UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ORGANIZACIÓN ESPACIAL DEL NUCLÉOLO DE *GIARDIA LAMBLIA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAZIEL EDUARDO GARZA MELCHOR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CD. MX. **SEPTIEMBRE, 2019**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ORGANIZACIÓN ESPACIAL DEL NUCLÉOLO DE *GIARDIA LAMBLIA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAZIEL EDUARDO GARZA MELCHOR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX. **SEPTIEMBRE, 2019**

POSGRADO
CIENCIAS
BIOLÓGICAS

UNAM POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/612/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de mayo de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del alumno **GARZA MELCHOR RAZIEL EDUARDO** con número de cuenta **404039518** con la tesis titulada **"Organización espacial del nucléolo de *Giardia lamblia*"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA:**

Presidente:	**DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES**
Vocal:	**DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**
Secretario:	**DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**
Suplente:	**DRA. LOURDES TERESA AGREDANO MORENO**
Suplente:	**DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de agosto de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

AGNS/VMVA/ASR/ipp

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1° Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 http://pcbiol.posgrado.unam.mx/

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Expreso también mi agradecimiento a la beca CONACYT (CVU: 421574) la cual me permitió realizar mis estudios e investigación, así como al PAPIIT-DGAPA-UNAM IN 217917 responsable de subvencionar el presente proyecto.

Finalmente, al tutor principal de mi tesis el Dr. Luis Felipe Jiménez García, así como a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes y el Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres por la vida.

A mi abuela Adela, quien no existe más, por enseñarme a vivir.

A ti, Celia, dondequiera que ya no estés.

A mi madre por todo.

A mi familia (dígase TODOS empezando por los Vidal y la Rosa) por el apoyo: Papá-bus... ...Emiliano (Nano).

A mis amigos por el camino compartido y los pasos aprendidos.

Al país con su gente que pagó mi educación.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez y a la Dra. Lourdes Segura por su guía académica y sus enseñanzas para la vida, su cariño, atención y paciencia. Por formarme, mi gratitud, aprecio y respeto siempre les acompaña.

A la gente del laboratorio de Microscopía y Nanobiología de la Facultad de Ciencias, nada habría sido posible sin ellos.

A mi comité tutor por enriquecerme con su experiencia académica, por su seguimiento en mi proyecto: Dra. Teresa Fortoul van der Goes y Dr. Arturo Becerra.

A la Dra. Reyna Lara por su ayuda en general a lo largo del proyecto. A la Dra. Lourdes Agredano por el seguimiento a todo este proceso desde hace varios años, su experiencia académica y sus oportunos consejos. A Anita por acompañarme en el cubo día a día y resonar positivamente de muchas maneras.

A la Dra. Fortoul por el sinfín de atinadas atenciones y muchísima paciencia.

A todos los miembros de mi jurado por su ayuda con la tesis: Dr. Antonio Lazcano, Dra. Sandra Luz, Dra. Teresa Fortoul, Dra. Lourdes Agredano y al Dr. Roberto Hernández.

Al laboratorio de Origen de la vida. A mi increíble maestro y profesor Dr. Antonio Lazcano Araujo Reyes, por sus enseñanzas de la ciencia, el arte y la vida. Por el cariño, humor, paciencia y bonhomías copiosas y diversas recibidas a lo largo de estos años, The Very Great Dominus et Magister Emeritus et Invictus, mi admiración, agradecimiento y dilección van de vuelta.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, mi maestra, por tantas lecciones de diversa índole y excelente trato.

A la mujer que me ha hecho en los últimos tiempos -ya uno que otro añito sin ser añejo- ser quien soy: Coral.

A los Cruz-González y a los Luna.

A Elsita Recillas, por el invisible apoyo que nada tiene de invisible. Y claro que por el alimento especial para el *vegetariano* que afablemente fabrica la doctora que mira las estrellas.

A Blanquita y a *nuestra* madre Hilda.

A los que la mente olvida pero el corazón no.

Gracias.

No sé qué es esto

Otro tonto sueño de irrealidad
esa esfera ondulada

La plena consciencia de los amores moribundos
cansadas y bellas caligrafías
ganas de morir
eterna muerte electrónica
mas no electrizante

Espasmos de sensación, secretos vitales que abigarran las fuerzas
dolores lejanos, recurrentes y siempre recalcitrantes
caminos rotos y pasos bloqueados
niños secos y vidas ahogadas

Blancos, macilentos como tu sangre lívida ahora exangüe
obscuros deseos
ennegrecidos amores
fuegos tatuados en la memoria que sirvan para olvidar
para cantar la ruindad de la vida
para apagar el tiempo y las trayectorias

Vivirás sin saber lo que viviste
frágilmente recordarás tu muerte
sin nombre santo alguno
hubo destellos en la senda
y el calor del llanto ahogará tu voz
en ese silencio donde no habita nada
ni el aire ni gas alguno

El amor vuelve a fruicionar la vida cuando la acalla
esto no existe pero estás cansado de vivirlo
dioses eternamente ausentes sonríen tu desgano
te haces las cuestiones más profundas para reparar
que no tienen sentido
un olvido latente se vuelve varios
y te acosa sin dejar de perseguir la nada
como viajando en el vacío
y haciendo fuerza de la ausencia

Nada terminará y no verás comienzo
balbucearás todos los idiomas como si no hubiera designio
fulgurarás inútilmente las bondades del amor
nuevamente
para desnudarte solo
frío y atemporal
vacío, descarnado, sabiendo que anduviste sin un hueso

falto de esqueleto y color sublimaste el canto

Viajaste errante a los objetivos más precisos
viste flores en el hueco espacio
comes alimentos a través de un cuerpo alienado
encumbrado e ilusorio
supones lenguas y también oídos

No engendrarás la mierda por los ojos ni pasos por las manos
es tan solo ese suave arrullo de no vivir
de ver sin ser observado, de beber sin deglutir
de amar rabioso sin sentir
de llorar un árbol resonante e inmenso donde ni penumbra ni luz harán su encanto
donde todo es juego de sueños quimeras y de la mente

No existes tú como no existe la mala muerte
deja que la tinta litifique el corazón y venda lo invendible
regresa a hacer las olas donde alucinaste arte
destruye los cansados pilares de la guerra a manera transgresora
de volver a soñar y a repetir

Sueña con tu fatiga otro de esos espejismos
del espejismo vida
de esa invención llamada tiempo
de esa creación sin creador
de esa telepatía no empática y carente de sentido
vocifera que el silencio es absoluto

Plásmate que así podrás jugar a que exististe
revuélvete en sueños que te secarás sin sol y sin calor
abriga lo inasible, mastica la nulidad de bocas
observa ciegamente este tu paraíso
y túrbate, poniendo en entredicho las palabras nuevas del futuro

Parece enfermedad pero solo es ausencia que no perece
que se forma de todo, de ese tiempo polvoso y reluciente
duda, teme, que así, quizás, tendrás sentido
trémulo, mentiroso, obnubilado, cansado
pero con apariencia de reactivo

No existe maldad es otra vez esa carencia
cansada de aparecer, de fabricarse ausente
y sentir que engendra la inexistencia
esa eterna inexistencia que a delirios dice que amamos
que somos, que fuimos y que caminamos

Como masas amorfas que devienen arquetipos
de las más puras proporciones como este final

plagado de no finales

SPEACE OSCURA NO PRESENCIA RUTILA, ETERNAMENTE AFECTADO DE NADA

DEDICATORIA

A mi abuela Adela Vélez García.

A mi madre, Maricela.

A quien disuelve la soledad y aspereza de la vida: Coral.

ÍNDICE

Resumen.....

Abstract

Introducción

El nucléolo en los seres vivos

En el tiempo: algo de historia

En el espacio: un compartimento subnuclear

En acción: centro de fisiología polifacética

Más acción: disfunción o patología; una de las facetas

En su materia:

Genoma nucleolar:

Estructura y organización del DNA ribosómico

Proteoma nucleolar:

Elementos de la estructura proteínica del nucléolo

***Giardia lamblia* en panorámica: ¿Quién es?**

Antecedentes

¿Cómo es la ultraestructura nucleolar de *Giardia lamblia*?

Justificación

Objetivos

Hipótesis

Metodología

Resultados

Discusión

Nucléolo giárdico

Centros fibrilares: presencia, ausencia o una cuestión de definición

Posición intranuclear del nucléolo

Aspectos evolutivos

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

Bibliografía

Artículos

Cibergrafía

Anexo

RESUMEN

El nucléolo es el organelo celular, intra y subnuclear, carente de membrana, que funge como centro de regulación para diversas actividades en la célula; además de la tradicionalmente estudiada función responsable de la biosíntesis ribosómica. Los mecanismos que modula implican la coordinación de diferentes procesos estructurales, metabólicos y energéticos. En la mayoría de los organismos analizados este organito se ha descrito, morfológica y ultraestructuralmente, constituido por un arreglo tripartita -i.e., centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular-; sin embargo, se han observado algunas especies con una estructura bipartita -mostrando únicamente el componente fibrilar denso y el granular definidos-. Recientemente se describió al nucléolo de *Giardia lamblia* (GL) con elementos característicos de los componentes fibrogranulares, y tal vez, centros fibrilares. Para determinar la presencia de los centros fibrilares y si la periferia nucleolar contacta la periferia nuclear de modo homogéneo, se prepararon cortes seriados y una reconstrucción tridimensional usando el programa Free-D. Los resultados indican una discontinuidad de contacto hacia la periferia nuclear y no se identifican centros fibrilares en nucléolos reconstruidos. Lo que muestra que la estructura *canónica* no es universal a la par que indica evolución.

ABSTRACT

The nucleolus is the, intra and subnuclear, membrane-less cell organelle which functions as a regulation centre for many cellular activities; besides the classical function responsibly for ribosomal biosynthesis. The mechanisms it modulates imply the coordination of different structural, metabolic and energetic processes. In numerous organisms this organelle has been depicted owing a tripartite array –i.e., fibrillar centres, dense fibrillar and granular components-; nevertheless, some species have been observed with a bipartite structure –exhibiting only fibrillar dense and granular components-. Recently *Giardia lamblia*'s (GL) nucleolus has been showed with fibrogranular components and may be fibrillar centres. In order to determine the presence of the fibrillar centres and whether nucleolar periphery contacts nuclear periphery in a homogeneous fashion, serial sectioning and a three-dimensional reconstruction (aided by Free-D software) were carried out. The results show a contact discontinuity towards nuclear periphery and fibrillar centres in reconstructed nucleoli have not been yet identified, so the *canonical* structure ain't universal but always evolving.

INTRODUCCIÓN

El nucléolo en los seres vivos

En el tiempo: algo de historia

Alrededor de 1781, Felice Fontana descubrió el nucléolo; dicha observación le otorgó el reconocimiento como uno de los pioneros en su estudio y fue realizada empleando una muestra de saliva de anguila (Garrison, 1935; Shaw, 2010).

Existe el consenso que, durante la década de 1830, quienes lograron formalmente a través de la microscopía, las primeras imágenes del nucléolo fueron los fisiólogos alemanes Rudolph Wagner (1835) y Gabriel Valentin (1839). Wagner lo nominó "fleck", "keimfleck" o *mácula germinativa*, a partir de una muestra de folículos de oveja (Dundr y Misteli, 2002; Shaw, 2010; Pederson, 2011). Poco después Valentin acuñó propiamente el término *nucléolo*, haciendo referencia a un núcleo dentro del núcleo (Shaw, 2010; Pederson, 2011; Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015).

A su vez, Bárbara McClintock fue también promotora de la entonces incipiente *nucleolología* al definir el concepto de **organizador nucleolar** (NOR) en 1934; confiriendo así, al organito celular, una posición específica asociada a los cromosomas (Shaw y Jordan, 1995; Shaw, 2010).

El nucléolo se ha estudiado en diversos organismos que fungen como modelo, entre ellos: *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Por ejemplo, en la figura 1 se muestra el nucléolo en células HeLa. Para el caso del presente estudio fue *Giardia lamblia* (GL) el modelo utilizado. Algunos organismos son analizados con un especial interés, debido a la semejanza que presentan en su funcionamiento con los mecanismos de las células que integran el cuerpo del ser humano, lo cual permite extrapolar resultados y, evita la necesidad de tener que experimentar directamente con él. En otros casos, la atención es consecuencia de, que el organismo en sí mismo representa un agente patógeno para los seres humanos y/o para otros animales domésticos o; que posee otros atractivos para emplearse como modelo (por ejemplo, dimensiones pequeñas, facilidad para mantenerse y reproducirse, entre otros).

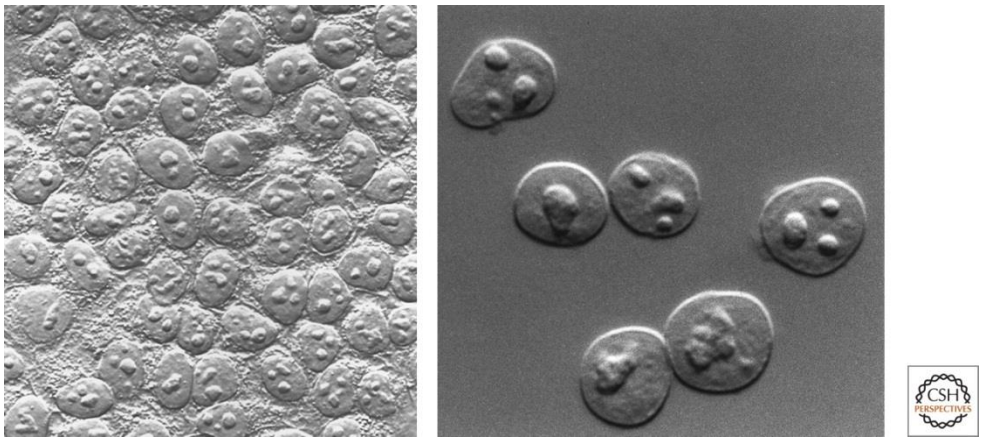


Figura 1. El nucléolo en células HeLa. Imágenes que muestran del lado izquierdo al nucléolo de células HeLa; en el recuadro derecho se observan con microscopía de interferencia diferencial (DIC) (Tomado de Pederson, 2011).

En el espacio: un compartimento subnuclear

El nucléolo es un organelo y compartimento celular minúsculo; una estructura subnuclear no membranosa (Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015; Tsekrekou et al., 2017; Potapova y Gerton, 2019) y un dominio subnuclear altamente conservado (Ahmad et al., 2009). Resulta la región de apariencia más conspicua (Shaw y Doonan, 2005) al observar el núcleo bajo el microscopio. Es una zona discreta, compleja, multifuncional y dinámica (Brown et al, 2005), ubicua en los eucariontes. (Lam et al., 2005; Jiménez-García et al., 2008; Sirri et al., 2008). Sin embargo, existen diferentes posturas al respecto de si es, o no, universal la presencia de este centro metabólico y estructural, en las células nucleadas (Picart-Picolo et al., 2019).

La convergencia espacial de diversas biomoléculas en el nucléolo es, tanto el resultado de procesos bioquímicos enmarcados en el contexto del ciclo celular y los parámetros regulares de la fisiología celular, así como, una consecuencia de las propiedades físicas intrínsecas de los materiales que lo constituyen, por ejemplo, el estado de agregación (Sirri et al., 2008; Mangan et al., 2017; Nakashima et al., 2019).

El nucléolo es una entidad citogenética, es decir espaciotemporal, que puede referirse como los genes en acción según la quizá atinada descripción que Pederson ha hecho en honor a los bellos trabajos de Miller y Beatty (Pederson, 1998, 2011).

El organito ‘fleck’ residente del núcleo comienza su actividad, se organiza y ensambla alrededor del rDNA poniendo en acción a los genes –así como otras estructuras y procesos citológicos, que se revisan adelante-. Estas secuencias génicas ribosómicas -rDNA-, los organizadores nucleolares (NOR) mcclitockianos, se encuentran dispuestas en el genoma a modo de repeticiones o arreglos tipo tándem (Boisvert et al., 2007); estas iteraciones de genes ribosómicos se encuentran transcripcionalmente activas (Potapova y Gerton, 2019).

En acción: centro de fisiología polifacética

Tradicionalmente, la principal función descrita, responsable de haberle conferido el epíteto de la *fábrica de ribosomas* -aludiendo el artículo de Cmarko et al. (2008)-, había sido su actividad como nodo primario dentro de la ruta responsable de la biogénesis ribosómica, i.e., la transcripción, la modificación, el procesamiento del pre rRNA, además del ensamblaje de las ribonucleoproteínas (RNPs) que constituyen las subunidades del ribosoma.

Sin embargo, estudios ulteriores comprendidos en las últimas tres décadas, han descubierto otros procesos fisiológicos y componentes biomoleculares no tan *tradicionales* ocurriendo en el nucléolo, también llamado condensado celular nuclear (Stamatopoulou et al., 2018). Por ejemplo: la maduración, el ensamblaje y el metabolismo de otras ribonucleoproteínas, amén del ubicuo y esencialísimo ribosoma, v.gr., la SRP -integrada en mamíferos por 300 nucleótidos y 6 proteínas- y la telomerasa (Pederson, 2011, 2015; Wild y Sinnging, 2014); además de la telomerasa, muy recientemente el grupo de Pontvianne (2019) mencionó la maduración de estructuras como el espliceosoma, el proteosoma y otras que se emplean para la degradación de RNA; el procesamiento químico de otras categorías de pre-RNA no ribosómicos, como snRNA, snoRNA, miRNA, tRNA y mRNA (Trynkle-Mulcahy, 2015); la regulación del ciclo celular –v.gr., puntos de control, crecimiento, senescencia y apoptosis-; las actividades realizadas por el centrosoma; la respuesta al medio ambiente y al estrés; las infecciones ocasionadas por virus donde replican sus genomas y proteínas (O'Day, 2019); la reparación y el mantenimiento genómicos (Scott y Oeffinger, 2016; Tsekrekou et al., 2017); la actividad de las chaperonas y la señalización celular (O´Day, 2019) inmunológica y del desarrollo (Zhou et al., 2015); la detención nucleolar, llamada *secuestro* de proteínas, así como de otra clase de moléculas –a modo de contenedor o almacén biomolecular (O'Day, 2019; Hayashi y Matsunaga, 2019)-, que se traduce en una residencia diferencial de proteínas, RNA, entre otras, disponibles para reaccionar a posible estrés biótico, abiótico, ambiental e intrínseco (Boisvert et al., 2007; Baßler y Hurt, 2019) y la regulación de la estabilidad proteica (Lam et al., 2005) mediante modificaciones postraduccionales a través de la proteína SUMO (abreviado del inglés, small ubiquitin-like modifier) (Hutten et al., 2011) o, lo estipulado por Montacié et al. en 2017, quienes mostraron que existe una relación entre los subcomponentes del proteasoma, su localización y una morfología nucleolar *saludable*.

Todos los procesos enumerados en el párrafo anterior deben apreciarse bajo una mirada que los conciba, siendo regulados finamente, y en consonancia tanto de los estímulos externos, como de la carga metabólica presente en el nucléolo. Esta carga se libera gradualmente hacia el núcleo y el citoplasma participando en mecanismos fisiológicos (Sirri et al., 2008) contingentes, lo cual permite inhibir o reprimir procesos celulares, al mantener arrestados o al liberar los factores implicados en ellos. Estas propiedades han hecho patente que gran parte de las rutas metabólicas y de señalización convergen o coinciden en el nucléolo (Lu et al., 2018).

Cuando se observa con un microscopio electrónico a este centro de procesamiento de RNPs, se reconocen tres compartimentos con proteínas específicas: centros fibrilares (FC) rodeados por la zona fibrilar densa (CFD), a su vez contenida en el componente granular (GC) (Sirri et al., 2008; Smetana, 2011). Estas zonas poseen diferentes funciones: transcripción de rRNA, procesamiento de pre rRNA y ensamblaje de las subunidades del ribosoma, respectivamente (Lam et al., 2005; Sirri et al., 2008).

Cuando el nucléolo se reorganiza alrededor de las repeticiones de los genes ribosómicos (Cmarko et al., 2008), iniciando en la telofase tardía, lo que se denomina nucleologénesis, permanece durante la interfase y se dispersa al comienzo de la mitosis (Lam et al., 2005). Su desensamblaje sucede durante la profase. Asimismo, al comienzo de la nucleologénesis termina el arresto mitótico con la disminución de la actividad de la ciclina B, las secuencias transcripcionalmente activas de rDNA se agrupan y organizan el nucléolo pues son los sitios donde comenzará la nucleación de éste. La transcripción de la RNA polimerasa uno (RNAP1) se activa. La fibrilarina y otras proteínas (Bopl, B23 y Nop32) se condensan formando los cuerpos prenucleolares (PNBs). Los PNBs pueden funcionar como plataformas de ensamblaje para complejos de procesamiento, a partir de las cuales sea posible proveerse paulatinamente de las proteínas que contienen para contribuir a la formación del nucléolo (Sirri et al., 2008).

Dada la notable influencia y participación del nucléolo en los procesos fundamentales de las células, resulta sencillo comprender el por qué ha habido una explosión de trabajos relacionados con él; en algunos casos se han relacionado anomalías o afectaciones en el nucléolo, las denominadas *nucleolopatías*, con las manifestaciones fenotípicas de alguna enfermedad.

Actualmente, en aspectos patológicos como el cáncer, o incluso en la longevidad, se emplea como un marcador o diagnóstico morfométrico (Tiku et al., 2017; O'Day, 2019).

También en relación con su apariencia, en diferentes organismos, incluso en el mismo individuo, pero en distintos estadios de su ciclo de vida, o en diferentes condiciones fisiológicas y/o patológicas, el nucléolo puede presentar una diversidad de dimensiones (v. gr., la levadura exhibe un nucléolo de < 1 µm mientras que en plantas de chícharo suele presentar un tamaño de >10 µm (Shaw, 2010; Kalinina, 2018)) y/o de configuraciones ultraestructurales. Por ejemplo, según Brown et al. (2005), proponen como capital diferencia entre plantas y mamíferos a la cavidad nucleolar presente en muchas especies vegetales.

Ya que se ha resaltado lo multifacético del nucléolo, es importante retomar el estudio clásico como biogenerador de ribosomas.

Una célula eucarionte transcurriendo activamente en su ciclo celular destina aproximadamente el 80 % de su energía total en la biogénesis ribosómica y el 60 % de su transcripción total corresponde al gen ribosómico (Zhou et al., 2015; Lu et al., 2018). Existen 4 especies de rRNAs de las cuales 3 son transcritas por RNAP1: 18S, 28S y 5.8S (Shaw y Jordan, 1995; Lu et al., 2018). Los rRNAs durante el proceso de biogénesis y maduración de las subunidades ribosómicas, son modificados covalentemente con pseudouridinaciones y metilaciones (2'-O-ribosa) en dominios específicos y de importancia funcional, estas modificaciones químicas, son consideradas como ajustes finos a la estructura o función de dichos rRNAs ribosómicos. Dichas modificaciones ocurren concomitantemente con la transcripción del gen ribosómico. Se sabe que 100 snoRNPs son algunos de los factores implicados en las aproximadamente 130 isomerizaciones de uridina y transferencias de grupos metilo que realizan enzimas como la CBF5 y la fibrilarina (Baßler y Hurt, 2018; Klinge y Woolford, 2019). Otro tipo de enzimas que participan en este proceso, las helicasas, se han cuantificado en 19 (Pederson, 2011; Baßler y Hurt, 2018). En el transcurso de la ruta biogenética ribosómica, posterior a la síntesis del precursor del rRNA, se requiere la escisión en fragmentos del pre rRNA unitario; en el caso del nucléolo mamífero, es escindida la partícula preribosómica 90S, lo cual origina las dos partículas pre ribosómicas 60S y 40S (Yoshikawa et al., 2015). Para ensamblar las partículas preribosómicas se requieren de diversos factores; por ejemplo, aquellos que participan actuando de manera trans, así como de las aproximadamente 47

y 33 proteínas que constituyen propiamente la subunidad grande y la pequeña, respectivamente (Martínez-Calvillo et al., 2019).

Más acción: disfunción o patología; una de las facetas

Al considerar la inmensa participación fisiológica del nucléolo en el desempeño de las células, fácilmente se puede comprender que alguna anomalía aconteciendo en el funcionamiento ordinario de la célula, afectaría directamente la estructura y los mecanismos propios del nucléolo y viceversa.

Esta estructura abarca tan amplia complejidad funcional que al desregularse o afectarse puede dañar, por ejemplo, la operación adecuada del sistema nervioso central; en casos de demencia se explica esta influencia pues regula la biosíntesis de los ribosomas y éstos, a su vez, la síntesis de las proteínas responsables de las actividades del SNC (Hartmann et al., 2018). Como se ha mencionado, algunos ejemplos de las afectaciones que sufre el nucléolo son consecuencia de presiones ambientales (bióticas y abióticas) o factores intrínsecos, a lo que reacciona como un sensor de estrés logrando arrestar inclusive hasta el ciclo celular (Powell, 2015; Kalinina et al., 2018; Yang et al., 2018). Estas presiones sobre la célula se traducen en morfologías *anormales* en el nucléolo y se han relacionado con una respuesta mediante la proteína p53 (Yang et al., 2018).

Se ha observado un mecanismo químico redox que subyace, al menos, algún tipo de respuesta al estrés nucleolar, cuando se glutationiza la proteína NPM1 en el azufre de una de sus cisteínas; lo anterior se explica considerando que el glutatión funciona como un antioxidante en diversos organismos. Aunado a estos cambios, sucede la translocación de NPM1 desde el nucléolo hacia el nucleoplasma, lo cual también se considera indicador de estrés nucleolar (Yang et al., 2016).

En su materia:

Genoma nucleolar:

Estructura u organización del DNA ribosómico

En el ser humano los genes ribosómicos, NORs, se localizan en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (Mangan et al., 2017). El que no exista una sola copia del gen ribosómico (de 43 kb, aprox.) -el número de copias totales, si se toman en cuenta los cinco cromosomas que los contienen, es aproximadamente de 400 (Malinovskaya et al., 2018)-, aunado a la alta afinidad que la RNAP1 tiene por los promotores del rDNA, tanto en su secuencia o en su estructura secundaria (Smircich et al., 2015), permite que se pueda satisfacer la demanda del proceso biosintético de ribosomas, en sintonía con los requerimientos impuestos por el contexto celular.

Para el caso del ribosoma procarionte, los transcritos constituyentes del ribosoma poseen los siguientes coeficientes de sedimentación: 23S, 16S y 5S.

El ribosoma eucarionte mamífero se compone, también de acuerdo con su coeficiente de sedimentación, por 4 especies de transcritos ribosómicos: 28S, 5.8S, 5S (pertenecientes a la subunidad 60S) y 18S (subunidad menor, 40S) (Yoshikawa et al., 2015; Dalla-Venezia et al., 2019). El transcrito primario o precursor (pre rRNA) -47S según Lu et al. (2018)- que contiene solo tres de las especies de rRNAs posee cuatro espaciadores; dos internos y dos externos (Yoshikawa et al., 2015; Baßler y Hurt, 2019). Diferentes autores han propuesto distintos valores para el RNA ribósomico precursor; según Potapova y Gerton (2019) en los mamíferos la unidad del precursor del rDNA que se transcribe presenta una longitud de 43-45 kb.

Algunos autores señalan que existen 2000 copias del 5S el cual presenta una longitud de 120 nt (Simon et al., 2018).

Otro aspecto peculiar sobre la organización de la familia de rRNAs resalta al observar que en eucariontes como *Saccharomyces cerevisie*, el 5S, pertenece a una sola unidad génica de transcripción junto con los otros: 16S-18S, 23S-28S; sin embargo, el 5S -tal como en la amplia diversidad de procariontes-, se transcribe en sentido contrario y a partir del molde en la otra cadena de DNA; este fenómeno difiere en una gran variedad de otros organismos eucariontes,

donde no forman parte de la misma molécula o unidad de transcrito (Nomura et al., 2013). Por supuesto que en el estudio biológico hay un universo de casos y pocas son las reglas, por ejemplo, los hongos muestran interesantes eventos evolutivos en lo que refiere a la historia evolutiva del rRNA 5S, v.gr., en pérdidas génicas, inversiones e inserciones (duplicaciones) (Bergeron y Drouin, 2008).

A continuación, se vuelve al organismo modelo en estudio, *Giardia lamblia*, con el propósito de mostrar las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos obtenidas en su base de datos:

28S

>GL50803_r0021 | Giardia Assemblage A isolate WB | 28S ribosomal RNA | genomic | AACB02000120 reverse | (geneStart+0 to geneEnd+0)| length=1818

CGGGGGCGACGGGCGGAACTTAAGCATATCAGTACGCCCCGGAGGAGAAACCAACCGGGATTCCCCGTAG
CGGCGAGCGACGCGGGAGGAGCCCGCCCCGAAGGCGCGCTGTGGGGCGCAGGCGCAGGCCCGCCGCGA
GGGGGCCCGAGGGCCCCGCCCGAGAGGGTGCAAGCCCCGTACGGCGGCCGCCGGGCCTGCGCGGCGAGT
AGCGCTGCTTGAGCGTGCAGCGCGAAGGGAGGCGCGGCCCTTCCAAGGCTAAATACGCCCCGGGACCGAT
AGCGGACCAAGTAGCGCGAGCGAACGGTGAAAAGGACGCCCTGCGGCCGCTCAAAAGACCTGAACCCGG
CCGGCCGCCGGCCCGCCGGCCCCGTCTCGAAACACGGACCGAGGAGCCACGCGCCGCGGCGAGCCCGAG
GGAGCCCCCGCGGCGGAGCGAGCGCGAGACGCCCCGGGCCCGCCATGCCCCTGCGGGCGTGCGCGGGCC
GAGCCGCGGCGCGTGGGCCCGAAAGGCGGTGATCTATGCCCGGCGAGGGCGAGGCCGGGCGAAAGCCTG
GTGGAGGCCCGCCGCGGTGCTGACGCGCAGATCGCTCGTCGGAGCCGGGCATGGGGGCGAAAGACTCAT
CGAACCGCCTGGTAGCTGGTTGCCTCCGAAATGTCTCCCAGGACAGCCGCCGCCCCGCAGTTGCGGCCCGT
AGAGCGCTGGCCGGCGGGAGCGGGGGGCCTGCCCCTCGCCCGCCCCCCAAACTCCGAAGGGCCGCGCCGC
CCCGCCGCTGGCCTGGGCGGGGCGGGCGAATGCGGGCGGCGCGTGGGCCCCTCCTGGTAAGCAGGACGG
GCGAGGCGGGACGATCCGGACGCCGGGCCAGGGTGCGCCGCCGGGGCCCGCGGAACGGCGTCGGCCGG
TCCCGACAGCTGGAAGGTGGCCCCAGAAGTCGGCATCCTCCAGGGAGTGTGTAACAACCCACCAGCCGAAT
CGGCCGGCCCGGAAAATGGAGCGCGCCGGAGCCCCGGACCCGCGCCCGGCCGCCGCGCGCGGCGGGTAG
GAGGCCGCAGAGGCCCCGGGGGCGAAGGCGGCGCGCAGGCCCCGCCGGACCGGCCTCTGGTGCAGATCT
CGGCAGCAGTAGCCGCTACTCCGCGCCCCGGAGGACTGAGGGGGAGACGGGTTCCGCGGCGCCTGCATCT
GGCCGCGGGTGACTCGGGCCTAAGCGGCGGGTGAAGACCGGGAAGGGGCGTGCCCGCCCGTCGAACGG
GGAGCCGGCGGAGACTCCGGCAGGCGCGGCCCCCGCGGAGACGCCCGCCCCCCGGCGACGCGCACGGGG
ACCGCGGCGGGCGGCGCCCCGGCCCGCGAACGCCCCGCAGCCCCCGGACGCCTTGCGCGGAGAGGGGGG

CCCGGGGGCGGACCCCGCGCGTCCCCGGCCGCCCCTGAAAAGCCGGGGGGCGCCGGCCGCGCGCCGTAC
CGACCGCAGCAGGACTCCGGGGTCAGCAGCCTCTAGCGCGGGAGCGAACGCGGCTCAGGGAAGTCGGCA
AGCCGGCTCCGTAACCTCGGGAAAAGGAGTGGCTCTGACGGCGCGCCGGGTCAGAACTGGAACGGACGC
GGGGATCCCGACTGTTTACTAGAAACACAGCGTCGCGAGGGCCGCACCCGGCGCTGGCGCGACGTGATTT
CTGCCCAGTGCCACGACCGTCACCGTGAAGCGATCCGCCGAAGCCCTGGTAAACGGCGGGAGTAACTATG
ACTCTCTTAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCGGGCAATTTCCGACGTGCATGAATGGACCAACGAGGATCCCA
CTGTCCCGAGCCGCG

(*Giardia* database, 2019).

18S

>GL50803_r0019 | Giardia Assemblage A isolate WB | 18S ribosomal RNA | genomic | AACB02000103 reverse | (geneStart+0 to geneEnd+0)| length=1449

CATCCGGTCGATCCTGCCGGAGCGCGACGCTCTCCCCAAGGACGAAGCCATGCATGCCCGCTCACCCGGGA
CGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAA
CCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGGGCGGGCGCCCGCGGGCGAGCAGCGTGACGCAGCGACGGCCCGC
CCGGGCTTCCGGGGCATCACCCGGTCGGCGCGGTCGCGGCGCGCCGAGGGCCCGACGCCTGGCGGAGAA
TCAGGGTTCGACTCCGGAGAGCGGGCCTGCGAGACGGCCCGCACATCCAAGGACGGCAGCAGGCGCGGA
ACTTGCCCAATGCGCGGCGCGCGAGGCAGCGACGGGGAGCGCGCGAGCGAGGCGGGCCCACAGCCCCCG
CCGCGGAGCCGAGGGCAAGGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCGGCGAGCGTCGCGCGGC
GCTGCTGCAGTTGAAACGCCCGTAGTTGGCCCCCCGCCGCCACGAGGAAACGGGAGCGCTCCAGGCAGGC
CCGTTGGACCCGCCGCGTGGGACCGCGCAGCGGGCGCGGCGCGCCGCGGCAGCCCCGAGGAGAGCGGGC
GGGGGCACCGGTACCGGCCGGGGACGGGTGAAACAGGATGATCCCGCCGAGACCGCCGGCCGCGCAGGC
GCCTGCCAAGACCGCCTCTGTCAATCAAGGGCGAAGGCCGGGGGCTAGAAGGCGATCAGACACCACCGTA
TTCCCGGCCGTAAACGGTGCCGCCCCGCGGCCGGCGCGCGCGTCCCGCCGGCCGCCCAGGGAAACCGGGA
GGCTCCGGGCTCTGGGGGGAGTATGGCCGCAAGGCTGAAACTTGAAGGCATTGACGGAGGGGTACCACC
AGACGTGGAGTCTGCGGCTCAATCTGACTCAACGCGCGCACCTCACCAGGCCCGGACGCGCGGAGGACCG
ACAGCCGGGCGCGCTTTCGCGATCGCGCGGGCGGTGGTGCATGGCCGCTCCCAGCCCGTGGCGCGAGCCG
TCTGCTCCATTGCGACAACGAGCGAGACCCCGGCCGCGGGCGCCGCGGGACGGCCCGCGCGAGCGGGAG
GACGGCGGGGCGATAGCAGGTCTGTGATGCCCTCAGACGCCCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGG
GCCAGCCGGCGCCCGCGAGGACGCGCGGAGCCCCCGCCGTGGCCGGGACCGCGGGCTGGAACGCCCCCG
CGCACCAGGAATGTCTTGTAGGCGCCCGCCCCCACCGCGCGCCGGACGCGTCCCTGCCCCTTGTACACACC

GCCCGTCGCTCCTACCGACTGGGCGCGGCGGCGAGCGCCCCGGACGCGCGAAGGGCCGCGAGCCCCCGC
GCCTGGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTATCCGTAGGTGAACCTGCGGATGGATCC

(*Giardia* database, 2019).

5.8S

>GL50803_r0018 | Giardia Assemblage A isolate WB | 5.8S ribosomal RNA | genomic | AACB02000103 reverse | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=73

CGAGCCCCCGCGCCTGGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTATCCGTAGGTGAACCTGCGGATGGATCCC
TCG

(*Giardia* database, 2019).

5S

>GL50803_r0007 | Giardia Assemblage A isolate WB | 5S RNA | genomic | AACB02000013_frag forward | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=120

CAGTTCGGCCATCCTACGGCGGAAACTCCTTAACTCGTTCCGAATTAAGAAGAGAAGCGCCGTCAGGCCCC
GCCAGTACTGCGATCGGAGACGTCGTGGGAACACGGGGTGCCGAACTTT

(*Giardia* database, 2019).

Proteoma nucleolar:

Elementos de la estructura proteínica del nucléolo

Además de los ácidos nucleicos y proteínas comúnmente estudiados en el nucléolo, múltiples biomoléculas coalescen en su interior. Por ejemplo, RNA y proteínas que no participan en la biosíntesis del ribosoma ni forman parte de él estructuralmente; e incluso lípidos. Según la proteómica más conservadora, de Pollard y Earnshaw (2008), alrededor de 690 proteínas componen al nucléolo, sin embargo, análisis más recientes ofrecen una cuantificación con un mayor número de elementos. Por ejemplo, en seres humanos, para Leung et al. (2006) existen ~728. Un par de años después el proteoma nucleolar humano, había aumentado a aproximadamente 50000 péptidos y 4500 proteínas (Ahmad et al., 2009; O'Day, 2019).

Para el caso de los vegetales, empleando al género *Arabidopsis* como modelo, Brown et al. (2005) han identificado como componentes del proteoma nucleolar a 217 proteínas. Versiones proteómicas más recientes reportan 1602 proteínas (Palm et al., 2016).

Del proteoma nucleolar, aproximadamente un 30 % funge como factores relacionados con la biogénesis ribosómica (O'Day, 2019), más de un tercio se relaciona con la transcripción y el procesamiento de RNA y codifica para las proteínas ribosómicas; otro 30 % codifica genes no caracterizados (Lam et al., 2005; Cmarko et al., 2008; Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015; Montacié et al., 2017).

Giardia lamblia en panorámica: ¿Quién es?

El microorganismo *Giardia lamblia* -quien presenta las sinonimias *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*- fue reportado por Anton van Leewenhoek en 1681 (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010; Luján y Svärd, 2011) al analizar muestras de heces fecales. Algunos autores como Adam (2001) han mencionado que este parásito fue nombrado en 1915 por Kofoid y Christiansen. Sin embargo, Lipoldová (2014) y el Centro de Control de Enfermedades estadounidense (CDC, 2019) refieren a Charles Wardell Stiles, como el responsable de nominar a *Giardia lamblia* en honor a los investigadores, francés y checo respectivamente, Alfred Mathieu Giard (Lipoldová, 2014) y Vilém Dušan Lambl (1859) (Cox, 2002). *Giardia lamblia* fue descrita por V. D. Lambl en 1859 (Shaw, 2010; Pederson, 2011).

Dentro de la clasificación evolutiva de los organismos se ha clasificado taxonómicamente como perteneciente a los Eukaryota; Diplomonadida; Hexamitidae; Giardiinae; Giardia (KEEG, 2018). Por su parte el grupo de Tůmová, lo posiciona contenido en los taxa Diplomonadidae, Excavata (2016).

En el presente estudio se empleó a *Giardia lamblia* como modelo para abordar la biología del nucléolo. Es un organismo eucarionte, monocelular, de divergencia temprana que ha permitido obtener resultados interesantes en el ámbito de la biología celular, molecular y evolutiva (Ankarklev et al., 2010; Luján y Svärd, 2011). Globalmente es uno de los principales parásitos entéricos en el ser humano (Brown et al., 2016; Troeger et al., 2007) y de una amplia variedad de vertebrados.

Con este organismo se han estudiado el origen y la historia evolutiva de las células eucariontes (Sogin et al., 1989; Adam, 2001; Morrison et al., 2007; Luján y Svárd, 2011), así como procesos, mecanismos, funcionamiento y estructuras celulares (Kabnick y Peatti, 1990; Marti y Hehl, 2003; Tovar et al., 2003; Jiménez-García et al., 2008; Túmová et al., 2015; Lara-Martínez et al., 2016).

Este parásito unicelular posee un ciclo de vida complejo con una fase móvil y una sésil: trofozoíto y quiste, respectivamente. El estado de trofozoíto presenta una estructura celular constituida por cuatro pares de flagelos dispuestos con una simetría bilateral, un disco adhesivo ventral, un funis y un cuerpo medio. El estado quístico se caracteriza por una apariencia oval sin estructuras del

citoesqueleto, como los flagelos y el disco adhesivo ventral, donde el parásito entra en una latencia metabólica. El quiste representa su fase infectiva.

En *Giardia lamblia* una estructura celular notable es el arreglo de su citoesqueleto, constituido por: cuatro pares de flagelos, un disco adhesivo ventral, la presencia de cuerpo medio y un funis (Adam, 2001; Benchimol y De Souza: Luján y Svärd 2011). También muestra la presencia de dos núcleos (Kabnick y Peatti, 1990), una red tubular vesicular y diversos tipos de vesículas (Abodeeley et al., 2009). Además, se han descrito estructuras subcelulares que antes se pensaban ausentes: los mitosomas (Tovar et al., 2003) y unos nucléolos pequeños (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2010).

Su genoma está constituido, según Morrison et al. (2007) por ∼11.7 Mbp; sin embargo, datos más recientes proponen ~10.7–12 Mbp (Ankarklev et al., 2015); tal número de pares de bases se encuentra distribuido en 5 cromosomas (Morrison et al., 2007; Tůmová et al., 2016). Por ejemplo, secuencias relacionadas con los genes ribosómicos como: 18S rDNA, espaciadores ribosómicos intergénicos, regiones ITS y rDNA 5.8 se localizan en múltiples cromosomas. En *Giardia lamblia* no solo se encuentra rDNA en su nucléolo, además se ha reportado en regiones subteloméricas (Luján y Svärd, 2011).

Se han descrito como constituyentes del proteoma giárdico aproximadamente a 5000 proteínas (Morrison et al., 2007).

ANTECEDENTES

¿Cómo es la ultraestructura nucleolar de *Giardia lamblia*?

Hasta una época muy reciente *Giardia lamblia* había sido considerado como el único organismo eucarionte carente de nucléolo (Narcisi et al., 1998; Xin et al., 2005).

Alrededor de la década pasada el laboratorio de Jiménez-García (2008) derribó lo que había sido un persistente paradigma: el único eucarionte anucleolado. Dichos aspectos de la biología celular y nuclear de *Giardia lamblia* ulteriormente (2010) fueron confirmados de nuevo por Tian et al. (2010).

Los nucléolos de *Giardia lamblia* presentan una disposición sub y anteronuclear, con componentes fibrilares y granulares (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2009). Son relativamente pequeños al medir 0.2-0.5 µm (200-500 nm) (Jiménez-García et al., 2008: Tian et al., 2010). Aunque se conoce la presencia de nucléolo en *Giardia lamblia* y hay evidencias de compartimentación (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2010) no se ha caracterizado la distribución ultraestructural de sus componentes, con resolución espacial suficiente para determinar la regionalización (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2010; Lara-Martínez et al., 2016; Jiménez-García et al., 2017).

En la actualidad se ha reportado, que algunos eucariontes microbianos como *Giardia lamblia,* no presentan una arquitectura nucleolar tripartita, a diferencia de lo que es común en la mayoría de los mamíferos; observándose un nucléolo con dos componentes fibrogranulares, principalmente uno granular extenso, como en el caso de tripanosomátidos (Ogbadoyi et al., 2000, López-Velázquez et al., 2005; Nepomuceno-Mejía et al., 2010).

En adición a las ya mencionadas diferencias sobre el nucléolo de *Giardia lamblia*, estudios más recientes han propuesto que su nucléolo es persistente y para su reestructuración, o nucleologénesis, a través del ciclo celular al terminar la mitosis, no es necesaria la presencia de los PNBs (Lara-Martínez et al., 2016). Una nucleologénesis semejante es llevada a cabo por *Trypanosoma cruzi*, agente infectivo causante del mal de Chagas (Nepomuceno-Mejía et al., 2016). La persistencia del nucléolo a lo largo de la división celular permite especular sobre la permanencia de su actividad a lo largo de todo el ciclo celular (Lara-Martínez et al., 2016).

El objetivo de este estudio fue: definir el arreglo espacial del nucléolo dentro del núcleo; determinar la presencia o ausencia de subestructuras nucleolares y en caso de encontrarlas; caracterizar su aspecto ultraestructural.

JUSTIFICACIÓN

Giardia lamblia funciona como modelo en diversos ámbitos del estudio biológico. Es un organismo interesante para la biología celular y la microscopía debido a que recientemente le fue descubierto un diminuto nucléolo, el cual se creía ausente. El estudio del nucléolo en este parásito provee información sobre la biología celular, molecular, evolutiva y bioquímica de una estructura que regula jerárquicamente una gran cantidad de procesos desde el interior de la célula. Además, debido a que representa un amplio problema de salud pública a nivel mundial, profundizar el conocimiento previo sobre su biología puede repercutir incluso en la clínica que se ocupa del tratamiento de la giardiasis.

HIPÓTESIS

Si el nucléolo de *Giardia lamblia* es similar al de otras especies, entonces presenta centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular diferenciados espacialmente.

OBJETIVOS

Caracterizar la distribución espacial de los componentes nucleolares de *Giardia lamblia*.

Como objetivos particulares se buscó determinar la distribución tridimensional intranuclear de:

1) el nucléolo,

2) los centros fibrilares (FC),

3) el componente fibrilar denso (DFC) y

4) el componente granular (CG).

A través de técnicas de microscopía electrónica de transmisión estándar y procesamiento digital de imágenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Métodos generales

Análisis de la ultraestructura del nucléolo de trofozoítos de *Giardia lamblia* con TEM estándar (Jiménez-García et al., 2008), sin tratamiento.

A) Generación de imágenes tridimensionales a partir de estereopares producidos con un goniómetro acoplado al microscopio electrónico.

B) Reconstrucción tridimensional a partir de cortes seriados.

Cultivos

Se cultivaron trofozoítos de *Giardia lamblia* de la cepa WB en condiciones axénicas en medio de cultivo TYI-S-33 (Kesiter, 1983) suplementado con 0.7 g/l de bilis bovina y ovina (SIGMA Cat. N° B8381), 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL Cat. N° SH-30072.03) y una mezcla de antibióticos: ampicilina 0.2 g/l y ceftazidima 0.2 g/l (Ampicillin salt sodium SIGMA Cat. N° A9518) (ceftazidima "Izadima" TM). Inicialmente los cultivos se realizaron en tubos de borosilicato de 13 x 100 con tapón de rosca (Pyrex™) conteniendo 7 ml de medio de cultivo a 37 °C durante 72 horas para obtener una semiconfluencia.

Transcurridas las 72 horas, los tubos de cultivo se sumergieron en un baño de hielo durante 20 minutos para relajar a los parásitos, separar la monocapa y centrifugarlos por 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C (Hettich centrifuge Mod. Universal 32R). Los botones celulares se lavaron con PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril frío para realizar el conteo de una población en un hemocitómetro (Propper Lumicyte™ Cat. N° LCB) con un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo Axiostar) y continuar su procesamiento.

También se tomó un inóculo de estos botones celulares de 5 x 10^5 trofozoítos, los cuales crecieron por 48 horas más en vasos de coplin de tapa de rosca (Pyrex™) conteniendo 21 ml de medio y cubreobjetos (Corning N°1 de 22 x 22 mm) previamente sometidos a ácido acético glacial al 96 % (CTR Scientific) y alcohol etílico al 70 % (Hycel N°1822) y colocados en autoclave, con la finalidad de dar porosidad al vidrio y permitir la adherencia de los parásitos.

Procesamiento de la muestra/ técnica convencional para TEM

Fijación

Glutaraldehído 2.5%/ Paraformaldehído 4% por 90 min en PBS (0.1 M; pH 7.5)

⇩

Lavados

PBS, 3 de 5 min c/u

⇩

Postfijación (se puede omitir)

Tetraóxido de osmio al 1% por 90 min

⇩

Lavados

PBS, 3 de 5 min c/u

⇩

Deshidratación

EtOH 30%, 1 cambio de 5 min

50%, 1 cambio de 10 min

⇨

Evaporación del óxido de propileno

Óxido de propileno: Epon, dilución 1:1, toda la noche o 24 hrs

Agente intermediario

100%, 2 cambios de 10 min

96% 1 cambio de 10 min

90%, 1 cambio de 10 min

80%, 1 cambio de 10 min

70%, 1 cambio de 10 min

⇨

Inclusión

Resina époxica fresca en moldes

⇩

Polimerización

A 60°C durante 24-48 hrs

Figura 2. Diagrama de flujo para la preparación de la muestra.

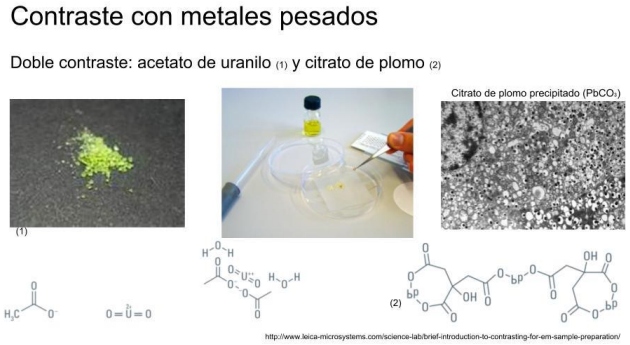


Figura 3. Ejemplo de doble contraste para TEM.

Figura 4. El goniómetro. Accesorio del TEM que permite cambiar el ángulo de incidencia del haz y la posición de la muestra.

Posterior a la obtención de cortes únicos, de su análisis con diferentes inclinaciones mediante el empleo del goniómetro y la generación de estereopares, se procedió a la captura de imágenes en cortes sucesivos con el propósito de reconstruir tridimensionalmente el núcleo con su nucléolo.

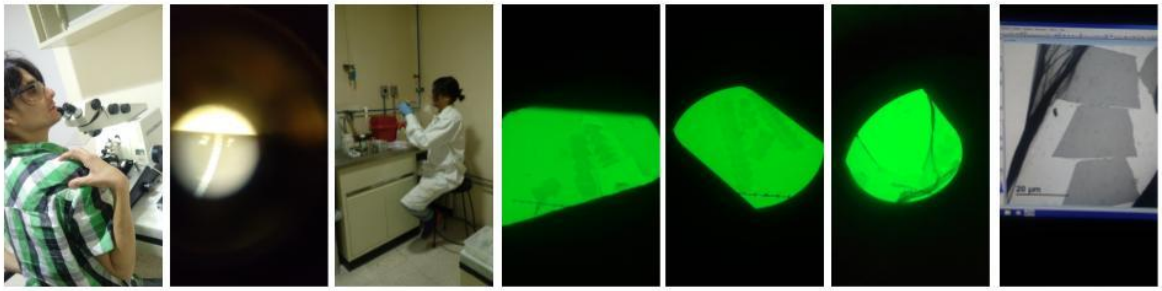


Figura 5. Sucesión de fotografías para la creación de cortes en serie. Se muestra el proceso para la obtención de cortes seriados: el empleo de ultramicrotomo; la deposición de la serie o *tira* de cortes sobre la superficie del agua; el doble contraste con metales pesados; la observación en la pantalla fluorescente del TEM y; finalmente se capturan imágenes digitales en el computador.

RESULTADOS

Figura 6. Fotomicrografía del trofozoíto de *Giardia lamblia.* Imagen generada a partir de un corte semifino teñido con azul de toluidina, en campo claro. Se observa principalmente una célula en un corte longitudinal, muestra dos núcleos (N) cada uno con una inclusión de mayor densidad, correspondiente a los nucléolos (No). Cuerpo medio (CM) y flagelos (F). Campo claro y objetivo de inmersión. Corte semifino. Inclusión, Epon.

En la figura 6 se observa tinción de regiones periféricas intranucleares que sugieren la presencia de material nucleolar. En la siguiente sección se presenta una serie de imágenes Las figuras 7, 8, 9 y 10 corresponden al nucléolo de *Giardia lamblia* (GL). Las imágenes son micrografías electrónicas,

cuya preparación se basó en la técnica TEM convencional con doble contraste (producido por sales de uranio y plomo).

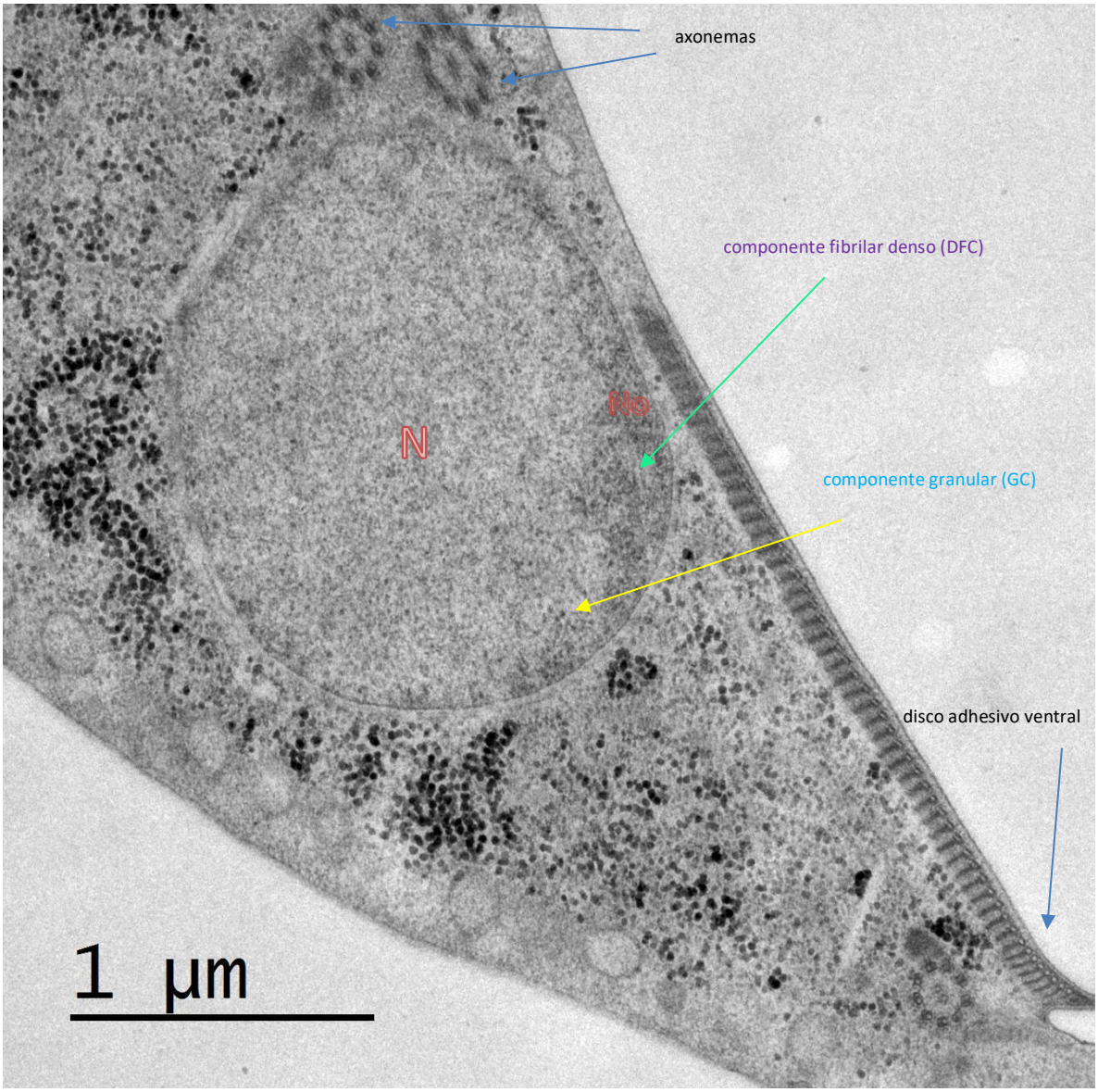


Figura 7. Micrografía electrónica de *Giardia lamblia*.

Se observa al núcleo (N) conteniendo a un nucléolo (No) periférico con componentes fibrogranulares bien definidos. Además, se puede apreciar al disco adhesivo ventral y a los axonemas; algunos de los componentes ultraestructurales del citoesquelto de *Giardia lamblia*.

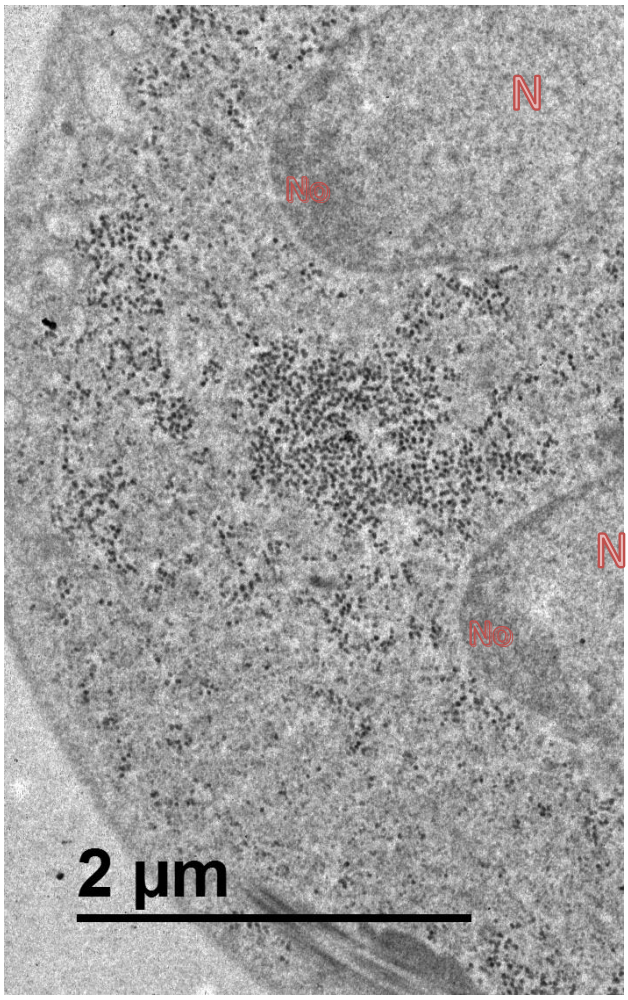


Figura 8. Micrografía electrónica de *Giardia lamblia*. Se aprecia la presencia de nucléolo (No) en ambos núcleos (N).

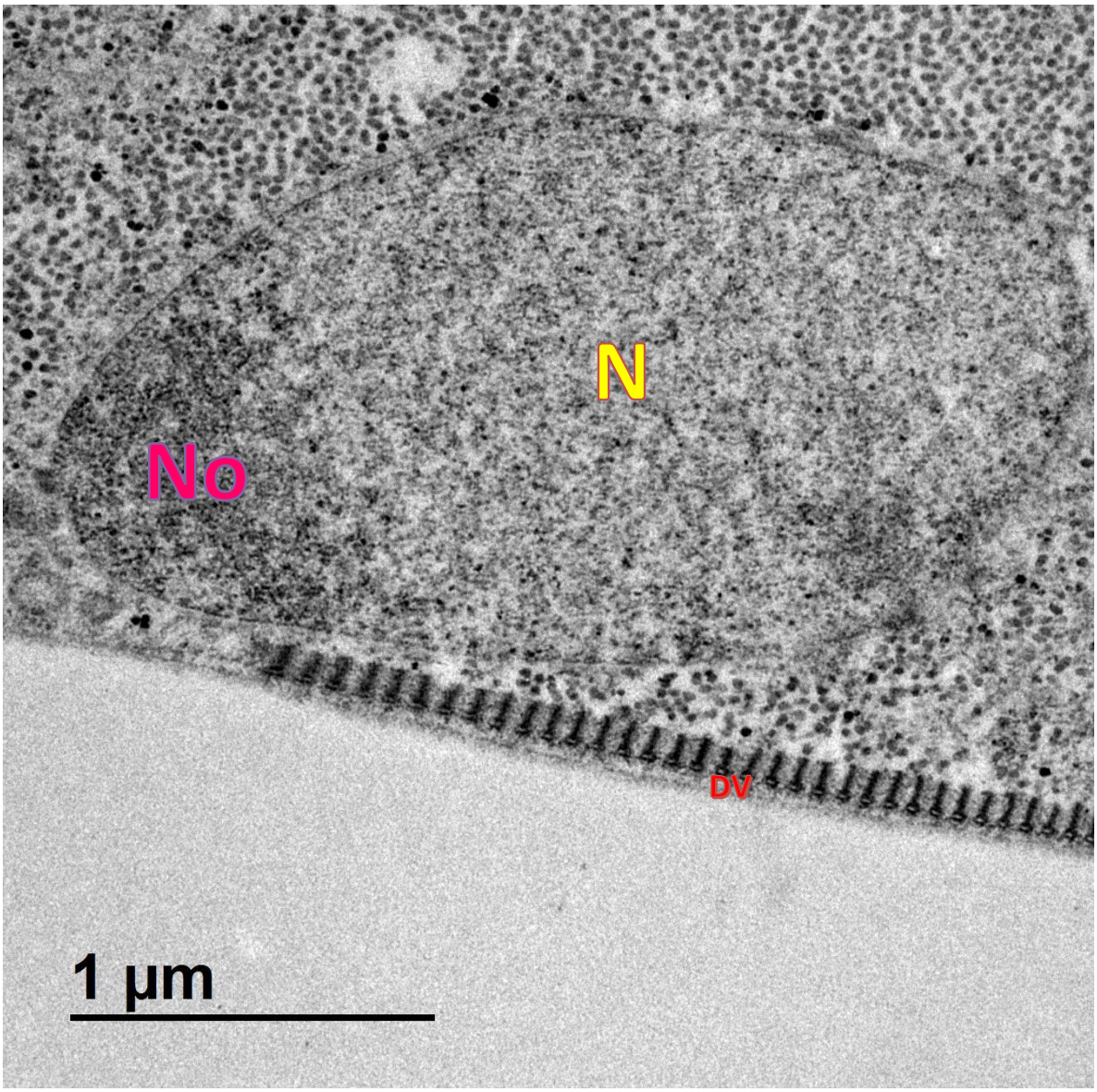


Imagen 9. Micrografía electrónica que muestra la ultraestructura del nucléolo de *Giardia lamblia*. El nucléolo (No) se observa como una zona densa a los electrones, periférica y fibrogranular dentro del núcleo (N). DV, disco ventral.

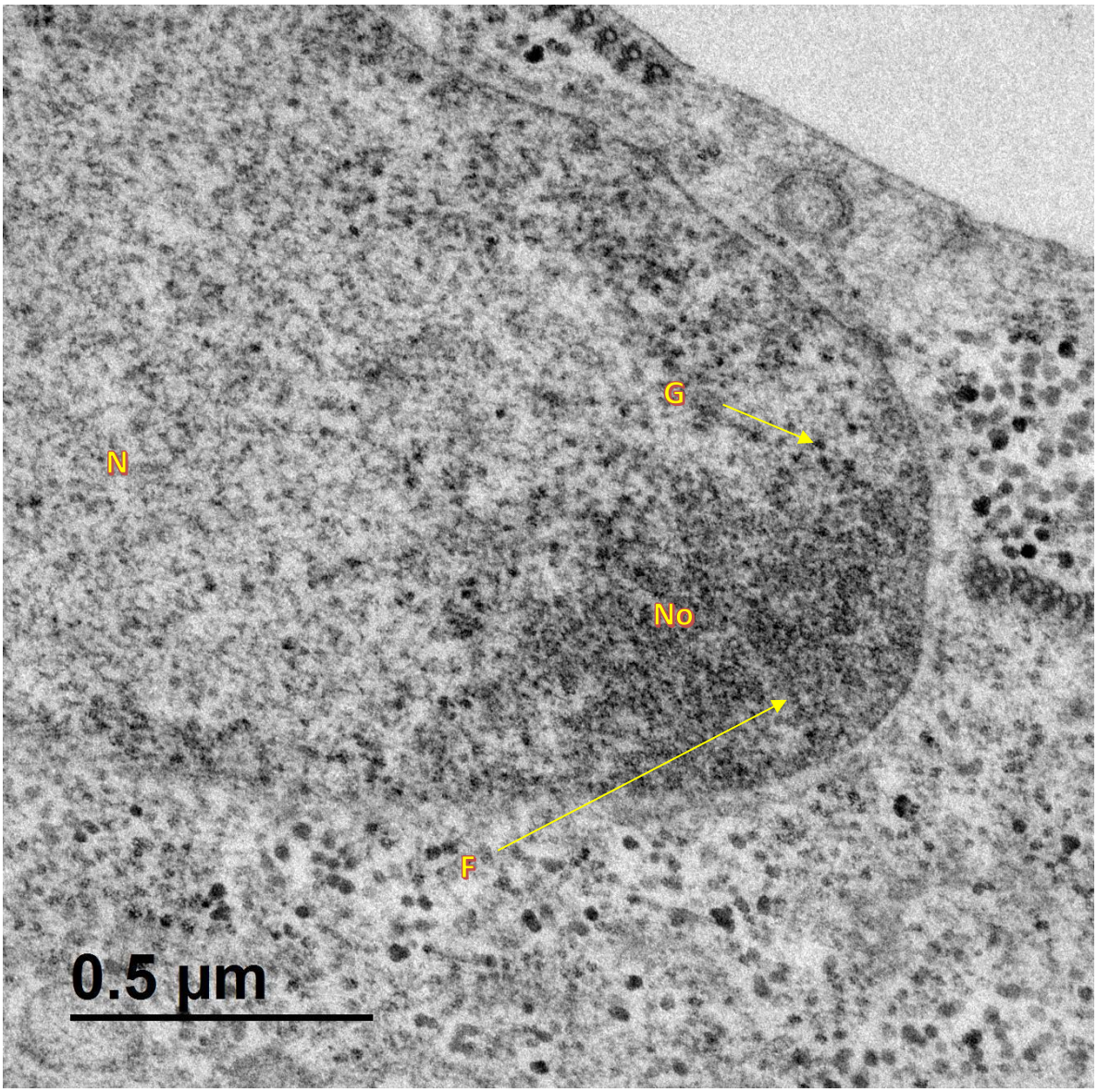


Figura 10. Estructura fina del nucléolo de *Giardia lamblia*. No se observan centros fibrilares como se han descrito. Se evidencian los elementos fibrosos (F) y granulares (G).

A continuación, se muestra una de las imágenes anáglifos construidas a su vez a partir de las micrografías electrónicas estereopares (referirse al método para más detalles).

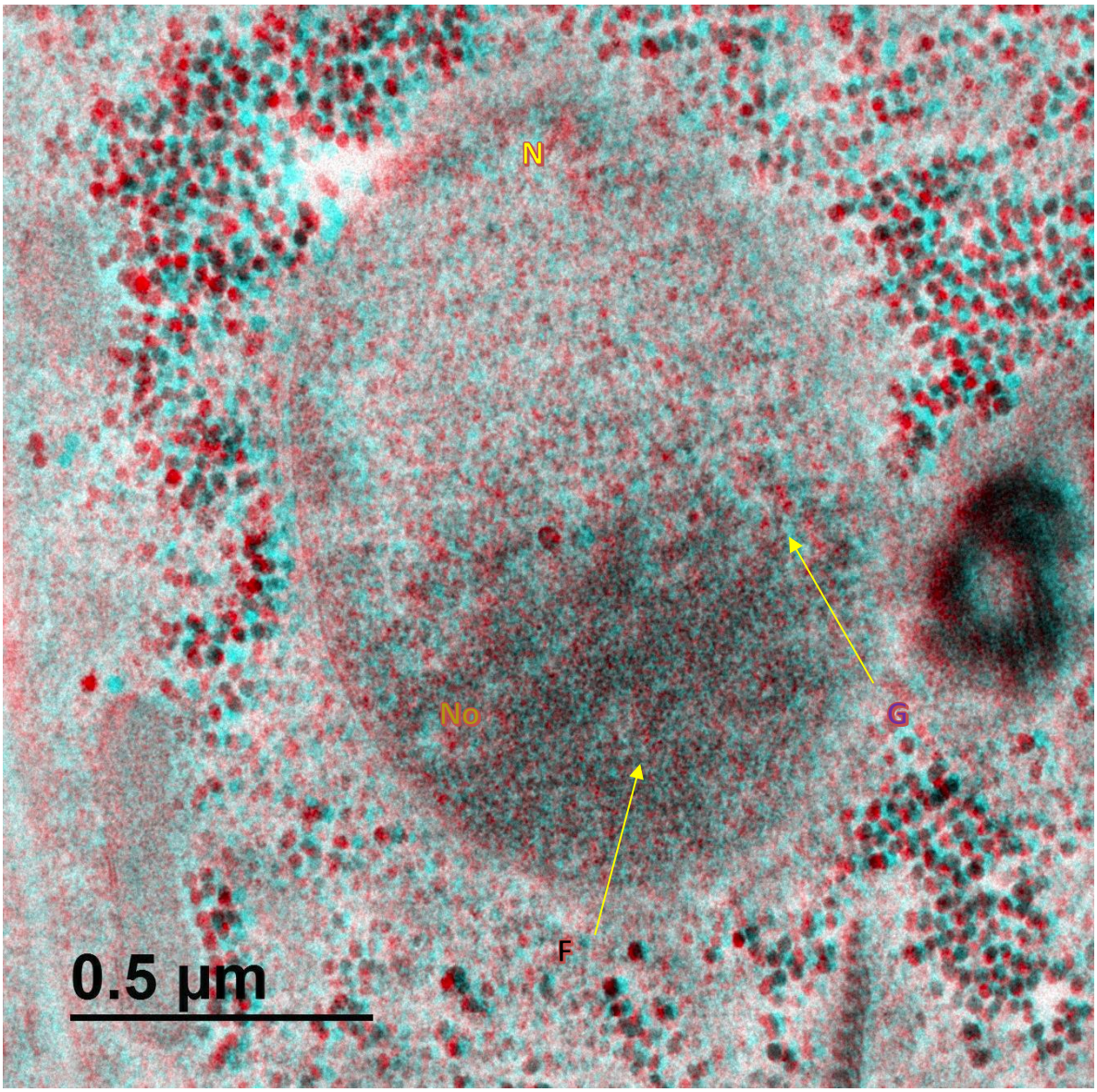


Figura 11. Anaglifo del nucléolo del trofozoíto de *Giardia lamblia*. En el interior del núcleo (N) se observan los componentes fibrogranulares (F; G) del nucléolo (No) periférico localizados en diferentes niveles de profundidad del corte.

Los anáglifos se generaron con el objetivo de caracterizar las relaciones espaciales entre los componentes fibrosos y los granulares, los cuales fueron identificados recurrentemente a lo largo de las pruebas previas. En la figura 11 es posible observar, también, que no se notan centros fibrilares.

Una vez analizado el espesor de un corte ultrafino, con el empleo y sin el uso de anaglifos, se decidió profundizar el análisis, al buscar la relación de los componentes ultraestructurales del nucléolo de *Giardia lamblia* en un volumen mayor; para mostrar si un nucléolo completo contiene centros fibrilares en alguna región, se prepararon cortes seriados y se reconstruyó su imagen tridimensionalmente. Debido a las dificultades técnicas, la obtención de series de cortes que incluyeran la totalidad del volumen de los núcleos y nucléolos no fue posible; sin embargo, considerando las dimensiones teóricas del nucléolo de *Giardia lamblia*, el espesor y número de cortes podemos aseverar que más de la mitad del núcleo fue reconstruido totalmente. Lo anterior, en consenso con estudios recientes sobre otros parásitos, permite proponer que incluso nucléolos completos de *Giardia lamblia* no presentan centros fibrilares como se han descrito hasta ahora.

Además de la identificación de los subcomponentes del nucléolo, se buscó determinar la relación del nucléolo con la periferia nuclear interna. La reconstrucción tridimensional permitió obtener información al respecto.

Se muestra a continuación una serie representativa de las micrografías que corresponden a una sección del núcleo y del nucléolo de *Giardia lamblia*; es decir, los cortes seriados empleados para realizar la reconstrucción tridimensional.

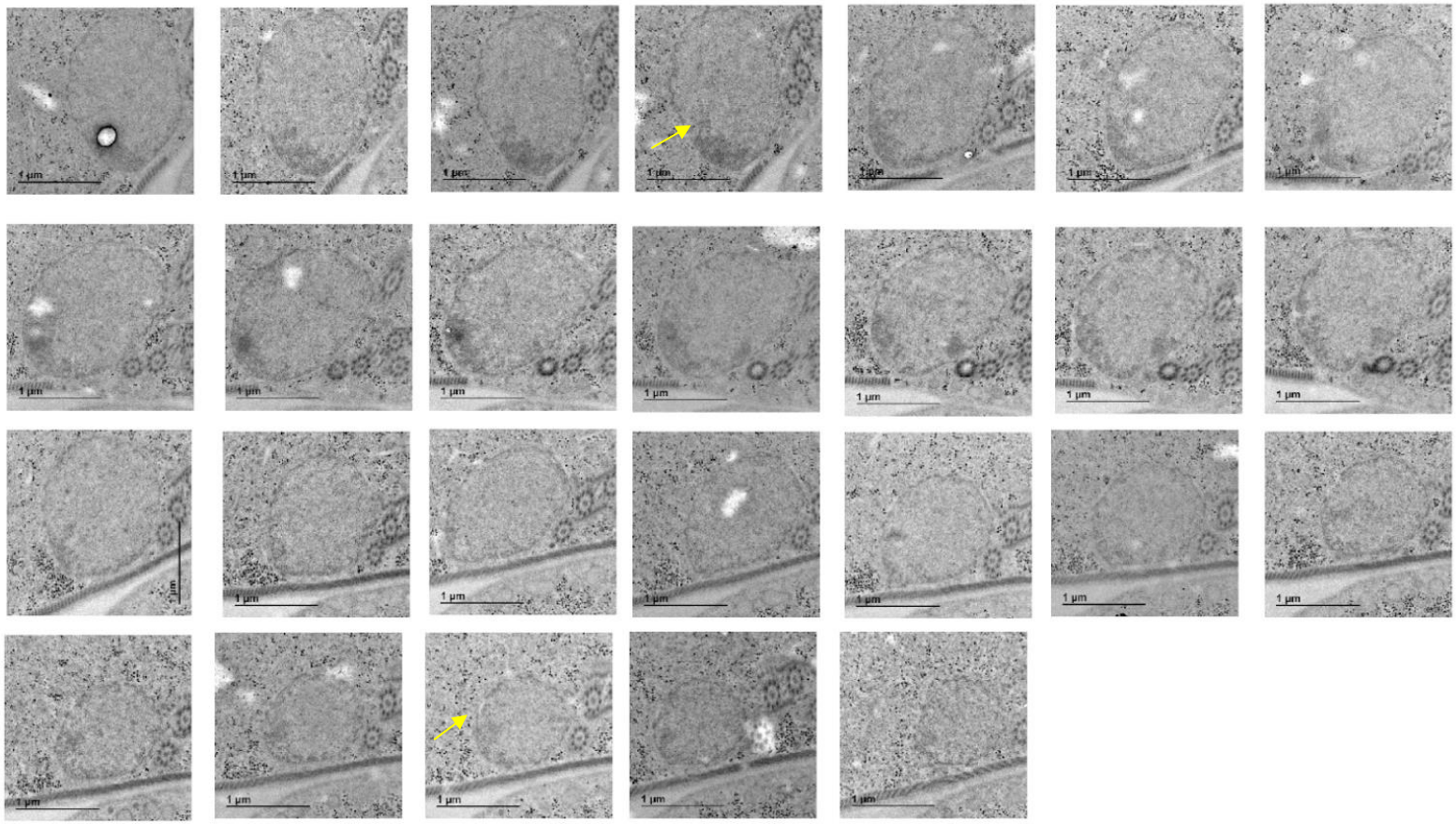


Figura 12. (A-Z) Micrografías electrónicas de cortes seriados, 27 con un espesor de ≈ 60 nm, del nucléolo de *Giardia lamblia*. Los nucléolos periféricos (flechas) muestran regiones de contacto y no contacto con la periferia.

Con el objetivo de obtener una mayor resolución en la identificación de los componentes ultraestructurales del nucléolo de GL, y de determinar el grado de asociación, los puntos de contacto o las asociaciones del nucléolo con la membrana nuclear, las series de cortes fueron procesadas para realizar una reconstrucción tridimensional con el programa de libre uso Free-D (Free-D, 2018). El programa permite sobreponer una imagen -las micrografías de dos dimensiones- sobre otra, para luego reconstruir una imagen en tres dimensiones.

Dada la dimensión del nucléolo de *Giardia lamblia* -alrededor de 1-2 µm- y el espesor de los cortes en serie ultrafinos -de 60 nm, aproximadamente- necesarios para el análisis con microscopía electrónica de transmisión, se concluye que, al obtener un intervalo de 20 a 30 cortes, es posible aseverar que se contiene en la reconstrucción tridimensional, al menos el 80 % del material nucleolar, cuando no la totalidad de éste. Por lo anterior, pese a las dificultades técnicas para la obtención de la totalidad de los cortes seriados que habrían de contener todo el material nucleolar del espécimen, podemos confirmar de manera robusta, aunque no definitiva tanto la posición periférica del nucléolo dentro del núcleo, donde el nucléolo no contacta totalmente la periferia nuclear, así como la presencia de un nucléolo con únicamente componentes fibrosos y granulares.

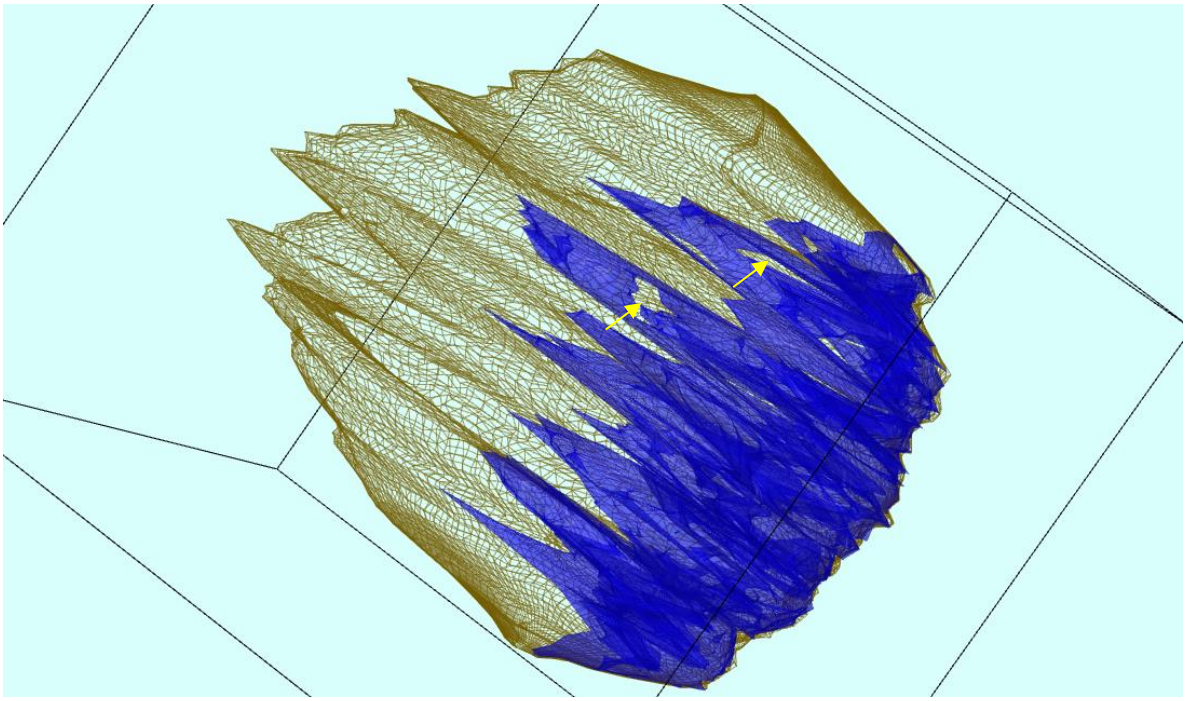


Figura 13. Reconstrucción tridimensional de núcleo y nucléolo. El núcleo se observa desde una

perspectiva longitudinal (el contacto con la periferia no es uniforme; ejemplos se indican con flechas).

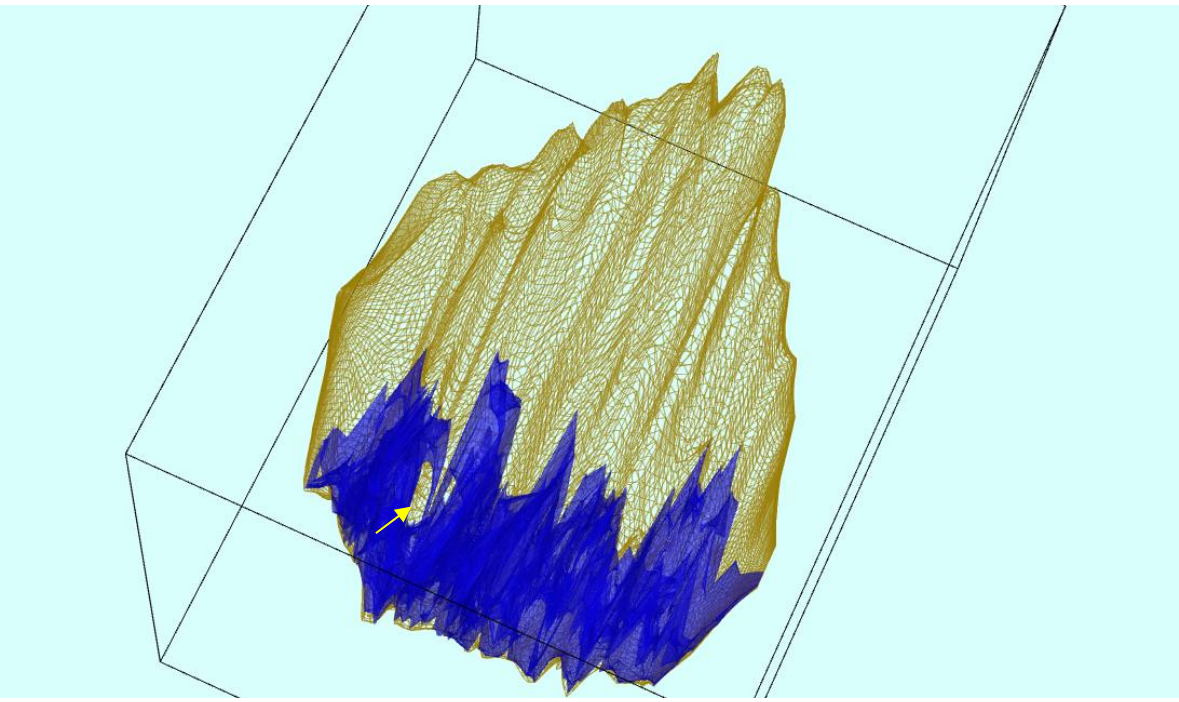


Figura 14. Reconstrucción tridimensional de núcleo y nucléolo desde una perspectiva longitudinal.

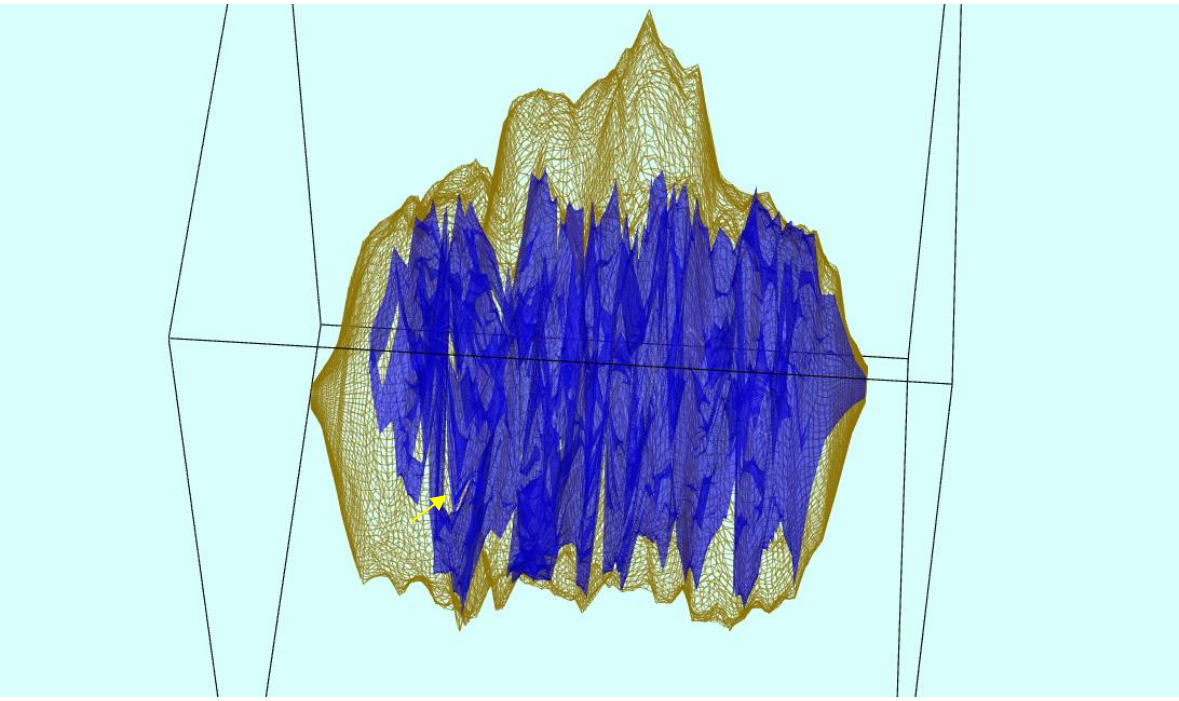


Figura 15. Reconstrucción tridimensional del núcleo y nucléolo desde una perspectiva longitudinal.

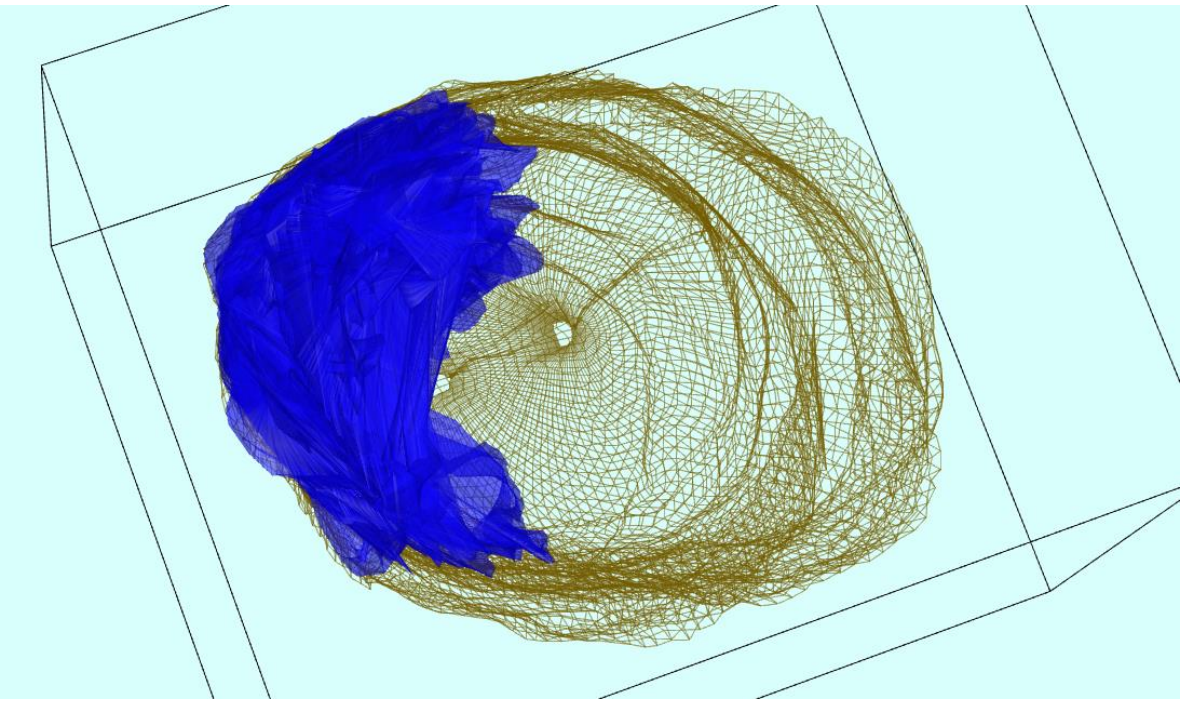


Figura 16. Reconstrucción tridimensional del núcleo y nucléolo de *GIardia lamblia* desde una perspectiva transversal.

DISCUSIÓN

Nucléolo giárdico

Los resultados de este trabajo coinciden tanto con lo reportado por Jiménez-García et al. (2008) como con las conclusiones obtenidas por Tian et al. (2010), donde se confirma la presencia de un diminuto nucléolo, de 200 nm, en el parásito *Giardia lamblia*.

Sin embargo, existen discrepancias con este último grupo (Tian et al., 2010), pues su investigación asevera que el nucléolo de *Giardia lamblia* presenta una anatomía microscópica tripartita, i.e., constituida por centros fibrilares, un componente fibrilar denso y uno granular. A este respecto, el presente estudio reporta que, hasta el momento, acorde con los resultados de Jiménez-García et al. (2008), Lara-Martínez et al. (2016) y Jiménez-García et al. (2017), no se ha observado la presencia de centros fibrilares en *Giardia lamblia*, como un componente de su nucléolo.

Centros fibrilares: presencia, ausencia o una cuestión de definición

Se observó un material fibrogranular denso a los electrones, que este material corresponde a lo descrito previamente como nucléolo por sus elementos fibrogranulares, densidad electrónica y asociación periférica (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2010; Lara-Martínez et al., 2016; Jiménez-García et al., 2017). La dinámica del nucléolo dentro del núcleo muestra que, al analizar las imágenes previas, se observa al componente fibrilar y al granular distribuidos en el espacio de un corte ultrafino. Dado que no fueron reportados los centros fibrilares en cortes sencillos, se buscó una estrategia para descartar que se encontraran en otras áreas del nucléolo, con este objetivo se realizaron cortes seriados. En este trabajo, el análisis ultraestructural, incluso de cortes seriados, mostró que el espacio en el que se localiza nucléolo no se detectan centros fibrilares. Lo cual puede deberse a la necesidad de un muestreo mayor o a que quizá se requiera de una tinción especial para observarlos. La ausencia de ellos podría significar que no funjan como un componente fundamental para llevar a cabo las funciones nucleolares; si no se descarta que existan estos centros fibrilares, quizá, por ejemplo, en las células analizadas se redujeron al máximo, entonces, convendría analizar el estado fisiológico de los especímenes, como la fase del ciclo celular en el que se encuentren.

Si se considera que no existe un consenso absoluto sobre las actividades realizadas por cada subcomponente del nucléolo y/o las biomoléculas características residentes en ellos, empero, una

de las actividades y de los complejos proteicos nucleolares más ampliamente aceptados en el campo, menos sujetos a debate, son: la residencia del gen ribosómico y la posible asociación de la holoenzima RNAP1 con éste, al interior de los centros fibrilares. Por tanto, si hacemos notar la ausencia de centros fibrilares, se tiene que aceptar que a) los genes ribosómicos no se hallan en el centro fibrilar, b) que se encuentran en un arreglo que impide observarlos en la manera esperada, es decir, *críptico* a la técnica microscópica empleada, o, c) una combinación de ambas posibilidades.

Se hace hincapié que, pese a que Tian et al. (2010) ha descrito centros fibrilares con antelación, tanto en la inspección de diversos cortes sencillos y aleatorios, como en el análisis de nucléolos en cortes seriados y dado el alcance de nuestra reconstrucción, el presente trabajo indica la ausencia de centros fibrilares.

Posición intranuclear del nucléolo

En cuanto a la intermitencia del contacto de la superficie del nucléolo con la membrana del núcleo, se puede suponer que quizá estos puntos de contacto sean dinámicos y vayan alternándose a través del tiempo, en respuesta a las fases del ciclo celular, a las contingencias ambientales o a ambas. Es probable que una asociación no homogénea responda a necesidades fisiológicas aún no descritas.

Estudiando en las micrografías electrónicas el grado de interacción aparente del nucléolo con la membrana nuclear, no se ha notado un contacto homogéneo o continuo con la periferia/membrana nuclear; existen regiones donde no hay tal asociación. Por tal motivo se generó una reconstrucción tridimensional, con el interés de resaltar si a lo largo y ancho de la asociación núcleo-nucléolo, el contacto también es discontinuo.

La reconstrucción basada en cortes seriados también mostró un contacto núcleo-nucléolo intermitente.

Aspectos evolutivos

La estructura nucleolar, como se ha descrito tradicionalmente, basada en un arreglo tripartita no es universal; lo que evidencia que existe diversidad de morfologías y arquitecturas en el organelo, así como que han sucedido procesos evolutivos a lo largo de la historia de esta estructura.

El caso del nucléolo bipartita de *Giardia lamblia* puede parecer un ejemplo particular de ultraestructura nucleolar al cotejarse, por ejemplo, con el arreglo del nucléolo en el ser humano u otros eucariontes con una estructura tripartita. Sin embargo, algunos autores como Thiry y Lafontaine (2005) han resaltado, de acuerdo a sus investigaciones, que la disposición nucleolar bipartita, carente de centros fibrilares, la cual muestra únicamente componentes fibrogranulares, no es un caso aislado sin una aparición reciente en la evolución asociada al surgimiento del clado de los amniotas y común a este grupo.

Al considerar lo anterior, podemos especular que la ausencia de centros fibrilares es: 1) una consecuencia del origen evolutivo antiguo, que no primitivo, de *Giardia lamblia*, el cual se manifiesta presentando regiones intergénicas en el rDNA, de poca longitud en comparación con otros organismos que aparecieron posteriormente en la historia evolutiva y quienes sí exhiben centros fibrilares -v.gr., como se ha referido al linaje de los amniotas- como subcomponentes nucleolares o; 2) el resultado de una pérdida secundaria, i.e., una reducción de genes y/o regiones intergénicas a causa de su estilo de vida parasitario.

Si seguimos la hipótesis donde se afirma que es en organismos eucariontes con un origen evolutivo relativamente más reciente, donde aparecen los centros fibrilares, cabe mencionar que, una posible explicación puede ser que estos centros fibrilares, al surgir, hayan permitido regular aún más finamente los procesos metabólicos y energéticos que el nucléolo bipartito ya regulaba, como lo han sugerido Thiry y Lafontaine en 2005. Asimismo, ellos han sugerido que, para facilitar el diagnóstico de los centros fibrilares, debido a que existen posturas contrarias (Jiménez-García et al., 2008; Tian et al., 2010), habrían de considerarse factores bioquímicos y no meramente morfológicos, como que la holoenzima, o maquinaria, responsable de la transcripción (RNAP1) se encuentre presente y/o en un estado de transcripción competente.

Como consideraciones adicionales, cabe resaltar que no fue necesario emplear alguna técnica, por ejemplo, especifica para RNA, debido a que el contraste convencional que utiliza sales de uranio y plomo permite la resolución fina de los subomponentes nucleolares, sobre los cuales se enfoca el estudio. A continuación, se aborda el caso de las sondas específicas para RNA dentro del protocolo FISH, con el propósito de ejemplificar el por qué no se requirió de un contraste específico; vale la pena mencionar que, para lograr la hibridación fluorescente, se requiere de un procesamiento y

una fijación de la muestra no estándares. Por ejemplo, la microscopía electrónica convencional emplea una disolución fijadora de uso común, compuesta de paraformaldehído y glutaraldehído -, sin embargo, estos compuestos comprometen la posibilidad de la hibridación de la sonda con los RNAs blancos. Es decir, se tiene que encontrar un balance entre la fijación adecuada que permita una preservación lo más cercana a la estructura nativa -en el caso buscar resolución morfológica y utraestructural- y la posibilidad de hibridar moléculas con secuencia específica -como en FISH-, debido a que, si el espécimen se encuentra óptimamente fijado, estaría químicamente indispuesto para reaccionar con su sonda.

Finalmente, como alcances potenciales de este trabajo se propone que el conocimiento fino del nucléolo de *Giardia lamblia* puede conducir a una aproximación farmacológica que conduzca a la creación de drogas y tratamientos contra este común patógeno. Por ejemplo, ya que se ha caracterizado morfológicamente las subregiones del nucléolo, puede buscarse la identificación específica de RNAs y enzimas contenidos en su nucléolo, para impedir la progresión en la biogénesis y/o en la maduración de las subunidades ribosómicas.

CONCLUSIONES

General

Como resultado del trabajo se pudo conocer la disposición tridimensional del nucléolo dentro del núcleo, su relación con la membrana nuclear y algunas características de sus subcomponentes. Únicamente el componente fibrilar denso y el componente granular, principalmente en asociación con la envoltura interna nuclear, fueron observados, colocando a *Giardia lamblia* como un eucarionte con un nucléolo no *canónico*, i.e., constituido por dos componentes.

Particulares

El análisis ultraestructural indica que el material intranuclear, denso a los electrones, periférico, fibrogranular que se delimitó corresponde a material nucleolar y a lo descrito previamente como nucléolo.

A pesar de la presencia de los componentes fibrogranulares no se observan centros fibrilares como los descritos actualmente.

Dentro del nucléolo es notable la ausencia de centros fibrilares, tanto en cortes aleatorios como en serie, ya que ocasionalmente se han definido como los portadores del gen ribosómico y/o de los organizadores nucleolares.

La relación entre nucléolo y la periferia nuclear es intermitente.

PERSPECTIVAS

Sería interesante analizar la estructura del nucléolo, en puntos específicos del ciclo celular, así como durante su transcurso a lo largo de todo este, como respuesta al tratamiento con fármacos que afectan la transcripción, tales como la actinomicina D. De este modo, al perturbar el sistema, generar un modelo, por ejemplo, de cómo agentes ambientales o extrínsecos pueden afectar su funcionamiento.

Valdría la pena del mismo modo ver la evolución de los puntos de contacto, del nucléolo con la membrana nuclear, en diferentes estados fisiológicos, con diferentes organismos y con tratamientos farmacológicos que influyan en dicha interacción nucléolo-núcleo.

Una proteómica nucleolar más detallada y específica de GL queda aún pendiente, así como la determinación de los mecanismos bioquímicos y moleculares por los cuales el nucléolo permanece asociado a la membrana nuclear.

REFERENCIAS

Bibliografía

1. Abodeely M, DuBois KN, Hehl A, Stefanic S, Sajid M, DeSouza W, Attias M, Engel JC, Hsieh I, Fetter RD, McKerrow JH. A contiguous compartment functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia lamblia*. 2009. Eukaryotic Cell. 8(11):1665-76.
2. Adam RD. 1991. The biology of *Giardia* spp. Microbiological Reviews. 55(4):706-732.
3. Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14(3):447-475.
4. Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, Cobley A, Lamond AI. 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. Nucleic Acids Research. 37: D181-4.
5. Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svard SG. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nature Reviews Microbiology. 8:413–422.
6. Brown JR, Schwartz CL, Heumann JM, Dawson SC, Hoenger A. 2016. A detailed look at the cytoskeletal architecture of the *Giardia lamblia* ventral disc. Journal of Structural Biology. 194(1):38-48.
7. Brown JW, Shaw PJ, Shaw P, Marshall DF. *Arabidopsis* nucleolar protein database (AtNoPDB). 2005. Nucleic Acids Research. 33(Database issue):D633-6.
8. Baßler, Hurt. 2019. Eukaryotic Ribosome Assembly. Annual Reviews of Biochemistry. 88(1). 8.1-8.26.
9. Bergeron J, Drouin G. 2008. The evolution of 5S ribosomal RNA genes linked to the rDNA unit in fungal species. Current Genetics. 54(3):123-31.
10. Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A. Nucleolus: the ribosome factory. 2008. Histology and Histopathology. 23(10):1291-8.
11. Cox FEG. 2002. History of Human Parasitology. Clinical Microbiological Reviews. 15(4):595-612.
12. Dundr M, Misteli T. 2002. Nucleolomics: An Inventory of the Nucleolus. Molecular Cell. 9(1):5-7.
13. Garrison F. 1935. Felice Fontana a Forgotten Physiologist of the Trentino. Bulletin of the New York Academy of Medicine. 11(3):117-22.
14. Hutten S, Prescott A, James J, Risenberg S, Boulon S, Lam Y, Lamond A. 2011. An intranucleolar body associated with rDNA. Chromosoma. 120(5):481-99.

15. Jiménez-García L, Zavala G, Chávez-Munguía B, Ramos-Godínez M, López-Velázquez G, Segura-Valdez M, Montañez C, Hehl A, Argüello-García R, Ortega-Pierres G. 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. International Journal for Parasitology. 38(11): 1297-1304.

16. Jiménez-García L, Lara-Martínez R, Garza-Melchor R, Segura-Valdez M. The nucleolus of *Giardia lamblia*. 2017. MOJ Anatomy & Physiology. 3(2): 00083.

17. Kabnick K, Peattie D. 1990. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. Journal of Cell Science. 95 (Pt 3):353-360.

18. Keil M, Meyer M, Dannheisig D, Maerz L, Phillip M, Pfister A. 2019. Loss of Peter Pan Protein is associated with cell cycle defects and apoptotic events. Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research. 1866(5):882-895.

19. Klinge S, Woolford J Jr. 2019. Ribosome assembly coming into focus. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 20(2):116-131.

20. Lam YM, Trinkle-Mulcahy L. 2015. New Insights into nucleolar structure and function. 2;7:48.

21. Lam YM, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. 2005. The nucleolus. Journal of Cell Science. 118(Pt 7): 1335-7.

22. Lara-Martínez R, De Lourdes Segura-Valdez M, De La Mora-De La Mora I, López-Velázquez G, Jiménez-García LF. 2016. Morphological Studies of Nucleologenesis in *Giardia lamblia*. Anatomical Record (Hoboken). 299(5): 549-556.

23. Leung AK, Trinkle-Mulcahy L, Lam YW, Andersen JS, Mann M, Lamond AI. 2006. NOPdb: Nucleolar proteome database. Nucleics Acids Research. 34(Database issue):D218-20.

24. Lipoldová M. *Giardia* and Vilém Dušan Lambl. 2014. PLoS Neglected Tropical Diseases. 8(5):e2686.

25. López-Velázquez G, Hernández R, López-Villaseñor I, Reyes-Vivas H, Segura-Valdez Mde L, Jiménez-García LF. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. 2005. Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America. 11(4):293-9.

26. Lu L, Yi H, Chen C, Yan S, Yao H, He G, Li G, Jiang Y, Deng T, Deng X. 2018. Nucleolar stress is there a reverse version? Cancer. 9(20):3723-3727.

27. Luján HD, Svärd S. (eds). 2011. *Giardia*: A model organism. Springer Wien New York.

28. Malinovskaya E, Ershova E, Golimbet V, Porokhovnik L, Lyapunova NKutsev S, Veiko N, Kostyuk S. 2018. Copy number of human ribosomal genes with aging: Unchanged mean but narrowed range and decreased variance in elderly group. Frontiers in Genetics. 9:306.

29. Mangan H, Gailín M, McStay B. 2017. Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of the nucleoli. The FEBS Journal. 284 3977-3985.

30. Manning G, Reiner DS, Lauwaet T, Dacre M, Smith A, Zhai Y, Svard S, Gillin FD. 2011. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. Genome Biology. 12(7):R66.

31. Martínez-Calvillo S, Florencio-Martínez L, Nepomuceno-Mejía T. 2019. Nucleolar structure and function in Trypanosomatid Protozoa. Cells. 8(5), 42.

32. Montacié C, Durut N, Opsomer A, Palm D, Comella P, Picart C, Carpentier MC, Pontvianne F, Carapito C, Schleiff E, Sáez-Vásquez J. 2017. Nucleolar proteome analysis and proteasomal activity assays reveal a link between nucleolus and 26S proteasome in *A*. *thaliana*. Frontiers in Plants Science. 8: 1815.

33. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science. 317(5846):1921-1926.

34. Nakashima K, Vibhute M, Spruijt E. 2019. Biomolecular chemistry in liquid phase separated compartments. Frontiers in Molecular Bioscience. 6:21.

35. Narcisi EM, Glover CV, Fechheimer M. 1998. Fibrillarin, a conserved pre-ribosomal RNA processing protein of *Giardia*. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 45(1):105-11.

36. Nepomuceno-Mejía T, Lara-Martínez R, Cevallos AM, López-Villaseñor I, Jiménez-García LF, Hernández R. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. 2010. FEMS Microbiology Letters. 313(1):41-6.

37. Nepomuceno-Mejía T, Lara-Martínez R, Hernández R, Segura-Valdez Mde L, Jiménez-García LF. Nucleologenesis in *Trypanosoma cruzi*. 2016. Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America. 22(3):621-9.

38. Nomura M, Nogi Y, Oakes M. 2013. Transcription of rDNA in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Austin (TX) Landes Bioscience.

39. Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. 2000. Chromosoma. 108(8):501-13.

40. O'Day D. 2019. Proteins of the nucleolus of *Dictyostelium discoideum*: Nucleolar compartmentalization, targeting sequences, protein translocations and binding partners. Cells. 8(2),167.

41. Ortega-Pierres MG, Jex AR, Ansell BRE, Svärd SG. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. 2018. Acta Tropica. 184:67-72.

42. Pederson T. 2011. The Nucleolus. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1;3(3).

43. Potapova T, Gerton J. 2019. Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. Chromosome Research. 27(1-2):109-127.

44. Picart-Picolo A, Picault N, Pontvianne F. 2019. Ribosomal RNA genes shape chromatin domains associating with the nucleolus. Nucleus. 10(1):67-72.

45. Shaw P. 2010. Nucleolus. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.

46. Simon L, Rabanal F, Dubos T, Oliver C, Lauber D, Poulet A, Vogt A, Mandlbauer A, Le Goff S, Sommer A, Duborjal H, Tatout C, Probst A. 2018. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal rRNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. Nucleics Acids Research. 46(6): 3019-3033.

47. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernández-Verdún. 2008. Nucleolus: The fascinating nuclear body. Histochemistry and Cell Biology. 129(1): 13-31.

48. Smircich P, Duhagon M, Garat B. 2015. Conserved curvature of RNA polymerase I core promoter beyond rRNA genes: The case of the Tritryps. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 13(6); 355-63.

49. Sogin M, Gunderson J, Elwood H, Alonso R, Peattie D. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science. 243(4887):75-77.

50. Sulaiman I, Cama V. 2006. The biology of *Giardia* parasites. En Ortega YR. (ed). Foodborne Parasites. Springer US. 2, pp. 15-32.

51. Thiry T, Lafontaine D. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. Trends in Cell Biology. 15 (4): 194-9.

52. Tian X, Yang Z, Shen H, Adam RD, Lu SQ. 2010. Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. Parasitology Research. 106(4): 789-793.

53. Tiku V, Jain C, Raz Y, Nakamura S, Heestand B, Liu W, Späth M, Suchiman H, Müller R, Slagboom P, Partridge L, Antebi A. 2017. Small nuceloli are cellular hallmark of longevity. Nature Communications. 30; 8: 16083.

54. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron sulphur protein maturation. 2003. Nature. 426(6963):172-6.

55. Tůmová P, Uzlíková M, Wanner G, Nohýnková E. 2015. Structural organization of very small chromosomes: study on a single-celled evolutionary distant eukaryote *Giardia intestinalis*. Chromosoma. 124(1): 81-94.

56. Wild K, Sinning I. 2014. RNA gymnastics in mammalian signal recognition particle assembly. RNA Biology. 11(11):1330-4.

57. Xin DD, Wen JF, He D, Lu SQ. Identification of a *Giardia* krr1 homolog gene and the secondarily anucleolate condition of *Giardia lamblia*. 2005. Molecular Biology and Evolution. Mar;22(3):391-4.

58. Yang K, Yang J, Yi J. 2018. Nucleolar stress: Hallmarks, sensing mechanism and diseases. Cell Stress. 2(6):125-140.

59. Zhou X, Liao W-J, Liao J-M, Liao P, Lu H. 2015. Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. Journal of Molecular Cell Biology. 7(2):92-104.

Cibergrafía

https://giardiadb.org/giardiadb/service/answer/report, 01:16, 29/04/2019

https://giardiadb.org/giardiadb/service/answer/report, 01:19/29/04/2019

https://giardiadb.org/giardiadb/service/answer/report, 01:22/29/04/2019

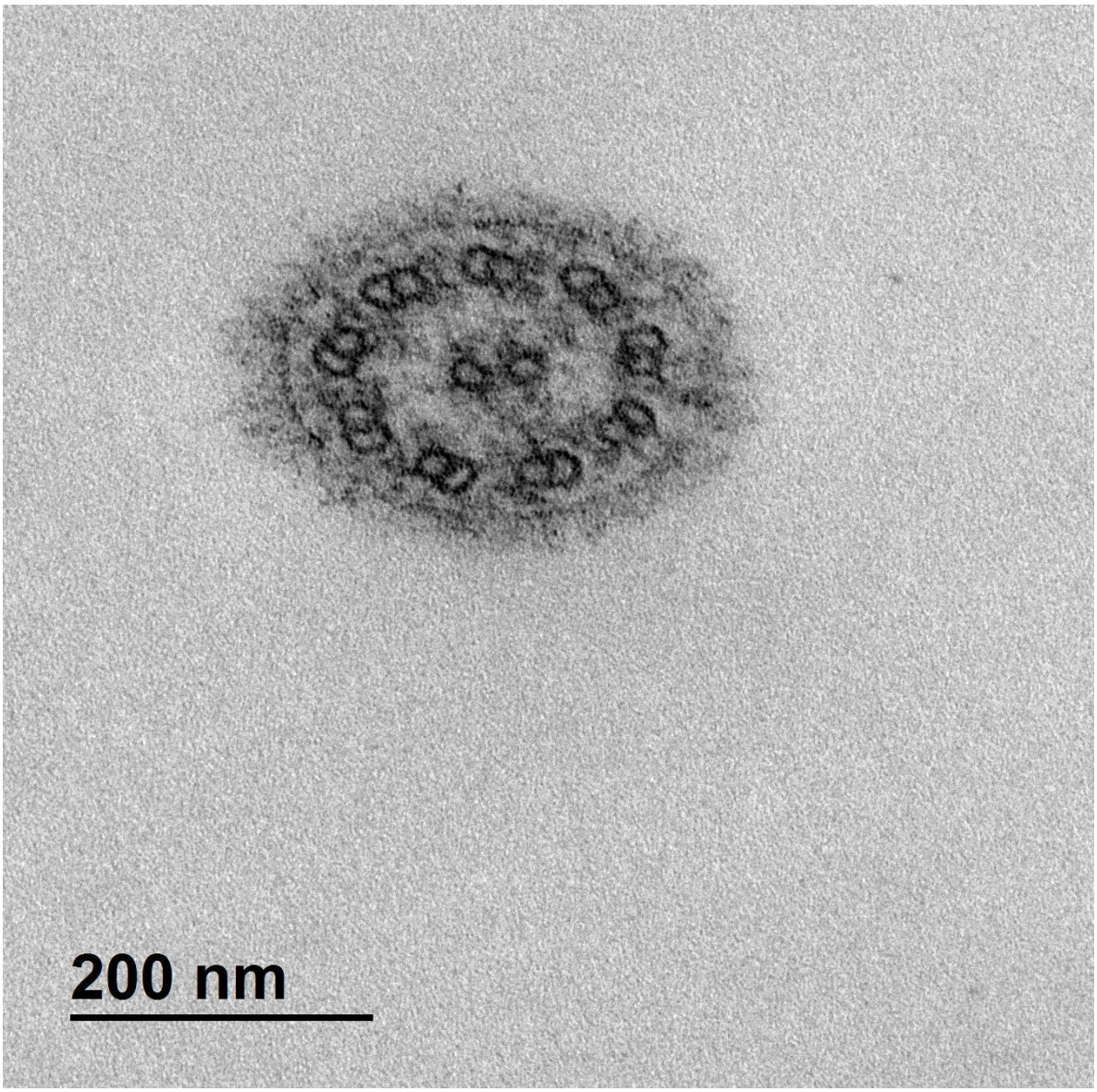
https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html (25/01/2019.04:25)

KEEG, (06/12/18, 14:19).

http://free-d.versailles.inra.fr/html/freed.html

ANEXOS

Figura 17. Micrografía de un corte transversal de un flagelo de *Giardia lamblia*.



Tu esfuerzo y tu amor te llenan el rostro de flores, de estrellas, de gotas y diamantes...
es tu faz la luz de las estrellas
la oniria, el embeleso y deliquio
que con miel alimenta
bosques con caminos de color,
húmedos, repletos de hongos y dulzura
habitan eternos en el espacio oscuro que hay de aquí a allá
en ese espacio silencioso que es el corazón ahuecado como el árbol y los viejos bivalvos en las playas
oquedades plenas,
rezuman el amor y el sentido,
encuentran su camino de salida
en la poesía,
se vierten en risas, y caminan suave,
dulce
como tiernos niños, como bellas doncellas y gráciles mozos
en el canto nuevo y cansado de los viejos
que no es nada sino maná
praxadam que mana
en efluvios de especias y perfumes
amamanta ese canto antiguo
pues cuando tañe abigarra los sentidos
pero no embota
sino trina
trina en ondas, en olas, en mesetas
no ve el fin ni lo percibe
no muere nunca pues halló ya siempre
la muerte en la vida
en olvido la memoria
derrama las lágrimas
y las deja beber
para como discreto y sutil desmayo
engendrar otra vez la vida sin cansancio y sin fastidio
otra vez, otra vez la vida
donde rompen los soles sus ocasos
y en fuegos de colores sombríos
paren madreperlas, camafeos naturales
turquesas y obsidianas,
ámbares y ríos
ve allá donde la dirección se pierde
donde el fruto es comido
donde la semilla es oro
donde eco hace el arte escondido
tira todo para siempre
que no haya dónde caiga
pues cuando y como lo gravedad lo atraiga
fundirás los ojos en los míos
no es nada más que este tierno ocaso

un giro más en la espiral que a veces con sigilo
donde hay una gota vuelca una tempestad
y donde cae una hoja vacía y transparente
de la más ínfima rama,
se hace una poesía

KRÁSNÁ ŽENA

Ese cobrizo reflejo que se esfuma
Es tu vida
Que como dirían los cantores
Es el río destinado al mar
Es muerte y nada más

DALE COLOR