Stefânia Morisco Tasca Pinheiro

Corpúsculos de Cajal e nucléolos em células normais e tumorais em cultura e sua associação com proliferação celular e alteração destas estruturas nucleares após o uso de inibidores de síntese de RNA

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia celular e Tecidual)

São Paulo
2009

5 μ m

Stefânia Morisco Tasca Pinheiro

Corpúsculos de Cajal e nucléolos em células normais e tumorais em cultura e sua associação com proliferação celular e alteração destas estruturas nucleares após o uso de inibidores de síntese de RNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

**Orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Maria Machado –Santelli
Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual**

**São Paulo
2009**

PINHEIRO, S.M. T. Corpúsculos de Cajal e nucléolos em células normais e tumorais em cultura e sua associação com proliferação celular e alteração destas estruturas nucleares após o uso de inibidores de síntese de RNA 202f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O núcleo é uma estrutura organizada que possui subcompartimentos semelhantes a organelas dentre os quais estão os nucléolos e os corpúsculos de Cajal (CBs). Estes compartimentos nucleares são estruturas dinâmicas, mantidas pela associação de macromoléculas envolvidas na expressão gênica que interagem entre si delimitando-as. A principal proteína encontrada nos CBs é a p-80-coilin e, portanto, o principal epítipo capaz de marcar essas estruturas. Suas funções específicas ainda tem sido alvo de estudo. Existe uma proteína em comum a ambas as estruturas, a fibrilarina que participa no processamento de rRNA. Estes corpúsculos já foram descritos na periferia dos nucléolos ou mesmo fisicamente ligados a ele. Acredita-se que os corpúsculos de Cajal participem da síntese de rRNA, maturação, transporte e associação das subunidades ribossômicas. Diante esta relação, este trabalho visa estudar a inter-relação entre estas estruturas em células normais e as respectivas linhagens de células tumorais em cultura antes e após tratamentos com actinomicina D. Esta droga se usada em baixas concentrações, bloqueia a transcrição dos genes que foram decodificados pela RNA polimerase I e II, e α -amanitin, por sua vez bloqueia a transcrição de genes decodificado pela RNA polimerase II. Além disso, também visa investigar uma relação entre a proliferação das linhagens estudadas e frequência dos corpúsculos de Cajal nas células controle e tratadas. O microscópio confocal de varredura a laser permitiu o estudo dessas estruturas em preparações imunofluorescência fornecendo uma análise tridimensional destas estruturas quando utilizados anticorpos específicos. Linhagens de células que apresentaram um crescimento mais lento foram aquelas que tinham uma maior frequência de corpúsculos por núcleo. Por outro lado, aquelas que apresentaram um crescimento mais intenso, foram aquelas que apresentaram maior variação no número de corpúsculos por núcleo. Após o tratamento com inibidores de síntese de RNA, tanto os corpúsculos de Cajal quanto os nucléolos, apresentaram alterações morfológicas, às vezes apresentando um grande acúmulo na região dos corpúsculos ou desorganizando os nucléolos. Mudanças no tamanho e forma também puderam ser destacadas.

Palavras-chave: Corpúsculos de Cajal. Nucléolos. inibidores de síntese de RNA. proliferação celular.

PINHEIRO, S. M. T. **Cajal bodies and nucleoli in normal and tumoral cell lines: its association with cell proliferation and RNA synthesis.** Doctoral thesis 202f. (Cell and tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

The nucleus is a structure that has sub-compartments which can be called nuclear organelles. Among them, it may be cited the nucleoli and the Cajal bodies (CBs). These nuclear compartments are dynamic structures, maintained by association and storage of macromolecules involved in gene expression. The main protein found in the CB is a p-80-coilin and therefore the main epitope able to label these structures. Their functions are still to be clarified. There is a protein in common to the nucleolus and Cajal bodies, the fibrillarin that takes part in the processing of rRNA. The CBs can be found at the periphery of the nucleoli or even physically connected to them. It is believed that the CBs may have a role in the synthesis of rRNA and maturation, transport and association of ribosome subunits. This work aims to study the interrelationship between these structures in normal cells and their respective tumor cell line in culture before and after treatments with actinomycin D, and α -amanitin, and find out a relationship between cell proliferation and Cajal bodies frequencies in control and treated cells. The laser scanning confocal microscope enabled the study of these structures in immunofluorescence preparations providing a three-dimensional analysis of these structures. Cell lines that show slow cell growth, appears to have low CB frequency on the other hand, cell lines that have fastest growth shown nuclei with more Cajal bodies frequencies and more variation in the number of Cajal/nucleus. After treatment with RNA synthesis inhibitors, both Cajal bodies and nucleoli, presented morphological changes, sometimes giving large accumulation of proteins in organelles and sometimes appeared disorganized in the nucleoplasm. Changes in the size and shape were also highlighted. The tumor cell lines also showed changes compared to their normal cell type.

Key words: Cajal bodies. Nucleolus. inhibitor of RNA synthesis. Cell proliferation.

1.1 Considerações gerais

A expressão gênica nos eucariontes é um processo extremamente elaborado e pode melhor ser estudada após a descoberta da estrutura do DNA. No início dos anos 50 existiam, algumas dúvidas a respeito de como processos relacionados à hereditariedade e como informações genéticas eram transmitidas para as gerações futuras. Esta questão, no entanto, veio à luz do conhecimento com a descoberta das seqüências nucleotídicas contidas no interior do núcleo das células e estas seqüências eram as responsáveis por compor a identidade de cada um, o genoma do indivíduo. Desde então, muitos processos biológicos relacionados à expressão dos genes, duplicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA puderam ser estudados. Muito já se sabe a respeito de como esta estrutura de DNA está organizada dentro do núcleo, sua composição e organização de uma forma geral, porém muitos processos relacionados com informações contidas nesta molécula ainda devem ser elucidados.

O DNA genômico é decodificado pelas moléculas de RNA, que são capazes de ler o código contido no DNA, decifrá-lo na forma de seqüência de aminoácidos específicos que darão origem a diversas proteínas e suas isoformas. A transcrição e a tradução são os meios pelos quais as células expressão seu material genético.

A transcrição nada mais é que a cópia de ácido desoxiribonucleico em ácido ribonucléico por ação de uma série de enzimas que catalisam esta reação. Dentre estas enzimas, estão as RNA polimerases I, II e III, que são responsáveis por catalisar a ligação entre três das pontes fosfodiéster que unem os nucleotídeos entre si. Existem três tipos de moléculas de RNA diferentes, cada qual com sua função cujas transcrições são catalisadas por suas respectivas RNAs polimerases. A mensagem contida no DNA é decodificada em um molde de RNA mensageiro, que será traduzido durante a síntese protéica. Os rRNAs estão relacionados com a formação das subunidades ribossomais, sítios onde ocorre a síntese protéica com a participação dos tRNAs que transportam os aminoácidos até o sítio de tradução. Existem outros RNAs de pequeno tamanho que atuam no processamento dos

RNAs (snRNA, small nuclear ribonucleic acid) e os RNAs nucleolares de pequeno tamanho (snoRNA, small nucleolar acid ribonucleic) que atuam no processamento dos RNA ribossomais. As enzimas que catalisam estas reações são as RNAs polimerases. A RNA polimerase I, atua na transcrição de genes de codificam rRNA para as subunidades 5,8S, 18S e 28S. A RNA polimerase II transcreve todos os genes que codificam proteínas, além de genes que codificam snoRNA e alguns genes de snRNA. E por fim, a RNA polimerase III descodifica genes de tRNA, 5S RNA e alguns snRNA. Além destas enzimas, existe uma série de fatores de transcrição que atuam juntamente com elas para que a transcrição possa ocorrer.

A molécula de mRNA recém transcrita é imatura, ou seja, ainda necessita sofrer uma série de processamentos para que se torne efetiva. Ela deverá sofrer um capeamento na região 3' e uma poliadenilação na região 5', além sofrer o *splicing*, onde permanecerão apenas os éxons, formando uma sequência de ribonucleotídeos pronta a ser traduzida e dão origem a proteína. O *splicing* é realizado por moléculas de RNA de pequeno tamanho, que complexadas às proteínas que podem ser U1, U2, U4, U5 e U6, formam as snRNP (small nuclear ribonucleoprotein). Estas ribonucleoproteínas juntamente com uma série de outras que atuam no *splicing*, dão origem ao spliceossomo, região no núcleo onde há um grande acúmulo de fatores relacionados à transcrição. Cada snRNP atua em uma fase específica do *splicing*. Os RNAs maduros serão transportados ativamente pelo poro nuclear para o citosol onde a informação contida no RNA será traduzida e ocorrerá a síntese protéica nos ribossomos. Os ribossomos nada mais são que moléculas de rRNA associadas a proteínas, que acomodarão as moléculas de mRNA a ser traduzido. Os RNA transportadores, por sua vez, se encarregarão de associar as moléculas de aminoácidos ditadas pela sequência do mRNA.

Existe, portanto, uma organização nuclear que coordena todas as moléculas que atuam no complexo processo da expressão gênica em eucariotos.

1.2 Organização nuclear e as organelas nucleares

Durante anos o núcleo foi descrito como sendo uma estrutura desorganizada cujos cromossomos, encontravam-se dispersos aleatoriamente sem uma organização espacial definida. Hoje, sabe-se que é uma estrutura organizada e que os cromossomos ocupam lugares definidos. (PINKEL et al., 1998).

Além dessa organização, o núcleo possui uma compartimentalização, constituindo aquilo que se pode chamar de organelas nucleares. Tais compartimentos não são envoltos por membranas, sendo mantidos por proteínas que interagem entre si, delimitando estruturas específicas dentro do núcleo. São estruturas extremamente dinâmicas e ocorrem, provavelmente devido a uma forte interação entre proteínas e RNAs envolvidos na síntese, montagem e estocagem de macromoléculas relacionadas à expressão gênica. Embora uma célula de mamífero expresse diversos genes de uma vez, a transcrição e o *splicing* do RNA podem estar restritos a regiões específicas do núcleo, que são resutantes da associação de moléculas, onde sua concentração é muito alta, delimitando, desta forma, um subdomínio nuclear. Seus diversos componentes se movem pelas células de acordo com sua necessidade. (SPECTOR, 1993, LAMOND e EARNSHAW, 1998, MISTELI e SPECTOR, 1998, MATERA, 1999).

Dentre estes domínios, podem ser citados os nucléolos, que foram as estruturas melhor caracterizadas, por serem mais proeminentes dentro do núcleo, os corpos de leucemia pro-mielocística (*promyelocytic leukemia body*, ou PML), o compartimento dos fatores de *splicing* (*splicing factors compartments*, SFC ou *speckles*), os Gems (*gemini coiled bodies*), corpos de clivagem (*clivage bodies*), corpos DDX1 e os corpúsculos de Cajal (*coiled bodies* ou CBs). Assim como os nucléolos, estes compartimentos nucleares são estruturas altamente dinâmicas, mantidas por associação e estoque de macromoléculas envolvidas na expressão gênica

Os corpúsculos de leucemia promielocítica são estruturas de 0,5 um de diâmetro e apresentam um anel, denso contendo a proteína PML, que circunda um núcleo central desprovido desta proteína. Funcionalmente parecem estar relacionados com a regulação da transcrição. Estes corpos encontram-se desorganizados em indivíduos que apresentam a translocação (t15; 17: q22; q21) associada à leucemia promielocítica. Esta translocação envolve os genes que codificam para PML e para o receptor de ácido retinóico A proteína resultante não se localiza nos PMLs. O tratamento de pacientes com ácido retinóico resulta na localização desta proteína nos PMLs e regressão do câncer (STERNSDORF et al., 1998)

Os compartimentos dos fatores de *splicing* ou speckles ocupam cerca de 20% do núcleo e contém grandes concentrações de fatores de pré-mRNA, (SPECTOR, 1990, SPECTOR et al., 1991) além de fatores de transcrição (LARSSON et al., 1995; MORTILARO et al, 1996), fatores de processamento 3' (KRAUSE et al., 1994; SCHUL et al., 1998) e proteínas ribossômicas. Quando analisado por microscopia eletrônica de transmissão, mostram uma região central contendo um grande acúmulo de grânulos e a região periférica contendo fibras pericromatínicas, que podem representar transcritos nascentes (FAKAN, 1994). Estas estruturas ocorreriam no núcleo para controlar a concentração de fatores de *splicing* no nucleoplasma, uma vez que esta estrutura é um sítio acúmulo de fatores de *splicing* e transcrição. O balanço na concentração destes fatores de *splicing*, levaria a uma otimização na eficiência do *splicing*. A localização intranuclear dos speckles em células de mamíferos, responde a mudanças na transcrição do mRNA e fosforilação de proteínas.

O compartimento nuclear conhecido como GEM (*Gemini of Coiled Bodies*) é assim chamado devido ao fato destas estruturas estarem relacionadas com os corpúsculos de Cajal, ou corpos gêmeos aos corpúsculos de Cajal. Os CBs e os GEMS contêm a proteína de sobrevivência neuronal, SMN (*Survivor Motor Neuron*). Mutações no gene que informa esta proteína, resultam em atrofia muscular que leva a morte em crianças. Em algumas linhagens celulares, esta proteína encontra-se nos CBs e em outras nos GEMs, entretanto uma função para a organização dos GEMs ainda não foi bem estabelecida, porém, sabe-se que está relacionada com tipo celular e estágio de desenvolvimento que se encontram

(YOUNG et al., 2001) O intrigante fato da maioria das células transformadas apresentarem CBs sugere que o processo de transformação leva a formação dos CBs (SPECTOR et al., 1992; YOUNG et al., 2000).

Existe uma diferença na presença de CBs e GEMS em células derivadas de tecidos fetais e de adultos. Nos tecidos fetais, os GEMS encontram-se unidos aos CBs, enquanto que nos tecidos adulto estão separando-se em duas estruturas distintas. Esta mudança na organização entre CBs e GEMs entre tecido fetal e tecido adulto, sugere que os GEMS podem ser necessários nos tecidos fetais e não nos adultos, isso varia de acordo com a necessidade de RNP que cada célula necessita.

Corpos DDX1 que têm várias distribuições pontuais pelo nucleoplasma e também podem ser encontrados em forma de estruturas de 0,5µm e estão freqüentemente associados aos corpos de clivagem. A proteína DEAD Box DDX1 é uma proteína relacionada ao processamento de RNA bem como transporte de RNA (BLEÓO et al., 2001; KANAI, 2004)

Corpos de clivagem foram primeiramente descritos quando estudados os anticorpos contra o fator de estímulo de clivagem CsF-64 e a fatores específicos de clivagem e de poliadenilação CPSF-100. Fatores de transcrição como TFIIE e TFIIIF também foram descritos nestes corpos nucleares (GALL, 2000). Possuem um tamanho de 0,3-1 µm de diâmetro.

Nucléolos são os sub-compartimentos melhores estudados devido ao seu tamanho. Estão relacionados, com os genes de rRNA, síntese de rRNA e conseqüentemente com toda a maquinaria formadora de ribossomos.

Corpúsculos de Cajal ou CBs possuem 0,2 a 1,0 µm de diâmetro e podem ser encontrados de um a dez por núcleo. Os CBs contêm uma variedade muito grande de componentes incluindo fatores envolvidos no *splicing* do pré-mRNA, o processamento do pré-rRNA e maturação de pré-mRNA para histona assim como fatores de transcrição basais para RNA polimerase I, II e III e telomerase (MATERA, 1999; GALL, 2000; ZHU et al., 2004). Ao que tudo indica os CBs não

são sítios principais para que a transcrição ocorra uma vez que há ausência de poli A⁺ e de rRNA (MATERA, 1999).

1.3 Organelas nucleares e a cromatina

O genoma das células eucarióticas é dinamicamente empacotado dentro do núcleo e dependendo do estado de atividade que se encontram, os genes podem mudar de posição dentro do núcleo de acordo com a necessidade celular e podem formar domínios nucleares bem definidos. A cromatina se move para silenciar a heterocromatina e também para facilitar a associação dos genes ativos com seus respectivos fatores de transcrição. Muitos genes ativos são posicionados perto dos speckles nucleares que são enriquecidos em fatores de *splicing* para facilitar o funcionamento de todo o aparato transcricional dos pré-mRNAs, uma vez que grande parte destes fatores se acumula nesta região do núcleo. Existem outros genes ativos em outra localização do mesmo núcleo, incluindo os genes de histonas e snRNPs, são associados especificamente com os corpúsculos de Cajal, um domínio nuclear envolvido na biogênese das snRNPs (CIOCE e LAMOND, 2005; STANEK e NEUGEBAUER, 2006). Embora essa associação seja difícil de explicar, Dundr et al. (2007), mostraram que interferindo na actina nuclear, a movimentação do *locus* de U2 snRNA pelo corpúsculo de Cajal é bloqueada, uma vez que a associação deste *locus* de U2snRNP ocorra nos corpúsculos de Cajal

Foi desenvolvida uma metodologia em busca de visualizar o movimento cromatínico no núcleo em células vivas, (ROBINETT et al., 1996) e usando esta metodologia, o laboratório de Belmont mostrou movimentos da cromatina excedendo 1µm pela trajetória curvilínea. A actina nuclear e a miosina estão envolvidas na mobilidade da cromatina, uma vez que a posição da cromatina em um determinado “*lôcus*” e seu reposicionamento foi significativamente modificado em células transfectadas com formas mutantes destas proteínas. Um tipo de actina não polimerizada foi capaz de abolir a redistribuição do “*lôcus*” enquanto que actina filamentosa estável acelerou sua mobilidade. Isso sugere que actina e a miosina nuclear são motores moleculares

que guiam a mobilidade dos genes e os movimentam para regiões alvo no núcleo bem como no seu interior (CHUANG et al., 2006).

Além disso, os corpúsculos de Cajal têm sido relacionados por se associarem à *loci* específicos nos cromossomos os *loci* para histonas (FREIZ e MATERA, 1995). Além disso, um grupo de genes que codificam para U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs, responsáveis por codificarem pequenos RNAs, localizam-se juntos aos CBs em núcleos interfásicos em células humanas (MATERA, 1995), fato este que confirma esta organização e dinâmica nuclear entre os diferentes compartimentos.

1.4 OS corpúsculos de Cajal

Os corpúsculos de Cajal são domínios nucleares evolutivamente conservados, presentes desde leveduras a organismos superiores mais desenvolvidos como os eucariontes. (MATERA, 1999; GALL, 2000; OGG e LAMOND, 2002; VERHEGGEN et al., 2002). Esta conservação aponta para a importância nuclear que estas estruturas apresentam. Os corpúsculos de Cajal (CBs) foram identificados em vários tipos de células no século XIX e início do século XX. Uma das primeiras descrições foi feita por Carnoy e Lebrun (CARNOY e LEBRUN, 1897 *apud* GALL et al., 1995) a partir de estudos com vesículas germinais, tendo sido chamados por eles de organelas esféricas. Posteriormente, GALL et al. (1995), mostraram organelas esféricas equivalentes aos *Binnenkörper* encontrados em vesículas de insetos por Jörgensen (JÖRGENSEN, 1913 *apud* GALL et al., 1995). Em células somáticas foram primeiramente demonstrados em 1903 por Ramón y Cajal, neurobiologista espanhol que mostrou a existência dessas estruturas em neurônios de vertebrados. Foram descritos em uma variedade muito grande de células e, inicialmente, denominados de várias formas: *spheres*, *Binnenkörper*, *endobodies* e *coiled bodies*. Na atualidade, têm sido chamados de corpúsculos de Cajal. Embora seja conhecida sua existência, suas funções e importância fisiológica são pouco esclarecidas.

1.5 Corpúsculos de Cajal e a proteína p-80 coilina

A principal proteína encontrada nos corpúsculos de Cajal é a p-80-coilina, sendo, portanto o principal epítipo capaz de marcar estas estruturas (RASKA et al., 1991). O gene que codifica esta proteína apresenta-se completamente caracterizado (HEBERT et al., 2002; SLEEMAN et al., 2001)

Embora haja uma grande quantidade dessa proteína dispersa no nucleoplasma, quando utilizado o anticorpo anti-coilina como marcador, obtém-se sinal positivo apenas naquelas regiões correspondentes aos corpúsculos de Cajal (CREMER et al., 1993; LAMOND e EARNSHAW, 1998; BRASH e OCHS, 1992; SCHUL et al., 1998).

A coilina pode servir como arcabouço dos CBs para sua ligação aos diversos fatores neles encontrados. Este arcabouço serve como suporte físico para que uma gama muito grande de funções a eles atribuída ocorra. Partindo de uma única organela nuclear a coilina pode participar na relação entre dois compartimentos nucleares: os corpúsculos de Cajal e os PMLs (SUN et al., 2005).

A coilina aparentemente pode apresentar uma relação com a organização da região centromérica, uma vez que sua presença já foi descrita na região centromérica, em resposta a danos ou depleção da proteína centromérica CENP-B (MORENCY et al., 2007).

Compondo a proteína coilina, pode-se encontrar o aminoácido arginina dimetilado que é importante para a relação direta com SMN (*survival motor protein*) (HEBERT, 2001; HEBERT, 2002).

Além disso, a coilina também se liga a várias proteínas Sm relacionadas às snRNPs (HEBERT, 2001; XU et al., 2005), sugerindo que a interação da coilina com ambos, CBs e snRNPs mediam sua organização.

Para melhor definir o papel da coilina na organização dos CBs, Tucker et al (2001) estudaram fibroblastos embrionários de ratos selvagens e knockout para coilina. Dependendo da sua alteração genética, alguns ratos knockout tinham significantes problemas de fertilidade e viabilidade, enquanto que outros eram fenotipicamente normais. As células derivadas de ratos knockout não apresentavam CBs propriamente dito, mas tinham dois tipos de CBs residuais. A proteína SMN não se encontrava presente nos CBs residuais.

Em células HeLa, que apresentavam a coilina depletada por RNA de interferência, os CBS estavam ausentes, a formação dos GEMs era induzida e a proliferação era reduzida em comparação as células controle (LEMM et al., 2006).

O papel da coilina nos Cbs ainda não está bem definido, mas alguns estudos demonstraram que sozinha a coilina não consegue formar os CB. Por outro lado, quando estudadas células knockdown para SMN por RNA de interferência (LEMM et al., 2006) ou inibição da biogênese de snRNP usando leptomicina D, ocorre uma desorganização dos CBs, que já não podem mais ser vistos (JADY et al., 2003).

1.6 Os corpúsculos de Cajal e as snRNPs

Alguns dos componentes da maquinaria de *splicing*, as U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs, já foram detectados nos corpúsculos de Cajal em experimentos de imunofluorescência (FAKAN et al., 1984). Desta forma, pode-se supor que os CBs possam atuar como sítios de estoque das snRNPs, ou facilitando a comunicação entre a maquinaria de snRNP e o aparato transcricional dos genes de snRNP, além de, terem sido implicados na maturação deste complexo (SLEEMAN e LAMOND, 1999; STANEEK et al., 2003) . A transcrição e o *splicing* dos RNAs podem ocorrer em vários locais do núcleo, que constituem sítios altamente dinâmicos, formados por associação de componentes atuantes na transcrição, que neles se concentram sendo redistribuídos pelo núcleo de acordo com as necessidades celulares.

Os núcleos das células de mamíferos contêm uma grande variedade de proteínas e ribonucleoproteínas (RNPs) (CARMO-FONSECA, 2002; MATERA e SHPARGEL, 2006; MISTELI, 2005). Tem sido demonstrado que proteínas e RNAs movem-se pelo núcleo aparentemente por difusão randômica (DUNDR et al., 2004; KRUHLAK et al., 2000; MISTELI, 2005; MISTELI et al., 1997; PHAIR e MISTELI, 2000; POLITZ e PEDERSON, 2000; SNAAR et al., 2000).

As U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) são fatores essenciais de *splicing*. Cada snRNP é formada de um RNA pequeno, rico em uridina e sete proteínas comuns Sm, formando estruturas semelhantes a um anel. A maior parte das snRNP se localiza nos compartimentos de *splicing* (speckles), com uma menor quantidade nos corpúsculos de Cajal. A biogênese e maturação destes fatores de *splicing* são processos complexos, que ocorrem em múltiplos passos e em diferentes partes das células (LÜHRMANN et al., 1990; WILL e LUHRMANN, 2001).

Os snRNAs são transcritos no núcleo e depois transportados para o citoplasma como parte de um complexo de exportação, (FORNEROD et al., 1997; IZAURRALDE et al., 1997; IZAURRALDE et al., 1995; OHNO et al., 2002). As proteínas Sm, por sua vez são associadas no citoplasma. As proteínas SMN são necessárias para que adição de Sm na molécula de snRNP em formação ocorra (DREYFUSS, 1996; PELLIZZONI et al., 1999), e são posteriormente importadas novamente para o núcleo, após se ligarem a partículas sinalizadoras nuclear. Uma vez no núcleo, irão acumular primeiramente nos CB (CARVALHO et al., 1999; SLEEMAN e LAMOND, 1999) onde logo sofrerão maturação (DARZACQ et al., 2002; JADY et al., 2003).

Os CBs também têm sido relacionados como sendo sítios de ação de fatores heterotriméricos aos snRNPs como SF3a, ao U2 snRNP, completando sua maturação (KRAMER et al., 2005; NESIC et al., 2004) e desta forma têm sido implicados na maturação do complexo snRNPs (SLEEMAN e LAMOND, 1999; STANEEK et al., 2003) e modificação pós-transcricional dos UsnRNA recém associados no spliceossoma (DARZACQ et al., 2002; JADY et al., 2003).

A presença da proteína SMN (*survivor motor neuron protein*) nos CBs é uma evidência de que os CBs estariam relacionados com a biogênese das snRNPs, pois ela apresenta um papel importante na associação dos snRNPs spliceossomais (LUI e DREYFUSS, 1996; MATERA e FREY, 1998; YOUNG et al., 2000).

1.7 Os corpúsculos de Cajal e os GEMs

Como as snRNPs são vitais para o processamento dos pré-mRNAs, as atividades celulares engajadas à transcrição contêm CBs proeminentes. A presença de CBs e GEMs unidos em tecidos fetais e separados em duas estruturas distintas um do outro no adulto, sugere que os GEMs podem ser necessários nos tecidos fetais e não no adulto. A falta de CBs e GEMs em algumas células adultas indica que sua organização nuclear é importante e necessária e reflete a necessidade de snRNPs nas células.

A coilina contém arginina dimetilada simetricamente, que é importante para a ligação com a SMN (HEBERT et al., 2001; HEBERT, 2002) e a presença dos GEMs junto aos CBs está relacionada com a diminuição da metilação da coilina (HEBERT, 2002; BOISVERT, 2002), sugerindo que a ligação direta da coilina com a snRNP e a SMN medeiam sua localização nos CBs.

Estudos usando linhagens de células com ambos, CBs e GEMs, demonstraram que os CBS que estavam envolvidos na fase de maturação nuclear dos snRNPs eram os que continham a proteína SMN. A relação entre coilina, SMN e snRNP nos CBs pode facilitar a biogênese e a reciclagem destas proteínas e roboproteínass. É desconhecido se a coilina desempenha algum papel no nucleoplasma.

1.8 Corpúsculos de Cajal e as RNAs polimerases

Os corpúsculos de Cajal contêm uma série de fatores envolvidos no *splicing* do pré-mRN; processamento do pré-rRNA e maturação de pré-mRNA para histonas, assim como fatores de transcrição para RNAs polimerases I, II e III e RNA telomerase (MATERA, 1999; GALL, 2000; ZHU et al., 2004)

RNA polimerases I, II e III ocorrem nos corpúsculos de Cajal assim como vários componentes da maquinaria de *splicing*, que são necessários para a transcrição e processamento dos três tipos de RNA: mRNA, rRNA e tRNA, transcritos pela RNA pol III. Alguns destes componentes são fatores de transcrição IIF (TFIIF), TFIIS, TFIIA, fatores de *splicing*, snRNPs, proteínas SR, fatores de clivagem e poliadenilação, pequenos RNA nucleolares, proteínas envolvidas no processamento do pré-rRNAs. Muitos destes componentes, quando injetados em ovócitos de *Xenopus*, são inicialmente pré-associados nos CBs, e somente depois são localizados nos cromossomos ou nucléolos onde a transcrição ocorre de fato, sugerindo que RNA pol I, II e III, fatores de transcrição e processamento são inicialmente pré-associados nos CBs para posteriormente seguirem para cromossomos ou nucléolos (GALL et al., 1999).

A transcrição e a maquinaria de processamento da RNA polimerase II são associadas nos CBs como uma partícula unitária antes que esta proteína atue nos cromossomos plumulosos de *Xenopus*. Desta forma, o complexo de RNA pol II e seus fatores associados, são vistos por microscopia eletrônica como parte dos transcriptossomos, região do núcleo onde grande quantidade de fatores de transcrição pode ser encontrada. As RNAs polimerases I e III são associadas nos CBs de forma similar a RNA pol II. A RNA pol I e fatores associados são posteriormente transportados para os nucléolos, onde atuam na transcrição e processamento do rRNA. As RNAs polimerases III e complexos de transcrição e processamento de RNA associados, seguiriam dos CBs para *loci* específicos nos cromossomos

Para se propor esse modelo, foi pressuposto que as complexas enzimas RNAs polimerases I, II e III, juntamente com os fatores de transcrição e processamento,

são pré-associados nos CBs como partículas unitárias (os transcriptossomos), para posteriormente serem transportados para os genes nos cromossomos (GALL et al., 2001).

1.9 Os corpúsculos de Cajal e os nucléolos

A função primária dos nucléolos é biogênese dos ribossomos. Nucléolos são formados no final da mitose ao redor da região dos cromossomos onde as seqüências de rDNA se encontram em tandem e acabam por resultar em uma compartimentalização. Isso acaba gerando um sítio de concentração da maquinaria de transcrição e processamento de rRNA, responsável por formar ribossomos. Esta região é chamada de NOR (nucleolar organizing region).

As regiões nucleolares compreendem um centro fibrilar (*Fibrillar Center* ou FCs), componentes densos fibrilares (*Dense Fibrillar Components* ou, DFCs) e a região dos componentes granulares (*Granular components* ou GCs). A transcrição dos rDNAs ocorre no FC. A região dos DFC com a região FC é rica em RNA polimerase I. O processamento e modificação rRNA ocorrem na DFC onde há acúmulo de snoRNP, onde muitas proteínas são agrupadas e há associação das subunidades dos ribossomos (BOISVERT, 2008).

A formação dos ribossomos tem início com a síntese do RNA ribossomal, feita pela RNA polimerase I. O transcrito inicial 47S é subsequente clivado para formar 28S, 18S e 5,8S, pós-transcricionalmente modificado. Com o auxílio das snoRNPs e proteínas adicionais de fatores de *splicing* estes transcritos são finalmente associados com as proteínas ribossomais antes da interação com a maquinaria de exportação e transporte para o citoplasma.

Aproximadamente 30% das proteínas nucleolares têm uma função que está relacionada à produção da subunidade ribossômica, entretanto, as diversas identidades e funções destas proteínas nucleolares são consistentes com inúmeros

processos que ocorrem nos nucléolos. Isso inclui muitos fatores de processamentos de *splicing* de pré-mRNA e proteínas que estão relacionadas com o controle do ciclo celular bem como reparo de DNA. Estudos têm sido feitos envolvendo o bloqueio da transcrição com actinomicina D (ANDERSEN et al., 2005), e o modo como essas proteínas interagem nas diferentes linhagens celulares primárias ou estabelecidas.

Os genes que codificam as proteínas ribossomais são transcritos em pré-mRNA pela RNA polymerase II e posteriormente os mRNAs são exportados para o citoplasma onde ocorre a tradução. Proteínas recém sintetizadas são importadas para o núcleo e concentradas nos nucléolos onde associam ao rRNA para formar as subunidades ribossômicas. A produção eficiente de ribossomos requer coordenação entre transcrição de rRNA e transcrição de genes que informam proteínas ribossomais. O mecanismo que controla todo esse processo que envolve atividade de polimerases diferentes e associação de proteínas exportadas e reimportadas para o núcleo ainda é desconhecido.

Durante o ciclo celular, os nucléolos perdem sua organização e só se reorganizam quando a transcrição é restabelecida. Na prófase um rápido aumento nos níveis de ciclina B1 e quinase dependente de ciclina 1 ou CDK1 resulta na fosforilação de componentes da maquinaria de transcrição rDNA, incluindo SL-1 e o fator de transcrição TTF1 (HEIX et al., 1998).

A maquinaria de processamento de rDNA não permanece associada com a NOR durante a mitose, sendo redistribuída em NORs menores na interfase. Alguns componentes de processamento deixam os nucléolos juntamente com os pré-rRNA processados que estão associados na DFC e após a transcrição são quebrados. Juntamente com a perda de algumas subunidades de RNA polimerase I da FC, componentes de processamentos de rRNA, como a fibrilarina se dissociam da região DCF. Esta perda de fibrilarina desta região do nucléolo, juntamente com a desintegração desta estrutura, sugere mecanismo de controle em comum (LEUNG, 2004).

Durante o início da anáfase, o nível de ciclina B1/CDK1 diminui o que resulta na reativação de transcrição do rRNA. Subseqüentemente os nucléolos começam a se reorganizar. Componentes do núcleo, bem como a fibrilarina, que tem papel na via

de processamento do pré-rRNA, são recrutados pelos nucléolos no início de G1 , quando a FC começa a se restabelecer tem início o acúmulo de fibrilarina nas proximidades o que se relaciona com o restabelecimento de um nucléolo funcional. As demais proteínas voltam a síntese de novo para restabelecer um núcleo funcional. Este tipo de controle possivelmente é feito por alguma quinase dependente de ciclina.

Os nucléolos têm sido encontrados associados aos corpúsculos de Cajal ou mesmo fisicamente ligados a eles. A intrigante relação entre nucléolos e corpúsculos de Cajal foi primeiramente descrita em 1903 em estudos realizados com microscopia eletrônica de transmissão (RASKA e OCHS, 1990) e por demonstração de vários componentes dos nucléolos nos CBs. Os CBs podem ser encontrados na periferia dos nucléolos ou mesmo, freqüentemente, adjacentes ou fisicamente ligados a eles. Vistos por microscopia eletrônica de transmissão, podem ser observados próximos ao limite dos nucléolos, sendo encontrados componentes fibrilares comuns às duas estruturas (HARDIN et al., 1969; LAFARGA et al., 1983; VILLAGAS e CRESPO, 1983). Por causa da sua associação com os nucléolos, acredita-se que os CBs possam exercer papel na síntese de rRNA e na maturação, transporte e associação de subunidades ribossômicas (HARDIN et al., 1969; RASKA, et al., 1990; LAFARGA et al., 1991; BRACH e OCHS, 1992).

Há uma proteína em comum a ambas as estruturas, a fibrilarina que, assim como os corpúsculos de Cajal, também é altamente conservada na escala evolutiva (RASKA et al., 1990; RASKA et al., 1991). A fibrilarina é uma fosfoproteína de 34kDa encontrada junto à região rica em uridina dos RNAs nucleolares de pequeno tamanho que participa no processamento dos rRNA. (LAMOND e EARSSHAW, 1998). Por outro lado, proteína organizadora do nucléolo 90 (NOR-9), envolvida na regulação da transcrição do rRNA não foi encontrada nos CBs.

As fibrilarinas são encontradas na região fibrilar densa dos nucléolos e têm um importante papel no processamento de pré-RNA em leveduras. Outras proteínas nucleolares também podem ser encontradas nos CBs, como a NOPP140 e a NAP 57 que são proteínas relacionadas com os snoRNAs, envolvidos na pseudourinilação de pré-rRNA (JIMENEZ-GARCIA,1994). Os snoRNAs e suas

proteínas associadas atuam no processamento do pré-RNA nos nucléolos, o que sugere serem estas, componentes transitórios nos CBs a caminho dos nucléolos.

A região organizadora do nucléolo (NOR, Nucleolar Organizing Region) contém genes codificadores do rRNA e quando ativas associam-se a proteínas acídicas. Estas proteínas têm grande afinidade pela prata, permitindo sua utilização como marcadores das NORs ativas. A impregnação com prata (AgNOR), evidencia o centro fibrilar e o componente fibrilar denso.

As principais proteínas identificadoras por AgNOR são a nucleolina que tem papel importante na transcrição do rRNA, e a nucleofosmina, envolvida em etapas mais tardias do processo de maturação do ribossomo

Também compartilham de alguns desses processos componentes dos corpúsculos de Cajal, como é o caso da proteína SMN (*survival motor neuron protein*). Esta proteína está relacionada com o distúrbio neurodegenerativo de atrofia da musculatura espinhal (LUI e DREYFUSS, 1996; MATERA e FREY, 1998; YOUNG et al., 2000).

1.10 Outros componentes dos corpúsculos de Cajal

Os corpúsculos de Cajal também têm sido relacionados com uma série de outros processos que ocorrem no núcleo. Um dos fatores de elongação da RNA polimerase II, o ELL, responsável pela expressão da proteína EAF1, está presente nos CBs. Tratamentos com actinomicina D, um inibidor de RNA polimerase II, a ELL e EAF1 encontram-se dispersas no nucleoplasma, sendo sua presença dependente de pol II ativa. A translocação (11,19)(q23;p13,1) resulta em uma proteína quimérica MLL-ELL, característica da leucemia mielóide. Os CB encontram-se desarranjados nestas leucemias e a coilina se dispersa pelo nucleoplasma (POLAK et al., 2003). A ausência de poli A+ e rRNA sugere que os CBs não estão diretamente ligados ao processamento de RNA (MATERA, 1999).

Tem sido estabelecido uma relação dos corpúsculos de Cajal com as enzimas RNA telomerasas, que sintetizam repetições de DNA teloméricos no final dos cromossomos de eucariontes. O componente de RNA desta enzima (hTR) forma o molde para a síntese do telômero, catalisado pela transcriptase reversa da telomerase (hTERT). Pouco se sabe a respeito da localização nuclear de hTR e hTERT, porém em células tumorais, a hTR acumula nos CBs. Há um acúmulo de hTR nos CBs quando hTERT são ectopicamente expressas em células primárias, onde em condições normais esta enzima não se encontra. Os corpúsculos de Cajal podem estar relacionados com a associação e/ou função da telomerase humana (ZHU et al., 2004).

1.11 Os corpúsculos de Cajal e o ciclo celular

As células eucarióticas possuem um grupo de proteínas regulatórias que fazem parte do sistema de controle do ciclo celular. Estas proteínas determinam se as células estão devidamente organizadas a ponto de entrarem no ciclo celular e se dividirem. Durante todo o processo de divisão, as células passam por diversas fases nas quais o DNA encontra-se em diversos níveis de condensação. Quando se encontram na fase G0/G1 as células dependem de sinais extracelulares de outras células que controlam sua permanência em G0 ou se passam de G1 para S. Quando em S as células começam a duplicar DNA. Quando duplicados e condensados, os cromossomos já estão prontos a se dividirem, fase esta chamada de mitose ou M, quando as células se dividem efetivamente e dão origem a duas células filhas. Na próxima etapa as células entrarão na fase G1, quando as organelas já ocupam seus devidos lugares e as células estão prontas para transcrever e sintetizar todas as proteínas necessárias ao tipo celular que representa. Os pontos de checagem controlam se as células estão prontas ou não para seguirem para a próxima fase.

A divisão celular é um processo complexo, com uma série de eventos que culmina na duplicação do genoma e segregação dos cromossomos e duplicação das células. A decisão de entrar em divisão ocorre em G1, quando as células estão prontas a

receber sinais de fatores de crescimento, e dar início com a maquinaria básica de divisão composta pelas quinases ciclinas dependentes (Cdks). As atividades destas quinases surgem e desaparecem com o avanço do ciclo. As ciclinas são os reguladores de CDKs. O complexo CDK2/ciclina E, é responsável por controlar a passagem do ciclo de G1 para S.

Os corpúsculos de Cajal variam em número e tamanho durante o ciclo e diferentes tipos celulares (ANDREDE et al., 1991,1993; RASKA et al., 1991) e podem ser encontrados em maior número em células transformadas (SPECTOR et al., 1992). Em geral, os corpúsculos não são detectados durante a mitose e nesta fase a coilina encontra-se fosforilada, dispersa pelo citosol e os corpúsculos de Cajal, desta forma, são dissociados. Os corpúsculos são sensíveis ao estado proliferativo de cada célula uma vez que sua expressão pode ser regulada por privação de soro no meio ou por adição do hormônio tireoideano TSH a cultura de células (ANDRADE et al., 1993).

O complexo ciclina E/CDK2 coordena muitos eventos celulares, incluindo a replicação do DNA, duplicação do centrôssomo e ativação de E2F. Estudos sugerem que a ciclinaE/CDK2 tem um papel na ativação da transcrição das histonas durante a fase S via proteínas associadas aos corpúsculos de Cajal como a p220, além disso a p220 quando super-expressa, pode promover a entrada na fase S, independente da transcrição de histona (YE, 2003).

Contudo, fatores relacionados à progressão do ciclo celular, como as ciclinas e quinases ciclinas dependentes podem acumular nos CBs de maneira ciclo dependente. Já foram observadas a CDK2 e ciclina E, sendo recrutadas por este como complexo funcional (LIU et. al., 2000).

Os corpúsculos de Cajal não são detectados durante a mitose. Isso se deve ao fato dos resíduos de serina encontrados na composição da coilina estar na sua forma hiperfosforilada que pode levar a dissociação destes corpúsculos (CARMO-FONSECA et al., 2003). Nesta mesma fase as snRNPs apresentam-se difusas pelo citoplasma (SPECTOR e SMITH, 1986; FERREIRA et al., 1994). Os CBs reaparecem na metade de G1 junto com a reassociação dos nucléolos nas células filhas. O reaparecimento do CBs nas células filhas é dependente de transcrição (FERREIRA et al., 1994).

1.12 Os corpúsculos de Cajal e o e câncer

O câncer é uma doença originada a partir de três fatores preponderantes: a pré-disposição genética, os fatores ambientais e os fatores hereditários. Esses fatores estão associados ao surgimento de mutações genéticas, que podem ocasionar lesões do DNA, e estas se não reparadas, poderão dar início ao processo de desenvolvimento do tumor. Embora o dano genético possa ocorrer ocasionalmente, existem alguns genes que estão mais freqüentemente associados aos processos neoplásicos como no caso do gene p53, que na sua forma não mutada é um gene supressor de tumores, ou seja, um gene que exerce controle negativo sobre a proliferação celular (NIGRO et al., 1989).

O câncer é caracterizado por uma população celular heterogênea, com expressão de diferentes antígenos de superfície e receptores hormonais, além da morfologia celular encontrar-se de forma alterada quando comparada a uma célula do mesmo tecido sadio. Algumas células normais (endoteliais e fibroblastos) possuiriam receptores de membrana para fatores de crescimento produzidos pelas células malignas, formando-se assim um cenário de interdependência mútua e conseqüente manutenção do crescimento celular desordenado dos processos neoplásicos (PONTÉN et al., 1990). Nota-se com isso que estroma do tecido normal adjacente ao processo neoplásico, também colabora para o crescimento e desenvolvimento das neoplasias.

Para que o processo neoplásico se instale, há necessidade de que uma sucessão de erros ocorra para dar origem a uma população neoplásica. Primeiramente, ocorre uma lesão no DNA que pode ter sido originada de fatores externos ou mesmo internos da própria célula dentre eles estão mutação gênica, rearranjos cromossômicos, radiação UV, agentes químicos e vírus oncogênicos capazes de alterar a estrutura do DNA. Todos estes fatores poderão gerar uma mudança irreversível do genótipo da célula normal progenitora, produzindo uma célula com o conteúdo mutado.

O segundo estágio consiste na ativação de oncogenes ou inibição de genes supressores de tumor, estágio este quando o erro no DNA já não pode ser reparado. O último estágio ocorre a progressão do erro para as células filhas, onde há a mudança do microambiente celular, com o objetivo de manter o processo maligno e a capacidade de gerar metástases. Nesta fase, as células se encontram em um meio favorável para que seu crescimento continue, tais como produção de fatores de crescimento e citocinas (PONTÉN et al., 1990).

O termo tumor ou neoplasia caracteriza uma massa anormal de tecido com crescimento que excede os limites anatômicos do tecido sadio. Os tumores podem ser benignos, não apresentando risco de levar à morte, ou malignos. Câncer é o termo utilizado para todos os tumores malignos e compreende um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem outros tecidos e órgãos, adjacentes ou não. Geralmente, as células neoplásicas malignas proliferam agressivamente (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003).

1.13 O Tamanho dos corpúsculos de Cajal

Os corpúsculos de Cajal podem variar de tamanho e frequência de acordo com o tipo celular. Sua existência nas células pode também estar relacionada com a fase do ciclo celular que as células se encontram.

Os neurônios do gânglio trigeminal compreendem três tipos de células com diferentes tamanhos, propiciando um bom modelo para estudo de células de tamanhos dependentes. Utilizando esse modelo, alguns compartimentos celulares podem ser melhor estudados tais como nucléolos (sua dinâmica), corpúsculos de Cajal e speckles (comparação de tamanhos em diferentes tipos celulares). O número de corpúsculos de Cajal aumenta em neurônios maiores em comparação aos menores. Em neurônios grandes há um número maior de CBs associados aos nucléolos. O número de nucléolos por sua vez diminui em neurônios menores.

A atividade transcricional é um mecanismo determinante de tamanho celular em células diplóides, no caso dos neurônios, tem sido sugerido que uma organização transcricional depende da organização dos nucléolos e maquinaria de *splicing* nos três tipos de neurônios (PENA, 2001). Uma relação similar entre atividade transcricional e tamanho das células tem sido observada em células não neuronais onde diferenças no tamanho das células correspondem a diferenças no conteúdo de RNA e uma relação íntima tem sido mostrada entre níveis de transcrição e níveis de RNA/DNA em roedores (SCHMIDT e SCHIBLER, 1995). Além disso, o tamanho celular está relacionado com a quantidade de ribossomos nelas presentes e pelo acúmulo de alguns componentes celulares (MACKNIGHT, 1988; SCHMIDT e SCHIBLER, 1995).

O número de corpúsculos de Cajal por núcleo pode variar quando as células recebem um estímulo para crescerem mais rapidamente, ou quando altas taxas de expressão gênica são induzidas, o que leva a um aumento de sua frequência por núcleo (LAFARGA et al., 1991; BRACH e OCHS, 1992).

Tendo em vista a relação entre CBs e aspectos fundamentais do processamento dos RNAs nos núcleos, o desarranjo dos CBs, que resulta na ausência de detecção nos núcleos, parece ser letal às células, porém a alteração de apenas alguns de seus componentes parece não acarretar danos (POLAK et al., 2003), mostrando que sua manutenção e organização são de fundamental importância para o funcionamento harmônico de cada célula.

1.14 Drogas inibidoras de síntese de RNA

A actinomicina D é uma droga que bloqueia a transcrição de genes que seriam decodificados via RNA polimerase I (genes que informam rRNA 8S, 18S e 28S) e RNA polimerase III (genes de tRNA e 5s rRNA) quando utilizada em baixa concentração (0,01 a 0,09 µg/ml) (POLAK et al., 2003).

A α -amanitina é responsável por bloquear a transcrição dos genes decodificados pela RNA polimerase II (CUSTODIO e ANTONIOUS, 2006) comprometendo o processo de transcrição de mRNA, snoRNA e snRNA, através de um mecanismo que envolve um ciclo de fosforilação e defosforilação do domínio carboxi-terminal desta enzima .

Acredita-se que a transcrição e os complexos de processamento de RNA polimerase I, II e III são pré-associados nos CBs antes de seguirem para seus sítios de transcrição nos cromossomos e nos nucléolos (GALL, 2001). Inibição ou alteração da transcrição por actinomicina D, α -amanitina retira snRNP dos corpúsculos e resulta na associação dos corpúsculos de Cajal aos nucléolos (RASKA et al., 1990; CARMO-FONSECA et al., 1992).

A frequência de corpúsculos de Cajal por núcleo está associada à proliferação celular mais intensa.

O dinamismo nuclear se fez claro ao estudar as estruturas nucleares, como os corpúsculos de Cajal e os nucléolos após interferência com inibidores de síntese de RNA. Quando submetidas a este tipo de interferência, tanto os corpúsculos quanto os nucléolos apresentaram como característica uma reorganização nas

O bloqueio da síntese de RNA polimerase I e III induz em células normais e tumorais promoveu alterações na região dos CBs aumentando seu volume corpuscular, modificando a distribuição da proteína fibrilarina e induzindo queda em sua expressão. Em células tumorais o aumento do volume é ainda maior.

As células hepáticas demonstraram uma reação individual dependendo da interferência sofrida, formando uma série de estruturas corpusculares contendo RNA polimerase II em seu conteúdo. O núcleo é uma estrutura dinâmica, o que é evidenciado pelas alterações nucleolares induzidas pelo bloqueio da RNA polimerase II

O bloqueio da RNA polimerase II não induz alterações aparentes nos corpúsculos de Cajal, e nem altera morfologicamente os nucléolos tanto das células normais quanto das células tumorais.

A dinâmica das organelas nucleares está relacionada às necessidades da célula. Cada célula exerce individualmente, e de acordo com seu estágio proliferativo, o controle dessa dinâmica, que deve ocorrer de forma harmoniosa, para que processos biológicos aconteçam perfeitamente em um organismo como um todo, e a expressão gênica seja controlada e organizada de tal forma a evitar doenças.

Referências bibliográficas

ALLIEGRO, M. C.; ALLIEGRO, M. A. Protein heterogeneity in the coiled body compartment. **Exp. Cell. Res.**, v. 39, p. 60-68, 1998.

ANDERSEN, J. S.; LAM, Y. W.; LEUNG, A. K.; ONG, S. E.; LYON, C. E.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Nucleolar proteome dynamics **Nature**, v. 433, p. 77-83, 2005.

ANDRADE, L. E. C.; TAN, E. M.; CHAN, E. K. L. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 1947-1951, 1993.

ANDRADE, L. E.; CHAN, E. K.; RASKA, I.; PRIBLLES, C. L.; ROOS, G.; TAN, E. M. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1407-1419, 1991.

ANTONIOU, M.; CARMO-FONSECA, M.; FERREIRA, J.; LAMOND, A. Nuclear organization of splicing snRNPs during differentiation of murine myeloid leukemia cells in vitro. **J. Cell. Biol.**, v. 123, p. 1055-1068, 1993.

ARORA, B.; JEEVAN, D.; PUNIA, R. S.; KUMAR, S.; ARORA, D. R. AgNORs in squamous cell carcinoma of head and neck. **J. Indian. Med. Assoc.**, v. 100, p. 315-316, 2002.

BEN-ZE'EV, A. Regulation of cytoskeletal protein synthesis in normal and cancer cells. **Cancer. Rev.**, v. 4, p. 91-116, 1986.

BEN-ZE'EV, A. The cytoskeleton in cancer cells. **Acta. Biochim. Biophys.**, v. 780, p. 197-212, 1985.

BERCIANO, M. T.; NOVELL, M.; VILLAGRA, N. T.; CASAFONT, I.; BENGOCHEA, R.; VAL-BERNAL, J. F.; LAFARGA, A. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. **M. J. Struct. Biol.**, v. 158, p. 410-420, 2007.

BIRRELL, G. B., HEDBERG, K. K.; HABLSTON, D. L.; GRIFFITH, O. H. Protein kinase C inhibitor H-7 alters the actin cytoskeleton of cultured cells. **J. Cel. Physiol.**, v. 141, p. 74-84, 1990.

BLÉOO, S.; SUN. X.; HENDZEL, M. J.; ROWE, J. M.; PACKER, M.; GODBOUT, R. Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-mRNA. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 3046-3059, 2001.

BOISVERT F. M.; KONINGSBRUGGEN, S.; NAVASCUÉS, J.; LAMOND, A. I. The multifunctional nucleolus. **Mol. Cell. Biol.**, v.8, p. 573-585, 2007.

BOISVERT, F. M.; COTE, J.; BOULANGER, M. C.; CLEROUX, P.; BACHAND, F.; AUTEXIER, C.; RICHARD, S. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. **J. Cell. Biol.**, v.159, p. 957-969, 2002.

BOUDONCK, K.; DOLAN, L.; SHAW, P. J. The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein. **Mol. Biol. Cell.**, v. 10, p. 2297-22307, 1999.

BRACH, K.; OCHS, R. L. Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. **Exp. Cell. Res.**, v. 202, p. 211-223, 1992.

CARMO-FONSECA, M.; FERREIRA, J.; LAMOND, A. I. Assembly of snRNP containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. **J. Cel. Biol.**, v. 120, p. 841-852, 1993.

CARMO-FONSECA, M.; PEPPERKOK, R.; CARVALHO, M. T.; LAMOND, A. I.; Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. **J. Cell. Biol.**, v. 117, p. 1-14, 1992.

CARMO-FONSECA, M.; PLATANI, M.; SWEDLOW, J. R. Macromolecular mobility inside the cell nucleus. **Trends. Cell. Biol.** v. 12, p. 491-495, 2002.

CARMO-FONSECA, M. New clues to the function of the Cajal body. **EMBO. Rep.**, v. 3, p. 726-727, 2002.

CARVALHO, T.; ALMEIDA, F.; CALAPEZ, A.; LAFARGA, M.; BERCIANO, M. T.; CARMO-FONSECA, M. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body **J. Cell. Biol.**, v. 147, p. 715-728, 1999.

CARVALHO, H.F.; SHIVIEI M.; RECCO-RIMENTEL. **A célula 2001**. Barueri: Manole, 2001. 287 p.

CHAN, E. K.; TAKANO, S.; ANDRADE, L. E., HAMEL, J. C.; MATERA, A. G. Structure, expression and chromosomal localization of human p80-coilin gene. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 22, p. 4462-4469, 1994.

CHEN, H. K.; PAI, C. Y.; HUANG, J. Y.; YEH, N. H. Human Nopp140, which interacts with RNA polymerase I: implications for rRNA gene transcription and nucleolar structural organization. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 8536-85346, 1999.

CHING, R. W.; DELLAIRE, G.; ESKIW, C. H.; BAZETT-JONES, D. P. PML bodies: a meeting place for genomic loci? **J. Cell. Sci.**, v.118, p. 847-854, 2005.

CHUANG, C. H.; CARPENTER, B.; FUCHSOVA, T.; JOHNSON, P. DE LANEROLLE; BELMONT, A. S. Long-range directional movement of an interphas chromosome site. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 825-831, 2006.

CIOCE, M., LAMOND, A. I. Cajal bodies: a long history of discovery. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 21, p. 105-131, 2005.

CMARKO, D.; VERSCHURE, P.J.; MARTIN, T. E.; DAHMUS, M. E.; KRAUSE, S.; FU, X. D.; VAN DRIEL, R.; FAKAN, S. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection **Mol. Biol. Cell.**, v.10, p. 211-223, 1999.

CREMER, M.; VON HASE, J.; VOLM, T.; BRERO, A.; KRETH, G.; WALTER, J.; FISCHER, C.; SOLOVEI, I.; CREMER, C.; CREMER, T. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. **Chromosome**, v. 9, p. 541-567, 2001.

CREMER, T.; KURZ, A.; DIETZEL, S.; RINKE, B.; SCHROCK, E.; SPEICHER, M. R.; MATHIEN, U.; JAUCH, A.; EMMERICH, P. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. **Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.**, v.58, p. 777-792, 1993.

CUSTÓDIO, N.; ANTONIOU, M. CARMO-FONSECA, M. Abundance of the largest subunit of RNA polymerase II in the nucleus is regulated by nucleo-cytoplasmic shuttling **Exper. Cell. Res.**, v. 312, p. 2557 – 2567, 2006.

DARZACQ, X.; JADY, B. E.; VERGHEGGEN, C.; KISS, A. M.; BERTRAND, E.; KISS, T. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. **EMBO**, v. 21, p. 2746-2756, 2002.

DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 13, p. 83-117, 1997.

DUNDR, M.; OSPINA, J. K.; SUNG, M. H.; JOHN, S.; UPENDER, M.; RIED, T.; HAGER, G. L.; MATERA, A. G. Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo. **J. Cell. Biol.**, v. 179, p. 1095-103, 2007.

DUNDR, M.; HEBERT, M. D.; KARPOVA, T. S.; STANEK, D.; XU, H.; SHPARGEL, K. B.; MEIERU. T.; NEUGEBAUER, K. M.; MATERA, A. G.; MISTELI, T. In vivo kinetics of Cajal body components. **J. Cell. Biol.**, v. 164, p. 831-842, 2004.

EL-BACHA, T.; FREITAS, M. S.; SOLA-PENNA, M.; Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. **Mol. Genet. Metab.**, v. 79, p. 294-299, 2003.

FAKAN, S.; LESER, G.; MARTIN, T. E. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. **J. Cell. Biol.** v. 98, p.358-363, 1984.

FERREIRA, P.; HEMERLY, A.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Control of cell proliferation during plant development. **Plant. Mol. Biol.**, v. 26, p.1289-1303, 1994.

FLAHERTY, S. M.; FORTES, P.; IZAURRALDE, E.; MATTAJ, I. W.; GILMARTIN, G. M. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 11893, 1997.

FORNEROD, M.; OHNO, M.; YOSHIDA, M.; MATTAJ, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, p. 1051-1060, 1997.

FORNEROD, M.; OHNO, M. Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins. **Res. Probl. Cell. Differ.**, v.35, p. 67-91, 2002.

FREY, M. R.; MATERA, A. G. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, p. 5915-5919. ,1995.

GABBIANI, G.; KOCHER, O. Cytocontractile and cytoskeletal elements in pathologic processes: pathogenetic and diagnostic value. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.107, p. 622-625, 1983.

GALL, J. G.; TASVETKOV, A.; WU, Z.; MURPHY, C. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? **Dev. Genet.**, v.16, p. 25-35, 1995.

GALL, J. G.; Cajal bodies: the first 100 years. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 16, p. 273-300, 2000.

GALL, J. G. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. **FEBS. Lett.**, v. 498, p. 164-7, 2001.

GANT, T. M.; WILSON, K. L. Nuclear assembly. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 13, p. 669-695, 1997.

GISSELSSON, D.; BJÖRK, J.; HÖGLUND, M.; MERTENS, F.; DAL CIN, P.; AKERMAN, M.; MANDAH, D. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 199-206, 2001.

GOLDSCHMIDT, R. B.; STEWARD, O. Retrograde regulation of neuronal size in the entorhinal cortex: consequences of the destruction of dentate gyrus granule cells with colchicine. **Rest. Neurol. Neurosci.**, v. 3, p. 335–343, 1992.

HARDIN, J. H.; SPIECER, S. S.; GREENE, W. B. The paranucleolar structure, accessory body of Cajal, sex chromatin, and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: a cytochemical and ultrastructural study. **Anat. Rec.**, v. 164, p. 403-431, 1969.

HEBERT, M.D.; SHPARGEL, K. B.; OSPINA, J. K.; TUCKER, K. E.; MATERA, A. G.; Coilin methylation regulates nuclear body formation. **Dev. Cell.**, v. 3, p. 329–337, 2002.

HEBERT, M. D.; SZYMCHYK, P. W.; SHPARGEL, K. B.; MATERA, A. G. Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. **Genes. Dev.**, v. 15, p. 2720–2729, 2001.

HEIX, J.; VENDE, A.; VOIT, R.; BUDDE, A.; MICHAELIDIS, T. M.; GRUMMT, I. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. **EMBO. J.**, v.17, p. 7373–7381, 1998.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 126, p. 135-148, 2006.

HOLME, T. C. Cancer cell structure: actin changes in tumour cell – possible mechanisms. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v.16, p. 161-169, 1990.

HOZÁK, P.; SASSEVILLE, A. M.; RAYMOND, Y.; COOK, P. R. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. **J. Cell. Sci. Feb.**, v. 108, p. 635-644, 1995.

HUANG, S.; SPECTOR, D. L. Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors. **J. Cell. Biochem.**, v. 62, p. 191-197, 1996.

ISAAC, C.; YANG, Y.; MEIER, U. T. Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. **J. Cell. Biol.**, v. 142, p. 319-29, 1998.

IZAURREALDE, E.; LEWIS, J.; GAMBERI, C.; JARMOLOWSKI, A.; MCGUIGAN, C.; MATTAJ, I. W. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. **Nature**, v. 376, p. 709-712, 1995.

JACKSON, D. A.; HASSAN, A. B.; ERRINGTON, R. J.; COOK, P. R. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. **EMBO. J.**, v. 12, p. 1059-1065, 1993.

JADY, B. E.; DARZACQ, X.; TUCKER, K. E.; MATERA, A. G.; BERTRAND, E.; KISS, T. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. **EMBO. J.**, v.22, p.1878–1888, 2003.

JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F.; SEGURA-VALDEZ, M. L.; OCHS, R. L.; ROTHBLUM, L. I.; HANNAN, R.; SPECTOR, D. L. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. **Mol. Biol. Cell.**, v. 5, p. 955-966, 1994.

JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F.; SPECTOR, D. L. In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. **Cell**, v.73 p. 47-59, 1993.

KAISER, T. E.; INTINE, R. V.; DUNDR, M. De novo formation of a subnuclear body. **Science**, v. 322, p. 1713-1717, 2008.

KANAI, Y.; DOHMAE, N.; HIROKAWA, N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. **Neuron**, v. 43, p. 513-525, 2004.

KELLER, H. U.; NIGGLI, V.; ZIMMERMANN, A. Diacylglycerols and PMA induce actin polymerization and distinct shape changes in lymphocytes: relation to fluid pinocytosis and locomotion. **J. Cell. Sci.**, v. 93, p. 457-465, 1989.

KIM, E.; DU, L.; BREGMAN, D. B.; WARREN, S. L. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. **J. Cell. Biol.**, v. 136, p. 19-28, 1997.

KOFFER, A.; DARIDAN, M.; CLARKE, G. D. Regulation of the microfilament system in normal and polyoma virus transformed cultured (BHK) cells. **Tissue. Cell.**, v. 17, p. 147-59, 1985.

KRAUSE, S.; FAKAN, S.; WEIS, K.; WAHLE, E. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. **Exp. Cell. Res.**, v. 214, p. 75-82, 1994

KRUHLAK, M. J.; LEVER, M. A.; FISCHLE, W.; VERDIN, E.; BAZETT-JONES, D. P.; HENDZEL, M. J. Reduced mobility of the alternate splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state spckle compartments. **J. Cell. Biol.** v. 150, p. 41-51, 2000.

KUMARAN, R. I.; MURALIKRISHNA, B.; PARNAIK, V. K. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. **J. Cell. Biol.**, v. 159, p. 783-793, 2002.

LAFARGA, M.; ANDRÉS, M. A.; FERNÁNDEZ-VIADERO, C.; VILLEGAS, J.; BERCIANO, M. T. Number of nucleoli and coiled bodies and distribution of fibrillar centres in differentiating Purkinje neurons of chick and rat cerebellum. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 191, p. 359-367, 1995.

LAFARGA, M.; BERCIANO, M. T.; GARCIA-SEGURA, L. M.; ANDRES, M. A; CARMO-FONSECA, M. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. **J. Neurocytol.**, v. 27, p. 205-217, 1998.

LAFARGA, M.; BERCIANO, M. T.; HERVAS, J. P.; VILLEGAS, J. Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. **J. Neurocytol.**, v.18, p. 19-26, 1989.

LAFARGA, M.; HERVAS, J. P.; SANTA-CRUZ, M. C.; VILLEGAS, J.; CRESPO, D. The "accessory body" of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v. 166, p. 19-30, 1983.

LAFARGA, M.; ANDRES, M. A.; BERAANO, M. T.; MAQUEIRA, E. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 308, p.329-339.1991.

LAMOND, A. I.; SPECTOR, D. L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.4, p. 605-612, 2003.

LAMOND, A. I.; EARNSHAW, W. C. Structure and function in the nucleus. **Science**, v. 280, p. 547-53, 1998.

LARSSON, S. H.; CHARLIEU, J. P.; MIYAGAWA, K.; ENGELKAMP, D.; RASSOULZADEGAN, M.; ROSS, A.; CUZIN, F.; VAN HEYNINGEN, V.; HASTIE, N. D. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. **Cell**, v. 81, p. 391-401, 1995.

LEMM, I.; GIRARD, C.; KUHN, A. N.; WATKINS, N. J.; SCHNEIDER, M.; BORDONNE, R.; LUHRMANN, R. OngoingUsnRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. **Mol. Biol. Cell.**, v. 17, 3221–3231, 2006

LESER, G. P.; FAKAN, S.; MARTIN, T. E. Ultrastructural distribution of ribonucleoprotein complexes during mitosis. snRNP antigens are contained in mitotic granule clusters. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 50, p. 376-389, 1989.

LEUNG, A. K. I. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. **J. Cell Biol.**, v. 166, p. 787–800, 2004.

LIU, Q.; DREYFUSS, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. **EMBO. J.**, v. 15, p. 3555-3565, 1996.

LIU, J. M. D.; HEBERT, Y. Y. E.; TEMPLETON, H.; KUNG, J.; MATERA, A. G. Cell cycle-dependent localization of the CDK2-cyclin E complex in Cajal (coiled) bodies. **J. Cell. Sci.**, v. 113, p. 1543–1552, 2000.

LÜHRMANN, R.; KASTNER, B.; BACH, M. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1087, p. 265-292, 1990.

MACHADO-SANTELLI, G.M.; MORI, L.; PEREIRA C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v. 7, p. 321-34, 1994.

MACKNIGHT, A. D. Principles of cell volume regulation. **Ren. Physiol. Biochem.**, v.11, p. 114-141, 1988.

MALATESTA, M.; ZANCANARO, C.; MARTIN, T. E.; CHAN, E. K.; AMALRIC, F.; LÜHRMANN, R.; VOGEL, P.; FAKAN, S. Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 85, p. 82-93, 1994.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. **Histochem. Cell Biol.**, v.115, p. 403-11, 2001.

MATERA, A. G. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. **Trends. Cell Biol.**, v. 9, p. 302-309, 1999.

MATERA, A. G.; FREY, M. R. Coiled bodies and gems: Janus or Gemini. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 63, p. 317-321, 1998.

MATERA, A. G; SHPARGEL, K. B. Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, p. 317-324, 2006.

MISTELI, T.; SPECTOR, D. L. The cellular organization of gene expression. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 323-331, 1998.

MISTELI, T. Concepts in nuclear architecture. **BioEssays**, v. 27, p. 477-487, 2005.

MISTELI, T.; CACERES, J. F.; SPECTOR, D. L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. **Nature**, v. 387, p. 523-527, 1997.

MOIR, R. D.; MONTAG-LOWY, M.; GOLDMAN R. D. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. **J. Cell Biol.**, v. 125, p. 1201-1212, 1994.

MORENCY, E.; SABRA, M.; CATEZ, F.; TEXIER, P.; LOMONTE, P. A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability **J. Cell Biol.**, v. 177, p. 757-756, 2004.

MORTILLARO, M. J.; BLENCOWE, B. J.; WEI, X.; NAKAYASU, H.; DU, L.; WARREN, S. L.; SHARP, P. A.; BEREZNEY, R. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 93, p. 8253-8257, 1996.

NAKIELNY, S.; SIOMI, M. C.; SIOMI, H.; MICHAEL, W. M.; POLLARD, V.; DREYFUSS, G. Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway. **Exp. Cell Res.**, v. 229, p. 261-266, 1996.

NAVASCUES, J.; BERCIANO, M. T.; TUCKER, K. E.; LAFARGA, M.; MATERA, A. G. Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis. **Chromosoma**, v. 112, p. 398-409, 2004.

NIGRO, J. M.; BAKER, S. J.; PREISINGER, A. C.; JESSUP, J. M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S. H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, p. 705-708, 1989.

OAKLEY, B. R. An abundance of tubulins. **Trends Cell Biol.**, v.10, p. 537-542, 2000.

OGG, S. C.; LAMOND, A. I. Cajal bodies and coilin-moving towards function. **J. Cell Biol.**, v. 159, p 17-21, 2002.

O'KEEFE, R. T.; MAYEDA, A.; SADOWSKI, C. L.; KRAINER, A. R.; SPECTOR, D. L.; Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. **J. Cell Biol.**, v.124, p. 249-60, 1994.

PELLIZZONI, L.; BACCON, J.; CHARROUX, B.; DREYFUSS, G.; The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 1079-88, 2001.

PELLIZZONI, L.; CHARROUX, B. A.; DREYFUSS, G. SMN mutants of spinal muscular Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. **J. Cell Biol.**, v. 154, p. 293–307, 1999.

PENA, E.; BERCIANO, M.T.; FERNANDEZ, R.; OJEDA, J. L.; LAFARGA, M.; Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the

organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 430, p. 250–263, 2001.

PHAIR, R. D. AND MISTELI, T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. **Nature**, 404, 604-609; 2000.

INKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; KUO, W. L.; CHEN, C.; ZHAI, Y.; DAIRKEE, S. H.; LJUNG, B. M.; GRAY, J. W.; ALBERTSON, D. G. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 207-11, 1998.

PLATANI, M.; GOLDBERG, I.; SWEDLOW, J. R.; LAMOND, A. I. In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. **J. Cell Biol.**, v. 151, p. 1561-1574, 2000.

OLAK, E. P.; SIMONE, F.; KABERLEIN, J.J.; ROGER, T. L; THIRMAN, M. J. ELL and EAF1 are Cajal bodies components that are disrupted in MLL-ELL Leukemia. **Mol. Biol. Cell.**, v. 14, p. 1517-1528, 2003.

POLITZ, J. C.; PEDERSON, T. Review: movement of mRNA from transcription site to nuclear pores. **J. Struct. Biol.**, v. 129, p. 252-257, 2000.

POLLACK, R.; OSBORN, M.; WEBER, K.; Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 72, p. 994-998, 1975.

PONTÉN, J.; HOLMBERG, L.; TRICHOPOULOS, D.; KALLIONIEMI, O. P.; KVÅLE, G.; WALLGREN, A.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Biology and natural history of breast cancer. **Int. J. Cancer Suppl.**, v.5, p. 5-21, 1990.

RAO, K. M.; COHEN, H. J. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. **Mutat. Res.**, v. 256, p. 139-148, 1991.

RAO, K. M. K. Phorbol esters and retinoids induce actin polymerization in human leukocytes. **Cancer Lett.**, v. 28, p. 253-262, 1985.

RASKA, I.; OCHS, R. L.; ANDRADE, L. E.; CHAN, E. K.; BURLINGAME, R.; PEEBLES, C.; GRUOL, D.; TAN, E. M. Association between the nucleolus and the coiled body. **J. Struct. Biol.**, v. 104, p. 120-127, 1990.

RASKA, I.; KOBERNA, K.; MALINSKY, J.; FIDLEROVA, H.; MASATA, M.; The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biol. Cell**, v. 96, p. 579–594, 2004.

RASKA, I.; SHAW, P. J.; CMARKO, D.; Structure and function of the nucleolus in the spotlight. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, p. 325–334, 2006.

REYNOLDS, P.; MONTGOMERY, A.; HUGHES, B. Nuclear "caps" produced by actinomycin D. **Cancer Res.**, v. 24, p. 1269-1267, 1964.

ROBINETT, C. C. A.; STRAIGHT, G.; LI, C.; WILLHELM, G.; SUDLOW, A.; MURRAY; BELMONT, A.S. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 1685–1700, 1996.

SANTAMA, N.; DOTTI, C. G.; LAMOND, A. I. Neuronal differentiation in the rat hippocampus involves a stage-specific reorganization of subnuclear structure both in vivo and in vitro. **Eur. J. Neurosci.**, v. 8, p. 892-905, 1996.

SASTRODIHARDJO, S.; SASAKI, Y.; SHINA, Y.; KANNO, Y. Possible involvement of reorganization of actin filaments, induced by tumor-promoting phorbol esters, in changes in colony shape and enhancement of proliferation of cultured epithelial cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 132, p. 49-56, 1987.

SCHMIDT, E. E.; SCHIBLER, U. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y, and the liverenriched transcription factor DBP. **J. Cell. Biol.**, v. 128, p. 467–483, 1995.

SCHMIDT, E. E.; SCHIBLER, U. High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. **Development**, v. 121, p. 2373-2383, 1995.

SCHUL, W.; DE LONG, L.; VAN DREIL, R. Nuclear neighbours: the spatial and functional organization of genes and nuclear domains. **J. Cell Biochem.**, v. 70, p. 159-171, 1998.

SHARP, D. J.; ROGERS, G. C.; SCHOLEY, J. M. Microtubule motors in mitosis. **Nature**, v. 407, p. 41-47, 2000.

SHAW, P. J.; HIGGETT, M. I.; BEVEN, A. F.; JORDAN, E. G. The nucleolar architecture of polymerase I transcription and processing. **EMBO. J.**, v. 14, p. 2896-906, 1995.

SLEEMAN, J. E.; AJUH, P.; LAMOND, A. J. SnRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 4407-4419, 2001.

SLEEMAN, J. E.; LAMOND, A. I. Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 1065-1074, 1999.

SNAAR, S.; WIESMEIJER, K.; JOCHEMSEN, A. G.; TANKE, H. J.; DIRKS, R. W. Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells. **J. Cell Biol.**, v. 151, p. 653-662, 2000.

SOBUE, K.; FUJIO, Y.; KANDA, K. Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 85, p. 482-486, 1988.

SPECTOR, D. L.; FU, X. D.; MANIATIS Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. **T. EMBO. J.**, v. 10, p. 3467-3481, 1991.

SPECTOR, D. L.; LANDON, S.; O'KEEFE, R. T. Organization of RNA polymerase II transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. **Biochem. Soc. Trans.**, v.21, p. 918-920, 1993.

SPECTOR, D. L.; SMITH, H. C. Redistribution of U-snRNPs during mitosis. **Exp. Cell Res.**, v.163, p. 87-94, 1986.

SPECTOR, D. L.; Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.87, p. 147-151, 1990.

SPECTOR, D. L.; LARK, G.; HUANG, S. Differences in snRNP localization between transformed and non transformed cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 3, p. 555-569, 1992.

STANĚK, D.; RADER, S. D.; KLINGAUF, M.; NEUGEBAUER, K. M. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 505-516, 2003.

STANEK, D.; NEUGEBAUER, K. M. The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. **Chromosoma**, v. 115, p. 343–354, 2006.

STANEK, D. S. D.; RADER, M.; KLINGAUF, K.; NEUGEBAUER, K. M. Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 505–516, 2003.

STERNSDORF, T.; GRÖTZINGER T, JENSEN K, WILL H. Nuclear dots: actors on many stages. **Immunobiology**, v. 198, p. 307-331, 1997.

STUURMAN. N.; HEINS, S.; AEBI, U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. **J. Struct. Biol.**, v. 122, p. 42-66, 1998.

SUN. J.; XU, H.; SUBRAMONY, S. H.; HEBERT, M. D. Interactions between coilin and PIASy partially link Cajal bodies to PML bodies **J. Cell Sci.**, v. 118, p. 4995-5003, 2005.

TUCKER, K. E.; BERCIANO, M. T.; JACOBS, E. Y.; LEPAGE, D. F.; SHPARGEL, K. B.; ROSSIRE, J. J.; CHAN, E. K.; LAFARGA, M.; CONLON, R. A.; MATERA, A. G. Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. **J. Cell Biol.**, v. 154, p.293-307, 2001.

VALERO, J.; BERCIANO, M. T.; WERUAGA, E.; LAFARGA, M.; ALONSO, J. R. Pre-neurodegeneration of mitral cells in the pcd mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies. **Mol. Cell Neurosci.**, v. 33, p. 283-95, 2006.

VERHEGGEN, C. D. L.; LAFONTAINE, D.; SAMARSKY, J.; MOUAIKEL, J. M.; BLANCHARD, R.; BORDONNE, E.; BERTRAND. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. **EMBO J.**, v. 21, p. 2736–2745, 2002.

WANG, E.; GOLDBERG, A. R. Changes in microfilament organization and surface topography upon transformation of chick embryo fibroblasts with Rous sarcoma virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 73, p. 4065-4069, 1976.

WANSINK, D. G.; SCHUL, W.; VAN DER KRAAN, I.; VAN STEENSEL, B.; VAN DRIEL, R.; DE JONG, L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. **J. Cell Biol.**, v. 122, p. 283-293, 1993.

WILL, C. L.; LUHRMANN, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 290-301, 2001.

XU, H.; PILLAI, R. S.; AZZOUZ, T. N.; SHPARGEL, K. B.; KAMBACH, C.; HEBERT, M. D.; SCHÜMPERLI, D.; MATERA, A. G. The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. **Chromosoma**, v. 114, p. 155-66, 2005.

YE, X.; WEI, Y.; NALEPA, G.; HARPER, J. W. The cyclin E/Cdk2 substrate p220(NPAT) is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 23, p. 8586-8600, 2003.

YOUNG, P. J.; LE, T. T.; DUNCKLEY, M.; NGUYEN, T. M.; BURGHESE, A. H.; MORRIS, G. E. Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: Nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. **Exp. Cell Res.**, v. 265, p. 252–261, 2001.

YOUNG, P. J.; LE, T. T.; THI MAN, N.; BURGHESE, A. H.; MORRIS, G. E. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. **Exp. Cell Res.**, v. 256, p. 365-374, 2000.

ZHU, Y.; TOMLINSON, R. L.; LUKOWIAK, A. A.; TERNS, R. M.; TERNS, M.P. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 81–90, 2004.