

00341 6
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTÍCULAS RIBONUCLEOPROTÉICAS DURANTE LA
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE CRISTALINO DE EMBRIÓN DE
POLLO

TESINA

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

JOSE ROBERTO PERALTA RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS : DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998
2.67694



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microscopía
Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional
Autónoma de México.

Agradezco a la Dra. Guadalupe Zavala Padilla su dedicación en la asesoría para la realización de este trabajo y así mismo a los Especialistas en Microscopía Electrónica Marco Antonio González Jiménes y Ernestina Flores Rivera por sus orientaciones durante mi formación.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen -----	1
Introducción	
Expresión Génica -----	3
Morfogénesis del Cristalino -----	6
Justificación -----	8
Objetivos del Trabajo -----	9
Hipótesis -----	9
Material y Método -----	9
Resultados -----	11
Discusión -----	32
Conclusiones -----	35
Bibliografía -----	36

RESUMEN.

El mecanismo mediante el cual se realiza la expresión génica aún presenta incógnitas. No obstante, se ha establecido que la transcripción que se realiza en el núcleo y la traducción en el citoplasma. A partir de diversos estudios tanto bioquímicos y ultraestructurales, se considera la existencia de la etapa intermedia a las anteriores, que es la postranscripcional y que está relacionada incluso con el transporte de RNA hacia el citoplasma. Las moléculas de RNA requieren de ciertas modificaciones para salir del núcleo al citoplasma, como es la asociación con proteínas para formar las ribonucleoproteínas, la metilación en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3'. Los gránulos pericromatinianos (GPC) además están relacionados con el transporte de ese tipo de RNA.

El propósito de este trabajo fue demostrar que durante la diferenciación del cristalino, el número de GPC se incrementaría en relación directa al grado de diferenciación de sus células. Para ello se utilizaron cristalinos de embrión de pollo de la cepa White Leghorn entre los estadios 14 y 36 de la clasificación de Hamilton y Hamburger que fueron cortados y procesados mediante el método de contraste preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard y analizados con el microscopio electrónico de transmisión.

Los resultados mostraron que el número de GPC se incrementa al inicio de la diferenciación y disminuye conforme avanza dicho proceso. Lo anterior difiere de lo observado en la diferenciación de los neuroblastos y mioblastos, ya que el número de este tipo de partículas aumenta paulatinamente hasta la total diferenciación de las células; sin embargo lo observado en este trabajo coincide en parte con lo detectado en células de la notocorda ya que en ellas el número de GPC se incrementa momentos previos a su diferenciación.

Lo anterior podría ser el reflejo de mecanismos postranscripcionales diferentes supeditados por las características propias de cada estructu-

ra. Por otra parte estos resultados generan la necesidad verificar el comportamiento del resto de partículas ribonucleoproteínicas en el cristalino y en otros órganos que poseen capacidad inductora múltiple en estructuras vecinas a ellas.

PARTÍCULAS RIBONUCLEOPROTÉICAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE CRISTALINO DE EMBRIÓN DE POLLO

INTRODUCCION.

Durante el desarrollo embrionario de los seres vivos se lleva a cabo la diferenciación celular, proceso mediante el que las células adquieren en forma gradual sus características morfofuncionales a partir de la síntesis de proteínas específicas, lo que les permite organizarse para conformar tejidos y órganos que tendrán funciones particulares. A lo largo de él. participan grupos celulares vecinos y distantes que por medio de interacciones químicas de naturaleza proteínica conducen al pleno desarrollo de las estructuras.

Este proceso esta regulado por mecanismos que controlan la expresión de los genes, estos últimos dependen de interacciones específicas tanto intra como extracelulares. Es el núcleo celular, el que actúa como sistema de retroalimentación que permite a las células sintetizar la estructura primaria de proteínas, a partir de la información genética presente en el DNA, mediante la producción de RNA.

EXPRESIÓN GÉNICA.

Se considera que el cigoto posee la información genética necesaria para conformar un sistema vivo altamente organizado (1). Esta información se expresa a lo largo del desarrollo embrionario lo que da lugar a estirpes celulares que gradualmente adquieren características estructurales y funcionales particulares, que al organizarse y establecer interacciones entre ellas conforman órganos y sistemas.

El proceso mediante el que se origina la variabilidad celular es caracterizado por síntesis de proteínas y se fundamenta en la transcripción y traducción de la información genética contenida en el DNA, esto a su vez se rige por mecanismos de expresión y represión de genes durante el desarrollo embrionario (2).

La transcripción consiste en la transferencia de información contenida en el DNA a moléculas de RNA, este último se constituye a partir de bases complementarias a las que conforman la cadena de DNA. El proceso requiere de enzimas que regulan en el gen la secuencia de bases que serán copiadas, el desenrollado de la cadena de DNA en la zona a transcribirse, el copiado de la secuencia y el fin de éste; y el enrollado de la cadena de DNA (3).

El mecanismo mediante el cual se transfiere la información genética presente en el DNA al RNA para la síntesis de proteínas es complejo. No obstante, diversos estudios han demostrado la existencia de RNA previo al RNA mensajero (RNAm), al que se le ha denominado RNA heterogéneo (hn) o premensajero (pre-m), que es transformado para intervenir en la síntesis de la estructura primaria de proteínas (4,5).

Este RNApre-m antes de considerarse RNAm maduro y salir del núcleo hacia el citoplasma, sitio en el que se llevará a cabo el proceso de traducción de la información para la síntesis de proteínas correspondiente, deberá adquirir ciertas características que son: 1) Eliminación de intrones y unión de exones ("splicing"), 2) Asociación con proteínas para la formación de ribonucleoproteínas, 3) Adición de grupos metilados y fosforilados de guanósina (formación del "capping") y 4) Poliadenilación (6-8).

Las ribonucleoproteínas o partículas ribonucleoproteínicas (RNP) se observan en los núcleos en interfase y se han caracterizado morfológicamente cuatro tipos de complejos ribonucleoproteínicos que son: los gránulos pericromatinianos (GPCs) e intercromatinianos, las fibras pericromatinianas y el nucleolo, que es el de mayor tamaño. Todos ellos están en correlación tanto bioquímica y funcionalmente con la síntesis y procesamiento de RNA (9-11).

Específicamente los GPCs se encuentran generalmente en la periferia de la cromatina compacta y fueron descritos inicialmente por Watson en 1962. Siete años después, con la técnica preferencial para la locali-

zación de ribonucleoproteínas desarrollada por Bernhard (10,11) fue posible reconocer la estructura fina del nucleolo, la distribución de partículas ribonucleoproteínicas en el espacio intercromatiniano y en la periferia de la cromatina compacta. Asimismo, se determinó que los GPCs son partículas esféricas de diámetro entre 30 y 50 nm que poseen un halo claro de 20 a 25 nm y que está configurado por una fibra de 30 nm retorcida que da la apariencia de ovillo (10). Recientemente se ha determinado que esta fibra de RNA está asociada a proteínas y mide de 4 a 5 nm (12).

Inicialmente se propuso que los GPCs se relacionaban con el transporte de información del núcleo al citoplasma y que contenían RNAm (10), posteriormente, con base en el conocimiento de que las hormonas esteroideas actúan sobre genes para modificar las actividades celulares específicas (13), lo anterior fue ratificado por diversos estudios en los que se observó variaciones reversibles de GPCs relacionadas con el metabolismo del RNA al inducir alteraciones en los niveles hormonales (12,14-18). Por tanto se considera que los GPCs son estructuras de almacén o transporte de RNAm de síntesis reciente que pueden modificarse en número, morfología y características citoquímicas al alterarse la transcripción o procesamiento del RNA (11,16-18)

Estudios referentes a estas partículas durante el desarrollo embrionario fueron iniciados por Karanski en 1965, quien describió la ultraestructura del núcleo interfásico de células de ectodermo y mesodermo de embrión de anfibio. Además observó variaciones de densidad de ribonucleoproteínas que coincidieron con la síntesis de RNA ribosomal e incremento de RNA total y de diferentes enzimas (19).

Aunque Fakan y Odartchenko (20) en 1980 estudiaron las partículas ribonucleoproteínicas y la cromatina de blastómeros de embrión de ratón, estudios específicos durante la diferenciación neural de embrión de pollo realizados por Vazquez-Nin y cols. (21,22), mostraron la existencia de variaciones de los GPCs que coincidió con las etapas del desarrollo

en las que las células requieren de gran síntesis proteínica y por tanto gran número de ribosomas.

Por otra parte, uno de los trabajos realizados por Zavala y cols. (23), también en embrión de pollo, evidenció que durante la diferenciación de mioblastos y miofibrillas, los núcleos muestran cambios poco importantes, no así durante el establecimiento de sinapsis entre neuronas motoras y células musculares, etapa en la que existe incremento notable de GPCs, lo que hace pensar en la aparición de un mecanismo postranscripcional que regula la salida de los RNAm del núcleo al citoplasma y de esta forma se controla la expresión de algunos genes

MORFOGÉNESIS DEL CRISTALINO.

La formación del globo ocular se inicia con la aparición de una evaginación localizada a cada lado del cerebro anterior denominada vesícula óptica, antes de que el prosencéfalo se subdivida en telencéfalo y diencefalo. La vesícula óptica se acerca al ectodermo superficial sin que se establezca contacto entre ambas estructuras (24,25). Intermedia a ellas existe una matriz extracelular conformada principalmente por glicoproteínas, glicaminoglicanos y fibras de colágena, y se considera que en esta matriz se encuentra el o los factores inductores que promueven el desarrollo de la placoda del cristalino en el ectodermo superficial. Esta placoda se manifiesta como una región engrosada en la que las células y sus núcleos se alargan en sentido perpendicular a la superficie, lo que ocurre entre la etapa de 10 a 12 somitas del embrión de pollo (24,26).

La elongación de las células de la placoda del cristalino es el resultado de la síntesis intracelular de microfilamentos, los que provocan que las células formen una empalizada que posteriormente se invaginará, debido tal vez, a la contracción de los microfilamentos lo que genera también el desplazamiento de los núcleos hacia la región basal de cada célula. Lo anterior da lugar a la formación de una fosa y sus bordes

en las que las células requieren de gran síntesis proteínica y por tanto gran número de ribosomas.

Por otra parte, uno de los trabajos realizados por Zavala y cols. (23), también en embrión de pollo, evidenció que durante la diferenciación de mioblastos y miofibrillas, los núcleos muestran cambios poco importantes, no así durante el establecimiento de sinapsis entre neuronas motoras y células musculares, etapa en la que existe incremento notable de GPCs, lo que hace pensar en la aparición de un mecanismo postranscripcional que regula la salida de los RNAm del núcleo al citoplasma y de esta forma se controla la expresión de algunos genes

MORFOGÉNESIS DEL CRISTALINO.

La formación del globo ocular se inicia con la aparición de una evaginación localizada a cada lado del cerebro anterior denominada vesícula óptica, antes de que el prosencéfalo se subdivide en telencéfalo y diencefalo. La vesícula óptica se acerca al ectodermo superficial sin que se establezca contacto entre ambas estructuras (24,25). Intermedia a ellas existe una matriz extracelular conformada principalmente por glicoproteínas, glic amino glicanos y fibras de colágena, y se considera que en esta matriz se encuentra el o los factores inductores que promueven el desarrollo de la placoda del cristalino en el ectodermo superficial. Esta placoda se manifiesta como una región engrosada en la que las células y sus núcleos se alargan en sentido perpendicular a la superficie, lo que ocurre entre la etapa de 10 a 12 somitas del embrión de pollo (24,26).

La elongación de las células de la placoda del cristalino es el resultado de la síntesis intracelular de microfilamentos, los que provocan que las células formen una empalizada que posteriormente se invaginará, debido tal vez, a la contracción de los microfilamentos lo que genera también el desplazamiento de los núcleos hacia la región basal de cada célula. Lo anterior da lugar a la formación de una fosa y sus bordes

tienden a fusionarse para formar la vesícula del cristalino, la que se separa del ectodermo superficial; en ellos se presenta muerte celular (27). Una vez separada esta porción de tejido, los bordes libres del ectodermo superficial se acercan para restituir su continuidad y recubrir a la copa óptica (28).

En forma sincrónica a la formación de la vesícula del cristalino, se invagina la vesícula óptica para transformarse en la copa óptica y concomitantemente la vesícula del cristalino se introduce al interior de dicha copa.

La vesícula del cristalino una vez aislada del ectodermo, presenta dos caras separadas por un espacio central; la cara anterior está conformada por células epiteliales de forma cúbica con su capacidad mitótica bloqueada, excepto aquellas que se encuentran en la región cercana al ecuador y que conforman la zona germinativa que mantiene el crecimiento del cristalino en forma continua. La cara posterior inicialmente está conformada por células que se elongan para ocluir el espacio de la vesícula y posteriormente transformarse en las células fibrilares primarias del cristalino (24, 26, 28, 29). La elongación de estas células es influenciada por el "factor fibroblástico de crecimiento" proveniente de la retina neural. Dicho factor genera en la zona germinativa: proliferación celular, migración de estas células hacia la periferia de la cara posterior y su elongación, además de la síntesis y acumulación de proteínas específicas (30-32)

Una de las primeras proteínas sintetizadas durante la diferenciación del cristalino es la δ cristalina ó F.I.S.C. (first important soluble crystallin) producida en algunas células de la región basal durante la etapa de placoda, asimismo en la etapa de vesícula durante la formación de las fibras primarias; tanto las células epiteliales centrales de forma cúbica como las de la región ecuatorial la sintetizan posteriormente.

Esta proteína conforma del 70 al 80 % del total de proteínas sintetizadas, el resto corresponde a las proteínas α y β cristalina y a enzimas

que participan en la síntesis de colágena que conforma la cápsula del cristalino (33). La α cristalina es sintetizada por las células columnares del ecuador y la β cristalina por células epiteliales de la cara anterior del cristalino. Estas tres proteínas α, β y δ le confieren a esta estructura sus propiedades ópticas.

Las células epiteliales de la zona germinativa se transforman paulatinamente en fibras secundarias, al alargarse constituyen un conjunto de células columnares radiales, las que se colocan unas sobre otras y establecen capas concéntricas alrededor del eje longitudinal del cristalino. Lo anterior es reflejo de maduración de las células y a medida que se generan numerosas capas de fibras secundarias, está estructura aumenta de volumen y adquiere su forma esférica o elipsoidal.

El final de la diferenciación de las células que se transforman en fibras lo marca la picnosis de los núcleos en las que hay pérdida gradual de DNA, asimismo el núcleo, mitocondrias, ribosomas y el aparato de Golgi inician sus cambios degenerativos que conducen a que el cristalino adquiera su índice de refracción (30-32,34,35).

JUSTIFICACIÓN.

Dada la relevancia de los mecanismos de expresión génica durante el desarrollo embrionario y de que los estudios referentes a la dinámica de las partículas ribonucleoproteínicas durante la oftalmogénesis son reducidos, se hace necesario realizar estudios sobre la presencia de los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación del cristalino. Lo anterior permitirá relacionar las variaciones de estos gránulos con las características ultraestructurales y bioquímicas para así ampliar el conocimiento de la génesis de este medio refringente del globo ocular.

que participan en la síntesis de colágena que conforma la cápsula del cristalino (33). La α cristalina es sintetizada por las células columnares del ecuador y la β cristalina por células epiteliales de la cara anterior del cristalino. Estas tres proteínas α, β y δ le confieren a esta estructura sus propiedades ópticas.

Las células epiteliales de la zona germinativa se transforman paulatinamente en fibras secundarias, al alargarse constituyen un conjunto de células columnares radiales, las que se colocan unas sobre otras y establecen capas concéntricas alrededor del eje longitudinal del cristalino. Lo anterior es reflejo de maduración de las células y a medida que se generan numerosas capas de fibras secundarias, esta estructura aumenta de volumen y adquiere su forma esférica o elipsoidal.

El final de la diferenciación de las células que se transforman en fibras lo marca la picnosis de los núcleos en las que hay pérdida gradual de DNA, asimismo el núcleo, mitocondrias, ribosomas y el aparato de Golgi inician sus cambios degenerativos que conducen a que el cristalino adquiera su índice de refracción (30-32,34,35).

JUSTIFICACIÓN.

Dada la relevancia de los mecanismos de expresión génica durante el desarrollo embrionario y de que los estudios referentes a la dinámica de las partículas ribonucleoproteínicas durante la oftalmogénesis son reducidos, se hace necesario realizar estudios sobre la presencia de los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación del cristalino. Lo anterior permitirá relacionar las variaciones de estos gránulos con las características ultraestructurales y bioquímicas para así ampliar el conocimiento de la génesis de este medio refringente del globo ocular.

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

- Determinar en forma estadística las variaciones numéricas de los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación de células de cristalino de embrión de pollo.
- Relacionar las variaciones numéricas con sucesos embriológicos importantes durante el desarrollo del cristalino.
- Correlacionar las variaciones numéricas mencionadas con las determinadas en estudios previos de diferenciación de neuroblastos de médula espinal, mioblastos y notocorda de embrión de pollo.

HIPÓTESIS.

Con base en la importancia del RNA durante el proceso de diferenciación en el que se refleja la expresión génica y de que los gránulos pericromatinianos representan el almacenamiento y transporte de RNAm maduro previo a la síntesis de proteínas específicas durante la diferenciación celular, es probable que al contabilizar estas partículas ribonucleoproteínicas se encuentren en gran número y en relación directa al grado de diferenciación de las células del cristalino.

MATERIAL Y MÉTODO.

Se adquirieron 30 huevos de ave *Gallus domesticus*, de la cepa White Leghorn que se incubaron a 37⁰ C. y en condiciones de humedad de 87-88%.

Se determinó previamente los días en que se iban a retirar los embriones de la estufa para proceder a fijarlos. A los huevos seleccionados se les abrió una ventana amplia en el cascarón para extraer al embrión con saco vitelino. Antes de cortar la membrana vitelina y el amnios para aislarlo de ellas, se procedió a inyectar directamente el fijador en la porción cefálica o bien en el globo ocular sin lesionar el cristalino. Posteriormente se procedió a cortar la membrana vitelina para colocar al embrión en una caja de Petri con base de cera. Con ayuda del este-

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

- Determinar en forma estadística las variaciones numéricas de los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación de células de cristalino de embrión de pollo.
- Relacionar las variaciones numéricas con sucesos embriológicos importantes durante el desarrollo del cristalino.
- Correlacionar las variaciones numéricas mencionadas con las determinadas en estudios previos de diferenciación de neuroblastos de médula espinal, mioblastos y notocorda de embrión de pollo.

HIPÓTESIS.

Con base en la importancia del RNA durante el proceso de diferenciación en el que se refleja la expresión génica y de que los gránulos pericromatinianos representan el almacenamiento y transporte de RNAm maduro previo a la síntesis de proteínas específicas durante la diferenciación celular, es probable que al contabilizar estas partículas ribonucleoproteínicas se encuentren en gran número y en relación directa al grado de diferenciación de las células del cristalino.

MATERIAL Y MÉTODO.

Se adquirieron 30 huevos de ave *Gallus domesticus*, de la cepa White Leghorn que se incubaron a 37⁰ C. y en condiciones de humedad de 87-88%.

Se determinó previamente los días en que se iban a retirar los embriones de la estufa para proceder a fijarlos. A los huevos seleccionados se les abrió una ventana amplia en el cascarón para extraer al embrión con saco vitelino. Antes de cortar la membrana vitelina y el amnios para aislarlo de ellas, se procedió a inyectar directamente el fijador en la porción cefálica o bien en el globo ocular sin lesionar el cristalino. Posteriormente se procedió a cortar la membrana vitelina para colocar al embrión en una caja de Petri con base de cera. Con ayuda del este-

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

- Determinar en forma estadística las variaciones numéricas de los gránulos pericromatinianos durante la diferenciación de células de cristalino de embrión de pollo.
- Relacionar las variaciones numéricas con sucesos embriológicos importantes durante el desarrollo del cristalino.
- Correlacionar las variaciones numéricas mencionadas con las determinadas en estudios previos de diferenciación de neuroblastos de médula espinal, mioblastos y notocorda de embrión de pollo.

HIPÓTESIS.

Con base en la importancia del RNA durante el proceso de diferenciación en el que se refleja la expresión génica y de que los gránulos pericromatinianos representan el almacenamiento y transporte de RNAm maduro previo a la síntesis de proteínas específicas durante la diferenciación celular, es probable que al contabilizar estas partículas ribonucleoproteínicas se encuentren en gran número y en relación directa al grado de diferenciación de las células del cristalino.

MATERIAL Y MÉTODO.

Se adquirieron 30 huevos de ave *Gallus domesticus*, de la cepa White Leghorn que se incubaron a 37⁰ C. y en condiciones de humedad de 87-88%.

Se determinó previamente los días en que se iban a retirar los embriones de la estufa para proceder a fijarlos. A los huevos seleccionados se les abrió una ventana amplia en el cascarón para extraer al embrión con saco vitelino. Antes de cortar la membrana vitelina y el amnios para aislarlo de ellas, se procedió a inyectar directamente el fijador en la porción cefálica o bien en el globo ocular sin lesionar el cristalino. Posteriormente se procedió a cortar la membrana vitelina para colocar al embrión en una caja de Petri con base de cera. Con ayuda del este-

reomicroscopio se analizaron las características morfológicas externas para determinar su edad de acuerdo a la clasificación de Hamburger y Hamilton (36). Una vez realizado lo anterior se procedió a separar el globo ocular del resto del embrión.

Del total de huevos utilizados, se obtuvieron 17 embriones, los que fueron fijados por inmersión con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1.5% en solución buffer fosfatos a 0.2 M a pH 7.2 durante una hora.

Se procedió a deshidratar en forma gradual a los especímenes. Para ello se utilizó etanol a partir de 50% hasta 100%. Posteriormente se les dio tratamiento de preinclusión con mezcla de óxido de propileno y resina Epon 812 (Glycide ether 100 Merck) en tres proporciones diferentes (2:1 por 1 hora, 1:1 por 12 hrs. y 1:2 por 12 hrs.). Enseguida los especímenes se colocaron en moldes planos para incluirlos en resina Epon 812 y se introdujeron en la estufa a 60^o C. durante 24 horas para la polimerización de la resina.

Una vez polimerizada la resina se obtuvieron cortes semifinos de 0.5 μ m de espesor con los Ultramicrotomos MT1 y MT2 de marca Sorvall, con cuchillas de vidrio, los que se tiñeron con azul de toluidina para observarlos al microscopio fotónico, determinar la región a estudiar y realizar la toma de fotografías con el sistema de contraste de fases.

De los 17 especímenes de diversos estadios, únicamente 8 fueron considerados para su estudio, ya que algunos de ellos presentaron artefactos por fijación inapropiada o por defectos en la polimerización de la resina.

De los ocho especímenes de diferentes estadios se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 a 90 nm. que fueron colocados en rejillas de cobre de 200 mesh con membrana de Formvar y procesados según el método de contraste preferencial para ribonucleoproteínas de Bernhard (10). Este consiste en dejar flotar las rejillas con cortes ultrafinos prime

ro en solución de acetato de uranilo por 3 minutos, posteriormente en solución de EDTA al 0.2% por 8 minutos y al final en solución de citrato de plomo por 2 minutos. Las rejillas fueron lavadas por goteo con agua desionizada entre la aplicación de cada contraste y al final las muestras, se dejaron secar completamente antes de observarlas al microscopio electrónico de transmisión.

La observación de cortes ultrafinos se realizó con el microscopio electrónico EM10 Carl Zeiss; se hicieron tomas en banda magnética de video de 30 núcleos de cada uno de los ocho especímenes a 12,500 aumentos sobre la pantalla final. Asimismo, se tomaron fotografías de algunos núcleos y células a 8,000, 10,000 y 12,000 aumentos.

Las imágenes de núcleos grabadas en banda magnética de video fueron analizadas con el programa de computadora denominado IMAGENIA 5000 BIOCOM para cuantificar la densidad numérica de GPCs por área del núcleo. Los datos estadísticos se obtuvieron con el programa STATGRAPHICS.

RESULTADOS.

En el espécimen correspondiente al estadio 14 de la clasificación de Hamilton Hamburger que corresponde a 2 y medio días de desarrollo, se observó que las células que forman la placoda del cristalino tienen forma columnar, algunos de sus núcleos son alargados mientras que otros son de forma oval y se encuentran en la porción basal de las células (Fig. 1). Los núcleos en ocasiones presentan hasta dos nucleolos y entre las células se observan lagunas de diferente volumen que en algunas zonas respetan las uniones celulares. Las células de los bordes de la placoda tiende a ser de forma cúbica.

Los núcleos de células de cristalino del estadio 14, presentan numerosos GPCs dispersos en el nucleoplasma. El nucleolo en algunas células se encuentra desplazado a uno de los extremos del núcleo, mientras que en otras se localiza en el centro (Figs. 2 y 3).

ro en solución de acetato de uranilo por 3 minutos, posteriormente en solución de EDTA al 0.2% por 8 minutos y al final en solución de citrato de plomo por 2 minutos. Las rejillas fueron lavadas por goteo con agua desionizada entre la aplicación de cada contraste y al final las muestras, se dejaron secar completamente antes de observarlas al microscopio electrónico de transmisión.

La observación de cortes ultrafinos se realizó con el microscopio electrónico EM10 Carl Zeiss; se hicieron tomas en banda magnética de video de 30 núcleos de cada uno de los ocho especímenes a 12,500 aumentos sobre la pantalla final. Asimismo, se tomaron fotografías de algunos núcleos y células a 8,000, 10,000 y 12,000 aumentos.

Las imágenes de núcleos grabadas en banda magnética de video fueron analizadas con el programa de computadora denominado IMAGENIA 5000 BIOCROM para cuantificar la densidad numérica de GPCs por área del núcleo. Los datos estadísticos se obtuvieron con el programa STATGRAPHICS.

RESULTADOS.

En el espécimen correspondiente al estadio 14 de la clasificación de Hamilton Hamburger que corresponde a 2 y medio días de desarrollo, se observó que las células que forman la placoda del cristalino tienen forma columnar, algunos de sus núcleos son alargados mientras que otros son de forma oval y se encuentran en la porción basal de las células (Fig. 1). Los núcleos en ocasiones presentan hasta dos nucleolos y entre las células se observan lagunas de diferente volumen que en algunas zonas respetan las uniones celulares. Las células de los bordes de la placoda tiende a ser de forma cúbica.

Los núcleos de células de cristalino del estadio 14, presentan numerosos GPCs dispersos en el nucleoplasma. El nucleolo en algunas células se encuentra desplazado a uno de los extremos del núcleo, mientras que en otras se localiza en el centro (Figs. 2 y 3).

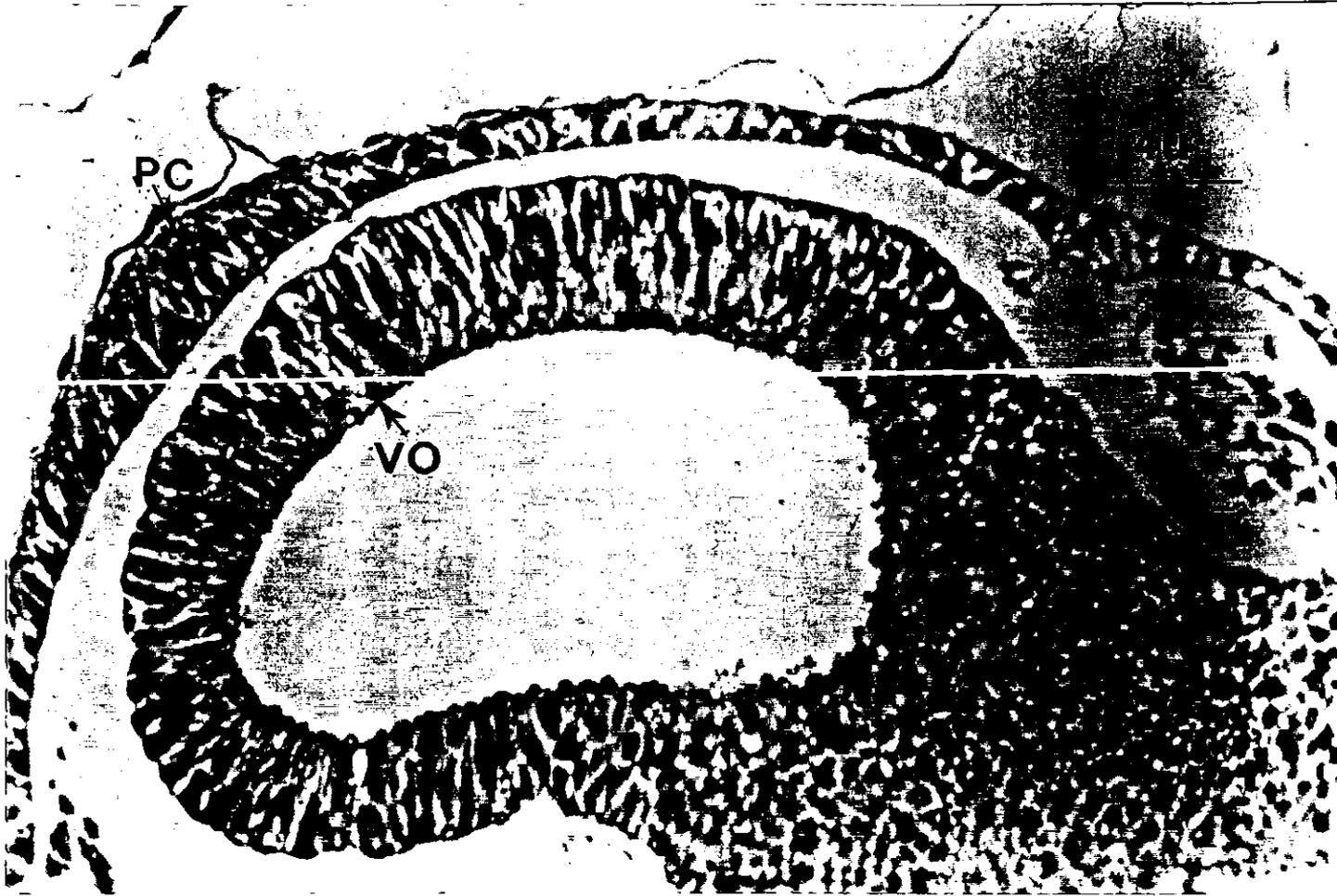


Fig. 1 Micrografía óptica que muestra la vesícula óptica (VO) y la placoda del cristalino (PC) de embrión de pollo del estadio 14 (2 ½ días) teñidas con azul de toluidina 500 X.



Fig. 2. Micrografía electrónica del núcleo de una célula de la placoda de cristalino de embrión de pollo del estadio 14 teñida con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. El nucleolo (n) se aprecia en uno de sus extremos y en el nucleoplasma numerosos GPCs (flechas) 30,000 X

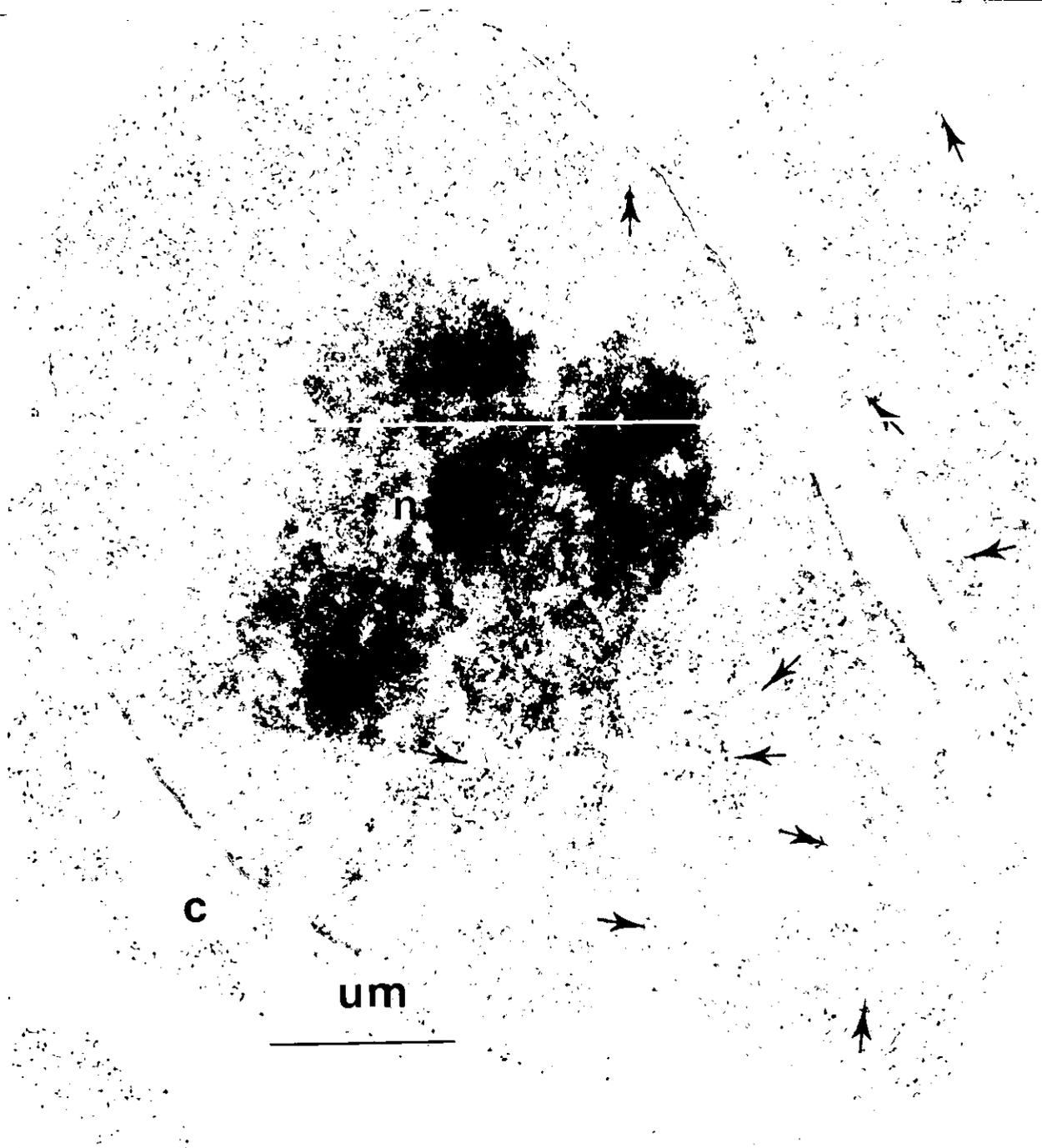


Fig. 3. Micrografía electrónica del núcleo de una célula de la placoda del cristalino de embrión de pollo del estadio 14 teñida con acetato de uranil-EDTA-citrato de plomo. Se aprecia el nucleolo (n) voluminoso, abundantes GPCs (flechas) y una pequeña porción de citoplasma (c) 30,000 X

En el espécimen del estadio 19 (3 días y medio) se observó que el epitelio anterior es grueso, con células alargadas sobre todo aquellas que se encuentran cerca del ecuador. Algunos núcleos de las células epiteliales presentan dos nucleolos. Las células de la cara posterior del cristalino han ocluido casi la totalidad del espacio central por las células fibrilares primarias (Fig 4). El núcleo de estas células se observa alargado, su contenido es granular, el nucleolo es denso y se localiza en uno de sus extremos .

Las características celulares y nucleares de los especímenes de los estadios 26, 29, 30 y 32 tienden a ser iguales. En general las células cercanas al ecuador tienden a ser menos alargadas que aquellas que se alejan de él y cercana a la cara posterior del cristalino. El núcleo ocupa una localización central y su elongación es proporcional al de la célula.

En especímenes del estadio 29 se observan células con núcleos alargados, algunos de ellos presentan forma irregular (Fig. 5) y otros presentan forma circular (Fig. 6, sobre todo aquellos que se encuentran cercanos al centro del cristalino. Su apariencia es granular aunque con menor número de GPCs (Fig. 7) y algunos nucleolos son densos en tanto que otros los son menos y presentan zonas centrales claras (Figs. 5 y 6).

En el espécimen del estadio 30 (6 y medio a 7 días) las células fibrilares secundarias presentan su núcleo alargado, en algunas de ellas no se observó núcleo o bien era pequeño, localizado en uno de los extremos (Fig. 8). La apariencia del contenido nuclear es granular y con abundantes GPCs dispersos en el nucleoplasma en mayor cantidad que en los núcleos de células del espécimen del estadio anterior (Fig. 9)

En la Fig. 10 que corresponde al espécimen del estadio 32 (de 7 días y medio) se aprecian los núcleos de células fibrilares secundarias, que en su mayoría son alargados y de localización central; escasos son

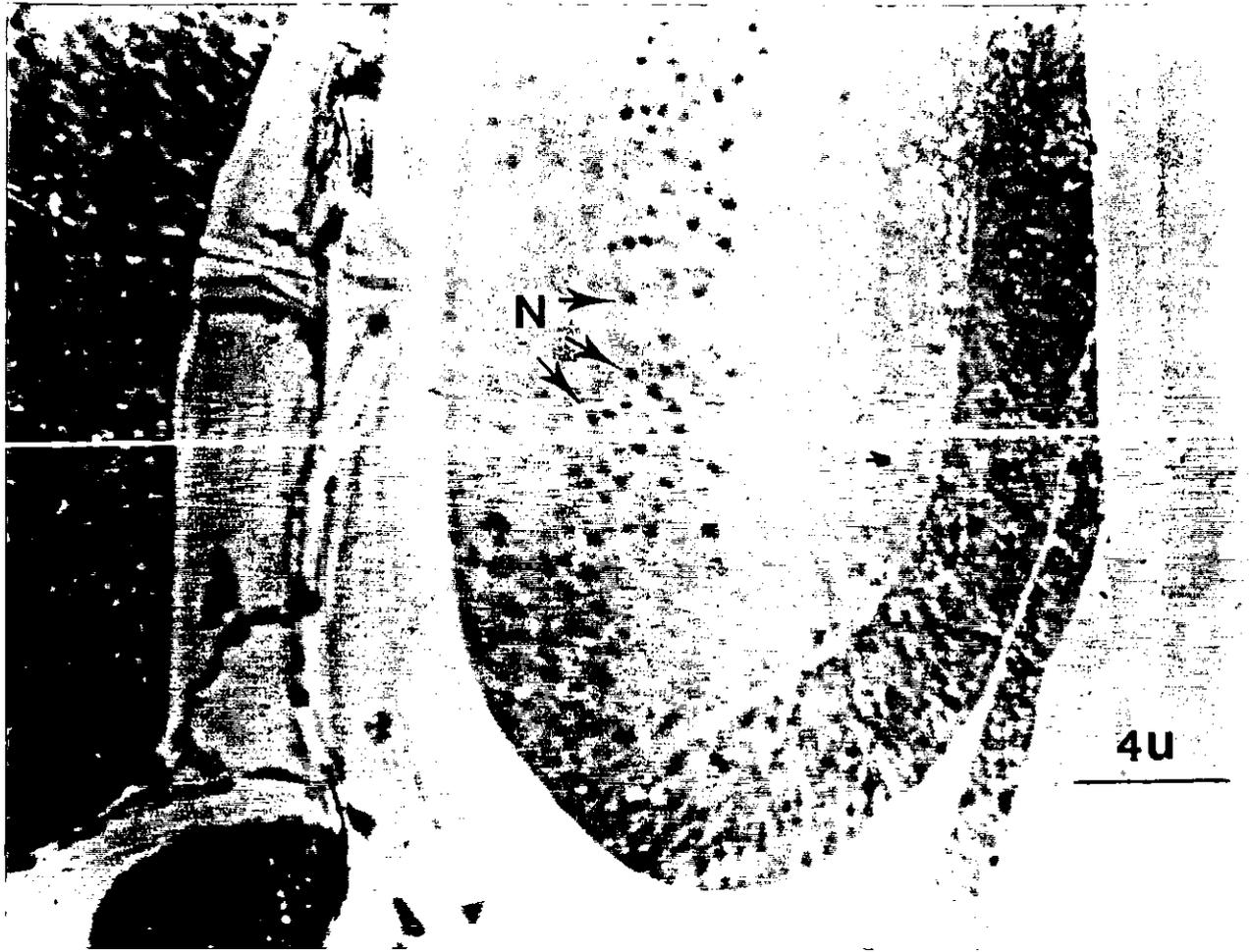


Fig.4 Micrografía óptica en la que se observa el cristalino de embrión de pollo del estadio 19, teñido con azul de toluidina. Se muestra la elongación de las células fibrilares primarias hacia la cara anterior y persiste aún en el borde inferior un espacio por ser ocluido. Los núcleos (N) de las células se observan cercanos a la cara posterior del cristalino. 500 X

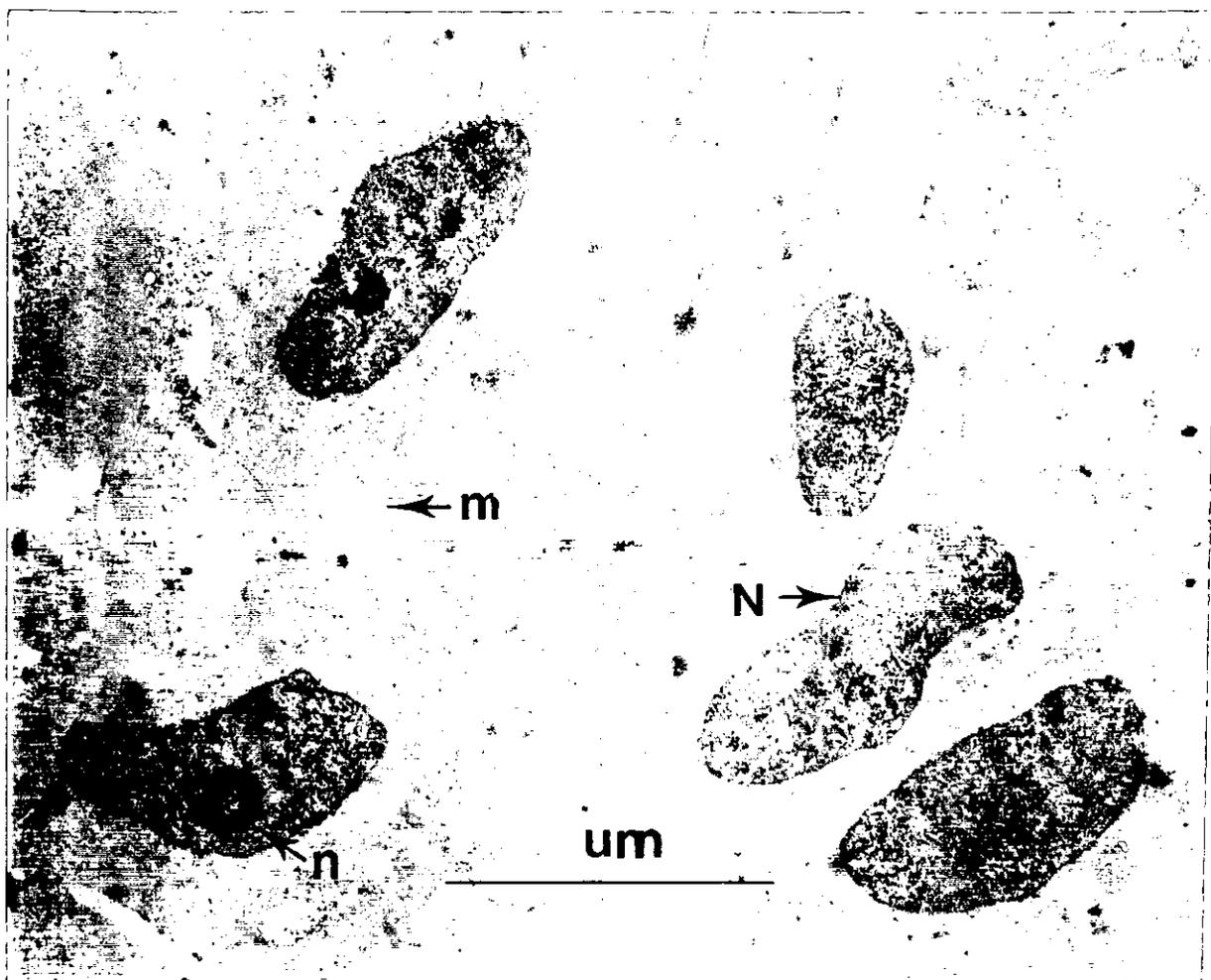


Fig. 5 Micrografía electrónica que muestra a las células de cristalino de embrión de pollo del estadio 29 contrastadas con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. En ellas se observa al nucleolo (n), membranas celulares (m) y núcleo (N) 11,025 X

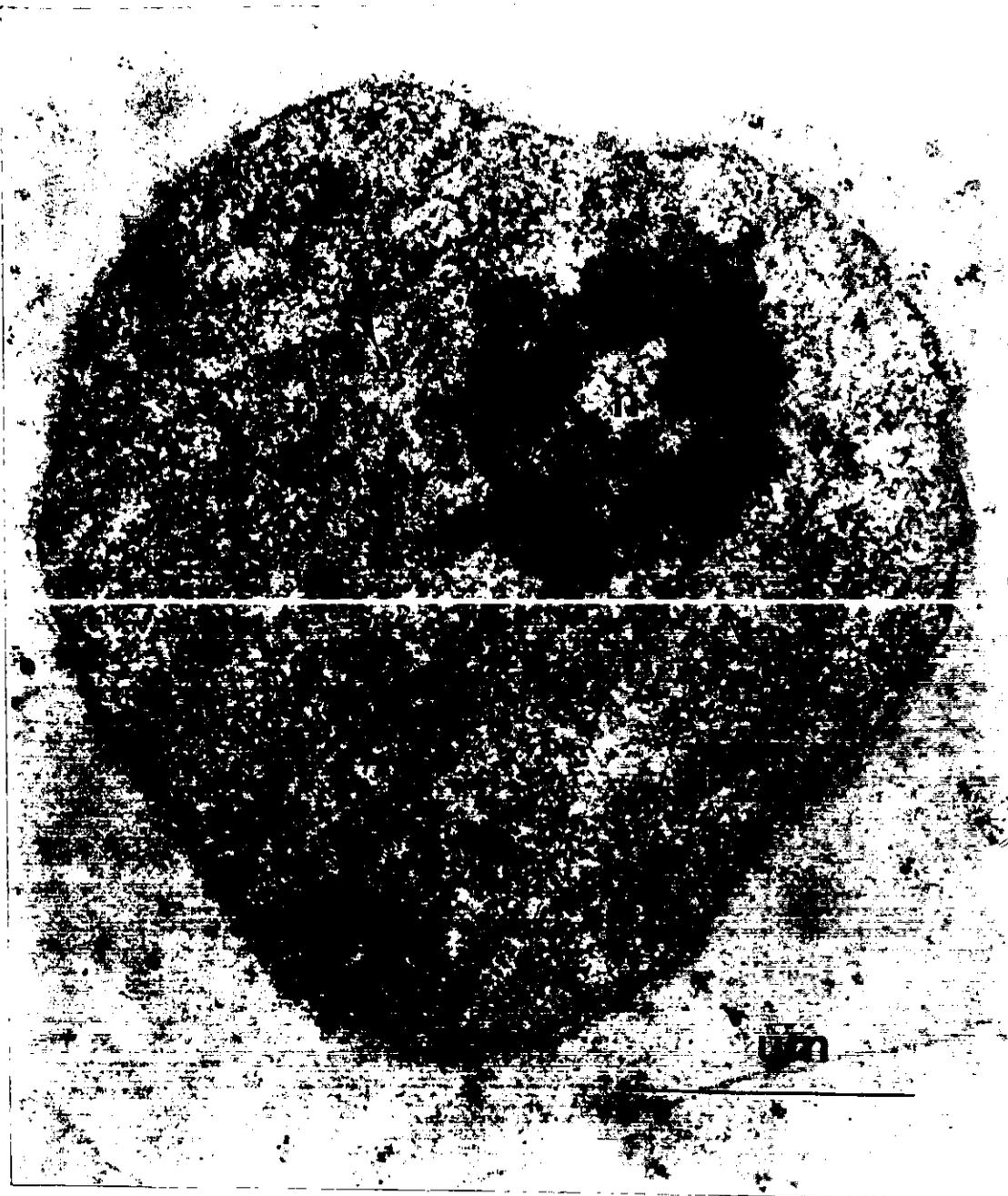


Fig. 6 Micrografía electrónica del núcleo de una célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 29, teñido con uranilo-EDTA-plomo. En ella se observa el nucleolo (n) con espacio central y GPCs escasos (flechas) 42,500 X.

Fig. 7 Micrografía electrónica de una región del nucleoplasma de célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 29 teñida con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. En ella se observan GPC (flechas). 93,750 X

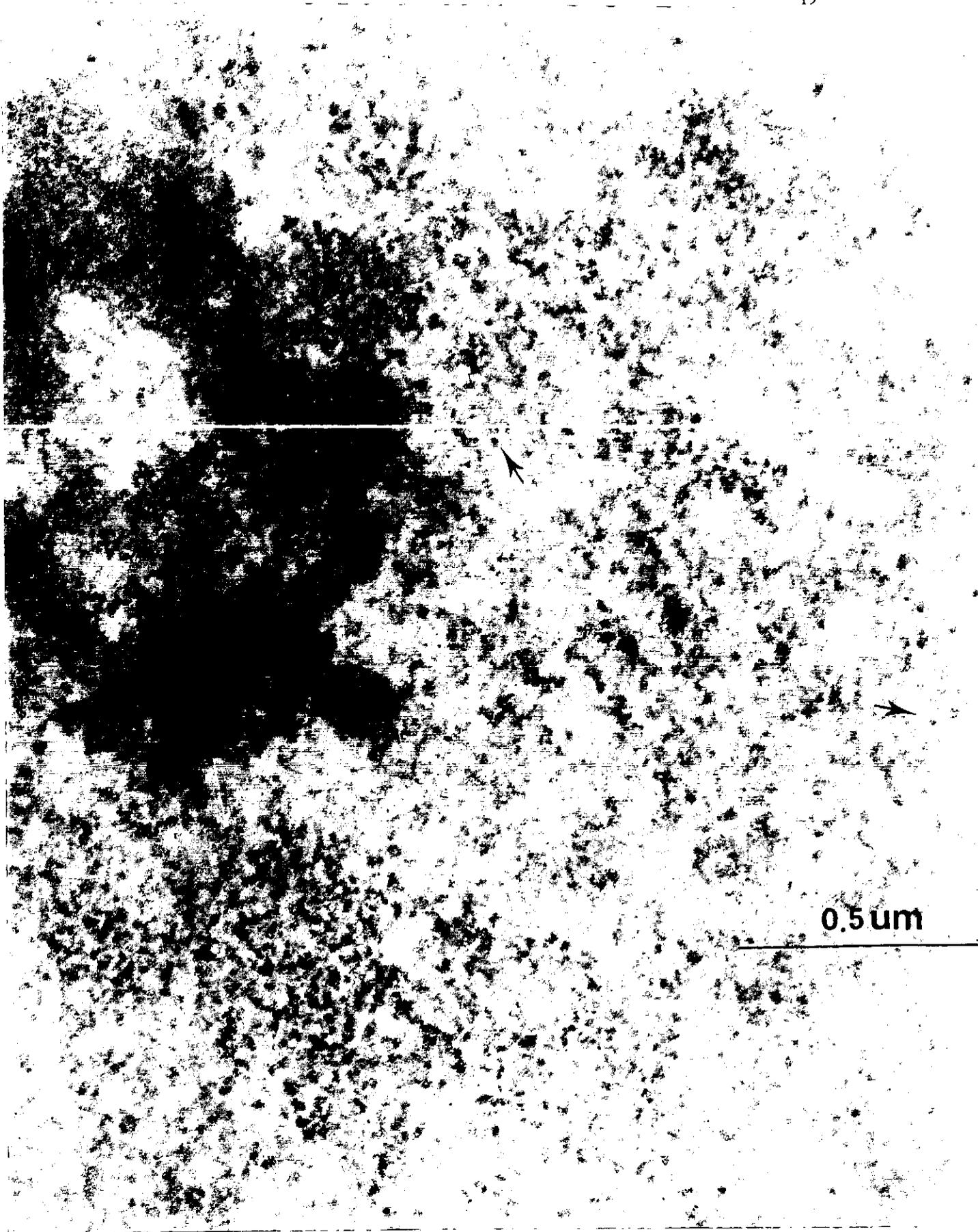
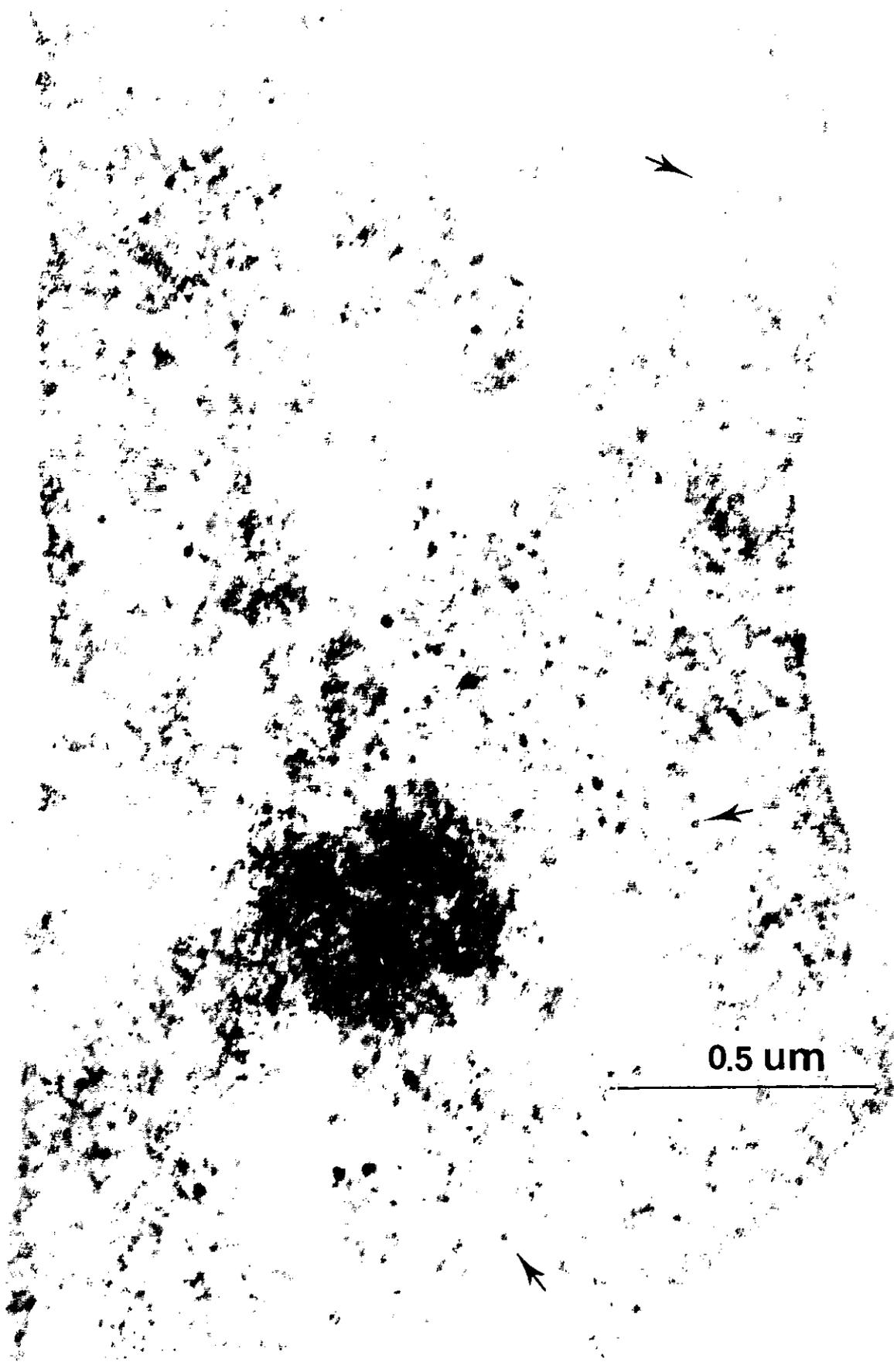




Fig. 8 Micrografía electrónica del núcleo de una célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 30, teñida con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. Su nucleolo (n) es pequeño y se aprecian los GPCs (flechas). 36,500 X.

Fig. 9 Micrografía electrónica de una región del nucleoplasma de célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 30 teñida con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo en donde se aprecian los GPCs (flechas) 92,500 X



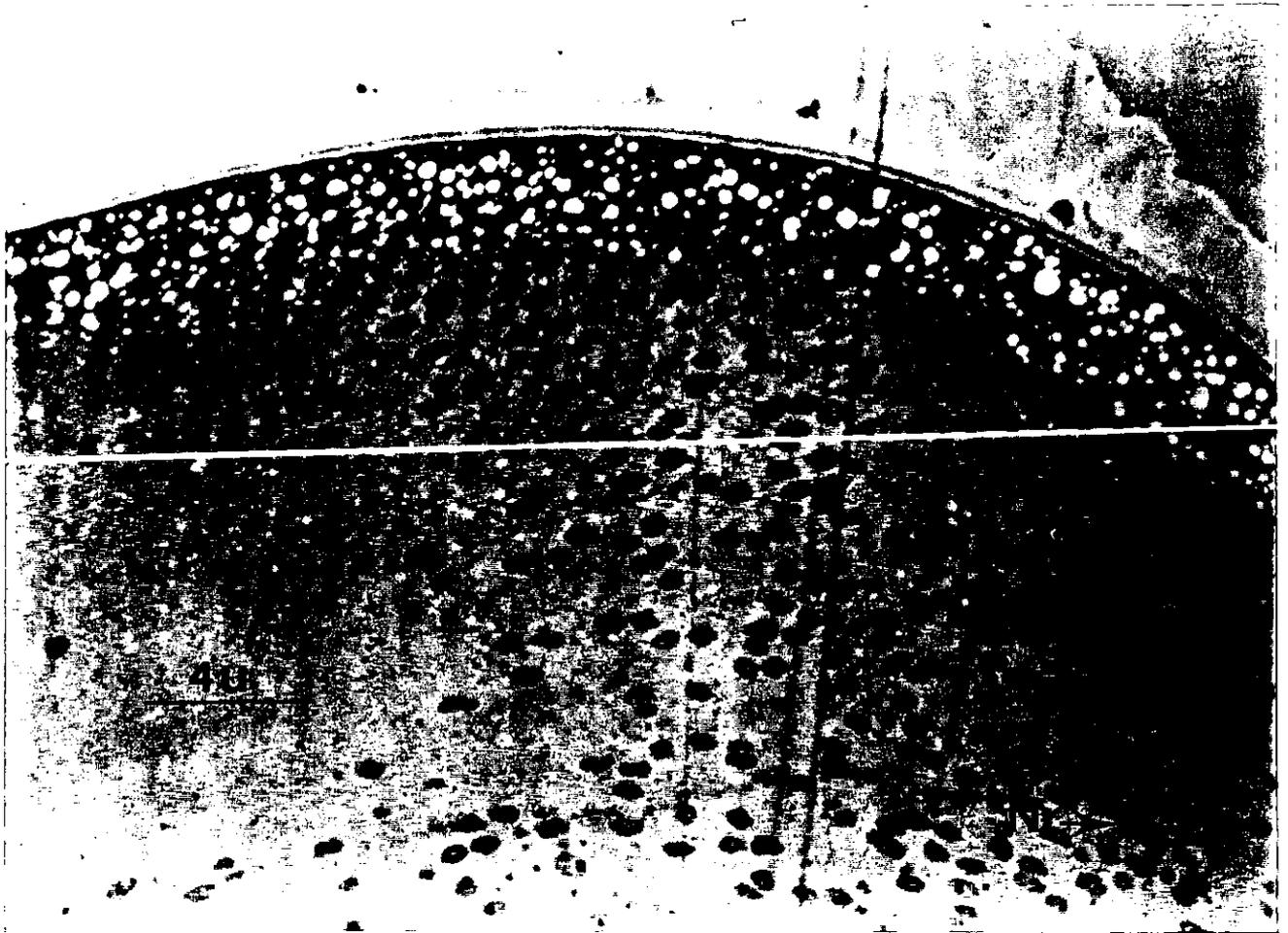


Fig. 10 Micrografía óptica en la que se aprecian núcleos alargados (Na) y redondos (Nr) de células fibrilares secundarias de cristalino de embrión de pollo del estadio 32 teñidos con azul de toluidina. 500 X

los de forma circular, y a mediada que las células se encuentran cerca del centro del cristalino carecen de núcleo.

Los núcleos de las células del estadio 35 presentan aspecto granular, algunos de forma alargada tendientes a formar una "s" (Fig. 11), en tanto que los que corresponden al estadio 36 son sumamente alargados y en ellos continua la apariencia granular fina con algunas condensaciones que no parecen ser nucleolos.

En relación a la presencia de GPCs a lo largo de los primeros 10 días de desarrollo del cristalino no es constante como se aprecia en la Gráfica 1 que muestra la densidad numérica de los gránulos pericromatinianos, ya que en el estadio 14 (2 y medio días), estos son más numerosos dado que la densidad numérica llegó a 0.76 GPCs por micra cuadrada; conforme avanza el desarrollo, la densidad numérica disminuye en los estadios 19 y 26 hasta llegar a 0.40 GPCs por micra cuadrada en el estadio 29 (6-6½ días) (Fig. 7). Después de este incremento, en los estadios 32 y 35 el valor de la densidad numérica vuelve a descender y llega a 0.22 GPCs por micra cuadrada para que en el estadio 36 (10 días de desarrollo) la densidad se incremente ligeramente a 0.24 GPCs por micra cuadrada (Fig.9)

La comparación de la media y la desviación estandar entre cada estadio aparentemente no manifiesta gran significancia (Cuadros Núms. 1 y 2).

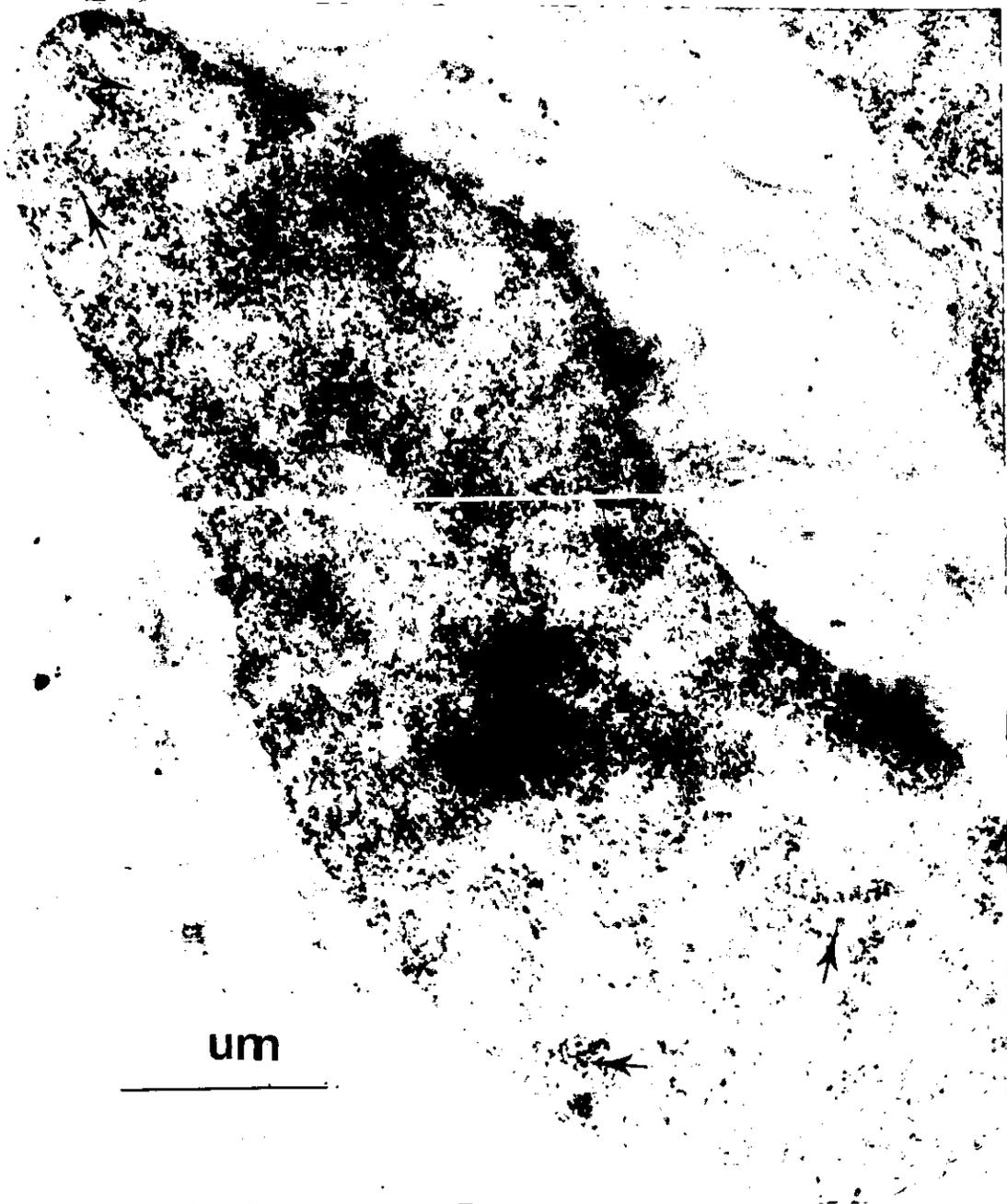


Fig. 11 Micrografía electrónica del núcleo de una célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 35, teñido con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. En ella se observan escasos GPCs (flechas). 31,500 X.

Fig.12 Micrografía electrónica del núcleo de una célula de cristalino de embrión de pollo del estadio 36 teñida con acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo en ella se observa el nucleolo (n) y escasos GPCs (flechas). 43,750 X.



um

CUADRO NÚMERO 1

DENSIDAD NÚMÉRICA DE GRÁNULOS PERICROMATINIANOS EN CÉLULAS DE CRISTALINO DE EMBRIÓN DE POLLO SEGÚN ESTADIO DE DESARROLLO

	14	19	26	29	30	32	35	36
	1.0428	1.3838	0.6117	0.8165	0.6096	0.2688	0.2621	0.3094
	1.3843	1.5191	0.4519	0.5701	0.7452	0.2216	0.3633	0.2047
	1.2795	0.9948	0.3238	0.6008	0.9411	0.5122	0.1541	0.1597
	0.9635	0.6650	0.6294	0.5768	0.4334	0.3065	0.1191	0.2139
	0.7506	1.1284	0.3364	0.6708	0.8755	0.3629	0.1791	0.2384
	0.5391	0.7262	0.4379	0.7588	1.1763	0.4220	0.2391	0.2563
	0.8359	0.8724	0.3815	0.4734	0.7753	0.3020	0.0983	0.3490
	0.6417	0.5092	0.4295	0.6538	0.9225	0.3670	0.1939	0.2497
	0.4282	0.8552	0.3239	0.5182	0.9184	0.4434	0.2021	0.1558
	0.6563	0.7581	0.6460	0.3974	0.9070	0.4105	0.2191	0.1526
	0.8985	0.5375	0.5023	0.3243	0.9614	0.3505	0.1955	0.2126
	0.8818	0.4812	0.4412	0.3134	0.6740	0.2452	0.1587	0.2442
	0.9370	1.0420	0.4276	0.5897	0.6813	0.4156	0.2274	0.2811
	0.9270	0.2461	0.4631	0.4407	0.5158	0.3788	0.2136	0.1454
	0.7556	0.6048	0.4999	0.2980	0.6863	0.3596	0.0959	0.1360
	0.7181	0.7754	0.5161	0.4346	0.6009	0.3536	0.1780	0.2098
	0.6293	0.5276	0.8578	0.3458	0.4309	0.1792	0.2835	0.2125
	0.5765	0.7480	0.9691	0.4214	0.4769	0.3316	0.1394	0.1482
	0.5384	0.5335	0.8229	0.3709	0.3933	0.1738	0.0784	0.2391
	0.5886	0.9146	0.8517	0.2002	0.5796	0.2470	0.1725	0.2068
	0.3898	0.5528	0.9450	0.3503	0.5406	0.2243	0.2532	0.2831
	0.7847	0.4801	0.9978	0.1184	0.3276	0.2264	0.2186	0.3190
	0.6296	0.6030	0.7613	0.2403	0.3678	0.2759	0.3034	0.3140
	0.7626	-	-	0.2658	0.2454	0.2092	0.2753	0.3085
	0.5673	-	-	0.2034	-	0.2113	0.1832	0.6486
	1.0438	-	-	0.2127	-	0.2383	0.2890	0.3125
	0.5626	-	-	0.1624	-	0.3968	0.4087	0.2099
	-	-	-	0.1395	-	0.1729	0.3281	0.2028
	-	-	-	0.1788	-	0.2070	0.3848	0.2829
X	0.7671	0.7591	0.5925	0.4019	0.6577	0.3039	0.2213	0.2485
Σ	0.2405	0.3031	0.2203	0.1929	0.2400	0.0924	0.0846	0.2485

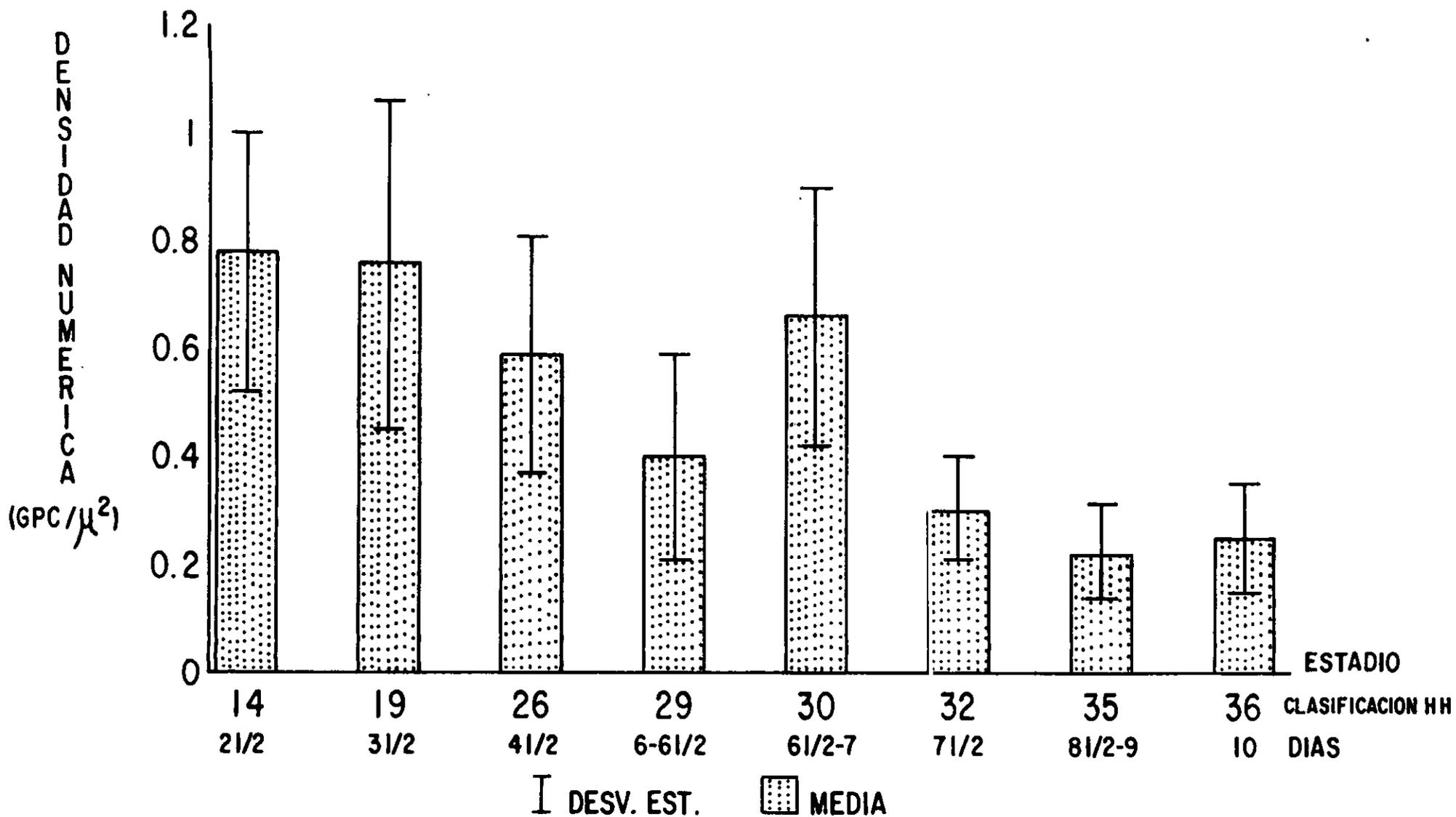
CUADRO NÚM. 2

SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA REFERENTE A LA CONCENTRACIÓN DE GRÁNULOS PERICROMATINIANOS EN CÉLULAS DE CRISTALINO DE EMBRIÓN DE POLLO

ESTADIO DEL DESARROLLO	H.H.*	14 - 19	19 - 26	26 - 29	29 - 30	30 - 32	32 - 35	35 - 36
	DÍAS	2 ½ - 3 ½	3 ½ - 4 ½	4 ½ - 6 - 6 ½	6 - 6 ½ - 6 ½ - 7	6 ½ - 7 - 7 ½	7 ½ - 8 ½ - 9	8 ½ - 9 - 10
NIVEL DE SIGNIFICANCIA **		0.916765	0.0386678	1.67628E-3	7.68022E-5	1.71288E-9	7.91797E-4	0.261245

* según la clasificación de Hamilton Hamburger.

** probabilidad de que los grupos sean iguales.



GRAFICA 1.- MUESTRA LA DENSIDAD NUMÉRICA DE GRANOS PERICROMATINIANOS EN NÚCLEOS DE CÉLULAS DE CRISTALINO DE EMBRIÓN DE POLLO POR ESTADIO DE DESARROLLO, SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE HAMILTON Y HAMILBURGER, Y POR DIA.

DISCUSIÓN.

Los resultados de este trabajo muestran por una parte que las características de las células del cristalino y de sus núcleos durante la diferenciación coinciden con las mencionadas por otros investigadores (24, 37, 38); sin embargo al inicio de la diferenciación de esta estructura (estadios 14 y 19 equivalentes a 2 ½ y 3 ½ días respectivamente), la densidad numérica de los GPCs es alta y a medida que avanza su diferenciación, el número de estos gránulos desciende hasta que en el estadio 30 (6 ½ - 7 días) se presenta un segundo incremento para después volver a disminuir y aumentar en pequeña proporción en el estadio 36 (10 días), aunque esta última variación es poco significativa.

El gran número de GPCs al inicio de la diferenciación del cristalino, no concuerda con lo observado por Ortega, Vázquez-Nin y Zavala, durante el proceso de maduración de neuroblastos, mioblastos, epidermis y células de endodermo. En estos tipos celulares, al comienzo de este proceso, los niveles son bajos y se incrementan en la medida que avanza su diferenciación (8, 21, 23, 43); sin embargo, Zavala y cols. reconocieron que las células de la notocorda, presentan niveles altos de estas partículas ribonucleoproteínicas momentos previos a su diferenciación, incremento que fue transitorio (43).

Lo observado en células de la notocorda como en las de cristalino en vías de diferenciación, podría ser una excepción a lo que manifiestan los neuroblastos inmaduros y los mioblastos, ya que los dos primeros tipos celulares actúan como inductores celulares, específicamente las primeras durante la formación de los cuerpos vertebrales y las segundas para generar la invaginación del ectodermo superficial y propiciar la formación de la copa óptica (25,29). Por otra parte podría pensarse que debido a que el proceso de inducción se da en un momento crítico durante el desarrollo embrionario, la transcripción referente a la síntesis del factor inductor no se almacenaría y tendría que abandonar el núcleo en forma inmediata por lo que su apariencia sería en forma de fibras

pericromatinianas. Debido a la escasez de datos referentes a la presencia de GPCs durante los momentos iniciales de la inducción celular se hace necesario comprobar experimentalmente, si otros grupos celulares con función inductora llevan a cabo almacenamiento de la información para la síntesis del factor inductor en forma de GPCs.

El decremento gradual de GPCs, observado a partir del estadio 26 (4 ½ días) y en el 29 (6-6 ½ días), posterior a la acumulación de estas partículas ribonucleoproteínicas, podría representar la salida paulatina de RNAm para ser utilizado en la síntesis de la proteína δ cristalina ya que esta se acumula desde la etapa de placoda del cristalino (45). Lo expresado por Modak y Person respecto a la disminución gradual de síntesis de RNA que acompaña a la diferenciación de las fibras del cristalino (44) y las observaciones de Bebe y Piatigorsky, Milston y cols., Oster y cols., y Shinohara y Piatigorsky relacionadas con la acumulación y decremento de RNAm (46, 47, 48, 39) reforzaría la idea expresada referente a la disminución gradual de GPCs.

En el estadio 30 (6 ½ - 7 días) se observa nuevamente incremento de los GPCs, por lo que podría suponerse que es, por una parte, la manifestación de otro momento de inducción generado por el cristalino, ya que este aumento coincide con el inicio del desarrollo de la córnea e iris que se lleva a cabo en el séptimo y octavo día (24, 29). La idea anterior sería semejante a lo que sucede en el caso de la notocorda y lo observado en el estadio 14 (2 ½ días).

Otra explicación para este segundo incremento, podría ser que es la manifestación del acopio de RNAm, que en días subsiguientes será transportado paulatinamente hacia el citoplasma para la síntesis de la proteína β cristalina. Inicialmente Genis-Gálvez determinó que la síntesis de este compuesto es a partir del séptimo día del desarrollo embrionario (45) y Hejtmancik mediante técnicas de hibridación de RNA detectó RNAm para los polipéptidos β B1 y β B2 a los seis días de desarrollo (41). Aunado a lo anterior, Duncan y cols. localizaron RNAm para la

proteína β A2 cristalina entre el quinto día de desarrollo (41).

Seguido a este incremento de GPCs, se observa en los estadios 32 y 35 (7 $\frac{1}{2}$ y 8 $\frac{1}{2}$ - 9 días) decremento del número de este tipo de partículas, lo que podría significar el transporte paulatino de RNAm hacia el citoplasma para la síntesis de la proteína β cristalina, que previamente fue almacenado.

Las variaciones antes comentadas más las observaciones de Hejtmancik e Inoue (41, 42) referente a la acumulación de RNAm de la proteína β A2 cristalina a los 19 días y 3 meses de vida postnatal y de las proteínas α A y α B en la vida embrionaria y adulta respectivamente, muestran que la expresión génica relacionada con la síntesis de proteínas, en las que residen las propiedades ópticas del cristalino, no es ni continua en la célula fibrilar ni exclusiva de la etapa embrionaria, sino que se lleva a cabo en ciertos momentos tanto del desarrollo embrionario como postnatal, por lo que al parecer corresponde a una característica propia del cristalino.

Por lo anterior el mecanismo postranscripcional durante la diferenciación pudiera diferir respecto al tipo celular, según lo observado en mioblastos y neuroblastos. En este último tipo celular la ausencia de contacto con células efectoras durante la diferenciación, provoca su degeneración y posteriormente muerte celular, por tanto existe dependencia mutua para la total diferenciación. Por otra parte, la motilidad se observa desde la etapa embrionaria y para ello es necesario el establecimiento de la sinapsis, mielinización de las fibras nerviosas y establecimiento de la placa motora. En tanto que el cristalino, aunque tiene un papel importante en la diferenciación de la córnea y retina, la adquisición del índice de refracción y poder dióptrico se lleva a cabo paulatinamente, esto lleva a la estructura a conformarse como medio refringente, que al estar integrado al globo ocular permite que este último funcione ópticamente; pero la maduración funcional se inicia a partir del nacimiento, momento en que este órgano es relevante.

CONCLUSIONES.

De los resultados de este trabajo se deduce lo siguiente:

- 1- La predicción mencionada en la hipótesis, referente a que el número de GPCs se incrementaría en forma directamente proporcional a la diferenciación del cristalino no fue confirmada.
- 2- Durante la diferenciación del cristalino se manifestaron dos momentos de máxima concentración de GPCs. Estos fueron a los 2 ½ y 6 ½ - 7 días de desarrollo embrionario. Inmediatamente seguido a estos picos de máxima concentración se apreció decremento paulatino de este tipo de partículas ribonucleoproteínicas.
- 3- El mecanismo postranscripcional observado durante la diferenciación del cristalino difiere al que presentan los neuroblastos, mioblastos y células blastodémicas en proceso de diferenciación al parecer por características propias del cristalino.

BIBLIOGRAFIA.

1. Stein G.S., Stein J.S. and Kleinsmith L.J. 1975. Chromosomal proteins and gene regulation. *Scient. Amer.* 232(2):46-51.
2. Denis H. 1968. Role of messenger ribonucleic acid in embryonic development. In: *Advances in morphogenesis*. Academic Press. U.S.A. 7:115-50.
3. Barrera S.H.A. 1992. *Información Genética. Estructura. Función y Manipulación*. Edit CONACYT. México pp 20-26.
4. Jiménez-García L.F. 1985. *Evolución nuclear en animales*. Tesis de Maestría en Ciencias. Biología. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México pp 1-29.
5. Imaizumi M.T., Diegelman M. and Sherrer K. 1972. Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of messenger RNA of avian erythroblast. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:1122-26.
6. Lukanidin E.M., Olsen S. and Pihl A. 1972. Antigenic difference between informers and protein bound to polyribosomal RNA from rat liver. *Nature (London) New Biol.* 240:90.
7. Kish V.M. and Pederson T. 1975. Ribonucleoprotein organization of polyadenylate sequence in HeLa cells heterogeneous nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* 95:227-38.
8. Ortega R.J.M. 1986. *Estudio Cuantitativo de las Partículas de Ribonucleoproteínas Nucleares durante la Diferenciación y Maduración de los Neuroblastos de Médula Espinal de Embrión de Pollo*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México pp 17-47.
9. Watson M.I. 1972. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell. Biol.* 13:162-67.
10. Monneron A. and Bernhard W. 1969. Fine structural organization of interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 266-88.
11. Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27:250-65.
12. Vázquez-Nin G.H., Abolhassani-Dadras S., Echeverría O.M., Boutinard-Rovelle-Rossier V. and Fakan S. 1996. Phosphorus distribution in

perichromatin granules and surrounding nucleoplasm as visualized by electron spectroscopic imaging. *Biol. Cell* 87:171-77.

13. Yamamoto K.R. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and genes networks. *Annu.Rev. Genet.* 19: 209-52.

14. Vázquez- Nin G.H. and Bernhard W. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani rings granules. *J. Ultrastruct. Res.* 36:842-60.

15. Vázquez-nin G.H., Echeverría O.M., Molina E., and Fragoso J. 1978. Effects of ovariectomy and estradiol injection on nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat* 102:308-18.

16. Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Peiron J. 1979. Ultrastructural and Autoradiographic Study of the Effects of Bleomycin on the Interphase Nucleus of Cultures Normal cell. *Cancer Res.* 39:4218-23.

17. Moyne G. Nash R.E. and Puvion E. 1977. Perichromatin and the nuclear components in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *J. Biol Cell.* 30:5-16.

18. Petrov P. and Skeris C.E. 1971. Early action of amanitin on extranuclear ribonucleoproteins as revealed by electron microscopy observation. *Exp. Cell. Res.* 69:393-401.

19. Karasaki S. 1965. Electron microscopic examination of site nuclear RNA synthesis during amphibian embryogenesis. *J. Cell Biol.* 26:937-58.

20. Fakan S. and Odaychenko N. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *J. Biol. Cell* 37:211-18.

21. Vázquez-Nin- G.H., Ortega-Rangel J.A., Echeverría O.M. 1980. Nuclear aspect of neuroblast differentiation in chick embryo. *J. Biol. Cell* 39: 143-46.

22. Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel J.A., Echeverría O.M., Parra M.R. and Jiménez-García L.F. 1973. Changes in the nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *J. Biol Cell* 48:17-24.

23. Zavala G., Aguilar X., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M. and Vázquez-Nin G:h. 1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of muscle cells in the chick embryo. *J. Biol. Cell.* 76:159-65.

24. Romanoff A. 1960. *The Avian Embryo Structural and Functional Development.* McMillan Co.U.S.A. pp 381-89.

25. Balinsky B.I. 1975. *Introducción a la Embriología*. Edit. Omega. Barcelona España. pp 287
26. Schook P. 1978. A Review of data on Cell Actions and Cell Interactions During the Morphogenesis of Embryonic Eye. *Acta Morphol. Neerl. Scaand.* 16:267-86.
27. Silver J. and Hughes F.W. 1973. The role of cell death during morphogenesis of mammalian eye. *J.Morph.* 140:159-70.
28. Coulombre J.L. and Coulombre A.J. 1963. Lens Development: fiber elongation and lens orientation. *Science* 142:1489-90.
29. Coulombre A.J. 1969. Regulation of ocular morphogenesis. *Investigative Ophthalmology.* 5(1):25-31.
30. McAvoy J.W. Chamberlain C.G. 1989. Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cell depending on its concentration. *Development* 107:221-28.
31. Schultz M.W. , Chamberlain C.G., de longh R.U. and McAvoy J.W. 1993. Acidic and basic FGF in ocular media and lens: Implications for lens polarity and growth patterns. *Development* 118:117-26.
32. Robinson M.L., Overback P.A., Verran D.J., Grizzle W.E., Stockard C.R., Friesel R., Maciag T. and Thompson J.A. 1995. Extracellular FGF-1 acts as a lens differentiation factor in transgenic mice. *Development* 121:505-14.
33. Moscona A.A., Monroy A. 1970. *Current Topics in Development Biology* Vol .5. Academic Press. New York pp. 115-175.
34. Beebe D.C., Feagans D.E. and Jebens H.H. 1980. Lentropin: A factor in the vitreous humor promotes lens fiber cell differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77:490-93.
35. McAvoy J.W. 1978. Cell division, cell elongation and distribution to α , β and γ crystallins in the rat lens. *J. Embryol. Exp. Morph.* 44:149-65.
36. Hamilton H.L. 1952. *Lillie's Development of the Chick and Introduction to Embryology*. Holt, Rinehart and Winston Inc. New York pp:206,208-12, 343-45.
37. Hunt H.H. 1961 A Study of the fine structure of the optic vesicle and lens placode of the chick embryo during Induction. *Developmental Biology* 3: 175-209.

38. Kuszak J.R. 1995. The Ultrastructure of Epithelial and Fiber Cells in the Crystalline Lens. *International Review of Cytology* . 163:305-51.
39. Piatigorsky J. 1981. Lens Differentiation in vertebrates . A review of Cellular and Molecular Features. *Differentiation* 19:134-53.
40. Byers B. and Porter K.R. 1964. Oriented microtubules in elongation cell of the developing lens rudiment after induction. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52:1091-99.
41. Duncan M.K., Banerjee-Basu S., Mc Dermott J.B. and Piatigorsky J. 1996. Sequence and Expression of Chick $\beta 2$ and $\beta 3$ crystallins. *Exp. Eye Res* 62:111-19.
42. Inoue T., Miyazaki Jun-ichi, Hirabayashi I. 1992. Accumulation of Crystallin in Developing Chick Lens. *Exp. Eye Res.* 55:1-8.
43. Zavala P.G.T. 1995. *Análisis ultraestructural de partículas intranucleares durante la diferenciación de tejidos derivados de las principales capas embrionarias* . Tesis de Doctor en Ciencias . Biología. Facultad de Ciencias U.N.A.M. México.
44. Modak S.P. and Person B.J. 1971. RNA syntesis during lens cell differentiation. *Exptl Cell Res.* 64:473-76.
45. Genis-Gálvez J.M., Maesel H. and Castro J. 1968. Changes in Chick Lens Proteins with Aging. *Exptl Cell Res.* 7:593-602.
46. Beebe D.C. and Piatigorsky J. 1977. The Control of δ Crystallin Gene Expression during Lens Cell Development: Dissociation of Cell, Cell Division, δ -Crystallin Syntesis and δ Crystallin mRNA Acumulation . *Development Biology.* 59:174-82.
47. Milstone L.M., Zelenka P. and Piatigorsy J. 1976. δ Crystallin in mRNA in Chick Lens Cells: mRNA Accumulates during Differential Stimulation of δ Crystallin Sunthesis in Cultured Cells. *Developmental Biology.* 48: 197-204
48. Oster H., Beebe D. and Piatigorsky J. 1981. β Crystallin mRNAs: Differential Distribution in the Developing Chick Lens. *Developmental Biology.* 86: 403-8.