

00387

leje 6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS PARTICULAS DE RIBONUCLEOPROTEINAS NUCLEARES DURANTE LA DIFERENCIACION Y MADURACION DE LOS NEUROBLASTOS DE LA MEDULA ESPINAL DEL EMBRION DE POLLO.

TESIS DOCTORAL

Para Optar por el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P r e s e n t a :
JUAN AMBROSIO ORTEGA RANGEL

Director de Tesis: Dr. en C. Gerardo H. Vázquez Nin

México, D. F.

1986

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION.	1
I. EL TEJIDO NERVIOSO.	1
1) Histogénesis.	1
2) Diferenciación y maduración de los neuroblastos.	6
3) Sinaptogénesis.	11
II. EL NUCLEO INTERFASICO.	17
1) Caracterización y propiedades del ARN heterogéneo.	19
2) Procesamiento del ARNhn y su relación con el ARN polisomal. ...	21
3) Partículas de ribonucleoproteínas. ...	25
4) Localización <u>in situ</u> de ribonucleo proteínas extranucleolares.	31
a) FIBRAS PERICROMATINIANAS.	32
b) GRANULOS PERICROMATINIANOS. ...	36
c) GRANULOS INTERCROMATINIANOS. ..	41
5) El nucléolo.	44
OBJETIVOS DEL TRABAJO.	48
MATERIALES Y METODOS.	51
RESULTADOS.	61
I. MORFOLOGIA.	61
II. ESTEREOLOGIA.	72
III. FIGURAS.	81
DISCUSION.	97
CONCLUSIONES	116
BIBLIOGRAFIA.	120

INTRODUCCION.

I. EL TEJIDO NERVIOSO.

1) Histogénesis.

La formación del tejido nervioso en los vertebrados, se inicia en una etapa temprana del desarrollo embrionario, hecho importante por la función que va a tener casi desde el principio, al constituirse en un sistema integrador de muchas funciones generales en estos organismos de elevada complejidad. Así, desde el final de la gastrulación - caracterizada por el establecimiento de las tres capas embrionarias primordiales - se integra la placa neural. Esta es el primer esbozo del sistema nervioso, formada por la diferenciación de células ectodérmicas de la línea media del dorso del embrión.

Los cambios que presenta el ectodermo para formar la placa neural, se inicia con modificaciones en la forma de sus células; que en un principio son planas y en una sola capa, se transforman en poliédricas y forman un epitelio columnar. También aumenta la actividad mitótica de dichas células que produce un mayor número de capas que engrosan esta zona, en comparación con las áreas vecinas. Posteriormente, las células poliédricas más superficiales de la placa presentan estrechamien-

tos apicales, que producen plegamientos que la invaginan en el mesodermo subyacente, lo que constituye la segunda etapa que es la de surco neural.

Estos cambios morfogénicos han sido observados desde mucho tiempo atrás. His al describirlos en 1879, sugirió una causa que los originara. Para él eran debidos a una expansión del ectodermo, generada por mitosis excesiva en las áreas vecinas a la línea medio dorsal que la presiona hasta invaginarla. Esta hipótesis de His no fue aceptada por todos sus contemporáneos. Roux (1885) con observaciones más precisas, manifestó que dichos eventos serían el resultado de cambios intrínsecos, más que de fuerzas extrínsecas. Esta hipótesis está actualmente comprobada por los experimentos con explantes de placa neural en cultivo de tejidos, que en condiciones apropiadas exhiben los cambios observados in situ (Holtfreter, 1947).

Actualmente con los estudios de Burnside (1971), estos primeros movimientos morfogenéticos se explican en parte al considerar la dinámica de los microtúbulos y microfilamentos; y al desplazamiento de la matriz celular, favorecida por la presencia y orientación del retículo microtrabecular (Porter y Tucker, 1981) de las células implicadas. Mientras que en las células ectodérmicas ordinarias, éstas estructuras del citoesqueleto se distribuyen irregularmente, en las células de la pla-

ca neural presentan una orientación más definida. - Así, el alargamiento de las células neuroectodérmicas depende: de la posición de los microtúbulos - paraxiales, del crecimiento de los mismos y del - transporte de la matriz citoplásmica a las regiones apicales y basales de dichas células. La presencia, la orientación circunferencial y el deslizamiento de los microfilamentos por debajo de la - superficie libre de las mismas células, dan lugar a constricciones apicales que disminuyen la superficie y contribuyen al proceso de invaginación - (Burnside, 1973).

La etapa de surco neural -además de los cambios mencionados- se caracteriza por presentar en su pared, células con morfología variable. Hacia - la luz son pálidas, alargadas y presentan algunas mitosis, en cambio en la parte externa de la pared, hay células con núcleos más empaquetados y con escaso citoplasma.

Con observaciones más precisas al microscopio (Sauer: 1935, 1936 y 1937), con citofotometría - (Sauer y Chittenden, 1959) y con los múltiples estudios de autorradiografía con timidina tritiada - (Sauer y Walker, 1959; Sidman y col., 1959; Killen y Valmin, 1963; Fujita, 1963; Martin y Langman, - 1965), se comprueba que en esta etapa y al principio del desarrollo del tubo neural, funcionalmente sólo existe un tipo de células con ciclos celulares

cortos. De esta manera, los núcleos de la zona externa de la pared duplican su ADN y se desplazan posteriormente hacia la luz del tubo para completar las mitosis correspondientes. Posteriormente las células resultantes, vuelven a migrar a la zona externa donde duplican su ADN y continúan el ciclo descrito. Este tipo celular único fué denominado por Fujita (1964) como célula matriz, tanto por su gran proliferación, como por la falta de diferenciación hacia líneas celulares específicas. Por lo tanto, estos estudios modifican la hipótesis de His (1889), que mencionaba en estas primeras etapas tipos celulares diferentes tales como: células ependimarias, germinales y espongioblastos.

Durante el período de tubo neural, se observan cambios morfológicos notables, como: la separación del ectodermo, el aumento de grosor de su pared y conjuntamente la formación de las crestas neurales. Además, en la periferia de la pared del tubo, se distinguen algunas células de aspecto irregular, con núcleo grande, redondo, pálido y con nucléolo muy aparente (Martín y Langman, 1965). Estas células se diferencian funcionalmente de las denominadas matrices, en que sus núcleos no incorporan timidina tritiada aún con exposiciones largas (Fujita, 1964; Martín y Langman, 1965). Dichas células corresponden a los primeros neuroblastos, que en el embrión de pollo aparecen aproximadamen-

te en la etapa de 22 somitas (Hamburger y Hamilton, 1952; Martín y Langman, 1965).

Con la presencia de los primeros neuroblas- - tos, la pared del tubo neural presenta las tres ca- - pas concéntricas a su luz, conocidas desde tiempos atrás como: la interna o germinal, la media o del_ - manto y la externa o marginal. La capa germinal - - continúa generando células por mitosis constantes_ - y como se mencionó, de un solo tipo funcional. Du- - rante la interfase las células germinales tienen - - núcleo y citoplasma alargado, cuyo eje mayor es - - perpendicular a la luz del tubo. Estas células en_ - la superficie ventricular, están adheridas entre - - sí por uniones celulares firmes - complejos de - - unión, barras terminales, etc. - por lo tanto, los_ - movimientos de ascenso y descenso del núcleo, suce- - den dentro del mismo citoplasma sin que se separen de la luz del tubo (Fujita, 1963).

Martín y Langman (1965) observaron, que si - - bien, la mayoría de los husos acromáticos de las - - mitosis son paralelos a las superficies ventricula_ - res, hay un pequeño número de mitosis -entre el 5 - - y el 10%- en que el huso es perpendicular a la su- - perficie. Por lo que se plantea la posibilidad de_ - que la célula hija inferior, pierda contacto con - - la superficie y migre hacia la capa del manto, don_ - de algunos factores no determinados inducen su di- - ferenciación hacia neuroblastos. Estos serían los_ -

neuroblastos de aspecto bipolar, con su prolongación interna orientada hacia la luz y la externa - más larga y mejor constituida, integrada a la capa marginal (Cajal, 1909-1911).

2) Diferenciación y maduración de los neuroblastos.

La transformación de las células matrices en neuroblastos, es un fenómeno gradual desde el punto de vista morfológico. Parte de un punto crítico, que es la incapacidad de incorporar timidina - tritíada (Fujita, 1964; Martín y Langman, 1965), - estos neuroblastos primitivos, difieren en poco o - nada de las células matrices en cuanto su organización celular (Wechsler, 1966). Con microscopía electrónica se observa: un desarrollo pobre del sistema de membranas intracitoplásmicas, abundantes ribosomas libres, material nuclear denso y finamente granular (Fujita y Fujita, 1963; Lyser, 1968). Los primeros signos morfológicos en la diferenciación de estas células, es el mayor desarrollo de las membranas intracelulares, en especial el retículo endoplásmico rugoso y el complejo de Golgi (Fujita y Fujita, 1963), a lo que se agrega la formación de neurofibrillas y neurofilamentos (Cajal, 1909-1911; Vázquez-Nin y Sotelo, 1966). El mismo Fujita (1963), describe que en los núcleos hay una mayor

dispersión de cromatina y los nucléolos son más prominentes. Estos cambios, junto con el aumento de volumen de la célula, se acentúan más conforme transcurre el desarrollo.

Con observaciones en microscopía de luz y con las técnicas de impregnación argéntica, se describen diferentes etapas en el desarrollo de los neuroblastos, que secuencialmente son:

1.- Presencia de células apolares, llamadas también neuroblastos primitivos de Held que se asemejan a las células matrices, pero con un mayor contenido fibrilar y con propiedades migratorias (Cajal, 1909-1911).

2.- Desarrollo de neuroblastos bipolares con dos formaciones citoplásmicas, la prolongación distal que es el esbozo del axón la cual se observa crecer desde el segundo día del desarrollo (Lyser, 1968), y si se compara con la prolongación proximal es más grueso y rico en fibrillas.

3.- Observación de neuroblastos unipolares de His, que resultan de la atrofia de la prolongación proximal y del mayor crecimiento del cilindroeje. En el caso de los neuroblastos que terminan como motoneuronas, esta prolongación llega a su destino el quinto día del desarrollo del embrión de pollo (Cajal, 1909-1911).

...

Al observar la ultraestructura de estos últimos neuroblastos, resalta el gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y la abundancia de ribosomas, los cuales a la microscopía óptica y teñidos con azul de toluidina se distinguen por un notable aumento de la basofilia citoplásmica. Estos cambios corresponden a las adaptaciones funcionales, tales como una mayor síntesis de proteínas necesarias para mantener el crecimiento de las prolongaciones citoplásmicas -axones o dendritas-. Cabe hacer notar al respecto, que la producción y flujo de proteínas del soma a las prolongaciones, es continua durante toda la vida de las neuronas.

Para la médula espinal del embrión de pollo, la formación de los neuroblastos tiene un límite temporal bien determinado, que es al final del octavo día de incubación (Martin y Langman, 1965; Fujita, 1965). Durante este tiempo, el número de mitosis de la capa germinal varía con base de modelos específicos de distribución (Hamburger, 1948). En los primeros 3 días de incubación el número de mitosis es uniforme, tanto en dirección dorso-ventral como en la céfalo-caudal. Después del tercer día el índice mitótico es más acentuado en la placa alar, y alcanza su pico más alto en la mitad del cuarto día. También se encontró que en la región braquial la cantidad de mitosis es mayor que en la torácica (Mitolo, 1967) y como se mencionó,-

las mitosis perlependimarias terminan casi en el noveno día del período de incubación.

Igualmente el patrón de distribución de los neuroblastos recién diferenciados, lleva una secuencia determinada en cuanto a su origen y la localización final de los mismos (Fujita, 1964; Langman y Haden 1970). En general, los neuroblastos del asta anterior se forman entre el segundo y sexto día del desarrollo, como resultado de la actividad mitótica de la placa basal y unos pocos de la placa alar, es en esta última donde se forman los neuroblastos del asta posterior. La posición final de las neuronas que inervan los músculos de las alas y los miembros inferiores, es en la parte lateral del asta anterior y se originan en los primeros tres o cuatro días del desarrollo. En cambio, los neuroblastos que maduran en las motoneuronas de los músculos del torax y abdomen, se sitúan en la zona intermedia de las mismas astas y se forman entre el cuarto y el sexto día (Langman y Haden, 1970).

Durante el desarrollo normal, la columna motora cervical (Levi-Montalcini, 1950) y lumbar (Hamburger, 1975), presentan una notable reducción del número de neuroblastos, causada por la muerte celular masiva de los mismos. Este fenómeno sucede en la región cervical entre el cuarto y quinto día y en la lumbar entre el sexto y noveno día del desa-

rollo. La muerte de los neuroblastos es tan abundante en las regiones motoras, que llega a disminuir hasta el 40% del total de células (O'Connor y Wyttenbach, 1974). Los cambios ultraestructurales de esta necrobiosis, fueron descritos por O'Connor y Wyttenbach (1974), y consisten principalmente en disminución del volumen nuclear, concentración de la cromatina en la envoltura nuclear y disgregación de los polirribosomas. Estos primeros cambios morfológicos parecen tener como causa una drástica reducción en la síntesis del ARN, que determina la muerte de estas neuronas.

La hipótesis más aceptada como causa de estos fenómenos, es la falta de contacto de los neuroblastos motores con sus tejidos efectores (Hamburger, 1975; Oppenheim y Chu-Wang, 1977). Este hecho ha sido demostrado experimentalmente en embriones de 3 a 7 días, con la ablación o implantación de miembros inferiores y alas supernumerarios, en estos últimos se conserva un mayor número de neuronas. A nivel de los tejidos efectores, también existe una competencia entre los axones para hacer contacto con el músculo (Oppenheim y Chu-Wang, 1977). Todo esto apoya el concepto de que los tejidos efectores contribuyen a modular la morfogénesis de la médula espinal.

...

3) Sinaptogénesis.

Una etapa fundamental en la ontogenia de la función neural con repercusión directa en la diferenciación de los neuroblastos, es el establecimiento de los contactos especializados denominados sinapsis. En la región cervical de la médula espinal del embrión de pollo, las primeras sinapsis se observan entre las 60 y 72 horas del período de incubación (Oppenheim y Foelix, 1972; Oppenheim y col., 1975), para la región lumbar es 24 horas más tarde. Los sitios precisos de estos primeros contactos se observan en los bordes ventro-laterales, entre las zonas intermedia y marginal de las astas anteriores (Skoff y Hamburger, 1974; Oppenheim y col., 1975).

En un principio dichos contactos son exclusivamente axo-dendríticos, como lo demostró Cajal en 1911 con impregnaciones argénticas. El crecimiento precoz de las dendritas de las neuronas motoras del asta anterior, está dirigido en gran parte hacia la zona marginal o futura substancia blanca. Actualmente con la microscopía electrónica se comprueba este crecimiento y además, se observa que los primeros contactos se presentan en los conos de crecimiento del árbol dendrítico, para integrar las sinápsis exodendríticas (Skoff y Hamburger, 1974). Se ha discutido cual pudiera ser el primer

indicio morfológico en la formación de una sinapsis. Para unos (Oppenheim y col., 1975), es la aparición de las vesículas pre-sinápticas esféricas - de 400 a 500 Å de diámetro y para otros (Stelezner y col., 1973) es el establecimiento de uniones celulares especializadas, junto con la presencia de vesículas cubiertas las cuales se fusionan con la superficie celular para integrar dichas uniones.

La observación de las primeras sinapsis axosomáticas es más tardía, se describe por primera vez en el sexto día de incubación (Oppenheim y col., 1975). Este hallazgo pone en duda la hipótesis sugerida por Morest (1969), en el sentido de que era indispensable el contacto axosomático para el desarrollo del árbol dendrítico. Más importantes parecen ser los contactos axónicos periféricos con los órganos y tejidos efectores (Barron, 1946), que se establecen entre el quinto y el sexto día del período de incubación (Hirano, 1967).

Sin embargo, aunque la detección morfológica de las primeras sinapsis es muy temprana, en un principio son escasas, se cuentan entre 0 y 1 en una área de 300 micras cuadradas (Oppenheim y col., 1975), además el número de vesículas cubiertas también es reducido. Según Stelezner y col. (1973) y Oppenheim (1975) el número de sinapsis se incrementa significativamente a partir del séptimo día del

desarrollo del embrión de pollo. En las curvas de frecuencia se observan picos a los 13 y 19 días y quedan a partir de este momento en número estable.

En la actualidad, se trata de relacionar el comportamiento funcional de los embriones con el establecimiento de las sinapsis y las variantes estructurales de las mismas. Así Bodian (1968), en los embriones de mono de 17 a 22 mm. los cuales no presentan movimientos aparentes, no observó bulbos sinápticos en el neurópilo motor. En cambio en los embriones de 24 a 28 mm. en los que se inician juntos los movimientos espontáneos y reflejos, se aprecian los primeros bulbos con vesículas esféricas -tipo "S" y ocasionalmente vesículas aplanadas -tipo "F". En los embriones de 32-41 mm. con movimientos espontáneos más vigorosos y reflejos intersegmentales -o sea con inhibición sináptica funcional- se observan sinapsis axosomáticas y mayor número de botones con vesículas tipo "F" (Bodian, 1968).

En el embrión de pollo, la aparición precoz de los movimientos espontáneos del tronco y los miembros suceden en el tercero o cuarto día de incubación, coinciden con la presencia de bulbos sinápticos axodendríticos y vesículas tipo "S" (Oppenheim y Foelix, 1972). A partir del séptimo día, se establecen movimientos más complejos, con reflejos cutáneos, inhibición de grupos musculares antagonis-

tas, y se observan en la ultraestructura la presencia de sinapsis axósomáticas y vesículas aplanadas. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que estas últimas estructuras, son la base morfológica de la función inhibitoria, sin embargo, no existe al respecto un criterio unánime como se expresa en los trabajos de Mugnaini (1969) y Stelezner y Col. (1973).

Otro aspecto funcional en la sinaptogénesis, es con respecto a la primera actividad eléctrica registrada en la médula, que corresponde al cuarto día del período de incubación (Provine, 1972), - aunque es hasta el noveno o décimo día cuando se reciben los estímulos supra espinales. Esto lo demostró Oppenheim y col. (1975), al seccionar transversalmente la médula cervical en embriones de 3 a 10 días y observar sus movimientos espontáneos. De esta manera se modifican los conceptos de Visintini y Levi-Montalcini (1939), que suponían la influencia de las estructuras cerebrales en la médula a partir del cuarto día del desarrollo.

Entre otros factores que pueden influir o modular la maduración de los neuroblastos y la misma histogénesis de la médula espinal, se menciona la presencia del mesénquima y la vascularización. Los capilares junto con las células mesenquimatosas, invaden la médula a partir del cuarto día del desa

rollo (Cajal, 1909-1911; Feeney y Watterson, - - 1946). La invasión del mesénquima se comprueba al exponer la médula espinal a la timidina tritiada - en pulsos de 6 horas, lo que permite observar fi- - las de células marcadas que se extienden de la pe- - riferia de la médula a las capas marginales y del - - manto (Martín y Langman, 1965). Estas últimas célu - - las no derivan de las células matrices; primero - - porque las mitosis en esta etapa se presentan en - - la capa germinal y segundo, cuando se marcan célu - - las matrices, necesitan 8 horas para migrar hacia - - fuera de la capa marginal (Martín y Langman, 1965).

La diferenciación de la neuroglia se inicia - - en el séptimo u octavo día del desarrollo, práctic - - amente en el momento en que termina la producción - - de neuroblastos (Cajal, 1909-1911; Fujita, 1965). - - En estos días, las células matrices forman pobla - - ciones celulares que presentan núcleos redondos, - - pequeños y oscuros con escasa cantidad de cito - - plasma y que Fujita (1965) llamó glioblastos. Es - - tas células migran más rápido y lejos que los neu - - roblastos, se duplican durante su recorrido, para - - finalmente transformarse en astrocitos u oligoden - - drocitos.

Finalmente, la formación de mielina se inicia - - en la segunda semana del período de incubación, - - con el depósito de lípidos, cerebrósidos y coleste - - rol (Adams y Davison, 1959; El-Eishi, 1967); se - -

observa la mielina a nivel de ultraestructura a partir del día 13 (Oppenheim y Foelix, 1972). La mielinización activa sucede en los últimos 4 días de este período (El-Eishi, 1967), e influye en el aumento de volumen de los axones y en una diferenciación definitiva de las estructuras del axoplasma (Wechsler, 1966).

II. EL NUCLEO INTERFASICO.

El núcleo celular es el mayor depositario de la información genética en las células eucariotes y por lo tanto, es una estructura esencial para el funcionamiento de las mismas. La actividad del protoplasma, está sustentada en el conjunto de reacciones fisicoquímicas que se suceden ordenadamente por la acción de las enzimas. Estas junto con las demás proteínas, son el producto final de la expresión de determinados genes, esto depende del tipo celular del que se trate. A su vez se entiende que la base química de los genes es la gran molécula de ADN, la cual, asociada a diferentes clases de proteínas integra los cromosomas en los núcleos de los eucariotes.

Si se considera que la cantidad del ácido desoxirribonucleico (ADN), es virtualmente igual en todos los núcleos de las células diploides de un organismo (DuPraw, 1970; Gurdon, 1974), surge una interrogante en la biología molecular y es la que se refiere a la naturaleza de los sistemas que regulan la expresión del genoma. En la actualidad la respuesta es incompleta debido a la complejidad del problema, pero se considera al núcleo como parte de un sistema de retroalimentación, por el cual las células responden a estímulos intra y extracelulares, que al interaccionar con el genoma, provo

can la elaboración de productos específicos que -
permiten a la célula responder a dichos estímulos -
y necesidades. El producto principal de estas res-
puestas lo constituye el ácido ribonucleico (ARN),
por eso Busch (1977) considera que la síntesis de -
esta molécula, es la función nuclear más específi-
ca.

Todas las diferentes formas de vida celular -
contienen varias especies de ácido ribonucleico, -
los más específicos en cuanto su acción son: el -
ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia - -
(ARNt) y el ARN ribosomal (ARNr). La función de es -
tas variedades de ARN, es la de proveer un puente -
entre la información genética contenida en el ADN -
y la estructura primaria de las proteínas (Ro y -
Busch, 1974). Estos ARN son sintetizados sobre mol -
des de ADN por las ARN polimerazas dependientes -
del ADN (Ro y Busch, 1974). Sin embargo, la sínte -
sis, el metabolismo intra nuclear y el transporte -
al citoplasma -sobre todo en los eucariontes- es -
mucho más complejo y no del todo claro. Esto impli -
ca la necesidad de más compuestos y reacciones, -
que son dominio del campo de la química estructu -
ral y enzimática (Busch, 1977).

1) Caracterización y propiedades del ARN heterogéneo.

Los transcritos primarios de ARNm intranuclear se denominan ARN heterogéneo nuclear o ARN premen-sajero, RNAhn o pre-ARNm respectivamente (Jiménez-García, 1985). Después de la caracterización bio-química general del ARN, Georgiev (1961) y Geor-giev y Mantieva (1962) lograron separar dos clases de ácido ribonucleico: un ARN como el ribosomal - con alto contenido de G-C denominado ARNr y otro - con una composición de bases semejantes al ADN nuclear, denominado en un principio ARNd. La técnica que utilizaron estos investigadores, es la del - fraccionamiento con fenol caliente; la cual ha sido depurada para obtener más tipos de ARN. Básica-mente esta técnica consiste en extracciones sucesi-vas con fenol-NaCl al 0.14 M y pH 6, extrayendo a temperaturas variables. Así, a los 4 C se extrae - el ARN citoplásmico; a los 40 C se libera el ARN - nucleolar con el pre-ARNr; a los 55 C hay mezclas_ de diferentes ARN; y por último a los 65 y 85 C se obtiene el complejo de ARNd con un 90% de pureza - (Georgiev y Mantieva, 1962). Igualmente, con las - técnicas de centrifugación diferencial en gradien-tes de sacarosa, se logran separar estas substan-cias, pues el ARNd es más pesado que el ARNr y el_ citoplásmico (Scherrer y col., 1963; Penman y col., 1966; Warner y col., 1966).

Se ha comprobado que este gran complejo de ARNd, existe en todas las células de eucariontes (Sibatani y col., 1962; Brawerman, 1963), por lo que resalta su importancia biológica. Actualmente se le designa preferentemente con el término de "heterogéneo" o "heterodisperso" (ARNhn), por la irregularidad de su peso molecular (Warner y col., 1966); así con las determinaciones y cálculos apropiados, Georgiev (1974) estima que su peso molecular está comprendido entre 2 a $200 \cdot 10^6$ Daltones. También la dispersión es notoria cuando se consideran los coeficientes de sedimentación que abarca de 20 a 100 "S" (Yoshikawa y col., 1964; Scherrer y Marcaud, 1965; Attardi y col., 1966). En cuanto a la organización del ARNhn, se comprueba bioquímicamente que es una cadena simple de nucleótidos (Sharma y col., 1969), lo que se ha corroborado en parte por la visualización directa al microscopio electrónico (Granboulan y Sherrer, 1969). Con respecto a la cantidad de nucleótidos, unos investigadores (Perry y Col., 1975; Derman y col., 1976) que consideran la heterogeneidad del mismo, reportan que abarca de 20,000 a 30,000 ó más nucleótidos.

El contenido de bases del ARNhn no es del todo simétrico, puesto que el coeficiente de U/A oscila alrededor de 1 (Brawerman, 1963; Warner y col., 1966). Por lo anterior el ARNhn forma híbrido

dos con el ADN; en experimentos de saturación el coeficiente de hibridación del ARNhn/ADN, está entre el 5 y el 10%, mientras que el ARNr solamente hibrida con el 0.03% (Church y Brown, 1972). Esta gran hibridación del ARNhn con el ADN es similar a lo que se observa con los experimentos de renaturalización de ADN/ADN (Britten y Koehn, 1968). En tiempos de marcaje cortos, se comprueba que los precursores radioactivos como la uridina tritiada se incorporan de inmediato al ARNhn, lo cual indica una síntesis rápida de esta molécula. Sin embargo, el ARNhn solo forma el 2 ó el 3 % del total del ARN nuclear, mientras que el ARNr representa del 70 al 80% casi con la misma velocidad de síntesis. Estas últimas cifras indican que son degradadas cantidades significativas del ARNhn dentro del núcleo, si se considera su alta velocidad de incorporación (Georgiev, 1974).

2) Procesamiento del ARNhn y su relación con el ARN polisomal.

Con respecto a la función biológica que desempeña el ARNhn, está implícita la relación de esta substancia con el ARNm. Un gran número de estudios experimentales, apoyan el concepto de que el ARNm es parte de la molécula del ARNhn. Entre los resultados que demuestran esto último, está la hibrida-

ción del ARNm de los polisomas (ARN polisomal) con el ARNhn y sus secuencias de poliadenina, que en las células de animales superiores da una complementaridad de bases del 10 al 25% (Getz y col., 1975; Herman y col., 1976). También apoya esta hipótesis, la incorporación de genes virales en el genoma de células transformadas, porque al ser transcrito el mensaje viral, éste se incorpora a un ARN gigante del huésped con peso molecular mucho mayor que el mismo genoma viral (Oda y Dulbeco, 1963; Westphal y Dulbeco, 1968). En experimentos con transcriptasa inversa, en que se toma como molde el ARNm de la hemoglobina para transcribir el anti-ADNm e hibridándolo con el ARNhn de eritrocitos, se obtiene un 3 % de bases complementarias (Temin y Mizutani, 1970). Por último, se ha demostrado experimentalmente que el ARNhn puede servir como molde para la incorporación de aminoácidos en cadenas de polipéptidos en sistelibres de células (Brawerman, y col., 1964), todo esto indica que parte del ARNhn gigante, es transferido al citoplasma como el verdadero mensajero (Imaizumi y col., 1972). En las células de aves y mamíferos el ARNhn es de 3 a 6 veces más grande que el ARNm (Perry y col., 1975; Derman, y col., 1976). Sin embargo, en especies inferiores como Dictyostelium, los ARNhn apenas son un 20 % mayor que sus correspondientes ARNm (Lodish y col., 1974). Estos hallaz-

gos demuestran que la cantidad de ARNhn transcrita, aumenta proporcionalmente conforme crece el tamaño y la complejidad del genoma (Rosen, 1977).

Posterior a su transcripción, el ARNhn tiene que ser modificado para llegar a ser el ARNm activo e intervenga directamente en la síntesis de la estructura primaria de las proteínas. Esto corresponde al procesamiento post-transcripcional del ARN, e implica una serie compleja de eventos que incluyen principalmente: la adición de grupos metilados y fosforilados de guanosina, o sea la formación de un "capuchón" o "cap"; la poliadenilación; la partición del producto de la transcripción con la reunión de algunos de sus fragmentos, fenómeno denominado "splicing"; y la asociación a proteínas para formar las ribonucleoproteínas (RNP).

El encapuchamiento o "capping" se presenta al inicio de la transcripción y consiste en la adición de 7-metilguanósina y la fosforilación en el extremo 5' de la molécula de ARN (Rosen, 1977; Darnell, 1983). Este grupo metilado no existe en el ARNr y probablemente es de ocurrencia universal en células de eucariotes. La adición del "cap" le da estabilidad al ARNm e impide su degradación en el citoplasma y núcleo, también es necesario para la unión eficiente al ribosoma y para iniciar la síntesis de proteínas (Banerjee, 1980; Jiménez-García, 1985).

Una etapa esencial en el procesamiento del ARNhn es la que corresponde al llamado "splicing" o eliminación de algunas secuencias del ARN. Este fenómeno se descubrió al observar la gran inestabilidad de los transcritos primarios de ARNhn marcados con uridina tritiada, los cuales decrecen rápidamente de tamaño y que tan solo el 5 % de este ARN llega al citoplasma para que el resto se degrade en el núcleo. (Alberts y col., 1983). Esto junto con otras técnicas y descubrimientos, llevaron a establecer que la mayoría de los genes estructurales de eucariontes no son colineales con sus productos, sino que contienen secuencias de interrupción en las que no está codificado un mensaje para la síntesis de proteínas (Berget, 1977; Jiménez-García, 1985; Darnell, 1985). Las regiones que tienen codificadas las secuencias del ARNm se llaman "exónes", que a su vez están interrumpidas por secuencias en las que no está codificado algún mensaje y se denominan "intrones" (Crick, 1979). Este fenómeno complejo tiene dos fases, una en la que se separan las secuencias intrón-exón y otra en las que se unen los exónes restantes que junto con el "cap" y el "poli A" integran un ARN mensajero. Una de las consecuencias biológicas del "splicing" es el que le confiere a la célula una gran flexibilidad genética; esta flexibilidad es posible porque diferentes formas de "splicing" pueden generar al-

gunas proteínas diferentes a partir del mismo ARN transcrito (Alberts y col., 1983). Cambios en el modelo del "splicing" de una misma secuencia transcrita se saben que ocurren durante la diferenciación celular, por lo que un mismo segmento de ADN tiene diferentes aplicaciones durante el desarrollo de las células (Alberts, 1983).

Un complemento fundamental en el metabolismo intranuclear del ARN, es su asociación con proteínas específicas para constituir los complejos de ribonucleoproteínas "RNP" (Lukanidin y col., 1972; Kish y Pederson, 1975). Estos complejos moleculares están íntimamente relacionados con el procesamiento, transporte y almacenamiento del ARN dentro del núcleo, por lo que resalta la importancia de estos complejos en los fenómenos de expresión y regulación del genoma.

3) Partículas de ribonucleoproteínas.

Una diferencia fundamental entre los procariontes y los eucariontes respecto a la síntesis y procesamiento del ARN, es que en los primeros la traducción se inicia antes de que termine la transcripción. No hay barreras, pues no existen los compartimientos nuclear y citoplásmico en los procariontes, el ARNm de estos últimos rápidamente interactúa con los ribosomas para la síntesis de pro

teínas (Georgiev, 1974). Por lo contrario en los eucariontes, la transcripción se realiza en el núcleo y la traducción en el citoplasma, resalta otra etapa en el metabolismo del ARN que sería el transporte de esta molécula. Dentro de los núcleos en interfase, existen pocas especies de ARN libres, quizás algunos de bajo peso molecular como el ARN de transferencia; la mayor parte entre el 50 y 70 % del ARN nuclear se encuentra asociado a proteínas con las que integra las partículas de ribonucleoproteínas (RNP) (Martín y Mc Carthy, 1972; Rosen, 1977). Así, la mayoría del ARN se combina con estos complejos de RNP, en los que además del transporte ocurren modificaciones post-transcripcionales (Rosen, 1977).

Desde el punto de vista físico-químico, se han tratado de caracterizar estos complejos de ribonucleoproteínas (Samarina y col., 1966). Georgiev (1974), al trabajar con núcleos de hepatocitos de rata y de células del carcinoma de Ehrlich, logró extraer partículas que supuestamente tienen pre-ARNm. Estas partículas se someten a la centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y se recuperan en bandas homogéneas con un coeficiente de sedimentación de 30 a 40 "S"; el mismo Georgiev (1974) denomina como "informorfes" a las estructuras que con la técnica expuesta, sedimentan a 30 "S". En electroforesis con gel de poliacrila-

mida -SDS-, el peso molecular de la proteína más abundante de las partículas de 30 "S", fué de 40,000 y de reacción neutra.

Por los múltiples estudios físico-químicos que se han realizado, actualmente es difícil definir la existencia de un solo tipo de partículas de RNP que contengan ARNhn. Sin embargo, Hatzglou y col., (1985) consideran que las estructuras de RNP mejor identificadas y caracterizadas, son las que a continuación se mencionan. Primero, "los complejos heterogéneos" descritos por Stevenin y col., (1982) que tienen un coeficiente de sedimentación de 70 a 110 "S", que según estos autores contienen ARN-pre-mensajero y ARN de bajo peso molecular (ARNsn), además de una variedad heterogénea de polipéptidos y proteínas no bien identificadas; también mencionan que en estos complejos, es donde se realiza el "splicing", y por ser heterogéneos en su organización pueden disociarse en partículas más pequeñas. Segundo, poblaciones de partículas de 30-50 "S" que también contienen ARNhn (Hatzglou y col., 1985), formadas por un "núcleo o core" de proteínas las cuales están mejor definidas con un peso molecular entre 30 y 40 mil Daltones, estas mono-partículas contribuyen a la formación de estructuras más complejas como las primeramente descritas. Tercero, las pequeñas partículas de 30 "S" que pueden corresponder a las descritas por Geor--

giev (1974), estas estructuras de RNP tienen ARN - de bajo peso molecular (ARNsn).

Desde el punto de vista de la ultraestructura, Beyer y col., (1980) han logrado observar la forma ción de los primeros complejos de RNP, los cuales se identifican como partículas de unos 240 Å. Dichas partículas se forman en sitios precisos muy - carcanos a las zonas de transcripción, y que según sus conclusiones estos sitios no se distribuyen al azar, sino que pueden resultar de la expresión de algunos genes dados. También mencionan que dicho - empaquetamiento no solo condensa y estabiliza el - ARN, sino que lo secuestra y separa de su molde de transcripción.

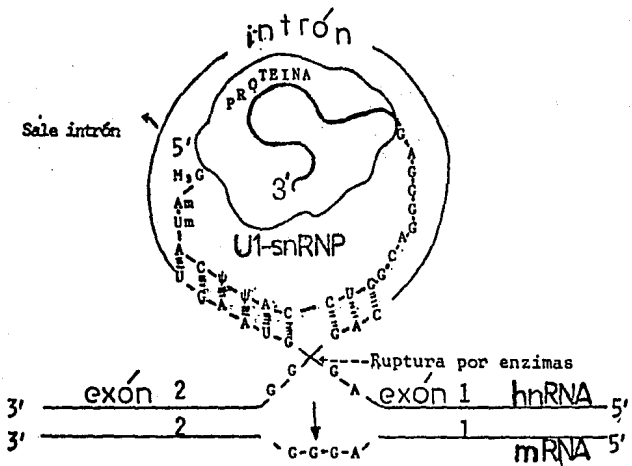
Economidis (1983) describe con respecto a las RNP, que las moléculas nacientes de ARNhn, se en-- samblan tempranamente en grupos con 6 tipos de pro teínas que tienen un peso molecular entre 32,500 y 41,500. Esto también coincide con lo expresado por Georgiev (1974), donde los 6 tipos de proteínas - formarían un núcleo central o "core" y el ARNhn se plegaría en el exterior de estas partículas esféri cas. También Economidis (1983), propone un orden - en el procesamiento del ARNhn, el cual sería: trans cripción y formación del "cap" ----- ensamble de - RNPs ----- poliadenilación ----- y el "splicing".

Un aspecto relevante de las RNP con respecto

al procesamiento del ARNhn, es la asociación de moléculas de ARN de bajo peso molecular (ARNsn) con moléculas de proteínas para integrar las partículas pequeñas de ribonucleoproteínas (RNPsn).

Los ARNsn se descubrieron hace 15 años por Maramatsu (Jiménez-García, 1985); su longitud es entre 100 y 300 nucleótidos; existen al menos 10 tipos diferentes de estas moléculas, 6 de las cuales están bien definidas y tienen un alto contenido de ácido uridílico, por lo que se denominan ARNsn-Us y corresponden del U1 al U6 (Darnell, 1985). Prácticamente se han encontrado en todas las células de eucariontes, son metabólicamente estables y han conservado sus características principales a través de la evolución (Busch, 1982). Actualmente estos 6 tipos de ARNsn-U se pueden localizar por inmunocitoquímica en algunos de los compartimientos de los núcleos en interfase (Busch, 1982). Así, el U-3 se encuentra en el nucléolo, el U-2 se asocia a la cromatina; los U-1, U-2, U-4, U-5 y el U-6, se asocian estrechamente a partículas de ribonucleoproteínas del espacio extranuclear (Spector y col., 1983; Puvion y col., 1984b). La función de estos ARNsn-Us no del todo aclarada, se relaciona tanto con la estructuración de las partículas nucleares con las que se asocian, como con el mismo procesamiento del ARNhn (Busch, 1982).

El ARNsn-U1, aparte de ser el mejor caracterizado y el de mayor concentración en los núcleos celulares, es el que se ha relacionado con una función específica en el procesamiento del ARNhn y es la concerniente al "splicing". Este fenómeno se ejemplifica en el siguiente esquema, interpretado por Jiménez-García y referido de Busch (1982).



En este modelo el asa del intrón es formado - por el ARNsn-U1, el cual mantiene unidos los extre- mos de los exónes adyacentes, para: presentar esta zona, facilitar el rompimiento y reunir de nuevo - los exónes; todo esto es activado por enzimas aún_ desconocidas. Como se observa, algunos nucleótidos del ARNsn-U1 se complementan con los nucleótidos - de la unión exón-intrón para formar el asa o "bu- cle" y poder eliminar el intrón correspondiente. - Según Stevenin y col., (1982) este fenómeno se pre- senta dentro de los grandes "complejos heterogé- - neos", de los cuales se liberan monopartículas las cuales pueden llevar los intrones eliminados.

4) Localización in situ de ribonucleoproteí-- nas extranucleolares.

Los núcleos en interfase a nivel de ultraes- tructura, muestran complejos de ribonucleoproteí-- nas bien definidos. De estos complejos los más co- nocidos y estudiados son los gránulos y fibras que forman el nucleolonema de los nucléolos. Estos, - aparte de estar bien caracterizados morfológicamen- te, tienen gran correlación bioquímica y funcional con respecto a la síntesis y procesamiento del ARN ribosomal (Hay, 1968; Bernhard y Granboulan, 1968). En el resto del núcleo interfásico, a excepción de los complejos condensados de dexosirribonucleopro-

teínas -heterocromatina-, se encuentra el gran espacio intercromatíneo. Esta es una zona no bien definida donde se localiza: la cromatina dispersa, los complejos de RNP extranucleolares, proteínas y otros metabolitos. Todo este conjunto de partículas son difíciles de distinguir y diferenciar entre sí, cuando se utiliza la tinción ordinaria de uranilo-plomo para la microscopía electrónica.

Bernhard (1969) introdujo una técnica en la cual el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en solución, extrae selectivamente el uranilo depositado en los complejos de cromatina compacta que se decolora; posteriormente al agregar sales de plomo resaltan preferentemente las ribonucleoproteínas. Con el mayor uso de esta técnica, se han facilitado los estudios que tienden a explorar la gran área nuclear y sobre todo ayuda a entender la correlación de los aspectos morfológicos con los funcionales en el núcleo interfásico (Monneron y Bernhard, 1969).

De entre los complejos morfológicos de las RNP extranucleolares que se distinguen con la tinción regresiva del EDTA, resaltan: las fibras pericromatinianas, los gránulos pericromatinianos y los gránulos intercromatinianos.

a) FIBRAS PERICROMATINIANAS (FPC) - Estas estructuras del núcleo interfásico, fueron descritas y ca-

racterizadas por Monneron y Bernhard (1969). La definición morfológica de estas fibras solamente es posible cuando se aplica la tinción regresiva del EDTA; se observa que estas se concentran más en el límite de la heterocromatina decolorada y en el espacio pericromatíniano. El grosor promedio de las fibras varían entre los 30 y 40 Å; en ocasiones aparecen enrolladas irregularmente y con alta resolución es posible ver cierta continuidad con estructuras granulares del nucleoplasma (Monneron y Bernhard, 1969; Bouteille y col., 1969).

Con la combinación de métodos citoquímicos, tinción preferencial para RNP y digestión enzimática, se comprueba que estas estructuras contienen ARN. Así, en presencia de las ADNasas no hay modificación alguna de estas fibras, en cambio, con la ARNasa -aún en ausencia de pronasa- dichas estructuras desaparecen. Esto confirma el contenido de ARN, el cual posiblemente esté poco protegido por el material proteico (Monneron y Bernhard, 1969).

Desde las primeras descripciones morfológicas y topográficas de estas fibras, se ha sugerido que tienen relación con la síntesis del ARN. El estar localizadas en la periferia y en frecuente contacto con la cromatina, se ha sugerido que estas representarían la expresión morfológica de la transcripción a lo largo de los sitios activos de nu-

cleohistonas derreprimidas (Monneron y Bernhard, - 1969). La hipótesis anterior ha sido apoyada con - la combinación de los siguientes experimentos: es- timulación o inhibición de la síntesis del ARN, - observación por la radioautografía de la distribu- ción de los precursores marcados y por la caracte- rización bioquímica de los complejos cromatina-RNP extranucleolares.

Al estimular la síntesis del ARN con cortisol en hepatocitos de rata en inanición, se observa un aumento rápido y significativo de las fibras peri- cromatinianas (Petrov y Bernhard, 1971). Con estu- dios bioquímicos previos, se había demostrado el - aumento de la síntesis de pre-ARNm como respuesta_ al mismo tratamiento hormonal (Brossard y Nichole, 1968). Por lo contrario, la disminución de las fi- bras se logra al administrar bloqueadores de la - síntesis y/o del procesamiento del ARN. Entre es- tas sustancias se encuentran: la α amanitina, - que inhibe la actividad de la ARN polimerasa II - (Petrov y Sekeris, 1971); la actinomicina "D" que_ estabiliza la doble helice del ADN (Geuskens y - - Bernhard, 1966; Unuma y col., 1973); la ciclohexi- mida (Daskal y col., 1975; Moyne y col., 1977) y - la bleomicina que remueve la timidina del ADN y - produce fragmentos de cadena simple ("Müller y - Zahn, 1979; Vázquez-Nin y col., 1979a).

La radioautografía combinada con la tinción regresiva del EDTA, muestra a grosso modo dentro del núcleo la localización de las macromoléculas formadas con precursores específicos como la uridina tritiada. Fakan y Bernhard (1971) al trabajar con cultivo de células BSC de riñón de mono, encuentran que a los 2 ó 3 minutos ya hay incorporación del precursor radiactivo preferentemente en dos sitios del núcleo, uno a nivel del nucléolo - en el límite entre la cromatina nucleolar y las fibras del nucleolonema- y el otro localizado en el nucleoplasma en una zona entre la heterocromatina y el mismo espacio pericromatiniano. Aunque la radioautografía tiene una resolución de más de 100 mm, no se puede asegurar que un grano de plata velado señala exactamente la posición de un emisor radiactivo incorporado a una fibra; es la localización precisa de dichos granos en el área pericromatiniana, lo que permite suponer que las fibras pericromatinianas contienen ARN producto directo de la transcripción cuando se utilizan pulsos muy cortos (Fakan y Bernhard, 1971; Moyne y Puvion, 1976). También en este tipo de experimentos, se comprueba que coexiste un aumento casi paralelo tanto del número de las fibras como de la incorporación del marcador. Al post-incubar las mismas células en un medio de cultivo libre del precursor tritiado, se observa la dispersión conjunta tanto

de las fibras como de las marcas radiactivas en el nucleoplasma (Fakan y Bernhard, 1971; Fakan y col. 1976).

Por último, al aislar por centrifugación diferencial las fracciones del material extranucleolar de los núcleos celulares de hepatocitos de ratas, se observa la persistencia del material fibrilar unido a partes de la cromatina (Puvion y col., - - 1976). Al análisis bioquímico, estas fibras aisladas muestran la presencia de ARN polidisperso de marcado rápido y sensible a la ARNasa, características propias del ARNhn (Bachelierie y col., 1975; Puvion y Moyne, 1978). Por otros estudios como los de inmunocitoquímica ultraestructural, se ha logrado localizar en las fibras pericromatinianas moléculas de ARNsn-U, lo que plantea la posibilidad de que estas fibras participen también en el procesamiento del mismo ARNhn (Puvion y col., 1984^b).

En conclusión, con base en las observaciones y resultados experimentales anteriormente expuestos, se puede decir que las fibras pericromatinianas representan la expresión morfológica del ARNhn recién sintetizado.

b) GRANULOS PERICROMATINIANOS (GPC). Estas estructuras fueron descritas por Swifth (1962) y Watson (1962), como cuerpos esféricos individuales, preferentemente localizados en la porción periférica de

la cromatina compacta, de donde se tomó el nombre. Su diámetro varía entre los 30 y 50 nm, con la tinción ordinaria de uranilo plomo presentan un halo periférico de 25 nm que casi desaparece con la tinción selectiva del EDTA, la cual a su vez resalta más el contraste de los gránulos (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Estas partículas no se modifican con la ADNasa, pero la combinación de pronasa y ARNasa disminuye notablemente su contraste con la tinción del EDTA. En presencia del ácido perclórico concentrado y con un tiempo largo de exposición, los GPC llegan a desaparecer. Por lo anterior y por otros estudios citológicos se comprueba en estas partículas, la presencia de ARN incluido y protegido por una matriz proteica voluminosa (Watson y Aldrige, 1964; Monneron y Bernhard, 1969).

Con la tinción regresiva del EDTA y con alta resolución, estos gránulos presentan una subestructura interna formada por fibras empaquetadas, con un diámetro entre los 15 y 30 Å aproximadamente. En ocasiones se observa que algunas fibras emergen de los gránulos dirigiéndose a la cromatina compacta y/o al área pericromatiniana (Monneron y Bernhard, 1969). Por estas observaciones se sugirió la hipótesis de que el ARN de estas partículas procede de las fibras pericromatinianas y por lo tanto contendrían ARNhn (Monneron y Bernhard, 1969; Nash,

y col., 1975; Puvion y Lange, 1980). Esta hipótesis está sustentada en otros estudios experimentales, así al estimular con cortisol la síntesis de ARNhn -en el que aumenta las fibras pericromatinianas- también hay un aumento rápido aunque limitado de los gránulos pericromatinianos (Moyne y Puvion, 1976). Vázquez-Nin y Bernhard (1971), al demostrar la semejanza: estructural, citoquímica y de sensibilidad enzimática entre los gránulos de Balbiani de los cromosomas de Chironomus y los pericromatinianos, indican que ambos gránulos contienen ARN -de marcado rápido y similar a su ADN correspondiente. Bachelierie y col. (1975), al fraccionar material extranucleolar de núcleos de hepatocitos, aislaron -aparte de las fibras- gránulos con un diámetro de 40 a 50 nm, que contienen ARN de marcado rápido.

Sin embargo, con respecto a la estimulación de la síntesis del ARN, no hay una relación precisa entre fibras y gránulos pericromatinianos. El mismo cortisol administrado a los hepatocitos de rata en cultivo, no produce un aumento manifiesto de los gránulos con respecto a las fibras (Petrov y Bernhard, 1971). En otras circunstancias casi de inmediato disminuyen o desaparecen los GPC preexistentes, como al administrar estradiol a las células del epitelio endometrial de ratas ovariectomizadas en cultivo (Vázquez-Nin y col., 1978), algo

semejante sucede a los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (Valkov y Moyne, 1974). En este tipo de experimentos, la falta de paralelismo entre estas partículas de ribonucleoproteínas puede deberse a un segundo efecto post-transcripcional de los estimulantes, que hacen que el transporte de los ARNs sea más rápido que la síntesis de los mismos, lo que hace disminuir el ARN almacenado de los GPC. Si el estímulo persiste, posteriormente hay un aumento gradual de los GPC hasta cierto límite -aumento del 30 al 40% en los hepatocitos de rata- no sucede lo mismo con la incorporación de la uridina tritiada, que llega a ser 3 ó 4 veces más que en los controles. Esto indica que independientemente de que muchas moléculas de ARN no pasan al citoplasma, buena parte del ARN tampoco se incorpora a los gránulos pericromatinianos (Moyne y Puvion, 1976).

Como se mencionó, la administración de drogas que interfieren con el metabolismo del ARN y altera la producción de las fibras pericromatinianas, también modifica la cantidad y distribución de los gránulos pericromatinianos. Así, la amanitina (Petrov y Sekeris, 1971), la cicloheximida (Moyne y col., 1977) y el cloruro de cadmio (Puvion y Lange, 1980) tienen como uno de sus efectos el de aumentar la cantidad de los GPC en el nucleoplasma.

En general, aunque estas drogas bloquean la síntesis de ARN, ésta continúa por cierto tiempo formándose más GPC, y como posiblemente también se interfiere con la dinámica y el transporte del ARN se da lugar a que los gránulos se acumulen progresivamente en los núcleos (Moyne y col., 1977; Puvion y Lange, 1980). Un efecto similar se presenta en el "shock" hipotérmico, en el cual a temperaturas de 4°C se bloquea la síntesis del ARN y disminuyen las fibras pericromatinianas y aumentan los gránulos mencionados (Puvion y col., 1977). Otras drogas como la cardiocepina (Puvion y col., 1976) y la bleomicina (Vázquez-Nin y col., 1979a), también modifican el metabolismo de los ácidos nucleicos, pero a diferencia de las ya mencionadas afectan principalmente los componentes nucleolares. Los cambios ultraestructurales que se suceden por acción de estas substancias, van desde la microsegregación de fibras y gránulos del nucleolonema, hasta su fragmentación. Esta interferencia con el procesamiento post-transcripcional y/o transporte del ARNr, también produce la aparición de gránulos similares a los pericromatinianos en los nucleolos afectados... Estos gránulos también podrían resultar de la acumulación de formas incompletas y/o anormales del ARNr, por estar primariamente afectada esta molécula (Gajkovska y col., 1977).

Actualmente se ha comprobado que los gránulos

pericromatinianos del nucleoplasma, también se relacionan con algunas de las moléculas de los - - - ARNs_n-U (Puvion y col., 1984^b). Sin embargo cuando se forman gránulos por trastornos metabólicos en los nucléolos, la distribución de los ARNs_n-U es diferente, tanto que Puvion y Lange (1980) señalan dos tipos de estos gránulos: los relacionados con el ARN_{hn} y otros con el ARN_r.

Por ser los gránulos pericromatinianos componentes ordinarios de los núcleos en interfase, su función está relacionada con el transporte de ARN. Además, otra función que desempeñarían sería la de almacenar selectivamente al ARN bajo determinadas condiciones fisiológicas y/o patológicas. Por todo lo anteriormente expuesto, se sugiere que los gránulos pericromatinianos, son estructuras dinámicas que desempeñan un papel activo en el metabolismo de los núcleos en interfase.

c) GRANULOS INTERCROMATINEANOS (GIC). Estas partículas descritas por Swifth en 1959, están presentes en casi todos los núcleos celulares, con un diámetro de 20 a 25 nm y frecuentemente se encuentran formando acúmulos en el nucleoplasma (Monneron y Bernhard, 1969). Con la tinción preferencial del EDTA, muestran contraste prominente y parecen estar incluidas en cadenas interconectadas por fibras delgadas, que forman una red fina en el espa-

cio intercromatiniano (Monneron y Bernhard, 1969; Wassef, 1979).

Si bien la reacción de los gránulos intercromatinianos (GIC) es similar a la de las otras partículas ribonucleoproteicas, existen diferencias con respecto a los siguientes estudios: de extracción química, de reacción enzimática y en los de radioautografía. Como las otras partículas de RNP los GIC no son sensibles a la ADNasa, sin embargo y en contra de lo esperado, después de exposiciones largas a la acción de la ARNasa y pronasa, mantienen el mismo contraste con el EDTA; lo mismo sucede con el ácido perclórico que en condiciones óptimas solubiliza y extrae el ARN (Monneron y Bernhard, 1969). Aunque los GIC son pequeños para ser analizados individualmente por la radioautografía, se puede evaluar su marcado sobre los acúmulos que forman en el nucleoplasma. Fakan y Bernhard (1971), no encontraron incorporación significativa de uridina tritiada en áreas con abundantes GIC, aún después de períodos largos de tratamiento. Por todo esto y otros datos experimentales, desde un principio se propuso que el ARN de estas partículas estaba bien protegido aunque difícilmente tuviera ARNhn (Monneron y Bernhard, 1969).

Con base en esto último también se mencionó que dichas partículas no contenían ARN, y que su

reacción positiva a la tinción regresiva del EDTA era dada por las proteínas fosforiladas contenidas en estos gránulos y no por los ácidos nucleicos - (Wassef, 1979). Sin embargo en los últimos años - Puvion y Moyne (1981), al utilizar varios agentes físico-químicos que actúan en diferentes etapas - del metabolismo nuclear del ARN, inducen un aumento en el número y volumen de los gránulos intercromatinianos lo cual indica que sí existe una estrecha relación de estas partículas con el ARN. Recientemente Puvion y col. (1984^a), al trabajar con células aisladas de hígado de rata tratadas con un análogo de la adenosina: 5-6- dicloro-1 - B - D - -ribofuranosil- benzimidazole (DRB sustancia que interfiere con el procesamiento inmediato del ARN) más actinomicina "D" (que inhibe preferentemente - la síntesis de ARNr) y aplicando radioautografía - con uridina tritiada como precursor, logran demostrar que los gránulos intercromatinianos son sitios de acumulación y transferencia de ARN nuclear. Otros estudios en los que se utiliza conjuntamente inmunocitoquímica e inhibidores del ARN como el mismo DRB, muestran que los gránulos intercromatinianos y la matriz nuclear son los sitios donde se localiza la mayor cantidad de ARNs-U, lo que relaciona estas estructuras con el procesamiento del ARNhn (Spector y col., 1983; Puvion y col., 1984^a).

También existen evidencias de que los gránulos intercromatinianos son parte de una matriz proteica o matriz nuclear, que otros inclusive llaman "esqueleto del núcleo" (Comings y Okada, 1976; Miller y col., 1978; Spector y col., 1983). Este componente nuclear no solamente serviría de soporte a los núcleos interfásicos, sino posiblemente también como un sendero para el transporte de productos hacia el citoplasma (Busch, 1977). Al recordar que para el transporte del ARN de marcado rápido es necesario ATP y GTP, y al demostrar actividad de ATPasa y GTPasa en estas partículas, se apoyaría esta última hipótesis (Bauchawlow y Unger, 1977). Por todo lo anterior, estos gránulos en la actualidad se siguen considerando como partículas de ribonucleoproteínas, y con más estudios experimentales se conocerá mejor su función.

5) El nucléolo.

La porción del núcleo que sintetiza cerca del 85 % del ARN celular es el nucléolo, el cual a su vez desempeña un papel esencial en la producción del ARNr. El nucléolo es el producto directo de la transcripción del organizador nucleolar, siendo éste una región de la cromatina que contiene el ADNr y los sitios específicos para la combinación del ARNr con las proteínas nucleolares (Busch, 1977) en las células de eucariotes el número de cístrones para el ARNr varía entre 100 y 1,000 que

que están ordenados de manera lineal. Por acción de la ARN polimerasa I, el producto de la transcripción de cada cistrón es la gran molécula de ARN 45 "S" que a su vez está integrada por una secuencia de 12,000 nucleótidos (Busch, 1977).

Esta molécula gigante corresponde al llamado ARN pre-ribosomal; la cual por una serie de rupturas específicas termina por formar a las dos especies de ARNr: 28 S y 18 S (Busch y Smetana, 1970), la presencia de estos tipos de ARNr, se demostró por hibridación competitiva. Cuando estas variedades de ARNr se combinan para hibridar con la gran molécula de 45 S, estas compiten independientemente lo que indica que hay una molécula de cada especie por cada ARN 45 S. Por otros estudios, se demuestra que en esta molécula gigante hay una polaridad definida; así el 28 S estaría en el final 5' y el 18 S en el final 3', aunque esto puede invertirse según la especie estudiada. Además en la molécula 45 S, existen espaciadores denominados P1, P2 y P3; secuencia de nucleótidos que posiblemente actúen como sitios de reconocimiento para las rupturas específicas, estos son los segmentos que más varían de una especie a otra (Brown y Stern, 1974).

El componente proteico de los nucléolos es complejo y muy numeroso, se cuentan con aproximadamente 200 tipos diferentes de proteínas (Orryck y

...

col., 1973). Busch (1977) las clasifica en tres - grandes grupos: las que regulan el control genético del ADNr como las fosfoproteínas; las que actúan en el metabolismo del ARNr como las polimerasas y endonucleasas; y las estructurales que forman parte de las partículas pre-ribosomales.

El aspecto de los nucléolos puede variar: de ser una masa compacta, a tener nucleolonema, o bien tener la forma de una esfera hueca; esto depende del organismo al que corresponde y a las condiciones fisiopatológicas que las determinan. Sin embargo, a nivel de ultraestructura la morfología general de este componente se expresa principalmente en gránulos y fibras. A parte de la cromatina nucleolar que pudiera estar asociada a estas partículas, dichas estructuras están compuestas por ribonucleoproteínas (Bernhard y Granboulan, 1968; Unuma y col., 1968). Por los estudios realizados con la incorporación de uridina tritiada y los bloqueos metabólicos con drogas específicas ya mencionadas, se comprueba que las fibras de 3 a 4 nm contienen gran parte del pre-ARNr recién sintetizado y que las mismas fibras pudieran ser la expresión morfológica del mismo (Bernhard y Granboulan; - 1968; Busch y Smetana, 1970). Con estudios similares, más el aislamiento bioquímico de fracciones nucleolares, se demuestra que los gránulos con diámetro de 10 a 20 nm, contienen el ARN de 28 S y -

que derivan de las fibras antes mencionadas (Bernhard y Granboulan, 1968). Esta relación tan estrecha entre ultraestructura y composición química es de gran importancia, e indica en cierta forma la armonía que en última instancia existe entre morfología y función.

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

En general se acepta que la diferenciación celular en los organismos superiores, produce como resultado el establecimiento de fenotipos celulares específicos, cuyas características funcionales dependen de la expresión selectiva del genoma. En sí, el proceso de diferenciación y maduración trae consigo cambios metabólicos acentuados, como es la síntesis de proteínas específicas, la cual varía según la etapa del desarrollo y el estado funcional en que se encuentren las células (Scwartz y Wilde, 1973). Estas variaciones tienen como etapa intermedia algunas modificaciones en cuanto a: síntesis, transporte y procesamiento del ARN (Bristow y Deuchar, 1964; Firtel y col., 1972). Por lo tanto, al comparar las poblaciones celulares diferenciadas con células en vías de maduración, se detectan cambios significativos en cuanto a cantidad a tipos de ARN nuclear (Church y Brown, 1972) y posiblemente también en las estructuras nucleares que lo contienen.

En el caso específico del desarrollo del sistema nervioso central, se presenta un modelo completo de diferenciación y maduración celular. Este parte del tubo neural recién ocluido formado por células multipotenciales, de aquí van surgiendo progresivamente diferentes líneas celulares, una -

de estas líneas origina a las neuronas multipolares. Durante este proceso las células tienen interacciones múltiples con su microambiente, el cual directa o indirectamente regula la expresión del genoma y por lo tanto contribuye a la maduración de las mismas. Algunas de las modificaciones que surgen de esto último, son lo suficientemente aparentes para ser detectadas como cambios morfológicos. Con base en esto, durante la maduración de los neuroblastos, se presentan etapas definidas que han sido descritas e identificadas como de: células matrices, neuroblastos monopolares, bipolares y neuronas multipolares.

Dentro de este mismo proceso, pero a nivel de ultraestructura y composición molecular, se considera que en última instancia los complejos de ribonucleoproteínas son el resultado de la expresión génica. Por lo tanto, al variar ésta se presume que también se modifica la presencia y concentración de las diferentes partículas ribonucleoproteícas. Los estudios cualitativos y cuantitativos que se han realizado de estas partículas, han sido principalmente en células diferenciadas, ya sea comparándolas en diferentes estados fisiológicos o con otros tipos celulares (Petrov y Bernhard, 1971; Valkov y Moyne, 1974).

Por todo esto, este estudio tiene como objetí

vo-utilizando como modelo células de embrión de pollo- cuantificar con métodos estereológicos y estadísticos las variaciones que pudieran presentar las partículas ribonucleoproteicas in situ, durante la diferenciación y maduración de los neuroblastos-neuronas. Como el fenómeno de la expresión genica implica fundamentalmente la transcripción del ARN, y por lo tanto la capacidad matriz de la cromatina para esta actividad; otro de los objetivos es detectar los cambios de concentración de la cromatina concentrada o heterocromatina; puesto que las variaciones estructurales de la cromatina han sido relacionadas por varios autores, con la capacidad de la misma de servir de matriz para la síntesis de ARN (Littau y col., 1964); esta síntesis se lleva a cabo preferentemente sobre la cromatina laxa o eucromatina.

MATERIALES Y METODOS.

El material biológico consistió de embriones de pollo (Brown Leghorn) de: dos, cuatro, nueve, doce y veintiún días de incubación. Las muestras se tomaron preferentemente de la mitad ventral de la región cervical de la médula espinal de estos animales. En los embriones de 2 y 4 días, la fijación se realizó por inmersión; primero por goteo del fijador sobre el blastodisco por 15 minutos, para después extraer los embriones en bloque y hacer las disecciones correspondientes; posteriormente los fragmentos se dejaron en una nueva solución de fijador durante 2 horas. Los embriones de: 9, 13 y 21 días, previa incisión del torax y sección de la aurícula derecha, se perfundieron por el ventrículo izquierdo por medio de una llave de dos vías. Las substancias perfundidas se mantuvieron a 36 C y fueron: una solución de Ringer isotónica, que se pasó hasta que saliera por la aurícula derecha hasta eliminar la sangre del sistema vascular; la segunda, fué la solución fijadora que se perfundió hasta que se endurecieran los tejidos, aproximadamente a los 20 minutos. Para terminar, se disecó la médula cervical y se colocaron los fragmentos en una nueva solución de fijador durante dos horas y media.

La solución fijadora utilizada fué glutaral-

dehido (Merck, según Anderson) al 2.5 % diluido en cacodilato de sodio 0.19 M. (solución amortiguadora) y a un pH de 7.3. Algunas muestras se postfijaron en tetraóxido de osmio al 2 % durante una hora. Después de la fijación, los fragmentos de tejido sin tetraóxido de osmio e inmersos en solución amortiguadora, fueron separados en dos grupos. Un primer grupo se procesó con la finalidad de ser incluido en glicol metacrilato polimerizado (GMA); el segundo grupo de fragmentos quedó para incluirse en EPON 812 y para esto se procedió como a continuación se describe.

Previo lavado de los tejidos con el amortiguador, se prosiguió con la deshidratación en alcohol etílico a concentraciones crecientes.

Dos baños de 10 minutos en alcoholes de: 70, 80, 90 y 96 %.

Dos baños de 20 minutos en alcohol absoluto.

Dos baños de 20 minutos en óxido de propileno.

La pre-inclusión fue en una mezcla con la mitad de óxido de propileno y la otra mitad con la mezcla propia de inclusión, durante 18 horas a la temperatura ambiente.

Las muestras se incluyeron en una mezcla de EPON 812, cuya fórmula es la siguiente:

Epikote (Merck) ----- 10.3 g.

Anhídrido dodecenil succínico (DDSA)- 9.3 g.

Anhídrido 2,3,- metilnorbornendicar-	
noxílico (NMA) -----	3.8 g.
2,4,6, Tris (Dimetilaminometil	
fenol) (DMP) -----	.33 ml.

La polimerización se hizo en moldes planos - que se dejaron en una estufa a 60 C por 18 horas.- El material fue cortado en los ultramicrotomos - - MT-1 de la casa Sorval y en el Ultratome I- LKB.

Después de comprobar que los tejidos inclui-- dos en bloques de EPON estaban bien preservados, - se procedió a cortarlos en el siguiente orden; pri-- mero se obtuvieron cortes semifinos de 0.5 μ m de - espesor, que se tiñeron con azul de toluidina al - 1% disuelto en agua con borax al 1%, para después - observarlos al microscopio fotónico y determinar - con precisión la región por estudiar. Después se - cortaron de 6 a 8 secciones ultrafinas seriadas en - tre 80 y 100 nm de espesor, que se montaron juntas en rejillas de cobre ranuradas con membrana de Fom - var, los cortes quedaron libres en el centro de - las rejillas. Posteriormente se hicieron series de 25 cortes semifinos, los cuales se desecharon para continuar otra serie de cortes ultrafinos en el - orden antes mencionado.

Los cortes ultrafinos de 80 a 100 nm de espe- sor montados en rejillas de ranura, fueron teñidos según la técnica de Bernhard (1969) modificada:

- 5 minutos en acetato de uranilo al 3 %.
- De 12 a 23 minutos en una solución acuosa del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.2M
- 3 minutos en citrato de plomo al 0.3 N.

Los tejidos postfijados en tetraóxido de osmio, se deshidrataron e incluyeron igual que los fragmentos antes mencionados. Se cortaron en los mismos ultramicrotomos y se montaron en rejillas de 400 barrotes por pulgada, y se contrastaron de la siguiente forma:

- 20 minutos en acetato de uranilo al 3 %.
- 5 minutos en citrato de plomo al 0.3 N.

Las observaciones de los cortes ultrafinos, se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión EM-9 A de la casa Zeiss. Después de identificar el núcleo de la misma célula en cada uno de los cortes seriados, se procedió a fotografíarlos en cada uno de los cortes. Para los especímenes de 2 días de incubación, los núcleos escogidos fueron: los que rodeaban la luz del tubo neural (periependimarios) y los núcleos de las zonas periféricas (periféricos). Para los de 4 días se escogieron: los del área periependimaria; una zona intermedia que sería la 4a. ó 5a. fila de núcleos a partir de la luz del tubo; y por último el área correspondiente a la futura asta anterior. Con respecto a las muestras de 9, 13 y 12 días, se foto--

grafieron los núcleos de las neuronas inmaduras localizadas en el asta anterior. Después de revelar los negativos e imprimirlos en papel, se obtuvieron las fotografías a un aumento constante de 29,400 diámetros. De esta manera, por cada núcleo observado se obtuvieron un promedio de 6 micrográficas, y por cada área o zona escogida, se estudiaron en promedio 12 núcleos.

Los cortes postfijados en osmio y contrastados con uranilo-plomo, también fueron observados con el mismo microscopio electrónico. Las micrográficas se obtuvieron a diferentes aumentos, lo que dependió de los campos por estudiar desde un punto de vista cualitativo.

Los parámetros que se estudiaron y los métodos estereológicos utilizados para determinar las variaciones cuantitativas de los núcleos durante su diferenciación y maduración, fueron los siguientes:

- Los volúmenes nuclear y nucleolar, se determinaron en los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se observaron con un microscopio óptico "Axiomat" (Carl Zeiss), con placa de escala micrométrica para medición. Los datos obtenidos se procesaron de acuerdo a la ecuación de De Hoff, para esferas y elipses con una orientación preferencial según los casos. Para estimar la fracción del volu

men nuclear ocupada por el nucléolo, se hizo el promedio de la relación de las áreas nucleolar sobre la nuclear.

- La fracción del área nuclear ocupada por las fibras pericromatinianas y los gránulos intercromatinianos. Para estas estimaciones se utilizó la cuenta de puntos de una retícula, que coincidiera con los gránulos y fibras divididos por el número total de puntos que contenía el área de cada núcleo. Todas estas estimaciones se fundamentan en métodos estereológicos bien conocidos (Underwood, 1970).

- La densidad numérica de los gránulos pericromatinianos, se estimó al contar el número total en cada foto y se dividió por el área nuclear en la que se había contado.

- Los diámetros de los gránulos pericromatinianos, se midieron en micrografías obtenidas a 15,000 aumentos y amplificadas a un aumento final de 150,000 diámetros.

Con respecto al otro grupo de fragmentos de tejidos de la médula espinal de los mismos embriones y que no se incluyeron en Epon, fueron procesados en el orden que a continuación se describe, con la finalidad de que quedaran incluidos en el 2-hidroxi-etil-metacrilato (denominado también glicol-metacrilato o GMA) y poder contrastar preferentemente la cromatina compacta. A partir del lavado

con el amortiguador correspondiente se continuó con la deshidratación progresiva para la que se usaron concentraciones crecientes del glicol-metacrilato (GMA), diluido en agua bidestilada.

- 2 baños de 10 minutos cada uno de GMA al 70, 80 y 97 %.
- Un baño de 20 minutos de una mezcla 1:1 de GMA al 97 % y con la solución de inclusión no polimerizada.
- Un baño de 20 minutos con la solución de inclusión no polimerizada.

La solución de inclusión es una mezcla de las siguientes sustancias:

- GMA al 97 % ----- 7 ml.
 - Butil-metacrilato ----- 2 ml.
 - Peróxido-Benzoico ----- 100 mg.
- (Leduc y Bernhard, 1967).

Se prosiguió con la pre-inclusión, en la cual los tejidos se dejaron 12 horas en la solución de inclusión, la cual previamente se prepolimerizó con calor regulado obtenido de agua caliente (baño maría).

La inclusión se realizó en la solución prepolimerizada, en cápsulas transparentes de gelatina y colocadas en una cámara cerrada con una fuente de luz ultravioleta. La exposición en esta fuente

de energía se prolongó durante 6 días en promedio, hasta el endurecimiento del material.

Los cortes ultrafinos de 80 a 100 nm de espesor, se efectuaron en los ultramicrotomos antes mencionados. Se escogieron las mismas zonas de la médula espinal en desarrollo ya mencionadas y se montaron en rejillas de 400 barrotes por pulgada.

La técnica de tinción para estos cortes, fue la del ácido fosfotúngstico (PTA), desarrollada por Vázquez-Nin y col. en 1973, la cual resalta las desoxirribonucleoproteínas.

La solución del ácido fosfotúngstico al 3 % para la tinción del PTA, es:

- Acido fosfotúngstico	-----	3 g.
- Acido clorhídrico	-----	10 ml.
- Agua bidestilada	-----	90 ml.

Esta solución se ajustó a un pH de 2.4 NaOH, el tiempo de exposición de los cortes montados fue de 24 a 30 minutos.

Las observaciones con el microscopio electrónico EM-9 A de Carl Zeiss, se centraron en las mismas zonas de la médula espinal que se utilizaron para el estudio de las ribonucleoproteínas descrito anteriormente. De cada región estudiada se fotografiaron un promedio de 15 núcleos, el aumento original dado por el aparato fue de 8,400 y la am-

pliación final en el papel impreso fué de 29,400 -
diámetros.

Para medir la cantidad de cromatina compacta_ por núcleo, se realizó la sumatoria de todas las - subáreas ocupadas por dicha cromatina, ya que es- - tas fueron delimitadas con el cursor de un digita- - lizador unido a una computadora Hewlett-Packard, - que integra áreas. Después se midió el área nuclear y se obtuvo el cociente de esta cromatina entre el área nuclear total. Esto da un número relativo de_ la cantidad de cromatina compacta en cada uno de - los núcleos analizados, que en promedio sumaron 16 núcleos para cada una de las zonas estudiadas (epen- - dimaria y periférica de 2 días; ependimaria, inter- - media y periférica de 4 días; motoneuronas de as- - tas anteriores de 9, 13 y 21 días).

Por último, para determinar las posibles va- - rriaciones de la cantidad de ADN de las células en- - estudio, se practicó la reacción de Feulgen. Para esto, los cortes semifinos montados en portaobje- - tos se sumergieron en las siguientes soluciones:

HCl 5N ----- 1 hora a temperatura ambiente.

Reactivo de Shiff -- " " " " "

Baño sulfuroso ---- 3 enjuagues de 1 minuto.

Posteriormente se fotografiaron unos 17 nú- - cleos en promedio de las mismas zonas anteriormente mencionadas, con un fotomicroscopio Amplival Carl

Zeiss (Jena), con película de alto contraste y filtro verde.

Para obtener la cantidad de ADN por núcleo, los negativos se analizaron en un densitómetro integrador de alta precisión IPM-2 Carl Zeiss. A su vez, la transmitancia de cada núcleo examinado, se integró en el volumen calculado por los diámetros mayor, menor y espesor del corte; de esta forma las cifras obtenidas corresponden a la cantidad de ADN expresada en unidades arbitrarias. Para comparar esa cantidad con la de una célula diploide normal de pollo, se midieron varias placas de anafase de células matrices en división.

Los programas para determinar tanto las variaciones de cromatina compacta como la cantidad de ADN, fueron generados por el personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM; utilizando una microcomputadora 9825T (Hewlett - Packard) provista de digitalizador, graficador y unidad de disco.

RESULTADOS.

I. MORFOLOGIA.

En los cortes semifinos de embriones con dos días de incubación, teñidos con azul de toluidina y observados con el microscopio fotónico ya se distingue la separación entre el tubo neural y el ectodermo superficial. En esta etapa la luz del tubo es una hendidura orientada en sentido dorso ventral, rodeada por una gruesa pared celular (Fig. 1a.). Hacia la luz del tubo se observan células en mitosis, (Cajal, 1909-1911), que funcionalmente se comportan como células matrices (Fujita y Fujita, 1963). El resto de la pared, está integrado por un epitelio con células fusiformes de eje mayor perpendicular a la luz del tubo, los extremos de dichas células por un lado tocan la luz del tubo y por otro su membrana basal; esta estructura limita y separa el neuro epitelio del tubo, del mesénquima que le rodea. En esta etapa, aunque se han descrito algunos tipos celulares, se considera actualmente que estas células son funcionalmente matrices (Fujita, 1964). La diversidad de formas, puede deberse a las adaptaciones que presentan estas células durante las diferentes etapas de sus ciclos celulares.

Las observaciones con el microscopio electró-

nico se centraron en los núcleos celulares (Fig. - 1 b), Los cuales son ovoídes y muy juntos unos con respecto a otros, debido a la escasa cantidad de - citoplasma que los separa. Contrastados con la tin - ción del EDTA, que es preferencial para ribonucleo - proteínas (Bernhard, 1969), los núcleos presentan - gran cantidad de partículas de ribonucleoproteínas. Las estructuras observadas son principalmente del - tipo de fibras y gránulos pequeños, distribuidas - irregularmente que llena buena parte del espacio - intercromatíniano. Estos elementos se mezclan en - tre sí, sin llegar a formar grandes acúmulos. Con la tinción del EDTA resalta la ausencia de grandes áreas de cromatina decolorada, por lo que se supone que buena parte de la cromatina está en fase ex - tendida; también es notable la baja frecuencia de - los gránulos pericromatínianos en estos núcleos.

Los núcleos son generalmente voluminosos, tal como se observan en la figura 1 b, esto coincidiendo con lo observado en el microscopio óptico. Su - aspecto es compacto, con escasas áreas claras y - sin que se desarrolle bien el nucleolonema. Con - respecto a las partículas fibrilares y granulares - de los nucléolos, no se aprecian diferencias en - cuanto a su distribución o a que predomine alguna - de ellas, más bien están mezcladas. Los límites no son precisos, ya que el material nucleolar frecuen - temente se continúa con las ribonucleoproteínas ex -

tranucleolares y éstas a su vez pueden continuarse hasta la envoltura nuclear.

No se observan diferencias notables entre los núcleos periependimarios y los periféricos. Solamente se aprecia que en los primeros los acúmulos de ribonucleoproteínas están más concentrados, en cambio en los periféricos la distribución de la RNP es más homogénea y difusa.

También se observaron los embriones de 2 días de incubación con la técnica del ácido fosfotúngstico (PTA) que resalta preferentemente la cromatina (Vázquez-Nin y col., 1973). En general, en estos núcleos se observan acúmulos discretos de cromatina compacta, localizados de preferencia en la periferia de los mismos y cerca de los nucleólos decolorados. El resto del nucleoplasma, está ocupado por redes finas de fibrillas ligeramente positivas a la reacción del PTA (Figura 2). La disposición de la cromatina es semejante en las dos poblaciones celulares estudiadas en esta etapa.

En los embriones de 4 días de incubación, la médula cervical muestra la luz ependimaria todavía alargada, pero más reducida con respecto a su pared (Figura 3 a). En la población celular de la región ventral, se distinguen 3 áreas determinadas por la posición y el aspecto morfológico de las células que las constituyen (Fig. 3 a). Con respecto

a la primera zona -periependimaria-, las células son pequeñas, ovoides, con citoplasma pálido, núcleos claros con nucléolos prominentes que alternan con células en mitosis. El área intermedia está ocupada principalmente por los neuroblastos bipolares; los cuales presentan aspecto fusiforme, núcleos ovoides con nucléolos muy aparentes y basofilia citoplásmica muy marcada y difusa; la orientación de estas células es perpendicular a la luz ependimaria. En la zona más periférica y ventrolateral, los neuroblastos son: de mayor tamaño, de forma ovoide o poligonal, su citoplasma con basofilia intensa y difusa, núcleos más grandes y con nucléolos prominentes. Este último conglomerado de células corresponde a los neuroblastos multipolares, que conforme van madurando se transforman en las neuronas motoras del asta anterior. También hay que hacer notar que en esta etapa de 4 días de incubación, se tiene un panorama general de la diferenciación y desarrollo de esta línea celular, puesto que coexisten en ella las células matrices indiferenciadas periependimarias, los neuroblastos bipolares que han perdido la capacidad de dividirse y los primeros neuroblastos multipolares que son más diferenciados. La médula espinal en este período, está rodeada por una franja estrecha, pálida y de aspecto fibrilar, que corresponde al velo marginal, futura substancia blanca.

La ultraestructura de los núcleos de las células matriciales y los neuroblastos bipolares, no difiere en mucho a la de los de la etapa anterior, sobre todo en lo referente a la estructura, abundancia y disposición de las ribonucleoproteínas. Como se observa en la figura 3 b, los núcleos celulares presentan abundantes partículas de RNP, predominando las fibras sobre los gránulos. Esto indica que prosigue un alto ritmo de transcripción, expresado por el gran número de ribonucleoproteínas que si bien, no tienen la localización típica pericromatiniana, ocupa gran parte del volumen nuclear. Los neuroblastos más periféricos se distinguen de los bipolares, por el mayor tamaño del núcleo, más dispersión de las ribonucleoproteínas y mayor número de gránulos pericromatinianos.

El nucléolo disminuye de tamaño, decrece también la relación del volumen nucleolar con respecto al del núcleo que lo contiene, esto sobre todo en los neuroblastos más periféricos. Conforme estas células van madurando, los nucléolos tienden a presentarse con el nucleolonema más aparente y con límites mejor definidos (Fig. 3 b).

Al aplicar a los núcleos celulares de este período la tinción del PTA para observar la disposición de la cromatina, se distinguen algunos cambios importantes. Las células periepéndimarias pre

sentan grumos discretos de cromatina, pero en menor cantidad que los núcleos correspondientes a los 2 días de incubación, su disposición es preferentemente en la periferia y alrededor del nucléolo. Conforme se estudian los núcleos de las capas intermedias y periféricas, se observa que disminuye progresivamente la proporción de la cromatina compacta, lo que hace que predominen en el nucleoplasma los filamentos finos que integran redes difusas asociadas a fibras ligeramente positivas a la reacción del PTA (Figura 4). En los núcleos de los neuroblastos periféricos, existe una que otra masa de cromatina compacta generalmente asociada al nucléolo.

A los 9 días de incubación, la médula cervical de estos embriones muestra cambios acentuados. El conducto del epéndimo es casi circular, están rodeados por células pequeñas, con núcleo obscuro, sin figuras de mitosis y que en conjunto ya integran un epitelio cilíndrico (Figura 5 a). Las neuronas de las astas anteriores son grandes y basófilas, con núcleos pálidos y voluminosos y nucléolos pequeños para el tamaño nuclear. El espacio que se para las neuronas es pequeño, por eso, esta zona resalta como un conglomerado muy celular. A su vez, la substancia blanca aún amielínica, rodea completamente la médula, entre sus fibras se distinguen células pequeñas, de escaso citoplasma, con núcleos

condensados y que corresponden a las primeras células de neuroglia. En esta etapa las células matrices han dejado de producir neuroblastos, transformándose en un epitelio simple de revestimiento - - (epitelio epindimario). En cambio, las neuronas del asta anterior están en vías de maduración, tanto en el aspecto morfológica como en el funcional, puesto que ya han tenido contacto con sus tejidos efectores y han realizado sinapsis aferentes con fibras nerviosas.

Por lo tanto, también los cambios ultraestructurales serán tan acentuados como los morfológicos antes mencionados. Así, se observa que los núcleos de las motoneuronas en este período son voluminosos, este aumento de tamaño se debe a una mayor cantidad de nucleoplasma, el cual dispersa todavía más el material nuclear. La distribución de las partículas de ribonucleoproteínas varía con respecto a las etapas anteriores. Las fibras pericromatinianas están más segregadas de los gránulos, tienden a rodear grandes zonas de nucleoplasma o bien, a reunirse en islotes irregulares dentro del mismo núcleo (Figura 5 b). Gran número de gránulos inter cromatinianos tienden a agruparse en acúmulos, generalmente localizados en el centro de los núcleos (Figura 5 b), aunque parte de ellos están dispuestos en el nucleoplasma junto con las fibras. Los gránulos pericromatinianos son muchos más numero-

sos que en las etapas anteriores, su distribución es irregular, aunque frecuentemente se observan en acúmulos de 3 a 5 gránulos, sin una localización precisa en el nucleoplasma (Figura 5 b). Un hallazgo notable en los núcleos de estos neuroblastos inmaduros, es la presencia de gránulos pericromatinianos en estrecha relación con el borde de algunos nucléolos, en que dan la impresión de que emergieran de este organelo.

En los núcleos de estas neuronas inmaduras y de las etapas siguientes, es difícil observar grandes masas de cromatina compacta. En parte a esto se debe el aumento del nucleoplasma, puesto que los segmentos extendidos ocupan mucho más espacio. También la disminución de la cromatina condensada, da lugar a la distribución irregular de las partículas de RNP, se observan gránulos y fibras pericromatinianas lejos de los acúmulos de cromatina compacta. Aún con la tinción del PTA, casi no se distinguen los acúmulos de cromatina compacta, predominan cada vez más las redes laxas de filamentos finos dispersos en todo el nucleoplasma.

En los embriones de 13 días de incubación, las neuronas de las astas anteriores de la médula cervical, muestran un mayor desarrollo. Así, en los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, las neuronas son más voluminosas y su citoplasma presenta intensa basofilia difusa. Los núcleos de

estas neuronas son grandes y contrastan con el citoplasma por su claridad debido a su mayor contenido de cariolinfa. El espacio que separa a las neuronas -el neuropilo-, es más amplio y se presenta como una zona fibrilar difusa. El gran desarrollo de este espacio, indica un mayor crecimiento de los axones y las dendritas, lo mismo que la penetración de fibras nerviosas de otros segmentos. Además en el neuropilo de estos embriones, se observa un mayor número de células gliales y de pequeños vasos sanguíneos que en los embriones de 9 días. A nivel ultraestructural, se mantiene el mismo patrón de organización de la etapa anterior.

Las observaciones con microscopio fotónico de los cortes de los pollos recién nacidos -21 días- muestran que la médula cervical ya presenta el patrón general de organización de los animales adultos. En los cuerpos neuronales de las astas anteriores, se distinguen los típicos grumos de Nissl distribuidos uniformemente en el citoplasma. La presencia de estas estructuras, que están formadas por grandes acúmulos de ribosomas, indica una alta velocidad de síntesis proteica para uso intracelular. En correspondencia con esto último, los núcleos celulares son grandes, con abundante cariolinfa y casi sin gránulos visibles de cromatina. El nucléolo es único, grande, esférico y muy basófilo. El neuropilo es más amplio, con grandes va-

sos sanguíneos y rodeados por más tejido conjuntivo perivascular. En cuanto a la substancia blanca, esta es más extensa y resalta un gran número de fibras mielinizadas. Las fibras mielínicas están localizadas preferentemente en las áreas periféricas, se observan en los cortes transversales como anillos teñidos intensamente por el azul de toluidina.

En las micrografías de los núcleos de neuronas pertenecientes a los pollos recién nacidos y teñidos con el EDTA, se distingue el gran aumento del volumen nuclear con mayor dispersión de las partículas ribonucleoproteicas. Las fibras y los gránulos se observan mezclados formando pequeños grupos interconectados, que rodean áreas irregulares de nucleoplasma (Figura 6). En la mayoría de estos núcleos existe un gran acúmulo de gránulos intercromatinianos, que es irregular y tiende a localizarse en el centro de los núcleos. También se aprecia que la cantidad de gránulos pericromatinianos es mayor, en comparación con todas las etapas anteriores. Frecuentemente la envoltura nuclear presenta pliegues irregulares, algunos de los cuales forman invaginaciones profundas en el interior del núcleo, algunas de estas invaginaciones se relacionan con el nucléolo.

Por último, la reacción del PTA en estos núcleos es apenas positiva, por la disposición misma

de la cromatina semicompacta, la cual está organizada en la red fina aún más dispersa que en las etapas anteriores. Tanto que los límites de los núcleos apenas son perceptibles por la falta de grandes masas de cromatina compacta en esa zona. Los pocos acúmulos de cromatina compacta que persisten, se observan cerca de los nucleólos o libres en el nucleoplasma.

II. ESTEREOLOGIA.

El análisis cuantitativo del volumen nuclear y nucleolar durante la diferenciación de las células matrices en neuroblastos-neuronas y la maduración de estas últimas, se realizó en los cortes semifinos de las médulas espinales de los embriones, teñidos con azul de toluidina y observados con microscopio fotónico a 3,200 aumentos.

Al observar el histograma de la figura 7, se aprecian cambios en el volumen de los núcleos durante los diferentes días del período de incubación. A los 2 días, los núcleos celulares de las dos capas estudiadas, no muestran entre sí diferencias manifiestas de su volumen. En esta etapa la mayoría de las células son matrices y por lo tanto guardan un mismo estado funcional. A los 4 días, es donde se define la secuencia de maduración en la línea de los neuroblastos. Al partir de las células matrices orientadas hacia el epéndimo (4 E), seguiría la capa intermedia con células matrices y neuroblastos bipolares (4 I), para terminar con los neuroblastos multipolares en la periferia de las astas anteriores. Considerando estas etapas, se observa un aumento progresivo del volumen nuclear, este es de menor tamaño en las células periependimarias (4 E), y como un 25% mayor en los neuroblastos de la capa periférica (4 P). Sin em--

bargo, estos cambios de volumen nuclear no son bien definidos, puesto que la desviación estándar se imbrinca en estos grupos.

Entre el cuarto y noveno día de incubación, se presenta un aumento notable del volumen de los núcleos, que es de menos de $120 \mu\text{m}^3$ hasta el cuarto día, llegan a un promedio de $250 \mu\text{m}^3$ al noveno día (Figura 7). Durante este lapso, estas células experimentan grandes cambios por estar interactuando activamente con el medio que les rodea. Así, progresivamente se inicia la invasión del mesénquima, se van estableciendo los primeros contactos sinápticos aferentes, los axones toman contacto con sus tejidos y órganos efectores y se forman las primeras células gliales. Por todos estos cambios, los neuroblastos de estos primeros días pasan a ser neuronas en vías de maduración. Posteriormente, esta maduración progresiva de las neuronas determina un aumento de volumen nuclear también progresivo, tal como se observa durante los días 13 y 21 (Figura 7).

Los cambios del volumen nucleolar, están expresados en la gráfica de la figura 8. Como se observa, el volumen nucleolar muestra dos máximas; una corresponde a las células matrices de embriones de 2 días y la otra a motoneuronas del pollo recién nacido. En el primer caso, son células matrices con ciclos celulares muy acelerados para du

plicar en corto tiempo su citoplasma, necesitando una síntesis de proteínas alta, ribosomas y el concomitante aumento de los nucléolos. En el último caso, las motoneuronas necesitan lo mismo para aumentar su volumen indispensable durante el desarrollo. Sin embargo, independientemente de estas variaciones del volumen nucleolar, hay diferencias notables al comparar las relaciones nucléolo/núcleo (Figura 9). Así, se distingue que los nucléolos ocupan una fracción grande del volumen nuclear en las células matrices y por lo contrario, ocupan una fracción mínima en las motoneuronas en vías de maduración.

Las pequeñas partículas de ribonucleoproteínas, como las fibras pericromatíneas y los gránulos intercromatinianos, fueron cuantificadas directamente en las micrografías tomadas y amplificadas en aumentos constantes. La concentración de las fibras pericromatinianas (Figura 10), varía significativamente al comparar las células matrices y neuroblastos -2 y 4 días- con las neuronas en vías de maduración -9, 13 y 21 días-. Durante las primeras etapas en que estas células son más indiferenciadas, la concentración de las fibras es estadísticamente elevada, coincide alrededor del 50% del total de cruces en la cuadrícula. Indicando con esto un alto ritmo de transcripción de ARN por unidad de volumen, fenómeno indispensable para duplicar el -

tamaño celular, como en el caso de los ciclos celulares acelerados que presentan las células matrices, o bien, para aumentar el protoplasma de los neuroblastos. En cambio, en las neuronas inmaduras de los tres últimos días registrados, la concentración de las fibras disminuye aproximadamente al 30%, lo que coincide con un aumento notable de las áreas claras en los núcleos de estas células.

Los gránulos intercromatinianos, son las partículas ribonucleoproteicas que menos variaciones presentan en cuanto a su concentración en el nucleoplasma, puesto que no se encontraron diferencias significativas en los distintos grupos estudiados.

La frecuencia de los gránulos pericromatinianos está expresada en el histograma de la figura 11. Durante la etapa de células matrices -ependimaria de 2 y 4 días de incubación- la presencia de estas partículas en el nucleoplasma es mínima. Sin embargo, en las áreas donde se encuentran los neuroblastos más diferenciados, o sea los periféricos -2P y 4P- hay un discreto aumento del número de estos gránulos. Pero es en el lapso comprendido entre los 4 y los 9 días, donde la frecuencia de los gránulos pericromatinianos aumenta notablemente (Figura 11). Este cambio en el número de gránulos, coincide con el aumento del volumen nuclear, en un período de tiempo donde los neuroblastos están in-

teraccionando activamente con el microambiente que les rodea, para proseguir como neuronas en vías de maduración. Posteriormente a los 13 y 31 días del desarrollo, el número de estos gránulos se incrementa progresivamente junto con el volumen nuclear y la maduración funcional de estas neuronas.

Al observar que en ocasiones los gránulos pericromatinianos se encontraban aislados o formando nequeños acúmulos, ya sea en el nucleoplasma o cerca del nucléolo, se estudiaron las posibles diferencias de tamaño que pudieran tener estas partículas en las diferentes zonas antes mencionadas y durante el desarrollo. Las mismas micrografías tomadas en núcleos a los 4, 9, 13 y 21 días de incubación, se amplificaron a un aumento final de 150,000. Posteriormente se midió el diámetro de los gránulos, bien que estuvieran aislados (PA), en grupos (PG), o cerca del nucléolo (PN); también en este estudio se incluyeron los gránulos intercromatinianos. En los resultados obtenidos (Figura 12), no se observan diferencias importantes entre los gránulos pericromatinianos en sus diferentes localizaciones estudiadas o durante el desarrollo. En cambio, sí hay diferencias significativas entre los pericromatinianos y los intercromatinianos (Figura 12).

Como los gránulos pericromatinianos frecuente

mente se acumulan en pequeños grupos en el nucleoplasma, se realizó un análisis de varianza del tamaño de estos gránulos en grupos diferentes en embriones de 9 y 13 días (Figura 13). La varianza de los diámetros dentro de cada grupo, fué comparada con la varianza de los diámetros entre los grupos. En 55 gránulos reunidos en 27 grupos de secciones no adyacentes pertenecientes a neuronas inmaduras en embriones de 9 días, la varianza entre los grupos (227.5) se encontró 4.7 veces más alta que la varianza residual de los grupos (48). La probabilidad de que estas diferencias ocurran por casualidad es de $P < 0.001$. También se obtuvieron diferencias significativas entre grupos de los mismos cortes.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Varianza	Razón de varianzas.
Diferentes grupos de GPC	5915.6	26	227.5	4.74+++
Error	2658.7	55	48	
Total	8574.3	81		

Análisis de varianza de los diámetros de los gránulos pericromatinianos (GPC), dispuestos en diferentes grupos en los núcleos de neuronas inmaduras de la médula espinal del embrión de pollo de 9 días de incubación ($p < 0.001$).

En la gráfica combinada de la figura 14, las barras oscuras representan el volumen relativo ocupado por el conjunto de las ribonucleoproteínas, esto es válido sólo para propósitos meramente comparativos. En las zonas y etapas donde predominan las células matrices y neuroblastos inmaduros de 2 E y 4 E, la cantidad de RNP se mantiene más o menos constante; pero en el momento en que la diferenciación y la maduración son manifiestas - a partir de 4 P-, la cantidad de ribonucleoproteínas aumenta progresivamente. En cambio, independientemente de la cantidad total de estas partículas la concentración relativa de las mismas disminuye de las etapas de neuroblastos a neuronas inmaduras. -

En la figura 14, las barras blancas representan la concentración que se expresa en las fracciones del volumen total. Esta parte de la gráfica nos indica el gran efecto de dilución por aumento del nucleoplasma, que se va presentando conforme maduran las motoneuronas del asta anterior.

En el histograma de la figura 15, se muestran las mediciones obtenidas de las fracciones del espacio nuclear ocupado por la cromatina compacta, cuando los cortes finos se tiñeron con el ácido fosfotúngstico. Como se observa, la concentración de esta cromatina disminuye continuamente desde el segundo hasta el último día estudiado. Donde se distingue mejor esta secuencia progresiva de la descompactación de la cromatina, es entre el cuarto y el noveno día del período de incubación. Precisamente en el lapso donde se transforman las células matrices indiferenciadas (4 E) en neuroblastos bipolares (4 I) y estos en multipolares (4 P), para terminar en las neuronas inmaduras del asta anterior en embriones de 9 días (Fig. 15).

Por último, la gráfica de la figura 16, muestra la cantidad de ADN cuantificada por la técnica de Feulgen, tanto en placas de anafase como en los núcleos en interfase de las diferentes etapas estudiadas. Así, en los neuroblastos multipolares de 4 días (4 P) como en las neuronas en maduración de 9, 13 y 21 días, la cantidad de ADN detectada es -

más constante, puesto que las diferencias no son - muy significativas entre los mismos ($0.4 > p > 0.2$) y también semejan más a las placas de anafase cuantificadas. En cambio, en las etapas de células matrices y primeros neuroblastos bipolares (2E, 2P, 4E y 4I) la cantidad de ADN es mayor si se compara con las células anteriormente mencionadas.



Figura 1 a. Micrografía óptica del corte transversal de la médula cervical de embrión de pollo de 2 días de incubación; tinción de azul de toluidina. Capa celular endimaria (e), adyacente a la luz endimaria; capa celular periférica (p) con su membrana limitante (d). 290 aumentos.

Figura 1 b. Micrografía electrónica de núcleo de células matriz de la capa endimaria de embrión de 2 días de incubación; contrastado con uranilo-EDTA-plomo para ribonucleoproteínas. Los dos nucléolos (n) observados son grandes y compactos. Las partículas de ribonucleoproteínas son abundantes, formadas por fibras y gránulos pequeños distribuidas irregularmente; no se observan grandes acúmulos de cromatina decolorada, ni gránulos pericromatinianos. En el citoplasma abundan y resaltan los ribosomas (r). 19,000 aumentos.



Figura 2. Micrografía electrónica de célula matriz de la capa periférica de embrión de 2 - días de incubación, contrastada con la - técnica del ácido fosfotúngstico para - cromatina. El nucléolo (n) voluminoso - se presenta decolorado. Se observan acú- mulos irregulares de cromatina compacta (c), áreas extensas de cromatina semicom- pacta (s) junto con zonas menos extensas de cromatina extendida (E). 15,000 aumen- tos.



Figura 3a. Micrografía óptica teñida con azul de toluidina de corte transversal de médula espinal de embrión de pollo de 4 días de incubación. La luz endodérmica en hendidura está rodeada por la capa endodérmica (e) con algunas figuras de mitosis; la capa intermedia (i) integrada por neuroblastos bipolares; y la periférica (p) con neuroblastos de aspecto irregular que formarán el asta anterior. 315 aumentos.

Figura 3b. Micrografía electrónica del núcleo de neuroblasto multipolar de la capa periférica del embrión de 4 días, teñido con uranio-EDTA-plomo. El nucleólo (n) es grande y con nucleolonema bien desarrollado. En el nucleoplasma la concentración de ribonucleoproteínas es elevada, predominando las fibras (F) y los gránulos inter cromatínicos (icg), estos últimos forman un gran acúmulo. 20,000 aumentos.

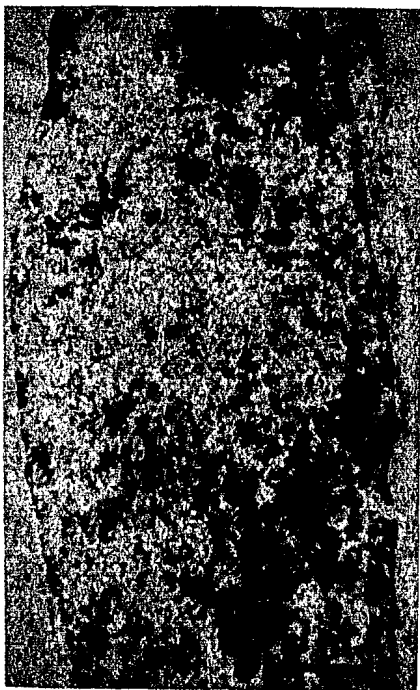


Figura 4. Micrografía electrónica de núcleo de - neuroblasto bipolar de la capa intermedia de embrión de 4 días de incubación, contrastada con ácido fosfotúngstico. - El nucléolo (n) está parcialmente decolorado. Los grumos de cromatina compacta son escasos, la cromatina semicompacta (S) es menos abundante y por lo contrario, las áreas de cromatina extendida (E) son más amplias. 14,000 aumentos.

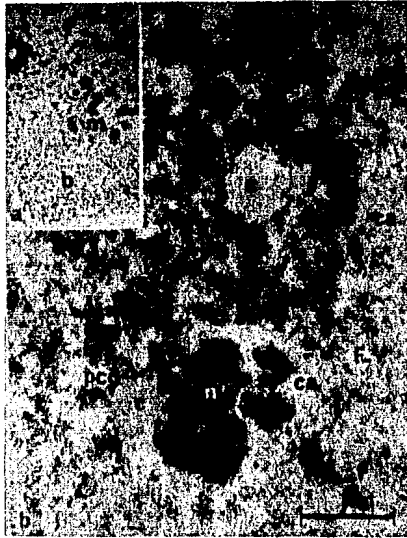


Figura 5a. Micrografía óptica de corte transversal de un segmento ventral de médula cervical de embrión de pollo de 9 días de incubación, teñido con azul de toluidina. El epéndimo (e) está configurado como un conducto circular. Los cuerpos celulares de las motoneuronas (m) son muy notorios y la sustancia blanca sin mielinizar (b) está más desarrollada y con abundantes células gliales. 160 aumentos.

Figura 5b. Micrografía electrónica de núcleo de neurona Inmadura del asta anterior, teñida con uranilo-EDTA-plomo. El nucléolo (n) en corte trasversal, muestra el nucleolonema grueso. Los gránulos intercromatinianos forman un gran acúmulo (icg). Se observan numerosas áreas claras sin partículas de RNP (ca). Los gránulos pericromatinianos (pcg) son más numerosos y algunos rodean a los escasos grumos de cromatina decolorada (c); las fibras (F) están más dispersas en el nucleoplasma. 20,000 aumentos.

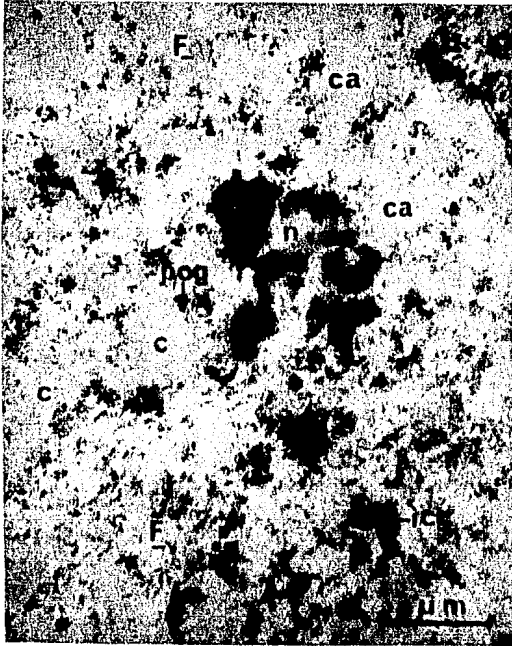


Figura 6. Micrografía electrónica de núcleo de mo-
toneurona de pollo recién nacido, con-
trastado con uranilo-EDTA-plomo. El nu-
cléolo (n) se observa en corte tangen-
cial, predominan las áreas claras (ca)
del nucleoplasma con mayor dispersión
de fibras (F) y gránulos intercromati-
neanos (icg). Se observan pequeños acú-
mulos de cromatina decolorada (c) con
algunos gránulos pericromatinianos -
(pcg) típicos en la periferia. 18,000 -
aumentos.

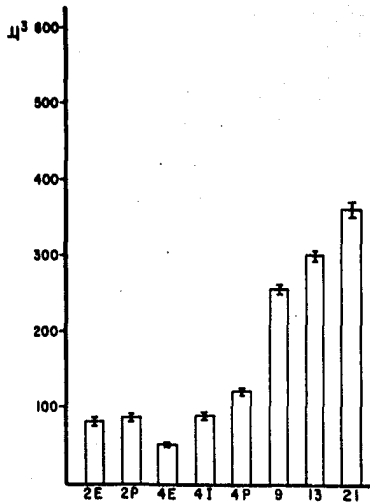


Figura 7. Cambio del volumen nuclear durante el desarrollo de los neuroblastos-neuronas. En las abscisas están marcados los días del período de incubación y el tipo de células: 2E y 2P capas endimaria y periférica ocupadas por células matrices, 2 días de incubación; 4E- capa endimaria con células matrices, 4I- capa intermedia con neuroblastos monopolares y bipolares de Cajal y algunas células matrices, 4P- capa periférica con los neuroblastos multipolares del asta anterior, todos estos de 4 días de incubación; 9- neuronas inmaduras del asta anterior del embrión de 9 días de incubación; 13 y 21- neuronas en diferentes etapas de maduración del asta anterior de embriones de 13 y 21 días. La ordenada muestra el volumen nuclear en micras cúbicas. El mayor incremento del volumen nuclear es de neuroblasto multipolar de 4 días (4P) a neuronas inmaduras de 9 días (9).

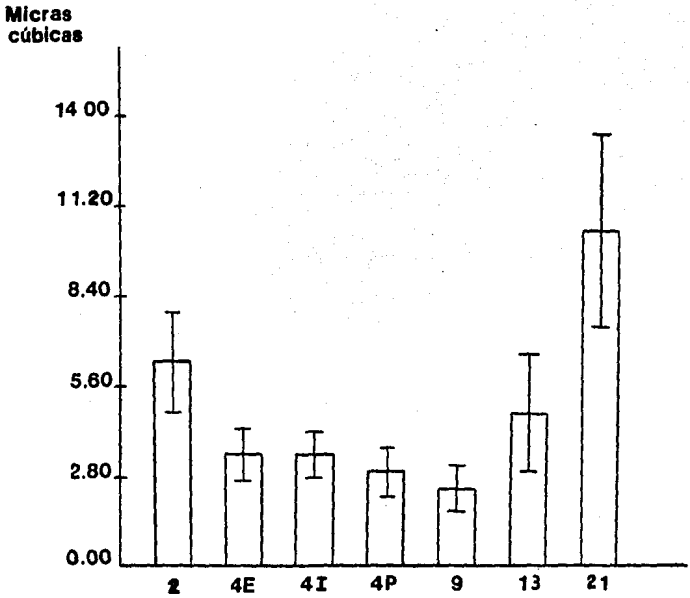


Figura 8. Gráfica que representa los cambios del volumen nucleolar. La abscisa está marcada igual a la de la figura 7; ordenada volumen en micras cúbicas (μ^3). El mayor volumen nucleolar corresponde a las grandes motoneuronas de 21 días y después a las células matrices (2).

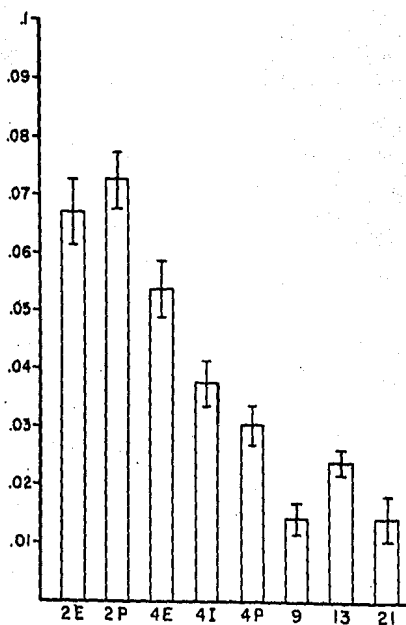


Figura 9. Gráfica que relaciona el volumen nucleolar con el volumen nuclear. Abscisas como en la figura 7; ordenada fracción $\frac{V_{nuc}}{V_{total}}$ del espacio nuclear ocupada por el volumen nucleolar. El volumen nuclear total de la ordenada corresponde a la unidad (1.00).

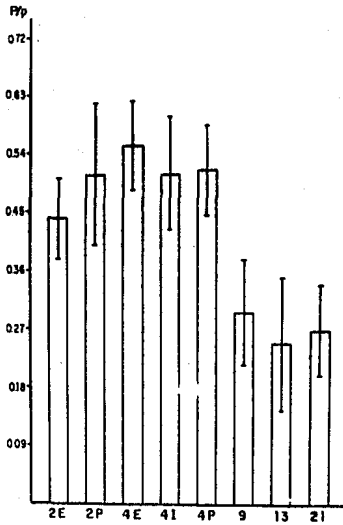


Figura 10. Gráfica que muestra la concentración de ribonucleo proteínas contenidas en las fibras pericromatínicas durante el desarrollo. Abscisas: días de incubación y capas celulares estudiadas como en la figura 7. Ordenada, frecuencia relativa de las fibras de RNP expresada por su coincidencia con la fracción de los puntos de cruce de una cuadrícula circunscrita dentro de su área nuclear. La concentración de las fibras es elevada en las etapas de célula matriz y neuroblasto, disminuye notablemente en etapa de neurona.

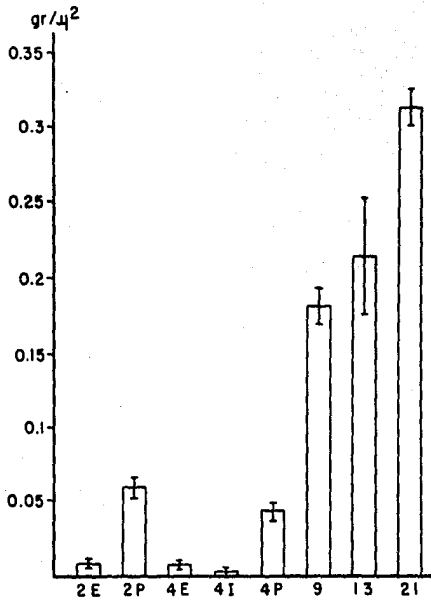


Figura 11. Gráfica que representa la frecuencia de gránulos pericromatinianos durante el desarrollo. La abscisa corresponde a la de la figura 7. En la ordenada se muestra el número de gránulos por micrómetro cuadrado de núcleo (gr / μ^2), en fotografías de cortes de espesor estándar (ver materiales y métodos). Es notable el incremento de estas partículas en las neuronas en vías de maduración (, 13 y 21 días).

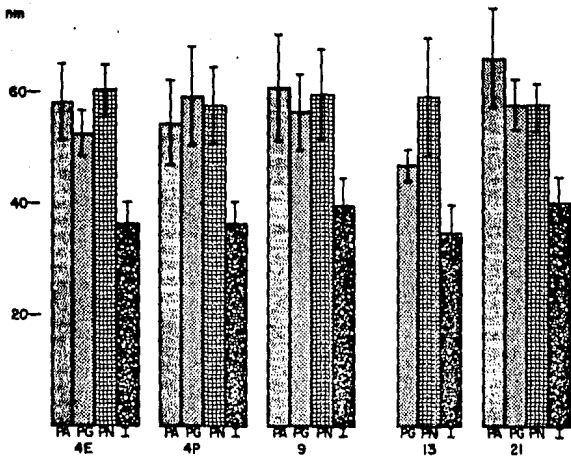


Figura 12. Gráfica que muestra el diámetro mayor de los gránulos peri e intercromatinianos, localizados como: PA pericromatinianos aislados, PG pericromatinianos en grupos en el nucleoplasma, PN pericromatinianos perinucleolares e I gránulos intercromatinianos. Abscisa: - - días y capas estudiadas. Ordenada: diámetro de los gránulos en nanómetros.

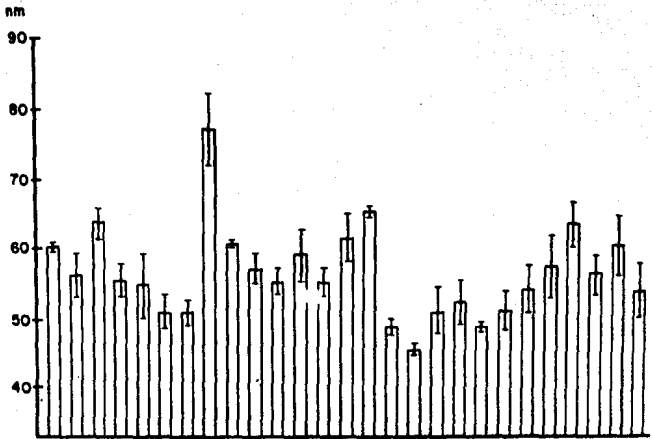


Figura 13. Gráfica que muestra el diámetro mayor de gránulos pericromatinianos de grupos diferentes, distribuidos en el nucleoplasma y no relacionados con el nucleólo, en núcleos de neuronas inmaduras de embriones de 9 días de incubación. Ordenada, diámetro mayor de los gránulos en nanómetros.

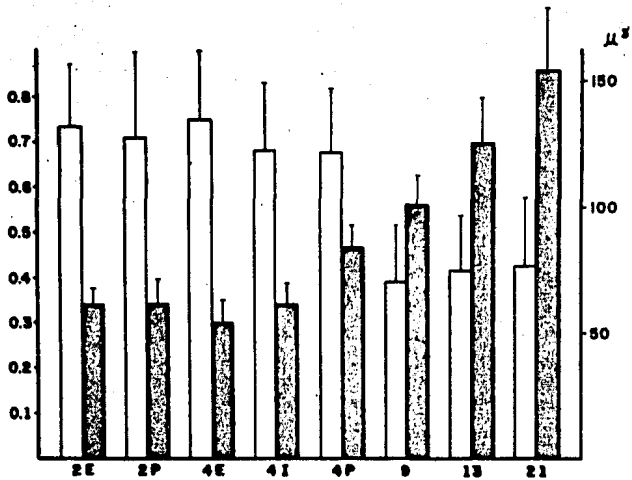


Figura 14. Gráfica combinada donde las barras blancas representan la fracción del volumen nuclear ocupada por partículas de ribonucleoproteínas (RNP), expresadas como puntos de fracción en la ordenada de la izquierda. Las barras rayadas corresponden al volumen absoluto ocupado por las RNP expresado en micrómetros cúbicos en la ordenada de la derecha. Abscisas como en la figura 7. Aunque la concentración de dichas partículas disminuye durante el desarrollo, la cantidad absoluta de las mismas es mayor conforme avanza dicho proceso.

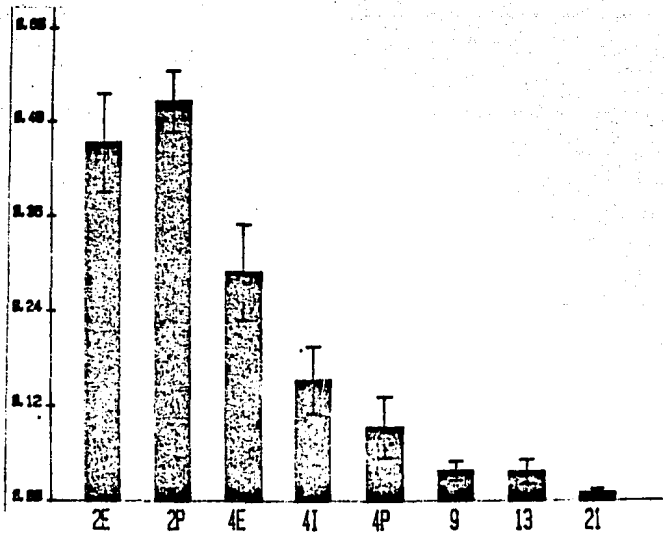


Figura 15. Gráfica que muestra el área nuclear ocupada por cromatina compacta en células matrices (2E, 2P y 4E), neuroblastos (4I y 4P) y neuronas en maduración (9, 13 y 21 días). La ordenada corresponde a el área relativa ocupada por la cromatina compacta que se expresa como el cociente de dicha cromatina entre su área nuclear (área nuclear total = 1.00). Hay diferencias significativas entre los tres tipos celulares de esta línea de diferenciación-maduración, obtenidas por la prueba "t" de Student.

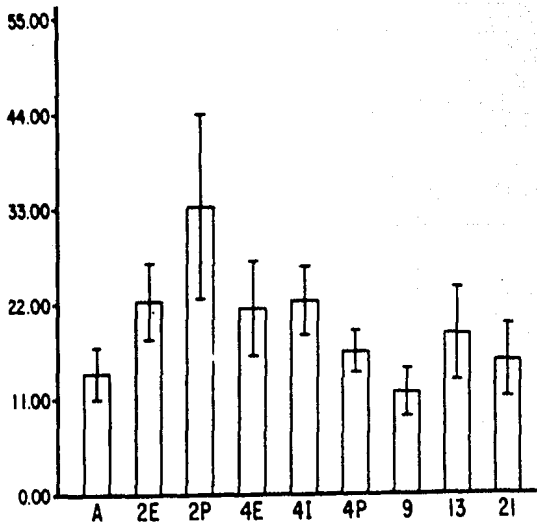


Figura 16. Gráfica que muestra los cambios en la cantidad de ADN en los núcleos de células matrices (2E, 2P y 4E), neuroblastos (4I y 4P) y neuronas (9, 13 y 21) en comparación con las cantidades de ADN en placas de anafase (número de ploidie) de células matrices en división (A). La ordenada está calibrada en unidades arbitrarias. Las células que han dejado de dividirse y son más diferenciadas, no muestran diferencias significativas con las placas de anafase.

DISCUSION

El proceso de la diferenciación celular implica cambios a diferentes niveles, el más obvio es el referente al aspecto morfológico -cambios de forma, aspecto, tamaño, tipo de organelos, etc.- sin embargo, actualmente se entiende que estas variaciones, en su mayoría son modificaciones tanto de su composición química -contenido y tipos de proteínas, lípidos, etc.- como del metabolismo de las células que están en el proceso de diferenciación. Para que esto suceda, es indispensable la participación directa del genoma de las células correspondientes, que con la expresión o represión de genes específicos, determinan gran parte de este fenómeno fundamental en el desarrollo de los organismos multicelulares. Como los núcleos celulares son las estructuras que contienen el material genético implicado en este proceso, se justifica el análisis cuantitativo de las características de dicho componente celular. Precisamente los hallazgos más importantes del presente estudio, muestran que los núcleos interfásicos durante la diferenciación de los neuroblastos y la maduración de las motoneuronas varían ostensiblemente, tanto en su conformación general, como en algunas de las estructuras que lo integran. Dichas modificaciones están íntimamente ligadas y relacionadas con algunos eventos fundamentales de la histogénesis y organo-

génesis de los organismos.

El estudio de los núcleos celulares en embriones de pollo de 2 días de incubación, corresponden a la capa neuroectodérmica primitiva del tubo neural recién formado. Desde las investigaciones realizadas con microscopía óptica (Sauer, 1936), microscopía electrónica (Fujita y Fujita, 1963), con la medición del contenido del ADN (Sauer y Chittenden, 1959) y con la radioautografía (Fujita, 1964); se indica que en esta etapa la pared del tubo está casi totalmente formada por células matrices; las cuales presentan el ciclo celular acelerado, con las correspondientes mitosis, que multiplican así la población celular del tubo neural primitivo.

Estos conceptos fundamentales de la homogeneidad relativa de las células matrices, concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo. La separación de la pared del tubo en dos poblaciones celulares: periepéndimaria y periférica, no muestra diferencias notables en cuanto al volumen nuclear y nucleolar, ni en el ritmo de transcripción -expresado en la concentración de fibras pericromatinianas- y en general, no varía la cantidad y concentración de las ribonucleoproteínas. Solamente en los núcleos periféricos se observa un aumento de los gránulos pericromatinianos y un mayor contenido de ADN. En el caso de los gránulos, más que un indicio de diferenciación celular, este

efecto podría deberse a un incremento de los mismos en alguna etapa del ciclo celular, como lo señalan Erlandson y Harven (1971). Una causa semejante se puede señalar para el ADN, puesto que al final de la etapa "S" y en la "G2" del ciclo celular, las células tienen mayor cantidad de ADN por haberlo duplicado; y es probable que estas etapas del ciclo se acumulen en las zonas periféricas del tubo (Sauer, 1937; Sauer y Chittenden, 1959). En términos generales, con los datos obtenidos se identifica un tipo celular que presenta una gran relación nucleolar/núcleo, un ritmo elevado de transcripción, con grandes áreas de cromatina compacta y posiblemente una síntesis de diversas proteínas, característica de células que sin aumentar su volumen protoplásmico, ni presentar diferenciación morfológica alguna, genera nuevas células.

Se han descrito ampliamente los cambios fundamentales de la diferenciación de las células matrices hacia los neuroblastos primitivos. Ya Cajal (1909-1911), con técnicas de impregnación argentínicas describe las transformaciones progresivas que presentan dichas células. Fujita y Fujita (1963) y Lyser (1968), señalan que uno de los primeros signos de diferenciación a nivel de ultraestructura es el desarrollo de los sistemas de membrana intracelulares. Sin embargo la técnica que con más aproximación define el paso de célula matriz a neuro--

blasto es la autorradiografía, por la incapacidad de estos últimos de duplicar su ADN y por no incorporar timidina tritiada (Fujita, 1964; Langman y Haden, 1970), esto es un aspecto básicamente funcional.

Al relacionar los resultados obtenidos con lo expuesto anteriormente, resalta que las capas periependimarias de embriones de pollo de 2 y 4 días presentan diferencias entre sí. En la población celular periependimaria de 4 días, el volumen nucleolar es significativamente menor y la compactación de la cromatina disminuye a un tercio de su valor con respecto a las células correspondientes de dos días; en ambos casos la probabilidad de error es menos del uno por mil ($P < 0.001$ obtenido a partir de la prueba "T" de Student). Esto podría indicar que la población de células matrices a los 4 días ya no fuera tan homogénea como en el período anterior; puede suceder que la diferenciación a nivel de expresión génica, se presente inmediatamente después a la etapa post-telofásica, pero dentro de la misma capa germinal, en lo que Fujita (1964) considera como la zona intermedia. En este caso, la reducción del volumen nucleolar y la descompactación de la cromatina sin que se modifique el volumen nuclear que se detectó en el presente trabajo, pueden ser signos primarios en la diferenciación de los neuroblastos, que ocurren antes de

los cambios morfológicos (Cajal, 1909-1911) detectados a microscopia fotónica, de la ultraestructura (Fujita y Fujita, 1963) y quizás a las mismas modificaciones del ADN. Esto también se apoya en el hecho de que en los neuroblastos bipolares que son más diferenciados, el volumen nucleolar sea menor y la descompactación de la cromatina más acentuada.

El estudio de las 3 zonas -4 E, 4I y 4P- en la médula de embriones de 4 días (figuras de la 7 a la 11 y la 15), muestra los cambios que pudieran suceder al comparar células matrices con neuroblastos y las diferentes variedades de estos entre sí; aunque el paso de células matrices a neuroblastos prácticamente se analizó al comparar las capas -ependimarias de 2 y 4 días. Al observar las fotomicrografías de la capa intermedia (4 I), se distingue que está constituida por neuroblastos bipolares, los cuales han desarrollado más sus sistemas de membranas (Fujita y Fujita, 1963) y otras estructuras como los neurotúbulos y neurofilamentos (Vázquez-Nin y Sotelo, 1966). En cambio la zona periférica (4 P), está formada por neuroblastos multipolares, en los que destaca el desarrollo del árbol dendrítico y el crecimiento del axón en el mesénquima circundante (Barron, 1946). Al comparar las modificaciones cuantitativas de dichas zonas, resalta en los neuroblastos multipolares un cierto

aumento en la cantidad de ribonucleoproteínas, una mayor descompactación de la cromatina con un ligero aumento del volumen nuclear; esto último sugiere que al desenrollarse la cromatina compacta, no causa un aumento proporcional del volumen nuclear. Este resultado es de por sí un hallazgo de importancia en biología celular, puesto que pone en duda lo que se supone en el sentido de que a mayor cantidad de cromatina extendida mayor volumen nuclear. Sin embargo, las causas profundas en los cambios de volumen nuclear escapan a la presente investigación.

Entre el cuarto y noveno día del período de incubación, se presentan una serie de eventos esenciales para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso de estos animales. Así, la mayoría de los axones de los neuroblastos, han tomado contacto funcional con las células musculares correspondientes (Cajal, 1909-1911; Barron, 1946). Precisamente aquellos neuroblastos que no contactaron con células efectoras, degeneraron y murieron (Levi-Montalcini, 1950; O'Connor y Wyttenbach, 1974; Hamburger, 1975), hecho que confirma el efecto trófico de los tejidos efectores hacia los neuroblastos en desarrollo. En este lapso, es cuando los contactos sinápticos -principalmente los axodendríticos- ya se observan aunque no del todo maduros, en las motoneuronas de la región cervical (Stelez-

ner y col., 1973). Igualmente en este período aparecen conexiones funcionales propio espinales - - (Oppenheim, 1975). El microambiente que rodea a estas células también se ha modificado: el neuropilo es más amplio, se distinguen las primeras células gliales y se inicia la vascularización de la región (Martin y Langman, 1965). Por lo tanto, es en esta etapa cuando el tipo celular que nos ocupa - presenta las características primordiales para desarrollar y ejercer la actividad funcional que le corresponde, y dejan de ser neuroblastos para - transformarse en neurona inmadura.

El paso esencial de neuroblasto a motoneurona inmadura, causa modificaciones notables en la conformación y la estructura de los núcleos celulares. En este intervalo de tiempo -de los 4 a los 9 - días- es cuando el volumen nuclear aumenta significativamente, con la mayor diferencia estadística - de todas las etapas que se estudiaron. El mismo fenómeno se observa en la frecuencia de los gránulos pericromatinianos. Como se ve al analizar la relación del volumen nuclear con la proporción de la cromatina compacta, no existe paralelismo entre - ambos ya que hay una descompactación de la cromatina muy significativa durante el paso del célula matriz a neuroblasto antes de que se inicie el aumento más notable del volumen nuclear. Por lo tanto, - se podría considerar la existencia de tres etapas -

en cuanto a la configuración y la expresión génica de cada uno de estos tipos celulares.

Primero, en las células matrices donde la compactación de la cromatina es máxima, con abundantes fibras pericromatinianas, en un volumen nuclear pequeño y casi sin gránulos pericromatinianos. Esta reducida cantidad de cromatina extendida, debe transcribir ARN que de inmediato saldría del núcleo para la síntesis de diversas proteínas necesarias en la división celular y que de hecho no se almacenarían, sino que se repartirían en las células hijas. Por cierto, la abundante síntesis de proteínas en este período, implica el gran volumen nucleolar, otra de las características de esta primera etapa.

Segundo, en los neuroblastos donde la descompactación de la cromatina es significativamente mayor en un pequeño volumen nuclear. En este caso se pensaría que el aumento de la cromatina extendida fuera propio de células que han iniciado cambios intrínsecos en la configuración de su genoma, previos e indispensables para determinar un mayor trabajo metabólico que implica la especialización celular de esta línea. Lo anterior apoyaría lo expuesto por O'Connor y Wyttenbach (1974), de que la muerte espontánea de los neuroblastos no estaría programada genéticamente, como lo mencionó Saunders (1966), sino más bien, este control genético estricto

to se ejerce: en la proliferación de células neuroepiteliales, en la diferenciación inicial de los neuroblastos y en los cambios preparativos de la cromatina descritos en este trabajo. Precisamente al no haber la interacción metabólica con los tejidos efectores, se trastornaría profundamente el metabolismo -como la falta de síntesis de ARN- por lo que sobrevendría la muerte de estos neuroblastos (Levi-Montalcini, 1964; O'Connor y Wyttenbach, 1974).

Tercero, en las neuronas inmaduras donde el trabajo metabólico elevado necesita la expresión de muchos genes y/o la expresión muy rápida de unos pocos probablemente redundantes; en cualquier caso, se necesita que los segmentos de eucromatina sean más extensos, se agrega además la acumulación de metabolitos y del mismo ARN que pueda almacenarse o degradarse, todos estos factores pueden ser los que modifiquen el volumen nuclear.

Es probable que la última etapa sea mediada y/o influida por los factores tróficos del medio ambiente. Aunque se duda y discute, si la diferenciación y migración de algunos neuroblastos depende de las conexiones aferentes (Peusner y Morest, 1977), existe por lo contrario un buen número de estudios que apoyan la influencia metabólica a nivel molecular de las conexiones sinápticas en la supervivencia (Levi-Montalcini, 1949) y desarrollo

(Black y col., 1972; Black y Geen, 1973) de otros neuroblastos. Por lo tanto, los últimos resultados de los cambios nucleares en el presente trabajo sugieren que los efectos tróficos y metabólicos trans-sinápticos en el desarrollo de las neuronas, sean debidos a una acción recíproca con la expresión de genes.

Posterior a los 9 días de incubación y al llegar el momento de la eclosión, las motoneuronas prosiguen con el crecimiento del axón, el cual se alarga por acompañar el desarrollo mismo del embrión. En este período de tiempo, el número y maduración de las sinapsis aumenta considerablemente (Oppenheim y col., 1975), y se establecen las sinapsis axo-somáticas. Igualmente la actividad bioeléctrica y la consecuente motilidad embrionaria, presenta importantes cambios cualitativos y cuantitativos (Provine, 1972). La mielinización de los tractos nerviosos se detectan desde el día 14, con un mayor incremento entre los 18 y 21 días de incubación (Cajal, 1909-1911; El-Elshi, 1967). Es indudable que la persistencia de estos fenómenos incide en la maduración de las motoneuronas, lo que redundando directamente en: el aumento continuo del volumen nuclear, la descompactación de la cromatina y en los otros parámetros estudiados. Precisamente entre los 13 y 21 días, es donde suceden los mayores incrementos de la descompactación de la cromatina.

tina y del volumen nucleolar. Estos fenómenos son concomitantes a la elevada síntesis proteica de células realmente gigantes por la longitud de su axón y a la mielinización intensa durante el período mencionado. Por último, es en el día 21 donde se detecta el máximo volumen nuclear y la mayor descompactación de la cromatina con el correspondiente aumento de la eucromatina y por lo tanto una transcripción elevada. Si bien, gran parte del ARN transcrito posiblemente pase al citoplasma, otra parte o se metaboliza en los nucleos o se incorpora a las partículas ribonucleoproteicas, dato que se confirma por el notable incremento en el número de los gránulos pericromatinianos.

El comportamiento de las partículas ribonucleoproteicas durante la diferenciación y maduración de esta línea celular, presenta notables variaciones que se correlacionan con las diferentes etapas morfofuncionales de dicho proceso. La transcripción, una de las actividades fundamentales de la expresión génica, se considera que tiene como expresión morfológica a las fibras pericromatinianas. Estas afirmaciones se basan en: descripciones morfofuncionales (Monneron y Bernhard, 1969), estudios con radioautografía (Fakan y col., 1976; Puvion y Moyne, 1978), la inhibición y/o estimulación de la síntesis de ARN (Petrov y Bernhard, 1971; Nash y col., 1975) y a la correlación bioquí

mica-morfológica (Bachelierie y col., 1975). Por lo tanto, el estudio cuantitativo de las fibras pericromatinianas permite evaluar indirectamente la misma transcripción.

Desde ese punto de vista, en los núcleos de las células matrices los cuales contienen una alta concentración de fibras pericromatinianas, grandes áreas de cromatina compacta y por lo mismo menor proporción de eucromatina; la transcripción es elevada con la posibilidad de que buena parte del ARN pase de inmediato al citoplasma, dada la escasez de gránulos pericromatinianos donde este ARN se podría almacenar. En los neuroblastos bipolares y monopolares, la concentración de fibras pericromatinianas se mantiene prácticamente igual, aunque la descompactación de la cromatina es significativamente mayor. Si a esto se agrega que la cantidad de fibras permanece casi estable, puesto que no ha variado el tamaño nuclear, se podría expresar que efectivamente en la etapa de neuroblasto la configuración de la cromatina se ha modificado, no tanto por la síntesis inmediata de ARN, sino más bien como un estado previo al gran cambio que se sucede a continuación. En las neuronas inmaduras se presenta el efecto de dilución de las fibras por el mayor tamaño del núcleo, sin embargo, la transcripción y por la cantidad absoluta de las fibras, aumenta continua y progresivamente. Esto está de - -

acuerdo con una mayor proporción de cromatina extendida, necesaria para el intenso trabajo metabólico de estas células en desarrollo, que como se mencionó son ya influenciadas por factores del microambiente como la sinaptogénesis.

Las otras partículas estudiadas corresponden a los gránulos pericromatinianos (G.P.), estructuras evidentes y constantes en los núcleos celulares de los eucariontes. Numerosas observaciones y trabajos han demostrado que contienen, almacenan y/o transportan ARN preferentemente extranucleolar, sea mensajero o heterogéneo (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971; Puvion y col., 1977; Vázquez-Nin y col. 1979-b). Por lo tanto, su número depende en especial del balance entre la síntesis del ARN no nucleolar y su degradación y/o transporte hacia el citoplasma. Gran parte del comportamiento de dichos gránulos, ya se ha discutido al caracterizar algunas etapas en la diferenciación y maduración de esta línea celular. Sin embargo, resalta su escasez en las primeras etapas -como en células matrices y neuroblastos. Por lo contrario, entre los días 4 y 9 de incubación -durante la transformación de neuroblasto a neurona inmadura- hay un gran aumento de los mismos, este incremento es progresivo en el resto de los días analizados.

Con base en esto, se podría considerar que existen situaciones de expresión génica y funciona

les algo diferentes entre las células matrices y las neuronas inmaduras. Como la actividad primordial de las primeras es la duplicación celular en corto tiempo, es posible que este fenómeno imponga con respecto a la transcripción y al transporte del ARN, el que sea más favorable a esto último y por lo tanto, la formación de los gránulos pericromatinianos es escasa. Como datos de apoyo a esta interpretación, destacan los resultados obtenidos por Vázquez-Nin y col. (1978 y 1979-b) al modificar el equilibrio: transcripción/transporte por supresión e inducción hormonal, tanto in situ como in vitro. En estos experimentos se forman más gránulos si el ritmo de transcripción es mayor que el transporte y su número disminuye si se invierte la situación. Cuando las neuronas inmaduras expresan sus genes específicos, que a su vez determinan las características fenotípicas de estas células altamente especializadas, el nuevo equilibrio es a favor de la transcripción lo que permite un almacenamiento del ARN específico y favorece la integración de más gránulos pericromatinianos. En los neuroblastos, aunque se ha definido su línea de diferenciación, no han adquirido del todo las características genéticas y funcionales propias de las neuronas, son células poco diferenciadas que acumulan escasos gránulos pericromatinianos, como en las blastómeras de blástulas de rata en etapa de más de 16 células (Fakan y Odartchenko, 1980); lo

que coincide con la hipótesis de que a menor diferenciación, menor número de estas partículas (Vázquez-Nin y col., 1980).

El estudio detallado de los gránulos pericromatínicos, permitió distinguir diversas formas de distribución de estos en el nucleoplasma; podían estar aislados, o formar pequeños grupos o bien estar relacionados con el nucléolo. En este mismo estudio se planteó la posibilidad, de que existiera alguna relación entre los G.P. y los gránulos intercromatínicos. De los resultados obtenidos al respecto, se puede concluir: Primero, que aunque existan fluctuaciones en el tamaño de los G.P., no hay diferencias estadísticas en cuanto a su posición o volumen durante el desarrollo embrionario. Segundo, se demuestra una cierta constancia de la presencia de los gránulos asociados al nucléolo. Esto tiene importancia porque varios estudios informan de la presencia de estas estructuras solamente bajo condiciones experimentales que trastornan el metabolismo del ARNr, o al mismo nucléolo (Recher y col., 1971; Puvion y col., 1977). Por lo tanto, en este trabajo donde se consideraron aspectos normales del desarrollo embrionario, se sugiere que estos gránulos asociados al nucléolo, pueden desempeñar algún papel en el metabolismo y el transporte del ARNr en condiciones ordinarias de este período, o bien, una relación entre el ARN

extranucleolar contenido en los G.P. y los nucléolos. Esta es una fuente para investigaciones posteriores dirigidas a esclarecer dichas estructuras. Tercero, por este mismo estudio estadístico, se comprueba que no hay continuidad alguna en las distribuciones de tamaño de los G.P. y la de los gránulos intercromatinianos; este dato es importante porque rebate la hipótesis de que los gránulos pericromatinianos se originen de los intercromatinianos.

La presencia de pequeños grupos de gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma no relacionados con el nucléolo, sugirió la posibilidad de que cada miembro de un grupo tuviera un origen común y que a su vez, los grupos se originarían en sitios diferentes. Esta sospecha se basa en el trabajo experimental de Vázquez-Nin y Bernhard (1971), en donde se demostró que los gránulos de los anillos de Balbiani de los cromosomas politénicos de Chironomus, tienen el mismo tamaño, ultraestructura y propiedades citoquímicas que los gránulos pericromatinianos. Así mismo mostraron con radioautografía que los gránulos de los anillos de Balbiani, se originan en segmentos específicos de cromatina transcripcionalmente activa como son los hinchamientos o "Puffs" y que los gránulos de un hinchamiento difiere del tamaño de los gránulos originados en otros sitios de cromatina activa. Sin embar

go, ningún estudio había informado si algo similar sucede con los G.P. de núcleos celulares de los vertebrados. En este estudio al realizar el análisis estadístico de la varianza de tamaño de los G.P., se encontró similitud en los diámetros de gránulos del mismo grupo, sobre todo en las etapas en que se detectó un gran aumento de los mismos.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que tanto los gránulos de los anillos de Balbiani, como los gránulos pericromatinianos son partículas de ribonucleoproteínas de tamaño específico en cuanto a su localización, o sea que los grupos se originen en loci determinados como resultado de la transcripción de genes específicos, propios de células diferenciadas. Este concepto también apoya lo ya expresado en diferentes trabajos, de que estas partículas almacenan y/o transportan ARN premensajero o mensajero.

En cuanto a los gránulos intercromatinianos (G.I.), fueron las partículas que menos variaciones tuvieron durante el desarrollo embrionario. Esta uniformidad relativa se puede explicar por estudios experimentales en los que se comprueba que dichas partículas no se relacionan directamente con la transcripción y/o el transporte del ARN de nueva síntesis (Fakan y Bernhard, 1971; Wassef, 1979), pueden estar más bien implicados en otras funciones como la de formar parte del "Armazón nuclear"

(Comings, y Okada, 1976; Miller y col., 1978; Puvion y col., 1984 b). Por lo tanto, estos gránulos no estarían expuestos a las grandes variaciones que implica la síntesis de los ácidos nucleicos durante la diferenciación y maduración celular.

Para finalizar, al considerar la cantidad de ADN por núcleo cuantificada por la técnica de Feulgen, resaltan dos aspectos importantes. Primero, en las etapas y sitios donde se encuentran las células matrices y neuroblastos primitivos -2 E, -2P, 4 E y 4 I-, la proporción de ADN es mayor y su distribución más irregular en comparación con las neuronas inmaduras de etapas posteriores. Segundo, en estas últimas -4P, 9, 13 y 21- la cantidad de la substancia estudiada varía menos y por lo tanto es más constante, siendo similar a la placa de anafase que representaría el número diploide en este tipo celular. Para la interpretación del primer fenómeno, hay que referirse a la actividad y función de las células matrices en el ciclo celular, las cuales por sus constantes mitosis necesariamente duplican su ADN. Por lo tanto en estas primeras poblaciones, posiblemente se encuentren muchas células matrices en etapa de postduplicación con un contenido mayor de ADN. En apoyo de esto, es que la proporción más alta de ADN es en 2P que corresponde a la zona de duplicación del ADN (Sauer y Chittenden, 1959). A partir de los neuroblastos

multipolares -4P- y continuar con las neuronas en maduración, ya no hay diferencias significativas - en cuanto a la cantidad de ADN; aunque el volumen nucleolar aumenta de tamaño y disminuya la proporción de cromatina compacta. Esto apoya el concepto de que estas células diploides durante la diferenciación y maduración, las modificaciones de su cromatina no son debidas a cambios en la cantidad de ADN, sino más bien a variaciones en la conformación de la misma cromatina, producidas por las condiciones que implica la transcripción del ARN para las necesidades metabólicas de las motoneuronas.

CONCLUSIONES.

1.- Los núcleos celulares en interfase durante la la diferenciación y maduración de las células matri--ces en neuroblastos y de estos en neuronas, presen--tan variaciones en cuanto a su conformación y en algunas de las estructuras que lo constituyen, como las partículas de ribonucleoproteínas.

2.- Por la metodología utilizada en el presente trabajo, se pueden caracterizar dentro de esta línea celular tres etapas en cuanto a: la conforma--ción general de sus núcleos, la configuración de su cromatina y el ritmo de expresión génica; esto coincide con los aspectos morfológicos y funciona--les ya descritos, dichas etapas son:

-Primera la de células matrices, caracteriza--das por: un gran volumen nucleolar, máxima compac--tación de la cromatina, un ritmo de transcripción elevado que se deduce del alto número de fibras, el escaso número de gránulos pericromatinianos y todo esto en un reducido volumen nuclear.

-Segunda, la de los neuroblastos con una des--compactación significativa de la cromatina sin au--mentar el volumen nuclear, reducción del volumen nucleolar acompañado de un alto ritmo de transcrip--ción.

-Tercera, la de neuronas inmaduras con gran vo

lumen nuclear y nucleolar, alta proporción de cromatina laxa; aunque dispersa, gran cantidad de fibras pericromatinianas y un gran número de gránulos pericromatinianos.

3.- Según las características mencionadas las células matrices y su contenido en ADN, se corrobora que la médula espinal cervical del embrión de pollo de 2 días de incubación y la capa ependimaria del de 4 días, están formadas por este tipo celular.

4.- Por lo mismo, en etapas más avanzadas -4 días- se infiere que la llamada capa germinal ya no es tan homogénea, por la posible diferenciación inmediata de los primeros neuroblastos. En este estudio se demuestra que la transición de células matriz a neuroblasto se manifiesta por la disminución del volumen nucleolar y la descompactación de la cromatina dentro de un volumen nuclear que no ha modificado su tamaño.

5.- Igualmente se demuestra que el desarrollo altamente significativo de la cromatina, no necesariamente conlleva un aumento progresivo del volumen nuclear.

6.- Los cambios y variaciones más acentuados se presentaron durante la transición de neuroblastos a neuronas inmaduras, con notable aumento del volumen nuclear, mayor descompactación de la cromatina y gran incremento de los gránulos pericromatinia-

nos. Son factores decisivos para esto, la influencia del microambiente y los contactos sinápticos - entre otros.

7.- Se comprueba la presencia de un alto número de gránulos pericromatínicos en las células más diferenciadas como las neuronas inmaduras, en contraposición a la baja frecuencia de los mismos en las células poco diferenciadas como las células matrices.

8.- Se comprueba la presencia de gránulos pericromatínicos asociados al nucléolo, durante el desarrollo de estas células; sugiere esto que dichos gránulos estén relacionados con las funciones del mismo nucléolo. Este hallazgo es significativo por lo reportado anteriormente, en el sentido de que estas estructuras solamente se forman en condiciones de trastornos experimentales del ARNr o de los nucléolos.

9.- Se comprueba que no existe continuidad de tamaño entre los gránulos pericromatínicos e intercromatínicos, esto apoya el concepto del origen independiente de cada una de estas estructuras.

10. Como resultado de mediciones apropiadas y de métodos estereológicos y estadísticos adecuados - realizados en el presente trabajo, se demuestra - que los gránulos pericromatínicos encontrados en grupos pequeños, tienen un origen común y a su vez,

estos grupos se forman en sitios diferentes. Estos resultados juntos con los obtenidos de estudios en los gránulos de los anillos de Balbiani de cromosomas politénicos de Chironomus, plantean la hipótesis de que dichos grupos se forman en loci bien determinados, como resultado de la expresión de genes precisos y por lo tanto, almacenan y/o transportan segmentos específicos de ARN premensajero o mensajero.

11. En este estudio se comprueba la relativa constancia de la cantidad de ADN en células ya diferenciadas, sin que se modifique notablemente dichas substancias durante el proceso de maduración de las neuronas; esto apoya lo ya expuesto de que los cambios de cromatina son debidos a cambios en su conformación, posiblemente necesarios para la transcripción de los diversos ARN específicos. Por lo contrario, en las células matrices indiferenciadas la cantidad de ADN varía más, en cuanto a que están en situaciones fisiológicas diferentes como es la duplicación del ADN y las mitosis correspondientes.

BIBLIOGRAFIA

- Adams C.W. y Davison A.N. 1959. The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. *J. Neurochem.* 4; 282-289.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. 1983. *Molecular Biology of the Cell.* pag. 406-427. Garland New York.
- Attardi G., Parnas H., Huang M.H. y Attardi B. 1966. Giant size rapidly labeled nuclear ribonucleic acid and cytoplasmic messenger RNA in immature duck erythrocytes. *J. Mol. Biol.* 20; 145-182.
- Bachelierie J.P., Puvion E. y Zalta J.P. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin RNA protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 58; 327-337.
- Banerjee A.K. 1980. 5' -terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleoprotein acids. *Microbiol. Rev.* 44 (14): 175-205.
- Barron H.D. 1946. Observations of the early differentiation of the motor neuroblast in the spinal cord of the chick. *J. Com. Neurol.* 85 (2); 149-216.
- Bauchawlow I.B. y Unger E. 1977. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exp. Cell. Res.* 106; 139-150.
- Berget S., Moore C. y Sharp P. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74; 3171-3175.
- Bernhard W. y Granboulan N. 1968. "The nucleus". Editado por Haguenu F. y Dalton A.J. Academic Press N.Y. pag. 81-89.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27; 250-265.
- Beyer A., Miller O.L. y McKnight S. 1980. Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is non random and sequence-dependent. *Cell* 20; 75-84.

- Black I.B., Hendry I.A. y Iversen L. 1972. The rol of postsynaptic cholinergic nerve terminals in mouse sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)*. 221; 149-159.
- Black I.B. y Geen S.C. 1973. Transynaptic regulation of adrenergic neuron development inhibition by ganglionic blockade. *Brain Res.* 63; 281-302.
- Bodian D. 1968. Development of fine estructure of spinal cord in monkey fetuses. *J. Com. Neurol.* 133; 113-166.
- Bouteille M., Laval M. y Dupiy-Coin A.M. 1969. "The cell nucleus". Editado por Busch H., Academic Press N.Y. Vol. I pags. 5-64.
- Brawernan G. 1963. A procedure for the isolation of RNA fractions resembling DNA with respect to nucleotide composition. *Biochem. Biophys. Acta* 76; 322-327.
- Brawerman G., Gold L. y Eisensntand J. 1964. A ribonucleic acid fractions rat liver with template activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 50; 630.
- Bristow D.A. y Deuchar E.M. 1964. Changes in nucleic acid concentration during the development of Xenopus leavis embryos. *Exp. Cell Res.* 35; 580-589.
- Britten R.J. y Kohne D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161; 529-540.
- Brown D.D. y Stern R. 1974. Methods of gene isolation. *Annu. Rev. Biochem.* 43; 667-693.
- Brossard M. y Nichole L. 1968. Metabolism of high molecular weight polydisperse, rapidly labeled nuclear RNA in rat liver. *Canad. J. Biochem.* 46; 1497-1505.
- Busch H. 1977. "Receptors and hormone action". Editado por O'Malley B.W. y Birnbaumer L. Academic Press, N.Y. Vol. I pag. 32-97.
- Busch H., Reddy R., Rothblum L. y Choy Y.C. 1982. SnRNAs, SnRNPs and RNA processing. *Ann. Rev. Biochem.* 51; 617-654.
- Busch H. y Smetana K. 1970. "The nucleolus". Academic Press N.Y.

- Burnside B. 1971. Microtubules and microfilaments in newt neurulation. *Develop. Biol.* 26; 416-441.
- Burnside B. 1973. Microtubules and microfilaments in Amphibian neurulation. *Amer. Zool.* 13; 989-1006.
- Cajal S.R. 1909-1911. *Histologie du systema nerveux de l'homme et des vertebres*. Editado por A. Maloine Paris. Tomo I y Tomo II.
- Church R.B. y Brown I.R. 1972. Results and problems in cell differentiation. Editado por Urspring H. Springer-Verlage. Berlin y New York. Vol. III, pag. 11-24.
- Comings D.E. y Okada T.A. 1976. The fibrillar nature of the nuclear matrix. *Exp. Cell. Res.* 103; 341-360.
- Crick F.H.C. 1979. Split genes and RNA splicing. *Science.* 204; 264-271.
- Darnell J. E. 1983. The processing of RNA. *Sci. Am.* 249 4); 72-82.
- Darnell J. E. 1985. "RNA". *Sci. Am.* 253 (4); 54-73.
- Daskal I., Merski J. A., Hughes J. B. y Busch H. 1975. The effects of cycloheximide on the ultrastructure of rat liver cells. *Exp. Cell. Res.* 93; 395-401.
- Derman E., Goldberg S. y Darnell J. E. 1976. hn RNA in HeLa cells: distribution of transcript size stimated from nascent molecule profile. *Cell.* 9; 465-472.
- DuPraw E. J. 1970. "DNA and chromosomes". Editado por Holt, Rinehart and Winston, Inc. págs. 1-24.
- Economidis I. y Pederson T. 1983. In vitro assembly of a pre-messenger ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 (14); 4296-4300.
- El-Eishi H. E. 1967. Biochemical and histochemical studies on myelination in the chick embryo spinal cord. *J. Neurochem.* 14; 405-412.
- Erlanson R. A. y Harven E. 1971. The ultrastructure of synchronized HeLa cells. *J. Cell. Sci.* 8; 353-397.

- Fakan S. y Bernhard W. 1971. Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exptl. Cell. Res.* 67; 129-141.
- Fakan S., Puvion E. y Spohr G. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in rat isolated hepatocytes. *Exptl. Cell. Res.* 99; 155-164.
- Fakan S. y Odartchenko N. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. *Biol. Cell.* 37; 211-218.
- Feeney J. F. y Watterson R. L. 1946. The development of the vascular pattern within the walls of the central nervous system of the chick embryo. *J. Morph.* 78; 231-291.
- Firtel R. M., Jacobson A. y Lodish H. F. 1972. Isolation and hybridization kinetic of messenger RNA from Dictyostelium discoideum. *Nature (New Biol.)* 239; 225-228.
- Fujita S. 1963. Matrix cell and cytogenesis in the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 120; 37-42.
- Fujita S. 1964. Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 122; 311-328.
- Fujita S. 1965. An Autoradiographic study on the origin and fate of the sub-pial glioblast in the embryonic chick spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 124; 51-60.
- Fujita H. y Fujita S. 1963. Electron microscopic studies on neuroblast differentiation in the central nervous system of domestic fowl. *Z. Zellforsch.* 60; 463-478.
- Gajkovska B., Puvion E. y Bernhard W. 1977. Unusual perinuclear accumulation of ribonucleoprotein granules induced by camptothecin in isolated liver cells. *J. Ultrastruct. Res.* 60; 335-347.
- Georgiev G. P. 1961. Ribonucleic acid in the chromosomonuclear apparatus. *Biokhimiya* 26; 1095-1107. (Resúmen en inglés.)
- Georgiev G. P. 1974. "The cell nucleus", Editado por Busch H. Academic Press. Vol. III; pág. 70.

- Georgiev G. P. y Mantieva V. L. 1962. On the presence of ribonucleic acid of the A-V type in the chromosomo nucleolar apparatus. Vop. Med. Khin. 8; 92-98. (Resúmen en inglés).
- Getz M. J., Birme G. D., Young B. D. y Paul J. 1978. A kinetic stimulation of bases sequence complexity of nuclear poly A containing RNA in mouse Fiend-cells. Cell 4; 121-209.
- Geuskens M. Bernhard W. 1966. Cytochemic ultraestructurale du nucleole. III. Action de I' actinomycyne sur le metabolisme du RNA nucleolaire. Exptl. Cell Res. 44; 579-598.
- Granboulan N. Sherrer K. 1969. Visualisation in the electron microscope and size of RNA from animal cells. Eur. J. Biochem. 9; 1-20.
- Gurdon J.B. 1974. "The cell nucleus". Editado por Busch H. Academic Press. N.Y. Vol. I. pag. 471-489.
- Hamburger V. 1948. The mitotic patterns in the spinal cord of the chick embryo and their relation to the histogenetic processes. J. Comp. Neurol. 88; 121-284.
- Hamburger V. 1975. Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. J. Comp. Neurol. 160; 535-546.
- Hamburger V. y Hamilton H.L. 1952. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88; 49-92.
- Hatzglou M., Adamlzki E., Margaritis L. y Sekeris C.E. 1985. Isolation and characterization of nuclear particles containing rapidly labelled hnRNA and SnRNA. Exptl. Cell Res. 1985. 157; 227-241.
- Hay E.D. 1968. "The nucleus". Editado por Dalton A.J. y Hagenau, Academic Press. N.Y. pag. 1-60.
- Herman R.C., Williams J.G. y Penman S. 1976. Message and non message sequences adyacent to poly A in steady state heterogeneous nuclear RNA of Hela cells. Cell 7; 429-437.

- Hirano H. 1967. Ultrastructural study on the morphogenesis of the neuromuscular junction in the skeletal muscle of the chick. *Z. Zellforsch.* 79; 198-208.
- His W. 1889. Die neuroblaste un cleren Entstehung in embryonalen mark. *Arch. F. Anat. Phys. Anat. Abt.* pag. 249-300.
- Holtfreter J. 1947. Neural induction in the explants wich haven passed through a sublethal cytolysis. *J. Exp. Zool.* 106; 197-222.
- Imaizumi M.T., Diggelman M. y Sherrer K. 1972. Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of messenger RNA of avian erythroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70; 1122-1126.
- Jiménez-García L.F. 1985. Evolución nuclear en animales. Tesis de Maestría en Ciencias, Biología, Facultad de Ciencias U.N.A.M. México. págs. 1-29.
- Kallen B. y Valmin K. 1963. DNA synthesis in the embryonic chick central nervous system. *Z. Zellforsch Mikrosk.* 60; 491-506.
- Kish V.M. y Pederson T. 1975. Ribonucleoprotein organization of polyadenylate sequences in HeLa cells heterogeneous nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* 95; 227-238.
- Langman J. y Haden C. 1970. Formation and migration of neuroblast in the spinal cord of the chick embryo. *J. Com. Neurol.* 138; 419-432.
- Leduc E.H. y Bernhard W. 1967. Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. *J. Ultrastr. Res.* 19; 196-199.
- Levi-Montalcini R. 1949. The development of the acoustico-vestibular centers in the chick embryo in the absence of the afferent root fibers and of descending fibers tracts. *J. Comp. Neur.* 91; 209-242.
- Levi-Montalcini R. 1950. The origen and development of the visceral system in the spinal cord of the chick embryo. *J. Morphol.* 86; 253-284.
- Levi-Montalcini R. 1964. Events in the developing nervous system. *Progr. Br. Res.* 4; 1-26.

- Littau V.C., Alfrey V.G., Frenster J.H. et al. 1964. Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope autoradiography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 52; 93-100.
- Lodish H.F., Jacobson A., Firtel R., Alton T. y Tuchman J. 1974. Synthesis of messenger RNA and chromosome structure in the cellular slime mold. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71; 5103-5108.
- Lukanidin E.M., Olsen S. y Pihl A. 1972. Antigenic difference between informorfers and protein bound to polyribosomal RNA from rat liver. Nature (London) New Biol. 240; 90.
- Lyser K. 1968. Early differentiation of motor neuroblast in the chick embryo as estuded by electron microscopy. II Microtubules and microfilaments. Develop. Biol. 17; 117-142.
- Martin A. y Langman J. 1965. The developmente of the spinal cord examined by autorradiography. J. Embryol. Exp. Morph. 14; 25-35.
- Martin T.E. y McCarthy B.J. 1972. Synthesis and turnover of RNA in the 30 S nuclear ribonucleoprotein complexes of mouse ascitis. Biochem. Biophys. Acta. 227; 354-367.
- Miller T.E., Hung C.Y. y Pogo A.O. 1978. Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA. J. Cell Biol. 76; 675-691.
- Mitolo V. 1967. Quantitative data on the mitotic activity in the brachial and thoracic segments of the chick embryo neural tube. Acta Embryol. Morph. Exp. 10; 62-74.
- Monneron A., y Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J. Ultrastruct. Res. 27; 266-288.
- Morest D.K. 1969. The growth of dendrites in the mammalian brain. Z. Anat. Entwicklungsgeschichte. 128; 290-317.

- Moyne G. y Puvion E. 1976. Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus. Sixth European Congress on Electron Microscopy. Jerusalem 1976. 14-19.
- Moyne G., Nash R.E. y Puvion E. 1977. Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cell.* 30; 5-16.
- Mugnaini E. 1969. The relation between cytogenesis and the formation of different types of synaptic contact. *Brain Res.* 17; 169-179.
- Müller W. y Zahn R. 1979. Bleomycin and antibiotic that removes thymine from double strand DNA. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 22; 21-57.
- Nash R.E., Puvion E. y Bernhard W. 1975. Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA. *J. Ultrastruct. Res.* 53; 395-405.
- O'Connor T.M. y Wittenbach C. 1974. Cell death in the embryonic chick spinal cord. *J. Cell. Biol.* 60; 448-459.
- Oda K. y Dulbecco R. 1968. Regulation of transcription of the SV 40 DNA in productively infected and in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 60; 525-532.
- Oppenheim R.W. 1975. The role of supraespal input in embryonic motility. *J. Com. Neurol.* 160; 37-50.
- Oppenheim R.W. y Foelix F.R. 1972. Synaptogenesis in the chick embryo spinal cord. *Nature New Biol.* 235.
- Oppenheim R.W. y I-Wu Chu Wang y Foelix R.F. 1975. Some aspects of synaptogenesis in the spinal cord of the chick embryo. A quantitative electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* 161; 383-418.
- Oppenheim R.W. y I-Wu Chu Wang. 1977. Spontaneous cell death of spinal motoneurons following peripheral innervation in the chick embryo. *Brain. Res.* 125; 154-160.
- Orryck L.R., Olson M.O. y Busch H. 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70; 1316-1320.

- Penman S., Smith I. y Holtzman E. 1966. Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cel nucleus. *Science*. 154; 786-788.
- Perry R.P., Bard E., Hames B.D. y Kelley D.E. 1975. Messenger RNA transcription, processing and turnover. *Proc. FEBS meet.* 9th. 33; 17-34.
- Petrov P. y Bernhard W. 1971. Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.* 35; 386-402.
- Petrov P. y Sekeris C.E. 1971. Early action of -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation. *Exptl. Cell Res.* 69; 393-401.
- Peusner K.D. y Morest D.K. 1977. Neurogenesis in the nucleus vestibularis tangentialis of the chick embryo in the absence of primary afferent fibers. *Neuroscience* 2; 253-270.
- Porter K.R. y Tucker J.B. 1981. The ground substance of the leving cell. *Sci. Am.* 244 (3) 56-67.
- Provine R.R. 1972. Ontogeny of bioelectrical activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Res.* 41; 365-378.
- Puvion E., Moyne G. y Bernhard W. 1976. Action of 3'Deoxyadenosine (Cordycepin) on the nuclear ribonucleoproteins of isolated liver cells. *J. Microscop. Biol. Cell.* 25; 17-32.
- Puvion E., Viron A. y Bernhard W. 1977. Unusual acumulation of ribonucleoprotein constituens in the nucleus of cultured rat liver cells after hipotermical shock. *Biol. Cell.* 29; 81-88.
- Puvion E. y Moyne G. 1978. Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins. *Exptl. Cel. Res.* 115; 79-88.
- Puvion E. y Lange M. 1980. Functional significance of perichromatin granular acumulation induced by cadmium choride in isolated rat liver cells. *Exptl. Cell Res.* 128; 47-58.

- Puvion E. y Moyne G. 1981. "The cell nucleus". Editado por Busch H. Academic Press N.Y. Vol. III pag. 59.
- Puvion E, Viron A. y Xu X.F. 1984. (a) High resolution autoradiographical detection of RNA in the interchromatin granules of DRB- treated cells.
- Puvion E., Viron A., Assens C., Leduc E.M. y Jeanteur P. 1984 (b). Immunocytochemical identification of nuclear structures containing SnRNPs in isolated rat liver cells. J. Ultrastruct. Res. 87; 180-189.
- Recher L., Briggs L.G. y Parry N.T. 1971. A reevaluation of nuclear and nucleolar changes induced in vitro by actinomycin D. Cancer Res. 31; 146-151.
- Ro T.S. y Busch H. 1964. In vitro labeling of RNA in isolated nucleoli of the Walter tumor and liver. Cancer Res. 24; 1630-1633.
- Rosen J.M. 1977. "Receptors and hormone actions". Editado por O'Malley B.W. y Bisbawner L. Academic Press. N.Y. pags. 237-263.
- Roux. 1985. Uber die bestimmung der hauptrichtungen des Froschembryo in E; und uber die erste theilung des froscheies. Ges. Anh. No. 20. p.p. 1-54.
- Samarina O.P., Kricheskaya A.A. y Georgiev G.P. 1966. Nuclear nucleoprotein particles containing messenger RNA. Nature (London). 210; 1319-1322.
- Sauer F.C. 1935. Mitosis in the neural tube. J. Comp. Neurol. 62; 377-405.
- Sauer F.C. 1936. The cellular estructure of the neural tube. J. Comp. Neurol. 63; 12-13.
- Sauer F.C. 1937. The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei. J. Morph. 60; 1-11.
- Sauer M.E. Chittenden A.C. 1959. DNA content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo; evidence for intermitotic migration of nuclei. Exptl. Cell Res. 16; 1-6.
- Sauer M.E. y Walker B.E. 1959. Radioautographic studies of interkinetic nuclear migration in the neural tube. Proc. Soc. Exp.Biol. Med. 101; 557-560.

- Saunders J.W. Jr. 1966. Death in embryonic systems. *Science* 154; 604-612.
- Scherrer K., Latham H. y Darnell J.E. 1963. Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in the HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 49; 240-248.
- Scherrer K. y Marcaud L. 1965. Remarques sur les ARN messagers polycistroniques dans les cellules animales. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47: 1697-1713.
- Schwartz R.J. y Wilde C.E. 1973. Changes in protein synthesis in the morphogenesis of Fundulus heteroclitus. *Nature* 245; 376-379.
- Sharma O.K., Hidregi E.J., Marks F., Prestayko A.W., Smetana K. y Busch H. 1969. Isolation and characterization of 60 S and 85 S RNA from nuclear fractions of Novikoff hepatoma cells. *Physiol. Chem. Phys.* 1(3); 185-209.
- Sibatani A., Dekloet S.R., Allfre V.G. y Mirsky A.E. 1962. Isolation of a nuclear RNA fraction resembling DNA in its base composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48; 471,
- Sidman R.L., Miale I.L. y Feder N. 1959. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Expl. Neurol.* 1; 322-333.
- Skoff R.P. y Hamburger V. 1974. Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 153; 107-148.
- Slevenin J., Gattoni R., Keohavong P. y Jacob M. 1982. Mild nuclease treatment as a probe for a non-random distribution of Adenovirus specific RNA sequences and of cellular RNA in nuclear RNP fibrils. *J. Mol. Biol.* 155 (3). 185-205.
- Spector D.L., Schrier W.H. y Busch H. 1983. Immunoelectron microscopic localization of SnRNP. *Biol. Cell.* 49; 1-10.
- Stelezner D.J., Martin A.H. y Scott G.L. 1973. Early stages of synaptogenesis in the cervical spinal cord of the chick embryo Z. *Zellforsch.* 138; 475-488.
- Swifth H. 1959. Studies of nuclear fine structure. *Brookhaven Symposia Biol.* No. 12; 134-152.

- Swifth H. 1962. "The interpretation of Ultraestructure".
Editado por Harris R.J.C. Academic Press N.Y. Vol
I pag. 213-218.
- Temin H.M. y Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase
in virons of Rous sarcoma virus. Nature (London).
226; 1211-1213.
- Underwood E.E. 1970. "Quantitative stereology". Addison-
Wesley Pub. Co. Massachusetts, pag. 23-30.
- Unuma T., Arendell, J.P. y Busch H. 1968. High resolution
autoradiographic studies of the uptake of uridina
into condensed and dispersed chromatin of nucleoli of
Novikoff hepatoma ascitis cells. Exp. Cell. Res.
52; 429-438.
- Unuma T., Senda R. y Muramatsu M. 1973. Mechanism of
nucleolar segretion. J. Electron Microscope. 22;
205-216.
- Valkov I. y Moyne G. 1974. Cytochimie ultraestructurale des
modifications du noyan de lymphocytes cultivés in
vitro en presence de phytohemagglutinne. J.
Microscopie. 20; 133-134.
- Vázquez-Nin G.H. y Sotelo J.R. 1966. Neurofibrillar
differentiation during embryonic growth. J. Comp.
Neurol. 138; 313-332.
- Vázquez-Nin G.H. y Bernhard W. 1971. Comparative ultraestructural
study of perichromatin and Balbiani ring granules. J.
Ultrastruct. Res. 36; 842-860.
- Vázquez-Nin G.H., Chávez B. y Tomas-Martin C. 1973. A
preferential staining method for chromatin in electron
microscopy. J. Microscopie. 26; 243-246.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverria O.M., Molina E. y Fragoso J.
1978. Effects of ovariectomy and estradiol inyection
on nuclear structures of endometrial epithelial cells.
Acta Anat. 102; 308-318.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverria O.M. y Pedron J. 1979 (a).
Ultraestructural and autoradiographic study of the
effects of bleomycin in the interphase nucleus
cultured normal cells. Cancer Res. 39; 4218-4223.

- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M. y Pedron J. 1979 (b). Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.* 35; 221-228.
- Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel J.A. y Echeverría O.M. 1980. Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell.* 39; 143-146.
- Visintini F. y Levi-Montalcini R. 1939. Relazione tra differenziacione strutturale e funziona di pollo. *Schwéiz. Archiv. Neurol. Psychiat.* 43; 1-45.
- Warner J.R., Soeiro R., Birnboim H.C., Girard M. y Darnell J.E. 1966. Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* 19; 349-361.
- Wassef M. 1979. A cytochemical study of interchromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.* 69; 121-133.
- Watson M.I. 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* 13; 162-167.
- Watson M.I. y Aldrige W.G. 1964. Selective electron staining of nucleic acids. *J. Histochem. Cytochem.* 12; 96.
- Wechsler W. 1966. Elektronemikroskopischer becter zur histogenese der weissen substanz des rucknmasts von huhnembryonen. *Z. Zellforsch.* 74; 232-251. (resumen en inglés).
- Westphal H. y Dulbeco R. 1968. Viral DNA in polysoma and SV-40 transformed cells line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59; 1158-1165.
- Yoshikawa M., Fukada T. y Kawada Y. 1964. Separation of rapidly DNA type and ribosomal RNA type components. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 15; 23-27.