del presente trabajo.

En estudios clásicos por medio de autorradiografía ultraestructural en combinación con la técnica del EDTA preferencial para RNPs, se demostró que la incorporación de  $^3\text{H}$  uridina se realiza en los bordes de la cromatina compacta denominada región pericromatiniana (Fakan y Bernhard, 1971). La

localización intranuclear de la transcripción ha sido ampliamente estudiada por más de tres décadas. Se ha demostrado que las fibras pericromatinianas (FPC) son el sitio donde ocurre el proceso de transcripción (Fakan y col., 1976; Vázquez Nin y col., 2003).

Al hacer la evaluación de la asociación moderada entre la región cromatiniana y la periferia de los gránulos intercromatinianos Fakan y Bernhard (1973), encontraron que la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina ocurre en la periferia de los cúmulos de cromatina compacta y llega a extenderse hasta el borde de los cúmulos de gránulos intercromatinianos y no en su interior. No se tenía en ese momento una explicación del significado citofisiológico de los acúmulos de GIC. Por otra parte, Fakan y Nobis (1978) hicieron una localización ultraestructural de los sitios de transcripción durante el ciclo celular utilizando como modelo cultivos de células CHO sincronizadas. Ellos encontraron que la transcripción cambiaba en las diferentes etapas del ciclo celular.

En estudios con microinyección de 5-bromodesoxiuridina Cmarko y col. en 1999 establecen que la RNA polimerasa II y otros factores de transcripción están asociados con el splicing y con la transcripción.

Los estudios moleculares y ultraestructurales permitieron establecer una topología de la región pericromatiniana para demostrar, que entre el dominio cromatiniano, la región pericromatiniana y el compartimiento intercromatiniano existe una organización funcional que permite la realización de varios eventos: replicación del DNA, transcripción de los RNAs y el splicing (Cremer y col., 2004). Los procesos anteriormente mencionados han sido correlacionados para

entender las implicaciones de carácter evolutivo que tiene el núcleo (Foster y Bridger, 2005).

En el laboratorio de microscopia electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM se ha venido desarrollando por más de tres décadas el estudio de la dinámica de los componentes nucleares trabajando con diferentes modelos. Las partículas ribonucleoproteicas han sido ampliamente estudiadas utilizando entre otros, el modelo de diferenciación celular en embrión de pollo. Con este trabajo contribuimos a ampliar el esquema que se tiene con respecto a la organización del núcleo interfásico durante la diferenciación y maduración de neuronas motoras en el desarrollo del embrión de pollo (Vázquez Nin y col., 1980; Vázquez Nin y col., 1983; Zavala y col., 1992; Zavala y Vázquez Nin, 1997).

Los núcleos interfásicos durante la diferenciación de los neuroblastos y la maduración de las motoneuronas tienen una variación marcada en su conformación general y en la organización de los distintos subdominios nucleares. Estos cambios se correlacionan con los eventos de la organogénesis en animales.

Los resultados de este trabajo se correlacionan con los obtenidos por Palade (1955), Fujita (1963, 1964) y Lyser (1964) ya que la organización general del núcleo, el nucléolo y la distribución de organelos en el citoplasma tiene un papel crucial durante la diferenciación. En el estudio de los núcleos celulares en el embrión de pollo de dos días de incubación (HH12 y HH13) observamos células que corresponden a la capa neuroectodérmica, la cual está formada por las denominadas células matrices. En esta etapa estas células se localizan en la pared del tubo neural (Fujita, 1963; Fujita, 1964).

Estas células establecen un programa de transcripción y traducción importante, por ello se considera la presencia del retículo endoplásmico rugoso en las imágenes de microscopía electrónica como el signo citofisiológico del paso de células matrices a neuroblastos. En los resultados de este trabajo, lo anterior lo observamos en los núcleos de 2 y 4 días de edad.

En las células de la pared del tubo neural, tanto en células periependimarias como en las células periféricas, encontramos los gránulos intercromatinianos organizados en grandes cúmulos de forma irregular, ocupando buena parte del espacio intercromatiniano. En la edad de 2 y 4 días se destaca abundante presencia de cúmulos de GIC en comparación a la baja cantidad de otras ribonucleoproteínas como son los gránulos pericromatinianos reportados por Ortega en 1986, quien trabajó con este mismo modelo.

Por otra parte Jiménez (1983) reporta el desenrollamiento gradual que sufre la cromatina compacta durante el proceso de diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo, iniciando con células matrices, pasando por los neuroblastos, hasta la formación de neuronas maduras.

### **Distribución de los gránulos intercromatinianos durante la diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo**

En este trabajo se muestra que durante la diferenciación del neuroblasto del asta anterior del embrión de pollo, se producen cambios en el tamaño y forma de los cúmulos de GIC. Previamente, se ha mostrado que otras estructuras nucleares también sufren modificaciones durante este fenómeno. Por ejemplo, el número de GPC aumenta durante las diferentes etapas a la vez que la cromatina compacta disminuye (Ortega-Rangel, 1986). Este tipo de variaciones

también se produce durante la diferenciación de otros tipos celulares en la notocorda y en el desarrollo del músculo (Zavala y Vázquez-Nin, 1997, 2000).

Debido a que los GPC se relacionan con el almacén y/o transporte del mRNA (Echeverría y Vázquez-Nin, 2000), las variaciones en estas partículas sugieren cambios en estos eventos postranscripcionales. En este trabajo se reportan cambios en los GIC, que se relacionan con el almacén de factores de splicing (Spector, 1993, 2003), indicando que durante la diferenciación del neuroblasto también se producen cambios en la morfología celular del splicing. Estos datos concuerdan con la presencia de diferentes subtipos neuronales caracterizados por sus patrones de transcripción (Shirasaki y Pfaff, 2002), y la correlación del tamaño y el cuerpo neuronal con el nucléolo y los cuerpos de Cajal, en relación a la organización de la maquinaria de splicing (Pena y col., 2001) debido a que el splicing y la transcripción son procesos acoplados incluso *in vivo* (Jiménez y Spector, 1993). Además, datos de este laboratorio indican variaciones también en el número de GIC en el mismo modelo (Molina, 2002).

### **Distribución de los elementos de maduración de mRNA durante la diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo**

En este trabajo se muestra que durante la diferenciación del neuroblasto del asta anterior del embrión de pollo, se producen cambios en el tamaño y forma del patrón moteado ("speckles"). Las variaciones del patrón moteado debido a cambios en la tasa de transcripción y splicing está bien documentada tanto en células (Jiménez y Spector, 1993; O'Keefe y col., 1993; Misteli y col., 1997), como en tejidos (George-Téllez y col., 2002) durante la mitosis (Ferreira y col., 1994) y en la diferenciación temprana (Antoniou, y col., 1993).

Debido a que el patrón moteado corresponde ultraestructuralmente a los GIC (Spector y col., 1991), variaciones en estos componentes nucleares indican cambios en la morfología del splicing.

En conjunto, los resultados ultraestructurales y de inmunofluorescencia indican que las estructuras nucleares relacionadas con la maduración del mRNA sufren modificaciones reguladas, lo que sugiere que el patrón celular de expresión genética se modifica y es característica fenotípica del estado diferenciado.

## **Conclusiones**

El estudio de algunos de los diferentes componentes nucleares, en el modelo de embrión de pollo, ha resultado ser una excelente opción para contribuir a la comprensión de la organización y dinámica del núcleo celular interfásico. Los cambios de forma tamaño y contenido de los materiales nucleares en particular las RNP y especialmente los GIC aportan información valiosa para comprender mejor el proceso de splicing y su significado citofisiológico.

Como resultado de nuestro estudio distinguimos tres momentos distintos en la dinámica de estas partículas que correlacionamos con eventos importantes de la diferenciación y maduración del neuroblasto para la formación de motoneuronas. Un primer evento observado en los núcleos de células de embriones de dos y cuatro días de incubación, donde se presentan cambios drásticos en las diversas células como son: células matrices, neuroblastos bipolares, monopolares y multipolares. En todas estas células los GIC son muy abundantes y la formación de cúmulos grandes e irregulares orientados hacia el nucléolo es notoria, esto se asocia con la gran actividad de transcripción y maduración del RNA que tienen las células.

Un segundo evento lo consideramos entre los días nueve y doce del desarrollo embrionario, cuando los neuroblastos se han transformado en neuronas inmaduras ocupando la zona de las astas anteriores. Para entonces se ha completado la sinaptogénesis y está por iniciarse la mielinización, para la maduración de las neuronas. En este periodo los GIC han disminuido y los cúmulos son muy escasos o nulos en algunas células.

El tercer evento se evidencia en el proceso final de la mielinización que en este trabajo son los días diecisiete y veintiuno del desarrollo, cuando observamos un



incremento en los cúmulos de GIC, con respecto a los días nueve y doce. El tamaño de los cúmulos de GIC alcanza un máximo cuando el pollo eclosiona del huevo una vez concluida la maduración y cuando la médula espinal ocupa un espacio de unas cuarenta veces del que ocupa el tubo neural de dos días de incubación.

## **Bibliografía**

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. y Walter M. 2008. Molecular Biology of the Cell. Chapter 4, 6. Fifth Edition GS Garland Science. USA. 195-262 y 329-410.

Antoniou, M. Carmo-Fonseca, M. Ferreira, J. and Lamond, A. 1993. Nuclear Organization of Splicing snRNPs during Differentiation of Murine Erythroleukemia Cell In Vitro. J. Of Cell Bio. 123 No. 5. 1055-1068.

Becker, W. M. Lewis, J. Kleinsmith, J. y Hardin, J. 2003. The world of the Cell. Fourth Edition. Addison Wesley Longman Inc. USA. 715-744.

Bernhard, W. 1969 A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res 27: 250-265.

Beyer, A. L. and Osheim, Y.Y. 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. Genes Dev. 2, 754-765

Black, D. L. 2003. Mechanism of alternative pre-messenger RNA splicing. Annu. Rev Biochem.72:291-336

Brouwer, J. Mientjes, E. Bekker, C. Nieuwenhuizen, I. Severijnen, L. Vantt, N. Oostrab Willwmsen. 2007 Evaluated Fmr1 levels and reduced protein expression in a mouse model with an on thylated Fragil X Full mutation. Exp Cell Res 313 (2) : 244-253.

Bubulya, P. A. and Spector, D. L. 2004 On the movements of nuclear components in living cell. Exp. Cell Res.296: 4-11

Cajal, S. R. 1908-1911 Histologie du system nerveux del homme et des vertebres. Ed. A. Maloine Paris. Tomo I y tomo II.

Cmarko, D. Verschurre, J. Fakan, S. 1999 Ultrastructural Analysis of Transcription and Splicing in the cell nucleus after Bromo-UTP microinjection Molecular Biology of the Cell.10:211-223..

Cremer, T. Kupper, K. Dietzel, S. Fakan, S. 2004 Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. Biol Cell 96: 555-567.

Derenzini, M. Novello, F. and Pessio-Brizzi, A. 1978 Perchromatin fibrils and chromatin ultrastructural visualization of transcription at the cellular and molecular level. Biol Cell 39: 113-116.

Fakan, S. y Bernhard, W. 1971 Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high-resolution autoradiography. Exptl. Cell Research. 67: 129-141

Fakan, S. y Bernhard, W. 1973 Nuclear labelling after prolonged <sup>3</sup>H uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. Exp. Cell Res. 79: 431-444..

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

Fakan, S. Laser, G. y Martin, E. 1984 Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoprotein as visualized by immunocytochemistry in thin sections. J of Cell Biology 98: 358-363.

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

Fakan, S. 1994 Perichromatin fibriles are in situ forms of nascent transcripts. Trends Cell Biol. 4: 86-90

Ferreira, J. Carmo-Fonseca, M. 1994. Differential interaction of Splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. J of Cell Biol. 126: 11-23..

Ferrreira, J. y Carmo Fonseca, M. 1996 Nuclear Morphogenesis and the onset of transcriptional activity in early hamster embryos. Chromosoma. 105:1-11

Foster, H. A. and Bridger, J. M. 2005 The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. Chromosome. 114: 212-229.

Fu, X. y Maniatis, T. 1990 Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized in discrete regions in the nucleus. Nature 343: 437- 444.

Fujita, S. 1963 Matrix cell and cytochrome in central nervous system. J Com. Neurology 120: 37-42.

Fujita, S. 1964 Analysis of neuro differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. J. Com. Neurology. 122: 311.328.

Fujita, S. 1965 An Autoradiographic study on the origin and fate of the subpial glioblast in the embryonic chick spinal cord. J Com Neurology. 124: 51-60.

George, T. R. y col. 2002 Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues changes in the uterus by hormone action. Biology of the Cell. 94: 99-108

Gall, J. G. 2000 Cajal Bodies: The first 100 years. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.16: 273-300.

Jiménez García, L. F. 1983 Estudio de la cromatina y ribonucleoproteínas durante la diferenciación del neuroblasto de embrión de pollo. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias UNAM.

Hamburger, V. Hamilton, A. L. 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.

Hamburger, V. 1975 Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160: 533-546.

Handwerger, H. E. and Gall, G. J. 2006. Subnuclear organelles. new insights into form and function. *TRENDS in Cell Biology.* Vol 16. No 1 19-26.

Huang, S. y Spector, D. 1996 Intro-Dependent Recruitment of Pre-mRNA Splicing Factors to Sites of transcription. *J of Cell Biol.* 13: No.4 719-732.

Jiménez García, L. F. y Merchant, L. H. (eds) 2003 *Biología Celular y Molecular.* Vásquez Nin GH y col. El núcleo celular interfásico. Cap 12 Editorial Prentice Hall México 341.394.

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

Jiménez García, L. F. Lara, M. R. Gil, I. Zamora, A. Salcedo A., M. Agregano, M., L. T. Moncayo, S. J. y Segura V, L. 2007. *Biología Celular del splicing.* Mensaje Bioquímico. Vol XXXI 141-156. México

Karp, G. 2007 *Cell And Molecular Biology . Concepts And Experiment.* Fifth Edition. John Wiley & Sons. Inc Chapter 12. The Cell Nucleus And the control of Gene Expression. USA

Krohner, G. and Benavente, R. 1986 The nuclear lamins. *Experimental Cell Research* 162: 1-10.

- Gruce, K. S. Kukczycka, E. and Zboreck, A. 1985 Cytochemical study on the localization of interchromatin granules during the cell division. *Acta Histochem.* 76: 49-55
- Lamond, A. I. and Spector, D. L. 2003 Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol 4 August 605-612
- Langman, J. y Haden, C. 1965 Formation and migration of neuroblast in the spinal cord of the chick embryo. *J Com. Neurology.* 138: 419-432.
- Lürhrmann, R. Kastner, B. and Bach, M. 1990 Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochimica et Biophysic Act.* 87 265-292
- Lyser, K. 1964 Early Differentiation of Motor Neuroblasts in the Chick Embryo As Studied by Electron Microscopy. *Developmental Biology.* 10:433-466.
- Marjoelin, A. y col. 1997 Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J of Cell Sci.* 110; 1781-1791.
- Medina, M. A. Moreno Díaz de la Espina, S. Martin, M. y Fdz-Gmz, M. E. 1989 Interchromatin granules in plant nuclei. *Biol.Cell* 67: 331-339.
- Meenakshi, R. and Sockanathan, S. 2005 Transmembrane Protein GDE2 Induces Motor Neuron Differentiation in vivo. *Science* Vol 309. 2212-2215.
- Mintz, P. y col. 1999 Purification and biochemical characterization of interchromatin granule cluster. *EMBOJ.* 18:4308-4320.
- Misteli, T. Cáceres, F. J. y Spector, D. L. 1997 The dynamic of pre-mRNA splicing factor in living cell. *Nature* 387: 523-527.
- Misteli, T. 2000 Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing:nuclear architecture meets nuclear function . *J. Cell Sci.* 113: 1841-1849.

Molina, F. P. 2002 Variaciones de los gránulos intercromatinianos (GIC) de los núcleos interfásicos de neuroblastos de embrión de pollo en varias etapas del desarrollo. Tesis de Licenciatura. Fac de Ciencias UNAM. 75 pags,

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

Moyne, G. Nash, R.E. y Puvion, E. 1977 Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cicloheximide. *Biol. Cell.* 30: 5-16.

O'Keefe, R. T., Mayeda, A. Sadowski, C. L. Krainser, A. R. and Spector, D. L. 1994 Disruption of pre mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J. Cell Biology* Vol 124 249-260.

Oppenheim y col. 1975. Some aspects of synaptogenesis in the spinal cord of the chick embryo. A quantitative electron microscopy study. *J. Com. Neurology.* 161: 383-418.

Ortega, R. J. 1986. Estudio cuantitativo de las partículas de ribonucleoproteínas nucleares durante la diferenciación y maduración de los neuroblastos de la médula espinal del embrión de pollo. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias UNAM. 133 pags.

Palay, S.L. and Palade, G.E. 1955 The fine structure of neurons. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* Vol. 1 N° 1:69-108

Peter, S. 1990 In vitro Disassembly of the nuclear lamin and M phase specific phosphorylation of lamin by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602

Pollard, T.D. and Earnshaw, W.C. 2004. *Cell Biology.* Second edition. Saunders. USA. 175-259.

Puvion, E. Viron, A. Assens, C. Leduc, E. M. y Jeanteur, P. 1984. Immunocytochemical identification of nuclear structures containing SnRNPs in isolater rat liver cells. *J Ultrastructure Res.* 87: 180-189.

Puvion, E. Viron, A. y Xu, X. 1984. High resolution autoradigraphical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB- treated cells. *Exp. Cell Res.* 152: 357-367.

Puvion-Dutilleul, F. Besse, S. Chan, E. Eg, M. T. y Puvion, E. 1995. p80 coilina : a component of coiled bodies and interchromatin granules –associated zones. *J. Of Cell Science* 108: 1143-1155.

Raska, I. Andrade, L. Ochs, R. L. Chan, E. K. L. y Chang, E. M. 1991 Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp. Cell Res.* 195: 27-37.

Raska, I. Koberna, K. Malinsky, J. Fidlerova, H. Masata, M. 2004 The nucleolus and transcrption of ribosomal genes. *Biol Cell.* 96: 579-594.

Rosbarh, M. and Seraphin, B. 1996. Who's on first? The U1 snRNP-5' splice site interaction and splicing. *TIBS* 16 No5 187-190.

Sharp, P. A. 1987 Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235: 766-771.

Shirasaki, R. y Pfaff, S. 2002. Transcriptional Codes and the Control of Neuronal Identity. *Ann Rev. Neurosci* 25: 251-281.

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

Spector, D. L. Fu, D. and Maniatis, T. 1991. Association between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10, 3467-3481.



Spector, D. L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.*9: 265-315.

Spector, D. L. 2003. The dynamic of chromosome organization and gene regulations. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 573-608.

Thiry, M. 1993. Diferencial localization of nucleic acids within interchromatin granule cluster. *Eu. J. Cell Biol.*62:229-240.

Thiry, M. 1995 Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. *European J of Cell Biol.* 68: 14-24.

Vankan, P. Mc Guigan and Mayyaj, I. W. 1992. Roles of U4 and U6 snRNAs in the assembly of splicing complexes *The EMBO Journal* Vol 11 No1 335-343.

Vázquez Nin, G. H. y Sotelo, J. R. 1966 Neurofibrilar differentiation during embryonic growth. *J. Com. Neurology* 138: 313-332

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

Vázquez Nin, G. H. Chavez, B. y Tomas, M. C. 1973. A preferential staining methods for chromatin in electro microscopy. *J. J. Microscopy.* 26: 243-246

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

Vázquez Nin, G. H. Ortega, R. J. A. Echeverría, M. O. Jiménez, G. L. F. 1983 Changes in nuclear Ribonucleoprotein Constituents and Chromatin disposition during Neural Differentiation and Maturation. *Biol Cell* 48: 17-21.

Vázquez Nin, G. H. y Echeverría, M. O. 1996. The polytene nucleus in morphological, citochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing, and transportation. *Eur. J. Histochem.*40, 7-16,

Vázquez Nin, G. H. y col. 1996 Phosphorus distribution in perichromatin granules and surrounding nucleoplasm as visualized by electron spectroscopic imaging. *Bio Cell*. 87: 171-177.

Vázquez Nin, G. H. y Echeverría, M. O. 2000 Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada A Las Ciencias Biológicas. UNAM- Fondo de Cultura Económica México 165 pags

Voet, D. Voet, J. G. y Pratt, C. W. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2° Edición Editorial Médica Panamericana. Capítulo 25 919-930.

Watson, M. I. 1962 Observations on granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and Mouse. *J. Cell Biol*. 13: 162-167.

Zavala, G. Aguilar, X. Jiménez, G. L. F. Echeverría, M. O. y Vázquez Nin, G. H. 1992 Changes in the ribonucleoprotein constituents of muscle cell in the chick embryo. *Biol cell*. 76:159-165.

Zavala, P. G. y Vázquez Nin, G. H. 1997 Changes of Ribonucleoproteic structure of Embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation. *Biology of the Cell*. 89: 245-255.

Zavala, P. G. y Vázquez Nin, G. H. 2000 Analysis of Nuclear Ribonucleoproteic Structures During Notochordal Cell Differentiation and Maturation in Chick Embryos. *The Anatomical Record* 259: 113-123.