



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

**Partículas Ribonucleoproteicas Intranucleares
Durante la Diferenciación Neuronal**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

PATRICIA ELENA HOPPENSTEDT ALFONSO

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

I DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

1) ESTRUCTURA:

El Sistema Nervioso está formado por una serie de órganos con funciones de relación entre el individuo y el medio que lo rodea, adecuando su comportamiento a las condiciones del ambiente; al mismo tiempo, hace posible la regulación de las funciones de los diversos órganos, respiratorio, digestivo, etc., para mantener la constitución del medio interno. Por esto, se divide en dos grupos: Sistema Nervioso de la Vida de Relación ó Cerebro-espinal y Sistema Nervioso de la vida Vegetativa ó Autónomo.

Desde el punto de vista anatómico consta de dos partes: Sistema Nervioso Central situado en el interior del cráneo y raquis y Sistema Nervioso Periférico. El Sistema Nervioso Central comprende el encéfalo y la médula espinal. El cerebro, cerebelo, pedúnculo cerebral, protuberancia y bulbo (encéfalo), se encuentran en el cráneo y la médula en el raquis.

El Sistema Nervioso de la vida de relación permite las relaciones del individuo con el ambiente. Estas se llevan a cabo a través de dos mecanismos principales: uno sensitivo-sensorial (que permite la información de lo que pasa en el medio externo) y otro motor (gracias al cual se establecen las reacciones necesarias para la protección del organismo). Para que sean posible éstas, es necesario que haya conducción, gracias a la especialización tan compleja del Sistema Nervioso y que entran en acción grupos de células -

nerviosas de función común. Desde el punto de vista anatómico, la célula nerviosa con sus prolongaciones es la Unidad del funcionamiento de todo este sistema, ya que el conjunto de neuronas forman el centro nervioso y sus prolongaciones constituyen las vías del Sistema Nervioso Central y los nervios periféricos.

2) ANATOMIA MACROSCOPICA:

En el hombre y en los vertebrados superiores la médula espinal es un cilindro de sustancia nerviosa que está rodeado por envolturas llamadas meninges y se encuentra alojado en el canal vertebral, extendiéndose desde el foramen magno o agujero occipital del hueso occipital, donde se continúa con el bulbo raquídeo, hasta el borde inferior de la primera vértebra lumbar.

En el comienzo del desarrollo embriológico, la médula se extiende hasta la extremidad inferior del sacro; posteriormente, la columna vertebral se alarga más rápidamente que la médula.

Tiene forma cilíndrica, aplanada sobre todo en la región cervical y con dos ensanchamientos: el cervical y el lumbar, ambos explicables porque a su nivel emergen las raíces que inervan los miembros superiores e inferiores. Debajo del engrosamiento lumbar, la médula se va estrechando rápidamente hasta terminar en forma de cono en el segmento denominado cono medular. El vértice de este cono es prolongado por el filum terminale que se extiende hasta el fondo del saco dural, fondo que se encuentra a nivel de la segunda vértebra sacra. El epéndimo, que es la pequeña cavidad que ocupa el centro de la médula, se prolonga hasta la parte superior de este filum terminale.

En la cara anterior de la médula espinal, se observa un surco mediano,

que se le conoce como surco medio anterior, y penetra en la sustancia medular; en él se extiende un pliegue de la piamadre que contiene la arteria surcocomisural. Lateralmente a éste, hay dos surcos denominados colateral anterior y paramediano anterior, del primero emergen las raíces anteriores. La cara posterior de la médula tiene una morfología análoga, el surco medio posterior, que sigue la línea media es menos ancho que el anterior y está en gran parte ocupado por el tabique neuróglico posterior. Se encuentran dos surcos laterales, el surco posterolateral, de donde nacen las raíces posteriores. En la parte superior medular se encuentra el surco paramediano posterior, entre el surco medio y el surco posterolateral.

El tejido nervioso está formado por neuronas y por otros elementos característicos: las glías. La proporción diversa de sus elementos constitutivos, células y fibras, así como el tipo de éstas hacen que el Sistema Nervioso conste de dos partes de aspecto diferente: sustancia gris y sustancia blanca. En la primera se encuentra el cuerpo de la neurona y en la segunda las fibras.

La sustancia gris, tiene en conjunto forma que se compara a la letra H; en cada rama vertical se consideran los siguientes segmentos: -un asta anterior relativamente voluminosa, de contorno festoneado que se dirige hacia adelante y afuera, sin alcanzar la superficie de la médula, y -un asta posterior que se dirige hacia atrás y afuera, acercándose más a la superficie de la médula. Esta es más fina, con contorno regular y aspecto no muy homogéneo. En su parte posterior se observa una zona de aspecto transparente, gelatinosa, que se conoce con el nombre de sustancia gelatinosa de Rolando; por detrás de ella, hay una fina capa de sustancia gris que se denomina capa zonal de Waldeyer. -Un asta lateral; ésta se observa en medula dorsal -

en la zona de unión de las astas anteriores y posteriores.

En médula cervical, en la zona que corresponde al asta lateral, se encuentra una formación constituida por bandas anastomosadas de sustancia gris denominada sustancia reticular de Deiters. Este aspecto se debe a que la - sustancia gris es penetrada por columnitas de sustancia blanca.

Uniendo las ramas dorsoventrales, se encuentra una rama transversal, que se conoce con el nombre de comisura gris. Esta tiene en su centro el conducto del epéndimo, que no es más que el resto de la amplia cavidad que po-seía la médula embrionaria.

La sustancia de las raíces anteriores y posteriores divide la sustan-
cia blanca en tres zonas o cordones: anterior, lateral y posterior.

El cordón anterior, tiene forma triangular, con la base anterior o -
ventral en contacto con la piamadre. En la región cervical tiene forma dife-
rente según se considere su parte superior o inferior, a nivel del ensancha-
miento cervical. El cordón posterior, tiene también forma triangular, con -
una base posterior periférica y vértice anterior en contacto con la comisura
gris. El cordón lateral se extiende en sentido anteroposterior entre las ra-
íces anterior y posterior, y transversalmente entre la sustancia gris y la -
periferia de la médula.

3) ANATOMIA MICROSCOPICA:

La sustancia gris está formada por neuronas, fibras nerviosas amielí-
nicas y por células neuróglícas.

Las células nerviosas de la sustancia gris de la médula han sido cla-
sificadas de distinta manera: desde el punto de vista funcional, Golgi las

clasificaba en motoras y sensitivas. Nissl las clasificaba por su estructura, considerando forma y disposición de la sustancia tigróide, en glicocromas, arquiocromas y esticocromas. Cajal, efectúa una clasificación basada en conexiones celulares y las llama células radicales, cordones, de cilindro corto o de Golgi tipo II y células de los ganglios raquídeos.

Se ha hecho otra clasificación basada en la disposición de las células mencionadas en la médula, de tal forma que éstas se disponen en la médula formando los núcleos de la sustancia gris, dicha clasificación se le conoce como topográfica.

4) ORIGEN:

El Sistema Nervioso se origina del ectodermo y el primer esbozo está representado por un espesamiento del mismo, situado en la parte dorsal del embrión, al que se le denomina neurectoblasto ó placa neural. Esta se desarrolla en sentido cefalocaudal en la zona suprayacente a la cuerda dorsal. La placa neural constituye el principal esbozo del Sistema Nervioso, pero no todo se origina a sus expensas, sino que interviene la cresta neural y las placodas para la formación del Sistema Nervioso Periférico.

En su evolución el esbozo del Sistema Nervioso pasa por varias etapas ó estados:

1.º- Estado de surco neural , sigue al de la placa neural y se produce por levantamiento y aumento de espesor de los bordes laterales de la placa neural y depresión de la parte media. Los bordes resaltan en la cara dorsal del embrión, constituyendo el pliegue neural,

2.º- Estado de tubo neural, se forma por el continuo proceso de hundi-

miento de la placa y el engrosamiento de los pliegues hasta que éstos se ponen en contacto y se fusionan. El cierre del tubo neural no se hace simultáneamente en toda la longitud del embrión; comienza en la parte media, a nivel del lugar que será el límite entre el bulbo y la médula, y se extiende en sentido cefálico y caudal.

3.º- Cresta neural, es un conjunto de células que aparecen en la unión de la placa neural primitiva con el ectodermo; se dispone a ambos lados del tubo neural, menos en la región cefálica. Estas células emigran en sentido ventral y al mismo tiempo se disponen segmentariamente, dando lugar posteriormente a los ganglios raquídeos.

4.º- Surcos laterales, a nivel de la región cefálica, la placa neural no forma un solo surco neural sino tres: uno medio y dos laterales (fosas ópticas, que se transforman en vesículas ópticas cuando se cierra el surco neural).

La médula espinal se origina a partir de la mitad posterior adelgazada del tubo neural primitivo. En un comienzo tiene forma aproximadamente cilíndrica, afinándose progresivamente en sentido caudal. En corte transversal presenta seis caras, de las cuales la ventral y la dorsal están menos desarrolladas, siendo en un comienzo la cavidad estrecha y alargada en sentido dorsoventral. La porción que crece más es la placa basal, origen de la parte motora de la médula; este crecimiento hace que aparezca una depresión en la parte media que será el surco medio anterior.

5) ORGANOGENESIS DE LA MEDULA ESPINAL:

La placa neural está formada al principio por un epitelio simple de

células prismáticas altas, en cuya parte superficial y profunda se describen membranas limitantes interna y externa. Posteriormente, aparece otro tipo celular; las células germinales de His, células esféricas que son las formas mitóticas de las células epiteliales. Las células epiteliales se dividen y originan células que se pueden comportar de dos maneras: las que persisten en su lugar de origen y vuelven a dividirse, y las células que no se multiplican más se hacen bipolares y emigran al lado opuesto del epitelio empujadas por células más jóvenes. De esta forma, el epitelio se estratifica al mismo tiempo que la placa neural se va transformando en tubo neural.

Las células emigradas tienen su núcleo en la parte media, por lo que queda una zona externa del epitelio que corresponde a la parte externa del tubo neural, a nivel de la cual no hay núcleos y que se conoce como zona = del velo marginal, llamado neuroespongio por His. Al proceder el desarrollo, la capa interna se adelgaza y las otras dos aumentan de espesor; haciéndose más escasas las mitosis en la primera

Según Del Río Hortega y su escuela (1921), existen las neuronas y las glías. Se puede aceptar que la célula germinal de His es el origen de las neuronas y que la célula originaria de las glías es el elemento bipolar que se desplaza hacia la superficie del epitelio.

Bailey y Cushing (1926), aceptan la existencia de una célula llamada por ellos meduloblasto, que da origen a los dos tipos de células, nerviosas y neuróglicas. Del Río Hortega (1921) niega la existencia de ésta y cree que de existir una célula con esta doble potencialidad sería el espongioblasto apolar, que puede originar astrocitos y oligodendrocitos, pero no neuronas.

La cavidad que está directamente tapizada por la capa endimaria, que en el adulto será el epéndimo, es en un comienzo grande y alargada en sentido dorsoventral y posteriormente se hace lanceolada, pasando por la forma de rombo. La forma se complica más tarde por el diferente desarrollo de las diversas partes que forman la médula. La cavidad se hace más pequeña por el mayor crecimiento de las capas marginal y del manto. La placa basal es la que primero se desarrolla y adquiere mayor volumen; en ella se diferencian los neuroblastos que van a constituir las neuronas radiculares motoras de la médula, cuyos axones se proyectan hacia adelante y abandonan la médula constituyendo la raíz anterior. Posteriormente, el asta anterior se ensancha y toma el aspecto festoneado que tienen en el adulto; este aumento se debe al crecimiento y multiplicación de prolongaciones de los neuroblastos, a la llegada de fibras que hacen sinapsis con otras células, al desarrollo de las glías, a la mielinización de las fibras y a la penetración y desarrollo de los vasos.

El asta posterior, se forma después del asta anterior cuando se diferencian las neuronas monopolares del ganglio raquídeo, cuyo axón envía su prolongación interna a la médula constituyendo la raíz posterior.

El velo marginal, tiene un desarrollo tardío, ya que depende de la aparición de fibras, algunas provenientes de neuroblastos medulares y otras de neuroblastos de otras partes del neuroeje. Las primeras fibras en aparecer son las fibras de asociación entre neuroblastos y las provenientes de células monopolares del ganglio raquídeo y que forman la raíz posterior y las últimas son las que vienen desde el cerebro, la vía corticoespinal y el haz piramidal.

6) HISTOGENESIS:

A.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

His, en 1883, realizó trabajos sobre la evolución de células nerviosas que posteriormente fueron confirmados por Ramón y Cajal en 1890 efectuados en embrión de pollo con el método de Golgi.

Estos trabajos en embrión de pollo fueron con objeto de estudiar las primeras etapas de la formación de la médula.

Altman (1881), Rauber (1886), Merk (1887) y Kölliker (1897) observaron elementos celulares alrededor de la cavidad endimaria y entre células epiteliales. Estos elementos fueron estudiados muy de cerca por His (1883) en embrión humano y nombrados por él células germinales; para His, éstos eran elementos específicos que dan origen a neuroblastos ó células nerviosas primitivas. His nunca observó los pasos intermedios entre células epiteliales y células germinativas sino de células germinativas a neuroblastos. Sin embargo, pudo constatar que a medida que el número de células epiteliales aumenta considerablemente, aparecen por diferenciación las células germinales.

His (1887) propuso que los elementos esféricos en camino de mitosis son las formas celulares indiferentes y aptas para procrear a la vez desde células epiteliales primitivas, y estuvieron de acuerdo con este punto de vista posteriormente Schaper (1897), Kölliker (1897) y Ramón y Cajal (1890). Así mismo observó que las células germinales en su división producen dos células diferentes: una continúa dividiéndose mediante mitosis ulteriores y la otra, incapaz de proliferar que es el neuroblasto. Ramón y Cajal (1909) sostenía que las células germinales evolucionaban en dos direcciones: para

llegar a ser células epiteliales embrionarias o espongioblastos.

En 1887 His describe tres zonas concéntricas cuando el canal medular se ha convertido en conducto por unión de sus bordes:

-Capa de columnas (formada por las extremidades internas alargadas y adelgazadas de las células epiteliales). En sus extremidades se encuentran cavidades con las células germinales.

-Capa de los núcleos o capa del manto y

-Capa del velo marginal; His supone que su aspecto esponjoso se debe al ensanchamiento del protoplasma del segmento externo de las células epiteliales.

His (1879) descubrió el neuroblasto, cuya función es la de originar las células nerviosas adultas; los describió con un cuerpo celular piriforme, con una extremidad gruesa que se voltea hacia el epitelio y que posee movimientos ameboides que le permiten abandonar la zona de las columnas y llegar a una zona intermedia entre la de los núcleos y la del velo marginal. Poseen un núcleo ovoide pobre en granos y redes de cromatina; un protoplasma finamente granuloso y una expansión única con protoplasma pálido. Descubrió que la prolongación periférica es el cilindroeje o axón de la futura célula nerviosa; esto fué constatado posteriormente por Ramón y Cajal (1909) en varios vertebrados.

Otros autores como Besta (1904), Held (1906) y Ramón y Cajal (1907) - con ayuda del nitrato de plata reducido, aportaron datos nuevos sobre la morfología y la estructura del neuroblasto en sus diferentes fases evolutivas. Held (1906) sostuvo que el retículo fibrilar primero engruesa y se localiza en un punto del protoplasma que se llama zona fibrilógena, durante la fase de célula germinal de His. Las neurofibrillas parten de esta zona fibrilóge

na para avanzar progresivamente hacia el polo distal y constituir el axón - primordial.

En 1906 Ziehen hizo otra interpretación de la histogénesis del sistema nervioso central de los vertebrados, la que sostiene que el tubo neural - está compuesto por células germinales de His, las que considera como únicas generadoras del tubo neural, dando origen a espongioblastos y neuroblastos. A las primeras las considera precursoras de las células de neuroglia.

Según F.C. Sauer (1935), la célula germinal no es una célula sui generis, sino una fase mitótica de la célula Indiferenciada. Posteriormente, es to fué confirmado mediante observaciones histológicas de S. Fujita (1960); - trabajos de Watterson y col. (1956); citofotometría de ADN, llevada a cabo - por M.E. Sauer y Chittenden (1959) y autorradiografía con timidina ³H de M. E. Sauer y Walker (1959); Sidman y col. (1959), Sidman (1961) y S. Fujita (1962).

H. Fujita y S. Fujita (1963) trabajaron en embriones de pollo de dife rentes horas de incubación en lóbulo óptico y telencéfalo. Observaron la o rientación de células matrices y neuroblastos en el lóbulo óptico y concluye ron que las células de la capa del manto han perdido su capacidad para sin te tizar ADN y su actividad mitótica. Este estudio, basado principalmente en - autorradiografía con timidina ³H, los llevó a la conclusión de que la capa - del manto está compuesta por neuroblastos exclusivamente. También observa ron que el cuerpo celular de la célula matriz está compuesto de citoplasma - escaso y un núcleo oval, cuyo eje mayor está dirigido desde la superficie in terna a la externa del tubo neural. Dicho núcleo está rodeado de una doble membrana y el material nuclear es homogéneamente granular fino y denso y con tene varios nucleolos. En el interior observaron varias partículas pequeñas

densas electrónicamente, de 15μ de diámetro, semejantes a ribosomas, que forman pequeños agregados. Observaron una ausencia de sistemas membranosos intracelulares en la periferia de células matrices. En pocas células observaron un área de Golgi pobremente desarrollada.

Estos autores estudiaron también las características de los cambios finos estructurales durante la diferenciación de los neuroblastos de células matrices mediante microscopía electrónica. Concluyeron que la estructura del retículo endoplásmico parece ser una de las características más importantes del neuroblasto por la que se puede distinguir de la célula matriz en las primeras etapas de la diferenciación. Ya en el neuroblasto más diferenciado, se observa un sistema de Golgi bien desarrollado y un incremento en ribosomas libres. Sostienen estos autores que la estructura interna del núcleo es casi similar a aquél de la célula matriz, homogéneamente denso con varios nucleolos. También describieron la estructura fina de la célula nerviosa en pollos y gallos domésticos adultos, demostrando que es bastante similar a la descrita para mamíferos por Palay y Palade (1955) y Hunjin (1959).

Varios neuroembriologistas clásicos, entre ellos His (1929), Held (1909) y Bailey y Cushing (1926), creyeron que algunos tipos celulares (célula germinal, meduloblasto, espongioblasto, neuroblasto, etc.), se encontraban en la capa matriz; sin embargo, análisis efectuados de la histogénesis basados principalmente en autorradiografía con timidina ^3H sugirieron la probabilidad de que la capa matriz solo contuviera una clase de célula, llamada célula matriz, la que origina el neuroblasto. S. Fujita y H. Fujita (1963) mediante estudios con micrografías electrónicas, concluyeron que sólo se encuentran células matrices en dicha capa con características estructurales finas uniformes de las células. Bellairs (1959) comunicó haber observado en

sus micrograffias electrónicas un proceso citoplásmico de un neuroblasto en la capa matriz de embrión de pollo muy joven. Sin embargo, esto nunca se ha podido comprobar.

B.- DIFERENCIACION DEL NEUROBLASTO.

En la diferenciación del neuroblasto, Cajal (1909) describió las etapas de neuroblasto apolar, bipolar, monopolar, multipolar y por último, la fase de modelación definitiva del neuroblasto.

El neuroblasto apolar, es una célula piriforme con el extremo interno engrosado. Se considera una célula en diferenciación neurocítica porque ha perdido la capacidad de dividirse, tiene un núcleo claro y vesiculoso y presenta neurofibrillas en su citoplasma. Es el neuroblasto primitivo de Held. Según Cajal, es capaz de fijar la plata, son muy abundantes en la retina y en la vesícula cerebral anterior en embriones de pollo de 56 a 60 horas. A veces se alargan a una gran distancia de la membrana limitante interna. Puede ser que las células apolares se alejen de su lugar de origen por elementos desplazados que presentan mitosis extraventriculares, según observaciones de Merk (1887) y Paton (1907).

El neuroblasto bipolar es una fase que no es constante; se presenta en vesícula cerebral anterior, retina y médula espinal. Se debe a la formación simultánea o casi simultánea de dos prolongaciones polares; transformación que se produce cuando la célula emigra progresivamente hacia la capa de los neuroblastos. La prolongación distal ó axón primordial es más gruesa, más oscura y más rica en fibrillas que la prolongación proximal por lo que pronto se diferencian netamente una de la otra. Una vez que los neuroblastos

bipolares se acercan a la membrana limitante externa, el axón gana rápidamente en diámetro y en longitud y presenta en su extremidad un espesamiento llamado cono de crecimiento. Por medio de este cono, el axón se alarga en sentido radial, pero cuando se acerca a la membrana limitante externa, toma dirección tangencial.

Cajal (1890) estudió los conos de crecimiento en embriones de pollo - muy jóvenes con el método de doble o triple impregnación cromo argéntica.

El neuroblasto monopolar se forma por desaparición de la expansión interna del neuroblasto bipolar o porque en el neuroblasto apolar aparece una prolongación externa que va a ser el axón. En este estadio se alarga considerablemente el axón.

La fase neuroblástica con su cono de crecimiento y su forma característica ha sido constatada en casi todo los vertebrados. Con el trabajo de Ramón y Cajal (1890) y con el de Lenhossek (1890) sobre la médula embrionaria del pollo, varios autores han aplicado con resultados positivos el método de Golgi para el estudio de neuroblastos. Retzius (1893), Lenhossek -- (1890), Van Gehuchten (1891) y Van der Stricht (citado por Ramón y Cajal) con embriones de peces; Slavunov (citado por Ramón y Cajal), Athias (1897) y Van Gehuchten (1891) con reptiles; Lenhossek (1890) y Kolliker (1890) con el hombre y mamíferos superiores.

Los neuroblastos son las células que más tarde se convertirán en neuronas, estableciendo conexiones con otros elementos celulares, proyectando largos filamentos, pero sin capacidad mitótica.

El neuroblasto monopolar se transforma en multipolar cuando se forman las dendritas, lo que sucede cuando el cilindroeje está próximo a su destino.

La neurona es la célula nerviosa adulta con sus prolongaciones: axón y dendritas. Desde Cajal (1890) y en oposición a los conceptos de la escuela alemana, se piensa que una neurona es una individualidad perfecta y que puede considerarse la unidad del sistema nervioso desde el punto de vista genético, morfológico, trófico, fisiológico y patológico.

Se han estudiado "in vivo" las neuronas grandes, sobre todo las ganglionares simpáticas y las motoras de la médula. Estas presentan un núcleo grande, redondo u oval, central, donde se encuentran uno o dos nucleolos. En el endoplasma hay gránulos que se disponen mas o menos concéntricamente, que son pequeños y alargados; hay también gránulos más grandes y menos numerosos, y neurofibrillas.

II NUCLEO INTERFASICO

El núcleo es el centro que controla la célula (tanto las reacciones como la reproducción). Contiene grandes cantidades de ácido desoxirribonucleico (genes). Los genes controlan las características de los péptidos del citoplasma y en esta forma rigen la actividad citoplasmática. Durante la mi tosis, el material cromatínico se ve con facilidad en forma de cromosomas. Durante la interfase, el material cromatínico se halla organizado en estructuras granulares y filamentosas.

El núcleo de los eucariontes contiene cantidades significantes de ácido ribonucleico (ARN) que está caracterizado por un rápido marcado. En 1961, este ARN fué separado en dos clases: ARN ribosomal (ARN_r) con una composición de bases rica en G+C y ARN con una composición de bases parecida al ADN (ARNd ó ARNm) (Georgiev, 1961; Georgiev y Mantieva, 1962a).

El método de fraccionamiento con fenol caliente ha sido descrito para la separación del ARNr y ARNd (Georgiev y Mantieva, 1962b) y recientemente - modificado para la obtención de ARNr nuclear con un alto peso molecular (Georgiev y col., 1972).

Desde 1962, numerosos trabajos muestran evidencia de la existencia de ARNm nuclear en todas las células eucariontes (Sibatani y col., 1962; Scherrer y col., 1963; Brawerman, 1963). Brawerman (1963) fraccionó el ARN nuclear con un tratamiento incrementando el pH. Sin embargo, este método es menos eficiente que el método de temperatura con fenol para purificar el ARNd del precursor ARNr, el cual claramente demostró la presencia de ARNd nuclear. Debido a que el ARNd nuclear recién formado tiene un alto peso molecular, puede ser separado del ARN citoplasmático y del pre-ARNr (Scherrer y col., 1963; Scherrer y Marcaud, 1965; Penman y col., 1966; Warner y col., 1966).

Varios autores han usado diferentes términos para designar al ARNd nuclear. En los primeros trabajos, se denominaba "ARN nuclear rico en AU" ó "ARNd" (Georgiev y Mantieva, 1962a, b). Posteriormente, el término "ARN heterogéneo", "heterodisperso" ó "ARNHn" se usó (Warner y col., 1966). Sin embargo, se puede utilizar el término "precursor del ARNm" ó "pre-ARNm", de una forma análoga a la que se usa pre-ARNr ó pre-ARNt.

El ARNd se caracteriza por un bajo contenido G+C por lo cual se parece al ADN total celular y es muy diferente al ARNr ó pre-ARNr, alto en G+C (Georgiev y Mantieva, 1962b; Georgiev y col., 1963; Brawerman, 1963; Samarina y col., 1965; Scherrer y Marcaud, 1965, 1968; Warner y col., 1966).

El ARNd posee altos pesos moleculares mientras que el ARNm citoplasmático no los tiene tan elevados. Se han hecho experimentos en donde se usa - el ARNm citoplasmático total (Brawerman y col., 1963; Penman y col., 1963; -

Georgiev y col., 1963) y ARNm individuales parcialmente purificados (Becher y Rich, 1966; Borun y col., 1967; Williamson y Askonas, 1967) mostrando que el tamaño del ARNm es apenas mayor que el calculado para el mensajero monocistónico de la proteína correspondiente.

Se ha sugerido que el ARNd gigante nuclear es un precursor del ARNm - citoplasmático, el cual se rompe en cadenas más cortas durante procesamientos nucleares (Samarina, 1964; Samarina y col., 1965a). Se han postulado mecanismos para el clivaje del ARNd gigante antes de transferirse en el presunto ARNm en el citoplasma (Samarina, 1964). Experimentos de hibridación ARN/ADN favorecieron esta idea. El ARNd nuclear se hibrida efectivamente con ADN mientras el ARN polisomal no marcado añadido al medio de hibrida, compete en un límite amplio por los sitios de ligante del ADN pero no por todos los sitios. Estos resultados sugieren la transferencia de alguna porción del ARNd nuclear al citoplasma (Georgiev, 1966; Arion y Georgiev, 1967; Scherrer y Marcaud, 1967). Sin embargo, se han hecho otros experimentos que han permitido concluir que no todas las secuencias del ARNd nuclear se transfieren al citoplasma (Stearer y Mc Carthy, 1967; Georgiev y col., 1972).

Se han hecho experimentos de competencia entre ARNd nuclear pesado (73-75 S) y ligero (10-20 S) y se ha observado que el ARNd pesado compete completamente con el ARNd ligero, mientras que el último, aun en exceso, únicamente inhibe en parte la híbrida del ARNd pesado y por tanto el ARNd ligero parece más similar al ARNm citoplasmático (Georgiev, 1966).

La hipótesis de que parte del ARNd nuclear pasa a ser ARNm citoplasmático, fué posteriormente comprobada mediante el uso de marcadores específicos, como virus que contienen ARN ó por el uso de marcadores en los extremos

terminales de ARNd. Este método tiene la ventaja de que la hibridación del ADN viral purificado permite una fácil detección de las secuencias del ARN - específico del virus.

Por último, la preparación del ADN antimensajero permitió una demostración inequívoca de la presencia de ARNm en el ARNd gigante nuclear. El descubrimiento de la transcriptasa inversa (Temin y Mizutani, 1970; Baltimore, 1970) que transcribe ARNm en ADN (Verna y col., 1972), permite la síntesis de poblaciones de ADN antimensajeros específicos. Imaizumi y col., (1972) trabajaron con ARNm de hemoglobina pura, preparando antimensajero y reportaron que parte de la molécula gigante es transferida al citoplasma y representa el ARNm verdadero.

Puede decirse por tanto que el ARNd gigante nuclear nascente es un precursor de alto peso molecular, por lo que debe designarse como pre-ARNm. Las secuencias degradadas en el curso de los procesamientos nucleares, pueden ser referidas como un pseudo-ARNm. El ARNd nuclear es una mezcla de pre-ARNm, algún ARNm maduro listo para el transporte al citoplasma y algo de pseudo-ARNm.

Después de cortos marcados con precursores radiactivos, el ARNd nuclear tiene la más alta actividad específica de las varias fracciones del ARN. Solo el pre-ARNr nucleolar alcanza una actividad específica tan alta. La rápida incorporación indica un alto porcentaje en la síntesis de ARNd dentro del núcleo (Harris, 1963).

Experimentos con actinomicina D muestran que la degradación del ARNd es en realidad compleja y probablemente tiene lugar en el núcleo, ya que muy poco ARN marcado aparece en el citoplasma de estos experimentos, (Gvozdev y Tikhonov, 1964; Gazaryan y col., 1966; Scherrer y Marcaud, 1968; Warner y col., 1966).

Los primeros estudios del núcleo con el microscopio electrónico se llevaron a cabo en membranas nucleares aisladas de ovocitos de anfibio, observándose los poros nucleares, lo cual está íntimamente relacionado con la permeabilidad de la envoltura nuclear.

Distintos problemas técnicos dificultaban el estudio de la ultraestructura del núcleo en las células superiores. Entre ellos, la disposición tridimensional compleja de los constituyentes nucleoproteicos, que no permitía interpretar fácilmente su estructura en cortes delgados y el hecho de que los ácidos no se ligan al tetróxido de osmio, generalmente usado en la fijación. La introducción de Ca^{++} en las mezclas fijadoras mejoró el grado de preservación e hizo posible reconocer la estructura microfibrilar de los cromosomas. Con el uso de acetato de uranilo se obtuvieron mejoras en el contraste, ya que tiene una afinidad 800 veces superior con los ácidos nucleicos que con las proteínas.

Actualmente, con el uso de acetato de uranilo y la aplicación de ciertos métodos extractivos, se puede diferenciar en el núcleo interfásico las regiones ricas de ADN de aquéllas en las que abunda el ARN.

El EDTA es un agente quelante que extrae los iones uranilo del ADN y permite destacar las regiones nucleares ricas en ARN, así como los ribosomas citoplasmáticos (Bernhard, 1969). Este método, complementado con otros de digestión enzimática, extracción selectiva y experimentos con drogas y tratamientos de temperatura supraóptima -que interfieren con la síntesis o degradación del ARN- hicieron factible la localización ultraestructural de las ribonucleoproteínas (RNP) en el núcleo.

Sobre esta organización estructural fina del núcleo interfásico, A. Monneron y W. Bernhard (1969) hicieron algunos estudios y describen los siguientes elementos nucleares:

-gránulos intercromatinianos (Granboulan y Bernhard, 1961; Ris, 1962; Swift, 1962).

-gránulos pericromatinianos (Bernhard y Granboulan, 1963; Swift, 1962; Watson, 1962).

-fibrillas pericromatinianas (Monneron y Bernhard, 1969).

-cuerpos espiralados (Monneron y Bernhard, 1969).

Los gránulos intercromatinianos aparecen en todas las células animales como agrupaciones de un diámetro promedio de 200-250 Å. No poseen relación topográfica especial con el núcleo o con poros nucleares. Están interconectados con fibrillas, por lo que aparecen como cadenas.

Smetana y col. (1963) y Shankar Narayan y col. (1967), trabajaron con núcleos aislados de tumores de Walker y de hígado, mostrando una red de RNP densas de fibrillas y partículas que se parecían a los gránulos intercromatinianos. Sugirieron que podrían representar el camino de migración del ARN nucleolar dentro del núcleo y asumieron que podría estar en relación con la síntesis de ARN 18S. Sin embargo, trabajos recientes muestran que los genes para el ARN 18S están localizados en el organizador nucleolar, en donde alternan con genes para ARN nucleolar 28S.

Moulé y Chauveau (1968) aislaron de núcleos de células hepáticas unas partículas ribonucleoproteicas 40S, conteniendo 10% por peso de ARN. Con un estudio ultraestructural y citoquímico del aislamiento de estas partículas, paso por paso, estos autores llegaron a la conclusión de que éstos eran pro-

bablemente los gránulos intercromatinianos. Las partículas aisladas, además de estructuras esféricas, contienen unas pocas barras elongadas de 400 Å aproximadamente. Sin embargo, las partículas aisladas no están interconectadas entre sí como los gránulos intercromatinianos 'in situ' están enlazados por fibrillas; es probable que durante su aislamiento sólo los gránulos se preserven, mientras que las fibrillas se pierden.

Samarina y col., (1968) aislaron una clase de partículas de RNP 30S - mostrando algunas semejanzas a las antes descritas y encontraron monómeros y polímeros.

Se cree que los gránulos intercromatinianos desde su descubrimiento, (Granboulan y Bernhard, 1961; Swift, 1959) contienen ARN, probablemente rodeados por una concha proteínica, la que los protege contra la hidrólisis de RNasa (Bernhard y Granboulan, 1963; Shankar Narayan y col., 1967; Smetana y col., 1971; Smetana y col., 1963).

Fakan y Bernhard (1971) sugirieron que esta estructura puede contener un ARN nuclear de marcado lento. Es posible que contengan pre-ARNm estable, el cual es rico en ARNm, pero esto es incierto. Estos autores, llevaron a cabo un estudio con uridina ^3H seguido por postincubaciones prolongadas. La aplicación simultánea de autorradiografía de alta resolución y la tinción preferencial de EDTA les permitió observar cercanamente las estructuras RNP nucleares en general y especialmente seguir los gránulos intercromatinianos, encontrando que hay una mayor frecuencia de marcado en agrupaciones de gránulos intercromatinianos en células después de largos períodos de incubación.

Los gránulos pericromatinianos (Watson, 1962) se encuentran en núcleos de células animales en cantidades variables siendo más raros y grandes que los gránulos intercromatinianos. Se han observado en la periferia de a-

gregados cromatínicos, aislados en el área intercromatínica, y en los canales adelante de los poros nucleares, en donde se cree que desaparecen; lo cual sugiere un posible papel en el transporte de información desde los genes hacia el citoplasma, (Monneron y Bernhard, 1969).

Varios argumentos se pueden citar en favor de esta hipótesis de trabajo. Se ha demostrado que estos gránulos son muy probablemente RNP. Monneron y Bernhard (1969) sostuvieron que la técnica que ellos emplearon revela que contienen un material fino fibrilar originado en la cromatina, en la superficie de la cual dicha transcripción se supone que ocurre, (Alfrey y col., 1966; Littau, 1964; Pogo, B.G.T. y col., 1968).

El método de contraste al EDTA revela más claramente su subestructura; parecen consistir en pequeñas fibrillas enroscadas de un diámetro promedio de 12-15 Å, (Vázquez Nin y Bernhard, 1971); lo cual contradice datos de estudios anteriores que sostenían un diámetro de 30 Å, (Monneron y Bernhard, 1969). Algunas de estas fibrillas parecen emerger de las partículas hacia la cromatina ó el área intercromatínica. En ocasiones, pequeños grupos de gránulos pericromatínicos parecen estar interconectados por un pequeño paquete de fibrillas.

Entre las diversas clases de portadores ribonucleoproteicos nucleares, Vázquez Nin y Bernhard (1971) han tenido particular interés en los gránulos pericromatínicos, ya que forman un grupo morfológico bien definido y se han encontrado en muchos tipos de células animales. Tienen una relación morfológica estrecha con los anillos de Balbiani en cromosomas gigantes de Dipteros, en donde se han acumulado considerables conocimientos concernientes a la genética y significancia funcional de los cromosomas (Beerman, 1962; Beerman y Bahr, 1954).

Los gránulos pericromatinianos se han descrito en núcleos de células de mamíferos como cuerpos esféricos de 300-500 Å de diámetro, la mayoría rodeados por un halo claro de 250 Å de ancho, (Monneron y Bernhard, 1969; Watson, 1962). Extracciones enzimáticas ó químicas (Bernhard y Granboulan, 1963; Monneron y Bernhard, 1969; Swift, 1962; Watson, 1962), indican la existencia de ARN en una voluminosa matriz de proteína.

El estudio de Vázquez Nin y Bernhard (1971), demostró la gran similitud entre gránulos pericromatinianos y anillos de gránulos de Balbiani, en cuanto a su tamaño, organización interna, comportamiento citoquímico, formación en contacto cercano con la cromatina, mismo comportamiento con extracciones enzimáticas y tinciones del microscopio electrónico; con lo cual se concluye que el volumen principal consiste de RNP. Sin embargo, los gránulos pericromatinianos están ligados a la estructura de la cromatina mientras que los otros rápidamente se desligan de ésta. Los gránulos de Balbiani rápidamente migran y cruzan los poros nucleares mientras que es más difícil demostrar ésto para los gránulos pericromatinianos. Los gránulos de Balbiani se originan de áreas bien definidas de los cromosomas, pero demostrar ésto es imposible para los gránulos pericromatinianos. Mediante autorradiografía (Peeling, 1959; 1972), se ha observado que los anillos de Balbiani rápidamente incorporan precursores de ARN.

Mediante métodos nuevos de tinción, se ha tratado de ver si los gránulos pericromatinianos contienen algo de ADN como se sugería anteriormente, (Watson, 1962; Watson y Aldrige, 1964; Wisse y Tates, 1968). Se ha aplicado una tinción aparentemente específica para las estructuras portadoras de ADN, descrita recientemente por Gautler y Schreyer (1970). Utilizando dicho método, Vázquez Nin y Bernhard (1971) no encontraron ningún contraste en gránulos

los pericromatínicos o de Baltiani, aunque la cromatina constantemente se teñía fuertemente. Sin embargo, aplicando pronasa, ambos tipos de gránulos pueden ser parcialmente digeridos y desaparecer si posteriormente se aplica RNasa, no así si se aplica DNasa. Después de aplicaciones de tinciones que proveen un alto contraste de portadores de ADN, los gránulos pericromatínicos no son visibles.

Las fibrillas pericromatínicas son componentes ribonucleoprotéicos nucleares que se encuentran en contacto con la cromatina periférica. La tinción apropiada para éstas es la misma que para los gránulos inter y pericromatínicos. El diámetro varía entre 30-50 Å y en muchos casos aparecen irregularmente caudadas. Algunas están envueltas dentro de gránulos con visible transición; en otros casos es imposible saber si los gránulos no son secciones cruzadas de fibrillas adelgazadas. Puede visualizarse la continuidad estructural entre gránulos intercromatínicos y fibrillas pericromatínicas, e incluso pueden observarse conexiones entre fibrillas y gránulos pericromatínicos.

Monneron y Bernhard (1969) sugieren que estas fibrillas pueden representar la expresión morfológica de la transcripción a lo largo de los sitios activos de las nucleohistonas.

Una combinación de microscopía electrónica y autorradiografía ha demostrado que el ARN marcado rápidamente es concentrado en las regiones que contienen las fibrillas pericromatínicas. Partículas aisladas 30 S frecuentemente contienen estructuras fibrilares vistas en el microscopio electrónico. Las fibrillas pericromatínicas bien pueden ser complejos ribonucleoprotéicos del reclén formado pre-ARNm y estar relacionadas con los informadores, (Monneron y Bernhard, 1969; Fakan y Bernhard, 1971).

Los cuerpos espiralados son agregados compuestos de filamentos espiralados, con un grosor que varía de 400-600 Å. Con EDTA (Bernhard, 1969) aparecen como agregados esféricos más o menos individuales de 0.3-0.5 μ . A gran aumento, parecen paquetes de pequeñas fibrillas de cerca de 50 Å de grosor, que están irregularmente enroscadas a lo largo del eje del filamento. Parecen no tener ninguna relación topográfica con el nucleolo, pero pueden encontrarse en contacto con la cromatina asociada decolorada.

Monneron y Bernhard (1969) y Vázquez Nin y Bernhard, (1971) sostienen que estos cuatro elementos descritos, son portadores de ARN y que los componentes granulares se transforman en fibrillas cerca de los poros nucleares, antes de dejar el núcleo.

El flujo de partículas de los cromosomas a los poros de la membrana nuclear es menos clara en el núcleo de células de mamíferos. Se han observado partículas ribonucleoproteicas cerca de los poros. Adentro de los poros, las estructuras granulares pueden ser convertidas en fibrillas pequeñas, (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez Nin y Bernhard, 1971), pero no hay evidencia de éstas en el citoplasma. Aún así el microscopio electrónico no permite describir los detalles del proceso de transporte.

Hace más de diez años, se pensó que los gránulos intercromatinianos y pericromatinianos podrían ser ribosomas, por contener ribonucleoproteínas y tener más o menos el mismo tamaño; pero hay diferencias que sugieren que ninguna de estas partículas son iguales a ribosomas citoplásmicos. Monneron y Bernhard (1969) y Bernhard (1966) describieron que los gránulos nucleares son más pequeños y de forma más irregular que los ribosomas. Más aún, ni las subunidades estructurales características de los ribosomas citoplásmicos

y ni la asociación en complejos como polisomas, se han observado en estas partículas intranucleares.

La demostración de que todos los componentes requeridos para la síntesis proteica (enzimas activantes, ARNt, polisomas, etc.) están presentes en el núcleo, constituía una evidencia indirecta de que el núcleo es un sitio de síntesis proteica. De hecho, muchas de estas sustancias se han identificado en núcleos aislados; sin embargo, puede ser el resultado de contaminaciones citoplásmicas. Así la mayor parte de los pasos en el ensamble de los ribosomas se cree que tienen lugar en el núcleo. Datos de Warner (1971) sugieren que la terminación del ribosoma puede ocurrir en el citoplasma y las estructuras nucleares pueden ser partículas precursoras ribosomales inactivas. El ARNm y ARNt son así mismo producidos en el núcleo como precursores que requieren procesos posteriores antes de asumir sus funciones usuales en la célula.

Es generalmente aceptado que hay una gran fracción de ARN nuclear que no abandona el núcleo (Darnell, 1968; Georgiev, 1967; Scherrer y col., 1970). Este ARN tiene un relativamente corto tiempo de vida y su mayor parte es degradado en el núcleo y convertido en material ácido-soluble (Darnell, 1968).

La persistencia del marcado nuclear por largos períodos de tiempo sugieren una reutilización de los productos del metabolismo del ARN ya sintetizado en el núcleo, ya que la mayor parte del ARN nuclear es metabolizado "in situ" y el tiempo de vida de este ARN es por lo general muy corto (Attardi, 1966; Penman y col., 1968; Soeiro y col., 1968).

Rovera y col., (1970) demostraron que aún después de cortos marcados con uridina, seguido por una larga postincubación, hay una fracción relativa

mente importante de ARN encontrada en el núcleo que permanece sin marca. Fakan y Bernhard (1973) encontraron radioactividad nuclear y nucleolar aún después de cuatro días de postincubación. Siendo el nucleolo metabólicamente muy activo en células de mamíferos, los resultados de estos autores sostienen la idea de que hay un almacén único de precursores para la síntesis de ARN nucleolar y ARN sintetizado en el nucleoplasma (Scherrer y col., 1970; Wu y Soeiro, 1971) y que este almacén puede ser usado para la síntesis de ambos tipos de ARN durante un largo período de tiempo. Sin embargo, no se tiene prueba directa para tal conclusión.

El papel central de los ribosomas en la biosíntesis proteínica está bien establecido y aún cuando muchos de los detalles concernientes a su función están oscuros, es claro que son constituyentes indispensables de todos los organismos vivientes. En eucariontes, la producción de estas partículas complejas ocurre en sitios celulares bien definidos: los nucleolos. El nucleolo es una localización cromosómica que contiene genes que codifican el ARN ribosomal y algunas si no todas las maquinarias enzimáticas requeridas para la síntesis, conversión y procesos de ensamble de proteínas, (Birnstiel, 1967; Perry, 1967).

Aun cuando la mayor parte de constituyentes del nucleolo es proteína, los pasos en el metabolismo de las proteínas y las relaciones entre proteínas y ARN no están tan bien definidos como el metabolismo del ARN. Evidencias recientes, sin embargo, indican que la mayoría de las proteínas de los ribosomas citoplásmicos están representadas en el nucleolo (Warner y Soeiro, 1967; Mundell, 1967).

Aún cuando los constituyentes químicos del nucleolo varían en cantida

des dependiendo del tipo celular y estado fisiológico, generalmente hay tres compuestos principales en fracciones nucleolares aisladas: ADN, ARN y proteínas (Vincent y col., 1966). Es probable que parte de este ADN no sea activo en el metabolismo del ARN nucleolar, sino más bien consiste en porciones cromosómicas adyacentes a las regiones del organizador nucleolar.

Análisis de fracciones nucleolares muestran que un número de especies de ARNs nucleolares están relacionados con la biogénesis de ARN ribosomal, - (Weinberg y col., 1967).

También se han descrito trazas de lípidos en fracciones nucleolares, (Finamore, 1961).

La forma y tamaño del nucleolo varía ampliamente dependiendo del organismo, tipo celular y estado fisiológico de la célula; aún así, exhibe dos regiones estructurales diferentes: una fibrosa y otra granular. En muchos nucleolos, estos dos componentes están más o menos entremezclados. Mediante diferentes técnicas de tinción, digestión enzimática y autorradiografía, se ha observado que ambos componentes contienen ARN y proteína y que el ADN activo está finamente disperso en el componente fibroso.

En secciones delgadas, la región granular parece contener numerosas partículas de 150-200 Å de diámetro. Algunos investigadores las han interpretado como regiones espiraladas delgadas de fibrillas de RNP (Kalnins y col., 1964; Shankar Narayan y col., 1966).

En algunos nucleolos se ha descrito una matriz proteínica amorfa, de baja densidad electrónica (Marinozzi, 1964).

El nucleolo puede estar rodeado por un anillo de cromatina Feulgen-positiva, que representa las porciones heterocromáticas del ó de los cromosomas asociados al nucleolo. Frecuentemente estas zonas de cromatina compacta

son continuas con la cromatina laxa intranucleolar. (Vázquez Nin y col., -- 1973).

La síntesis y el movimiento del ARN dentro de los dos componentes mayores del nucleolo han sido estudiados en varios organismos por autorradiografía. La síntesis de ARN se detecta primero en el componente fibroso que contiene ADN y marcado subsecuentemente aparece sobre el área granular. El marcado de la región granular concuerda razonablemente con la apariencia del precursor en la fracción nucleolar de células de mamíferos, (Granboulan y Granboulan, 1965; Simard y Bernhard, 1967; Weinberg y col., 1967).

Datos autorradiográficos y bioquímicos indican que el ARN 32 S está localizado en la región granular del nucleolo.

Experimentos de Wallace y Birnstiel (1966) en Xenopus y de Ritossa y Spiegelman (1965) en Drosophila proveen evidencia convincente de que el ADN complementario al ARNr está confinado a regiones del genoma encerradas en el organizador nucleolar. Birnstiel y col., (1966), aislaron cistrones de ARNr y por pesos moleculares encontraron que los cistrones se localizan en secuencias lineales.

Análisis de ARN de fracciones nucleolares indican que las especies de ARN más largas son las moléculas de 45 S, lo que sugiere que cada cistrón de ARNr en el locus nucleolar es transcrito como una unidad.

Los numerosos nucleolos extracromosomales que están presentes en ovocitos de anfibios inmaduros contienen más de la mitad del total de ADN del núcleo. Este gran incremento en la proporción del ADN nucleolar sobre el encontrado en células somáticas ha sido recientemente demostrado y representa una amplificación de aproximadamente 3000 cistrones de ARNr relativa al -

resto del genoma (Brown, 1966; Gall, 1968). Por otro lado, en diferentes tipos de células somáticas del pollo la misma proporción de genes que codifican ARNr se encontraron, aún cuando la proporción de síntesis de ARNr en estos tipos celulares varían en orden de magnitud (Ritossa y col., 1965). La amplificación genética no es la única forma por la que las células controlan la síntesis del ARNr.

La semejanza cercana en composición de bases entre ARN nucleolar y citoplásmico (Edström, 1960) fueron interpretados en término de un origen nucleolar para el ARNr. Perry (1960); Perry y col., (1961); Perry y Errera, (1960), sostienen que el ARN sintetizado en la región nucleolar puede ser un precursor del ARNr. Perry (1962, 1963) confirmó esta hipótesis mediante bajas dosis de actinomicina D que inhibe selectivamente la síntesis de ARN nucleolar y la síntesis del precursor ARNr.

Siebert y col., (1966); Liau y Hurlbert (1966) y Birnstiel y col., (1963) demostraron que el nucleolo contiene el aparato enzimático necesario para la polimerización del ARN y su subsecuente metilación.

Varias líneas de evidencia, incluyendo la cinética con actinomicina (Perry, 1962; Rake y Graham, 1964; Scherrer y col., 1963; Georgiev y col., 1963; Tamaoku, 1966; Kempf y Mandel, 1966), la inhibición selectiva de la formación del componente 45 S con dosis bajas de actinomicina D (Perry, 1962, 1964), la no formación de ARN 45 S en mutantes anucleolares de Xenopus que son incapaces de sintetizar ARNr (Brown y Gurdon, 1964) y estudios del patrón de metilación (Wagner y col., 1967), indican que el componente 45 S es el precursor inicial del ARNr.

No ha sido posible disociar el componente 45 S en piezas más pequeñas

bajo condiciones determinadas, favoreciendo el rompimiento de los puentes de H (Kempf y Mandel, 1966). Por eso, parece probable que el precursor 45 S sea una molécula continua covalente que contenga los componentes de ARNr. Esto sería compatible con el concepto de cistrones alternantes para el ARNr, - 18 S y el ARNr 28 S.

Estudios cinéticos detallados indican que los grupos metilo son derivados de la metionina por una transmetilación que ocurre en el nucleolo durante la transcripción del componente 45 S y que ocurre poca o ninguna metilación posterior del ARN (Greenberg y Penman, 1966; Muramatsu, Zimmerman y Holler, 1967).

Tamaoki y Mueller (1965) y Tamaoki (1966) aislaron el componente 45 S como una parte de un grupo heterogéneo de complejos ribonucleoproteicos, que tienen la misma densidad de carga efectiva que los ribosomas, conteniendo alguna proteína sintetizada recientemente y propusieron que podrían representar estadios iniciales en la formación de partículas ribosomales.

Detalles concernientes a la conversión de la molécula precursora 45 S en los componentes de ARNr 28 y 18 S se han obtenido con varios tipos de estudios. Uno de ellos se obtuvo en experimentos con marcadores, incluyendo a aquellos con incorporación de actinomicina D, en el que se observa un marcado secuencial del 45 S, después del 32 P, y finalmente de los componentes - 18 y 28 S (Rake y Graham, 1964; Scherrer y col., 1963; Perry, 1965). De estos estudios se concluyó que el paso inicial en la conversión del componente 45S ocurre en el nucleolo.

Se hicieron análisis del marcado de los ARNs de fracciones aisladas - nucleolares, nucleoplásmicas y citoplásmicas, obteniéndose una evidencia más convincente para este punto de vista, (Gall, 1966; Penman y col., 1966; Bush

y col., 1966). En estos casos, pudo observarse un marcado secuencial de ARN 45 y 32 S en series de fracciones nucleolares preparadas a partir de células marcadas en períodos diferentes. En algunos casos, muy poco ARN 18 S parece estar asociado con el núcleo, indicando que después del rompimiento de la molécula 45 S hay una salida rápida del componente 18 S al citoplasma (Gall, 1966; Penman y col., 1966). Esto está de acuerdo con la apariencia temprana del ARN 18 S marcado en el citoplasma, (Perry, 1964; Girard y col., 1964).

La resolución que se obtiene con técnicas de electroforesis gel acrílamida, ha revelado en preparaciones nucleolares la presencia de dos componentes menores de ARN, con un peso molecular intermedio entre el componente 45 y 32 S y otro componente un poco mayor que el componente 18 S, (Weinberg y col., 1967). Estos componentes menores pueden representar estadios intermedios de corto tiempo en el proceso de conversión.

Acerca de los estudios más detallados de los sitios de síntesis de proteínas ribosomales, se tienen los de Birnstiel, Flamm y col., (1964) en células de chícharos y tabaco. Estos estudios se basan en la separación mecánica del núcleo, subfracciones nucleares y citoplásmicas, seguido por extracciones diferenciales de varias fracciones proteínicas distintas. La composición de aminoácidos de la proteína de la fracción "residual" se asemeja grandemente a la de los ribosomas citoplásmicos. De estos y otros resultados, se dedujo que la proteína ribosomal se produce de acuerdo a la siguiente secuencia: proteína de la fracción "residual", proteínas de partículas ribonucleoproteicas nucleares y proteínas de ribosomas citoplásmicos. Sin embargo, debido a la relativa gran cantidad de síntesis proteica que ocurre simultáneamente en el citoplasma, es difícil excluir la posibilidad de -

que la proteína de la fracción residual sea originalmente sintetizada en el citoplasma y rápidamente transferida al nucleolo. Perry (1967) concluyó que por lo menos parte de la proteína ribosomal es sintetizada antes de su asociación con el ARNr en el nucleolo; ya sea que la proteína sea sintetizada en el citoplasma y rápidamente transportada al nucleolo, ó en el nucleolo - por algún único mecanismo no determinado.

Otros experimentos sugieren que el nucleolo es un sitio de ensamble, pero no un sitio de síntesis para proteínas ribosomales, (Prescott y Bender, 1962; Zalaokar, 1960; Errera y col., 1961; Suskind, 1965; Stenram, 1964). Sin embargo, Vincent (1964) y Maggio (1966) sostuvieron que los nucleolos aislados son también capaces de realizar la síntesis polipeptídica. Aún así, - nadie ha localizado esta actividad en una fracción particular, por lo que es razonable suponer que si las proteínas ribosomales son sintetizadas en el nucleolo, el mecanismo puede ser enteramente diferente de aquél que se opera en la síntesis de proteína citoplásmica.

Han habido numerosas comunicaciones, comenzando con el trabajo de Alfrey, Mirsky y colaboradores (1961) que sostienen la capacidad de síntesis proteica de núcleos aislados que no parecen ser debidas a contaminación citoplásmica (Ficq y Errera, 1959). En algunos casos, esta actividad pudo ser atribuída a partículas ribosomales del núcleo (Frenster y col., 1961; Pogo y col., 1962). Hay algunas indicaciones de que estos ribosomas pueden utilizar ADN tanto como ARN, como una matriz directa para la síntesis proteica, (Frenster y col., 1961; Naora, 1966), pero hasta ahora no hay evidencia que los implique en la síntesis de proteína ribosomal.

Estudios en células de mamíferos cultivadas (Warner, 1967) y levadura (Vincent, 1966), sugieren que hay un conjunto de proteína preformada capaz -

de combinarse con ARNr recién formado y consecuentemente responsable del hecho de que un inhibidor de síntesis proteica no inhiba inmediatamente la síntesis del ARN 45 S y su transformación en ARN 18 y 28 S de partículas citoplásmicas.

Observaciones de Warner y Soeiro (1964); Liau y Perry (1968); Perry y Kelley (1966a); Perry (1967); Perry y Kelley (1968), sugieren que hay un progresivo cambio conformacional durante la maduración de subunidades ribosomales de una larga cadena extendida ribonucleoproteica, en partículas relativamente compactas. La cantidad de subunidades, especialmente pequeñas, que existen en el núcleo, afuera del nucleolo, es muy pequeña, sugiriendo que cuando subunidades recién formadas salen del nucleolo pasan muy poco tiempo en el nucleoplasma. Cuando alcanzan el citoplasma las subunidades, son rápidamente combinadas con el ARN mensajero e incorporadas en polirribosomas, (Perry y Kelley, 1968). Otros estudios de Perry (1965), Girard y col., (1965) y Kleinfeld y Perry (en preparación), sugieren que las subunidades grandes, una vez que alcanzan el citoplasma son más rápidamente incorporadas en polirribosomas que las subunidades pequeñas.

OBJETIVOS

Las partículas ribonucleoproteicas se encuentran en el núcleo y pueden cambiar de forma y salir de él (Monneron y Bernhard, 1969; Vázquez Nin y Bernhard, 1971). Estas partículas ribonucleoproteicas son el resultado de la expresión genética, así como el proceso de diferenciación celular. Este estudio tiene como objeto ver los cambios que sufren las partículas RNP durante el proceso de diferenciación celular, ya que al haber variaciones en la expresión génica durante la diferenciación celular puede pensarse que estas variaciones también afectan la formación de dichas partículas durante este proceso.

Para este estudio tomamos el neuroblasto de un organismo superior por ser una célula que se ha estudiado bien y que se puede seguir fácilmente durante su diferenciación celular (His, 1879, 1883; Cajal, 1890, 1909; Held, 1906; H. Fujita y S. Fujita, 1963).

Este estudio proporciona datos morfológicos detallados del núcleo del neuroblasto durante su diferenciación, ya que se conocen bastante los cambios en el citoplasma durante dicho proceso, (H. Fujita y S. Fujita, 1963), más no los del núcleo. Para lograr esto, se empleó la técnica de Barnhard (1969) método de tinción que resalta ultraestructuralmente el contenido ribonucleoproteico celular.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron embriones de pollo de 0, 23-26, 26-29, 33-38, 40-45 y 70-72 horas de incubación y de 4, 4.5-5, 5-5.5, 8, 12, 19-20 y 20-21 días de incubación.

En los embriones de pocas horas de incubación, la fijación se realizó en dos formas:

a) -Por inmersión: El embrión se pasa a una solución lavadora (salina isotónica) y posteriormente a la solución fijadora. Se disecciona la médula y se separa la porción cervical, que se corta en pequeños trozos perpendiculares al eje medular.

b) -Por goteo: Este método, como su nombre lo indica, consiste en gotear con la solución fijadora directamente el blastodisco y posteriormente separar éste y diseccionarlo y seccionarlo en la solución fijadora.

Los embriones mayores de 8 días de incubación se fijaron "in situ" - por perfusión. Una vez que se ha extraído el embrión del huevo, se pasa a una solución Ringer y se disecciona dejando el corazón al descubierto. Se introduce una aguja por ventrículo izquierdo con la solución lavadora y se hace un corte en aurícula derecha. Pasado un minuto aproximadamente, se continúa perfundiendo la solución fijadora. Cuando el organismo se observa endurecido por el fijador, se separa médula cervical que se sumerge en el fijador y se secciona en trozos pequeños perpendiculares al eje medular.

Los fijadores utilizados fueron:

-Glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído al 4% disueltos en cacodilato

0.2 M a pH 7.3.

-Glutaraldehído 2.5% amortiguado con cacodilato 0.2 M a pH 7.3.

Todo el material se procesó para su estudio con el microscopio electrónico de la siguiente forma:

I Deshidratación en alcoholes de concentraciones crecientes:

- 2 cambios de 20 minutos c/u en alcohol 70%
- 20 minutos en alcohol 80%
- 20 minutos en alcohol 96%
- 2 cambios de 20 minutos c/u en alcohol 100%
- 2 cambios en óxido de propileno, el 1o. de 30 minutos y el 2o.

de 20.

II Preinclusión de 12 a 34 horas en una mezcla de propileno y Epon, en proporción 1:1.

III Inclusión en Epon. El Epón se preparó de la siguiente manera:

Epon 812.	10.13 grs
DDSA	6.25 grs
MNA	5.56 grs
DMP33 ml

IV Polimerización en una estufa a 60°C.

Se hicieron cortes semifinos y ultrafinos en un ultramicrotomo MT1 de la casa Sorvall ó en un Ultratome I de LKB.

Los cortes semifinos de media micra a una micra de espesor se colorearon con azul de toluidina al 1% disuelto en bórax al 1% y se observaron con el microscopio óptico, para localizar las regiones de especial interés y hacer los cortes ultrafinos para microscopía electrónica.

Las fotografías ópticas fueron tomadas con un microscopio Axiomat de la casa Carl Zeiss, provisto con óptica plana apocromática.

Los cortes ultrafinos, de 80 a 100 nm de espesor se montaron en rejillas de cobre cubiertas por una capa de formvar y se contrastaron según la técnica de Bernhard (1969).

- 1 minuto de uranilo
- de 12 a 23 minutos de EDTA
- de 2 a 4 minutos de plomo

Estas preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Zeiss EM9-A.

RESULTADOS

I - Embriones sin incubar (0 días):

Se observa una gran variabilidad en el grado de desarrollo debido a que el tiempo que permanecen en el oviducto no es constante. En esta etapa, los embriones son didérmicos. La capa inferior correspondiente al hipoblasto presenta células polimórficas laxamente dispuestas cargadas de gránulos vitelinos; mientras que en la capa superior ó Epiblasto, las células se agrupan en una lámina epitelial de células cilíndricas formando el ectodermo primitivo pregastrular. Los núcleos de esta capa aún indiferenciada han sido usados en nuestro estudio. Las observaciones de cortes semifinos coloreados con azul de toluidina (Fig. 1a), demuestran la existencia de nucleolos enormes únicos o múltiples. Esto se corrobora con la técnica para RNP en las micrografías electrónicas (Fig. 1b), donde además se observa que los nucleolos pueden tener una constitución laxa, lo que sugiere una alta actividad sintética, o bien presenta extensas zonas débilmente positivas ó negativas con la técnica de contraste de las RNP, (Fig. 1c). Se encuentran también otras estructuras RNP como gránulos intercromatinianos dispersos entremezclados con fibrillas (Figs. 1b, 1c, 1d). No se observan típicos gránulos pericromatinianos ni áreas de cromatina compacta. Esto sugiere que predomina la eucromatina en todo el volumen nuclear, lo que explica la dispersión de los elementos fibrogranulares no nucleolares. Son frecuentes las invaginaciones de la membrana nuclear.

II - Embriones de 20-24 hrs. de incubación (Estadio 6 de Hamilton y -

Hamburger, 1951).

En estos embriones se estudió la zona del neuroectodermo correspondiente a la región comprendida entre el 3o. y 7o. somite. Esta porción es la que se continuará estudiando a lo largo de este trabajo, pues es la que se diferenciará en región cervical de la médula espinal. En estos embriones, (Fig. 2a), se aprecia el surco neural abierto formado por un epitelio polies tratificado, en el que existen células redondas en mitosis cercanas a la cavidad, las células de His; (Fig. 2b). Al microscopio de luz, el nucleolo continúa siendo prominente, pero las micrografías electrónicas lo muestran nucleolonemal y fuertemente positivo para RNP. Es notable la presencia de cuerpos esferoides paranucleolares de estructura fina fibrogranular delicada, que se contrastan un poco menos con la técnica del EDTA, (Figs. 2c y 2d). Las partículas ribonucleoproteicas no nucleolares son moderadamente abundantes y homogéneamente distribuidas salvo los gránulos pericromatinianos que están ausentes.

III - Embriones de 33-38 hrs de incubación, (Estadio 10).

En estos embriones se observa el cierre del surco neural en la región cervical, (Fig. 3a), y su transformación en tubo, (Figs. 3b y 3c). Las células matrices que forman el grueso epitelio del tubo neural en estas etapas, (Fig. 3c) son alargadas con un extremo en contacto con la basal que separa el epitelio del mesénquima y otro llegando hasta el epéndimo, los núcleos dispuestos en varias filas, pero sin presentar diferenciaciones citoplasmáticas. El núcleo presenta los mismos aspectos descritos para la etapa anterior. No obstante en estas etapas se continúa acumulando polirribosomas citoplásmicos no asociados a membranas.

IV - Embriones de 70-72 horas de incubación, (Estadio 19).

Se observan claros síntomas de diferenciación citoplásmica como son el notable desarrollo de las membranas del retículo endoplásmico, la mayoría de las cuales presentan ribosomas adheridos y la formación de áreas claras - libres de ribosomas en donde se ha demostrado comienza la síntesis de las neurofibrillas, (Vázquez Nin y Sotelo, 1966). Estos cambios permiten definir a estas células como neuroblastos y distinguirlas de las células matrices que eran hasta ahora las únicas existentes. Los núcleos de las células matrices permanecen junto al epéndimo así como los elementos redondeados en mitosis ó células de His; mientras que los de los neuroblastos forman las capas más cercanas a la basal. Esta capa poco a poco se constituye en la llamada capa del manto, futura sustancia gris de la médula. Esta disposición permite tener una idea dinámica de la diferenciación de las células estudiando las etapas iniciales cerca del epéndimo y las finales en la periferia, en la capa del manto cerca de la zona de prolongaciones celulares o velo marginal, que comienza a reconocerse. La coexistencia de varias etapas de diferenciación de neuroblastos en un mismo corte de médula cervical se mantiene aproximadamente entre 3 y 8 días, momento en que comienzan a diferenciarse las glías.

Las células matrices que comienzan su diferenciación, (Fig. 4a) presentan numerosos nucleolos accesorios y gotas nucleolares dispersas en el citoplasma. Este aumento de la actividad nucleolar es seguido de la aparición del retículo endoplásmico rugoso abundante, (Fig. 4b), en neuroblastos bipolares de capas nucleares intermedias. Fuera de los nucleolos, se encuentran acúmulos de gránulos intercromatinianos pequeños que ocupan extensas zonas -

de límites imprecisos en la parte central del núcleo, mientras que en la periferia predominan gránulos gruesos y pequeños acúmulos de origen nucleolar migrando hacia la membrana nuclear, (Figs. 4b y 4c). En la figura 4d se ilustra un neuroblasto multipolar perteneciente también a un embrión del estadio 19, en el que se aprecian regiones citoplasmáticas de límites precisos ocupados por cisternas rugosas del retículo endoplásmico y ribosomas no unidos a membranas. Estas regiones son el esbozo de los grumos de Nissl de la futura neurona. Entre ellas existen regiones claras alargadas en donde las técnicas de contraste habituales demuestran la existencia de fibrillas paralelas que constituyen las primeras zonas con neurofibrillas que se disponen como en la neurona diferenciada. La imagen nuclear de este neuroblasto con avanzada diferenciación citoplasmática no difiere mucho de la de los neuroblastos bipolares más primitivos. Solamente podemos señalar que a pesar de presentar nucleolos múltiples la importancia relativa de este organoide ha disminuído mucho. Conviene resaltar que en esta estadio el axón de estos neuroblastos no ha establecido aún sus conexiones sinápticas periféricas ni ha recibido los contactos de cilindroejes de interneuronas medulares, ni de las vías descendentes largas.

V - Embriones de 4 días en adelante (Estadio 25- nacimiento).

En el estadio 25 ya se observan en la médula cervical las tres capas clásicas, la capa germinativa (cg); la capa del manto (cm) y el velo marginal (vm), (Fig. 5a). La figura 5b, muestra la zona donde fueron tomadas las micrografías electrónicas de las dos siguientes láminas. Como se puede apreciar, dicha zona ocupa la región de las células más cercanas al epéndimo, los neuroblastos bipolares y neuroblastos multipolares de la capa del manto,

Las células matrices periependimarias no diferenciadas presentan citoplasma en el que predominan los monosomas y carece de membranas del retículo endoplásmico rugoso. El núcleo muestra un nucleolo de tamaño moderado y una enorme cantidad de fibrillas RNP, siendo este el momento de mayor concentración de estos elementos, (Fig. 6a). En la figura 6b, se ilustra una célula matriz situada en una capa inmediatamente más profunda que la anterior, que ya ha comenzado su diferenciación en neuroblasto. En ella el citoplasma no presenta diferencias con el anterior pero en el núcleo se observa un enorme aumento de estructuras nucleolares sobre todo construídas por nucleolos accesorios, la densidad de fibrillas RNP disminuye y poco a poco predominan los gránulos intercromatinianos. En la Fig. 6c y 6d se ven dos neuroblastos bipolares sucesivamente más lejanos del epéndimo y por lo tanto más diferenciados. Se reconocen como neuroblastos por la presencia de láminas del retículo endoplásmico rugoso que son características y el aumento de los polirribosomas. El núcleo se agranda notablemente, las estructuras RNP están menos densamente dispuestas, los nucleolos múltiples continúan indicando una gran actividad en la síntesis de ARN ribosomal y los granos intercromatinianos predominan sobre las fibrillas.

Las etapas siguientes de la maduración del neuroblasto están ilustradas en las figuras 7a, b y c por células que son contiguas con las anteriores pero cada vez más alejadas del epéndimo. Se observa una pérdida importante de los nucleolos accesorios y una disposición de los gránulos intercromatinianos semejante a la descrita en los neuroblastos bipolares de los embriones de 70-72 horas de incubación (Estadio 19). La sucesión de aspectos aquí descritos se pueden encontrar en la médula de cualquier embrión entre los 3 y 8 días de incubación, pues en estas edades se produce continuamente

la transformación de células matrices en neuroblastos y la maduración de éstos. Sin embargo, el grado de maduración final que alcanza el neuroblasto multipolar va siendo cada vez mayor a medida que establece sus conexiones periféricas y centrales. Es así que al comparar la figura 7d en donde se muestra un neuroblasto multipolar de la capa del manto de un embrión en el estadio 25 con la figura 4d, vemos que en la mencionada en primer término se observa mayor cantidad de RNP con predominio de fibras, grupos de gránulos intercromatinianos más definidos y aparecen dos granos pericromatinianos, mientras que la otra presenta una disposición de los elementos RNP similar al de los neuroblastos bipolares.

En la Fig. 8a se muestra un corte transversal de médula de la que las sustancias gris y blanca están bien definidas. Las células periependimarias son abundantes pues están produciendo los glioblastos. Los núcleos de las células gliales se advierten tanto en la zona gris como en la blanca, aunque son todavía escasas y la mielinización aún no ha comenzado. Los vasos sanguíneos aparecen con su luz clara y dilatada debido a la perfusión del fijador. En un embrión cercano al término (Fig. 8b), las células situadas rodeando al epéndimo son las pertenecientes al epitelio ependimario definitivo. La gliogénesis ha cesado y se puede observar en la gruesa capa blanca, abundantes glías y signos de la mielinización. En este período la formación de neuroblastos ha cesado pero la diferenciación de las neuronas continúa. En las figuras 9a, b y c, observamos núcleos de neuronas pertenecientes a embriones de edades crecientes en las que se observa la tendencia de los gránulos intercromatinianos a formar acúmulos definidos, (Figs. 9a y b), que no se ven en etapas anteriores. En motoneuronas de embriones cercanos a la salida

del cascarón, (fig. 9c), existen 1 ó 2 nucleolos, abundantes fibrillas, gránulos intercromatinianos dispersos y gránulos pericromatinianos numerosos, - características éstas de los núcleos de las neuronas grandes del animal adulto.

DISCUSION

De los resultados obtenidos en micrografías de embriones de pollo de 0 horas de incubación, puede pensarse que el núcleo es activo y las frecuentes invaginaciones de la membrana nuclear pueden indicar un intercambio activo entre el núcleo y el citoplasma, ya que hay aumento en la superficie. Los nucleolos grandes de este estadio indican gran cantidad de síntesis de ARNr, ya que en esta época el ciclo celular es muy corto.

En embriones de 24 horas de incubación, correspondiente al estadio 6 de Hamilton y Hamburger, destaca el hecho de la presencia de acúmulos con granos más pequeños a los del nucleolo, que permiten pensar que no constituyen un cuerpo de naturaleza nucleolar; aunque en algunas células hay relación de contigüidad con el nucleolo. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que este corpúsculo fuera una parte del nucleolo que tuviera menos ácidos nucleicos y más proteína.

En etapas de 70-72 horas de incubación, puede pensarse que hay mucha síntesis proteica de muy diversos tipos, ya que no hay cromatina compacta. Esto coincide con la síntesis de neurofibrillas del citoplasma y con una gran actividad mitótica.

En los estadios donde se observan en el núcleo nucleolos múltiples, la actividad nucleolar es muy alta, la célula requiere de una gran cantidad de ribosomas y está sintetizando pre-ARNr. También se observa que a medida que aumentan los ribosomas citoplásmicos, van disminuyendo los nucleolos accesorios.

En micrografías de embriones de 5 días de incubación, se observa que hay vasos, lo cual indica que ya podría realizarse la perfusión.

A los 5 y medio días de incubación, se observa un núcleo grande más claro que en estadios anteriores, por lo que se puede pensar que tiende a una menor actividad en la producción de partículas RNP.

Es apreciable también que antes de la aparición de neurofibrillas y neurotúbulos, la morfología nuclear cambia; aumentan los gránulos intercromatinianos, aparecen zonas claras de cromatina compacta así como los gránulos pericromatinianos.

Estas observaciones indican la existencia de dos etapas de evolución con signos nucleares previos a la aparición de las primeras diferenciaciones citoplasmáticas:

1o. la síntesis de ácido ribonucleico pre-ribosomal en el nucleolo seguida de la acumulación de ribosomas citoplasmáticos y

2o. la síntesis rápida de partículas que contienen probablemente ARN informacional que precede a la síntesis de proteínas citoplasmáticas específicas.

Hay tres etapas fundamentales en la citodiferenciación de la neurona: la primera de multiplicación, correspondiendo a la célula epitelial indiferenciada (Cajal, 1909) o célula matriz (Fujita, 1960); la segunda de crecimiento citoplasmático correspondiente a las etapas de neuroblasto bi, uni y multipolar, (Cajal, 1909) y la tercera de maduración coincidente con el establecimiento de los contactos aferentes y eferentes de la neurona. Las dos primeras se caracterizan por la elevada síntesis de gran variedad de proteínas citoplasmáticas no específicas de esta línea celular, mientras que en la tercera aparecen las proteínas específicas de las neuronas. Desde el punto de

vista de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares, las dos primeras etapas se caracterizan por nucleolos múltiples y grandes, numerosas fibrillas y gránulos intercromatinianos dispersos. Es de hacer notar la distribución de estos elementos en forma homogénea dentro del espacio nuclear y la falta de heterocromatina. En la última etapa disminuye el nucleolo y las fibrillas, aparecen áreas de heterocromatina y gránulos pericromatinianos. Estas últimas estructuras se piensa que contengan ARN, (Beerman, 1962; Vázquez Nin y Bernhard, 1971; Puvion y col., 1977). No obstante, su comportamiento frente a los cambios drásticos de la expresión génica no es semejante en los distintos sistemas, pues a veces permanecen inalterados, (Petrov y Bernhard, 1971), y a veces aumentan en número cuando la transcripción disminuye (Moyné y col., 1977; Puvion y col., 1977; Vázquez Nin y col., 1978). Las observaciones del presente trabajo permiten relacionar la aparición de dichos gránulos con una disminución de la velocidad de la transcripción coincidente con la terminación del crecimiento rápido de las prolongaciones celulares, lo que favorecería la hipótesis de estos gránulos, como una especie de almacén de ARN en equilibrio entre síntesis y la migración del mismo hacia el citoplasma, (Vázquez Nin y col., 1978).

La aparición de estos gránulos en los neuroblastos multipolares de embriones de más de 4 días de incubación, es evidentemente posterior a la aparición de los microtúbulos y microfibrillas que componen las neurofibrillas, (Vázquez Nin y Sotelo, 1966), y a la formación de las cisternas rugosas típicas de los grumos de Nissl. Estos hechos sugieren que su presencia no se debe a la simple expresión de los genes relacionados con estas estructuras,

En conclusión, las variaciones cualitativas más importantes de las

partículas ribonucleoproteicas intranucleares se producen durante la diferenciación de los neuroblastos en el momento de que éstos disminuyen la velocidad de síntesis proteica y por lo tanto se altera el equilibrio dinámico entre transcripción y transporte al citoplasma del ARN. En esta situación ci-tofisiológica aparecen los gránulos pericromatinianos, lo que nos permite ap-ortar más pruebas a la hipótesis que sostiene que dichas estructuras exis-ten en equilibrio entre la transcripción y el transporte.

CONCLUSIONES

- 1.- En embriones con poco tiempo de incubación, se observan grandes nucleolos de constitución laxa, así como nucleolos accesorios, lo que indica una alta actividad sintética.
- 2.- En embriones que se encuentran en etapas finales de incubación, se observa que el núcleo se estabiliza, no habiendo ya nucleolos accesorios y las partículas RNP se observan en menor cantidad que en células matrices y neuroblastos.
- 3.- La aparición en el citoplasma del retículo endoplásmico rugoso, es claro indicio de diferenciación de células matrices a neuroblastos.
- 4.- Los gránulos intercromatinianos y las fibrillas pericromatinianas se observan en gran cantidad en células no diferenciadas, encontrándose en menor cantidad en células ya diferenciadas.
- 5.- Los gránulos pericromatinianos aparecen durante la diferenciación del neuroblasto en el momento en el que disminuye la síntesis proteica, es decir, cuando se altera el equilibrio entre transcripción y transporte de ARN al citoplasma.
- 6.- Es posible encontrar todas las etapas de diferenciación de la neurona en un mismo embrión de pollo, entre los 3 y 8 días de incubación.

Plancha No. 1: Embrión sin incubar (0 horas).

Fig. 1a:

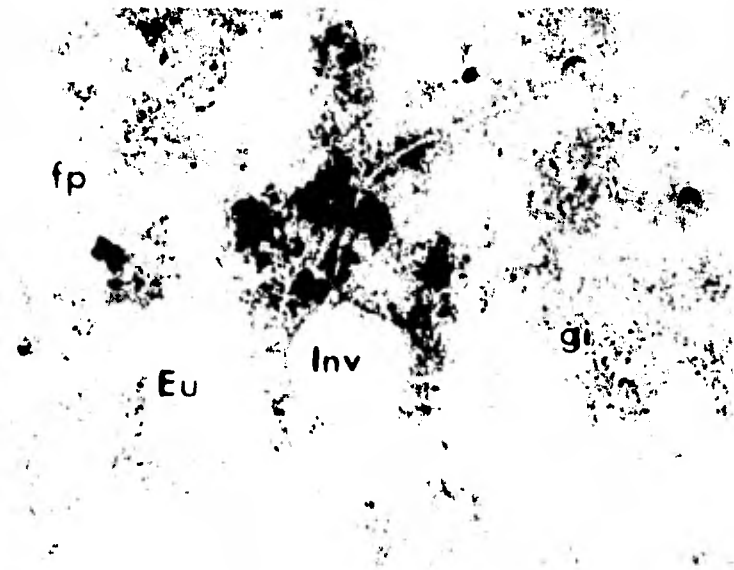
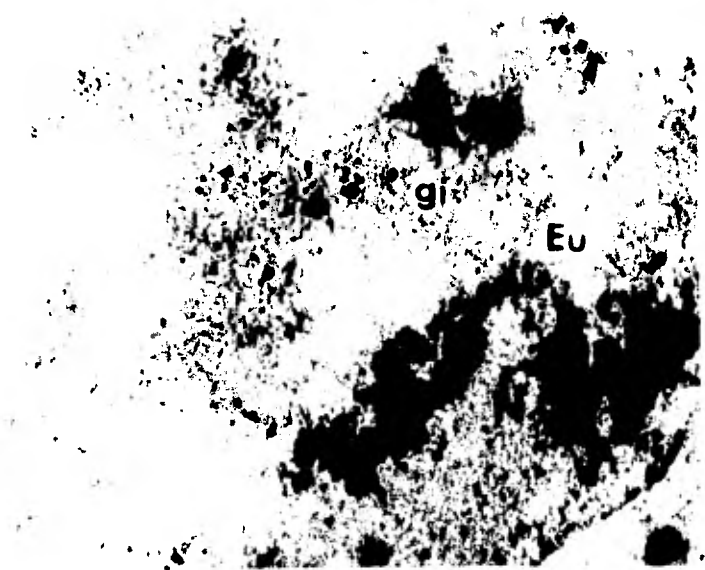
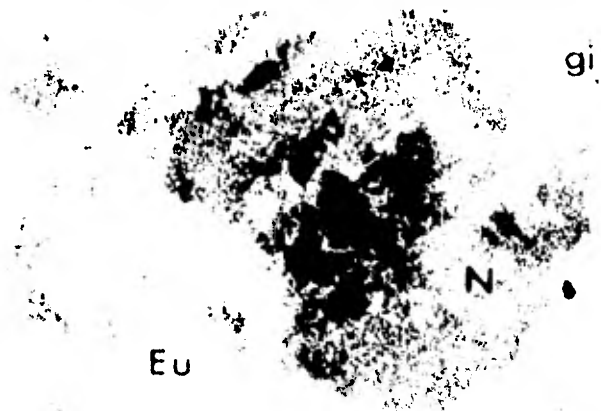
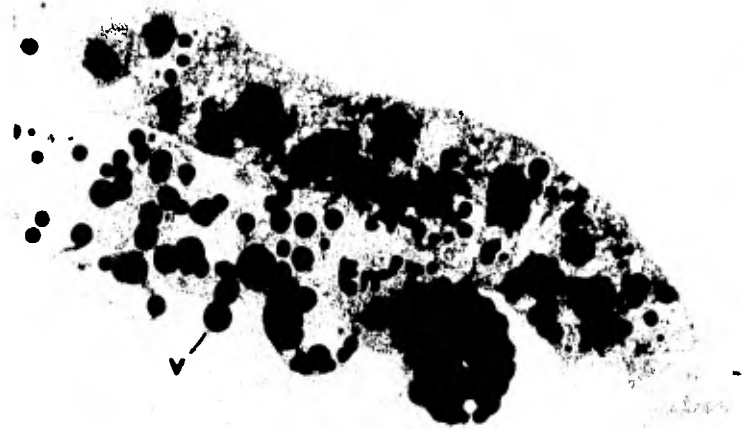
Micrografía óptica de un embrión didérmico de 0 horas de incubación, coloreado con azul de toluidina. Las células polimórficas laxamente dispuestas que se observan cargadas de cuerpos vitelinos (v) en la parte inferior, corresponden al endodermo (En) y las que se agrupan formando una capa epitelial de células cilíndricas, forman el ectodermo primitivo pregastrular (Ec).

256 X

Figs. 1b, 1c y 1d:

Micrografías electrónicas de células del ectodermo primitivo pregastrular, contrastadas con U-EDTA-Pb para resaltar las partículas ribonucleoproteicas. Se observa un gran nucleolo (N) y gránulos intercromatinianos (gi) entremezclados con fibrillas pericromatinianas (fp). En la micrografía 1d, se observa una invaginación de la membrana nuclear (Inv).

9 500 X



FIGS 1a 1b 1c & 1d

Plancha No. 2: Embrión de 20-24 horas de incubación (Estadio 6).

Figs. 2a y 2b:

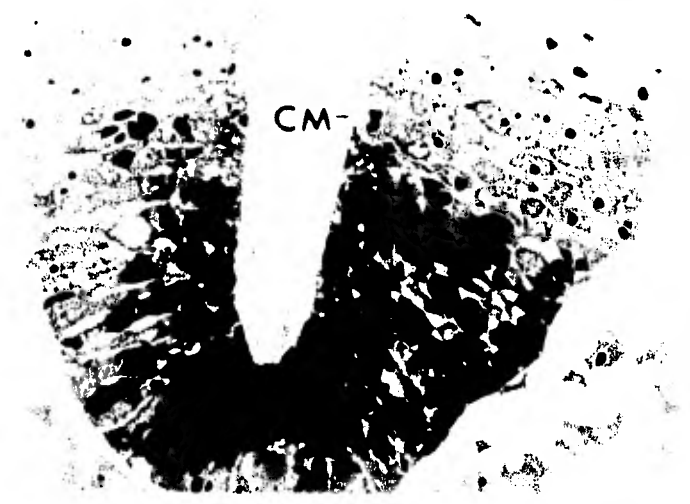
Micrograffas ópticas coloreadas con azul de toluidina, en donde se aprecia el surco neural (SN) formado por un epitelio poliestratificado en el que se ven células de His de forma redonda y en mitosis (CM), - cercanas a la cavidad.

100 y 128 X

Figs. 2c y 2d:

Utilizando la técnica de contraste que resalta las partículas RNP (U-EDTA-Pb), se observan dichas partículas, en especial gránulos intercro_{matinianos} (gi) homogéneamente distribuidos, algunas fibrillas pericro_{matinianas} (fp) y el nucleolo (N).

12 500 X



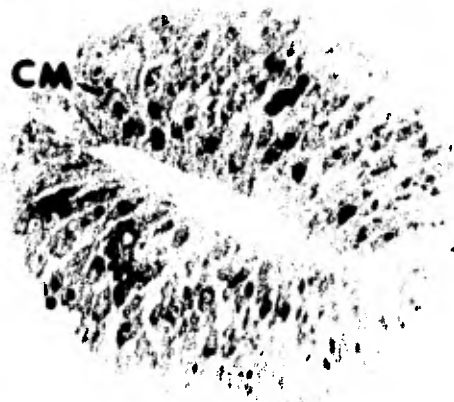
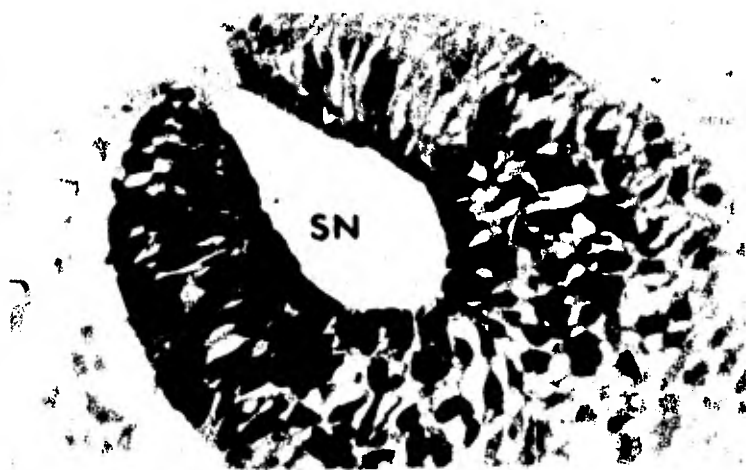
FIGS 2a, 2b, 2c, & 2d

Fig. 3a:

Micrografía óptica de médula de embrión de pollo de 33-38 horas de incubación correspondiente al Estadio 10 de Hamilton y Hamburger, en el que se observa el cierre del surco neural (SN) en la región cervical.
240 X

Figs. 3b y 3c:

Micrografías ópticas coloreadas con azul de toluidina, al igual que la anterior, en donde se observa una médula de embrión de pollo de 40-45 horas de incubación (Estadio 11 de Hamilton y Hamburger). Se aprecia la transformación del surco neural en tubo neural (TN), y células matrices (CM) que forman el grueso epitelio de dicho tubo.
160 y 200 X



FIGS. 30-32

Plancha No. 4: Micrográficas electrónicas de una porción cervical de médula de embrión de pollo de 70-72 horas de incubación (Estadio 19 de Hamilton y Hamburger), contrastadas con U-EDTA-Pb.

Fig. 4a:

Células matrices que comienzan su diferenciación presentando numerosos nucleolos accesorios (NA). También se aprecian gránulos intercro-matinianos, (gi).

5 000 X

Fig. 4b:

Neuroblasto de capas nucleares intermedias en donde ya ha aparecido el retículo endoplásmico rugoso (RE). Se aprecian los gránulos intercro-matinianos, (gi) y los poros nucleares (PN).

12 500 X

Fig. 4c:

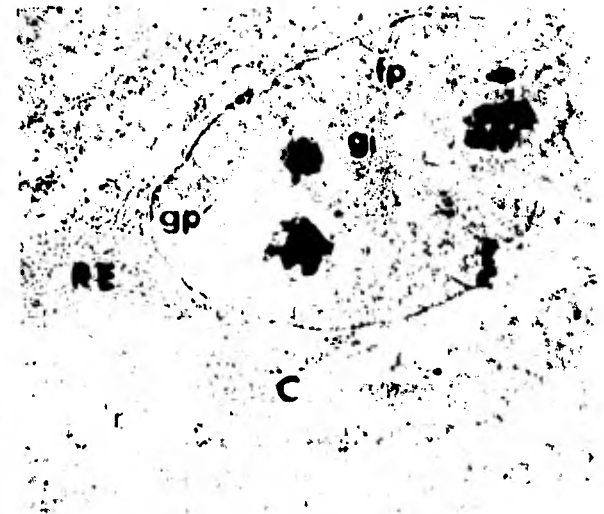
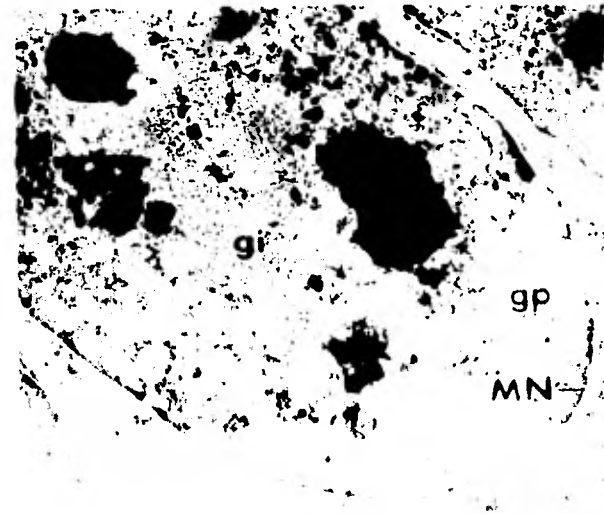
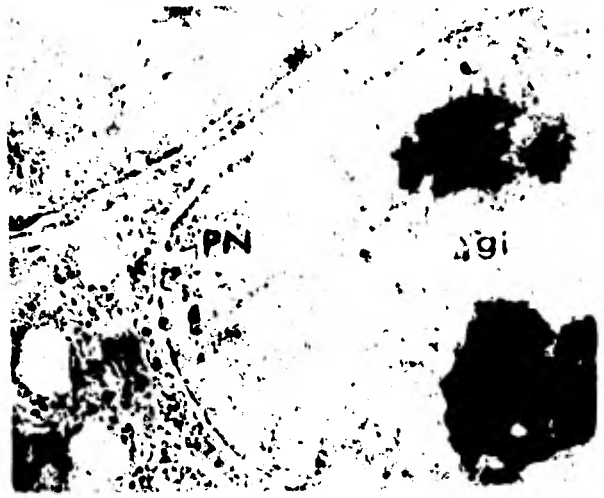
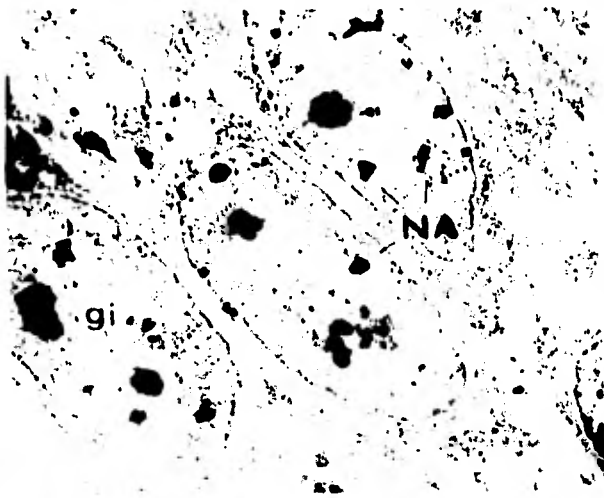
Al igual que en la anterior, se observan acúmulos de gránulos intercro-matinianos (gi), que ocupan zonas de límites imprecisos en la parte cen-tral del núcleo. En la periferia existen gránulos gruesos, llamados pe-ricromatinianos (gp) y pequeños acúmulos de ribonucleoproteínas en con-tacto con la membrana nuclear (MN).

12 500 X

Fig. 4d:

Neuroblasto multipolar donde se aprecian cisternas rugosas del retícu-lo endoplásmico (RE), ribosomas (r) no unidos a membranas en el cito-plasma (c), y en el núcleo gránulos pericromatinianos (gp), gránulos -intercromatinianos (gi) y fibrillas pericromatinianas (fp).

9 500 X



FIGS. 4a, 4b, 4c y 4d

Plancha No. 5: Embrión de 4 y medio días de incubación (Estado 25 de Hamilton y Hamburger), coloreado con azul de toluidina.

Fig. 5a:

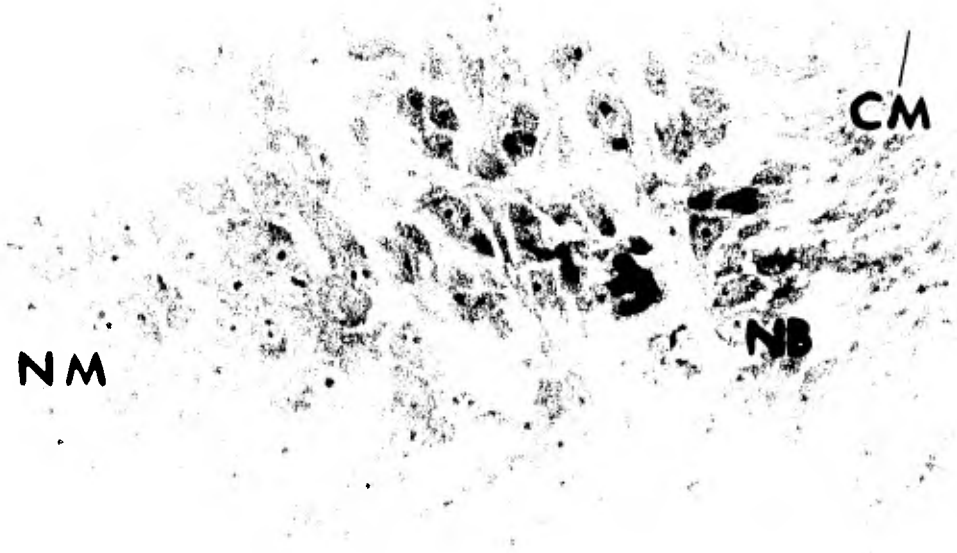
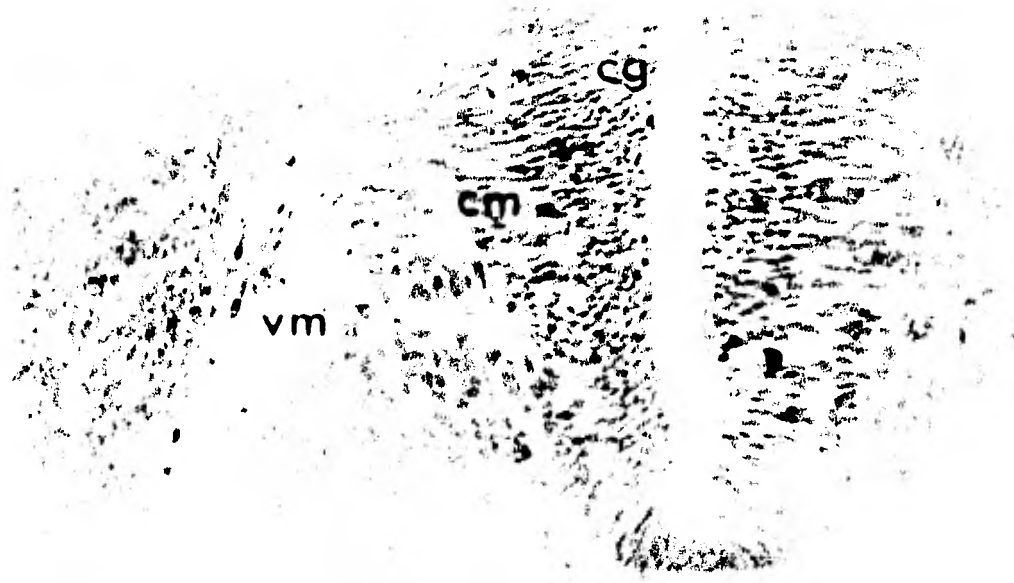
Micrografía óptica de un corte transversal de médula cervical. Se aprecian las tres capas clásicas: la capa germinativa (cg), la del manto (cm) y el velo marginal (vm).

240 X

Fig. 5b:

Micrografía óptica a mayor aumento, que ilustra la zona de donde fueron tomadas las dos siguientes láminas. Se pueden apreciar células matrices (CM) cercanas al epéndimo, neuroblastos bipolares (NB) de la capa germinativa y unos neuroblastos multipolares (NM) de la capa del -manto.

530 X



FIGS 5a y 5b

Plancha No. 6: Micrograffias electrónicas de médulas de embrión de pollo de 4 y medio días de incubación (Estadio 25 de Hamilton y Hamburger), contrastadas con uranilo-EDTA-Pb.

Fig. 6a:

Célula matriz periepéndimaria no diferenciada (CM), en donde se observan las fibras pericromatinianas (fp).

12 500 X

Fig. 6b:

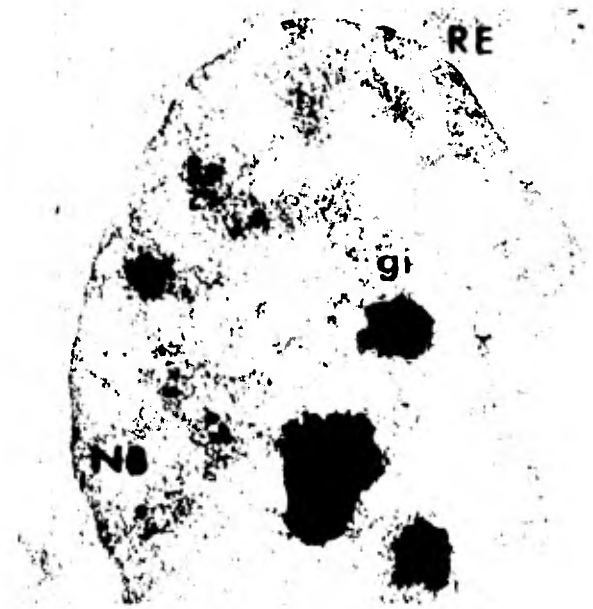
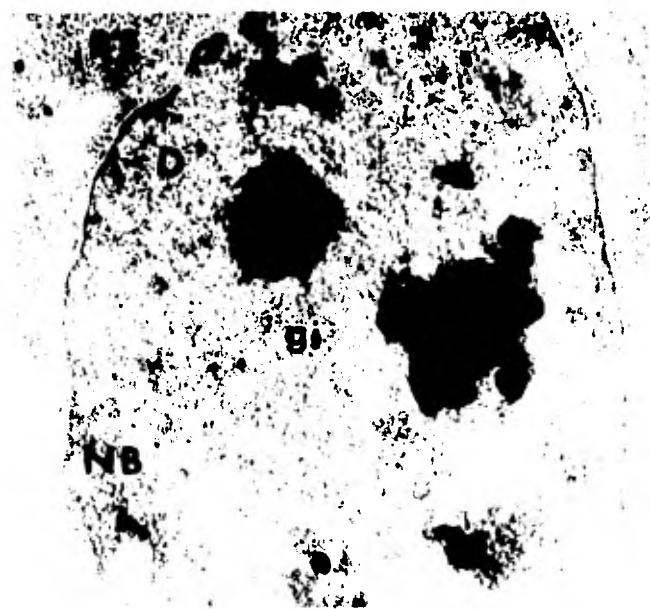
Célula matriz que ya ha comenzado su diferenciación en neuroblasto. Se aprecian nucleolos accesorios. (NA).

12 500 X

Fig. 6c y 6d:

Neuroblastos bipolares (NB) sucesivamente más lejanos del epéndimo y - por lo tanto más diferenciados. Se observa en el citoplasma retículo endoplásmico rugoso (RE) y en el núcleo gránulos intercromatinianos (gl).

12 500 X



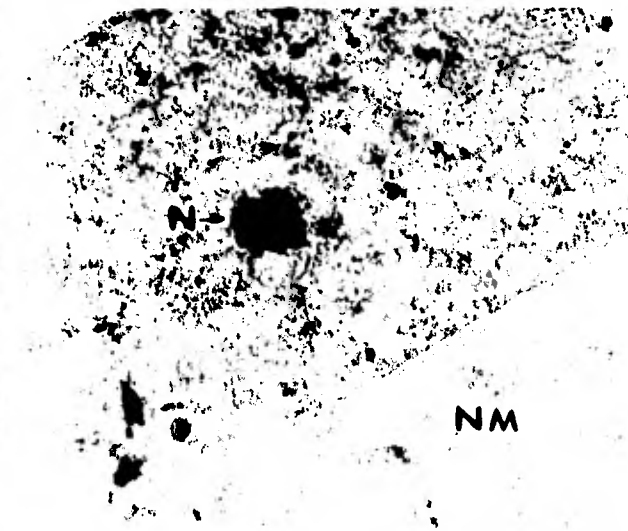
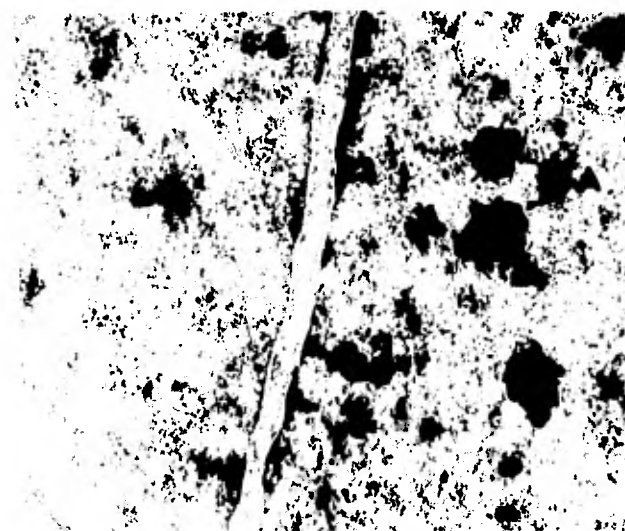
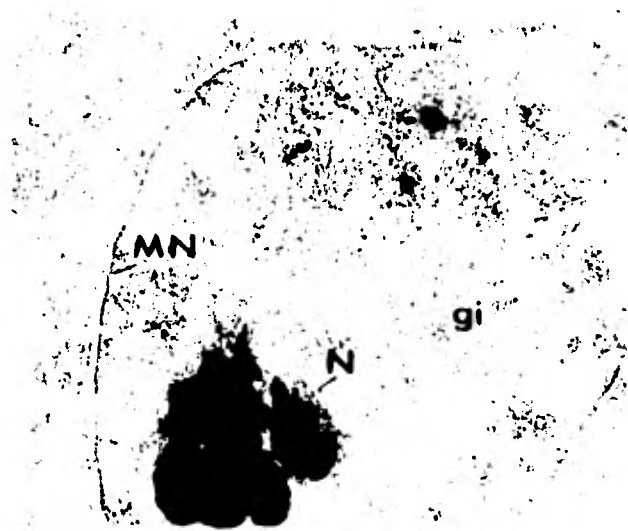
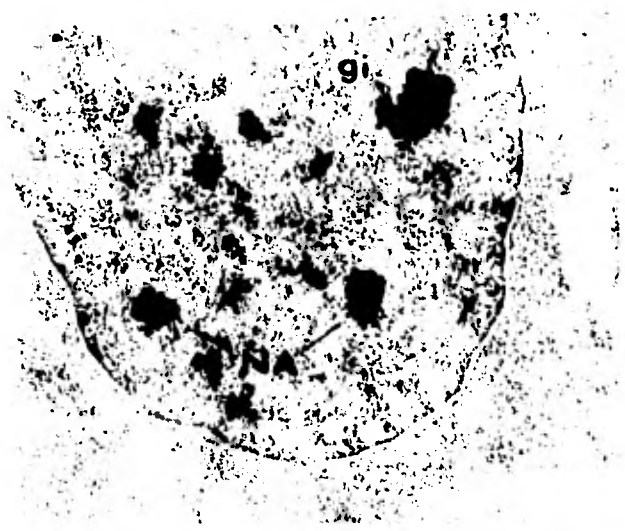
FIGS. 6a, 6b 6c y 6d

Plancha No. 7: Micrograffas electrónicas de médulas de embrión de pollo de 4 y medio días de incubación (Estadio 25 de Hamilton y Hamburger), contrastadas con U-EDTA-Pb.

Se observan células cada vez más alejadas del epéndimo en donde se aprecian gránulos intercromatinianos (gi), nucleolos accesorios (NA) y membrana nuclear (MN).

La última es un neuroblasto multipolar (NM) de la capa del manto, donde se aprecia solo un nucleolo (N).

12 500 X

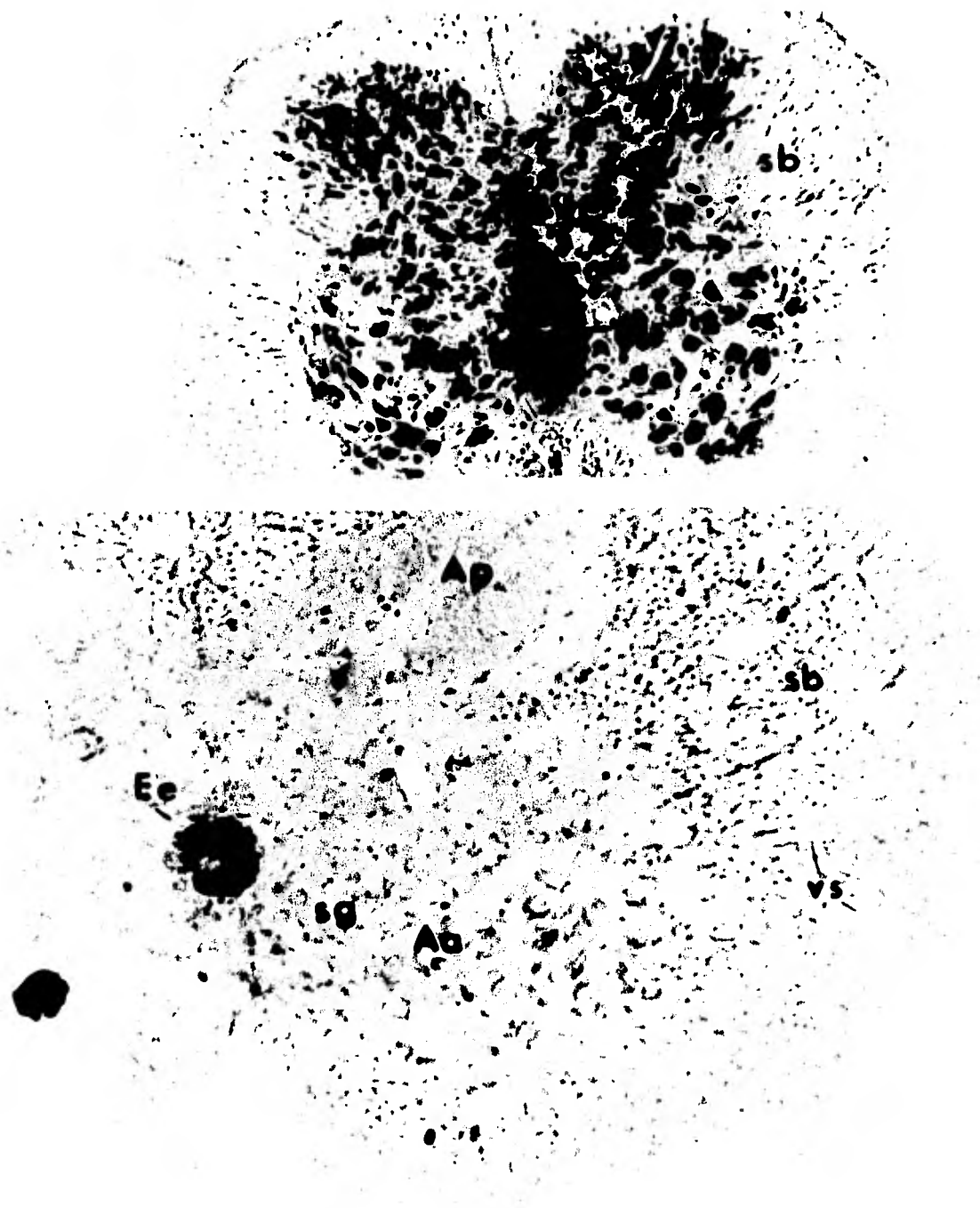


FIGS. 7a, 7b, 7c y 7d

Figs. 8a y 8b:

Corte transversal de médula de embrión de pollo de 19-20 días de incubación (Estadio 45 de Hamilton y Hamburger). Se aprecia claramente la sustancia gris (sg), sustancia blanca (sb); Astas anterior (Aa), posterior (Ap), vasos sanguíneos (vs) y el epitelio endimario definitivo (Ee).

204 X y 819 X



FIGS. 8a y 8b

Plancha No. 9: Médula de embrión de pollo de 19-20 días de incubación (Estadio 45 de Hamilton y Hamburger); micrografías electrónicas contrastadas con U-EDTA-Pb.

Fig. 9a y 9b:

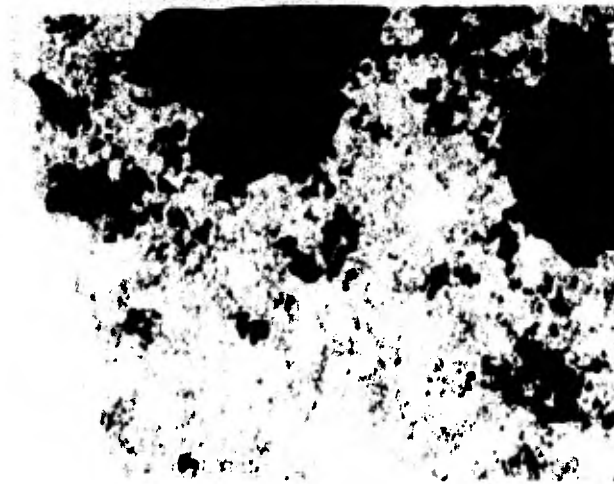
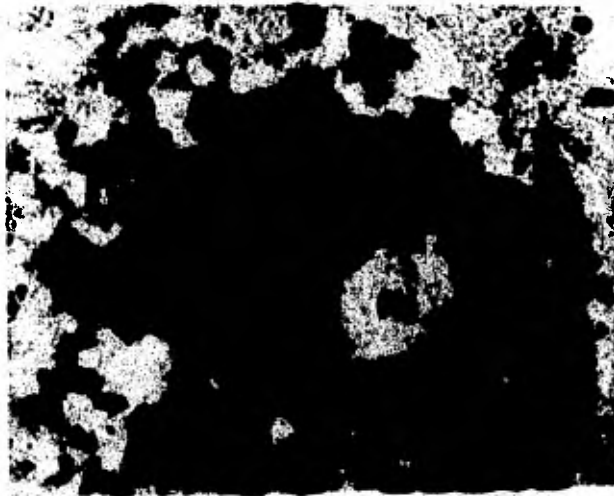
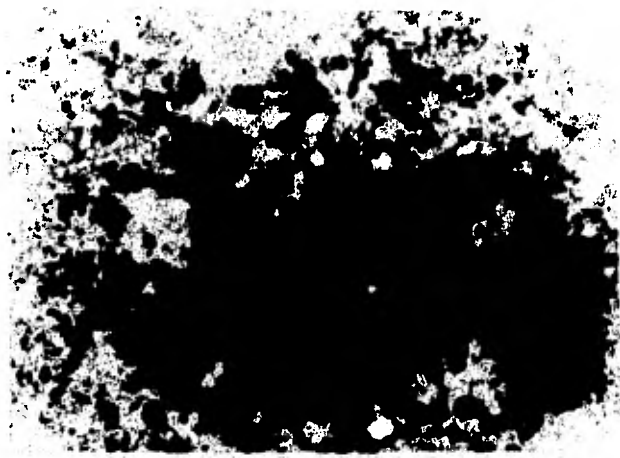
Representan núcleos de neuronas en donde se observan gránulos intercro-
matinianos (gi) formando acúmulos definidos entre zonas claras de cro-
matina compacta (Hc).

15 000 X

Fig. 9c:

Corresponde a una motoneurona en donde se observan dos nucleolos (N),
abundantes fibrillas pericromatinianas (fp), gránulos intercromati-
nianos dispersos y gránulos pericromatinianos (gp).

17 000 X



FIGS. 9a, 9b, 9c

BIBLIOGRAFIA

- Allfrey, V.G., Pogo, B.G.T., Pogo, A.D., Kleinsmith, L.G. and Mirsky, A.E.
In Histones, Ciba Found. Study Group, 24: 42, 1966.
- Altmann, T. Ueber Embryonales Wachstum. Vorläufige Mittheilung, 1881.
- Arana Iniguez, R. and Rebollo, M.S. Neuroanatomía. El Ateneo, 11:123, 1954.
- Arion, V. and Georgiev, G.P. Proc. Acad. Sci., 172: 716, 1967.
- Athias. Structure histologique de la moelle du têtard, etc. Bibliogr. Anatom., 1897.
- Attardi, G., Parnas, H., Huang, M.L.H. and Attardi, B.J. Mol. Biol., 20: 145, 1966.
- Bailey, P. and Cushing, H. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. J.B. Lippincott Col., 1926.
- Baltimore, D. Nature, 226: 1209.
- Becker, M. and Rich, A. Nature, 212: 142, 1966.
- Beerman, W. and Barr, G.F. Exp. Cell Res., 6: 195, 1954.
- Beerman, W. Protoplasmatologia GD, 1: 161, 1962.

Bellairs, R. The development of the nervous system in the chick embryos studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 7: 94-114, 1959.

Bernhard, W. In *Int. Symp. Nucleolus - Its Structure and Function.* - Nat. Cancer Inst. Monogr., 23, 1966.

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

Bernhard, W. and Granboulan, N. *Exptl. Cell Res. Suppl.*, 9: 19, 1963.

Besta. Ricerche in torno alla genesi e al modo di formazione della cellula nervosa. *Revista Sperim. di Freniatria*, T. XXX, 1904.

Birnstiel, M. The nucleolus in cell metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18: 25, 1967.

Birnstiel, M., Fleissner, E. and Borek, E. Nucleolus, a center of RNA methylation. *Science*, 142: 1577, 1963.

Birnstiel, M., Wallace, H., Sirlin, J.L. and Fischberg, J.L. Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of Xenopus laevis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 23: 43, 1966.

Birnstiel, M.L., Chipchase, M.I.H. and Flamm, W.G. On the chemistry and organization of nucleolar proteins. *Biochim. Biophys.*, 87: 111, 1964.

Borun, T.W., Schariff, M.D. and Robbins, E. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 1977, 1967.

Brawerman, G. Biochim. Biophys. Acta, 76: 322, 1963.

Brawerman, G., Biezunski, N and Eisenstadt, J. Biochim. Biophys. Acta, 190: 228, 1963.

Brown, D.D., A. Monroy and A.A. Moscona. Eds. Current topics in developmental biology. Vol. II Academic Press., 1966.

Brown, D.D. and Gurdon, J.B. Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis. Proc. Natl. Acad. Sci., 51: 139, 1964.

Busch, H., Desjardins, Rl, Grogan, D., Higashi, K., Jacob, S., Muramatsu, M., Ro, T.S. and Steele, W.J. Composition of nucleoli isolated from mammalian cells. Natl. Cancer Inst. Monogr., 23: 193, 1966.

Darnell, J.E. Bacteriol. Rev., 32: 262, 1968.

De Robertis, E.D.P., Nowinsky, W.W. y Sáez, F.A. Biología Celular. El Ateneo, 8a. Ed., 2-369, 1975.

Edström, J.E. Composition of RNA from various parts of spider oocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8: 47, 1960.

Errera, M., Hell, A. and Perry, R.P. The role of the nucleolus in RNA and protein synthesis II. Amino acid incorporation into normal and nucleolar inactivated HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta, 49: 58, 1961.

Galibert, F., Larsen, C.J., Lelong, I.C. and Boiron, M. A ribosomal RNA of low molecular weight isolated from mammalian cells. Bull. Soc. Chim. Biol., 48: 21, 1966.

Gall, J.G. Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60: 553, 1968.

Gall, J.G. Nuclear RNA of the salamander oocyte. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 23: 475, 1966.

Gautier, A. and Schreyer, M. *Cong. Int. Microsc. Electron.* 7th. Vol. 1, 559, 1970.

Gazaryan, K.G., Schuppe, N.G. and Prokoshkin, B.D. *Biokhimiya*, 31: 108, 1966.

Georgiev, G.P. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 6: 259, 1967.

Georgiev, G.P. in "The Cell Nucleus: Metabolism and Radiosensitivity". Ed. Taylor and Francis, 79, 1966.

Georgiev, G.P. *Biokhimiya*, 26: 1095, 1961.

Georgiev, G.P. and Mantieva, V.L. *Vol. Med. Khim.*, 8: 92, 1962a.

Georgiev, G.P. and Mantieva, V.L. *Biokhimiya*, 27: 949, 1962b.

Georgiev, G.P. and Samarina, O.P. Metabolic activity of components of the nuclear sap. *Biokhimiya*, 26: 401, 1961.

Georgiev, G.P., Tyskov, A.P., Coutelle, Ch., Mantieva, V.L. and Avakyan, E.R. *Biochim. Biophys. Acta* 259, 259, 1972.

Georgiev, G.P., Samarina, O.P., Lerman, M.I., Smirnov, M.N. and Severtzov, A.N. Biosynthesis of messenger and ribosomal RNA in the nucleolo chromosomal apparatus of animal cells. *Nature*, 200: 1291, 1963.

Girard, M., Latham, H., Penman, S. and Darnell, J.E. Entrance of newly formed messenger RNA and ribosomes into He La cell cytoplasm. *L. Mol. Biol.*, - 11: 187, 1965.

Girard, M., Penman, S. and Darnell, J.E. The effects of actinomycin on ribosome formation in He La cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51: 205, 1964.

Granboulan, N. and Bernhard, W. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 155: 1767, 1961.

Granboulan, N. and Granboulan, Ph. *Cytochimie ultrastructurale du nucleole II. Etude des sites de synthese de RNA dans le nucleole et le noyau. Exptl. Cell Res.*, 38: 604, 1965,

Greenberg y Penman, H. and Penman, S. Methylation and processing of ribosomal RNA in He La cells. *M. Mol. Biol.*, 21: 527, 1966.

Gvozdev, V.A. and Tikhonov, V.H. *Biokhimiya*, 29: 1083, 1964.

Harris, H. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 47: 275, 1963.

Held, Zur Histogenese der Nervenleitung. X^e Versamml. d. Anat. Gesellsch. zu Rostock., *Anat. Anzeiger*, 1906.

His, W. Die neuroblasten un deren Entstehung im embryonalen Merk. *Arch. Anat. Physiol.*, 249: 300, 1889.

His, W. Ueber das auftreten der weissen substanz und der Wurzelfasern am Rückenmark der menschlichen Embryonen. *Ibidem*, 1883.

His, W. Ueber die Anfänge des peripherischen Nervensystems *Arch. f. Anat. a. Physiol.*, *Anat. Anth.*, 1879.

Honjin, R. Ultrastructure of Golgi apparatus of the nerve cell. *Folia Anat. Jap.*, 29: 117-131, 1956.

Imaizumi, M.T., Diggelman, M. and Scherrer, K. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 1122, 1972.

Kalnins, V.I., Stich, H.F. and Bencosme, S.A. Fine structure of nucleoli - and RNA-containing chromosome regions of salivary gland chromosomes of chironomids and their interrelationship. *Can. J. Zool.*, 42: 1147, 1964.

Kempf, J. and Mandel, P. RNA de haut poids moléculaire, rapidement marqué, des sarcomes plasmocytaires de la souris. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48: 211, 1966.

Kölliker. *Handbuch der Gewebelehre*, 1897.

Kölliker. Zur feineren Anatomie des centralen Nervensystems. Zweiter Beitrag das Rückenmark *Zeitschr. f. Wissensch. Zool.* Bd. LI, 1890.

Lachi. *Contributo alla Istogenesi della neuroglia*, 1890.

Lehninger, A.L. *Bioquímica*. Omega. 1972.

Lenhossék, M.V. Zur Kenntniss der ersten Entstehung der Nervenzellen und nervenfasern beim Vogelembryo. *Verhandl. X Internat. medicin. Kongresses zu Berlin*, Bd. II, 1890.

Liau, M.C. and Perry, R.P. Ribosome precursor particles in nucleoli. *J. Cell Biol.*, 39: 81A, 1968.

- Liau, M.C. and Hurlbert, R.B. Comparative studies of RNA synthesis in isolated nucleoli from rat novikoff tumor and rat liver. *Proc. Am Ass. Cancer Res.*, 7: 42, 1966.
- Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H. and Mirsky, A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 52: 93, 1964.
- Maggio, R. Progress report on the Characterization of nucleoli from guinea pig liver. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 23: 213, 1966.
- Marinozzi, V. Cytochimie ultrastructurale du nucléole - RNA et protéines intranucleolaires. *J. Ultrastruct. Res.*, 10: 433, 1964.
- Merk. Die Mitosen in Centralnervensystem, Ein Beitrag zur Lehre vom Wachstum der belben. *Denkschriften der Wiener Akad. Bd. LIII*, 1887.
- Miller and Beatty. Nucleolar structure and Function. In: *Handbook of Molecular Biology*, 1969.
- Monneron, A. and Bernhard, W. Fine structural organization of mammalian cells. *J. Ultr. Res. Acad. Press*, 27: 266-288, 1969.
- Montgomery, T.H. Comparative cytological studies. I. A special regard to the morphology of the nucleolus. *J. Morphol.*, 15: 265, 1898.
- Moulé, J. and Chauveau, J. *J. Mol. Biol.*, 33: 465, 1968.
- Moyne, G., Nash, R.E. and Puvion, E. Perichromatin granules and other nuclear components in isolated hepatocytes treated with cortisol and cyclohexamide. *J. Microscopie Biol. Cell.*, 1977. (In press).

- Mundell, R.D. The occurrence of ribosomal proteins in nucleoli of starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28: 117, 1967.
- Muramatsu, E., Zimmerman, F. and Holler, B.W. Methylation of 45S ribosomal RNA precursor in He La cells. *J. Mol. Biol.*, 23: 149, 1967.
- Naora, H. Deoxyribonucleic acid-dependent protein synthesis in nuclear ribosome system in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 123: 151, 1966.
- Paton, S. The Reactions of the vertebrate Embryo to stimulation and the associated changes in the nervous system. *Mittheil. aus der Zool. Station zu Neapel*. Bd. XVIII, 11: 2-3, 1907.
- Peeling, C. *Nature*, 184: 655, 1959.
- Penman, S., Vesco, C. and Penman, M. *J. Mol. Biol.*, 34: 49, 1968.
- Penman, S., Smith, I., Holtzman, E. and Greenberg, H. RNA metabolism in the He La cell nucleus and nucleolus. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 23: 489, - 1966.
- Penman, S., Scherrer, K., Becker, I. and Darnell, J.E. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 49: 654, 1963.
- Perry, R.P. Nucleoli: The cellular sites,.. In: *Handbook of molecular Biology*. Alima de Faria, 1969.
- Perry, R.P. The Nucleolus in cell metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18: 25, 1967.

- Perry, R.P. The nucleolus and the synthesis of ribosomes. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 18: 325, 1965.
- Perry, R.P. Role of the nucleolus in RNA metabolism and other cellular processes. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 14: 73, 1964.
- Perry, R.P. Selective effects of actinomycin D on the intracellular distribution of RNP synthesis in tissue culture cells. *Exptl. Cell Res.*, 29: 400, 1963.
- Perry, R.P. The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43: 2179, 1962.
- Perry, R.P. On the nucleolar and nuclear dependence of cytoplasmic RNA synthesis in He La cells. *Exptl. Cell Res.*, 20: 216, 1960.
- Perry, R.P. and Kelley, D.E. Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes. *M. Mol. Biol.*, 35: 37, 1968.
- Perry, R.P. and Kelley, D.E. Bouyant densities of cytoplasmic ribonucleoprotein particles of mammalian cells: Distinctive character of ribosome subunits and the rapidly labeled components. *J. Mol. Biol.*, 16: 255, 1966a.
- Perry, R.P., Hell, A. and Errera, M. The role of the nucleolus in RNA and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated He La cells. *Biochim. Biophys. Acta* 49: 471, 1961.
- Perry, R.P. and Errera, M. The influence of nucleolar RNA metabolism on that of the nucleus and cytoplasm. In J. S. Mitchell, ed.: *The cell nucleus*, 24, 1960.

Petrov, P. and Bernhard, W. Experimentally induced changes of extranuclear ribonucleoprotein components of interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.*, 35: 386-402, 1971.

Pogo, A.C., Allfrey, V.G. and Mirsky, E.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 59: 1337, 1968.

Pogo, A.C., Pogo, B.G.T., Littau, V.C., Allfrey, V.G., Mirsky, A.E. and Hamilton, M.G. The purification and properties of ribosomes from the thymus nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 849, 1962.

Prescott, D.M. and Bender, M.A. Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exptl. Cell Res.*, 26: 260, 1962.

Puvion, E., Viron, A. and Bernhard, W. Unusual accumulation of ribonucleoprotein constituents in the nucleus of cultured rat liver cells after hypothermal shock. *J. Microscopie Biol. Cell.* 1977. (In press).

Ramón y Cajal, S. *Etudes sur la Neurogénèse de quelques Vertébrés.* 1-12, - 1929.

Ramón y Cajal, S. *Histologie du Système Nerveux de L'Homme et des Vertébrés.* Ed. A. Maloine, 589-637, 1909.

Ramón y Cajal, S. *Les Metamorphoses précoces des Neurofibrilles dans la Régénération et la Dégénérescence des Nerfs.* *Trav. du lab. de Recherches Biologiques, etc.* T.V. Fasc. 1 et 2, 1907.

Ramón y Cajal, S. A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la Moëlle Epinière du poulet, *Anat. Anzeiger*, 1890.

Rake, A.V. and Graham, A.F. Kinetics of incorporation of Uridine- ^{14}C into L-cell RNA. *Biophys. J.*, 4: 267, 1964.

Rauber. Die Kerntheilungsfiguren in Medullarrohr der Wirbelthiere. *Arch. F. Mikrosk. Anat.* Bd. XXVI. Heft 4, 1886.

Retzius. Ependym un Neureglia. *Biolog. Untersuch.*, N.F. Bd. V, 1893.

Rio Hortega, P. Del. Histogenesis y Evolución Normal, Exodo y distribución regional de la Microglia. *Mem. Real. Soc. Esp. Hist. Nat.* 11: 213, 1921.

Ris, H. In Interpretation of Ultrastructure, *Symp. Intern. Soc. Cell Biol.*, 1: 69, 1962.

Ritossa, R.M. and Spiegelmann, S. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Acad. Sci.*, 53: 737, 1965.

Ritossa, R.M., Atwood, K.C., Lindsley, D.L. and Spiegelman, S. On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 23: 449, 1966.

Rosset, R., Monier, R. and Julien, J. Ribosomes of *Escherichia coli*. I. Detection of ribosomic ribonucleic acid of low molecular weight. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46: 87, 1964.

Samarina, O.P. *Biochim. Biophys. Acta* 91: 688, 1964.

Samarina, O.P., Asriyan, I.S. and Georgiev, G.P. *Proc. Acad. Sci.*, 163: 1510, 1965a.

Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Molnar, J. and Georgiev, G.P. *J. Mol. Biol.* 33: 251, 1968.

Sauer, M.E. and Walker, B.E. Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the Neural Tube. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 101: 557-560, 1969.

Sauer, M.E. and Chittenden, A.C. Deoxyribonucleic acid content of Cell Nuclei in the Neural Tube of chick embryo. *Expl. Cell Res.*, 16: 1-6, 1959.

Sauer, F.C. Mitosis in the Neural Tube. *J. Comp. Neurol.*, 62: 317-405, 1935.

Schaper. Die Fruehsten Differenzierungsvorgange im Centralnervensystem. *Arch. F. Enturickelungsmechanik der Organismen*, Bd. V, 1897

Scherrer, K. and Marcaud, L. *J. Cell Physiol.*, 72, suppl. 1, 181, 1968.

Scherrer, K. and Marcaud, L. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47: 1697, 1965.

Scherrer, K., Spohr, G., Granboulan, N., Morel, C., Grosclaude, J. and Chezzi, C. *Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol.*, 35: 539, 1970.

Scherrer, K., Latham, H. and Darnell, J.E. Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in He La cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 49: 240, 1963.

Sclavunos (Citado por Ramón y Cajal, 1929).

Shankarnarayan, K., Muramatsu, M., Smetana, K. and Busch, H. Ultrastructural studies on RNA and DNA components of Isolated nucleoli of Walker 256 Carcinosarcoma. *Exp. Cell Res.*, 41: 81, 1966.

Shankar Narayan, K., Steele, W.J., Smetana, K. and Busch, H. Ultrastructural aspects of the ribonucleoprotein network in nuclei of Walker tumor and rat liver, *Exp. Cell. Res.*, 46: 65-77, 1967.

Sibatani, A., Dekloet, S.R., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48: 471, 1962.

Sidman, R.L. Histogenesis of Mouse retina studied with thymidine ^3H in the structure of the eye. Academic Press., 1961.

Sidman, R.L., Miale, I.L. and Feder, N. Cell Proliferation and Migration in the Primitive Ependymal zone, an autoradiographic study of histogenesis in the Nervous System *Exp. Neurol.*, 1: 322-323, 1959.

Siebert, G., Villalobos, J., Ro, T.S., Steele, W.J., Lindenmayer, G., Adams, H. and Busch, H. Enzymatic studies on isolated nucleoli of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241: 71, 1966.

Simard, R. and Bernhard, W. A heat sensitive cellular function located in the Nucleolus. *J. Cell Biol.*, 34: 61, 1967.

Smetana, K., Steele, W.J. and Busch, H. *Exp. Cell Res.*, 31: 198, 1963.

Soeiro, R., Vaughan, M.H., Warner, J.R. and Darnell, J.E. *C. Cell Biol.*, 39: 112, 1968.

Stenram, V. Radioautographic RNA and protein labeling and the Nucleolar volume in rats following administration of actinomycin D. *Exp. Cell Res.*, 36: 242, 1964.

Suskind, R.G. Autorradiographic and cytochemical evidence for synthesis of A Lysine-containing Ribonucleoprotein in Nucleoli inhibited by Actinomycin D. *J. Cell Biol.*, 24: 309, 1965.

Swift, H. In Interpretation of Ultrastructure. *Symp. Intern. Soc. Cell Biol.*, 1: 213, 1962.

Swift, H. *Brokhaven Symp. Biol.*, 12: 134, 1959.

Tamaoki, T. The Particulate Fraction containing 45 S RNA in L-Cell Nuclei. *J. Mol. Biol.*, 15: 624, 1966.

Tamaoki, T. and Mueller, G.C. The effects of Actinomycin D and Puromycin on the formation of ribosomes in He La cells. *Biochim. Biophys. Acta* 108: 73, 1965.

Termin, H.M. and Mizutani, S. *Nature*. 226: 1211, 1970.

Van der Stricht (Citado por Ramón y Cajal, 1929).

Van Gehuchten. *La Structure des Centres Nerveux, La Moëlle Epiniere et le Cervelet. La Cellule*, T. VII, 1891.

Vázquez Nin, G., Echeverría, O., Molina, E. and Fragoso, J. Effects of Estradiol on Endometrial cell Nuclei. 1978. (In press).

Vázquez Nin, G. and Bernhard, W. Comparative Ultrastructural Study of Perichromatin and Balbiani Ring Granules. *J. Ultr. Res.*, 36: 842-860, 1971.

- Vázquez Nin, G. and Sotelo, J.R. Neurofibrillar Differentiation during Embryonary growth. *H. of Comparative Neurology*. Vol. 128 No. 3: 313-331, 1966.
- Verma, I.M., Temple, F.F., Fan, H. and Baltimore, D. *Nature New Biol.*, 235: 163, 1972.
- Vincent, W.S., Baltus, E., Lovlie, A. and Mundell, R.E. Proteins and Nucleic Acids of Starfish oocyte Nucleoli and Ribosomes. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 23: 235, 1966.
- Vincent, W.S. The Nucleolus in Genetics Today. *Proc. XI Intern. Congr. of Genet.*, 343, 1964.
- Wagner, E.S., Penman, S. and Ingram, V. Methylation patterns of He La cell Ribosomal RNA and its Nucleolar precursors. *J. Mol. Biol.*, 3: 29, 1967.
- Wallace, H. and Birnstiel, M.L. Ribosomal cistrons and the Nucleolar Organizer. *Biochim. Biophys. Acta* 114: 196, 1966.
- Warner, J. R. *J. Biol. Chem.*, 246: 447, 1971.
- Warner, J.R. and Soeiro, R. Nascent Ribosomes from He La Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58: 1984, 1967.
- Warner, J.R., Soeiro, R., Birnboim, H.C., Girard, M. and Darnell, J.E. *J. Mol. Biol.*, 19: 349, 1966.
- Watson, M.L. and Aldrige, W.G. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 96, 1964.

Watterson, E., Veneziano, P. and Bertha, A. Absence of a true Germinal zone in Neural Tubes of young chick embryos as demonstrated by Colchicine Technique. *Anat. Res.*, 124: 379, 1959.

Watson, H.L. *J. Cell Biol.*, 13: 162, 1962.

Weinberg, R.A., Leoning, U., Willems, M and Penman, S. Acrylamide Gel Electrophoresis of He La Cell Nucleolar RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 58: 1088, 1967.

Williamson, A.R. and Askonas, B.A. *J. Mol. Biol.*, 23: 201, 1967.

Wisse, E. and Tate, A.D. *Proc. 4th. Eur. Reg. Cong. Electron Microsc.* Vol. 11: 465, 1968.

Zalaokar, M. Sites of Protein RNA in the Cell *Res.*, 19: 559, 1960.

Ziehen, T. *Handbuch der Vergleichenden Experimentellen Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*, Herausgeg. Von A. Hertwig. Bd. III: 3, 1906.

INDICE

	PAGINA
1.- INTRODUCCION	1
I Desarrollo del Sistema Nervioso	1
1) Estructura	1
2) Anatomía Macroscópica	2
3) Anatomía Microscópica	4
4) Origen	5
5) Organogénesis de la Médula Espinal	6
6) Histogénesis	9
A.- Antecedentes Históricos	9
B.- Diferenciación del Neuroblasto	13
II Núcleo Interfásico	15
2.- OBJETIVOS	35
3.- MATERIAL Y METODOS	36
4.- RESULTADOS	39
5.- DISCUSION	46
6.- CONCLUSIONES	50
7.- MICROGRAFIAS	51
8.- BIBLIOGRAFIA	60
9.- INDICE	76