



00381
20
ES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

**Análisis Ultraestructural de Partículas
Ribonucleoproteicas (RNP) Durante la Diferenciación
de Tejidos Derivados de las Principales
Capas Embrionarias.**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
Doctora en Ciencias (Biología)
P r e s e n t a

Men C: Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Director de Tesis : Dr. en Ciencias Gerardo Hebert Vázquez Nin.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en Ciencias Gerardo Hebert Vázquez Nin.

Director de la presente tesis.

A los Doctores en Ciencias:

Alfonso Torre Blanco.

Alfonso Cárabez Trejo.

Judith Márquez Guzmán.

Concepción Sanchez Gómez.

Por sus consejos y la revisión crítica del manuscrito.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por su apoyo durante la realización de la investigación.

Al PADEP por el apoyo financiero en los proyectos 3315 (1993) y 3357 (1995), que fueron de especial importancia para el desarrollo y culminación de esta tesis de Doctorado en Ciencias (Biología).

DEDICATORIA

A mi familia, por compartir conmigo las alegrías y sin sabores de este reto.

A mis hijos, por su comprensión y por permitirme crecer junto con ellos

A Micol... por todo lo que tu sabes.

A Rocio González-Mesa Rodríguez y a Carmen A. González-Mesa.

A Angélica González Oliver, Ernestina Ubaldo y Ernestina Flores, Marco Antonio González, Lourdes Agredano, Elizabeth Córdoba, Francis y Rafael, mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias.

Con especial cariño a la Dra. Leonor A. Cedillo Becerril

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
RNA _r	RNA ribosomal
RNA _m	RNA mensajero
RNA _{hn}	RNA heterogéneo nuclear
RNA pre-m	RNA premensajero
RNP	Ribonucleoproteínas
RNP _{pt}	RNP de pequeño tamaño
URNA _{pn}	RNAs de pequeño tamaño, ricos en uridina
GIC	Gránulos intercromatinianos
FIC	Fibrillas intercromatinianas
GPC	Gránulos pericromatinianos
nm	nanometros
μm	micrometros
kD	kiloDaltones
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
PTA	Acido fosfotúngstico
HH	estadios de la serie de Hamburger y Hamilton (1952)

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION.....	3
III.	NUCLEO INTERFASICO.....	5
IV.	REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA.....	28
V.	DIFERENCIACION.....	36
VI.	OBJETIVOS	59
VII.	MATERIAL Y METODO	60
VIII.	RESULTADOS	65
	APENDICE DE FIGURAS.....	74
	APENDICE DE TABLAS	97
	APENDICE DE GRAFICAS	101
IX.	DISCUSION.....	111
X.	CONCLUSIONES.....	120
XI.	REFERENCIAS	122

I. RESUMEN

En el presente trabajo, se estudiaron los núcleos en interfase de las células del epiblasto y de las células que se originan de las tres capas embrionarias: las células epiteliales derivadas del ectodermo, las células del epitelio intestinal originadas del endodermo y de las células de la notocorda de origen mesodérmico, en muestras de embrión de ave (*Gallus domesticus*), a partir de fases muy tempranas. Se analizaron las modificaciones observadas en la estructura nuclear durante la diferenciación y maduración de los epitelios, mientras que en los núcleos de las células de la notocorda se estudiaron los cambios relacionados con los procesos de maduración y envejecimiento. El avance del desarrollo de los embriones se identificó siguiendo la serie morfológica de Hamburger y Hamilton (1951), en muestras fijadas desde las 13 horas de incubación hasta la eclosión y procesadas para microscopía electrónica, aplicando la técnica de contraste preferencial para estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) nucleares (Bernhard, 1969). Se analizó el comportamiento de las estructuras RNP de los diferentes núcleos, por medio de mediciones morfométricas realizadas sobre imágenes impresas, mediante el programa de computo CLOE diseñado particularmente para el análisis de estas estructuras.

Anteriormente se determinó que durante la diferenciación del embrión de ave, las características ultraestructurales del núcleo interfásico de células nerviosas (Vázquez-Nin y col., 1980, 1983) y musculares (Zavala y col., 1992) reflejan fluctuaciones de las estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) y que, particularmente el incremento de los gránulos pericromatinianos (GPCs) es un evento que coincide con la maduración neuronal y el establecimiento de conexiones sinápticas y con la invasión de la fibra muscular.

Los núcleos de las células del epiblasto a las 13 horas de incubación, en embriones del estadio 3 de Hamburger y Hamilton (1952), presentan estructuras constantes y abundantes; sin embargo, el patrón de distribución de las partículas ribonucleoproteicas (RNPs) se modifica en el nucleoplasma de las células de las capas embrionarias de las etapas posteriores, como se aprecia en los núcleos de los diferentes tipos de células estudiadas con EDTA, según la técnica de Bernhard (1969). En los núcleos del ectodermo, del mesodermo y del endodermo de las etapas tempranas del desarrollo, los GPCs se distribuyen ampliamente, los gránulos intercromatinianos (GICs) abundan en el nucleoplasma, no forman cúmulos y se organizan entre el entramado de las fibrillas intercromatinianas (FICs). Los núcleos de las etapas avanzadas, presentan FICs dispersas y grupos de GICs. Los GPCs se reconocen en la periferia de grumos de cromatina que se definen claramente como elementos de bajo contraste alrededor del nucleolo y en contacto con la envoltura nuclear, en un patrón que se va estableciendo gradualmente y coincide con la descripción del núcleo interfásico de las células diferenciadas de los vertebrados (Monneron y Bernhard, 1969).

La frecuencia de GPCs de los núcleos de los tejidos estudiados se modifica en etapas sucesivas de la diferenciación, según se determinó en la cuantificación realizada en el estadio HH3, en los núcleos del epiblasto. En los núcleos del ectodermo, de la notocorda y del endodermo de diferentes edades, las mediciones se iniciaron a partir del estadio HH9, finalizando la evaluación en los núcleos estudiados en muestras de piel e intestino en pollos recién nacidos. Por sus características particulares, se analizaron los núcleos de muestras del tejido notocordal, tomando como límite la etapa HH36, en que el desarrollo de los discos vertebrales en formación, interfiere con la conservación adecuada y dificulta el corte.

El nivel de GPCs es bajo en las células de la capa superficial de la piel, durante la mayor parte del desarrollo y muestra un leve incremento en la etapa de recién nacidos, en relación con la maduración funcional de las células superficiales aplanadas.

En notocorda se presenta un nivel elevado de GPCs a las 30 h de incubación (HH9), que antecede al inicio de la síntesis de proteínas específicas de la notocorda y que es coincidente con la inducción de la placa neural. Terminada la capacidad inductiva de este órgano, se presenta un decremento que se mantiene hasta el estadio HH36 en el décimo día de incubación.

En intestino los GPCs son más abundantes que en las otras células estudiadas desde las primeras etapas de diferenciación del epitelio. Las células epiteliales intestinales de los recién nacidos presentan el mayor índice de frecuencia de GPCs, superando al observado en piel y en notocorda. Este aumento es, como en las otras células coincidente con la maduración funcional. Por otra parte, los resultados indican que las modificaciones observadas en la frecuencia de RNPs son independientes del comportamiento de volumen nuclear y nucleolar de cada tipo celular.

Las modificaciones en frecuencia y distribución de las RNPs en los núcleos de los tres tejidos estudiados se relacionan con cambios en el patrón de distribución de la cromatina, según se observó en las muestras contrastadas con ácido fosfotúngstico (PTA). En los núcleos de los estadios tempranos (HH11), predomina la configuración laxa y gradualmente forma grumos dispersos en el nucleoplasma y en la periferia del nucleolo. Conforme avanza el desarrollo, aumenta el grado de condensación de la cromatina.

II. INTRODUCCION.

La primera descripción del núcleo fué publicada en 1833 por Robert Brown, quién lo consideraba como un pequeño "glóbulo" de material relativamente denso y aislado (Mirsky y Osawa, 1961). Un siglo después, la existencia "casi" común del núcleo celular fué utilizada como criterio determinante para la separación de los seres vivos. Sugerida en 1937 por Edouard Chatton, la dicotomía propuesta para la aplicación de dos términos, **procariótico** y **eucariótico** derivados de las raíces griegas **pro** antes, **karion** núcleo y **eu** verdadero (citado por Margulis y Schwartz, 1982; Sogin, 1989) modificó la agrupación de los organismos en categorías que contemplan el grado de diferenciación morfofuncional, revolucionando los sistemas de clasificación que separaban artificialmente tipos de organismos por sus características superficiales, planteados con serias limitaciones desde tiempos de Linneo (Whittaker, 1969).

La descripción detallada de la célula en general, el aislamiento y análisis de diferentes estructuras y productos nucleares contenidos en una doble membrana fosfolipídica y la caracterización de complejos desoxirribonucleoproteicos y ribonucleoproteicos asociados a una matriz de proteínas, logrados por el desarrollo de técnicas precisas, fueron los principales argumentos de apoyo al sistema actual para considerar en el grupo de los procariontes a los organismos que presentan el material genético disperso y no presentan envoltura nuclear, como se observa en las bacterias y algas azulverdosas. En este grupo el DNA, el RNA y los ribosomas se encuentran en un compartimiento común y no presentan mitocondrias, cloroplastos, ni otros organelos, a diferencia de los eucariontes que están representados por los protocistas, hongos, plantas y animales, que son organismos formados por células en las cuales el componente genético está localizado dentro de una estructura compleja que separa al DNA y RNA nuclear, de la fracción de RNA citoplásmico y de los ribosomas que transcriben la información de pequeñas moléculas de RNAm que atraviesan los poros de la envoltura (Whittaker, 1969).

Los estudios bioquímicos y morfológicos de eventos como la duplicación y transcripción del DNA o el procesamiento del RNA en el interior del núcleo y la traducción del RNAm en el citoplasma, subrayan la importancia de la envoltura nuclear como estructura dinámica y sugieren la posibilidad de que el aislamiento ha ejercido presión de selección sobre los ácidos nucleicos y representa un mecanismo de regulación genética en la evolución de organismos multicelulares altamente diferenciados (Cavalier-Smith, 1975).

Dependiendo del organismo al que pertenecen y su grado de diferenciación, diferentes autores sugieren que los núcleos de las células especializadas se distinguen, por su concentración de DNA y el grado de compactación de la cromatina (Mirsky y Osawa,1961; Bloom y Fawcett,1975), por el tipo de nucleolo (Risueño y Medina,1986) y por la distribución de las ribonucleoproteínas (RNP), estructuras complejas formadas por RNA y proteína (Fakan y Odartchenko,1980; Jiménez-García y col.,1989).

En los estudios sobre la caracterización ultraestructural de los núcleos de diferentes tipos celulares de mamíferos (Monneron y Bernhard,1969) y de células de organismos de varios grupos de la escala zoológica (Jiménez-García y col.,1989), se ha considerado que algunos componentes RNPs son constantes y están relacionados con los procesos de transporte, almacén y procesamiento de RNA premensajero y pre-ribosomal. El análisis comparativo de la estructura nuclear revela el establecimiento de patrones conservados para cada grupo (hongos, plantas y animales), pero también señala importantes diferencias en la disposición de las estructuras RNPs y de la cromatina dentro del grupo de los protoctistas, como resultado de posibles modificaciones evolutivas a nivel transcripcional y postranscripcional (Jiménez-García y col., 1989).

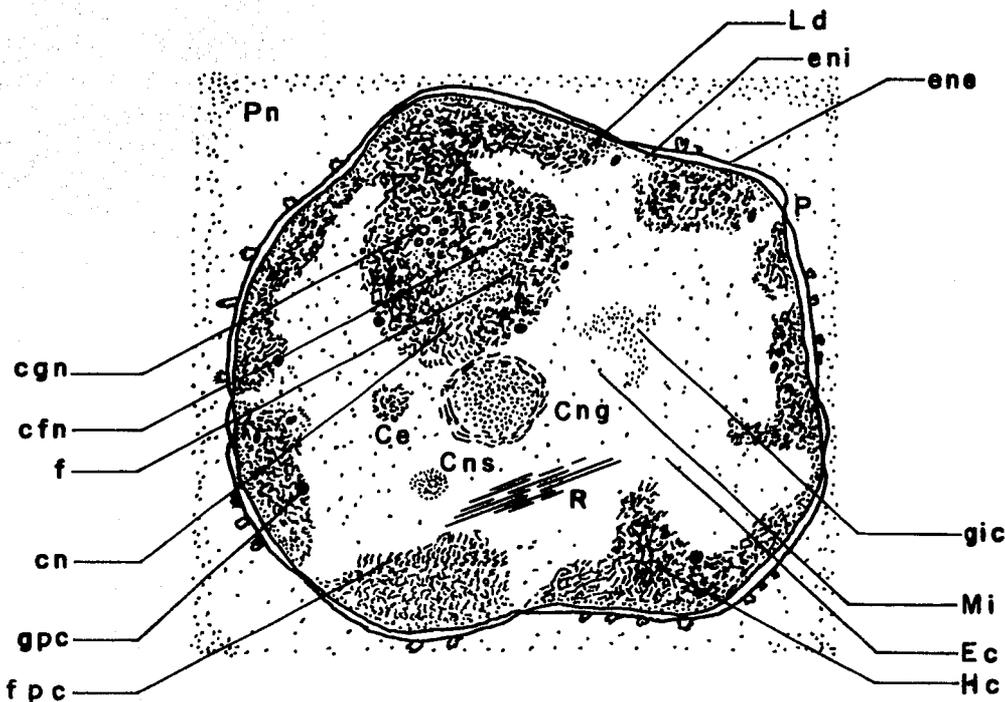
Se ha considerado que las transformaciones estructurales están relacionadas con cambios que suceden en el núcleo durante la expresión de los genes, en general y durante la diferenciación y maduración de tipos celulares particulares, en parte como resultado de la transcripción parcial de secuencias de DNA a fracciones de RNA, como señala Denis (1968) y por otro lado debido a modificaciones drásticas a nivel transcripcional y postranscripcional, aspecto profundizado en los trabajos de Davidson (1976). Estos planteamientos han servido de base a los estudios sobre variaciones en el grado de compactación de la cromatina y de la densidad de las estructuras RNPs que fueron detectadas en núcleos de ectodermo y endodermo de embriones de *Xenopus* (Karasaki,1965), en núcleos de células de ratón antes y después de la implantación (Fakan y Odartchenko,1980) y en el núcleo interfásico estudiado en embrión de ave, y se ha considerado la existencia de diferentes poblaciones de GPC que se incrementan durante la diferenciación neuronal (Vázquez-Nin y col.,1980), particularmente durante la sinaptogénesis (Vázquez-Nin y col.,1983) y también se presenta una elevación del número de GPCs nucleares en células musculares que establecen contacto sináptico (Zavala y col.,1992). Ambos eventos pueden estar bajo influencia de mecanismos de regulación de la actividad del aparato transcripcional, así como de fenómenos postranscripcionales.

III. NÚCLEO INTERFASICO.

El núcleo celular representa una entidad morfológica y funcional con límites definidos por una estructura compleja (esquema 1), que separa a la célula en subcompartimientos y ejerce control del medio interno, creando un ambiente particular durante la interfase (Mirsky y Osawa, 1961; Walter, 1989); sin embargo durante mucho tiempo, fué considerado en las figuras publicadas particularmente como señalador para localizar al resto de los organelos celulares (Bouteille, 1972). El uso de glutaraldehído y tetraóxido de osmio para la fijación de las muestras biológicas, la inclusión en resinas plásticas y la implementación de técnicas de contraste de cortes ultrafinos con sales de uranio y de plomo, son algunos de los pasos que se han utilizado para preservar adecuadamente el material biológico para su estudio al microscopio electrónico, con lo cual ha sido posible describir la organización ultraestructural de las células y del núcleo interfásico (Bouteille y col., 1974).

Envoltura Nuclear.- Callan y Tomlin en 1950, con técnicas de microscopía electrónica que precedieron a la introducción de cortes finos (citados por DuPraw, 1971) describieron la envoltura nuclear de organismos unicelulares secados al aire (Feldherr y Akin, 1994); sin embargo, se ha señalado que su existencia fué sugerida en 1893 por Hertwig (citado por Franke y Scheer, 1974). Según varios autores, su interacción con la eucromatina, con la heterocromatina, con el nucleolo, con las partículas RNPs, con la matriz nuclear, con diversos complejos multienzimáticos y con otros elementos contenidos en el núcleo, está en función de la reorganización cíclica de los genes para ser expresados (Mirsky y Osawa, 1961; Franke y Scheer, 1974; Daskal y Bush, 1978; Feldherr y Akin, 1994). La envoltura está integrada por varios elementos, descritos por diferentes autores.

a) La membrana que fué descrita en 1953 por Hartmann (citado por Mirsky y Osawa, 1961), forma un compartimiento discreto de espesor variable (10-15 nm) o cisterna perinuclear. La fase externa de la membrana orientada hacia el citoplasma presenta ribosomas asociados, mientras que diferentes estructuras nucleoproteicas establecen contacto con la fase orientada hacia el interior del núcleo (Mirsky y Osawa, 1961; Franke y Scheer, 1974; Kasper, 1974; De Robertis y De Robertis, 1983). A diferencia de otras membranas celulares, la que forma parte de la envoltura nuclear presenta bajo contenido de lípidos, de los cuales entre el 60 y el 85 % son fosfolípidos o glicolípidos. Además, el contenido proteico está representado principalmente por glicoproteínas (Kasper, 1974; Hancock y Boulikas, 1982).



Esquema 1: La cromatina, el nucleolo y diversas estructuras ribonucleoproteicas cuya interacción estructural y funcional está delimitada, se presentan en la imagen ideal del núcleo celular en interfase.

El espacio perinuclear (Pn) citoplasmático y el medio intranuclear (Mi), están separados por la envoltura nuclear; la fase de la envoltura orientada hacia el exterior (ene) está en contacto con el retículo endoplásmico y generalmente presenta ribosomas, mientras que la fase interna (eni) está separada de los componentes intranucleares por un elemento conocido como lámina densa (Ld), ausente en los sitios que la envoltura forma poros (P). La cromatina compacta o heterocromatina (Hc), se localiza principalmente en la periferia y la forma dispersa o eucromatina (Ec) se distribuye ampliamente. El nucleolo está integrado por el componente fibrilar (cfn), el componente granular (cgn) y los centros fibrilares (f) y también presenta una fracción de cromatina asociada (cn). En los bordes de la cromatina compacta se reconocen estructuras ribonucleoproteicas en forma de fibrillas (fpc) y gránulos pericromatinianos (gpc) de alta densidad a los electrones definidos por un halo claro, mientras que en el espacio claro, correspondiente a la región intercromatiniana, se observan fibrillas y pequeños gránulos (gic) dispersos o formando cúmulos. Se señalan otras estructuras ribonucleoproteicas, como los cuerpos nucleares simples (Cns), los cuerpos nucleares granulares (Cng), los cuerpos espiralados (Ce) y otros cuerpos nucleares de baja frecuencia (R). Elaborado de acuerdo con Bouteille (1972).

b) Los poros identificados por Callan y Tomlin en 1950 (citados por DuPraw,1971) están integrados por elementos de naturaleza proteica compleja que se organizan en octámeros enlazados a una pieza central, conservando continuidad morfológica con diversas estructuras nucleares, como algunas RNPs de la *pars granulosa* del nucleolo o relacionadas con los anillos de Balbiani de células del díptero *Chironomus* (Mirsky y Osawa,1961; DuPraw,1971; Kasper,1974) y con polirribosomas citoplásmicos (Kasper,1974; Franke y Scherr,1974). El diámetro aproximado de los poros es de 100 nm según se aprecia en cortes, muestras procesadas por criofractura y con tinción negativa (Franke y Scheer,1974; Feldherr y Akin,1994). En poros aislados se presenta un polipéptido de peso molecular aproximado a 68 000 (Hancock y Bouliskas,1982). Los poros ocupan un 10% del área total en núcleos de células de mamíferos y hasta el 36% de la envoltura nuclear en células vegetales y en protozoarios; se ha considerado una relación de la frecuencia de poros con la actividad transcripcional de cada tipo celular; como en el caso de los ovocitos de *Xenopus* que presentan alrededor de 30 millones de poros, mientras que los eritrocitos maduros solamente 300 (De Robertis y De Robertis,1983). El tráfico de macromoléculas, RNA y proteínas hacia adentro y hacia afuera del núcleo está controlado por los elementos altamente organizados del sistema de poro, embebidos en la doble membrana nuclear (Walter,1989; Feldherr y Akin, 1994).

e) La lámina es una capa homogénea dispuesta entre la cara interna de la envoltura nuclear y la cromatina condensada, común en núcleos de células somáticas y formada por polipéptidos de un rango de peso molecular aproximado a 70 000, las laminas A, B y C, que integran una fase de adhesión para el DNA cromosomal durante la interfase (Hancock y Bouliskas,1982) y se relacionan con la organización de los complejos de poro y el anclaje de la cromatina "inactiva" en la periferia del núcleo separada de la cromatina activa (Newport y Forbes,1987).

Cromatina. La condensación de estructuras dentro del núcleo antes de la división celular fué observada en 1876 por Balbiani; en 1879, Flemming aplicó el término cromatina (del griego *chroma* color) a la sustancia que reacciona intensamente con los colorantes básicos observada en núcleos metafásicos y sugirió que la reacción se debía al contenido de nucleína, un compuesto fosforado presente en células de pus y en esperma de salmón, aislado por Miescher en 1871 (citados por De Robertis y De Robertis,1983).

El término **cromosoma** fué aplicado en 1890 por Waldeyer al observar la transformación cíclica en filamentos que se condensan y migran por la disolución temporal de la envoltura nuclear y su continuidad con el material que se reorganiza en el núcleo interfásico de las células hijas (citado por De Robertis y De Robertis,1983). En 1924 Feulgen y Rossenbek, desarrollaron la **Reacción Nuclear** que permitió la detección específica del DNA en células o cortes de tejido fijado, sometidos a una hidrólisis ácida débil antes de la aplicación del reactivo de Schiff que permitió la detección de los patrones estructurales indicadores de la actividad celular que se describen a continuación: **a)** núcleos interfásicos que presentan poca cromatina teñida, debido a que los cromosomas se encuentran extendidos o en condición eucromática con mayor superficie de DNA sintéticamente activa. **b)** núcleos en los que la cromatina densa representa una gran proporción de masa cromosomal en condición heterocromática, inaccesible para la transcripción (citados por Bloom y Fawcett,1975). La reacción se considera positiva en el núcleo, particularmente intensa en los cúmulos de heterocromatina o cromocentros y negativa en el citoplasma y en el nucleolo, a excepción de los intersticios que ocupa la cromatina asociada a él (Bloom y Fawcett,1975; De Robertis y De Robertis, 1983).

En 1928 fué reconocida por Heitz, la existencia de dos variantes estructurales, la **heterocromatina** que permanece organizada en forma compacta en la periferia durante la interfase y la profase temprana y la **eucromatina** de estructura laxa, dispersa en el espacio nuclear (citado por De Robertis y De Robertis,1983).

Los genes que transmiten la información hereditaria entre generaciones y dirigen la función de cada célula, se localizan en estructuras formadas por DNA y proteínas, las cuales aparentemente mantienen la estructura y regulan la actividad, control que tiene especial significado en los procesos de diferenciación, desarrollo embrionario y de acción hormonal, relacionados con la expresión de la información genética (Stein y col., 1975). En eucariontes, el DNA en secuencias de 200 pares de nucleótidos interactúa con el octámero formado por dos moléculas de las histonas H2A, H2B, H3, H4, así como también con una molécula de histona H1 y proteínas no histónicas, para integrar unidades conocidas como nucleosomas (Kornberg,1977; van Holde,1989). Los diferentes grados de empaquetamiento de las cadenas de nucleosomas representan estados conformacionales relacionados con la actividad transcripcional de la cromatina en interfase y con la transición a cromosomas, en mitosis y meiosis (van Holde,1989).

El empaquetamiento de los nucleosomas limita la accesibilidad a las RNA polimerasas y otras proteínas regulatorias (Gross y Garrard,1988; Elgin,1988) y se considera, que la afinidad de la enzima por sitios específicos puede ser clave en el proceso del desarrollo (Jenuwein y col.,1993).

Algunas observaciones sugieren que la distribución de la cromatina no es al azar, que su organización en relación con la envoltura nuclear es recurrente, en sitios bien definidos durante la interfase (Daskal y Busch,1978) y que la orientación de los diferentes paquetes observados en la periferia y en asociación con el nucleolo, refleja un patrón repetitivo (Esquivel,1988).

La cromatina participa como matriz de DNA para la síntesis de moléculas específicas de RNA, que acopladas a proteína adoptan configuraciones tridimensionales particulares (Watson,1962b).

La localización de cromatina activa en la replicación de DNA se logró por medio de la incorporación de timidina tritiada y por el análisis subsecuente de muestras por autorradiografía ultraestructural. Se atribuye a Hay y Revel la determinación de sitios de incorporación de precursores radioactivos en el DNA, los mismos autores que publicaron en 1963 que en los núcleos celulares, durante la interfase, la heterocromatina está formada por fibrillas de 10 nm y que también se observa material del mismo tipo en los cromosomas mitóticos y meióticos (citados por Bouteille y col.,1974). En cuanto a la transcripción, Littau y colaboradores (1964) determinaron en núcleos aislados de timo, que la cromatina difusa es activa en síntesis de RNA, mediante la incorporación de uridina tritiada. Karasaki (1965) analizó las características de la cromatina y determinó la intensidad de síntesis de RNA nuclear en células de ectodermo y mesodermo, durante la embriogénesis de anfibios. No obstante la complejidad de la estructura nuclear y aún cuando no es posible identificar genes específicos morfológicamente, las técnicas autorradiográficas y de microscopía electrónica permitieron reconocer diferentes productos de transcripción.

En 1967 Oscar L. Miller y otros investigadores estudiaron genes activos al microscopio electrónico, aprovechando la notable amplificación del RNA ribosomal presente en los nucleolos de ovocitos en crecimiento, que presentan cromosomas extendidos muy grandes y sintetizan RNA mensajero activamente. En ese material lograron observar detalles estructurales del DNA durante la transcripción a RNA, mediante el aislamiento de núcleos, la dispersión de su contenido en agua destilada y la separación de los nucleolos extracromosomales de la capa que los envuelve para procesar el centro fibroso en solución de formalina y posteriormente centrifugar los residuos sobre rejillas carboneadas.

Las muestras sometidas a tratamiento enzimático y contrastadas con reactivos específicos permitieron identificar en las imágenes una larga fibra axial única de DNA y proteína a partir de la cual se originan los componentes fibrilares laterales de RNA y proteína. Las pruebas de autorradiografía con precursores marcados, permitieron determinar la existencia de unidades matriz de DNA que sintetizan RNA activamente, mientras que algunos segmentos se comportan como espaciadores, que aparentemente no se transcriben. Las fibrillas de RNA que se están sintetizando se acoplan con proteínas citoplásmicas sintetizadas previamente, las cuales migran al núcleo. En algunas fibras fué posible determinar la localización de RNA polimerasa, la enzima que cataliza la reacción en cada sitio de transcripción. También en células HeLa se observó que los genes RNA ribosomales son expresados como conjuntos de fibrillas que crecen gradualmente a partir de la fibra matriz (Miller,1973).

En diferentes tipos celulares estudiados mediante técnicas autorradiográficas, se observaron estructuras en forma de fibras y gránulos de carácter ribonucleoproteico distribuidas en el espacio nuclear, en la periferia de la cromatina compacta, las **pericromatinianas** o dispersas en el espacio que ocupa la cromatina laxa, las **intercromatinianas** (Fakan y Puvion,1976). El comportamiento de las estructuras intercromatinianas y pericromatinianas, es afectado por factores que inhiben o estimulan la actividad transcripcional de la cromatina (Wang y Kostraba,1978).

Los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de los dípteros, que permanecen alineados durante interfase mostrando un marcado patrón de bandeo por efecto de la posición de regiones intercaladas de heterocromatina y de eucromatina (Edström,1974) fueron de gran utilidad en la determinación estructural de la expresión de genes particulares. En *Chironomus tentans*, la actividad de tres bandas conocidas como anillos de Balbiani, fué determinada por la visualización de sus productos en el sitio de síntesis, dispersos en el nucleoplasma y atravezando los poros nucleares hacia el citoplasma (Vázquez-Nin y Bernhard,1971; Daneholt,1992).

La proporción específica de DNA y de histonas en los núcleos de las células somáticas es constante y en las células sexuales se encuentra reducida a la mitad (Gurdon,1974; Vिलее y col.,1977). Las moléculas de DNA son muy estables, solamente se resintetizan antes de que la célula se vaya a dividir y la formación de productos específicos requiere del flujo de moléculas de información que permitan a la célula responder a estímulos intra y extracelulares mediante la continua síntesis y degradación de factores de transferencia de información (Vилее y col., 1977).

El grado de compactación de la cromatina muestra un patrón de distribución en la mayoría de células, el cual se define gradualmente, durante la serie de transformaciones que sufren las células nerviosas (Vázquez-Nin y col.,1983) y musculares (Zavala y col.,1992) del embrión de ave, en proceso de diferenciación y que coinciden con modificaciones de las fracciones de RNPs nucleares.

Reconocimiento de las ribonucleoproteínas (RNPs). El aislamiento del núcleo celular logrado en 1871 por Miescher, la determinación citoquímica del altas proporciones de RNA intranuclear en células que sintetizan proteína activamente lograda por Brachet (1942) y la caracterización de complejos de RNA y proteína libres de DNA publicada en 1946 por Mirsky y Pollister, son hallazgos de gran trascendencia en el campo de la biología celular, en particular para el conocimiento de la significancia funcional del RNA (citados por DuPraw,1971).

El desarrollo de técnicas de rutina de citología ultraestructural, basadas en doble fijación de muestras con aldehídos y osmio, inclusión en plásticos hidrofóbicos y contraste de cortes ultrafinos con sales de uranio y plomo en solución, revelaron la estructura de la cromatina y del cuerpo nucleolar dentro del núcleo y de las características de ribosomas y otros organelos citoplásmicos (Watson,1958a.b).

Karasaki en 1959 publicó la descripción ultraestructural del núcleo interfásico de embriones en proceso de desarrollo, a partir de muestras fijadas con tetraóxido de osmio en las que observó la organización del componente cromatínico en cúmulos dispersos de textura fina, formados por fibras de 3 a 10 nm entre los cuales reconoció un componente granular, no cromatínico, mayor de 20 nm y otro de alrededor de 30 - 50 nm (citado por Karasaki,1965).

Posteriormente Karasaki (1965) analizó los sitios de incorporación de uridina tritiada y el destino del RNA sintetizado y logró determinar los sitios de síntesis temprana en la región periférica de la cromatina compacta y en el nucleolo y de síntesis tardía en la región intercromatiniana, mediante el marcado de células en etapas tempranas de la embriogénesis de un anfibio del género *Triturus*.

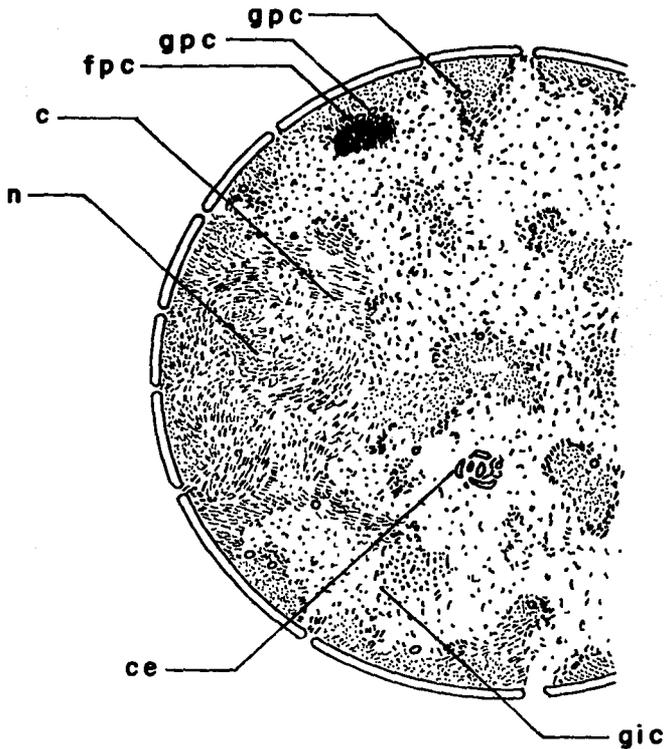
Bernhard en 1969 presentó la publicación de un método de contraste para cortes ultrafinos, que permitía reconocer preferencialmente estructuras nucleares que contienen RNA y que fué diseñada con el objeto de profundizar la exploración bioquímica del núcleo celular sin extracción de sustancias orgánicas. Muestras de varios tejidos de diferentes organismos y tipos celulares, fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% disuelto en amortiguador de fosfatos a pH 7.3 y se deshidrataron en alcohol o en glicolmetacrilato, incluidas en resina epóxica o GMA y polimerizadas a 60°C o luz ultravioleta respectivamente.

En cortes ultrafinos, se realizaron diferentes pruebas para evaluar el efecto del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) en solución acuosa a pH 7, como tratamiento entre el primer contraste con una solución de sales de uranilo y el contraste de reforzamiento final con solución de citrato de plomo. Paralelamente se realizaron pruebas con agua acidulada (pH 3) y alcalina (pH 9-11), con diferentes soluciones amortiguadoras (borato, citrato, fosfato y cacodilato en solución a pH variable) y con alcohol absoluto, acetona, ácido acético y ácido cítrico (Bernhard, 1969).

Las imágenes obtenidas con la aplicación de EDTA en solución 0.2 M, revelaron claramente la estructura del nucleolo y la distribución de diferentes partículas de contraste marcado, de pequeñas dimensiones, ampliamente distribuidas en el espacio intercromatiniano y en la periferia de cúmulos de cromatina compacta (esquema 2). En los cortes de las células de glándulas salivales de *Chironomus thummi*, el contraste de los cromosomas gigantes es muy bajo o se pierde en las amplias bandas de cromatina, sin embargo se mantiene en los gránulos asociados, en otros gránulos y fibrillas dispersos en el espacio nuclear y en los ribosomas citoplásmicos. En las muestras de cultivos celulares infectadas con reovirus tipo III que contienen RNA viral de doble hebra, los nucleoides y las RNP nucleares son notables por su densidad en un fondo de cromatina poco contrastado, mientras que en células infectadas con adenovirus, los viriones se reconocen por su bajo contraste en comparación con las RNP nucleares y con los ribosomas citoplásmicos.

La reacción del EDTA, es resultado de su efecto quelante que remueve progresivamente los iones de uranilo de la cromatina y de estructuras puramente proteicas, afectando también a las estructuras ribonucleoproteicas en pruebas con tratamientos largos, aunque estas últimas después de los tratamientos cortos habituales presentan un contraste más marcado (De Robertis y De Robertis, 1983).

El nucleolo. Es un prominente organelo inicialmente descrito en 1781 por Fontana (citado por Risueño y Medina, 1986) que representa el sitio de transcripción, procesamiento y ensamblaje de los precursores ribosomales (Scheer y Benavente, 1990). Es una estructura polimórfica, con notables variaciones en tamaño y distribución de sus componentes aún en células de un mismo tipo, que cíclicamente son desensamblados durante la profase y reensamblados en telofase. Desde las observaciones de Heitz (1931) se consideró que su número es constante y característico de cada especie. A partir de su relación con la constricción secundaria que presentan algunos cromosomas, McClintock (1934) sugirió la existencia de una región organizadora del nucleolo o NOR (citado por Risueño y Medina, 1986) y la



Esquema 2. Estructura del núcleo en interfase de célula diferenciada contrastada con la técnica del EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas. Las regiones sombreadas corresponden a masas de cromatina compacta (c). En el espacio intercromatiniano (fondo blanco) sobresalen diferentes estructuras ribonucleoproteicas, el nucleolo (n), las fibrillas pericromatinianas (fpc), los gránulos pericromatinianos (gpc), los gránulos intercromatinianos (gic) y los cuerpos espiralados (ce). Elaborado de acuerdo con Monneron y Bernhard (1969). En las figuras contrastadas con la técnica de Bernhard (1969), el componente cromatiniano se decolora y resaltan las estructuras RNPs.

formación de numerosos cuerpos nucleolares pequeños, durante la reconstrucción telofásica (citado por Vázquez-Nin y col.,1986). Anastasova-Kristeva en 1977 observó la asociación de cuerpos nucleolares durante el período G1, la disminución del número y el aumento del tamaño de los nucleolos (citado por Vázquez-Nin y col.,1986). La estrangulación secundaria puede presentarse en uno o varios de los cromosomas contenidos en una célula y no es basófila, por lo cual se reconoce el sitio en que se concentra la sustancia nucleolar y también se conoce como segmento SAT *sine acido timonucleico* incluido en el *acido timonucleico*, como anteriormente se conocía al DNA (Leonhardt, 1975).

Se ha sugerido que las unidades de transcripción observadas por Miller en 1966, que muestran la localización del RNA y del DNA en unidades matrices y espaciadoras y del RNA en un gradiente longitudinal de fibrillas RNP laterales en cada gene que se transcribe, son elementos conservados en un amplio rango de eucariontes inferiores y superiores, incluyendo plantas y animales (Hadjiolov,1985). Su composición es similar a la del RNA ribosómico, con alto contenido de fosfoproteínas (Alberts y col.,1994; De Robertis y De Robertis,1983; Hadjiolov,1985).

En los nucleolos compactos, reticulados, o en las variantes de estos dos tipos descritos con ayuda del microscopio electrónico, se presentan tres elementos intimamente relacionados: el componente fibrilar denso (CFD) formado por fibrillas de 3-4 nm de diámetro, el componente granular (CG) formado por gránulos de 15 nm de diámetro y los centros fibrilares (CF) que son regiones circulares delimitadas periféricamente por gránulos de 15-20 nm y fibrillas de 5-10 nm en la región central (Hadjiolov,1985). Los componentes del CFD y del CG son sensibles a la digestión por ribonucleasa (De Robertis y De Robertis,1983). Se considera que en la región del CF se localiza el DNA no transcrito de la región del NOR de los cromosomas mitóticos, que el CFD que usualmente rodea a los CF representa transcritos de genes de RNAr y es el sitio en que se transcribe el componente RNP pre-ribosomal y el CG contiene partículas pre-ribosomales en proceso de maduración (Hadjiolov,1985; Medina 1989).

Este organelo es desensamblado cíclicamente durante la profase y el reensamblaje en las células hijas sucede alrededor de los NORs, sitios cromosomales que contienen regiones repetidas de DNAr a partir del cual se forman los factores de transcripción y procesamiento para la producción de RNAr maduro y los componentes adicionales de proteína y RNA para ensamblaje del ribosoma (Alberts y col., 1994).

La determinación de la composición del nucleolo, muy similar a la del RNA ribosómico, con alto contenido de fosfoproteínas y otros logros han sido alcanzados mediante la experimentación con

diferentes sistemas celulares, análisis por autorradiografía ultraestructural y el uso de pruebas inmunocitoquímicas (Alberts y col.,1994). En 1982 Busch y colaboradores caracterizaron en el nucleolo de células de hepatoma de Novikoff y de células PTK2, dos proteínas no histónicas de comportamiento particular durante el ciclo celular, una de 110 KDa que durante la profase permanece asociada a elementos del nucleolo (proteína C23) mientras que otra de 37 KDa se dispersa en el nucleoplasma (proteína B23). En metafase C23 solamente se localiza en los NOR y la B23 se asocia con los cromosomas en forma inespecífica. Durante la telofase, C23 aparece en los cuerpos prenucleolares y posteriormente en el nucleolo y la B23 aparece en las etapas tardías o hasta G1 (citados por Risueño y Medina, 1986), esta última colocaliza con fibrilarina en la región fibrilar densa (Ochs y col.,1985). La actividad de la nucleolina, principal proteína del nucleolo de células de mamífero en proliferación, depende de la actividad de la proteína-quinasa y colocalizan en el CFD del nucleolo de las células CHO (Medina,1989). Además se ha propuesto la existencia de DNA topoisomerasa I y factores de unión (UBF) en los CFs y en el CFD (Olmedilla y col.,1993).

El contenido del nucleolo, caracterizado detalladamente, incluye además de series repetidas de genes de RNAr, numerosas proteínas ribosomales, proteínas nucleolares, diversas RNPs, RNA polimerasa I, DNA topoisomerasas, factores de transcripción, enzimas RNA 5S y RNAs de pequeño tamaño ricos en uridina (Raska y Dunder,1993). Los precursores de RNAr y RNA 18 y 25S fueron detectados en diferentes componentes nucleolares, mediante hibridación *in situ* y técnicas citoquímicas, y uno de los hallazgos más notables del análisis autorradiográfico de muestras expuestas por cortos períodos, se relaciona con la presencia de RNA recién sintetizado en la periferia de los CFs que sugiere que la transcripción se inicia en ese punto (Olmedilla y col.,1993).

El comportamiento del nucleolo durante el proceso de desarrollo fué analizado por Karasaki (1965), quién estudió sobre el sitio de síntesis de RNA nuclear durante la embriogénesis de anfibios en nucleolos de las células del ectodermo y del mesodermo presuntivo de *Xenopus*. Las células de gástrula en fase temprana de formación presentan cuerpos nucleolares primarios menores de 1.5 μm , que se originan como pequeños aglomerados fibrosos y densos, de material muy similar al observado en la región central en nucleolos de células diferenciadas. Conforme el nucleolo aumenta de tamaño se reorganiza la arquitectura de sus componentes granulares y fibrilares, en un proceso gradual. Posteriormente presentan, dos o tres cuerpos nucleolares de aproximadamente 3 μm de diámetro, de forma y compactación variable, compuestos por fibrillas menores de 10 nm, empaquetadas

apretadamente en la región central y gránulos de 15 nm en la periferia. También observó nucleolos de estructura nucleolonemal. El incremento en tamaño del nucleolo y las modificaciones notables en la arquitectura de los componentes fibrilar y granular inicialmente segregados y distribuidos irregularmente, se observaron también en ectodermo y en células diferenciadas de músculo.

La gradual transformación del nucleolo al igual que las variaciones en la densidad de otras RNP, coinciden con el inicio de la síntesis del RNA ribosomal, con la elevación del nivel de síntesis de RNA total y con la aparición e incremento de diferentes enzimas (Karasaki, 1965).

Fakan y Odartchenko (1980) en el análisis sobre la organización ultraestructural del núcleo celular de los mamíferos, observaron cambios progresivos en el cuerpo nucleolar a partir del período de preimplantación, que ocurre en las primeras 40 horas de la embriogénesis del ratón. A las 64 horas, los embriones formados por 2 células, presentan nucleolos redondos, compactos, agranulares, rodeados de cromatina o nucleolos pequeños formados por material granular y fibrilar segregados. En la etapa de 4 blastomeras, las células presentan cuerpos de estructura nucleolonemal definida, formados por una red fibrogranular compacta, mientras que los blastocistos presentan nucleolos grandes completamente reticulares (Fakan y Odartchenko, 1980).

En embriones de aves, Vázquez-Nin y colaboradores (1983) registraron importantes cambios en el comportamiento. El volumen nucleolar de células matrices de embriones de 2 días de incubación fué de $6 \mu\text{m}^3$. Posteriormente se registró disminución en el volumen hasta un valor mínimo de $2.5 \mu\text{m}^3$ en embriones de 9 días de edad, seguida por un incremento gradual conforme avanza el desarrollo, hasta que alcanza un segundo pico alrededor de $11 \mu\text{m}^3$ en motoneuronas de recién nacidos. Estos picos de volumen nucleolar coinciden con etapas del desarrollo en que la célula requiere una gran síntesis proteica y por lo tanto muchos ribosomas; Esto se debe a la necesidad de duplicar el peso celular entre una mitosis y otra y al enorme agrandamiento del axón.

Por otra parte, las células de la capa ependimal de 2 días, presentan numerosos cuerpos esféricos pequeños y otros elípticos muy grandes de estructura nucleolonemal compacta formados de fibrillas y gránulos, sin centros fibrilares. En los embriones de 4 días, se observó que el volumen de los nucleolos de células de la capa ependimal e intermedia se reduce mientras que los neuroblastos del cuerno anterior presentan varios nucleolos. La estructura nucleolonemal laxa se hace evidente en neuronas inmaduras y de etapas posteriores (Vázquez-Nin y col., 1983).

Así como en las células animales la estructura del nucleolo es compacta en las etapas iniciales del desarrollo y gradualmente adquiere estructura reticular, también en células vegetales se han reportado alteraciones en tamaño y compactación durante la diferenciación (Risueño y Medina, 1986).

Las células de un mismo tipo, pueden tener igual o diferente número de nucleolos, pero el tamaño de los mismos representa un parámetro morfológico de evaluación de la actividad transcripcional. Entre las que tienen el mismo número de nucleolos, se pueden presentar diferencias en la actividad transcripcional del RNA pre-ribosomal en función del volumen nucleolar total, como se observó mediante la incorporación de uridina tritiada, que resultó muy elevada en nucleolos grandes, de varios tipos celulares de embriones y organismos adultos (Vázquez-Nin y col., 1986). Anteriormente se había reportado que las variaciones en volumen nucleolar de las células que responden cíclicamente a un estímulo hormonal, coinciden con variaciones en la densidad de otras estructuras RNPs (Echeverría y col, 1980).

Ribonucleoproteínas extranucleolares. Swift en 1959 señaló la presencia de estructuras de alrededor de 20 nm en el núcleo celular, antes de la publicación de la técnica preferencial (citado por Swift, 1963). Con la técnica de doble contraste Granboulan y Bernhard, en 1961 y Ris en 1962, describieron numerosas fibrillas y gránulos dispersos en el nucleoplasma (citados por Monneron y Bernhard, 1969). En los bordes de la cromatina compacta se localizaron gránulos sobresalientes por su tamaño y la presencia de un halo claro de alrededor de 25 nm (Watson, 1962a).

La descripción de las partículas observadas en condiciones normales en muestras de diversos tejidos procesados por el método del EDTA y la comparación de su distribución en muestras de células y tejidos sometidos a extracción química y digestión enzimática, probaron la existencia de 4 categorías de RNPs, los gránulos pericromatinianos, las fibrillas pericromatinianas, los gránulos intercromatinianos y los cuerpos espiralados (Monneron y Bernhard, 1969), que representan un elevado porcentaje del contenido de RNA total del núcleo normal (Risueño y Medina, 1986)

Gránulos Pericromatinianos (GPC). Son partículas esféricas o ligeramente elipsoidales. Fueron observados por Watson (1962a) y descritos con la técnica preferencial para RNPs en diferentes tipos de células. Sus dimensiones varían alrededor de 40 - 45 nm. Son estructuras sensibles a digestiones sucesivas de pronasa-RNAasa y resistentes al efecto de pronasa - DNAasa o pronasa exclusivamente,

según se observó en material fijado en aldehídos e incluido en resinas acrílicas hidrosolubles (Monneron y Bernhard, 1969). Los GPCs guardan notable similitud con los gránulos de los anillos de Balbiani, que son partículas de 50 - 65 nm, observadas en los núcleos de las células de las glándulas salivales de dípteros.

Los GPCs, comúnmente localizados en la proximidad de cúmulos de cromatina periférica y perinucleolar, se observan mediante la técnica del EDTA como un centro de alta densidad definido por un halo claro de baja densidad a los electrones (Bouteille y col., 1974), no son afines a la técnica del PTA de contraste de cromatina (Vázquez-Nin y col.,1973) y se consideran un componente universal, que conserva su estructura característica en los núcleos de los diferentes grupos de eucariontes (Daskal y col.,1980; Jiménez-García y col.,1989).

En 1980 Daskal en colaboración con Komaromy y Busch lograron el aislamiento de partículas de 30 a 40 nm de diámetro, con un coeficiente de sedimentación aproximado de 40 S en gradiente de sacarosa y evidenciados con la técnica de Bernhard (1969), iguales a los GPCs observados *in situ*. Utilizaron núcleos de hepatocitos de ratas tratadas con cicloheximida, uno de los diversos agentes que produce incremento de estas estructuras. Una fracción de coeficiente de sedimentación 40 S se definió mejor en los residuos nucleares tratados con DNAsa II, aunque la solubilización de esa fracción con NaCl 0.6 M produce un desplazamiento a la banda 10-11S. Según los autores, las características ultraestructurales de los GPCs no fueron alteradas y el proceso de aislamiento permitió estudiarlos en número considerable, independientemente del componente cromatínico, como resultado del tratamiento con DNAsa II y mediante el empleo del EDTA. Es importante señalar que la digestión enzimática produce alteraciones en el diámetro de las estructuras, encontrando GPCs de 18 - 20 nm en los residuos nucleares y algunas partículas aisladas presentan un desenrollamiento parcial y la apariencia de una esfera hueca. Por medio del análisis del RNA de los GPCs en gel de poliacrilamida, se determinó la presencia de dos fracciones de bajo peso molecular, una fracción 4.7 S que predomina sobre otra fracción 5.8 S (Daskal y col.,1980).

El nivel de GPCs fluctúa como resultado del uso de drogas, agentes físicos y hormonas que afectan la transcripción y la traducción; el incremento de partículas fué reportado en células de hígado de ratas expuestas a lasiocarpina, aflatoxina (Monneron y Bernhard, 1969), α -amanitina (Petrov y Sekeris, 1971), cicloheximida (Daskal y col.,1975), cortisol (Moyne y col.,1977), mitomicina (Daskal y

col.,1980). También son afectados por la temperatura supranormal y por hipotermia (Daskal y col.,1980).

Experimentos de supresión y administración de estradiol *in vivo* (Vázquez-Nin y col.,1978) o *in vitro* (Vázquez-Nin y col.,1979), demostraron que los GPCs constituyen un almacén de RNA heterogéneo (premensajero) o RNA mensajero en equilibrio entre la síntesis (transcripción) y su salida al citoplasma. Estos experimentos permitieron también poner en evidencia que el estradiol aumenta la velocidad de salida de los RNAm con una cinética más rápida que con la que se produce el incremento de la transcripción, efectos similares a los producidos por la hormona en condiciones normales durante el ciclo estral (Echeverría y col.,1980) y posteriormente se encontró que la testosterona ejerce acciones similares sobre los núcleos de las células epiteliales de la próstata ventral (Echeverría y col.,1991).

Notables alteraciones en la frecuencia de GPCs se han reportado en varios tipos celulares durante la embriogénesis de diferentes especies. En embriones de ratón formados por dos células, se observaron abundantes GPCs en la periferia nucleolar, que disminuyen gradualmente conforme el desarrollo avanza. A partir de la etapa de 4 células su densidad es comparable a la observada en células diferenciadas. En ese material, se presentan gránulos EDTA positivos distribuidos en el nucleoplasma y cerca del nucleolo, redondos y alargados, de diámetro entre 30 y 50 nm, diferentes de los GPCs. Estos gránulos son numerosos en embriones de 2 - 8 células, escasos en mórula y no se detectaron en la etapa de blastocisto (Fakan y Odartchenko,1980).

En el estudio sobre el comportamiento de los núcleos de células nerviosas de embriones de ave en diferentes etapas del desarrollo, Vázquez-Nin y sus colaboradores (1980) observaron variaciones de los GPCs durante la diferenciación subsecuente de células matriz en neuroblastos y neuronas de la región cervical de la cuerda espinal, aplicando la técnica del EDTA en cortes ultrafinos. La frecuencia de GPCs es muy baja en células matrices localizadas en la capa ependimaria e intermedia, sin embargo la proporción es ligeramente más elevada en neuroblastos de la capa periférica, de embriones entre 2 y 4 días de incubación. Durante la transformación de neuroblastos a neuronas maduras, entre el día 4 de incubación y el día 9, los gránulos muestran un marcado incremento que se mantiene hasta el momento de la eclosión. La modificación coincide con la etapa del crecimiento axonal y con el establecimiento de conexiones centrales y periféricas de la motoneurona. Los GPCs observados, se encuentran dispersos o formando grupos y muestran además variaciones en el tamaño y en su proximidad con el

nucleolo, por lo que se podría considerar la posibilidad de un origen a partir de segmentos específicos de cromatina transcripcionalmente activa (Vázquez-Nin y col.,1980).

En cortes contrastados por el método de Bernhard (1969), se estudiaron los núcleos de células musculares de embriones de ave en diferentes etapas y se registraron variaciones de los GPCs que coinciden con eventos particulares de la miogénesis. La densidad numérica de los GPCs es baja en las células mononucleares y en las que forman miotubos y no se observaron cambios importantes en los núcleos durante la diferenciación de los mioblastos y de las miofibrillas. La innervación del músculo y el establecimiento de contactos sinápticos entre neuronas motoras y células musculares, coincide con un marcado incremento de los GPCs, comportamiento que involucra a la sinapsis con mecanismos de control sobre la expresión de algunos genes (Zavala y col.,1992).

Los GPCs de las células de vertebrados y los gránulos de Balbiani observados en los núcleos de dípteros (*Drosophila*, *Chironomus*, etc), los cuales se originan en los puffs, en los anillos de Balbiani o en las bandas de cromatina extendida y migran por el nucleoplasma hacia la envoltura nuclear (Vázquez-Nin y Bernhard,1971), alteran su comportamiento en respuesta al efecto de sustancias que inhiben o estimulan la transcripción, lo cual denota una función de almacenamiento y/o transporte intranuclear de los complejos de RNA - proteína (Monneron y Bernhard,1969; Vázquez-Nin y Bernhard,1971; Bouteille y col.,1974). El efecto de la elevada concentración de sales en la ultraestructura de los GPCs (Daskal y col, 1980) sirvió de apoyo a la hipótesis sobre su naturaleza filamentosa propuesta por Vázquez-Nin y Bernhard (1971).

La inmunolocalización de las proteínas que se unen a los RNAs de bajo peso molecular, ricos en uridina relacionados con el procesamiento del RNAm (U_1, U_2, U_3, U_4, U_5 y U_6) ha permitido situar con precisión el lugar donde se lleva a cabo la remoción de intrones durante el "splicing", cuando se emplean núcleos con cromosomas politénicos como objeto de estudio. Los núcleos citados tienen la característica de que los lugares activos en la síntesis de RNA son fácilmente reconocibles y están separados de la envoltura nuclear por un amplio espacio nucleoplasmático libre de DNA. Empleando ese procedimiento y ese material, Vázquez-Nin y colaboradores (1990), lograron demostrar que el "splicing" se produce fundamentalmente en los lugares de transcripción sobre la fibra que posteriormente se pliega para formar el gránulo de Balbiani, equivalente del GPC. De esto se deduce que los gránulos de Balbiani y los GPCs, contienen RNA mensajero sin intrones, es decir maduro y que su significación citofisiológica es la de un almacén intranuclear de mensajeros.

Fibrillas Pericromatinianas (FPC). Descritas por Monneron y Bernhard (1969) como estructuras ribonucleoproteicas de 3 a 5 nm de grosor y hasta 120 nm de largo, son consideradas como un sustrato morfológico donde se localiza el RNA heterogéneo nuclear (RNAhn) recién sintetizado (Fakan y Puvion,1976; Moyné y Puvion,1976). Mediante el análisis autorradiográfico ultraestructural, Karasaki (1965) determinó en muestras en *Xenopus*, la existencia de numerosas partículas fibrilares de RNA ampliamente distribuidas en el espacio intercromatiniano y reconoció la existencia de este componente asociado a las fibras de cromatina, en células de ectodermo y mesodermo presuntivo, analizadas a partir del estado de gástrula. Con la técnica de Bernhard (1969) fueron evidenciadas numerosas fibrillas de grosor variable, enrolladas irregularmente en el nucleoplasma en continuidad con otras estructuras RNPs granulares, susceptibles a la digestión enzimática por efecto de RNAasa aún en ausencia de proteasa, con lo cual se determinó su contenido de RNA (Bernhard, 1969; Monneron y Bernhard,1969). Fakan y Odartchenko (1980) observaron que en los núcleos de embriones de ratón, en las etapas tempranas, las FPCs son escasas, se encuentran dispersas o rodeando pequeños cúmulos de cromatina, sin embargo, en mórulas y en blastocistos su frecuencia es notablemente elevada.

A partir de la observación y descripción de esta fracción del componente RNP nuclear, poco evidente por el método de contraste de rutina, se consideró su participación como un elemento morfológico clave en la investigación sobre la transcripción en general, por la estrecha relación que establece con la cromatina (Monneron y Bernhard,1969).

La posibilidad de que las FPCs representan la expresión morfológica de la transcripción (Monneron y Bernhard, 1969) se apoya en las alteraciones observadas por diferentes investigadores, como el incremento en frecuencia por efecto de factores que estimulan la transcripción, como el producido por cortisol en hepatocitos de rata (Petrov y Bernhard,1971) o disminución por un efecto inhibitor, como resulta de la aplicación de α -amanitina que afecta la síntesis de RNA extranucleolar (Petrov y Sekeris,1971) y de diferentes sustancias que actúan específicamente sobre el RNAhn recién sintetizado (Bachelierie y col.,1975; Fakan y Puvion,1976). La naturaleza RNP de las fibrillas fué sugerida por técnicas citoquímicas y autorradiográficas (Fakan y Bernhard,1973) y la presencia de RNAhn recién sintetizado se determinó por técnicas ultraestructurales, en correlación con estudios bioquímicos (Bachelierie y col.,1975). Los estudios sobre incorporación temprana de uridina tritiada indican que el

marcado localizado en las fibrillas corresponde a los sitios de síntesis de RNA pre-m o RNAhn (Nash y col.,1975;Moynes y Puvion,1976; Fakan y Puvion,1976; Puvion y Moynes, 1981).

Fakan y Puvion (1976) demostraron que las fibrillas se forman en zonas periféricas de la cromatina compacta y al menos parte de ellas constituyen fibrillas intercromatinianas (FICs) que migran al espacio intranuclear (Puvion y Moynes,1981), para continuar el procesamiento y la maduración del RNA (Fakan y Puvion,1976).

Los primeros productos de transcripción visualizados como fibrillas pericromatinianas en cortes de núcleos de células somáticas, son equivalentes a las cadenas nacientes de RNA acopladas con proteína observadas al ME por Miller en 1966 en muestras del contenido nuclear de ovocitos, obtenidas por dispersión (citado por Hancock y Boulikas,1982). La caracterización inmunocitoquímica de los componentes RNPs de las estructuras nucleoplásmicas reveló que las fibrillas, independientemente de su localización en las regiones intercromatinianas y pericromatinianas, contienen RNPpn y antígenos de RNPhn (Fakan y col., 1984) y productos de "splicing" diferentes a las RNPpn (Spector y col.,1991).

Gránulos Intercromatinianos (GIC). Los estudios citoquímicos realizados por Swift en 1959, facilitaron la descripción dentro del núcleo interfásico, de numerosas partículas de 20-30 nm de diámetro, individuales o agrupadas en cúmulos, que están formadas por un tipo particular de RNA resistente a la RNAasa y a la extracción con ácido periódico (Swift,1963). La distribución de los GICs en la región intercromatiniana en asociación con fibrillas delgadas fué descrita mediante la técnica de Bernhard (1969) en diferentes tipos de células (Monneron y Bernhard,1969), en organismos de diferentes grupos de la escala zoológica (Jiménez-García y col.,1989).

Por su sensibilidad al tratamiento de pronasa seguido de RNAasa y la marcada resistencia al efecto de estas enzimas por separado, se considera que el RNA de los GICs se encuentra bien protegido por un componente proteico (Monneron y Bernhard,1969).

La presencia de un alto nivel de proteínas fosforiladas en los GICs fué sugerida por Browne y Locke en 1978 y confirmada por Wassef en 1979 (citados por Krzyzowska-Gruca y col.,1985). La técnica de bismuto, diseñada para la localización de RNPs por Browne y Locke en 1978, produce contraste acentuado en los GIC, en los GPC y en el componente fibrilar del nucleolo (citados por Krzyzowska-Gruca y col.,1985).

El doble contraste con uranilo y plomo en solución refuerza el obtenido con la solución de bismuto, lo que permitió delimitar las áreas de cromatina o de cromosomas de células en división, sin enmascarar las RNPs y posibilitando el estudio del comportamiento de los GICs durante la mitosis de hepatocitos de rata. En profase los GICs forman grandes cúmulos electron-densos distribuidos entre los cromosomas en proceso de compactación, en células metafásicas forman conglomerados de GICs cerca de los cromosomas y en la periferia del citoplasma. En telofase se observaron algunos gránulos individuales considerados como GICs dentro de los núcleos y otros en el citoplasma. El comportamiento de los GICs durante la mitosis y en telofase fué analizado en células tratadas con 9-aminoacridina, que produce la acumulación de los gránulos y permite diferenciarlos de los ribosomas en interfase. En estas condiciones, los GICs mantienen el patrón ultraestructural descrito en núcleos interfásicos en condiciones normales (Krzyzowska-Gruca y col.,1985). Su participación en el procesamiento y en el transporte de RNAhn (Prestayko y col.,1970) ha sido evaluada mediante métodos inmunocitoquímicos dirigidos a determinar el contenido de RNA mensajero inmaduro (pre-m o RNAhn) y de RNAs intranucleares de pequeño tamaño, ricos en residuos de uridina (URNApn).

Algunas evidencias indican la importancia de su papel estructural en la arquitectura nuclear (Fakan y col.,1984), como las variaciones en su abundancia por efecto de infecciones virales (Wassef,1979) y de agentes físico-químicos que actúan en diferentes etapas del metabolismo del RNA (Puvion y Moyne,1981). Su respuesta citofisiológica al efecto de tóxicos que inhiben la síntesis del RNAhn y del RNAr, en combinación con experimentos de pulso y caza, sugieren que las estructuras portadoras de RNA bien protegido se sintetizan muy al principio del ciclo celular (Puvion,1982; Jiménez-García,1985).

Los GICs solamente incorporan uridina tritiada en la periferia de los cúmulos (Fakan y Bernhard,1973), lo que indica la ausencia de transcripción y de migración de partículas RNP recién sintetizadas en el interior de los mismos (Echeverría y col.,1992).

El contraste preferencial de RNPs y cromatina por separado, en cortes seriados de muestras de hígado montados en forma alterna, reveló la disposición de la cromatina en diferentes grados de compactación y su relación con diferentes estructuras RNPs, facilitando el reconocimiento de filamentos de cromatina extendida entre los GICs organizados en cúmulos bien definidos, confirmando que no toda la cromatina extendida es transcripcionalmente activa, como se había observado anteriormente en algunas bandas de los cromosomas politénicos (Echeverría y col.,1992).

En embriones de ratón, cuando inicia la actividad transcripcional propia del sistema que incluye todas las clases de RNA, los GICs forman cúmulos en el espacio nuclear y otras estructuras RNPs individuales de pequeño tamaño ricas en uridina (URNPpn) se presentan dispersas en el nucleoplasma (Baran y col.,1993). Estas características se observaron en embriones obtenidos del oviducto entre 35 y 42 h después de la inyección de gonadotropina, procesados para ME e incluidos en Lowicryl K4M. Los cortes fueron incubados con anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNA que reacciona específicamente con moléculas de DNA cadena sencilla y doble, de acuerdo a la técnica de Scheer y colaboradores (1987). El componente fosfoproteico de los GICs fué localizado con el anticuerpo 3C5 y el reconocimiento del componente proteico de los URNPpn, se logró incubando las muestras con un suero humano autoinmune con especificidad anti-Sm, que reconoce las fibrillas RNPs y GICs (Fakan y col., 1984; Baran y col.,1993).

Cuerpos Espiralados (CE). Cajal en 1903, identificó cuerpos accesorios nucleolares que teñían fuertemente con plata (citado por Carmo-Fonseca y col.,1993). Posteriormente se determinó la presencia de agregados de fibras de 5 nm en paquetes de 50 nm aproximadamente, enrollados concéntricamente en cuerpos esféricos o elípticos de 0.3 a 0.5 μm de diámetro, localizados en la periferia nucleolar y cuya estructura ribonucleoproteica fué sugerida en el trabajo de Monneron y Bernhard (1969). Los cuerpos nucleares fueron identificados en núcleos de células malignas o sobrestimuladas (Brasch y Ochs, 1992).

Por medio de pruebas inmunocitoquímicas específicas con anti-Sm se determinó que los CE son compartimientos ocupados principalmente por RNPN y una baja proporción de RNPhn (Fakan y col.,1984) y que contienen RNAsn metabólicamente distinto a los GICs y subunidades de 65 y 35 kD del factor U2AF que no interviene en "splicing" (Carmo-Fonseca y col.,1993). Son estructuras cinéticas que contienen particularmente una fosfoproteína, la coilina p80, identificada por anticuerpos autoinmunes de reacción específica. La fosforilación de esta proteína coincide con cambios estructurales cíclicos que se evidencian por patrones de compactación y dispersión de RNPN detectadas con anti-coilina (Carmo-Fonseca y col.,1993).

Se han observado modificaciones por efecto de la temperatura en células HeLa y en fibroblastos, como alteraciones en el tamaño de los CB y en la cantidad de las RNPN que contienen, mientras que el uso

de inhibidores como la actinomicina-D o α -amanitina afecta su comportamiento de manera semejante a los GICs, posibles componentes de algunos CE (Carmo-Fonseca y col., 1993).

Kedersha y Rome en 1986 lograron el aislamiento de un elemento RNP citoplásmico, más grande que los ribosomas y que contiene una especie única de RNA de pequeño tamaño (144 pb) diferente a la que contienen otras RNPs conocidas y más de 50 copias de un polipéptido de PM aproximado a 104,000 a las que llamaron **Vaults**. (citado por Kedersha y col.,1990). Los vaults aislados de hígado de diferentes especies de eucariontes, incluyendo anfibios (rana toro y rana africana), aves (pollo) y mamíferos (rata y vaca) y en el mixomiceto *Dictyoslelium discoideum*, muestran similitudes en su composición polipéptidica que incluye un elemento mayor de aproximadamente 100 kiloDaltones y numerosos polipéptidos menores, que también se encontraron en fibroblastos y células mieloides y linfoides de mamíferos. Las proteínas de los vaults de todos los grupos señalados son reconocidas por el anticuerpo contra las proteínas específicas de los vaults de rata. De acuerdo con esas observaciones, los vaults representan estructuras citoplasmáticas conservadas, ampliamente distribuidas; Sus funciones posiblemente están relacionadas con el procesamiento del RNAm y el transporte del RNA. También se les ha relacionado con el metabolismo de las células eucariontes, por su asociación con proteínas semejantes a las del citoesqueleto. Los vaults no se presentan en el núcleo (Kedersha y col.,1990).

Las estructuras RNPs nucleares descritas y las estructuras citoplásmicas que contienen RNA, particularmente los ribosomas y las partículas de reconocimiento de señales (PRS), desempeñan un papel crítico en el metabolismo, mediando importantes funciones celulares. Su compleja composición molecular involucra diferentes especies y copias de fracciones de RNA y polipéptidos.

Matriz nuclear. Los elementos cromatínicos y RNPs descritos, están integrados a un complejo en el que se reconoce un entramado de estructura proteica reticular, formada por fibras de aproximadamente 50 nm de grosor asociadas con DNA, RNA, carbohidratos y fosfolípidos, según se observó en núcleos tratados desprovistos de cromatina y nucleoplasma que conservan la lámina densa, las proteínas del complejo de poro y residuos del nucleolo (Berezney y col.,1977; Berezney, 1991).

Las interacciones señaladas se relacionan con funciones de replicación del DNA, de transcripción en RNA y de regulación de los procesos nucleares (Berezney y col.,1977 Berezney, 1991; Barrack y Coffey,1982; Cook,1991).

La caracterización de la matriz nuclear aislada de núcleos morfológicamente intactos sometidos al tratamiento con nucleasas, extracción con sales y detergente, fué publicada en 1974 por Berezney y Coffey, que lograron la remoción de la mayor parte de la cromatina y proteínas, conservando estructuras residuales de naturaleza diversa, resistentes al tratamiento enzimático con DNAasa y a soluciones de alta concentración de sales; la extracción con soluciones salinas realizada en núcleos de hepatocitos de rata permitió reconocer inicialmente, un contenido aproximado de 30% de RNA, 10% de proteína, 1.5% de DNA y una fracción de fosfolípidos (citados por Berezney y Coffey, 1977; Barrack y Coffey,1982), sin embargo, mediante la digestión con altas concentraciones de DNAasa se logró la detérminación de aproximadamente un 10% de proteína, 3% de RNA, menos del 1% de DNA y fosfolípidos (Barrack y Coffey, 1982).

Mediante LIS (3,5-Diyodo salicilato de litio), se obtuvieron secuencias específicas asociadas con la estructura residual que representan fracciones de la matriz nuclear ricas en DNA. Las proteínas no histonas de elevado peso molecular, las laminas de la envoltura nuclear, los elementos reconocibles del complejo de poro y una pequeña proporción de proteínas de bajo peso molecular, entre ellas histonas, son importantes elementos macromoleculares que junto con el componente residual del nucleolo y la matriz fibrogranular externa, forman parte de la matriz nuclear. Las imágenes obtenidas con la técnica de contraste del EDTA en cortes ultrafinos, guardan notable similitud con las de la estructura de la matriz nuclear aislada y la imagen *in situ* observada en células enteras y en cortes delgados sin resina en los que se reconoce una red tridimensional de filamentos anastomosados (Berezney,1991).

Las proteínas celulares son sintetizadas continuamente durante la interfase, sin embargo el nivel de determinadas proteínas se incrementa durante fases específicas del ciclo celular y muchas de ellas se acumulan mostrando un patrón particular de distribución en el nucleoplasma (Berezney,1991).

El estudio molecular detallado de las proteínas de la matriz nuclear, logrado mediante el análisis bidimensional realizado en 1988 por Fey y Penman, incluyó a más de 200 proteínas, las cuales se han caracterizado en dos grupos: proteínas comunes a diversos tipos celulares y proteínas dependientes del ciclo celular y del estado de diferenciación como señalan los trabajos publicados en 1988 por Fey y Penman y en 1990 por los grupos de Stuurman y de Dworetzky (citados por Berezney,1991).

La participación de la matriz nuclear en la replicación de los cromosomas y en la formación del aparato mitótico fué evaluada mediante pruebas inmunológicas contra el antígeno de 125 kDa (pI 6.5) asociado con la matriz y detectado en células en proliferación. El patrón de fluorescencia en manchas compactas es marcado en profase temprana, mientras que en metafase y anafase la fluorescencia se dispersa en áreas no ocupadas por los cromosomas. Se considera la posibilidad de que la proteína nuclear distribuida en forma difusa en el nucleoplasma y excluida de los cromosomas, interactúe con otras proteínas nucleares asociadas al aparato mitótico, a los microtúbulos y a otros componentes RNP de la matriz nuclear (Todorov y col.,1988). Las secuencias de DNA se duplican en sitios específicos de la molécula y en momentos precisos de la fase S de las células eucariontes y estos eventos requieren la coordinación de una estructura de alto grado de orden y se ha propuesto que las subunidades de replicación se unen individualmente a la matriz formando cuerpos de replicación (replisomas) que se agrupan en sitios específicos (Berezney, 1991). Esto coincide con los criterios de algunos autores que consideran que la envoltura nuclear, los elementos que contiene y el citoplasma, interactúan para que la replicación del genoma y los procesos de transcripción, procesamiento y transporte de RNA se lleven a cabo en forma selectiva y altamente controlada (Franke y Scheer,1974; Clevenger y Epstein,1984; Van Driel y col.,1991).

Las características estructurales y fisiológicas de las células diferenciadas, se manifiestan gradualmente en etapas particulares del desarrollo del organismo (Romanoff,1967; Levine,1979). Los experimentos de trasplante de núcleos de células de epitelio intestinal en células de *Xenopus* (Gurdon,1962), la obtención de embriones del anfibio mediante núcleos de células intestino, riñón, corazón, testículo y piel inyectados en huevos enucleados (Laskey y Gurdon, 1970) y el uso de agentes que interfieren con los mecanismos de transcripción del RNA (Actinomicina D) simulando un efecto de enucleación fisiológica (Harris,1970), permitieron evaluar el potencial de la información contenida en los núcleos de células diferenciadas que en determinado momento producen proteínas específicas, como resultado de la expresión de genes particulares (Stein y col., 1975), tema que se analiza a continuación.

IV. REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA.

La potencialidad de los seres vivos para manifestar características específicas, resulta de la interacción de los ácidos nucleicos, moléculas dinámicas entre las cuales se establece un flujo de información. Varios mecanismos se han identificado durante el proceso de transferencia de la información genética de las células contenida en el ácido desoxirribonucleico (DNA), transcrita al ácido ribonucleico (RNA) y traducida en proteínas, como resultado de la aplicación de diversas técnicas bioquímicas y genéticas a nivel molecular (Stein y col., 1975; Miller, 1973; Levine, 1979).

El primer paso en el flujo de información genética consiste en la transcripción de una secuencia de DNA, que requiere la conversión de genes a una secuencia complementaria que resulta ser el transcrito primario de la molécula de RNA heterogéneo nuclear (RNAhn) o premensajero (pre-m). Los transcritos del gene son procesados a formas intermediarias funcionales representados por los mensajeros (RNAm), de transferencia (RNA_t) y ribosomales (RNA_r) (Miller, 1973). El RNAhn se distingue de otras formas de RNA por su tamaño, la compartimentalización subcelular y las características de la polimerasa que lo transcribe (Dreyfuss, 1986).

La separación de diferentes clases de RNA utilizando la técnica de **fraccionamiento celular en fenol**, fué lograda por dos grupos de investigadores, uno dirigido por Sibatani y el otro por Georgiev (citados por Georgiev y col., 1963) que requiere el **aislamiento de núcleos** mediante el procesamiento de un homogenado o de una suspensión de células en cloruro de sodio en solución 0.14 M y fenol a partes iguales a pH 6. Los núcleos resistentes forman una interfase durante el tratamiento y conservan la fracción de RNA que no se desproteíniza a pH neutro y que muestra una actividad altamente específica. El tratamiento entre 4-10°C de temperatura permite recuperar todo el RNA y a partir de éste fueron caracterizadas principalmente: a) la fracción ribosomal (RNA-R)* con alto contenido de G-C y b) una fracción que presenta una composición de bases réplica de DNA nuclear (RNA-D)* considerada correspondiente al RNA mensajero. Como paso intermedio se realiza el **fraccionamiento térmico** por centrifugación, para la recuperación de fracciones diferentes de RNA nuclear y citoplásmico de elevado peso molecular y el RNA total de bajo peso molecular obtenido en la mezcla de solución salina y fenol entre 4-10°C. La fracción de RNA_r nucleolar y pre-m fué obtenida entre 40-45 °C. La interfase de la solución salina-fenol a 50 °C contiene RNA-R / RNA-D. El RNA-D 90% puro fué obtenido a 65 °C.

*Nomenclatura considerada en el artículo original

Finalmente se lleva a cabo la **purificación de las fracciones** eliminando restos de RNAsas con dodecil sulfato de sodio en todas las fracciones, desproteinizando repetidamente con fenol y cloroformo, para precipitar el RNA con etanol, aplicando cloruro de sodio en solución 2.5 M y tratando con DNAasa (Georgiev y col.,1963). Con el método descrito se logró el aislamiento de RNA-R no degradado del nucleolo, sin afectar el componente 45-35S, posible precursor del RNA-R y también se determinó la transformación de RNA-R no ribosomal 45-35S a RNA-R 18-28S (Georgiev y col.,1963). Se considera que el RNA-D (citado anteriormente, corresponde al RNA que en las células eucariontes se conoce como heterogéneo nuclear (RNA hn) también llamado **heterodisperso** por la irregularidad en peso molecular que puede variar entre 2 a 200 kiloDaltones. La separación de las diferentes fracciones se logró con la técnica de centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, por ser el RNA-D más pesado que el RNAr y el RNA citoplásmico (Scherrer y col.,1963; Penman y col.,1966; WRNAer y col.,1966).

La existencia de complejos de RNA y proteínas fué sugerida en estudios de la ultraestructura nuclear, desde que fueron descritos diversas formas granulares sensibles a la ribonucleasa (Swift,1963), sin embargo la interpretación del comportamiento de las diferentes estructuras descritas con técnicas histoquímicas y ultraestructurales recibió un fuerte impulso con la implementación de técnicas autorradiográficas que permitieron determinar los sitios de localización de diferentes macromoléculas y demostrar que son estructuras dinámicas (Leblond,1965).

En el análisis de los ácidos nucleicos y en particular del RNA, pocos minutos después de la administración de un precursor marcado (uridina tritiada), los indicios de radioactividad se detectan exclusivamente en el núcleo, en sitios localizados cerca de la cromatina y en el nucleolo, y las observaciones en diferentes intervalos de tiempo permiten trazar la migración del RNA lejos del sitio de síntesis y al citoplasma (Leblond,1965).

Las diferentes fracciones de RNA son sintetizadas por enzimas específicas, el RNAr nucleolar 45S por la RNA polimerasa I y el RNA restante por las polimerasas II y III (Raska y col.,1992).

En el proceso de transcripción del RNA extranucleolar intervienen diversas proteínas, RNA polimerasas, factores de transcripción, fracciones de ribonucleoproteínas del componente heterogéneo nuclear (RNPhn) y del componente de pequeño tamaño o RNPPn* (Dreyfuss,1986).

*corresponde a las siglas RNPs_n (ribonucleoproteic small nuclear).

La identificación de las secuencias génicas que no se traducen en RNAm permitió valorar más exactamente el papel del RNAm en general y en particular durante el desarrollo embrionario (Bonner,1965; Denis,1968).

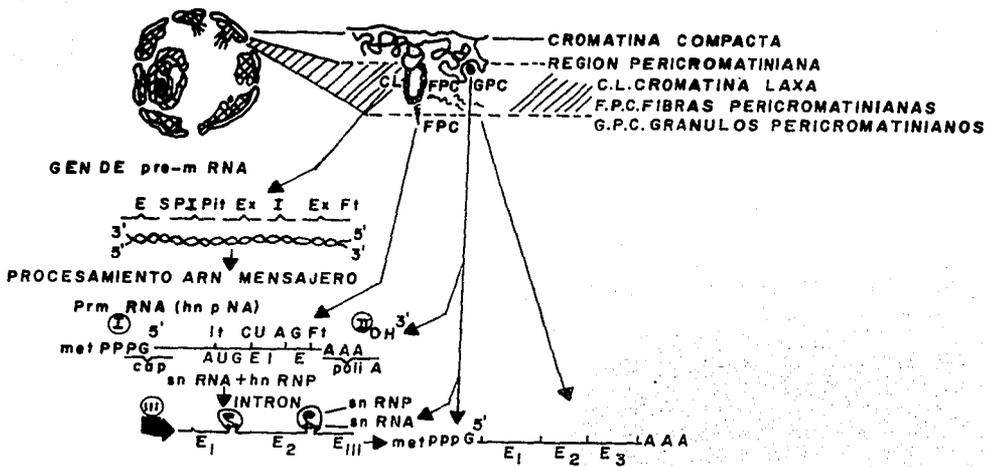
Durante el procesamiento del RNA se forman complejos RNP de pequeño tamaño ricos en uridina (URNPpn), conocidos como especies U1 U2 U4 U5 y U6 localizados en el nucleoplasma cerca de complejos RNP heterogéneos y el U3 que se localiza principalmente en el nucleolo (Zieve y Penman,1976).

Los URNAppn representan un grupo de RNAs metabólicamente estables (Reddy y Busch,1978) que representan focos de síntesis de RNA identificados con anticuerpos específicos contra factores de "splicing", proceso en el que participan proteínas (Spector y col.,1991) y RNAs pequeños nucleares (RNAppn) específicos (Carmo-Fonseca y col.,1991) que se distribuyen en un patrón moteado.

Procesamiento Postranscripcional del RNA. En las células eucariontes, los procesos de transcripción y traducción están separados en tiempo y espacio, la estructura genómica es compleja y el RNA transcrito debe ser procesado adecuadamente (Walter,1989). Se considera que algunos genes estructurales específicos son copiados en la periferia de los paquetes de heterocromatina y en la eucromatina, sitios en los que la síntesis de RNA se demostró por autorradiografía ultraestructural (Fakan y Bernhard,1973; Moyne y Puvion,1976).

La expresión de los genes en eucariontes no es directa, debido a que no todo el DNA se transcribe en RNA, ni todo el RNAm se traduce en proteína. La mayoría de los genes influyen sobre el metabolismo a través de la producción de proteínas estructurales y enzimas (Levine, 1979).

Después de la transcripción del DNA en RNA y antes de la traducción a proteínas, suceden diferentes modificaciones estructurales (esquema 3) como la adición del un capuchón o **cap** de grupos metilados y fosforilados de guanosina, el "**splicing**", la asociación de RNA desnudo con proteínas para formar RNP y la poliadenilación (Alberts y col.,1994). La modificación del extremo 5' del pre-m por adición del cap al inicio de la transcripción, proporciona estabilidad al RNAm impidiendo su degradación en el núcleo o citoplasma y además facilita la unión con el ribosoma y el inicio de la síntesis de proteínas (Citado por Jiménez-García,1985).



Esquema 3. Procesamiento Posttranscripcional del RNA. Los genes en los que están codificadas las proteínas, son conocidos como genes estructurales, los cuales son copiados en forma de RNA. Los estudios realizados con autorradiografía ultraestructural revelan que la síntesis se lleva a cabo principalmente en la periferia de la heterocromatina y en algunos sitios de la eucromatina. El primer producto de transcripción es el RNAhn, que se asocia a proteínas desde el momento de la síntesis, para formar diferentes estructuras ribonucleoproteicas. El modelo representa las modificaciones estructurales del RNAhn o premensajero antes de salir al citoplasma en forma de RNA mensajero maduro: metilación, adición del cap en el extremo 5', poliadenilación en el extremo 3' y "splicing".
Elaborado por Jiménez García, Zavala y Vázquez-Nin.

El “splicing” es un proceso dinámico de eliminación precisa de secuencias en las que no están codificadas secuencias de aminoácidos (**intrones**) y unión de secuencias codificadoras (**exones**) del transcrito naciente del RNA pre-m para formar RNAm funcional, evento que involucra múltiples interacciones entre muchas proteínas y el RNA en un ciclo de formación y disgregación de un cuerpo de corte o “spliceosoma” que se lleva a cabo cada vez que un transcrito es procesado (Brown y col.,1992). La presencia de intrones en las secuencias precursoras de RNAs nucleares (RNA pre-m) es ampliamente conocida y el proceso de corte y empalme del complejo es básicamente el mismo desde levaduras hasta eucariontes superiores, aunque se considera que la mayoría de los genes de estos últimos tienen múltiples intrones, cuya eliminación puede estar regulada por sitios de “splicing” alternativos (Brown y col.,1992; Kanaar y col.,1993).

La estructura del “spliceosoma” no ha sido totalmente descrita, involucra numerosos componentes, sin embargo, se considera que contiene principalmente partículas RNPs nucleares de pequeño tamaño (RNPpn) y proteínas que se incorporan independientemente del RNA (Kanaar y col.,1993). El grado de conservación de elementos estructurales secundarios que modulan el proceso, definen el sitio catalítico, los sitios de “splicing” y de ramificación alternos, es variable (Brown y col.,1992). El comportamiento “auto-splicing” en los intrones del grupo II característicos de mitocondrias y cloroplastos, *in vitro*, en ausencia de ATP (Brown y col.,1992) y la determinación de patrones de distribución en el núcleo de RNPs en bandas (Huang y Spector,1991; Lawrence y col., 1989;) o en focos representan importantes fuentes de información del proceso y de los sitios en que se lleva a cabo el “splicing” (Sibon y col.,1994).

El transporte de estructuras hacia afuera del núcleo fue visualizado al microscopio electrónico en 1966 por Stevens y Swift (citados por Jarmolowski y col.,1994). La exportación de RNAs del núcleo al citoplasma requiere de la asociación con proteínas; Dreyfuss (1986) señala la existencia de una familia de proteínas específicas muy abundantes, que forman RNPs heterogéneas y fueron identificadas formando complejos con el RNAm y sus precursores. Durante mucho tiempo se pensó que su actividad se restringía al núcleo, sin embargo en trabajos recientes se ha reportado el movimiento de este tipo de proteínas entre el núcleo y el citoplasma. En ambos sitios las proteínas se encontraron asociadas con RNA poliadenilado, por lo que se pensó en la posibilidad de su transporte y de su función como mediadoras de la exportación del RNAm nuclear (Jarmolowski y col., 1994).

En forma experimental, se observó en ovocitos de *Xenopus*, que el transporte de los RNAs de pequeño tamaño ricos en uridina (URNA pn) y del RNAm se facilita por la presencia del cap7-metil guanosina, aunque la concentración del factor que lo reconoce puede limitar el transporte de los URNAs pn (Jarmolowski y col., 1994).

En las células eucariontes algunas especies de RNAm se encuentran preferencialmente en la fracción no polisomal como complejos RNPs mensajeros (RNPM) libres, los cuales se conservan en la fracción soluble de material celular después del tratamiento con detergente no iónico, mientras que el RNA de los polisomas forma parte de la fracción del citoesqueleto (de Moor y col., 1990). En fibroblastos de ratón en cultivo se analizaron fracciones de RNAm no transcritos, los cuales en sistemas de traducción *in vitro* compiten con el RNAm polisomal después de la fenolización, lo cual no sucede cuando se experimenta con RNPM y la traducción es inhibida (de Moor y col., 1990). Otros ejemplo de RNAm citoplásmico específico que se acopla en forma RNPM, son las fracciones de RNAm de actina del músculo y los de la cadena pesada de la miosina, que se presentan en forma de RNPM libres en el citoplasma hasta el momento que se desencadena la diferenciación terminal del músculo (de Moor y col., 1990).

Walden y Tach en 1986 observaron la cinética inusual del acoplamiento y desacoplamiento de estructuras RNPM en RNAm de ferritina, lograda con la adición y supresión de hierro respectivamente en cultivos de fibroblastos normales, como un mecanismo especial de control de la expresión genética a nivel de la traducción (citados por de Moor y col., 1986). Otros casos de RNPM libres se observaron en ovocitos de *Xenopus*, los cuales reaccionan en los primeros estadios con un anticuerpo contra una proteína que se une al RNA y el nivel de la proteína decrece dramáticamente simultáneamente con el acoplamiento del RNAm a la fracción polisomal (de Moor y col., 1990). El acoplamiento del RNAm y proteínas específicas produce un efecto inhibitor del mecanismo de traducción que afecta la interacción con factores de iniciación activos, por lo tanto no todo el RNAm sintetizado en el núcleo y exportado al citoplasma es traducido en proteínas (de Moor y col., 1990).

La activación genética diferencial, es un concepto formulado por Morgan en 1934 que ha sido fundamental para el análisis de aspectos de la histodiferenciación en relación con la expresión genética en etapas sucesivas del desarrollo de los embriones de diferentes especies (citado por Goetnik, 1966).

La información genética contenida en el huevo de ave fertilizado y los elementos externos que lo capacitan para desarrollarse adecuadamente, integran un sistema altamente organizado, en el que la proporción de ácidos nucleicos se incrementa continuamente durante el desarrollo, de manera tal que el DNA en el primer día de incubación es de 0.002 mg en el embrión entero y alcanza 36.24 mg en recién nacidos, mientras que el RNA al segundo día de incubación es de 0.034 mg y llega a 66.0 mg en el momento de la eclosión, modificaciones relacionadas con cambios en composición química total y con la formación de tejidos específicos del embrión en etapas determinadas (Romanoff,1967).

El óvulo fertilizado contiene los genes de un organismo, del que se originan y proliferan diversos tipos celulares con diferentes funciones, sin embargo, en 1948 Gurdon estableció que aunque el DNA de los diferentes tipos celulares de un organismo es el mismo, solo parte de la información genética se expresa (citado por Stein y col., 1975). Los sistemas en desarrollo han sido de gran utilidad para explicar por diferentes vías, las modificaciones en la expresión genética en tiempo y espacio, que se traducen como cambios en el metabolismo celular (Stein y col., 1975).

Denis (1968) defendió la existencia de mecanismos de represión y liberación de la expresión genética, para explicar las modificaciones que se manifiestan a nivel de la síntesis del RNAm, durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, Davidson (1976) planteó que el proceso de diferenciación y el carácter funcional de las células, reflejan la influencia de modificaciones progresivas y selectivas en el procesamiento del RNA que ejercen control sobre transcritos de RNAm a nivel transcripcional o postranscripcional y consideró que el análisis de la capacidad genómica de un tipo celular particular, pone en evidencia la limitación de la transcripción de los genes estructurales a una fracción de genes indispensables que la dirigen y restringe la síntesis de RNAm de los restantes.

Mediante la comparación de las secuencias de RNA nuclear que hibridiza con DNA, se logró la determinación de la transcripción diferencial según observaron en 1964 McCarthy y Hoyer en células de *Xenopus* (citados por Denis, 1968) y como se comprobó posteriormente en células de ratón (Denis, 1968).

Se ha señalado que el RNA individual hibridiza con menos del 10% de secuencias individuales de DNA presentes en muchas células diferenciadas y tejidos, observaciones que sugieren que sólo una mínima fracción de genes estructurales son transcritos (Davidson,1976). Se reconocen aproximadamente 15,000 especies de mensajeros, identificadas y caracterizadas en diferentes tipos celulares de pollo y mediante hibridación se logró la detección de un alto porcentaje de RNAm común a

varios tejidos diferenciados, el cual es transcrito en bajas cantidades y también secuencias de RNAm altamente repetido de proteínas específicas de tejidos especializados (Axel y col.,1976).

Las técnicas autorradiográficas, por otra parte, permitieron reconocer que las regiones heterocromáticas tienden a ser inactivas en síntesis de RNA (Littau y col.,1964) y que la transcripción está restringida a fracciones de DNA enriquecidas en secuencias activas e inactivas, según observaron Gottesfeld y colaboradores en 1974 en cromatina aislada (citado por Davidson,1976). No obstante la baja proporción de genes activos en algunas regiones de la heterocromatina, los trabajos de Daneholt (1975) señalan la existencia de sitios de intensa síntesis de RNA y de productos proteicos específicos en los puffs de los anillos de Balbiani, en los cromosomas del díptero *Chironomus*.

El aislamiento de mensajeros para hemoglobina logrado por Hunt en 1973 y por el grupo de Gilmour; en el mismo año fueron aislados los mensajeros para ovoalbúmina por Rhoads y su grupo. En 1973 Palmiter y el grupo de Chan por separado y el grupo de Harris en 1975 compararon la acumulación de secuencias de RNA en diferentes etapas del desarrollo y lograron detectar variaciones en la síntesis de proteínas específicas a partir del estado indiferenciado hasta los niveles característicos de cada tipo celular diferenciado (citados por Davidson,1976). Según los trabajos señalados, durante el proceso de desarrollo, el incremento en síntesis de proteínas coincide con la elevación en la concentración de RNAm maduro, por efecto de la expresión de genes estructurales y se correlaciona con los cambios morfológicos que se manifiestan en diferentes etapas (Davidson, 1976). La represión de la mayor parte del genoma se explica porque las regiones de cromatina densamente empaquetadas tienden a ser inactivas en la síntesis de RNA (Littau y col.,1964).

V. DIFERENCIACION.

Durante el desarrollo a partir de una célula huevo única que sufre múltiples divisiones, se manifiestan tipos celulares diferentes como producto de la expresión diferencial (Stein y col., 1975; Beebee y Butterworth, 1980; Le Douarin y Smith, 1988). Los productos embrionarios representan sistemas en proceso de integración bajo la influencia de diversos mecanismos de control de la expresión génica, que determinan cambios morfo-fisiológicos y el establecimiento de patrones de diferenciación e integración de las células, tejidos, órganos y sistemas (Levine, 1979; Beebee y Butterworth, 1980).

El mantenimiento y crecimiento del embrión, son procesos continuos y están relacionados con las actividades metabólicas y de síntesis de proteínas, sin embargo los mecanismos que dirigen la diferenciación comprenden una serie de cambios que se manifiestan en forma gradual (Boell, 1971). Las características celulares al inicio del desarrollo y el complejo arreglo de diferentes tipos celulares del organismo completamente desarrollado, manifiestan diferentes patrones de expresión y sin embargo, se mantiene el fenotipo maduro a través de generaciones (Beebee y Butterworth, 1980). En el núcleo celular, desde etapas muy tempranas se observan modificaciones en la estructura y en la distribución de las RNPs, posiblemente relacionadas con la abundancia y distribución del RNA de origen materno almacenado y con el inicio de la actividad transcripcional propia del embrión de ratón (Fakan y Odartchenko, 1980), cambios que son de utilidad para evaluar la influencia de los genes en la coordinación del comportamiento celular y la morfogénesis (Le Douarin y Smith, 1988).

Los procesos relacionados con el desarrollo, fueron estudiados por muchos médicos y naturalistas desde los tiempos de Aristóteles, en que ya se sabía de la importancia de la observación sistemática de huevos fértiles de gallina en días sucesivos a la puesta. El espíritu griego fué la inspiración de los anatomistas y embriólogos del renacimiento como Vesalio, Fabricio, Falopio, etc., quienes hicieron efectiva la sistemática y plasmaron en obras ilustradas, sus conocimientos sobre el desarrollo de estructuras en embriones humanos y de diferentes animales, que William Harvey (1651) resumió en la frase *Omne vivum ex ovo*, los seres vivos proceden de un huevo (citados por Oppenheimer, 1971).

Los embriólogos del siglo XVII, reconocían que la continuidad entre generaciones se mantenía por el contenido del germen preformado dentro del óvulo o el espermatozoide, el cual crecía y se expandía hasta alcanzar el estado adulto como sostenía la Teoría Preformacionista (Gilbert, 1991).

Kaspar Friederich Wolf, relacionó las modificaciones de diferentes órganos y tejidos del embrión de ave con procesos dinámicos, de su concepción de la diferenciación surgió la Teoría Epigenista propuesta en 1759 para explicar el desarrollo de formas adultas a partir de un estado indiferenciado, el desarrollo de sistemas de órganos en diferentes etapas y la localización de estructuras embrionarias en posición diferente a la que ocupan en el recién nacido (citado por Gilbert,1991).

La diferenciación involucra la progresiva especialización estructural y funcional del organismo, que se reconoce por características citológicas e histológicas determinadas a nivel molecular (Boell, 1955). El comportamiento de los ácidos nucleicos durante la diferenciación, se manifiesta en la constante cantidad y tipo de DNA de cada célula somática, sin embargo los tipos de proteínas que se sintetizan en las células especializadas que se establecen progresivamente son diferentes; en el núcleo se determina el momento del desarrollo en que se activa cada gen y se produce RNAm específico (Bonner,1965). Sin embargo, se considera que la diferenciación es un proceso de especialización que también ocurre en los organismos unicelulares (Harris,1970). Los animales pluricelulares son considerados un clon de células que descienden de un óvulo o célula "huevo" única (Alberts y col.,1994) y su potencialidad depende de la manifestación de **mecanismos moleculares** relacionados con eventos complejos de segregación citoplásmica de moléculas "determinativas" y **mecanismos celulares** que involucran interacciones entre células y tejidos con efectos definidos previamente a la diferenciación (Gilbert,1991).

La **segmentación** del óvulo fecundado, es una fase de formación de numerosas células de menor tamaño, que organizan un epitelio y realizan movimientos complejos durante la etapa de **gastrulación**, para transformar a la blástula en una estructura triestratificada, en proceso continuo de organización de la arquitectura del embrión, a partir de las capas germinales: **ectodermo, mesodermo y endodermo**, que participan en la formación de los órganos del cuerpo durante la **organogénesis** (Gilbert,1991).

A partir del ectodermo se diferencian la capa del epitelio externo de la piel y el sistema nervioso. Los músculos y elementos fibrosos de la mayoría de las estructuras tienen origen mesodérmico y del endodermo se forma la cavidad intestinal rudimentaria, de la cual se diferencian el aparato digestivo y sus derivados, las glándulas salivales, el hígado, la tráquea, los pulmones, etc. (Viltee y col.,1977; Gilbert,1991; Alberts y col.,1994).

Diferenciación en Aves. Los cambios morfológicos graduales que experimentan los embriones de este grupo, pueden reconocerse en diferentes tiempos desde etapas tempranas (Hamburger y Hamilton, 1952).

El huevo está formado por membranas, reservas de RNA y vitelo rico en lipoproteínas concentrado en la porción inferior o polo vegetativo; en la porción contraria que representa el polo animal inicia la segmentación (Alberts y col.,1994), aún envuelto por la membrana vitelina y parte de la zona pelúcida elimina la primera célula polar (Arey,1956). Al ser fertilizado se completa la meiosis y se desprende la segunda célula polar completandose la maduración nuclear del óvulo. En el trayecto por el oviducto se van agregando el albumen, la membrana de la cáscara y la cáscara misma, proceso que tarda aproximadamente 18 hrs. En este período se completa la segmentación y en el momento de la postura, el área embrionaria está representada por el blastodermo, un disco celular blanquecino que se dispone sobre la superficie de la yema (Arey,1956). En la superficie del huevo fecundado, la porción central está ocupada por el blastodisco, en el cual se reconoce por su transparencia la **Zona Pelúcida**, grupo de células que se mantiene separado del vitelo por una cavidad, y el **Area Opaca**, formada por células que se mantienen en contacto con el vitelo en los bordes del blastocisto (Arey,1956; Bellairs,1963). Inicialmente, de una población de células que se mantienen en la superficie se forma el **Epiblasto** primer derivado embrionario, otro grupo de células migra a la cavidad subgerminal para formar el **Hipoblasto Primario**, que según Rudnick (1971) es un estrato formado por delaminación al cual se une otro grupo de células que migra posteriormente para formar el **Hipoblasto Secundario**. En el margen del área opaca se mantienen unidas las capas de epiblasto e hipoblasto que en la región interior del disco están separadas por un espacio o **Blastocele** (Bellairs,1963; Gilbert,1991; Paniagua y col.,1993).

Aproximadamente 10 horas después de la fecundación, se inicia la formación de las capas embrionarias, en el centro de la zona pelúcida, debido a la migración de células de la región posterior lateral del epiblasto que da por resultado la formación de la **Línea Primitiva**, la convergencia a esta zona produce inicialmente un engrosamiento celular seguido de la invaginación y migración de células por lo cual se establece una depresión o **Surco Primitivo** (Rudnick, 1971; Gilbert,1991; Paniagua y col.,1993). En el extremo cefálico de la línea primitiva se acumulan células formando el **Nudo primitivo o de Hensen**, a través del cual migran células del epiblasto, penetran a la cavidad formada

entre el epiblasto y el hipoblasto y se dirigen hacia la región anterior del embrión y forman el mesodermo cefálico y el cordamesodermo (Gilbert,1991).

Las primeras células del epiblasto que se invaginan a través de la línea primitiva, migran a la porción anterior del blastocisto, se integran al hipoblasto y constituyen el endodermo presuntivo que en estadios posteriores del desarrollo dará origen a los órganos endodérmicos, entre ellos el tubo digestivo y participan también en el desarrollo de algunas estructuras extraembrionarias (Rudnick,1971). Las células que migran más tarde y se establecen en la línea media anterior del epiblasto darán origen al proceso cefálico, mientras que las que se disponen un poco más caudalmente entre éstas y el nódulo de Hensen, darán origen a la notocorda (Gilbert,1991; Paniagua y col.,1993). Las otras células se dispersan laxamente entre el hipoblasto y el epiblasto y constituyen el mesodermo. A las 22 h de incubación, la mayoría de las células del endodermo presuntivo se encuentran dentro del embrión y las del mesodermo presuntivo continúan migrando hacia el interior (Gilbert,1991; Paniagua y col.,1993). La penetración de células del mesodermo presuntivo, la regresión de la línea primitiva y el desplazamiento del nudo de Hensen suceden en un momento clave del desarrollo, que coincide con la diferenciación de las células ectodérmicas, con la evolución de las células notocordales ya establecidas hacia la región posterior del embrión y con el establecimiento de un gradiente de maduración de la región anterior a la posterior, procesos que se reconocen en las aves, en etapas tempranas del desarrollo (Gilbert,1991; Paniagua y col.,1993).

Aspectos comunes a todos los vertebrados sobre el origen, arquitectura y desarrollo de la piel, notocorda y epitelio intestinal, se describen a continuación, enfatizando en las particularidades observadas en aves durante la diferenciación del embrión. Del ectodermo que recubre al embrión se diferencia la piel, parte de la notocorda y tejido nervioso (Alberts y col., 1994). El proceso de neurulación ha sido ampliamente revisado (Ortega,1986) por lo que solamente se abordan aspectos relevantes de la diferenciación de la piel y de la notocorda.

Diferenciación de la piel. La piel de ave es un órgano complejo que se origina de regiones del ectodermo y del mesodermo localizadas entre la región caudal y el nódulo primitivo, en etapas muy tempranas del desarrollo, cuando se diferencian la línea primitiva y el proceso cefálico (Hunt,1932; Rawles,1936; Rudnick y Rawles,1937).

En el pollo, la forma primitiva de la piel se origina del ectodermo y el inicio de su diferenciación coincide con el desarrollo de una membrana basal fibrosa que se inicia entre el segundo y el cuarto día de incubación, en que la epidermis está formada de una capa simple de células que contienen algunas fibras de sustancia elástica en el citoplasma. Al segundo día de incubación se inicia la separación de una capa externa y una capa muscular interna. Al tercer día las células que cubren la superficie ventral de la cabeza del embrión pierden su forma estrellada y se organizan en dos capas irregulares; el **epitrichium** que es una capa superficial de células escamosas y una capa compacta de células en proliferación dispuestas sobre la capa de mesénquima. Al quinto día, las células de la capa interna tienen forma cuboidal, uno o más nucleolos y se inicia la formación de la capa córnea del epitrichium y se reconoce el engrosamiento de la pared en la base de las células escamosas (Romanoff, 1960).

Al sexto día se separan las capas mucosa y epidérmica, algunas células superficiales se desprenden y las de la capa mucosa se desplazan para ocupar los espacios libres. En general la epidermis permanece delgada para cubrir al embrión en su totalidad y solamente se presenta engrosamiento en áreas restringidas. Hacia los trece días de incubación se reconoce la proliferación continua de la capa de células cuboidales, se diferencia el epitelio estratificado de células poliédricas en la capa intermedia y planas en la superficie, estas últimas se cornifican gradualmente. Entre los días décimo tercero y décimo quinto, las células del epitrichium muestran formas irregulares y grandes parches de sustancia intercelular entre ellas y se desprende la capa cornificada (Romanoff, 1960).

El límite dermoepitelial se reconoce por la capa germinativa o de Malpighi, también llamada *rete mucosum* que prolifera de manera continua, aumentando progresivamente las capas del estrato córneo. El estrato córneo se desarrolla más rápidamente en la región dorsal que en el resto de la cabeza y el epitrichium es parte de la muda con las células cornificadas. La epidermis asume su forma final después del día 15 (Romanoff, 1960).

En los embriones de anfibios, la epidermis es una capa epitelial formada por dos capas de células, el peridermo y la capa sensorial a partir de la cual se forman algunos órganos sensoriales, mientras que en embriones de aves y de mamíferos, de la capa de epidermis del espesor de una célula característica de estadios tempranos, se originan diferentes estratos, la capa celular interna o generativa (de Malpighi) y una capa celular externa (Balinsky, 1971). La capa de ectodermo que cubre completamente al embrión

en la etapa tardía de la gastrulación, mantiene el crecimiento y producción normal de plumaje de las aves, potencialidad que conserva al ser implantado experimentalmente (Rawles,1971).

La epidermis, es el componente de la piel que deriva del ectodermo y constituye un epitelio estratificado delgado, queratinizado, no vascularizado, alimentado por el líquido tisular de la dermis, estrato profundo que deriva del mesodermo, de mesénquima o del dermatomo (Rawles,1971; Ham, 1986), el cual forma una capa gruesa, de estructura fibrosa y uniforme de tejido conectivo denso, con abundantes vasos sanguíneos y linfáticos. La interacción dermo epidermal no se restringe al período embrionario, el mantenimiento de ciertos tipos de epitelio y la diferenciación continua de las células basales sigue la influencia de la dermis en la etapa adulta (Billingham y Silver, 1967;1968).

El tejido conectivo de la dermis y el plumaje sirven como aislante y contribuyen a mantener la temperatura alrededor de 37°C (Romer, 1973). La epidermis que se separa del ectodermo durante el proceso de neurulación, es un esbozo complejo a partir del cual se forman varios órganos, incluyendo el cristalino y la córnea, que forman parte del ojo (Balinsky, 1971) y además estructuras especializadas como las glándulas cutáneas, el pelo, las plumas, las uñas, las escamas y parte de la cornamenta de diferentes organismos (Rawles,1971; Rugh, 1971); la capa profunda está formada de células en proliferación constante que desplazan a las más viejas hacia la superficie, las cuales pierden contacto con la dermis y se queratinizan en grado variable en las diferentes regiones del cuerpo, por lo que se refleja en el espesor observado entre 0.5 a 4 mm o más (Banks,1981).

Las características del plumaje de las aves y del pelo en los mamíferos y sus particularidades en las diferentes regiones del cuerpo se relacionan con el tamaño, forma, estructura y función del componente epidérmico y con la presencia de papilas dérmicas (Rawles,1971). El plumaje de las aves está formado por elementos córneos de estructura compleja y resistente, sus características varían dependiendo de su localización, su relación con el vuelo o como protección contra el frío y se renuevan periódicamente (Muedra, 1973).

La pluma se origina de una estructura epidérmica papilar cónica que contiene tejido mesodérmico y penetra los tejidos para formar un folículo, parte del cono se transforma en cañón y la cubierta epidérmica forma un cilindro córneo, mientras que el tejido mesodérmico sirve como pulpa nutritiva durante la maduración de la pluma. El extremo distal forma la vaina y está cubierto por epitelio superficial organizado inicialmente en crestas que se transforman en filamentos del plumón que cubre el cuerpo del pollito y se conserva como capa aislante sobre casi todo el cuerpo del adulto. Las aves

adultas presentan plumón, filoplumas o plumas ordinarias que son producidas continuamente por el segmento basal de las papilas, en folículos que actúan como matriz de la pluma (Romer, 1973).

Los vertebrados en general, presentan estructuras sensitivas a nivel de la piel, de la cavidad bucal, en músculos y visceras. La piel diferenciada contiene numerosas terminales de nervios sensoriales altamente especializadas que registran sensaciones de calor, frío, tacto y presión (Portmann,1961; Rawles,1971; Romer,1973), que en las aves, particularmente en patos, representan estructuras abundantes (Rawles, 1971). Los receptores se organizan en redes densas que se extienden en la zona de contacto de la epidermis y de la dermis, en algunos casos se localizan en la capa basal de la epidermis. Las redes terminales son parte del sistema autónomo que involucra componentes simpáticos y parasimpáticos, sin embargo se desconoce su funcionamiento y no se ha logrado diferenciar estructuras aferentes y eferentes. En las aves, las células nerviosas subepidérmicas que dan origen a las terminales nerviosas en red, corresponden al sistema nervioso simpático (Portmann,1961). La piel de las aves blanda y flexible, facilita la acción del músculo para el vuelo, carece de glándulas sudoríparas y sebáceas (Muedra,1973).

Diferenciación de la notocorda. Organo transitorio, dispuesto en forma de bastón que proporciona rigidez temporal y define el eje primitivo del cuerpo; característica común de los embriones de las diferentes especies animales que se incluyen en el phylum *Chordata* (Jurand, 1962, 1974; Salisbury,1993). Spemann y Mangold en 1924, señalaron que el patrón evolutivo de los invertebrados avanzados a los cordados primitivos y vertebrados, involucra a la estructura notocordal como evidencia embriológica que sugiere que el desarrollo de el sistema nervioso requiere de señales inductivas producidas por la notocorda o algún otro primordio mesodérmico (citados por Yasuo y Sato, 1994).

En cordados inferiores, las células notocordales se mantienen formando una columna rígida por efecto de presión hídrica con función de hidroesqueleto persistente durante toda la vida (Vilsee y col.,1977). Algunas características particulares de la estructura notocordal de organismos de diferentes grupos, se citan a continuación: 1) Las ascidias juveniles presentan células compactas con inclusiones vitelinas y partículas de glucógeno en el citoplasma, mientras que, en adultos se forma una capa de material elástico extracelular y células epiteliales escamosas. 2) Los anfioxos presentan discos de células notocordales laminares con núcleo pequeño, escasos organelos, mitocondrias y abundante retículo endoplásmico liso que forma cisternas y túbulos. Las placas están envueltas en una vaina de colágena y

asociadas a células estrelladas de la región ventral y dorsal, estas últimas inervadas por la médula espinal. 3) En embriones de vertebrados las células cordales de las etapas tempranas son grandes, presentan vacuolas, microfilamentos y están unidas por desmosomas; se originan a partir de una capa de células indiferenciadas llamadas cordoblastos que presentan retículo endoplásmico rugoso, complejo de golgi, mitocondrias, microfilamentos, partículas de glucógeno y no son vacuoladas. El bastón notocordal está contenido en una vaina de fibras colágena y fibroblastos. 4) Los escualos presentan una capa elástica interna y una externa. 5) En embriones de los anfibios ápodos (gimnofiones) y de las salamandras, la vaina notocordal se calcifica simulando hueso (Paniagua y col., 1993).

La multiplicación celular que produce una estructura reticular y la vacuolización citoplasmática gradual fué observada y descrita en 1908 por Williams en cerdo, en 1930 por Dawes en ratón y en 1958 por Lesson y Lesson en conejo (citados por Lesson y col., 1961). Grandes vacuolas claras son características de embriones de etapas avanzadas del desarrollo (Salisbury, 1993).

Algunos autores afirman que en los vertebrados el primordio del tejido nervioso se origina a lo largo del embrión, como un engrosamiento del ectodermo dorsal inducido por el tejido cordomesodérmico precursor de la notocorda (Le Douarin y Smith, 1988).

Jurand (1962) determinó que la región organizadora del cordamesodermo en embriones de ave se extiende a partir del nudo de Hensen, se desarrolla extendiéndose hacia a la porción cefálica de la hipófisis cerebral, a la superficie posterior del cartilago basilar y a la región de la silla turca, uniéndose a uno o más puntos del epitelio faríngeo y se considera de importancia en el origen de la bursa faríngea (Ruiz i Altaba y col., 1993).

La estructura notocordal considerada como extensión del nódulo primitivo, forma el primer esqueleto axial e induce progresivamente la diferenciación de cartilago y posteriormente la osificación endocondral del cuerpo vertebral (Bloom y Fawcett 1968). Smith y Serafini-Fracasini (1968) señalan que la notocorda se transforma en el núcleo pulposo de los discos intervertebrales (citados por Frederickson y Low, 1971).

Las propiedades mecánicas de la columna vertebral son conferidas por el arreglo metamérico de las vértebras, separadas por los discos intervertebrales en los vertebrados superiores o directamente articuladas en los vertebrados inferiores (Dietrich y col., 1993). La columna vertebral se forma de componentes del mesodermo paraaxial o del mesénquima que se condensa en forma intermetamérica, involucrando células localizadas en la porción esquelotogena del somita; las porciones laterales forman

los arcos neurales y la porción medial da origen al cuerpo vertebral y a los discos intervertebrales en los cuales la notocorda persiste en forma de los núcleos pulposos (Dietrich y col.,1993).

Las investigaciones de Peacock realizadas a principios de los años 50s sobre desarrollo de los discos intervertebrales en el hombre (citado por Salisbury,1993) y las evidencias observadas en embrión de ave por Ruggeri (1972), sugieren que la estructura notocordal es reemplazada progresivamente por fibrocartílago de los tejidos vecino, sin embargo, la relación entre el destino de la notocorda y el desarrollo del cuerpo pulposo de la vertebra es incierta (Salisbury,1993).

Además de su reemplazamiento por los cuerpos vertebrales y la posible persistencia de una población celular notocordal en los discos intervertebrales, también se ha sugerido la posibilidad de que la notocorda degenera y desaparece por completo y que los núcleos pulposos se originan del cartílago perinotocordal embrionario (citado por Salisbury,1993).

Por otra parte, la comparación fenotípica por medio de pruebas inmunológicas y la caracterización de proteínas, permitió considerar la posible relación entre las células notocordales y las que constituyen los cordomas, tumores de apariencia espumosa, localizados como masas "gelatinosas", suaves y pedunculadas hasta de 2 cm de diámetro cuyas células poseen un citoplasma espumoso y voluminoso separado por finos septos intracitoplásmicos, características del tejido notocordal remanente, observado en humanos después del nacimiento, las cuales se pueden presentar en la base del cráneo, en el proceso odontoide del axis y en el coxis (Salisbury,1993), dos tipos celulares que contienen proteína S100, según las evidencias presentadas por Nakamura y sus colaboradores (1983). Además, Salisbury e Isaacson en 1985, reportaron citoqueratinas y mucina polimórfica epitelial humana (citados por Salisbury,1993).

Los procesos relacionados con el desarrollo e involución de la notocorda han sido ampliamente estudiados, no solamente por su influencia fundamental en la organización de los elementos embrionarios señalados anteriormente, sino también, debido a que las anomalías en el desarrollo de la notocorda reflejan el desarrollo anormal del cuerpo vertebral, por efectos de la notocordectomía en embriones de ave; las variaciones en la regresión de la notocorda humana y la persistencia de tejido cordal aberrante en sitios localizados, se consideran claves importantes para la determinación del origen de cordomas (Strudel,1967).

Se afirma que la especificación regional del somita esta fuertemente influenciada por la notocorda. Mediante la alteración del patrón de expresión del gene *Pax*, en notocorda de mutantes, se determinó

que la presencia de la notocorda es importante en dos procesos principalmente, la inducción de estructuras ventrales y para el mantenimiento del destino ventral (Dietrich y col., 1993).

La extensión craneal de la notocorda es subsecuentemente incorporada en la parte basilar del hueso occipital y en la parte caudal del cuerpo del esfenoides (Salisbury, 1993). Se ha considerado que el establecimiento del patrón axial del sistema nervioso y la diferenciación regional de la placa y del tubo neural (Jurand, 1962), responden al efecto inductor de factores o señales específicas presentes inicialmente en el nudo de Hensen y un poco avanzado el desarrollo, en la notocorda de los vertebrados (Ruiz i Altaba y col., 1993). Se han realizado intentos para determinar los mecanismos de especificación de diferentes genes de células de linaje celular notocordal, como genes homólogos de ratón y ascideas (Yasuo y Sato, 1994). Además, en embriones de mamíferos y de rana se detectaron dos factores de transcripción de la familia HNF-3 *fork head*, HNF-3 β y HNF-3 α , que presentan distintos patrones de expresión temporal. En mamíferos HNF-3 β ocurre tempranamente en la región del nódulo de Hensen, en la notocorda y en células de la línea media de la placa neural mientras que en embriones de rana se expresa en células de la región del labio dorsal de blastoporo, en el endodermo faríngeo y en el piso de la placa neural (Ruiz i Altaba y col., 1993).

El papel inductor de la notocorda en la formación de los somitas ha sido ampliamente discutido, algunas investigaciones han demostrado que no representa un factor esencial (Bellairs, 1963); sin embargo se ha señalado su posible intervención en la condrogénesis del mesodermo de la región vecina y en la miogénesis de los miotomos, además de la posible influencia del extremo rostral de la notocorda en el desarrollo en el desarrollo y crecimiento del lóbulo anterior de la pituitaria (Jurand, 1974; Burgess, 1983) y en la diferenciación de neuroblastos (Shinohara y Tanaka, 1988).

Las características histoquímicas de la notocorda de ave y de su cubierta en diferentes etapas de incubación fueron determinadas desde etapas muy tempranas (Leeson y col., 1961). A las 24 h de incubación, las células del cordamesodermo y de la región del ectodermo del cual se origina el tubo neural se encuentran separadas por un espacio bien definido. La formación de la notocorda se inicia con el desprendimiento de un cúmulo de células que tiñen débilmente y se caracterizan por un citoplasma denso con escasos organelos, las cuales se organizan en una estructura cilíndrica rodeada por células del mesénquima dispuestas laxamente. A las 48 h la estructura notocordal presenta pocos cambios, los núcleos se disponen basalmente, orientados hacia la cubierta en formación. Los extremos cefálico y caudal se mantienen en contacto con el tubo neural. A partir de las 72 h cuando es muy evidente el

incremento en número de células y la frecuencia de mitosis, el citoplasma presenta un aspecto espumoso y vacuolado, la notocorda y el tubo neural están separados por una capa de material acelular que tiñe fuertemente y la cubierta de la notocorda es más gruesa. A las 96 h la notocorda ha perdido contacto con el tubo neural y se acentúa la vacuolización del citoplasma, de tal forma que los límites celulares pierden definición y la apariencia general es de una retícula muy abierta que sostiene numerosos núcleos rodeados por escaso citoplasma. A las 120 h algunas células distribuidas principalmente en la periferia conservan el citoplasma intacto y en las dispuestas hacia el centro, el grado de vacuolización es tan marcado que no se reconocen límites celulares por lo cual los núcleos dispersos se observan virtualmente suspendidos en filamentos de citoplasma. La cubierta externa está formada por un componente denso dispuesto en una capa delgada en contacto con el tubo y un componente laxo de mayor amplitud.

La determinación de colágena y fibras reticulares en una matriz de lípidos, carbohidratos y proteínas, fué lograda alrededor de las 24 h, el incremento de lípidos se registró entre las 72 h y 96 h y la intensificación gradual de las reacciones histoquímicas en la cubierta notocordal se presenta en etapas avanzadas y coincide con el incremento en el grosor de la cubierta (Leeson y col., 1961).

Los estudios posteriores en que se analizan aspectos ultraestructurales, histoquímicos y autorradiográficos de la notocorda, permitieron determinar que antes de la etapa HH10 (Hamburger y Hamilton, 1951) del desarrollo del embrión de ave, se inicia la secreción de dos importantes componentes del tejido cartilaginoso colágena y sulfato condroitínico, marcado por un notable incremento en complejo de Golgi y mitocondrias envueltas en RER, eventos relacionados con la actividad secretoria e inductora de la notocorda de ave (Ruggieri, 1972).

Frederickson y Low (1971) analizaron la estructura fina de la capa notocordal en embriones vivos de 2 a 4 días, incubados en un medio de cultivo de agar-albúmina o dentro del cascarón y en embriones fijados en KRNAovsky, sometidos a la acción de diferentes enzimas, incluyendo colagenasa, tripsina, hialuronidasa y alfa-amilasa. Al inicio del desarrollo del tejido conectivo extracelular, se produce el crecimiento normal de microfibrillas perinotocordales de 10 a 20 nm y como resultado del tratamiento con colagenasa y tripsina fueron digeridas por completo las fibrillas de 20 nm y poco por efecto de de la hialuronidasa. Las fibrillas de 10 nm fueron digeridas por alfa-amilasa, hialuronidasa y tripsina pero no por colagenasa. Las fibras delgadas se consideran de formación reciente por la cercanía de la capa notocordal y su alta resistencia a la colagenasa se relaciona con la presencia de complejos primarios de

mucopolisacáridos y colágena. Por otra parte, las fibras gruesas sugieren la presencia de colágena molecular potencialmente capaz de desarrollarse en unidades de colágena mayores que no son afectadas por hialuronidasa posiblemente por la presencia de mucopolisacáridos que favorecen su engrosamiento formando un complejo estable. Mediante la condensación de colágena soluble o la adición de tropocolágena y la formación de enlaces covalentes con unidades de condroitín sulfato, las fibrillas delgadas gradualmente se transforman; sin embargo, el origen de las moléculas se atribuye a células indiferenciadas de la notocorda, considerando que no es esencial la presencia de organelos celulares bien desarrollados, al menos para la síntesis de la tropocolágena (Frederickson y Low, 1971).

El comportamiento de los componentes citoplásmicos de las células notocordales, como el incremento estructural máximo del Golgi y del RER, fué descrito en 1985 por Oettinger y colaboradores mediante reacciones inmunocitoquímicas con anticuerpos para proteína de cartilago y para colágena tipo II (citados por Shinohara y Tanaka, 1988).

Importantes aspectos de la transformación de la notocorda de ave, fueron cuidadosamente descritos por Jurand (1962), su origen y los cambios en el arreglo de las células durante la morfogénesis del órgano, desde el inicio de la diferenciación del tejido cordamesodérmico en el estadio HH5 en un punto anterior al nudo de Hensen como una extensión de la línea primitiva a lo largo del eje, hasta las etapas de marcada vacuolización en que el autor consideró la manifestación de los primeros cambios involutivos tomando como referencia la serie de Hamilton y Hamburger (1951) y analizando su relación con otros derivados de las capas germinales. Según sus observaciones, la notocorda y el ectodermo se mantienen separados por límites bien definidos, pero por su cercanía establecen contacto estrecho en algunos puntos en que aparentemente se forman estructuras de anclaje entre los dos tejidos entre los estadios HH5 y HH7, mientras que parece estar fusionada con el endodermo en algunos sitios.

Entre los estadios HH 6-9 la notocorda muestra una marcada separación del mesodermo paraxial y simultáneamente el contacto entre las células es más estrecho, la proliferación de las células frente a la región del nudo, los cambios que definen su forma y la separación del endodermo se consideran algunas de las causas de la transformación del cordamesodermo en la estructura compacta típica (Jurand 1962). Conforme avanza el desarrollo aumenta el diámetro de la notocorda y los espacios intercelulares centrales se interconectan y las células periféricas se organizan en pilas apretadas, además es posible reconocer dos tipos celulares por el aspecto del citoplasma. Algunas muestran condensación

de citoplasma por el empaquetamiento del retículo endoplásmico, las mitocondrias, el Golgi y microsomas, mientras que en otras células el citoplasma es menos denso (Jurand, 1962).

Las observaciones al microscopio electrónico permiten observar que las células de la notocorda se mantienen separadas por membranas celulares bien definidas y no se establece un sincitio en ningún momento, aún cuando presenta una consistencia gelatinosa que resulta de el alto grado de vacuolización, en el cual, según el autor, toman parte el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Los organelos ya citados y la envoltura nuclear muestran profundas alteraciones que marcan las etapas de envejecimiento de la estructura notocordal (Jurand, 1962).

Diferenciación del epitelio intestinal. El intestino se forma a partir del endodermo y de la hoja interior de la esplanopleura del embrión, que experimenta una serie de cambios para formar un tubo cerrado, del endodermo primario se origina la cubierta epitelial del sistema digestivo, del respiratorio y de las glándulas asociadas (Patten, 1975).

El desarrollo del tracto digestivo se ha estudiado ampliamente en aves y se ha observado que diversas estructuras secretoras asociadas son activas desde el décimo tercer día de incubación, mientras que en la porción del intestino delgado y el duodeno, los procesos de la fase final de maduración son más notables días antes de la eclosión. En relación con lo señalado, la actividad enzimática se incrementa progresivamente a partir del día 13, cae significativamente hacia el día 20 y a partir de entonces se incrementa de nuevo. La digestión del líquido amniótico rico en proteínas del albúmen se inicia antes de la eclosión, debido a la imbibición por el embrión alrededor del día 13 de incubación, cuando abunda en el duodeno la quimiotripsina 3, reemplazada rápidamente por la quimitripsina 1 con actividad en la fase embrionaria tardía hasta la eclosión. La quimiotripsina 2 se activa después de la eclosión y es particularmente agresiva con las proteínas del albumen que tienen un alto contenido en leucina, que pueden ser transportadas intactas através del epitelio antes de la eclosión (Freeman y Vince, 1974).

Se reconocen varias transformaciones estructurales a partir de que la primera porción del intestino primitivo adquiere un piso celular y se cubre completamente de una capa de endodermo en la región cefálica y se extiende hacia la posterior (Romanoff, 1960). La porción del intestino medio mantiene la comunicación con el vitelo, hasta que se forma el pedículo vitelino (Patten, 1975).

El sitio de almacenamiento de material nutritivo es el saco vitelino, que está provisto de un arco circulatorio propio. El vitelo no pasa directamente al intestino, las células de la capa que cubre el saco

vitelino, producen enzimas digestivas que participan en la formación de una fracción soluble que atraviesa la cubierta del saco vitelino y de la cubierta endotelial de los vasos sanguíneos, hasta la corriente sanguínea que lo distribuye a todo el cuerpo del embrión en crecimiento (Patten, 1975).

Hacia el día 19 de incubación, la mayor parte del vitelo se encuentra dentro del embrión y los restos del saco vitelino desaparecen. La absorción del vitelo se completa en el embrión alrededor de los 6 días de la eclosión (Patten, 1975).

Hacia las 55 h de incubación, se reconoce la diferenciación de las regiones faríngea y esofágica del intestino anterior, pero aun no se establece la abertura de la boca, a la que contribuye una porción del ectodermo conocida como estomodeo que con el endodermo forma la placa oral, la cual al romperse deja comunicación abierta de la faringe con el exterior (Patten, 1975).

El intestino posterior se reconoce hacia las 50 horas de incubación, se alarga a expensas del intestino medio y diversas especializaciones regionales se aprecian en etapas avanzadas. La abertura cloacal se forma de una depresión externa conocida como proctodeo, que en el punto de unión con el endodermo forma una doble estructura, la membrana cloacal que da origen a la cloaca (Patten, 1975).

El epitelio del intestino delgado es uno de los tejidos corporales que se renueva más activamente, su vida media es de 36 h y presenta varios tipos celulares que hacen de él otro modelo interesante para los estudios de diferenciación, morfogénesis y proliferación (Leblond, 1965; Leonhardt, 1975). En las etapas embrionarias tempranas el endodermo se localiza entre el ectodermo y el vitelo, y el intestino está representado por esa capa celular entre el ectodermo y el vitelo (Patten, 1975). La superficie interna del intestino de las aves, presenta pliegues o proyecciones dispuestos en un patrón longitudinal (Romanoff, 1960). Su diferenciación es un proceso complejo, gradual y continuo, a partir de una capa epitelial sin polaridad con la formación de un epitelio estratificado de células con marcada polaridad, organizadas en la superficie del intestino, notablemente amplificada por numerosos pliegues dispuestos transversalmente en relación a su eje longitudinal, que surgen de repliegues de la capa submucosa sin afectar la capa muscular (Romanoff, 1960; Leonhardt, 1975; Louvard y col., 1991).

La diferenciación de las células endodérmicas en células epiteliales del intestino con función de absorción, se caracteriza en particular por el desarrollo del borde en cepillo, aspecto que amplifica el área superficial de los microvilli y modifica la superficie apical, especialmente para la absorción eficiente de nutrientes (Heusser y col., 1992)

El epitelio monoestratificado formado de células cilíndricas forma parte de las vellosidades y microvellosidades en el borde orientado hacia la luz (villi) y en la base forma criptas profundas. Los villi pueden ser cortos, en forma de hojas, cónicos o digitiformes y en general decrecen en longitud y abundancia de la región cranial a la región terminal caudal del intestino (Romanoff, 1960).

Las criptas son grupos de células proliferativas indiferenciadas en las que existe un alto índice de mitosis; las células que forman el villi migran desde la cripta hasta el ápice, los microvellos y el borde en cepillo se forman gradual y sincrónicamente y algunas células de la superficie son exfoliadas (Leblond, 1965; Luvard y col., 1991).

Fossner reportó en 1907, que el epitelio columnar simple cubre la superficie interna del intestino al final del tercer día de incubación, y que al cuarto día, se transforma en pseudoestratificado. Cada célula epitelial presenta largas mitocondrias, uniformemente distribuidas en posición paralela al eje longitudinal a las que se conoce como condriocentos (Romanoff, 1960). Al séptimo día degeneran la mayoría de las células cercanas al lumen, por lo que alrededor del noveno día los núcleos se presentan alineados en un estrato de tipo basal. En la etapa descrita se presenta una marcada elevación de la actividad mitótica, el número de células incrementa, la altura disminuye y la mayoría de las mitocondrias se localizan en posición supranuclear. Las células mesenquimatosas no se multiplican tan rápidamente y con el establecimiento de la capa muscular circular, la expansión del epitelio encuentra resistencia y se forman pliegues alrededor del sexto día, que se ondula en forma marcada hacia el día 11. La formación del villus en el pollo se inicia alrededor del día 13 y hacia el día 15 se arregla en zigzag. Hacia el día 16 las células epiteliales tienen forma cuboidal y presentan muy pocas mitocondrias localizadas en la porción basal. Hacia el final del desarrollo, los villi se alargan, incrementan en número, y las células superficiales organizan un epitelio columnar. Las criptas de Lieberkñ aparecen en el duodeno hacia el día 17, formadas por activa mitosis del epitelio entre los villi. Las células argentafines que se diferencian directamente de células epiteliales entre las cuales se reconocen por el día 11 (Romanoff, 1960).

Abundantes células en copa secretoras de mucus, se presentan en etapas muy avanzadas del desarrollo. Algunas células redondas que contienen gránulos eosinófilos se presentan hacia el día 15. El epitelio cilíndrico es continuo con el epitelio de las glándula. Los núcleos de las células se presentan basalmente dispuestos y entre el estroma del villi se presentan fibras de la mucosa muscular, capilares sanguíneos y linfáticos, fibras elásticas y nervios. El borde libre de las células epiteliales presenta un

borde estriado de cutícula, antes del séptimo día de incubación, pero su apariencia definitiva se reconoce hasta el décimo (Romanoff, 1960).

La progenie de las células endodérmicas indiferenciadas expresa por lo menos 4 fenotipos marcadamente diferentes, según señalan Madara y Trier en 1987 (citados por Louvard y col.,1991) y cada tipo celular presenta cambios en una secuencia definida por la migración celular desde la cripta hacia el villus.

En el proceso señalado, se reconocen las células ordenadas por edades a lo largo del eje de diferenciación (citados por Louvard y col.,1991), en la región media central de la cripta proliferan las células matrices, las células que producen son desplazadas hacia la superficie, se organizan en un epitelio y se especializan para absorción y secreción; además se presenta un bajo porcentaje de otros tipos, como las células de Paneth y endócrinas (Fukamachi,1992).

La función secretora del intestino depende de la presencia de células caliciformes secretoras de moco distribuidas en las criptas y ocasionalmente en las vellosidades y de las células de Paneth, que concentran gran cantidad de estructuras acidófilas en el vértice y basófilas en la porción basal que incluye al núcleo, se localizan en el fondo de las criptas y su patrón de distribución en el intestino es muy variable. Además en el fondo de la cripta se presenta un número reducido de células argentafines-cromafines que contiene 5-hidroxitriptamina y otro grupo de células argirófilas no cromafines que produce y acumula dopamina. En cuanto a la función absorbente, se realiza en el epitelio de revestimiento de las vellosidades, que presenta microvellosidades de alrededor de 1.2 μm de longitud y de 0.1 μm de grosor revestidas de una capa de glucoproteínas mediadoras de la absorción, en las cuales se han detectado fosfatasas alcalinas principalmente, mientras que en la zona del borde en cepillo y en zonas profundas se presentan lipasas y esterasas relacionadas con la absorción de grasas (Leonhardt,1975).

Las células intestinales diferenciadas expresan altos niveles de hidrolasas en la porción superior del villi (Louvard y col.,1991). Sin embargo, durante la diferenciación las células del villus con función de absorción, sintetizan enzimas específicas como la maltasa (α -glucosidasa), fosfatasa alcalina y aminopeptidasa, las cuales son importantes para las funciones digestivas (Romanoff, 1960; Fukamachi,1992).

Como se describió anteriormente, la arquitectura molecular de las células del borde en cepillo es muy compleja, la porción apical en donde se desarrollan los microvellos es rica en elementos del

citoesqueleto. A cada microvello se asocia un grupo de 20-30 microfilamentos de actina de las isoformas β y γ , que está colocado en posición central, anclado a la membrana plasmática y alcanza la punta del microvello. Otras proteínas contribuyen a la organización de esta estructura, como el polipéptido de 68 kDa conocido como fimbrina y el de 95 kDa conocido como villina, que se distribuyen a todo lo largo de los filamentos de actina. Otros polipéptidos de 80 kDa y de 110 kDa unidos al complejo de actina se distribuyen solamente en la porción superior del microvello mientras que moléculas de tropomiosina se asocian esencialmente a la porción basal del microvello (Louvard y col.,1991).

Se ha observado una red filamentosa en la que se encuentran embebidos los elementos descritos y otros filamentos de 10 nm de prequeratina relacionados con los desmosomas de la *mácula adherens*, un anillo de actina de polaridad mixta. Moléculas de tropomiosina, miosina típicamente no muscular, caldesmina y la proteína de 36 kDa conocida como calpactina I, complementan el conjunto estructural (Louvard y col.,1991).

El comportamiento de la villina, una proteína globular integrada por dos fracciones de PM 90,000 y 8.5,000, es de especial interés para el estudio de diferenciación del intestino. En contraste con otras proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células del borde en cepillo, muestra un patrón de expresión histoespecífica particular; Se asocia con actina, muestra marcada afinidad por el ión calcio y además las variaciones en concentración de éste influyen en sus cambios conformacionales. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado villina en diferentes células del tracto urogenital y gastrointestinal (Louvard y col.,1991). Las células que presentan borde en cepillo acumulan gran cantidad de villina en el ápice, sin embargo también se han reportado bajas cantidades, pero significativas, en las células de la cripta indiferenciada de la mucosa intestinal que no lo presentan y en las células del tracto digestivo primitivo, precursoras de los enterocitos (Louvard y col.,1991).

La villina colocaliza con microfilamentos de actina en el ápice de las células diferenciadas, se distribuye ampliamente en el citoplasma de las células indiferenciadas y su proporción es variable: las células de la cripta presentan niveles bajos de la proteína y los niveles más altos se presentan en el fondo del villus, sin embargo el nivel muestra decremento en la superficie del villus, también se observó que su proporción es 10 veces más elevada en los enterocitos maduros que en las células inmaduras de la cripta. Todas las células a lo largo del villi expresan RNAm que codifica para villina y según observaron de Pringault y sus colaboradores en 1986, el incremento en proteína está en

correlación con el marcado incremento en los niveles de RNAm específico, lo que sugirió la posible existencia de mecanismos de regulación de la expresión de la proteína como resultado del incremento del nivel de transcripción de los genes de villina (citados por Louvard y col., 1991).

La expresión histoespecífica y la inducción de este proceso durante la diferenciación terminal, subraya la estricta regulación de su actividad durante el período embrionario y en el estado adulto. Louvard y colaboradores (1991), señalan que el nivel de expresión de la proteína en las células intestinales en correlación con el estado de diferenciación, sus propiedades estructurales únicas, su expresión en determinados tipos de células epiteliales y su localización, son aspectos bien conocidos en humanos.

Modelos de comportamiento de la ultraestructura nuclear durante la diferenciación.

El Tejido Nervioso. La diferenciación del ectodermo incluye al tejido nervioso, la diferenciación neuronal implica la pérdida de la división celular y el retardo en la expresión de los genes involucrados en la duplicación del material celular, sin embargo la expresión de los genes que determinan las características de las neuronas diferenciadas y de las propiedades fenotípicas de cada tipo neuronal, muestra un marcado aumento. La síntesis de las proteínas específicas de los tipos de neuronas diferenciadas, indica cambios secuenciales sostenidos en la expresión genética hasta la diferenciación final. Las neuronas maduras que mantienen altos niveles de síntesis de RNA y proteínas, presentan núcleos voluminosos en los cuales abunda la cromatina laxa y que presentan nucleolos grandes, sin embargo las células matrices presentan características muy diferentes.

El estudio de la distribución y frecuencia de las RNPs del núcleo interfásico durante la diferenciación neuronal de la médula espinal del embrión de pollo entre los dos días y la eclosión, permitió analizar a nivel ultraestructural el fenómeno de regulación de la expresión de los genes (Vázquez Nín y col., 1980; 1983). La diferenciación de las células matrices en neuroblastos y en neuronas consiste de tres etapas que se reconocen por la conformación del núcleo y por variaciones del contenido cromatínico y RNP nuclear. En la primera etapa las células matrices son pequeñas con nucleolos voluminosos, presentan cromatina con alto grado de compactación, pocos GPCs y numerosas fibras RNP, características de las células matrices de la médula espinal cervical de pollo de 2 días de incubación y de las células de la capa ependimaria del pollo de 4 días. En la segunda etapa los pequeños neuroblastos presentan nucleolos de menor tamaño que el observado en las células matrices, descompactación de la cromatina y gran cantidad de RNPs de tipo fibrilar, cambios que suceden sin modificaciones en el volumen nuclear.

En la tercera etapa, se determinó que la presencia de gran cantidad de fibrillas RNPs y GPCs y el componente cromatínico predominante de configuración laxa caracterizan a las voluminosas neuronas inmaduras con núcleos y nucleolos de notables dimensiones (Vázquez-Nín y col., 1980; 1983; Ortega-Rangel, 1986). Modificaciones similares se observaron posteriormente en músculo en diferenciación.

El tejido muscular. Herrmann en 1952, observó en embrión de pollo que los mioblastos en migración experimentan contracción lenta desde el sexto día del desarrollo, antes de las primeras células

contráctiles puedan ser reconocidas histológicamente, presentan características bioquímicas de etapas avanzadas (citado por Ogawa, 1962).

El músculo se forma del mesodermo el cual se organiza inicialmente una red celular tridimensional o **mesénquima** (Alberts y col., 1994). Las células mesodérmicas son precursoras de diferentes tipos celulares: adipoblastos, condroblastos y mioblastos, considerando a estos últimos de especial atractivo por que representan un sistema que después de generar líneas celulares estables diferenciadas e indiferenciadas, la división celular se frena y se reconocen eventos terminales específicos por la expresión de genes específicos y la formación de miotubos multinucleados (Olson y col., 1991).

Bellairs y colaboradores publicaron en 1986 que a partir de los somitas se forma el músculo esquelético corporal y según la publicación de Watchler y colaboradores del mismo año, algunos músculos de la cabeza derivan de la placa precordial, ambas estructuras son consideradas de origen mesodérmico (citado por Buckingham, 1992).

Los primeros somitas, se forman por segmentación del mesodermo paraaxial, organizado en esferas huecas de células de tipo epitelial de las que inicialmente se diferencian el dermamiotomo y el esclerotomo y más tarde el miotomo y el dermatomo, regiones parcialmente involucradas en la formación de la piel, el músculo y de las estructuras esqueléticas. Konigsberg (1974) resume algunas de las particularidades de la miogénesis *in vitro*, recalcando que en los primeros estadios del desarrollo, todas las células del embrión muestran cambios sincronizados y gradualmente se presentan características diferenciales.

Partiendo de que las células clonadas de un tipo histológico particular, al ser cultivadas y adaptadas a diferentes medios muestran características diferentes, fué diseñado un método para cultivar células de músculo. Los cambios específicos en los cultivos fueron identificados y determinados con base en las evidencias de fusión sucesiva de células individuales. Las primeras células contienen muchos núcleos, posteriormente se observaron contracciones espontáneas y al final se establece un patrón típico de estrías (Konigsberg, 1974). Los mioblastos mononucleados se dividen, migran y organizan cordones de células que más tarde se fusionan y forman miotúbulos (Chevallier y col., 1977; Olson y col., 1991).

Existen diferentes tipos de células musculares, incluyendo algunas fibras de gran volumen, que presentan numerosos núcleos distribuidos a lo largo de su longitud total. Mintz y Baker en 1967 realizaron observaciones en músculo obtenido de especies quiméricas para determinar si las fibras

musculares multinucleadas se forman por la fusión de mioblastos o por divisiones nucleares repetidas sin segmentación (citados por Hall y Ralston, 1989).

Los resultados de los estudios señalados, proporcionaron evidencias decisivas de la formación de fibras multinucleadas por fusión nuclear y abrieron nuevas posibilidades para el análisis del mecanismo de traducción del RNAm en el RER cercano al núcleo que lo sintetizó, para trazar la migración del RNA y determinar si los mioblastos que forman un miotúbulo no son idénticos y difieren en su potencial pueden ser distinguidos en un estadio que precede a la formación del miotubo, como propusieron Miller y Stockdale en 1986 (citado por Hall y Ralston, 1989). Posteriormente los experimentos de implantación de tejido embrionario de pollo en codorniz permitieron a Kahen y colaboradores (1988) comprobar la migración de células programadas para formar exclusivamente músculo y proponer un modelo de diferenciación considerando que la formación del miotomo se realiza a partir de la región central del somita, de células que migran del dermamiotomo, principalmente de la región craneal dorsal adyacente al tubo neural (citado por Buckingham, 1992). La actividad de síntesis durante la diferenciación del tejido, depende de la presencia de la actina y la miosina, elementos básicos de los miofilamentos que se organizan en miofibrillas y éstas a su vez en fibras musculares, moléculas detectadas a las 72 y 96 h respectivamente, durante la incubación del embrión de pollo (Ogawa, 1962). Proteínas del tipo de la tropomiosina, la cadena pesada de la miosina, la actina específica y creatinincinasa fueron detectados en la etapa que el mioblasto deja de dividirse (Shimada, 1971). La tropomiosina y la troponina ocupan sitios específicos y son reguladoras de la contracción (Banks, 1981). Nameroff y Munnar (1976) reportaron que previamente a la fusión de las células se frena la síntesis de DNA y la división celular. De acuerdo con Olson y Colaboradores (1991), la expresión de genes específicos del músculo sucede cuando se detiene la división celular, se dispara la fusión y se forman los miotúbulos multinucleados.

Se considera que la diferenciación en este sistema está dirigida por la transcripción coordinada de genes y la acumulación de RNAm de proteínas específicas de varios tipos, que son ensambladas en el aparato contráctil funcional (Thinakaran y Bag, 1991; Olson y col., 1991).

Se reconoce la existencia de una familia de factores proteicos específicos, casi idénticos estructuralmente, integrantes del grupo HLH (Helix-Loop-Helix), que pueden activar el fenotipo miogénico al ser transfectados en células no musculares, pueden unirse a DNA y transactivar genes

músculo específicos, que se presentan durante la determinación y diferenciación de células de músculo en cultivo, en forma de Myo D, miogenina, Myf-5 y MRF-4 (Olson y col.,1991).

La diferenciación del músculo ocurre cuando son activados los factores reguladores HLH, originalmente bloqueados por factores del crecimiento (Olson y col.,1991). Los factores citados son casi idénticos estructuralmente, sin embargo, exhiben patrones de expresión particulares: Los transcritos del factor Myf-5 se detectan inicialmente en la región de dermomiótomo del somita de ratón en etapas tempranas del desarrollo, mientras que los transcritos de miogenina se detectan solamente en la región del miótomo, aproximadamente dos días antes que los transcritos de MyoD. Estas diferencias sugieren la participación de los factores HLH en el control de la expresión fenotípica (Hinterberger y col.,1991). Se considera que el músculo diferenciado es fisiológicamente maduro cuando establece contacto con el sistema nervioso mediante la formación de la placa motora (Kalcheim y col., 1982).

Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se determinó la localización de RNAm específico alrededor de los núcleos de células de la placa terminal, que codifica para dos subunidades diferentes de los receptores para acetilcolina, cuya estructura y distribución en músculo varía en el desarrollo, la subunidad α se presenta en músculo fetal y adulto, mientras que la subunidad ϵ aparece en etapa postnatal y se considera el subtipo de receptor - acetilcolina maduro. El RNAm que codifica para la subunidad ϵ se presenta localmente en el sitio de contacto neuromuscular y su acumulación en la placa terminal no depende de la presencia continua de la terminal nerviosa durante la formación de la sinapsis. Los autores sugieren que la localización de la expresión del RNAm de la subunidad ϵ del receptor acetilcolina, inducida localmente por una señal restringida a la región de la placa terminal, es dependiente del contacto nervio - músculo en los primeros días de formación de la sinapsis durante la etapa fetal (Brenner y col.,1990).

Las características de los elementos ribonucleoproteicos nucleares en diferentes etapas del desarrollo del embrión de ave, se estudiaron al microscopio electrónico, siguiendo la serie cronológica-morfológica de Hamburger y Hamilton (1951). La densidad numérica de los GPCs ($N/\mu m^2$) en los primeros estadios varía entre 0.22 y $0.41\mu m^2$, se incrementa gradualmente entre los estadios 39 y 41, en el estadio HH43 alcanza el valor pico ($2/\mu m^2$) y decrece un poco en el recién nacido. Este incremento coincide con la reducción en volumen nucleolar que en el estadio HH43 alcanza su valor más bajo,

menor a $0.05\mu\text{m}^3$. La fracción del espacio nuclear ocupada por otras RNPs no se altera notablemente y el volumen nuclear se mantiene alrededor de $15\mu\text{m}^3$, y no presenta marcadas variaciones (Zavala y col.,1992).

La técnica de Barroso-Moguel y Costero (1962), fué utilizada para determinar la inervación del músculo de la región cervical del embrión, y se observó que en el estadio HH39, los núcleos se presentan centralmente, los miofilamentos son incipientes, y no se detectaron fibras argirófilas. En el estadio HH43 se determinó la impregnación de múltiples fibras nerviosas y terminales nerviosas en botón (Zavala y col.,1992). En el estudio citado se determinó el efecto modulador sobre la expresión de los genes de la fibra muscular en el momento del establecimiento de las conexiones nerviosas, que posteriormente ejercen acción trófica constante sobre el músculo.

Como sugieren Beebee y Butterworth (1980), los sistemas en desarrollo representan un material de especial interés para examinar la regulación de la expresión genética, debido a que las células en proceso de determinación y diferenciación terminal, en las que la expresión de genes se altera, se reflejan cambios en la velocidad de síntesis del RNA para determinadas etapas de la ontogénea. Los hallazgos (citados sobre las variaciones de estructuras RNP nucleares, se relacionan con la serie de transformaciones funcionales y estructurales de cada tipo celular, como resultado de los genes que expresan y del tipo de proteína que producen. Desde el origen de cada tipo celular se manifiestan diferencias en cuanto al tiempo o intensidad de copia del DNA en forma de RNA y la síntesis final de proteínas.

VI. OBJETIVOS

Los objetivos considerados en el presente estudio se señalan a continuación:

- 1) Determinar los patrones morfológicos y estructurales del núcleo celular de diferentes tejidos derivados de las tres capas germinales.
- 2) Analizar las características ultraestructurales del componente ribonucleoproteico extranucleolar en núcleos interfásicos, en embriones de ave de etapas muy tempranas de la diferenciación hasta individuos recién nacidos.
- 3) Cuantificar las variaciones de las ribonucleoproteínas, en particular del nucleolo y los gránulos pericromatinianos (GPC) y relacionarlas con las etapas críticas de la diferenciación y maduración, así como con aspectos funcionales de cada tipo celular.

VII. MATERIAL Y METODO.

Huevos fértiles de gallina (*Gallus domesticus*) de la raza White leghorn, fueron incubados a una temperatura de 37 - 38°C y humedad de 85%, durante diferentes tiempos para obtener embriones de los estadios objeto de este estudio.

La edad de los embriones se determinó tomando como referencia la serie cronológica basada en la morfología publicada en 1951 por Viktor Hamburger y Howard L. Hamilton. Las muestras de tejidos en diferenciación fueron obtenidas de embriones correspondientes a diferentes estadios (HH) y de pollos recién nacidos (RN).

Selección de estadios para la toma de muestras.

Las características del núcleo interfásico de células de etapas tempranas de diferenciación, se estudiaron mediante diferentes técnicas de contraste.

a) En células del epiblasto de embriones del estadio HH3 de aproximadamente 13 h de incubación, en los cuales la línea primitiva se encuentra en proceso de transición a hendidura primitiva (Arey,1956).

Del epiblasto se diferencian las tres capas germinales y a continuación se señalan los tejidos y los estadios seleccionados para el estudio ultraestructural:

b) Los núcleos del ectodermo y del epitelio superficial de la epidermis en el proceso de formación de la piel, fueron estudiados en embriones de los estadios HH9(30h), HH11(42h), HH16(56h), HH41(15 días) y RN(21 días, coincide con la eclosión)

c) Los núcleos del endodermo y del epitelio intestinal, durante el proceso de diferenciación del intestino, en muestras de embriones de los estadios HH11, HH16, HH30 (6½ días) y del intestino delgado de embriones de los estadios HH41, HH43 (17 días) y RN.

c) Los núcleos de las células de la notocorda en muestras de embriones de los estadios HH9, HH11, HH16, HH19 (68h), HH21 (3días), HH30 (6 ½ días), HH32 (7½días) y HH36 (10 días de incubación).

Microscopía óptica. Para determinar las zonas de estudio y realizar las mediciones de volumen nuclear y nucleolar, se utilizaron cortes semifinos de los diferentes tejidos de embriones de diferentes edades incluidos en resina epóxica, que fueron teñidos y estudiados como se describe a continuación.

Tinción.- Los cortes semifinos de $0.5\mu\text{m}$ fueron montados en portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina al 1% disuelto en una solución de bórax al 1% en agua destilada y con un microscopio fotónico se evaluó la preservación de las muestras y se localizaron las zonas de estudio.

Morfometría.-Se estudiaron las características morfológicas de los diferentes tejidos en los diferentes estadios y se realizaron mediciones del diámetro nuclear y nucleolar (mayor y menor) a un aumento fijo (1,600 X), utilizando cortes de las muestras incluidas en epón, de alrededor de 350 nm de grosor, obtenidos con un ultramicrotomo manual, marca Sorvall modelo MT1, teñidos con azul de toluidina al 1% y utilizando un sistema de observación integrado por un microscopio estándar de la casa Zeiss, al que se adaptó un lente intermedio (optovar) y un ocular micrométrico provisto de vernier. Los datos se utilizaron para determinar el volumen nuclear y nucleolar, mediante un programa de cómputo diseñado para obtener diversos datos morfométricos.

Microscopía Electrónica. Se procesaron muestras para estudiar las características del núcleo mediante la técnica de doble contraste utilizando el material postfijado en osmio e incluido en epón, de contraste preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA) en muestras sin postfijación; incluido en resina epóxica y para cromatina (PTA) en muestras sin postfijación incluidas en resina acrílica.

Fijación.- Para la obtención de muestras, se utilizó una solución de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 1% en amortiguador de fosfatos 0.2M a pH 7.2, a 37°C durante 1 h.

Las muestras de epiblasto (HH3) se fijaron por goteo e inyectando la solución fijadora debajo del blastocisto, el cual fué disecado, extraído del vitelo y colocado en la misma solución dentro de un vial.

En los estadios HH9, HH11 y HH16 la solución fijadora se inyectó por debajo del embrión, el cual se separa inmediatamente del vitelo, realizando la extracción inmediatamente y seccionando muestras pequeñas y delgadas, que se lavaron y colocaron en viales con fijador.

Las muestras de embriones desde los estadios HH21 hasta los pollos recién nacidos, fueron obtenidas inyectando la solución fijadora en la región del cuello y en la cavidad abdominal e inmediatamente se llevó a cabo la disección, separando en viales con fijador y etiquetados, los trozos de ectodermo-piel, endodermo-intestino y notocorda. Después de la fijación y antes de la deshidratación se lava el material con solución de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 a temperatura ambiente y se separaron algunas muestras para tratamiento con ósmio, otras para procesamiento en resina epóxica y otras para procesamiento en glicolmetacrilato.

Postfijación.- Algunas muestras de los tejidos señalados, fueron procesadas en solución de tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos durante 1 h y al final se lavaron con amortiguador.

Deshidratación.- Para incluir en resina epóxica, las muestras osmificadas y las obtenidas directamente de la fijación, se deshidrataron con alcoholes (inciso a). También se utilizaron mezclas de glicolmetacrilato, para la deshidratación gradual de las muestras que requieren la polimerización de ese medio de inclusión, siguiendo el procedimiento de rutina utilizado en el laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de Ciencias de la UNAM (inciso b).

a) La deshidratación de las muestras osmificadas y de las no osmificadas, se realizó por separado en alcoholes graduales en serie, del etanol 70° hasta alcohol absoluto, en cambios de 20 minutos y dos cambios en óxido de propileno de 15 minutos. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento de preinclusión que se llevó a cabo en mezclas de óxido de propileno y la mezcla de resina epóxica utilizada para la inclusión en tres diferentes proporciones (2:1 durante 1h, 1:1 durante 12 h y 1:2 durante 12 h).

La resina epóxica para inclusión se preparó utilizando: 10.13 g de glicidólico de éter (Epikote), 9.3 g de anhídrido dodecenil succínico (DDSA), 3.8 g de metil norbornendicarboxílico (NMA) y 0.33 g de dimetil aminometilfenol (DMP). La resina con las muestras fué polimerizada a 60°C en moldes planos.

b) Las muestras de tejidos procesados para evidenciar la cromatina, fueron lavados en amortiguador después de hora y media de fijación, se deshidrataron gradualmente con glicolmetacrilato (GMA) preparado a diferentes porcentajes (70%, 80%, 97%), en una mezcla 50:50 de GMA al 97 % y solución no polimerizada, cambiando el medio en tiempos de 20 minutos. Por último, se realizó un cambio adicional de solución no polimerizada de 20 minutos. La preinclusión de los trocitos de tejido se realizó en prepolímero de GMA durante 18 h y para la inclusión se utilizaron cápsulas de gelatina con prepolímero nuevo evitando dejar burbujas de aire al tapar. Para la polimerización de esta resina se utilizó una cámara de luz ultravioleta por 24 h.

Corte.- Las muestras polimerizadas en los bloques de EPON y en cápsulas con GMA, fueron cortadas en un microtomo MT1 de la casa Sorvall utilizando cuchillas de vidrio para obtener secciones de diferentes grosores.

Contraste.- Los cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de muestras incluidas en epón o en GMA, fueron depositados en rejillas de cobre cubiertas con formvar. Se dejaron secar al aire y se procedió a la aplicación del método de contraste adecuado para cada caso, según se describe a continuación:

a) Para el contraste general de la estructura celular de los diferentes tejidos osmificados e incluidos en epón, se utilizaron soluciones de acetato de uranilo al 3 % (20 minutos) y de citrato de plomo al 0.3 % (10 minutos), flotando las rejillas con cortes en gotas de las soluciones señaladas, dentro de una caja de petri con un algodón húmedo.

b) Para el estudio de las RNP se utilizó el método de contraste preferencial (Bernhard, 1969), flotando las rejillas con los cortes ultrafinos, primero en la solución de acetato de uranilo (3 minutos), posteriormente en la solución de EDTA al 0.2M (15 a 20 minutos) y al final en la solución de citrato de plomo (3 minutos). Para las muestras de las primeras etapas de incubación se redujo el tiempo de tratamiento con EDTA a 10 minutos o menos debido a que las estructuras RNPs se decoloran con tiempos más largos.

c) Para el estudio de la cromatina se utilizaron cortes ultrafinos montados en rejillas cubiertas con formvar, los cuales se flotaron durante 20 minutos en una solución de ácido fosfotúngstico al 3% ajustada a pH 7.2.

En todos los casos las rejillas fueron lavadas cuidadosamente por goteo con agua desionizada. En el caso del contraste general y de la técnica preferencial para RNPs, se realizó un lavado intermedio a la aplicación de cada solución de los diferentes contrastantes y un lavado final. Las muestras lavadas se dejaron secar completamente antes de observar al microscopio electrónico.

Obtención de imágenes.

Técnica preferencial para ribonucleoproteínas.- Los núcleos en los que se logró un grado de contraste adecuado con la técnica del EDTA para analizar los GPCs, fueron fotografiados en los microscopios electrónicos de transmisión EM9 y EM10 de la casa Carl Zeiss a 8,800 y 12,500 aumentos respectivamente. Los negativos fueron revelados e impresos en papel a un aumento final de 25,000 X. Se fotografiaron 20 núcleos de cada tejido de los diferentes estadios seleccionados.

- En los cortes de embriones de estadios posteriores al HH3, se fotografiaron los núcleos del ectodermo y en los cortes de muestras de piel, se fotografiaron los núcleos de las células del epitelio superficial no queratinizado.

- En los cortes de notocorda, se fotografiaron los núcleos localizados centralmente y en la periferia.

- En los cortes de embriones de los estadios tempranos, se fotografiaron los núcleos del endodermo y en los cortes de muestras del intestino, se fotografiaron los núcleos de la capa superficial de la región del villus.

Técnica de contraste para cromatina.- Los tejidos procesados e incluidos en GMA y contrastados con PTA, fueron fotografiados a diferentes aumentos y las imágenes se utilizaron para complementar el aspecto cualitativo del estudio, en particular en lo que se refiere a los cambios en la disposición de la cromatina.

Técnica de contraste general.- Los cortes de tejidos procesados con ósmio e incluidos en EPON, fueron contrastados con uranilo y plomo en solución, y se tomaron algunas imágenes para complementar el estudio de la disposición de las ribonucleoproteínas nucleares, particularmente durante la formación de la piel.

Cuantificación de estructuras y análisis de la frecuencia.- En las imágenes impresas, se evaluó la frecuencia numérica de GPCs contando el número total de éstas estructuras presentes en cada núcleo. La relación entre la frecuencia y el área nuclear fué determinada mediante el programa de computo CLOE diseñado para el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Los datos fueron procesados para obtener los valores de media, desviación estandar y error estandar.

Los resultados se presentan en gráficas de volumen nuclear, de volumen nucleolar y de frecuencia de GPCs, que comparan las particularidades de los núcleos celulares de los tres tejidos, notocorda, piel e intestino. Para cada caso se presentan las tablas de datos y de significancia estadística de análisis de varianza (ANOVA).

VIII. RESULTADOS

Tomando como base las mediciones del volumen nuclear y nucleolar obtenidas con el sistema óptico descrito en la metodología, fué posible reconocer diferentes patrones de comportamiento de los núcleos de los diferentes tipos celulares estudiados, en particular entre los núcleos de un mismo tejido en las diferentes etapas del desarrollo y en general entre los núcleos de los diferentes tejidos.

En lo referente al aspecto ultraestructural, mediante diferentes técnicas de contraste, fué posible analizar las características nucleares en diferentes etapas de la maduración de la notocorda y de dos epitelios, el superficial de la piel y el intestinal de borde en cepillo; la técnica preferencial del EDTA fué utilizada para abordar el aspecto fundamental del presente estudio, es decir, el análisis de la estructuras ribonucleoproteicas. Las técnicas de doble contraste y del PTA para contraste preferencial de cromatina fueron de utilidad para la obtención de imágenes de núcleos de ectodermo y endodermo de las etapas tempranas y de células diferenciadas de piel y epitelio intestinal, que se presentan como material complementario.

Primeras etapas de la diferenciación.

Los núcleos de las células del epiblasto del estadio HH3, representan el patrón de la organización de la capa indiferenciada respecto a los núcleos de las células de las capas de etapas tempranas de la diferenciación, de estadios subsecuentes y de las células diferenciadas.

El aspecto del nucleolo y las características de la distribución de la cromatina y de los demás elementos del núcleo de los tipos celulares estudiados en los diferentes estadios del desarrollo, se reconocen fácilmente con la aplicación de la técnica de doble contraste; sin embargo, el análisis de las estructuras RNPs requiere del uso de otro método de contraste y la adaptación de los tiempos de aplicación.

Las imágenes obtenidas al ME de material contrastado con la técnica preferencial de Bernhard (1969), muestran la distribución de las estructuras RNPs en el epiblasto (HH3) y permiten apreciar los cambios estructurales del núcleo interfásico, en etapas posteriores que coinciden con la diferenciación en ectodermo, en cordamesodermo y en endodermo.

Las características nucleares para cada tipo celular, observadas en el presente estudio se describen a continuación.

EPIBLASTO.

Aspectos generales.- En los embriones en el estadio HH3 (portada del apéndice de figuras), es posible apreciar el epiblasto aún indiferenciado, que se reconoce como una capa formada por células cilíndricas con abundante citoplasma, que presentan núcleos voluminosos, con grandes nucleolos de aspecto nucleolonemal o laxo que sugieren una actividad de síntesis intensa. El hipoblasto del embrión, es una capa dispuesta entre el epiblasto y el vitelo, formada por células con escaso citoplasma. El citoplasma de las células del estadio HH3 contiene numerosos ribosomas, también presenta vacuolas y gránulos de vitelo en diversos grados de degeneración. Las mitocondrias son poco frecuentes, los centriolos y el retículo endoplásmico son sencillos y en algunos sitios se aprecian uniones de reforzamiento.

Esterología.- Los núcleos de las células del epiblasto de 13 h de incubación (HH3), miden en promedio $66 \mu\text{m}^3$ (gráficas 1,4 y 7) y los nucleolos alrededor de $3.5 \mu\text{m}^3$ de volumen (gráficas 2,5 y 8).

Ultraestructura.- Con la técnica de doble contraste se reconocen algunos cuerpos de cromatina compacta alejados de la envoltura nuclear o en contacto con un nucleolo grande de aspecto nucleolonemal y se presentan numerosas estructuras granulares y fibrilares dispersas. (fig.1).

Las muestras contrastadas con la técnica preferencial (Bernhard,1969), permiten apreciar mejor la estructura granular y fibrilar del nucleolo y de las RNPs en general, así como la distribución de estas últimas. Las fibrillas RNPs se disponen irregularmente y forman un denso entramado con los GICs, sin embargo no se aprecia la formación de cúmulos o agrupaciones definidas. Los GPCs, se localizan en la región intercromatiniana y en los bordes de los pequeños grumos de cromatina compacta, que están en contacto con la envoltura nuclear y es difícil reconocer el halo que los rodea, debido a que la conformación de cromatina laxa predomina (fig.2). El nivel de GPCs en núcleos de epiblasto, es de $0.76/\mu\text{m}^2$, en muestras del estadio HH3.

Distribución de la cromatina en núcleos de las tres capas embrionarias.- En las muestras de embriones del estadio HH11 contrastadas con PTA, la cromatina en los núcleos de ectodermo (fig.3.a) y notocorda (fig.3.b), se presenta en pequeños cúmulos electrón densos dispersos en el nucleoplasma, alejados de la envoltura nuclear y otra fracción que muestra una estrecha relación con el interior y con la periferia nucleolar. En los núcleos de endodermo (fig.3.c), el elemento cromatínico predominante es el de configuración laxa, se reconocen pocos elementos de cromatina perinucleolar y las fracciones adheridas con la envoltura nuclear están poco definidas. Debido a la técnica de contraste, en los tres casos se presentan nucleolos decolorados.

ECTODERMO - PIEL.

Estereología.- Los núcleos del ectodermo en el proceso de formación de la piel tienden a una reducción gradual, tomando como referencia el volumen del núcleo de las células del epiblasto en HH3 ($66 \mu\text{m}^3$), como se observó al comparar los núcleos de las células superficiales de las muestras de piel entre los estadios HH9 ($58 \mu\text{m}^3$) - HH30 ($19.3 \mu\text{m}^3$). En el estadio HH41 se observó un marcado incremento en el volumen nuclear hasta $34 \mu\text{m}^3$, sin embargo, en los núcleos del estrato de transición de la capa superficial no queratinizada de la piel del pollo recién nacido el volumen promedio es de $17.3 \mu\text{m}^3$ (gráfica 1), una variación muy importante que representa la reducción del volumen nuclear aproximadamente a menos de un tercio del valor observado en epiblasto (HH3) y en ectodermo entre los estadios HH9 y HH30.

También se observaron cambios en el nucleolo, que mide alrededor de $3.5 \mu\text{m}^3$ en el epiblasto de la etapa HH3, sobrepasa las $5 \mu\text{m}^3$ en el epitelio (HH9) y se reduce gradualmente en los estadios posteriores, midiendo hasta $0.6 \mu\text{m}^3$ en los núcleos de las células de la capa de transición en piel de pollos recién nacidos (gráfica 2). Los valores del volumen nuclear y nucleolar por estadio de epiblasto, ectodermo y piel se presentan y comparan en la tabla 1 y 2 respectivamente.

Ultraestructura.- El núcleo de las células de la piel en diferenciación, además de la fluctuación de volumen, cambia de forma y presenta cambios discretos en la distribución de las estructuras. En las primeras etapas, las RNPs se encuentran ampliamente dispersas y los grandes nucleolos presentan aspecto nucleolonemal, como se observa en las muestras de ectodermo y piel primitiva de los estadios HH11 (fig.4), HH 21 (fig.5.a) y HH41(fig.6a), material contrastado con la técnica de tinción preferencial.

Los primeros cambios en la distribución de los componentes señalados, se reconocen en las células de la capa intermedia del estadio HH43, procesadas por el método de doble contraste con soluciones de uranilo y plomo, con lo cual se logró evidenciar el desplazamiento de las RNPs por la incipiente compactación de la cromatina (fig.6.b).

En este estudio se aprecia una distribución muy localizada de RNPs y la presencia de nucleolos compactos de volumen reducido, en los núcleos la capa de transición de la piel diferenciada contrastada con EDTA (fig.7)

El componente cromatinico es discreto en los núcleos de los primeros estadios, como se observa en muestras del estadio HH11 procesadas en glicol metacrilato y contrastadas con PTA (fig.3.a), en las

muestras incluidas en epón y contrastadas con soluciones de uranilo y plomo, de estadios intermedios (figs.5.b, 6.b), y en los núcleos de la capa basal de piel diferenciada (fig.9.b). Los cambios en la conformación de la cromatina durante la diferenciación, se aprecian claramente en los estratos de la piel: en los núcleos de la capa intermedia, la cromatina se encuentra ligeramente compactada (8.a), mientras que, en los núcleos planos de las células cornificadas del estrato superficial de descamación, la compactación se acentúa (fig.8.b) y la estructura en general sufre una dramática transformación con respecto a la observada en células de la capa de transición de piel de pollos recién nacidos, que presentan núcleos alargados (fig.9.b).

Los cambios progresivos en el citoplasma y en el núcleo, se reconocen en las muestras de epidermis de la región del cuello del estadio HH41 (fig. 9.a) y en las diferentes capas celulares de piel del recién nacido que manifiestan características estructurales de las etapas anteriores, abundante citoplasma y núcleos grandes en las células de la capa basal, reducción del citoplasma y núcleos ligeramente más voluminosos en las células de la capa intermedia o espinosa y núcleos alargados en las células de la capa de transición que muestran aplanamiento (fig.9.b). En las membranas se aprecian estructuras de reforzamiento (fig. 7) que mantienen a las células unidas y conforme avanza la cornificación se debilitan (fig.9.b). Al tiempo que se reduce el espacio citoplasmático, degeneran organelos y los núcleos de las células aplanadas desplazadas hacia la superficie, muestran condensación de la cromatina, compactación del nucleolo y disminución del espacio intercromatiniano, lo cual se puede apreciar en material contrastado con EDTA (fig. 7), con PTA (fig. 8.b) y por doble contraste (figs. 8.a, 9.b). La descamación de la capa superficial ocurre por la ruptura de las uniones reforzadas señaladas (fig. 9.b). La tinción preferencial del EDTA revela la presencia en el citoplasma de numerosos ribosomas, gránulos de tamaño aproximado al de los GPC nucleares, estructuras fibrilares dispersas (figs.4,5.a, 5.b. y 6.a) y también es posible apreciar material asociado en el exterior de los poros (fig.5.a).

Durante la diferenciación de la piel, aún cuando las RNPs se mantienen como estructuras abundantes, bien definidas y que el componente fibrilar y los numerosos GICs se presentan irregularmente dispuestos, la frecuencia de los GPCs en el núcleo de las células del ectodermo, se modifica después de las 42 hrs de incubación; el nivel es bajo ($0.67/\mu\text{m}^2$) en el estadio HH11, se incrementa ($0.81/\mu\text{m}^2$) en los núcleos de la capa superficial del epitelio en el estadio HH41 y en los núcleos de la capa de

transición en muestras de recién nacidos, alcanza el máximo nivel ($1.07/\mu\text{m}^2$), que sobrepasa el nivel de GPCs observado en núcleos de epiblasto del estadio HH3 ($0.76/\mu\text{m}^2$) (gráfica 3 y tabla 3).

NOTOCORDA.

Microscopía óptica.- En embriones de etapas tempranas, la notocorda se localiza entre la capa del ectodermo y sistema nervioso, del endodermo y de los somitas en formación (Fig.10.a), se transforma en un bastón formado por un gran número de células apiladas que presentan núcleos orientados hacia el exterior, alrededor del cual en el estadio HH16 se deposita gradualmente una cubierta fibrilar (fig 10.b). En las etapas avanzadas, el aspecto histológico más notable del órgano notocordal es la presencia de numerosas vacuolas que gradualmente aumentan de volumen y se interconectan, como se observa en cortes de embriones del estadio HH36, en que se aprecian los cuerpos vertebrales en formación (Fig.10.c).

Esterología.- Con respecto al volumen nuclear observado en el epiblasto ($66 \mu\text{m}^3$), se observó una notable disminución, debido a que el volumen nuclear en las células de la notocorda del estadio HH9 es de solamente $30 \mu\text{m}^3$. Sin embargo, en este tejido no se registraron variaciones importantes a lo largo del proceso de diferenciación y el tamaño de los núcleos fluctúa alrededor de $30 \mu\text{m}^3$ (gráfica 4), únicamente en el estadio HH21 baja ligeramente a $25.9 \mu\text{m}^3$ y se recupera en los estadios posteriores. El volumen nucleolar en las células de la notocorda, se reduce de $3.5 \mu\text{m}^3$ observado en epiblasto, hasta aproximadamente $2 \mu\text{m}^3$ durante los primeros estadios (HH 9, 11 y 16), se reduce de nuevo hasta $0.62 \mu\text{m}^3$ en el estadio HH30 y posteriormente se incrementa, hasta aproximadamente $1 \mu\text{m}^3$ en HH36 que fue el último estadio estudiado (gráfica 5).

Ultraestructura .- Las primeras observaciones de la distribución de las RNPs nucleares se realizaron en muestras del estadio HH9, etapa de organización de la estructura notocordal, en que el número de células es bajo. Los núcleos de las células están orientados hacia la periferia, presentan nucleolos voluminosos, gran número de GPCs dispersos entre el componente fibrilar y además se presentan GICs formando cúmulos (fig.11).

En el estadio HH11, las características son muy semejantes a las descritas en el estadio anterior, sin embargo el número de GPCs es menor, también se presentan GICs dispersos y en cúmulos (fig.12). En el estadio HH21, los cúmulos de GICs están mejor definidos y los GPCs se presentan dispersos en el nucleoplasma, algunos muy cerca del nucleolo (fig.13).

En estadios posteriores se presentan alteraciones estructurales del citoplasma y el aspecto del núcleo se modifica notablemente, la cromatina se condensa y la densidad de RNPs disminuye. En el estadio HH32 los núcleos presentan numerosas fibrillas y pequeños cúmulos de GICs entre los que se encuentran algunos GPCs unidos por fibrillas. Los GPCs en este estadio también se observaron cerca de la envoltura nuclear en áreas decoloradas de cromatina, la cual presenta un grado de compactación variable aún en células vecinas (fig.14). En el estadio HH36 independientemente del grado alteración del citoplasma, se conservan las estructuras nucleares, algunos GPCs se localizan entre los cúmulos de GICs o cerca de la envoltura y las fibrillas son abundantes. En general, las RNPs se encuentran notablemente dispersas (fig.15)

Con respecto a lo observado en los núcleos del epiblasto, la frecuencia de GPCs es muy elevada en el estadio HH9 ($1.14 /\mu\text{m}^2$) y disminuye gradualmente en los estadios posteriores, aunque muestra un leve incremento en HH32. La fluctuación en la densidad de los GPCs de la notocorda, se ilustra en la gráfica 6 y los valores de frecuencia se presentan en la tabla 6.

Los cambios en el componente RNP y cromatínico, descritos para cada estadio, son graduales y coinciden con la diversificación de las estructuras del citoplasma. En muestras del estadio HH11, están representados principalmente los ribosomas, las mitocondrias, los centriolos y entre las membranas se reconocen algunos puntos de unión particulares (fig.16). El estadio HH16 se caracteriza por la presencia de numerosas estructuras bien diferenciadas y conservadas en el citoplasma, en el cual se reconocen cisternas del Golgi, mitocondrias, vacuolas, centriolos, interdigitaciones de membrana y complejos de unión; la dilatación del RE es notable en diferentes sitios (fig.17). En el estadio HH30, el aspecto del citoplasma se altera gradualmente, aún en las células periféricas que conservan fragmentos del RE y mitocondrias, las vacuolas en formación constante se interconectan, incrementan su número y aumenta el volumen celular por la depositación activa de material exportado en vesículas (fig.18).

ENDODERMO-INTESTINO

Estereología.- Se encontraron variaciones importantes del volumen nuclear durante el proceso de diferenciación. El volumen observado en el epiblasto del estadio HH3 ($66\mu\text{m}^3$) se modifica; en los núcleos de la capa de endodermo del estadio HH9 es de aproximadamente $22\mu\text{m}^3$, gradualmente se incrementa hasta alcanzar $37\mu\text{m}^3$ en el estadio HH30 y después se reduce hasta $18\mu\text{m}^3$ en las células intestinales de los recién nacidos (gráfica 7). El volumen nucleolar fluctúa entre $1-2\mu\text{m}^3$ (gráfica 8).

Ultraestructura.- Los núcleos de las células en las primeras etapas de la formación del intestino, muestran abundantes estructuras RNPs de tipo fibrilar y granular, se reconocen GIC y GPC ampliamente dispersos y escasa cromatina compacta. En la periferia del núcleo desde el estadio HH9, se aprecian algunas estructuras fibrilares y granulares afines a la técnica de contraste preferencial para RNPs, dichas estructuras son más evidentes en el estadio HH16 en que se observan como fibrillas organizadas en paquetes y numerosos gránulos dispersos entre numerosos ribosomas y algunas mitocondrias del citoplasma (fig.19). Conforme avanza el desarrollo hacia el estadio HH41, disminuye la frecuencia de estructuras citoplasmáticas afines a la técnica preferencial de EDTA, se incrementan los GPCs y las RNPs nucleares de estructura fibrilar. Los GICs se organizan en cúmulos definidos en los espacios de bajo contraste que representan grumos de cromatina compacta (fig.20). En los núcleos del pollo recién nacido se observaron cuerpos de RNPs de marcada densidad (fig.21), diferentes a las fibrillas, a los GICs y a los GPCs descritos en el trabajo de Monneron y Bernhard (1969), en cuyo fondo se advierte la presencia de un material de estructura fina. En las etapas tempranas, los GPCs se presentan dispersos con otras RNPs y al cambiar la conformación de la cromatina se reconocen cerca de sus bordes, cuando alcanzan el nivel máximo de GPCs ($6.45/\mu\text{m}^2$) en muestras de intestino de pollo recién nacido (gráfica 9 y tabla 9).

En las muestras procesadas con la técnica del PTA, se aprecia la configuración predominante de la cromatina y su distribución, en las primeras etapas de la diferenciación del endodermo (fig.3.c) y la relación que guardan los pequeños cúmulos de cromatina de configuración compacta, con la envoltura nuclear y con el nucleolo, en el núcleo de intestino de los estadios finales de la diferenciación y también se aprecian las características de la superficie del villus (fig. 22). El citoplasma presenta numerosas estructuras diferenciadas, particularmente RER, mitocondrias, vacuolas en la parte basal del citoplasma, uniones complejas entre las células y se reconoce el incipiente borde en cepillo en la superficie; sin embargo las estructuras granulares y las fibrillas descritas alrededor del núcleo en estadios tempranos, no están presentes en las muestras del estadio HH41 (fig. 20), y tampoco se observaron en las células del epitelio intestinal del pollo recién nacido (fig.21).

Las células del endodermo a partir de HH11 mostraron un alto nivel de GPCs, que posteriormente se incrementa, alcanzando el máximo valor en los núcleos de recién nacidos (tabla 9 y gráfica 9), que es notablemente más alto que el observado en los otros tejidos estudiados.

Distribución de las RNPs.- Las características ultraestructurales del núcleo, analizadas con la técnica de contraste preferencial en los diferentes tipos celulares, incluyendo las del epiblasto del estadio HH3 y células de etapas subsecuentes de la diferenciación del ectodermo y del endodermo desde HH9 hasta muestras de piel y de intestino de pollos recién nacidos y en el caso de los núcleos de las células notocordales solamente hasta el estadio HH36, presentaron en general algunas modificaciones relacionadas con la transformación histológica de cada caso particular, que reflejan cambios en volumen nuclear y nucleolar como se observó al microscopio fotónico y la transformación gradual del citoplasma. Este último aspecto se ilustra detalladamente, para el caso de la notocorda.

Las observaciones de muestras contrastadas con PTA son de especial importancia para la interpretación de las imágenes obtenidas con la técnica preferencial para RNPs.

Distribución de la cromatina.- Se utilizaron muestras contrastadas con PTA para la obtención de imágenes de la distribución de la cromatina de los núcleos del epiblasto en el estadio HH3, del ectodermo, de la notocorda y del endodermo de las etapas tempranas y de células diferenciadas de piel y epitelio intestinal, que se presentan como material complementario del presente estudio. Debido a la configuración compacta de la cromatina en cuerpos compactos que ocupan un espacio reducido, el espacio considerado como "intercromatínico" representa un área considerable para distribución de otras estructuras del nucleoplasma.

APENDICE DE FIGURAS.

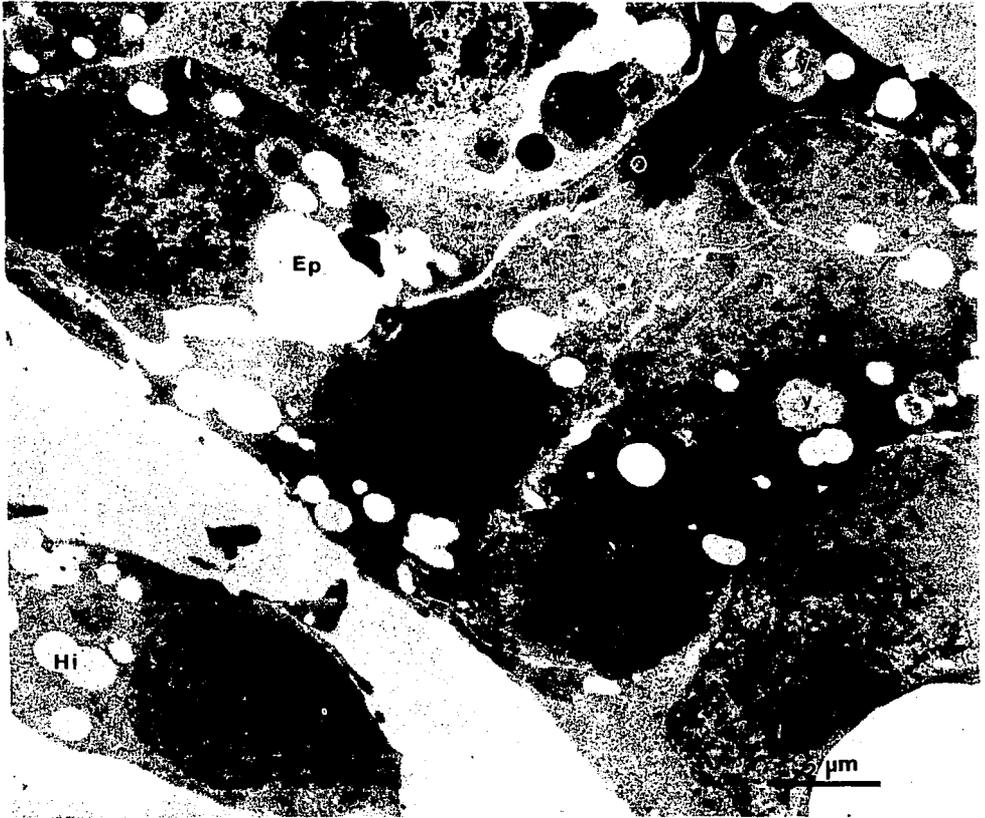


Ilustración.- Corte de embrión del estadio HH3 formado por dos capas: epiblasto e hipoblasto. El epiblasto (Ep) está formado por una capa de células cilíndricas altas con abundante citoplasma. El hipoblasto (Hi) es una capa plana de células polimórficas. Se observan núcleos (N) voluminosos y grandes núcleos (n). El citoplasma presenta abundantes ribosomas (r), mitocondrias (m) y gránulos de vitelo (y). Doble contraste con uranilo y plomo (10 000 X)

Figura 1. Aspecto del núcleo del epiblasto del embrión de ave de 13 h de incubación (HH3), en el que se reconoce el nucleolo (n) y la cromatina (c) perinucleolar, formando cuerpos definidos en el nucleoplasma en el que se observan numerosas estructuras fibrilares y granulares. Técnica de doble contraste con uranilo y plomo (46 250 X).

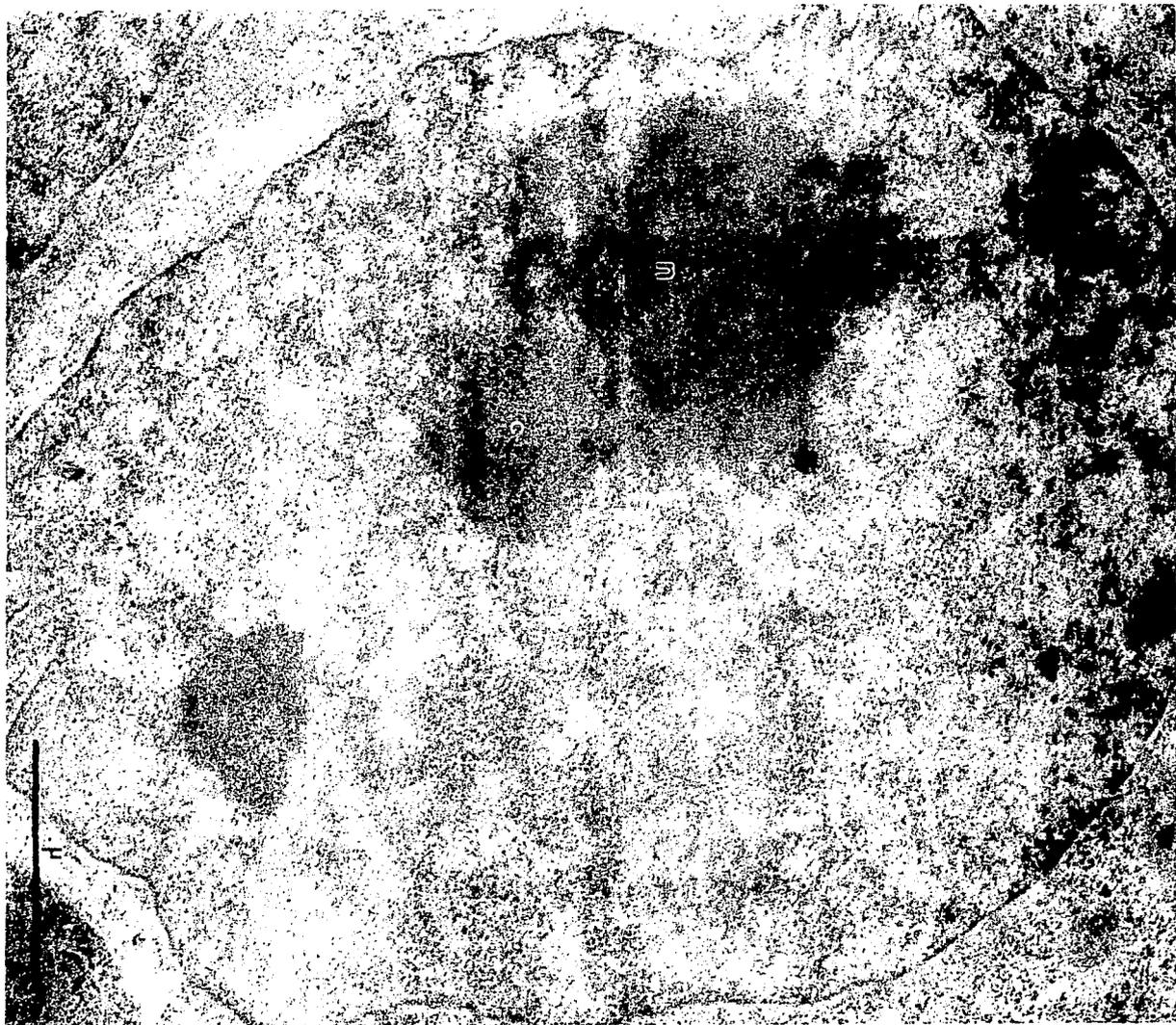


Figura 2. Micrografía del núcleo interfásico de epiblasto del estadio HH3 que presenta numerosas estructuras RNPs de forma fibrilar, irregularmente dispuestas en el nucleoplasma, en relación estrecha con los gránulos intercromatinianos (i). Los gránulos pericromatinianos (flechas) se localizan en contacto con delicados grumos de cromatina compacta (c) situados en la región intercromatiniana, adheridos a la la envoltura nuclear y cerca del nucleolo (n) que presenta aspecto nucleolonemal. Contraste con EDTA (46 250 X).

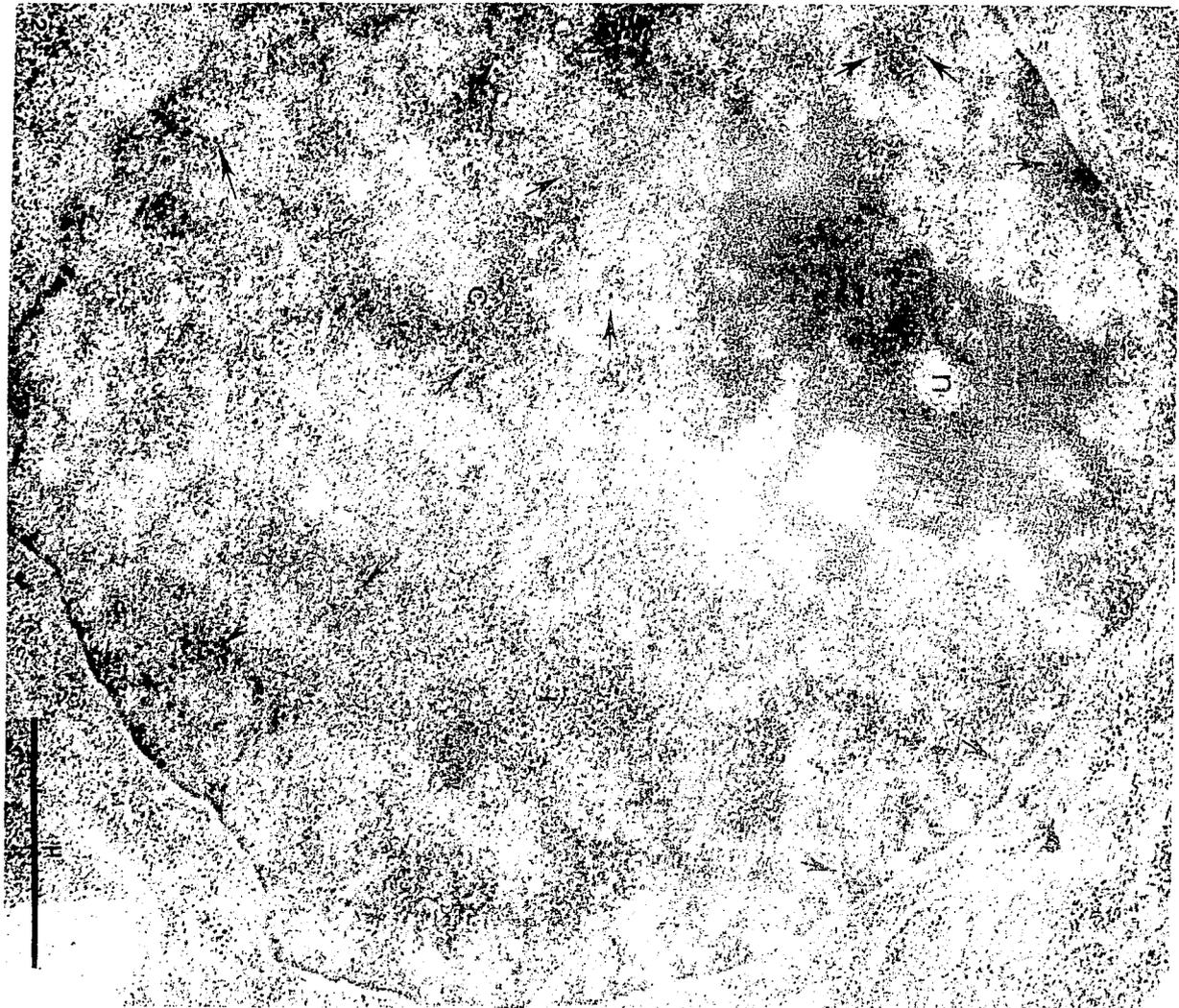


Figura 3.a, b, c. Distribución de la cromatina nuclear en embriones del estadio HH11. En los núcleos de ectodermo (3.a) y notocorda (3.b) de esta etapa, se reconocen pequeños agregados de cromatina compacta (c) y el componente cromatínico del interior y de la periferia del nucleolo (n) el cual presenta muy bajo contraste por la técnica empleada. En los núcleos de endodermo (3.c) predomina la cromatina de configuración laxa y se reconocen algunos elementos de la cromatina perinucleolar. Muestras procesadas en GMA. Contraste PTA. Fig 3.a (10 000 X). Fig. 3.b (31 250 X). Fig 3.c (16 000 X).

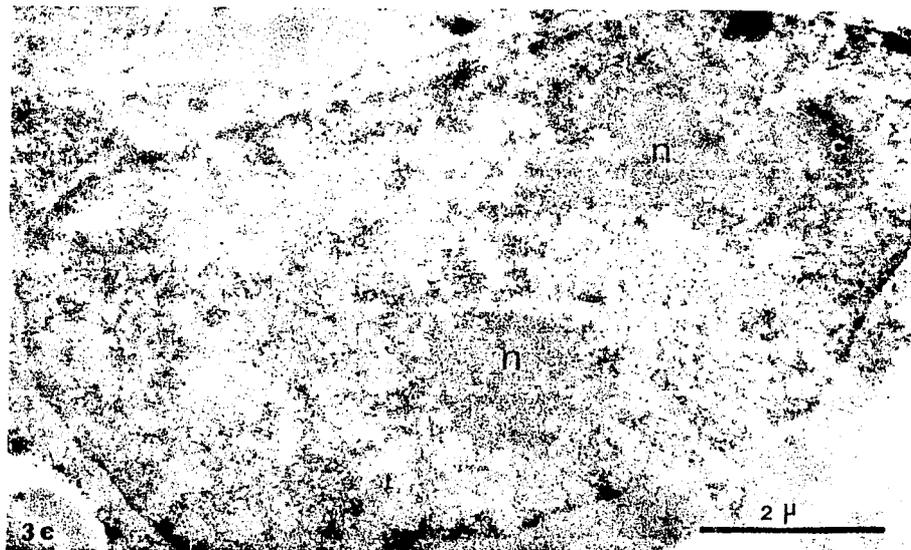
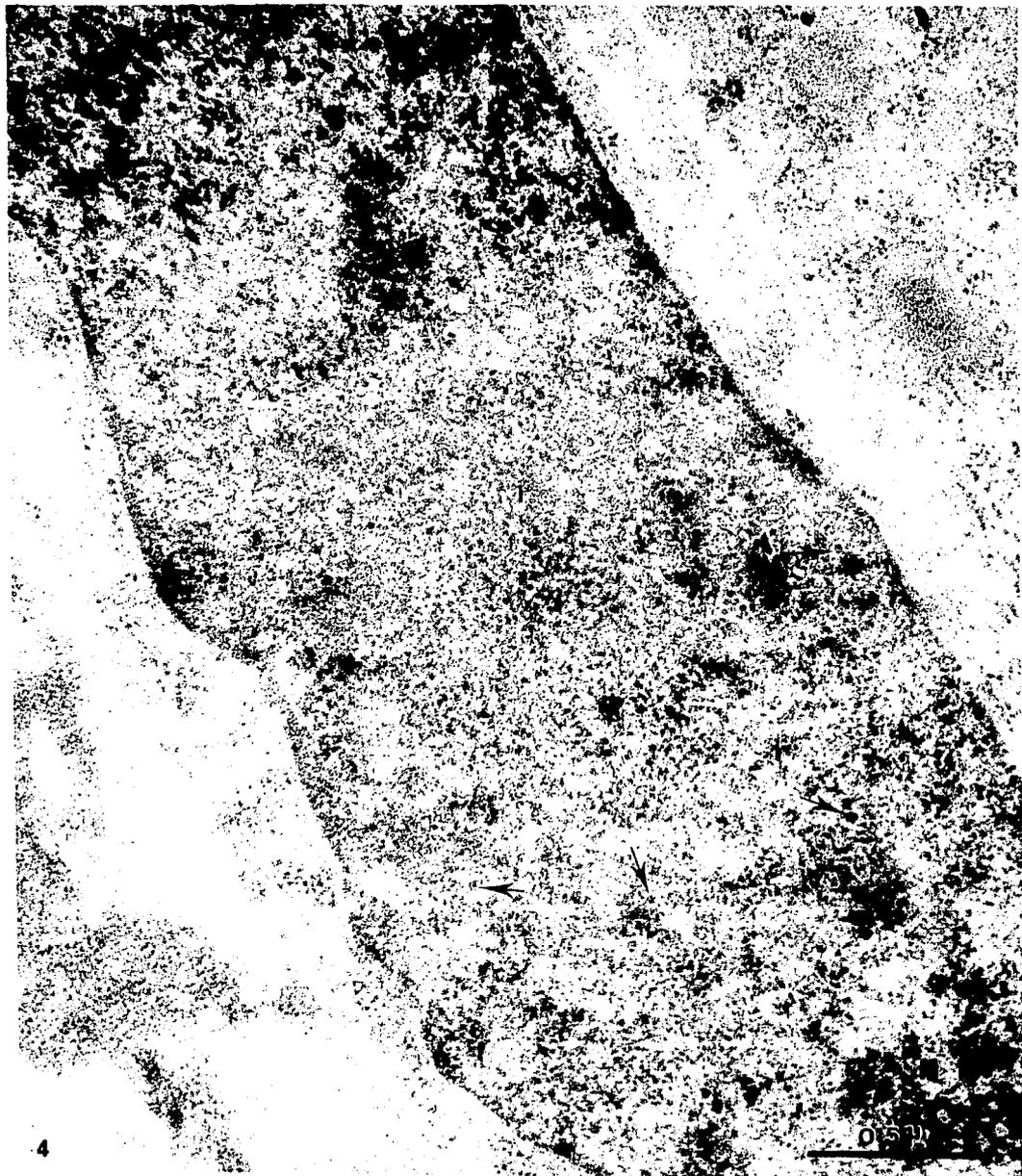


Figura 4. Detalle de núcleo de célula del ectodermo obtenido de embrión del estadio HH11, que presenta abundantes estructuras RNPs irregularmente dispuestas, formas fibrilares mezcladas con GIC (i), algunos GPC (flechas) y el nucleolo (n). Contraste con EDTA (66 250 X).

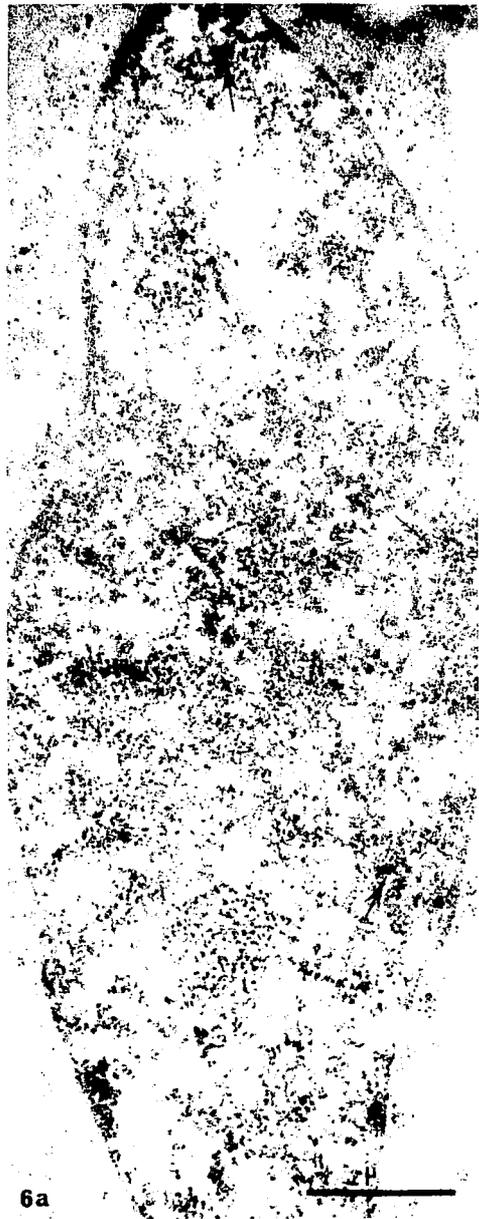


ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 5.a, b. Aspecto del núcleo interfásico en células del ectodermo del estadio HH21. **5.a.** Las RNPs son abundantes y se reconocen fibrillas, GICs (i), algunos GPCs (flechas) y las estructuras fibrilares y granulares del nucleolo (n). En la fase externa de los poros (p) se aprecia material con afinidad a la técnica de contraste del EDTA (50,000 X). **5.b.** Doble contraste (26 000 X).



Figura 6.a,b. Aspecto del núcleo interfásico en células diferenciadas de la piel en etapas avanzadas del desarrollo. En ambas figuras se aprecia la distribución de las RNPs, en forma de fibrillas, de GICs (i) y GPCs (flechas). **6.a** Corte de núcleo de célula localizada en la parte más alta de la capa intermedia de la piel de pollito del estadio HH41. La técnica del EDTA revela la presencia de numerosos ribosomas, algunas estructuras granulares semejantes a los GPCs y algunas microfibrillas en el citoplasma (26 000 X). **6.b.** Corte de núcleo de célula del estrato superficial del estadio HH43 con numerosos ribosomas y diferentes estructuras granulares. Doble contraste (39 600 X).



6a



6b

Figura 7. Núcleo interfásico aplanado de las células del estrato de transición de la piel del pollito recién nacido. El contorno de la envoltura nuclear está delineado por el perfil de bajo contraste del componente cromatínico (c). En el espacio intercromatiniano se distribuyen las fibrillas RNPs y pequeños cúmulos de GICs (i), mientras que los GPCs (flechas) se localizan en los bordes del componente cromatínico. Contraste de EDTA (42 500 X).

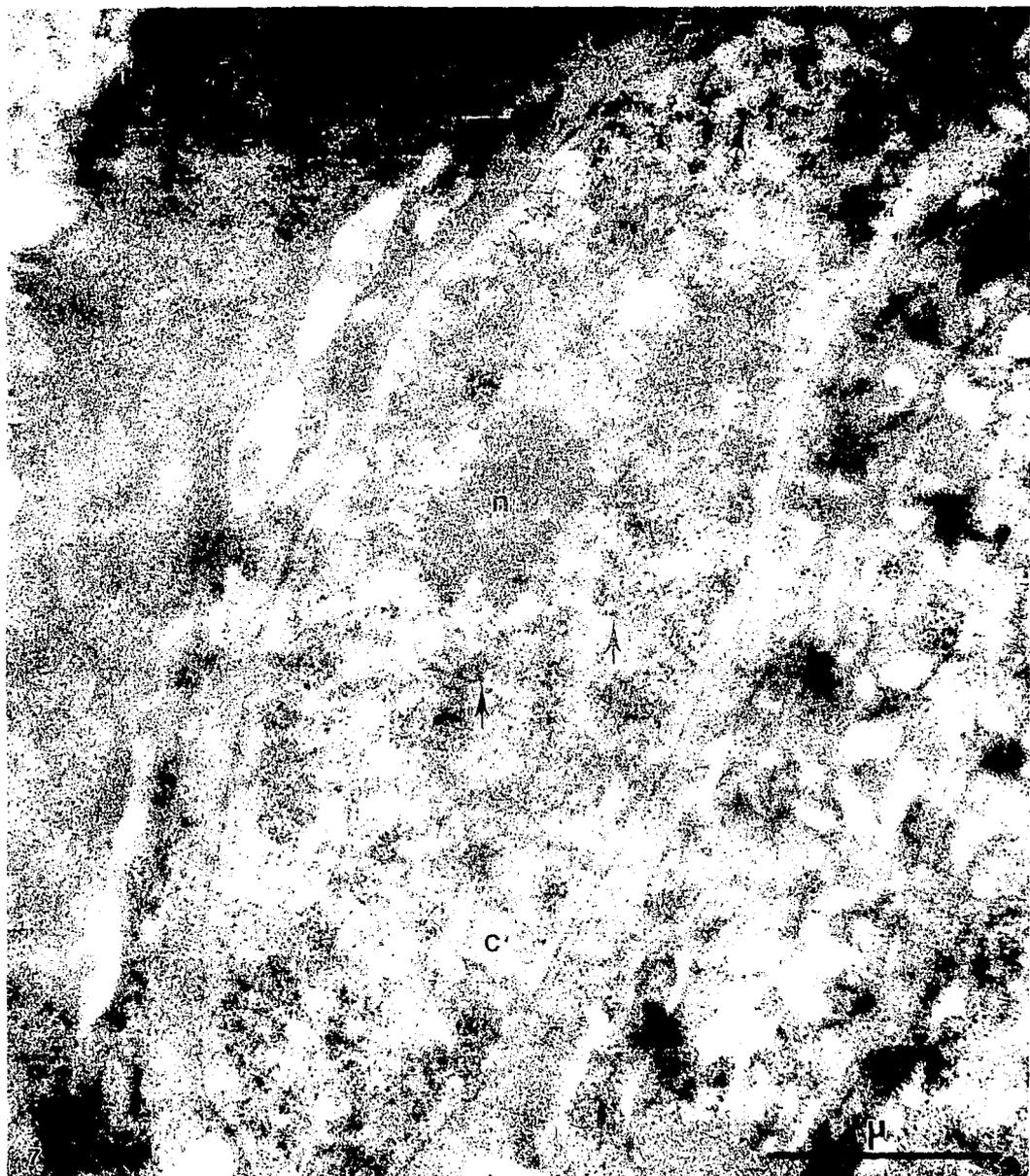


Figura 8.a,b. Núcleos de las células de piel de pollo recién nacido. Técnica de PTA pH 2.5. **8.a** Imagen que muestra pequeños cúmulos del componente cromatínico (c) dispuestos periféricamente, en contacto con la envoltura en los núcleos de las células de la capa intermedia de la epidermis (35 500X). **8.b.** La cromatina de células de la capa escamosa superficial, se dispone en grumos que ocupan gran parte de los núcleos y reducen el espacio intercromatiniano (45 000 X).



Figura 9.a Aspecto de las células de la capa epidérmica en el estadio H41, a los 13 días de incubación. El desprendimiento de la epidermis primitiva (epitrichium), no afecta la disposición de las capas internas. Las células de la capa basal (B) están separadas de la dermis (D) por la lámina basal (LB), la siguiente está formada por células poliédricas que definen una capa intermedia (M) y se pueden presentar células aplanadas de la capa epidérmica de transición (T). Doble contraste (13 000 X). **9.b** Imagen en que se reconocen los estratos que forman la piel de la región del cuello del pollito recién nacido. En la dermis (D) se aprecian numerosos elementos que corresponden a fibras de colágeno (flecha) y en la porción epidérmica se reconocen cuatro capas, la basal (B) formada por células cuboidales, la granular (G) de células poliédricas, las células y núcleos aplanados de las capas de transición (T) y de descamación (E), entre las cuales se reconocen uniones reforzadas (flechita blanca). Las diferencias entre los núcleos (N) y nucleolos (n) de cada tipo celular son evidentes. Las fibras de colágena (flecha) y las células de la dermis están separadas de las células de la epidermis, por una lámina basal (LB). Doble contraste (7 750X).

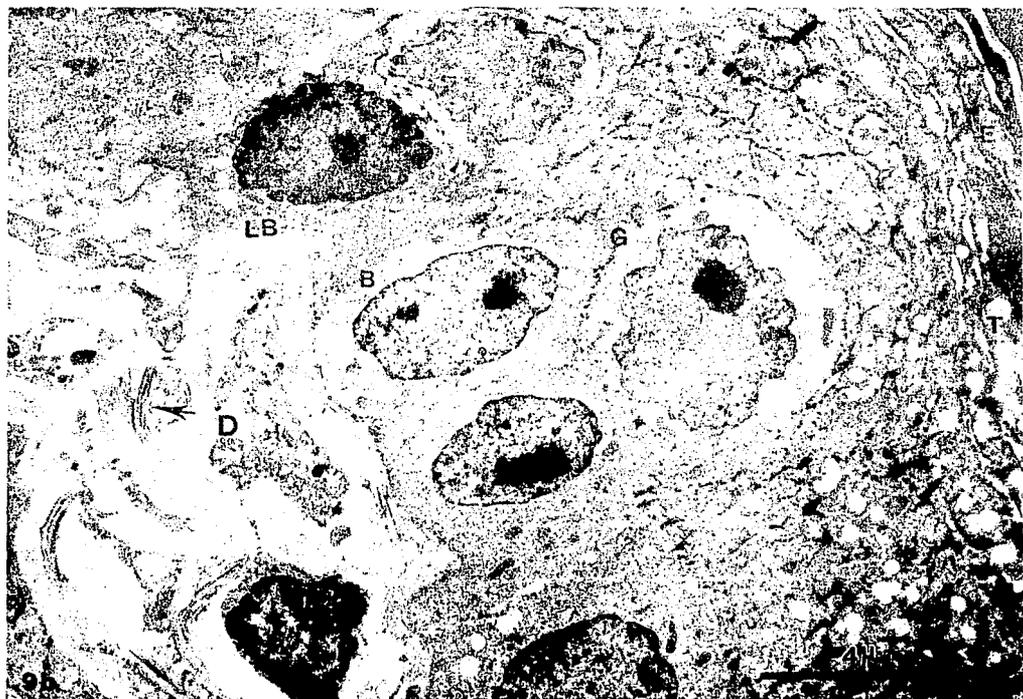
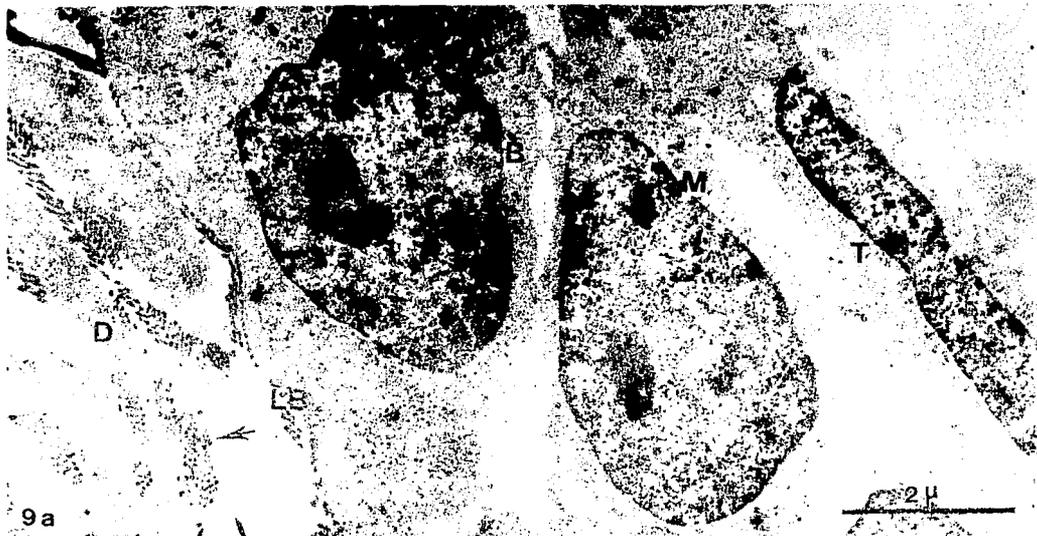


Figura 10.a Corte transversal de embrión de 30 h de incubación en que se aprecia el aspecto de la notocorda (N) del estadio HH9, localizada en posición central entre el tubo neural (TN), la capa de endodermo (En) y los somitas (S). Tinción de azul de toluidina. Contraste fases (1 600 X). **10.b** Corte longitudinal de la notocorda (N) del estadio HH16 en que se aprecia el apilamiento de las células y la orientación de los núcleos hacia el exterior de la estructura y la abundancia de vacuolas (v) que ocupan principalmente la región central. La cubierta perinotocordal es incipiente (flecha). Tinción de azul de toluidina. Contraste de fases (3 250X). **10.c** Corte transversal de embrión de 10 días de incubación (HH36). El citoplasma de las células del centro y de la periferia de la notocorda (N) forma una red por la presencia de numerosas vacuolas. Los núcleos (flechita) se aprecian inmersos en la red de citoplasma marcadamente vacuolizado. La notocorda se encuentra en un punto definido del cuerpo vertebral (CV) en formación. Tinción de azul de toluidina. Campo claro (800 X).

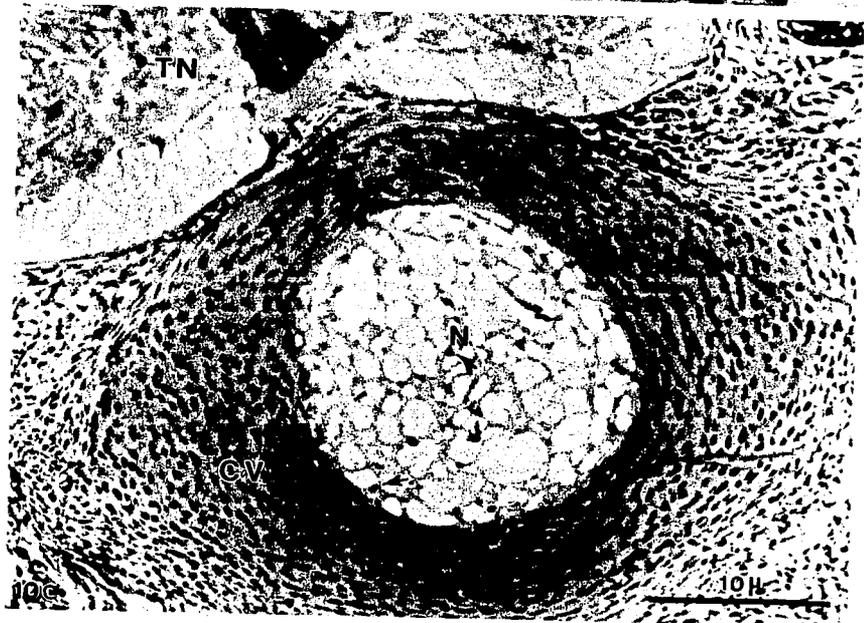


Figura 11. Distribución de RNPs de células de notocorda en el estadio HH9. Los GPCs (flechas) son numerosos, se localizan en la periferia cerca de la envoltura nuclear y dispersos entre el componente fibrilar y los GICs (i) que forman algunos cúmulos. La cromatina (c) se reconoce por el bajo contraste, dispuesta en la periferia del nucleolo (n) de gran tamaño fuertemente contrastado. EDTA (55 000 X).

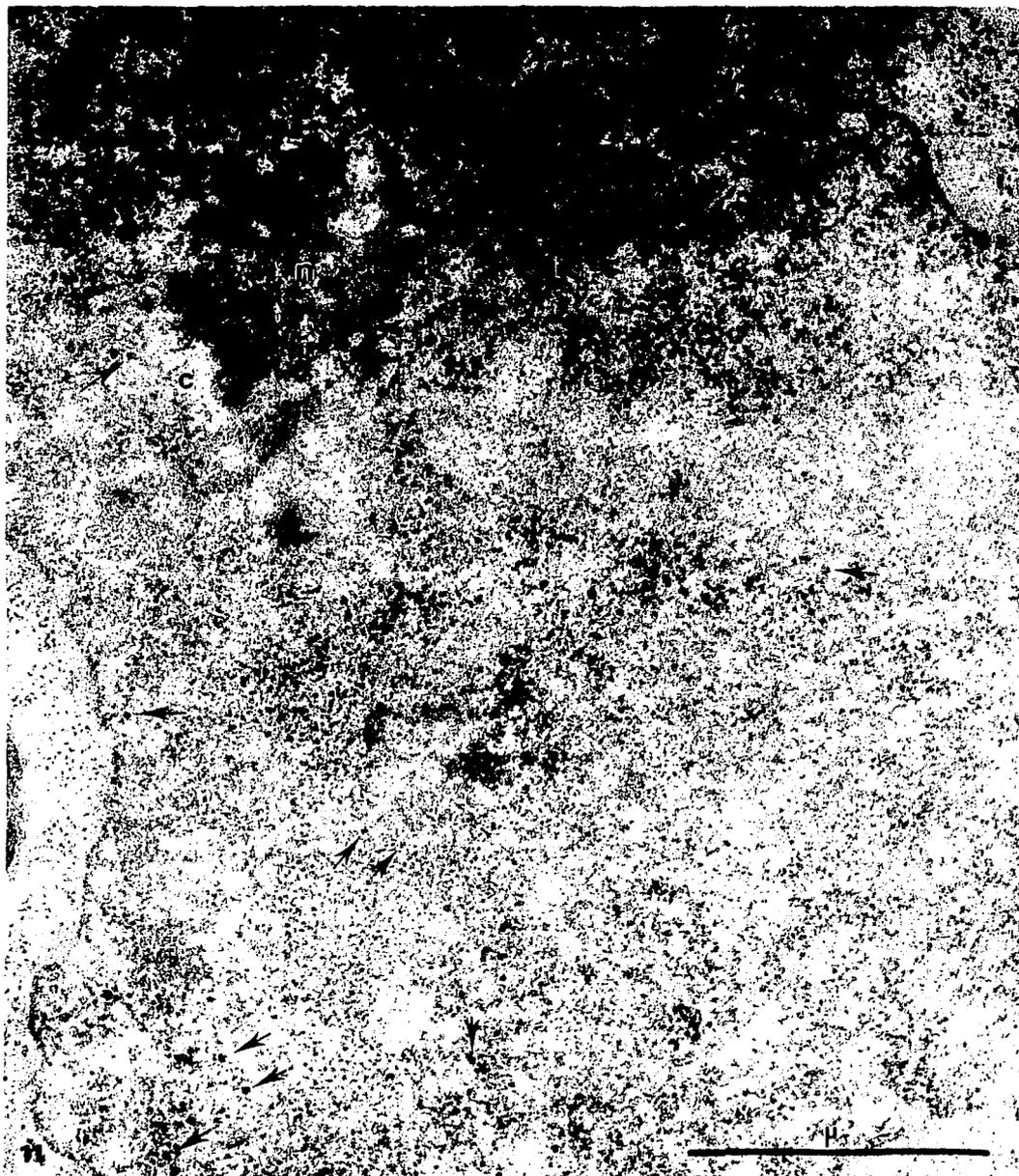


Figura 12. Micrografía del núcleo interfásico de notocorda en el estadio HH11. Las RNPs son abundantes, los GPCs (flechas) se localizan entre el entramado de fibrillas y cerca de pequeños grumos de cromatina (c) poco contrastada asociada al nucleolo (n). Los GICs (i) forman cúmulos bien definidos. Contraste con EDTA (37 500 X).



Figura 13. La micrografía muestra las características del núcleo de la notocorda en el estadio HH21. En general las fibrillas RNPs son abundantes, los GPCs se encuentran dispersos en el nucleoplasma y alrededor del nucleolo (n), los GICs (i) forman cúmulos. Contraste con EDTA (57·500 X).

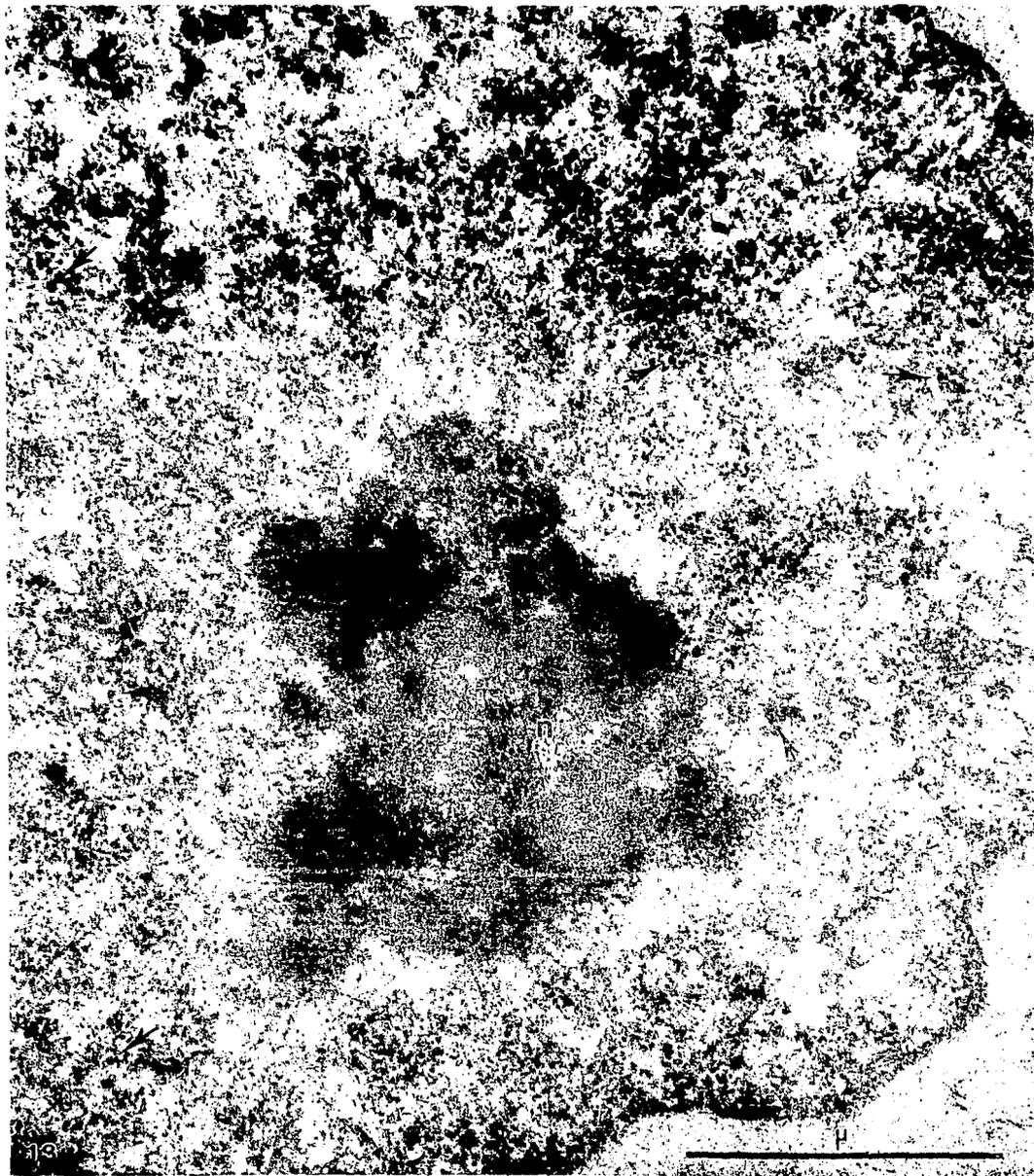


Figura 14. Aspecto de dos núcleos de células localizadas en el centro de la notocorda en el estadio HH32. En el núcleo A, las estructuras RNPs granulares y fibrilares se encuentran dispersas en el nucleoplasma, los GICs (i) se mantienen formando cúmulos, algunos GPCs (flechas) se encuentran en los bordes de la cromatina compacta (c) de bajo contraste localizada en la periferia y en contacto con el nucleolo (n). En el núcleo B, un cuerpo esférico de cromatina en posición central y cromatina compacta (c) en contacto con la envoltura nuclear, los GPCs (flechas) se disponen en la periferia, en contacto con los GICs (i) y con fibrillas dispersas. Las RNPs nucleares muestran desplazamiento en sitios localizados (triángulo negro). EDTA (40 000 X).

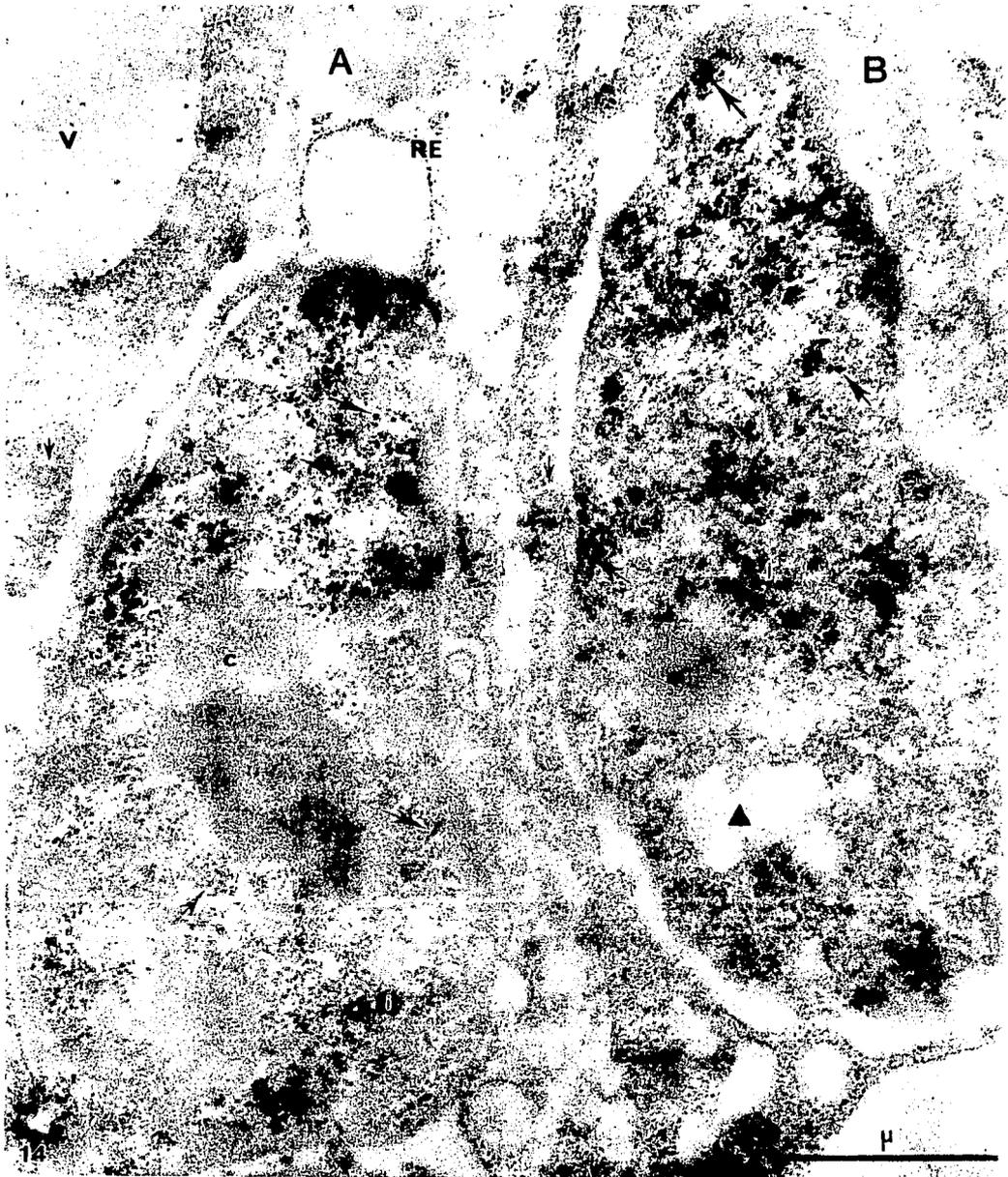


Figura 15. Núcleo de célula periférica de la notocorda del estadio HH36. Las fibrillas RNPs son numerosas y se disponen en forma dispersa o asociadas con otras RNPs. Los GICs (i) conservan su organización en cúmulos. Los GPCs (flechas) se reconocen cerca de la envoltura nuclear y en los bordes de grumos de cromatina (c) de bajo contraste y cerca de los GICs. Contraste con EDTA (60 000 X).

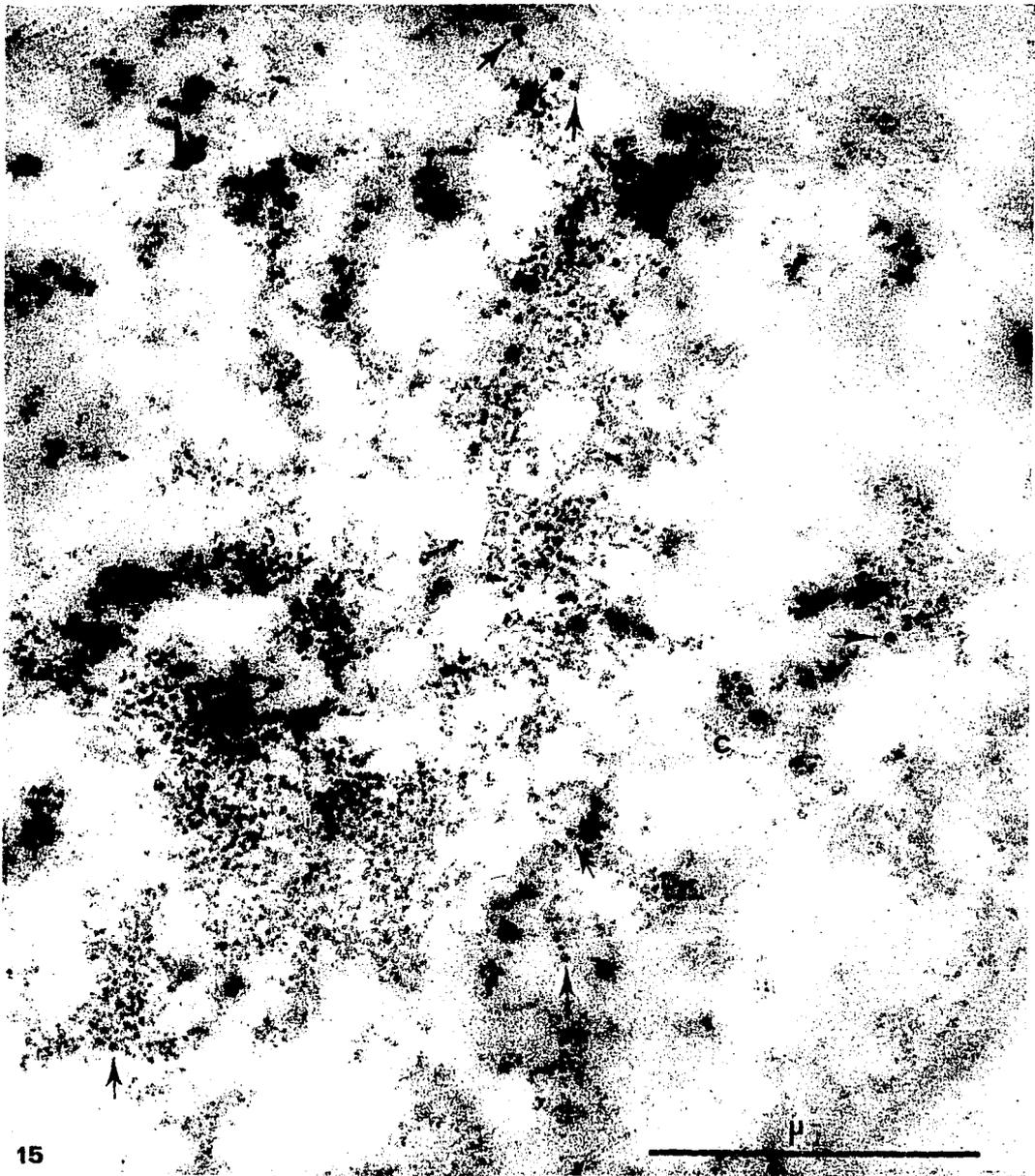


Figura 16. Corte transversal de la notocorda de embrión de pollo del estadio HH11. Las células presentan núcleos (N) orientados hacia la periferia, nucleolos (n) grandes y gran densidad de otras RNPs. En el citoplasma se observan ribosomas (r), fracciones de retículo endoplásmico (RE) y centriolos organizados. Entre las membranas se forman algunos puntos de unión complejos (punta de flecha), se aprecian algunos espacios intercelulares característicos de la etapa de integración del bastón notocordal y las primeras fibrillas de la cubierta perinotocordal externa. Doble contraste (15 750 X).

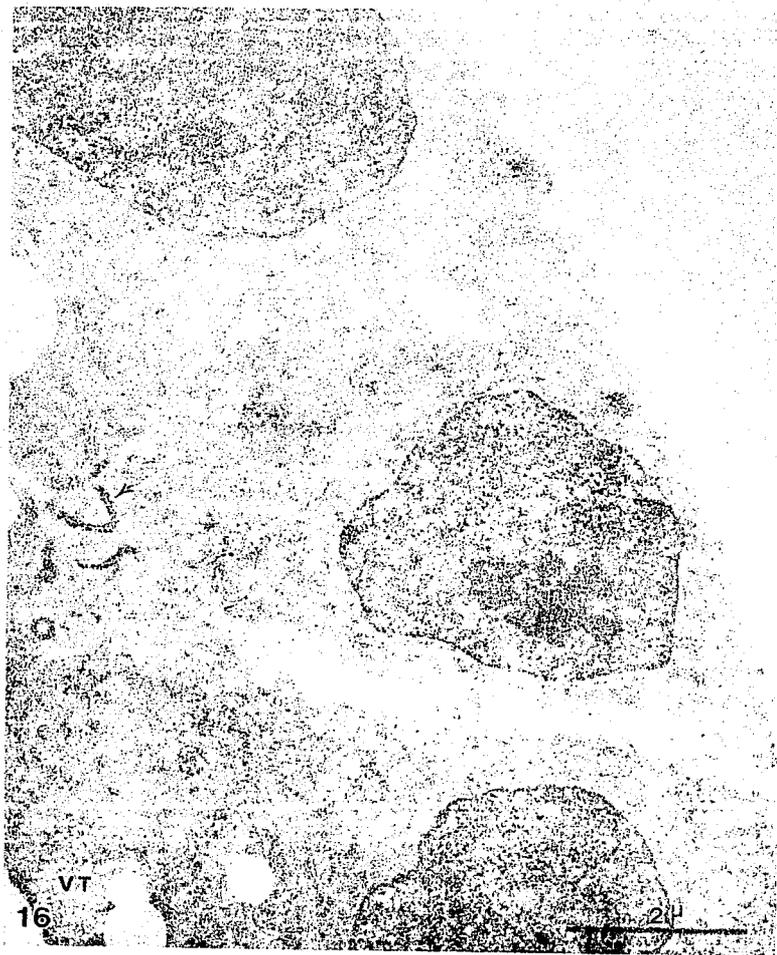


Figura 17. Imagen del citoplasma de las células notocordales del estadio HH16, que presentan abundantes ribosomas (r) y otras estructuras bien diferenciadas, cisternas del Golgi (G), mitocondrias (m), vacuolas (v), centriolos localizados en la periferia de la célula, interdigitaciones de membrana (>>>>), puntos de unión complejos (puntas de flechas) y algunos fragmentos del retículo (RE) que presentan dilatación (R). Doble contraste (50 000 X).

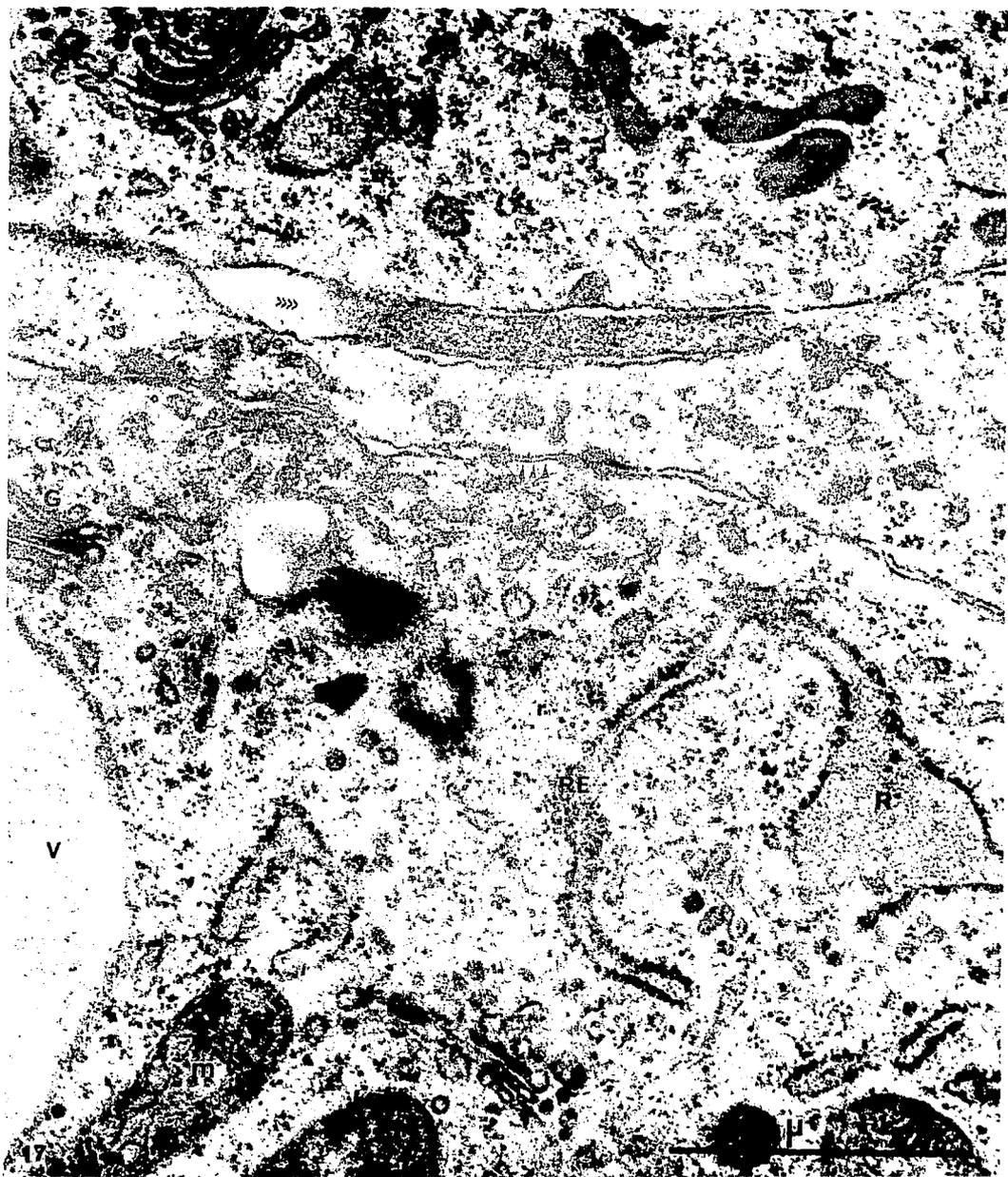


Figura 18. Aspecto de la organización del citoplasma de las células notocordales periféricas del estadio HH30 que conservan fragmentos del retículo (RE) y mitocondrias (m). Las vacuolas (v) son numerosas y de mayor volumen por la depositación activa de material exportado por vesículas (flechitas), además, están interconectadas y desembocan a los espacios intercelulares (EIC). El citoplasma filamentososo se mantiene unido entre las vesículas por fuertes uniones (puntas de flecha). Doble contraste (18 400 X).

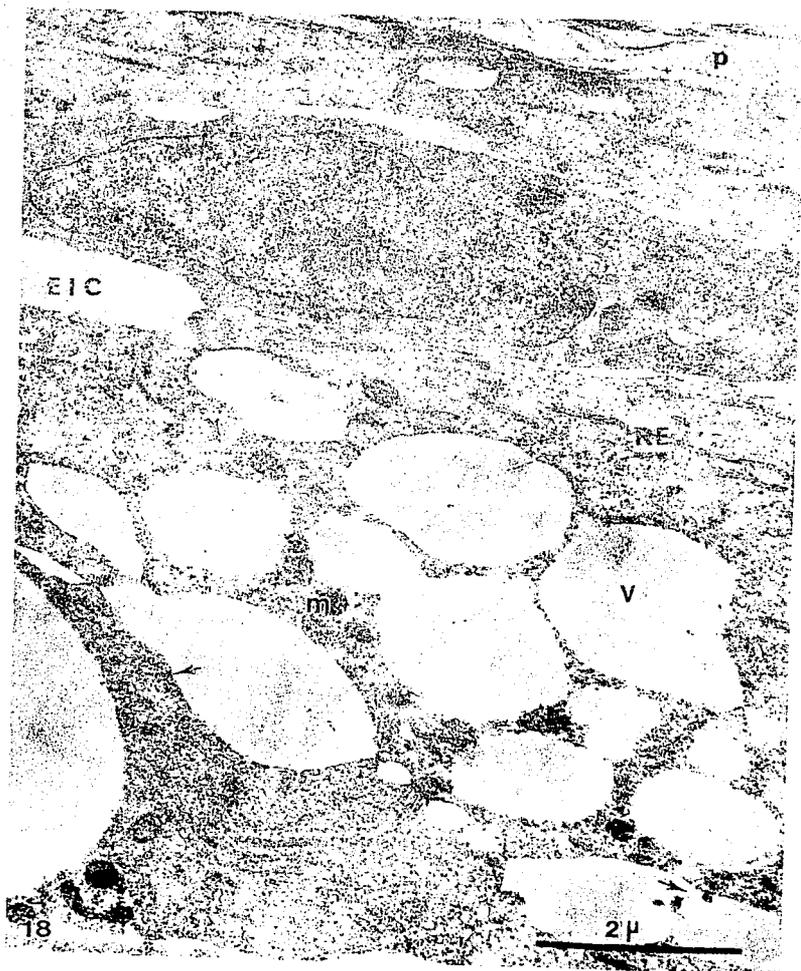


Figura 19. Núcleo del endodermo en el estadio HH16. El nucleolo (n) se encuentra rodeado principalmente de estructuras RNPs . Las fibrillas y los GICs (i) son abundantes, los GPCs (flechas) se localizan dispersos en el nucleoplasma y la cromatina compacta es escasa. En el citoplasma se reconocen principalmente mitocondrias (m), numerosos ribosomas (r), numerosas estructuras granulares (flechitas blancas) y paquetes filamentosos (*) en la proximidad del núcleo. Técnica de EDTA (37 500 X).

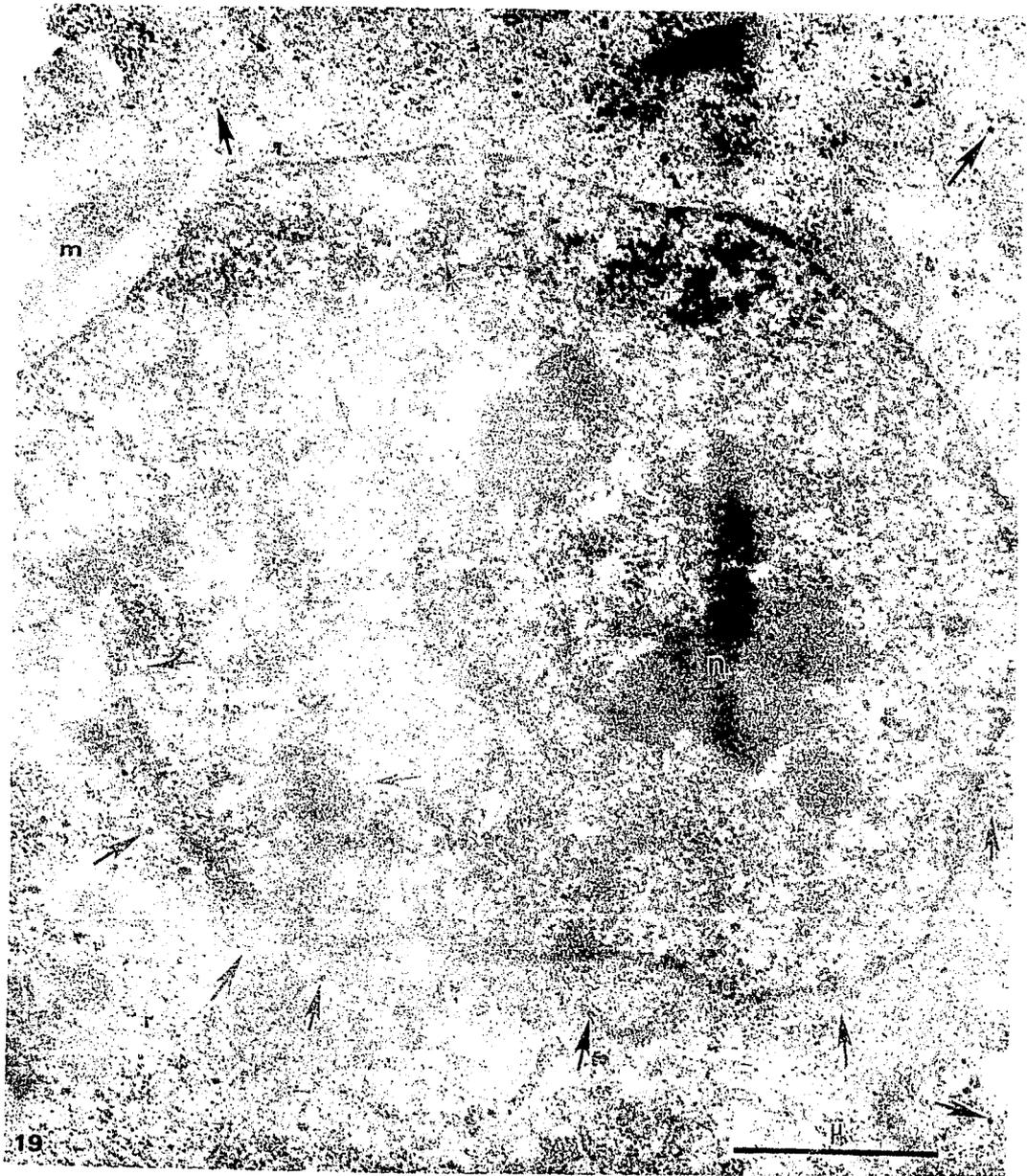


Figura 20. Imagen del núcleo de intestino de embrión de pollo del estadio HH41, que muestra nucleolo (n) de aspecto nucleolonemal, abundantes RNP nucleares de forma fibrilar , GICs (i) y numerosos GPCs (flechas) en la periferia de la cromatina compacta (c) de bajo contraste. Técnica del EDTA (45 000 X).

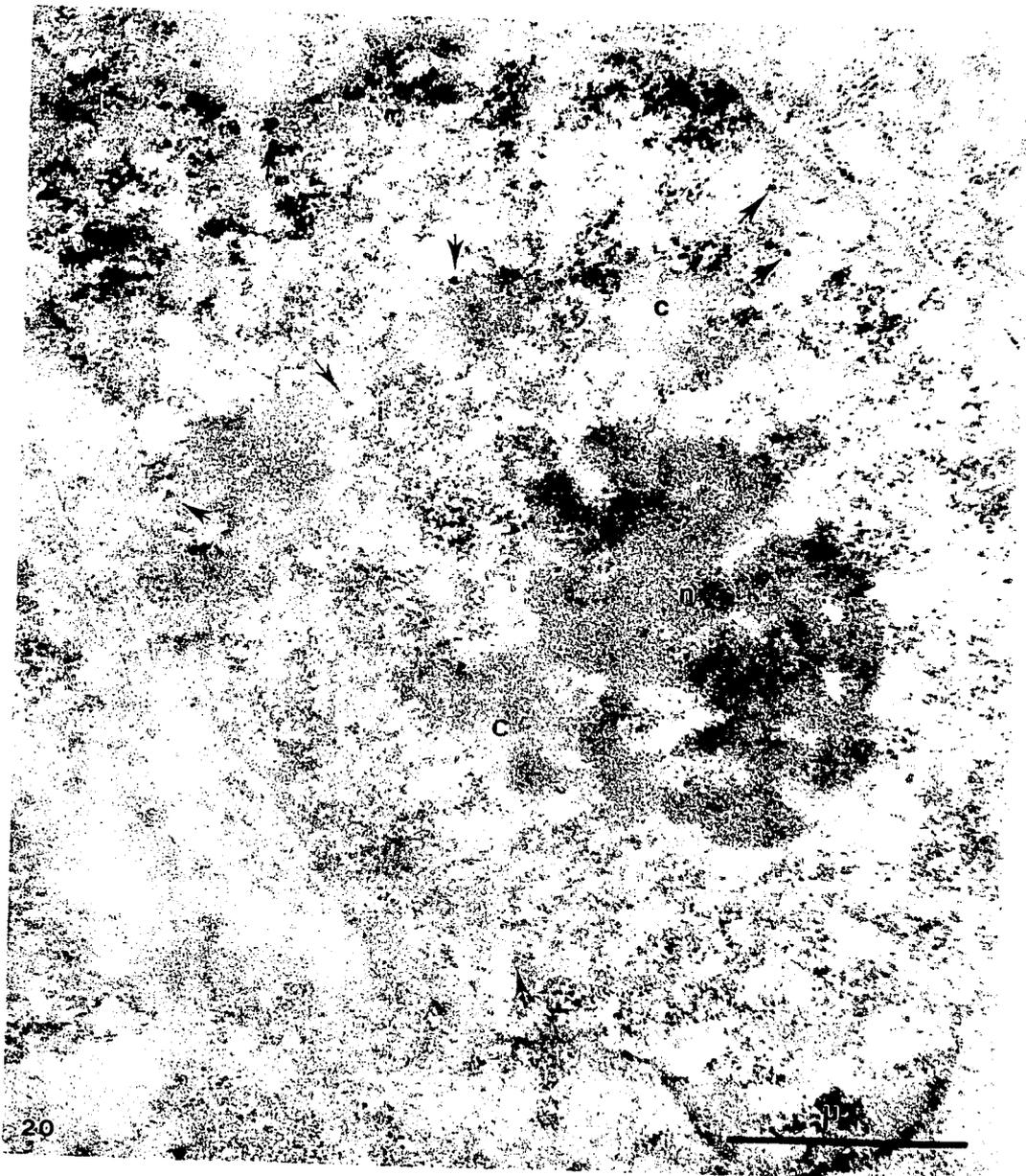


Figura 21. Núcleo de célula intestinal de pollo recién nacido. El componente fibrilar es abundante, los GICs (i) forman cúmulos y los GPCs (flechas) abundan en los bordes de la cromatina compacta (c) dispuesta en la periferia y alrededor del núcleo. Se presentan varias estructuras cilíndricas de material denso (1). Técnica de contraste del EDTA (56 000X).

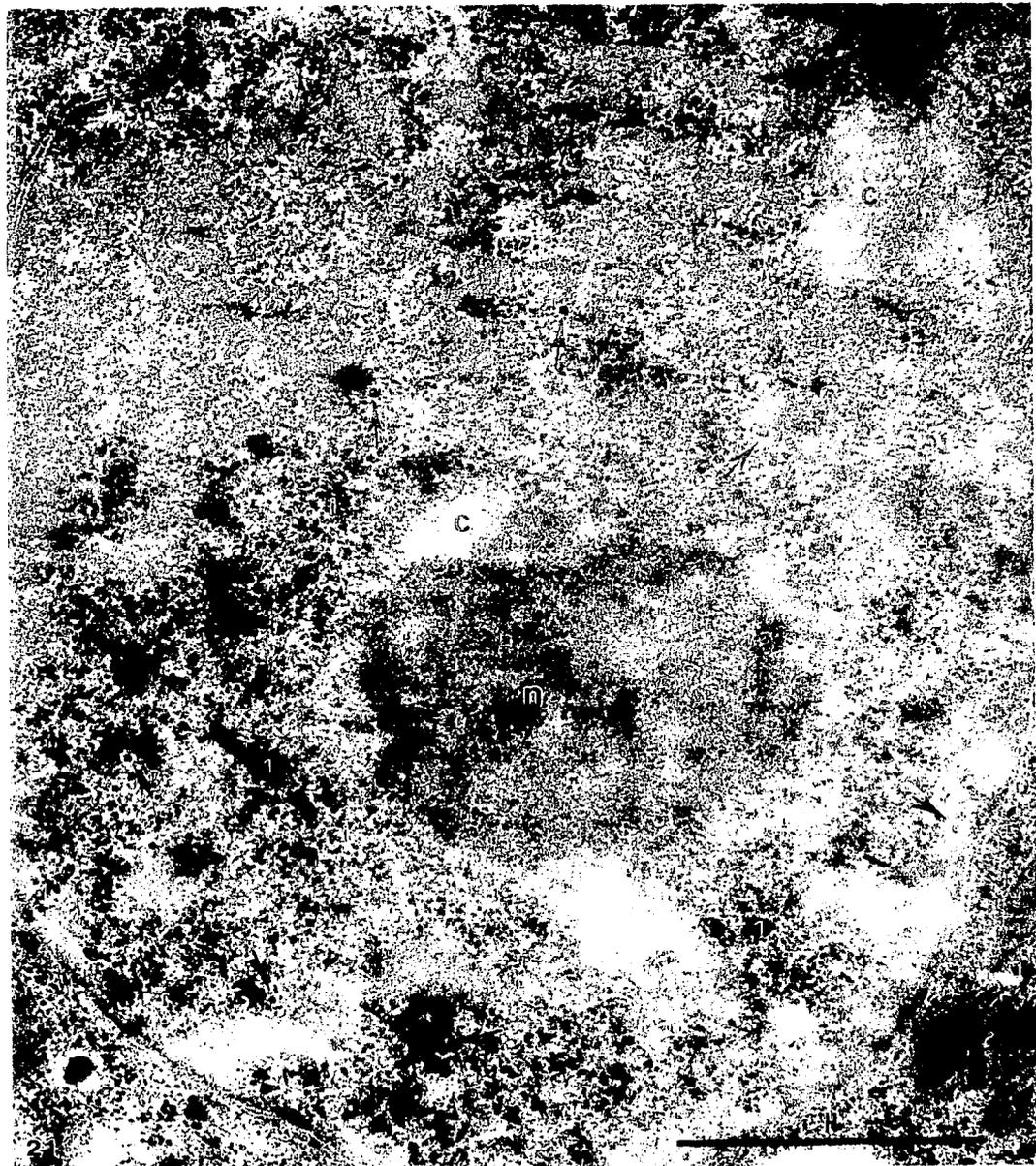


Figura 22. Región de la mucosa intestinal en que se aprecia la estructura (LB) que separa al epitelio intestinal del tejido conjuntivo (TC). En las células epiteliales se aprecia la distribución de los grumos de cromatina compacta (c) en contacto con la envoltura nuclear y alrededor del nucleolo (n). La superficie del villus (V) se reconoce claramente por la técnica de contraste. PTA (32 000 X).



APENDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Variaciones en el volumen nuclear de las células del ectodermo durante la diferenciación.

Tabla 2. Variaciones en el volumen nuclear de las células de la notocorda durante la diferenciación.

Tabla 3. Variaciones en el volumen nuclear de las células del endodermo durante la diferenciación.

Tabla 4. Variaciones en el volumen nucleolar de las células del ectodermo durante la diferenciación.

Tabla 5. Variaciones en el volumen nucleolar de las células de la notocorda durante la diferenciación

Tabla 6. Variaciones en el volumen nucleolar de las células del endodermo durante la diferenciación

Tabla 7. Variaciones en la frecuencia de GPCs nucleares durante la diferenciación de las células del ectodermo.

Tabla 8. Variaciones en la frecuencia de GPCs nucleares durante la diferenciación de las células de la notocorda.

Tabla 9. Variaciones en la frecuencia de GPCs nucleares durante la diferenciación de las células del endodermo.

TABLA 1.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEAR DEL ECTODERMO Y PIEL (μm^3).

HH 3	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH41	RN
66.0 \pm 18	58.0 \pm 22	47.0 \pm 17	38.0 \pm 10	28.8 \pm 12.4	19.3 \pm 5.4	34.0 \pm 12	17.3 \pm 5

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEAR EN ECTODERMO Y PIEL.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 41	RN
HH 3	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001				
HH 9		P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
HH 11			P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.001
HH 16				P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P < 0.001
HH 21					P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30						P > 0.05	P > 0.05
HH 41							P > 0.05

TABLA 2.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEAR DE LA NOTOCORDA (μm^3).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
30.0 \pm 11.7	35.8 \pm 9.3	37.8 \pm 9.1	25.9 \pm 8.3	30.9 \pm 11	36.2 \pm 11.1	33.0 \pm 10.1

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEAR EN NOTOCORDA.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
HH 3	P < 0.001						
HH 9		P > 0.05					
HH 11			P > 0.05				
HH 16				P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 21					P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30						P > 0.05	P > 0.05
HH 32							P > 0.05

TABLA 3.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEAR DEL ENDODERMO Y DEL INTESTINO (μm^3).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 30	HH 41	RN
22.6 \pm 4.65	22.3 \pm 4.4	33.2 \pm 9.2	37.6 \pm 8.3	24.3 \pm 5.1	18.4 \pm 7.1

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEAR EN ENDODERMO / INTESTINO.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 30	HH 41	RN
HH 3	P < 0.001					
HH 9		P > 0.05	P < 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
HH 11			P < 0.05	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05
HH 16				P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001
HH 30					P < 0.01	P < 0.001
HH 41						P > 0.05

* Los valores indican la media \pm la desviación estandar de cada estadio (N= 20)

TABLA 4.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR DEL ECTODERMO Y PIEL (μm^3).

HH 3	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH41	RN
3.50 \pm 1.60	5.80 \pm 3.50	3.50 \pm 0.60	2.40 \pm 0.70	1.90 \pm 0.50	1.40 \pm 0.40	0.80 \pm 0.27	0.60 \pm 0.24

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR EN ECTODERMO Y PIEL.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 41	RN
HH 3	P < 0.001	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001
HH 9		P < 0.001					
HH 11			P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001
HH 16				P > 0.05	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01
HH 21					P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30						P > 0.05	P > 0.05
HH 41							P > 0.05

TABLA 5.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR DE LA NOTOCORDA (μm^3).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
2.18 \pm 0.90	2.11 \pm 0.66	2.23 \pm 0.47	1.22 \pm 0.64	0.62 \pm 0.14	0.76 \pm 0.39	1.22 \pm 0.26

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR EN NOTOCORDA.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
HH 3	P < 0.001						
HH 9		P > 0.05	P > 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
HH 11			P > 0.05	P < 0.05	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05
HH 16				P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01
HH 21					P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30						P > 0.05	P > 0.05
HH 32							P > 0.05

TABLA 6.- VALORES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR DEL ENDODERMO Y DEL INTESTINO (μm^3).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 30	HH 41	RN
1.49 \pm 0.63	2.06 \pm 0.76	1.55 \pm 0.62	0.89 \pm 0.44	1.77 \pm 0.50	1.87 \pm 0.44

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN NUCLEOLAR EN ENDODERMO/INTESTINO.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 30	HH 41	RN
HH 3	P < 0.001					
HH 9		P > 0.05	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 11			P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05	P > 0.05
HH 16				P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30					P < 0.05	P < 0.01
HH 41						P > 0.05

* Los valores indican la media \pm la desviación estandar de cada estadío (N= 20)

TABLA 7.- FRECUENCIA DE GPC DEL ECTODERMO Y PIEL (GPC/ μm^2).

HH 3	HH 11	HH 16	HH 21	HH 41	RN
0.76 \pm 0.37	0.67 \pm 0.23	0.44 \pm 0.11	0.49 \pm 0.05	0.81 \pm 0.056	1.07 \pm 0.35

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DE GPC EN ECTODERMO Y PIEL.

	HH 11	HH 16	HH 21	HH 41	RN
HH 3	P > 0.05	P < 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 11		P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 16			P > 0.05	P < 0.05	P < 0.001
HH 21				P > 0.05	P < 0.001
HH 41					P > 0.05

TABLA 8.- FRECUENCIA DE GPC DE NOTOCORDA (GPC/ μm^2).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 19	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
1.14 \pm 0.40	0.46 \pm 0.16	0.44 \pm 0.18	0.30 \pm 0.11	0.27 \pm 0.09	0.26 \pm 0.15	0.40 \pm 0.15	0.26 \pm 0.06

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DE GPC EN NOTOCORDA.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 19	HH 21	HH 30	HH 32	HH 36
HH 3	P < 0.001	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001				
HH 9		P < 0.001						
HH 11			P > 0.05					
HH 16				P > 0.05				
HH 19					P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 21						P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HH 30							P > 0.05	P > 0.05
HH 32								P > 0.05

TABLA 9.- FRECUENCIA DE GPC DEL ENDODERMO Y DEL INTESTINO (GPC/ μm^2).

HH 9	HH 11	HH 16	HH 30	HH 41	RN
1.20 \pm 0.4	1.20 \pm 0.40	2.11 \pm 0.3	2.30 \pm 0.11	2.60 \pm 0.6	6.45 \pm 1.5

ANALISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LAS VARIACIONES DE GPC EN ENDODERMO / INTESTINO.

	HH 9	HH 11	HH 16	HH 21	HH 41	RN
HH 3	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
HH 9		P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
HH 11			P > 0.01	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001
HH 16				P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001
HH 30					P > 0.05	P < 0.001
HH 41						P < 0.001

* Los valores indican la media \pm la desviación estandar de cada estado (N= 20)

APENDICE DE GRAFICAS.

Gráfica 1. Volumen nuclear de las células del ectodermo y de la piel durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 2. Volumen nucleolar de las células del ectodermo y de la piel durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 3. Frecuencia de GPCs (N) en los núcleos de células del ectodermo y de la piel durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en $\text{N}/\mu\text{m}^2$. Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 4. Volumen nuclear de las células de la notocorda durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 5. Volumen nucleolar de las células de la notocorda durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

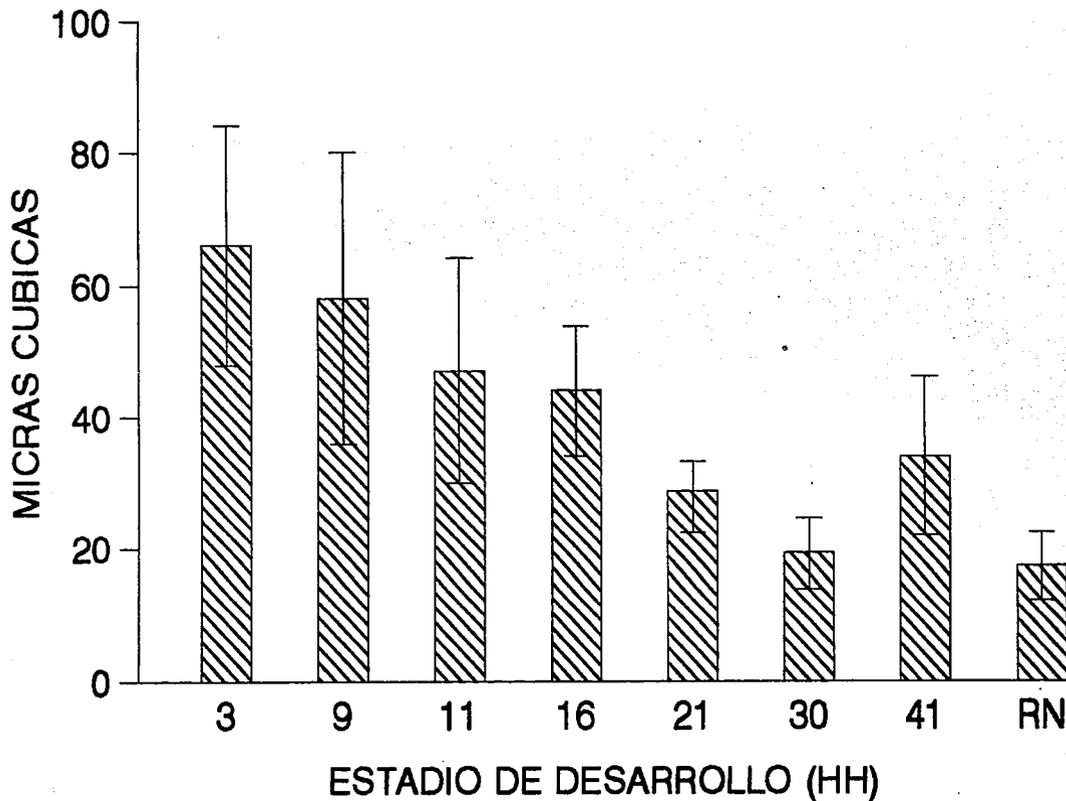
Gráfica 6. Frecuencia de GPCs (N) en los núcleos de las células de la notocorda durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en $\text{N}/\mu\text{m}^2$. Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 7. Volumen nuclear de las células del endodermo y del epitelio intestinal durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

Gráfica 8. Volumen nucleolar de las células del endodermo y del epitelio intestinal durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en μm^3 . Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

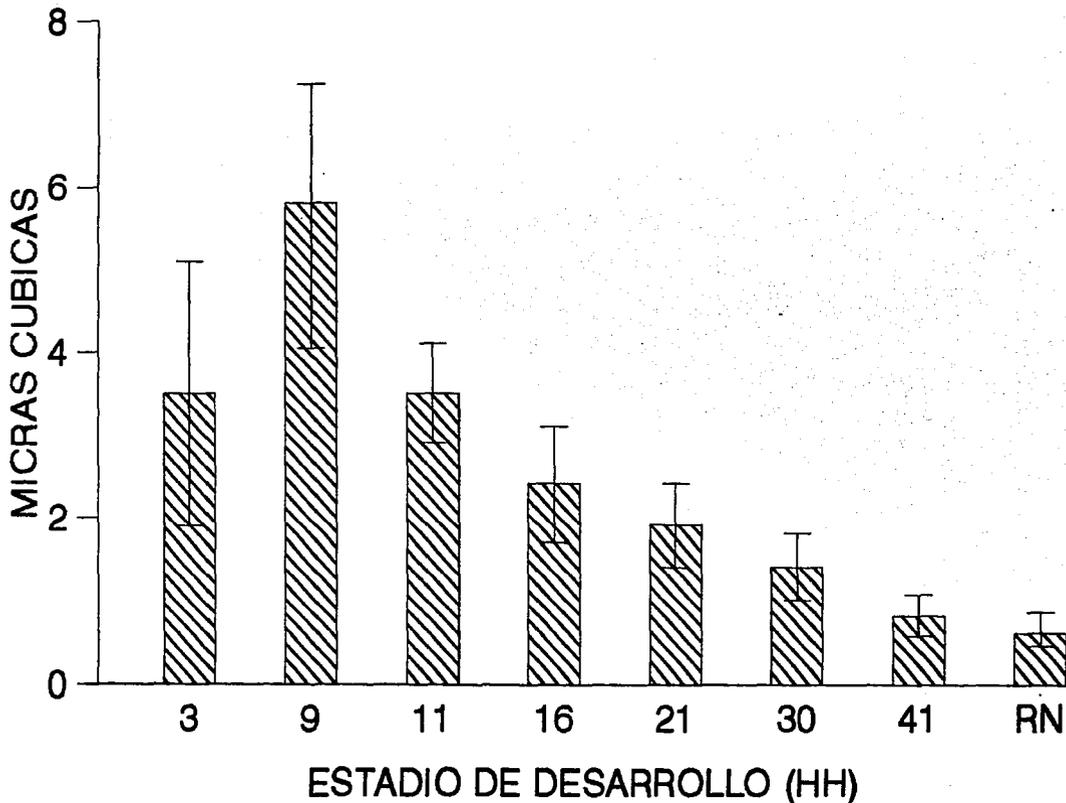
Gráfica 9. Frecuencia de GPCs (N) en los núcleos de células del endodermo y del epitelio intestinal durante la diferenciación. Ordenada: Calibrada en $\text{N}/\mu\text{m}^2$. Abscisa: Estadios del desarrollo del pollo según la serie de Hamburger y Hamilton.

VOLUMEN NUCLEAR DE CELULAS DEL ECTODERMO Y DEL EPITELIO SUPERFICIAL DE LA PIEL



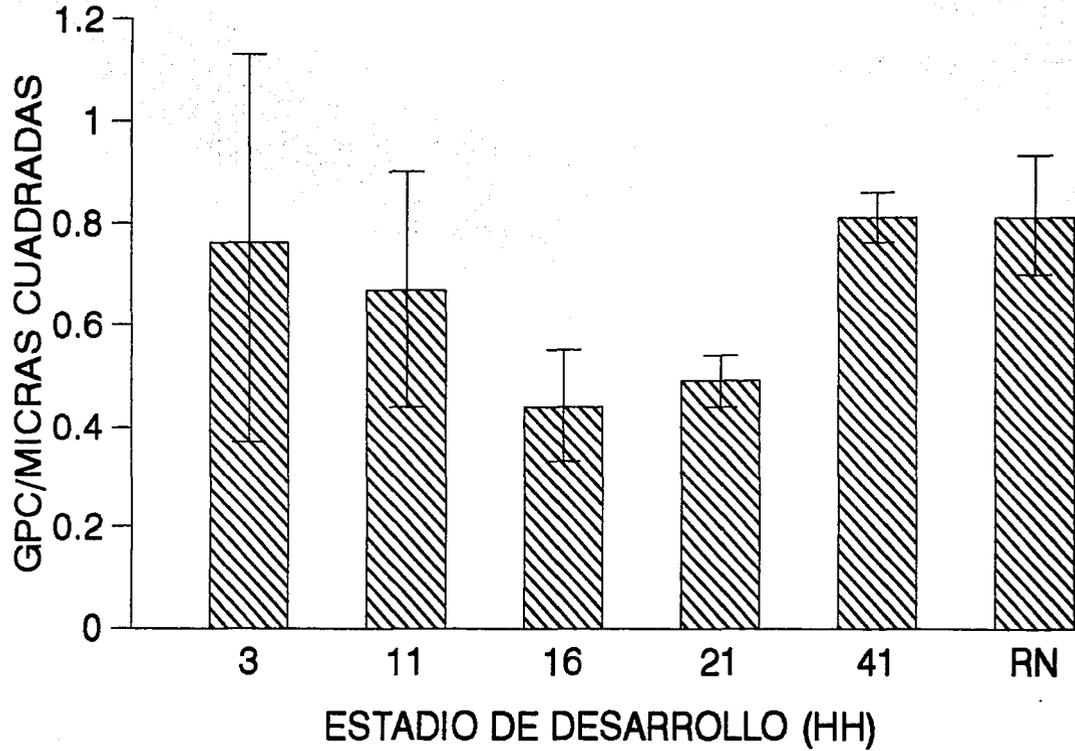
GRAFICA 1.

VOLUMEN NUCLEOLAR DE CELULAS DEL ECTODERMO Y DEL EPITELIO SUPERFICIAL DE LA PIEL



GRAFICA 2.

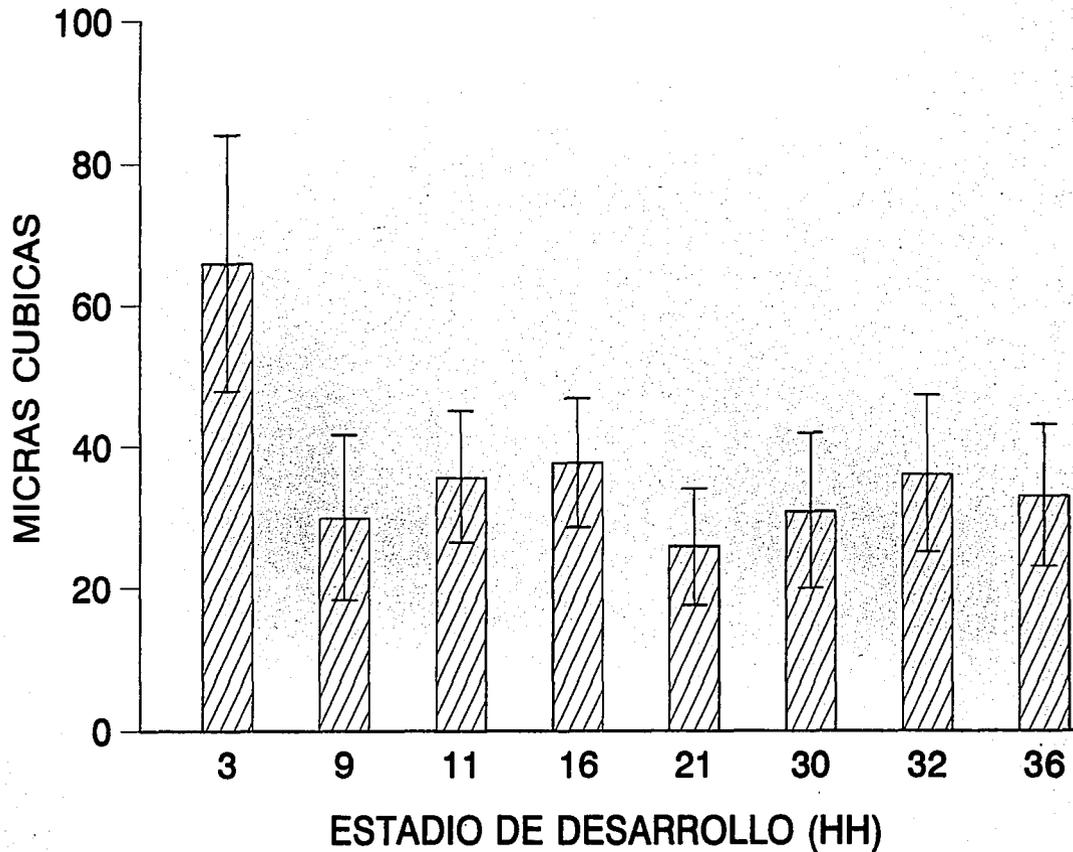
FRECUENCIA DE GPC DE CELULAS DEL ECTODERMO



I Desv. Est. ▨ Ectodermo

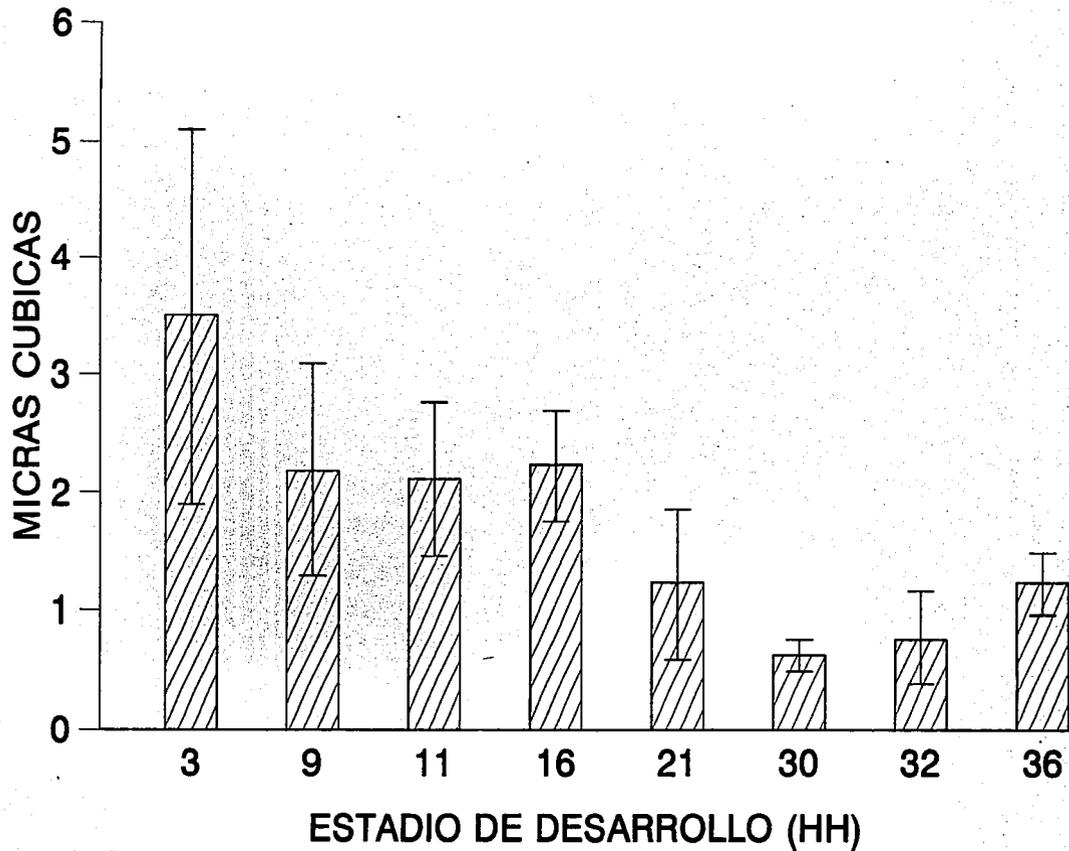
GRAFICA 3.

VOLUMEN NUCLEAR EN NOTOCORDA



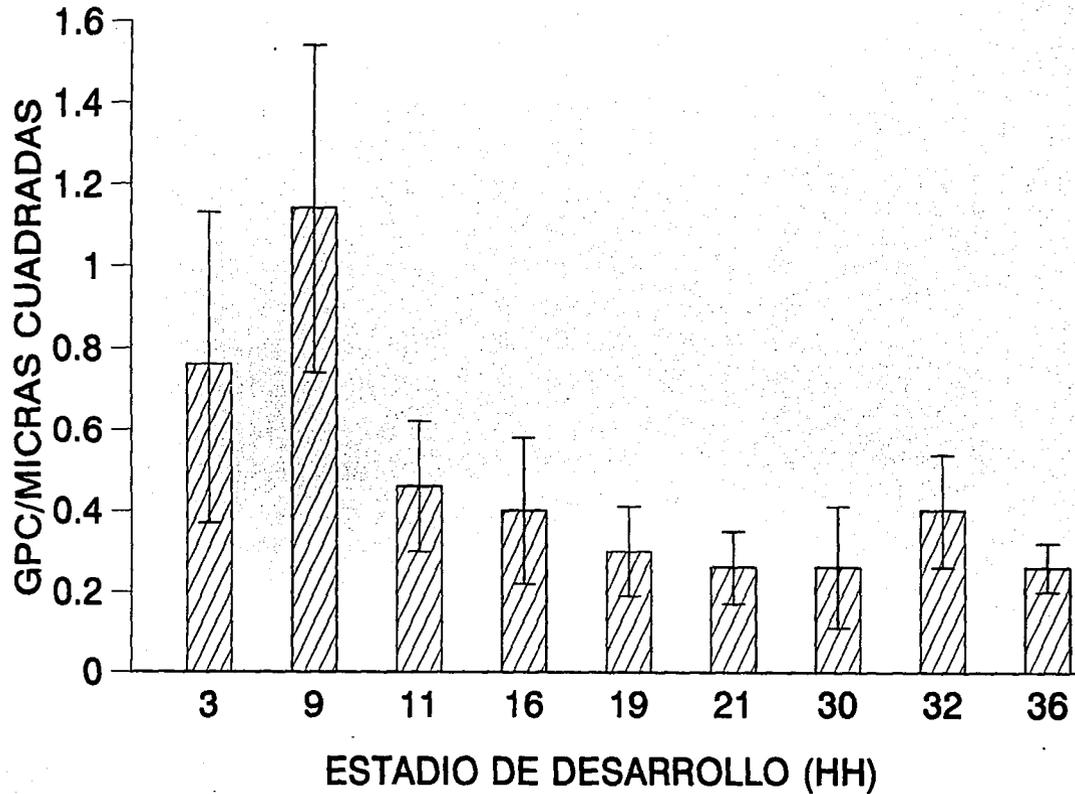
GRAFICA 4.

VOLUMEN NUCLEOLAR EN NOTOCORDA



GRAFICA 5.

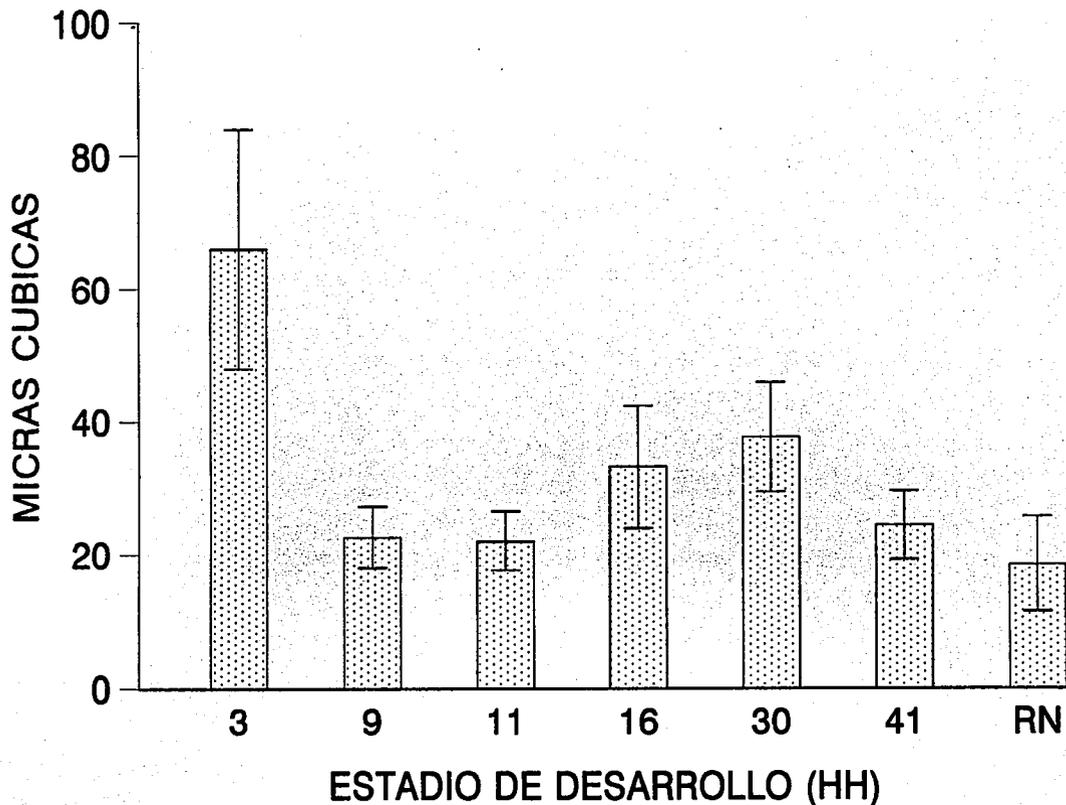
FRECUENCIA DE GPC EN NOTOCORDA



I Desv. Est.

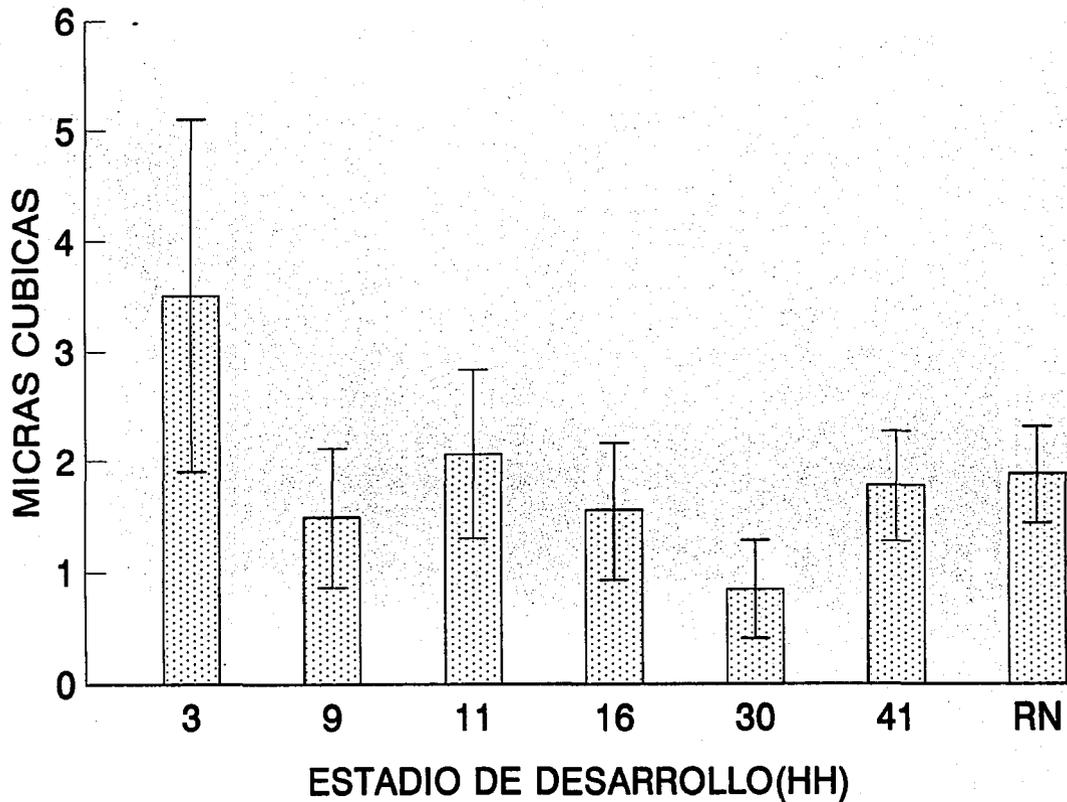
GRAFICA 6.

VOLUMEN NUCLEAR DE CELULAS DEL ENDODERMO Y DEL EPITELIO INTESTINAL.



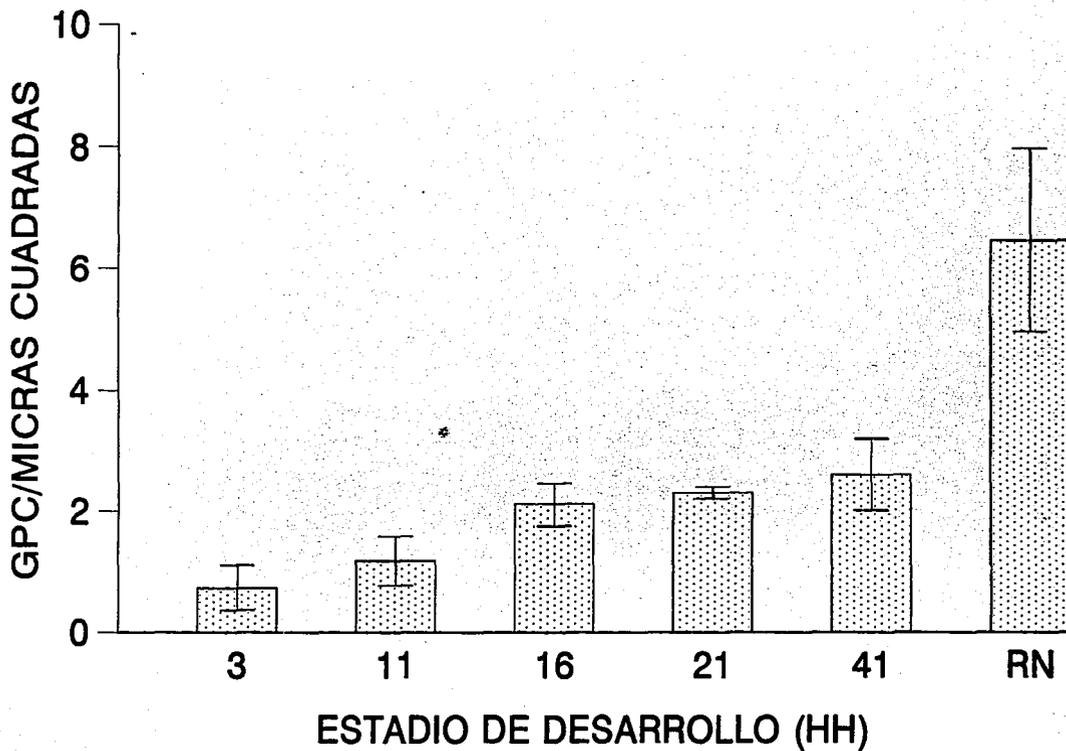
GRAFICA 7.

VOLUMEN NUCLEOLAR DE CELULAS DEL ENDODERMO Y DEL EPITELIO INTESTINAL.



GRAFICA 8.

FRECUENCIA DE GPC DE CELULAS DEL ENDODERMO



I Desv. Est. ■ Endodermo

GRAFICA 9.

IX.DISCUSION

El desarrollo es un proceso gradual, irreversible y dinámico, que se lleva a cabo a partir de una célula que experimenta divisiones controladas. El embrión es un sistema biológico en el que gradualmente y de manera diferencial se expresan los genes, en ese proceso continuo, secuencial e ininterrumpido a través del cual se lleva a cabo la morfogénesis (Le Douarin y Smith, 1988).

Los cambios producidos durante el desarrollo embriológico se manifiestan de manera particular en cada tipo celular, se reconocen en diferentes organismos y a través de muchas generaciones, en parte como resultado del comportamiento del DNA y del RNA (Harris,1970).

El incremento en la velocidad de transcripción de algunos genes, se considera un fenómeno natural que se presenta en las células en diferenciación (Davidson, 1976).

Los cambios ultraestructurales que se han observado en el núcleo celular interfásico, en respuesta a sustancias tóxicas, factores hormonales o en células en diferenciación en condiciones normales, como algunos de los ejemplos descritos en el presente trabajo, pueden estar relacionados con mecanismos de control que alteran la actividad del material genético o de los productos RNPs nucleares y pueden o no coincidir con variaciones en el volumen nuclear y nucleolar. Las alteraciones en la síntesis de RNA nuclear por la supresión de genes, cromosomas o juegos de cromosomas, se reflejan en los cambios estructurales o fisiológicos de un tejido en particular (Harris,1970), o pueden ser el resultado de la expresión e inhibición de genes controlados por señales ambientales de coordinación en tiempo y espacio (Alberts y col.,1994).

La diferenciación del tejido nervioso (Vázquez-Nín y col.,1980;1983) y del músculo (Zavala, 1992) se han relacionado con mecanismos de control que alteran el comportamiento del material genético o de las RNPs nucleares asociadas.

Las características del tejido neural se definen en etapas tempranas del desarrollo y posibilitaron el análisis de las relaciones entre los procesos morfogénicos y las modificaciones ultraestructurales del núcleo de las células de la médula espinal a los 2, 4, 9, 13 y 21 días de incubación, mediante el método de contraste preferencial que permite analizar la distribución de las estructuras RNPs.

Las células matrices de la capa endodermia a los 2 días de incubación, presentan núcleos elípticos, cromatina de configuración semicompacta y laxa predominantemente, poca cromatina compacta,

nucleolos muy grandes o múltiples, las fibras y gránulos de naturaleza RNP son abundantes, sin embargo los GPCs son escasos. Los núcleos de las células de la capa periférica de la misma etapa de desarrollo como principal característica, presentan mayor cantidad de GPCs y menor cantidad de cromatina compacta que las células matrices. Este fenómeno fué relacionado con el proceso de diferenciación de las células que pueden dividirse (matrices) en células que no se dividen (neuroblastos bipolares) y la acumulación de GPCs que se presenta en respuesta a los mecanismos de regulación de la expresión genética que interfieren con la velocidad del transporte de los RNAm del núcleo al citoplasma, es la primera en manifestarse en el sistema estudiado.

A los 9 días las neuronas inmaduras que ya han establecido contacto sináptico eferente funcional con fibras musculares y aferentes con axones propioespinales, presentan núcleos voluminosos con poca cromatina compacta y los GPCs son muy abundantes, de tamaños diversos y organizados en grupos. Esta segunda manifestación de cambios en la regulación de la expresión de muchos genes influye en la tendencia de los parámetros descritos, que se conserva hasta los 21 días de incubación.

En los núcleos de las neuronas el aumento de volumen es continuo, los nucleolos de aspecto nucleolonemal son grandes, los GICs forman acúmulos y los GPCs son abundantes. La cromatina compacta es escasa.

A los 2 días, la abundancia las estructuras fibrilares de naturaleza RNP en las células matrices, refleja el incremento en actividad transcripcional no nucleolar y el aumento de los GPCs en los neuroblastos bipolares de la misma etapa, refleja el estado de equilibrio de la actividad transcripcional de algunos genes y la salida de RNAm de las células que ya no se dividen. Sin embargo el incremento sostenido que se aprecia en las neuronas hasta el día 21 de incubación indica que la velocidad de transcripción supera a la de exportación (Vázquez-Nín y col., 1983).

También el comportamiento del núcleo celular del músculo de embriones de pollo, se altera durante la diferenciación, afectando la distribución de las RNPs y de la cromatina. El tejido muscular que es un ejemplo de producción y variación de los niveles de actina y miosina en correlación con un incremento en mensajeros, lo cual se ha determinado por métodos bioquímicos, sin embargo a nivel morfológico ultraestructural, las RNPs nucleares muestran fluctuaciones importantes particularmente cuando la fibra muscular establece contacto sináptico en una etapa avanzada del desarrollo, cuando los miofibrillos se organizan en miofibrillas y se reconocen por estructuras periódicas características. La respuesta del

músculo al establecimiento de la sinápsis se considera un fenómeno asociado con la expresión de los genes en un proceso controlado (Zavala y col.,1992).

Las modificaciones estructurales y el establecimiento de patrones definidos temporalmente, coinciden con la manifestación de eventos fisiológicos particulares. En el presente estudio se aprecian notables cambios en la distribución de las estructuras RNPs evidenciadas por la técnica preferencial de Bernhard (1969). En muestras del estadio HH3, el núcleo del epiblasto muestra notables diferencias con respecto a los núcleos de células en proceso de diferenciación, de etapas subsecuentes del desarrollo embrionario hasta la eclosión de los pollos. Se logró evidenciar que las diversas modificaciones en el comportamiento de las estructuras RNPs nucleares, que se presentan durante el desarrollo del embrión de pollo, en los núcleos de la población de células del ectodermo en la formación de la piel, en los núcleos de la notocorda y en los núcleos de la población de células del endodermo y la formación del epitelio intestinal, están relacionadas con eventos biológicos particulares. Las modificaciones descritas están relacionadas con los cambios en la conformación de la cromatina, como se observó al aplicar la técnica de contraste preferencial de PTA a muestras de etapas particulares de la maduración de cada tipo celular.

En los núcleos de la notocorda y de los núcleos de epitelios que se originan de capas embrionarias distintas y que su diferenciación es continua hasta la eclosión del pollo, las variaciones del componente ribonucleoproteico siguen modalidades muy particulares, como se puede apreciar en las figuras que ilustran las características de los núcleos de cada tejido en diferentes estadios y en las gráficas comparativas. A continuación se analiza cada caso particular.

EPIBLASTO.- Los núcleos del epiblasto, la capa de células indiferenciadas obtenida a las 13 h de incubación muestran marcadas diferencias con respecto a los núcleos de ectodermo, notocorda y endodermo estudiados en embriones de estadios posteriores, en los cuales el volumen nuclear disminuye gradualmente. Las características ultraestructurales de estos núcleos también son diferentes a las de los demás tipos celulares; predomina la conformación laxa de la cromatina, aunque también se presentan uno o dos pequeños cuerpos esféricos compactos (fig.1), las estructuras RNPs son abundantes, se encuentran ampliamente dispersas y los nucleolos son grandes y de aspecto nucleolonemal (fig. 2)

ECTODERMO - PIEL .- En las células del endodermo y de la capa superficial de la piel en proceso de diferenciación, se registró la disminución gradual del volumen nuclear entre los estadios HH9 - HH30. En el estadio HH41 se observa un incremento abrupto (gráfica 1), que coincide con el desprendimiento de la capa superficial que deja expuestas en la superficie a las células poliédricas que forman parte principalmente de la capa media. Como se señala en la tabla 1, los valores de volumen de los núcleos alargados de la capa superficial de los pollos recién nacidos (RN) son bajos y muestran continuidad con la tendencia descrita antes del estadio HH41.

El volumen nucleolar más alto se presenta en las células de HH9 alcanzando valores de $5.8\mu\text{m}^3$ y los estadios posteriores se caracterizan por la gradual disminución del volumen nucleolar hasta $0.60\mu\text{m}^3$ en los recién nacidos que se presenta paralelamente con la disminución del volumen nuclear de $66\mu\text{m}^3$ en HH3 a $19\mu\text{m}^3$ en HH30, que se incrementa a $34\mu\text{m}^3$ en el estadio 41 y posteriormente cae alrededor de $17\mu\text{m}^3$ en los recién nacidos. Es bien conocido que dentro de un organismo las células con núcleo más pequeño, como los linfocitos que circulan en el torrente sanguíneo, son células con más bajo metabolismo. Por lo contrario, los incrementos de volumen nuclear como el que sucede a los neuroblastos durante la maduración postmitótica, corresponden a los incrementos en la expresión genética (Vázquez-Nín, 1983). Estos datos permiten interpretar la disminución del volumen nuclear de las células epidérmicas en diferenciación como un signo de disminución metabólica. La tinción con ácido fosfotúngstico, preferencial para DNA, demuestra que la reducción del volumen del núcleo se acompaña de un incremento de la cromatina compacta, que coincide con la disminución de la actividad de síntesis de RNAs, ya que las células producen principalmente productos específicos y esto representa una de las causas de alteración en el patrón de distribución de las ribonucleoproteínas.

La disminución del volumen nucleolar que se presenta en el epitelio columnar simple precede la formación de las capas y los cambios dramáticos en la estructura y organización celular. En las células aplanadas no cornificadas de los epitelios poliestratificados, esta disminución se mantiene en forma progresiva hacia la etapa de recién nacido en que se presentan nucleolos compactos (gráfica 2, tabla 2). La reducción del volumen nucleolar, así como la pérdida de la estructura nucleolonemal y su compactación indican una disminución de la síntesis de los RNA ribosomales, que es parte de una reducción general de la transcripción que sucede en la etapa de diferenciación del epitelio monoestratificado en poliestratificado, así como durante la maduración de las células basales de este último en célula poliédricas y luego aplanadas.

La distribución de las RNPs se modifica considerando el aspecto de los núcleos en el estadio HH3, que se caracteriza por la elevada densidad de fibrillas y gránulos en el nucleoplasma, patrón de referencia adecuado para el análisis de las características estructurales durante la diferenciación de los tres sistemas celulares. El nivel de GPCs en núcleos de ectodermo en el estadio HH3, es de $0.76/\mu\text{m}^2$ y representa el valor patrón con respecto al cual es posible apreciar las modificaciones de los diferentes tejidos a través del tiempo. En la epidermis primitiva la variación es discreta, con niveles bajos de GPCs en las células de 42 h de incubación en las etapas que se presenta una capa celular (HH9), hasta los 3 días de incubación (HH21) que llega a nivel de $0.49/\mu\text{m}^2$ en los núcleos del estrato superficial no cornificado de la piel en etapas avanzadas, se mantiene bajo hasta el estadio HH41 en que se aprecia un ligero incremento de frecuencia a $1.07/\mu\text{m}^2$ (gráfica 3, tabla 3). El incremento de GPCs coincide con la aparición del patrón de condensación de la cromatina nucleolar y periférica y se reconoce particularmente en las células de la capa de transición de la piel.

El patrón de distribución de las RNP en general es repetitivo en la mayoría de los estadios y los principales cambios se presentan en las muestras obtenidas del recién nacido, en que se aprecia la disminución del volumen nuclear y la reducción del espacio nucleoplásmico por la redistribución de la cromatina. Durante la formación de capas que desplazan a las células hacia la superficie y como resultado de la cornificación gradual la condensación de la cromatina se modifica en grado máximo en las células de la capa escamosa en las cuales se encontró el máximo nivel de GPC (fig 8a,b; 9.b), que posiblemente produce alteración del patrón de expresión genética y de procesamiento del RNAm.

El aumento de los GPCs durante la maduración funcional de las células epidérmicas que tiene lugar después de la diferenciación, es similar a la encontrada durante la maduración de los neuroblastos ya diferenciados en neuronas maduras (Vázquez-Nin y col., 1980, 1983) y durante la maduración de las miofibrillas inmaduras debido a su conexión con un axón motor (Zavala y col., 1992). El aumento de estos gránulos implica un incremento del contenido de RNA mensajero en dichos núcleos. Estudios de autorradiografía cuantitativa demostraron que el aumento de este almacén intranuclear de RNAm se debe a una restricción de la salida de RNAm del núcleo al citoplasma (Vázquez-Nin y col., 1979, Echeverría y col., 1991). Este control postranscripcional de la expresión genética parece ponerse en marcha en diferentes momentos de la maduración en varias líneas celulares.

NOTOCORDA. Las muestras de embriones de pocas horas de incubación en los que se estudiaron los núcleos de estadios tempranos y las muestras de etapas avanzadas, permitieron estudiar las características de la notocorda y de las estructuras nucleares y citoplásmicas en óptimas condiciones de conservación, debido a que las características particulares del material de estudio interfieren con el procesamiento.

Considerando la ampliamente discutida influencia de la notocorda como elemento inductor de la formación de un esbozo mesenquimatoso, luego cartilaginoso y finalmente óseo, de la segmentación de los elementos mesenquimatosos del cuerpo vertebral, así como el desarrollo de la placa neural (Salisbury, 1993), representa un material muy valioso para el análisis de las variaciones de las partículas RNPs durante el proceso de diferenciación de una estructura de comportamiento muy particular.

La proliferación de las células notocordales continúa aún después de la agregación de una cubierta homogénea formada por la misma población celular que se mantiene independiente según se observa en embriones de ave del estadio HH10, proporcionando rigidez al embrión en esta fase del desarrollo e involucionando gradualmente durante la osificación del cuerpo vertebral, antes del nacimiento. El volumen nuclear muestra variaciones discretas (gráfica 4, tabla 4), al igual que el volumen nucleolar (gráfica 5; tabla 5) sin embargo, el componente RNP extranucleolar presenta variaciones notables.

El volumen nuclear se modifica gradualmente de $30 \mu\text{m}^3$ en HH9 a $37 \mu\text{m}^3$ en HH16, incremento controlado por el patrón de proliferación constante en un espacio reducido, limitado por una rígida estructura periférica que produce el apilamiento de las células en el estadio HH21 en que se presenta una disminución notable hasta $25 \mu\text{m}^3$. Es posible que como resultado de la disminución de la población por un proceso de degeneración celular natural y por la vaculización sostenida que reduce al mínimo el elemento citoplasmático, el volumen nuclear se incrementa de nuevo, ya que ambos factores determinan que el único elemento celular que se conserva aparte de las vacuolas disponga de espacio, sin embargo es posible que también la alteración del medio externo tenga efectos en el nucleoplasma y lo diluya, porque los núcleos de HH 36, presentan RNPs nucleares bien conservadas en un fondo sin contraste y se reconocen perfectamente estructuras fibrilares, GICs y GPCs en los que apenas se adivina el halo claro. El volumen nuclear de las células de la notocorda se mantiene entre 30 y $40 \mu\text{m}^3$ en todos los estadios investigados salvo HH21 en el que es de $26 \mu\text{m}^3$, estas pequeñas variaciones no pueden ser interpretadas en términos de procesos fisiológicos.

Las variaciones del volumen nucleolar son menos dramáticas que las observadas en los núcleos del ectodermo, pero son igualmente importantes. En los primeros estadios el volumen se mantiene alrededor de $2 \mu\text{m}^3$ hasta HH16, a partir de entonces disminuye hasta $0.62 \mu\text{m}^3$ en el estadio HH30, período en que aumenta el proceso de formación de vacuolas. La vacuolización del citoplasma que se aprecia partir de HH11 es un proceso constante y gradual por lo que en la etapa HH36 se observan núcleos incluidos entre una finísima red de citoplasma. La disminución del citoplasma y de sus organoides sin duda acarrea una importante reducción de la síntesis de ribosomas evidenciada por el menor tamaño del nucleolo.

En cuanto a la densidad de GPCs, en el estadio HH9 se registró un nivel elevado ($1.14/\mu\text{m}^2$) que precede a la diferenciación del citoplasma y a la formación de la capa externa que cubre a la notocorda (gráfica 6, tabla 6). Sin embargo, este estadio es posterior a la inducción de la placa neural. Aunque se carece de datos de un grupo de animales, algunos resultados preliminares parecen indicar que los núcleos de la prolongación cefálica, estructura precursora de la notocorda, también tienen un alto número de GPCs. Si en trabajos posteriores se confirma esta observación, se fortalecería la hipótesis de que existe transitoriamente un control del transporte del RNAm nuclear hacia el citoplasma durante el periodo de inducción neural. La importancia del almacén intranuclear de RNAm disminuye posteriormente, cuando la capacidad de inducir la diferenciación de las células ectodérmicas en células matrices del sistema nervioso desaparece y las funciones de la notocorda cambian. Entre los tejidos en diferenciación estudiados hasta el presente, éste es el único que muestra un incremento transitorio de los GPCs, lo que puede deberse a los cambios funcionales radicales que sufre la notocorda durante la vida embrionaria.

En los estadios posteriores se aprecia la gradual disminución de la densidad de las estructuras RNPs en general y de la frecuencia de GPCs hasta $0.26/\mu^2$, coincidiendo con las etapas que el citoplasma presenta mayor complejidad y la cubierta de proteína aumenta de grosor, sin embargo conforme la cubierta notocordal aumenta de grosor y las células del mesénquima se estacionan para formar el cuerpo vertebral, el citoplasma muestra un alto grado de vacuolización de manera que los núcleos parecen suspendidos en un red de citoplasma filamentosos que conserva pocos organelos.

En HH32 se presentó un leve incremento en el nivel de GPCs que coincide con la compactación del componente cromatínico en la periferia de algunos núcleos y alrededor del nucleolo, característica

mejor definida en las células del centro de la notocorda (fig.12 núcleo A); sin embargo, en este estadio se presentan otros núcleos con abundantes estructuras RNP y la cromatina compacta en un grumo bien definido, pero que muestran señales de infiltración de material de la misma textura del citoplasma circundante (fig.12 núcleo B) posibilidad que puede considerarse por la marcada alteración de la fase externa de la envoltura nuclear y del retículo asociado a ella en las células de este estadio.

En general el material de las muestras de las etapas tardías (HH36) presenta fuertes alteraciones fuera y dentro de los núcleos, aún en los mejor conservados en la periferia de la notocorda se aprecia el desplazamiento localizado del componente ribonucleoproteico, sin embargo se reconocen fibrillas RNPs, GICs y GPCs bien definidos. El alto nivel de los GPCs que se presenta en las etapas tempranas posiblemente está relacionado con el posible efecto inductor de la diferenciación de otras estructuras atribuido a la estructura; sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales se manifiesta esta actividad.

La osificación de los cuerpos vertebrales en formación dificulta la fijación y el corte de muestras de etapas posteriores al estadio señalado. Los dos aspectos interfieren en el estudio del comportamiento de las estructuras RNPs de los núcleos de la notocorda de etapas en que se transforma en discos intervertebrales. Este fenómeno es muy interesante, sin embargo por las características de la notocorda las muestras bien conservadas se obtienen difícilmente, aunque en el presente estudio el material de las etapas avanzadas la conservación supera al que se muestra en las publicaciones de otros autores.

ENDODERMO.

En este material se presentan modificaciones del volumen nuclear, en la etapa que el epitelio es columnar simple se incrementa de $22 \mu\text{m}^3$ a $37 \mu\text{m}^3$ (gráfica 7, tabla 7) entre la etapa que se transforma en epitelio pseudoestratificado, aparecen los primeros pliegues y se diferencia la porción de mesénquima subyacente, después de este período se presenta una fuerte actividad mitótica, aumenta el número de células y disminuye el volumen nuclear hasta $18\mu\text{m}^3$ en el epitelio intestinal de los recién nacido.

El volumen nucleolar máximo $2.06 \mu\text{m}^3$ se presenta a las 42 h de incubación (HH11) etapa que precede a la diferenciación y a partir de esta etapa disminuye hasta $0.89 \mu\text{m}^3$ (gráfica 8, tabla 8). En la etapa HH41 se presenta un incremento en el volumen nucleolar hasta $1.77\mu\text{m}^3$ que coincide con el elevado

índice de mitosis y la formación de nuevas capas de células. El incremento se mantiene hasta la etapa de recién nacidos.

En cuanto al componente RNP nuclear, los principales cambios se observan en las etapas avanzadas de la diferenciación, después de HH41 se presenta un fuerte incremento de GPCs de $2.6/\mu\text{m}^3$ a $6.45/\mu\text{m}^3$ en recién nacidos (gráfica 9, tabla 9), que coincide con la transformación del epitelio, la formación del villi, el plegamiento de la superficie, la aparición de las células en copa y elevación de fosfatasa alcalina demostrada anteriormente por técnicas citoquímicas (citada por Romanoff, 1960).

Las células endodérmicas durante su diferenciación en células epiteliales intestinales, muestran un incremento significativo de la densidad numérica de GPCs. Sin embargo, como ocurre en el sistema nervioso, en el músculo y en la piel, el mayor aumento de estos gránulos se produce en el momento de la maduración funcional del tejido.

X. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del pollo, en los núcleos de las células del epiblasto y de los núcleos de las células de las tres capas germinales; ectodermo, mesodermo y endodermo, se reconocen características muy particulares en la distribución de las estructuras RNPs con respecto los núcleos de las células terminalmente diferenciadas de cada grupo estudiado y este comportamiento es independiente de las modificaciones graduales en el volumen nuclear y en el volumen nucleolar, que se observaron a través de la diferenciación de tres tejidos; piel, notocorda e intestinal.

Las RNPs son abundantes y se distribuyen ampliamente en los núcleos de los primeros estadios de la diferenciación del embrión de ave. La distribución de las RNPs de células en etapas avanzadas y en las diferenciadas terminalmente con respecto a la observada en los estadios tempranos del desarrollo del embrión, coincide con la condensación de la cromatina en un proceso gradual. La configuración compacta facilita el reconocimiento de los GPCs en los límites de las áreas decoloradas por la técnica de Bernhard (1969), que acentúa el patrón de distribución de las estructuras, que tienden a agruparse como es el caso de los GICs. En las tres líneas de diferenciación estudiadas y en dos conocidas de la literatura, la frecuencia de RNPs se modifica en relación con la maduración funcional de las células en cuestión.

En el epiblasto, los núcleos presentan abundantes estructuras RNPs ampliamente distribuidas y predomina la cromatina de configuración laxa. Este patrón se conserva con pocas variaciones a lo largo del desarrollo en las células de la piel en diferenciación, hasta etapas avanzadas del desarrollo, como se aprecia en los núcleos de las células no cornificadas de la capa superficial de la epidermis. En las células del ectodermo y en las que participan durante la formación de la capa superficial de la piel, el proceso de diferenciación es continuo y está marcado por la constante disminución de los parámetros relacionados con la actividad sintética. El patrón descrito, se modifica de manera particular en las células de la notocorda y también en el endodermo que se diferencia en epitelio superficial del intestino antes del nacimiento.

Las RNPs nucleares de las células de la notocorda se presentan ampliamente distribuidas desde las primeras etapas de la diferenciación y las modificaciones estructurales que se aprecian alrededor del estadio HH30 involucran cambios en la configuración de la cromatina, en la distribución de las fibrillas RNPs y de los GIC que se organizan en cúmulos bien definidos. En etapas posteriores se reconocen cambios en la compactación de la cromatina y en la distribución de las RNPs principalmente en los núcleos centrales. La dispersión de las RNPs en el estadio HH32 coincide con un leve incremento del volumen nuclear.

Al comparar los niveles de GPCs entre los tres tejidos, los núcleos de la piel en diferenciación se caracterizan por ser menores de $1 \text{ GPC}/\mu\text{m}^2$ y las modificaciones posteriores descritas en las etapas avanzadas de diferenciación, coinciden con cambios en la conformación de la cromatina y con la transformación de núcleos ovoides a formas notablemente aplanadas en la capa superficial de descamación de la piel.

En las células de la notocorda, la presencia de GPCs es alta en las primeras horas de formación de este órgano, cuando desempeña la función específica de inducir la diferenciación de la placa neural al comienzo del desarrollo. En este caso el aumento del almacén intranuclear de RNAm representado por los GPCs que sucede en las primeras horas, en que representa el principal elemento de soporte del embrión; sin embargo las funciones que posteriormente cumple la notocorda no parecen requerir el almacenamiento de mensajeros en forma de GPCs.

Este parámetro, experimenta mayor variación en las células endodérmicas, aumentando en forma muy significativa durante el período de modificación estructural del epitelio y posteriormente, durante la etapa de maduración funcional de las células intestinales, que producen elevados niveles de fosfatasa alcalina y en las cuales el incremento de GPCs coincide con la presencia de grandes cúmulos de cromatina compacta.

XI. REFERENCIAS.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and D. Watson. 1994. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York. USA.

Arey L.B. 1956. Anatomía del Desarrollo (Embriología). Tratado y manual de laboratorio. Librería editorial Vázquez. Argentina. 563 - 613 pp.

Axel R., Feigelson P. and G. Schutz. 1976. Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct. Cell. 7: 247 - 254.

Bach M. 1992. Corte de intrones y empalme de exones. Investigación y Ciencia. (Mayo): 60 - 67.

Bachellerie J.P., Puvion E. and J.P Zalta. 1975. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. Eur. J. Biochem. 58: 327 - 337.

Balinsky B.J. 1971. Introducción a la embriología. Editorial Omega. Barcelona. 631pag.

Banks W.J. 1981. Histología veterinaria aplicada. Manual moderno. México. pp 416 - 434.

Baran V., Melcák Y., Otcovsky J. and V. Landa. 1993. Immunoelectron microscopic localization of small nuclear ribonucleoproteins and interchromatin granules in the 2-cell mouse embryo. Reprod. Nutr. Dev. 33: 447 - 454.

- Barrack E.R. and D.S. Coffey. 1982. Biological properties of the nucleus: Steroid hormone binding. *Recent Progress in Hormone Research*. **38**: 133 - 195.
- Beebee T.J.C. and H.W. Butterworth. 1980. Eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases: An evaluation of their role in the regulation of gene expression. In: *Eukaryotic Gene Regulation*. Vol. II. Ed. Gerald M. Kolodny. CRC Press: 2 - 48.
- Bellaïrs R. 1963. Differentiation of the yolk sac of the chick studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **11**(1): 201 - 225.
- Berezney R. y D.S.Coffey. 1977. Nuclear matrix: Isolation and characterization of framework from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* **73**: 616 - 637.
- Berezney R. 1991. The nuclear matrix: A heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* **47**: 109-123.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J.Ultrastruct. Res.* **27**: 250 - 265.
- Billingham R.E and W.K. Silver. 1967. Studies on the conservation of epidermal specificities of skin and certain mucosas in adult mammals. *J. Exp. Med.* **125**: 249 - 246.
- Billingham R.E. and W.K. Silvers. 1968. Dermoeplidermal interactions and epithelial specificity. In; *Epithelial-mesenchymal interactions*. Eds. R Fleishmajer & R.E Billingham. The William & Wilkins Co. Baltimore. pp. 252 - 256.
- Bloom W. and D.W. Fawcett. 1975. A textbook of histology. W.B.Saunders Company. 10th De. Philadelphia. pp. 1 - 1033.

Boell E.J. 1971. Energy exchange and enzyme development during embryogenesis. In: Analysis of development. Willier, B.H. Weiss, P.A. and V. Hamburger. W.B. Saunders Co: 520-555.

Bonner J. 1965. The Molecular Biology of Development. Oxford University Press. New York: 155 pp.

Bouteille M. 1972. Ultrastructural localization of proteins and nucleoproteins in the interphase nucleus. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 5th. Symposium. Gene Transcription in reproductive tissue. Bull.P. No. 8. Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer. Villejuif, France. 33 pp.

Bouteille M., Laval M., and A.M. Dupuy-Coin. 1974. Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. In: The Cell Nucleus. Edit. H. Busch. Academic Press. New York. Vol. I (part 1): 5 - 71

Brachet J. 1942. La localisation des acides pentosenucleiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de development. Arch. Biol. Liege, 53: 207 - 257.

Brenner H.R., Witzemann B. and B. Sakmann. 1990. Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. Nature. 344: 544 - 547.

Brasch K. and R. Ochs. 1992. Nuclear Bodies (NBs): A newly "rediscovered" organelle. Exptl. Cell Res. 202: 211 - 223.

Brown J.D., Plumpton M. and J.D. Beggs. 1992. The genetics of nuclear pre-mRNA splicing: a complex history. Antonie van Leeuwenhoek. 62: 35 - 46.

Buckingham M. 1992. Making muscle in mammals. *TIG*. 8 (4): 144 - 149.

Burgess, 1983. On the role of the notochord in somite formation and the possible evolutionary significance of the concomitant cell reorientation. *J. Anat.* 136: 829 - 835.

Carmo-Fonseca M., Tollervey D., Pepperkok R., Barabino S.M.L., Merdes A., Brunner C., Zamore P.D., Green M.R., Hurt E. and A.I. Lammond. 1991. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J.* **10**: 195 - 206.

Carmo-Fonseca M., Ferreira J. and A.I. Lamond. 1993. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis. Evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J. Cell Biol.* **120** (4): 841-852.

Cavalier - Smith T. 1975. The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature.* **256**: 463 - 468.

Clevenger Ch.V. and A.L. Epstein. 1984. Use of immunogold electron microscopy and monoclonal antibodies in the identification of nuclear substructures. *J. Cell Biol.* **32** (7): 757 - 765.

Chevallier A., Kieny M., Mauger A. and R. Sengel. 1977. Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo. In *Vertebrate limb and somite morphogenesis*. Eds Ede D.A. Hinchliffe J.R. and M. Balls. Cambridge University Press. 421 - 432 pp.

Cook P.R. 1991. The nuclear skeleton and topology of replication. *Cell* **66**: 627 - 635

Daneholt B. 1975. Transcription in polytene chromosomes. *Cell.* **4**: 1 - 9.

Daneholt B. 1992. The transcribed template and the transcription loop in Balbiani Rings. *Cell Biol. Int. Rep.* **16** (8): 709 - 715.

Daskal Y., Merski, J.A., Hughes, J.B. and H. Busch. 1975. The effects of cicloheximide on the ultrastructure of rat liver. *Exptl. Cell Res.* **93**: 395 - 401.

Daskal Y. and H. Busch. 1978. Ultrastructure of chromatin and chromosomes. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch. ed., Academic Press. New York. Vol. IV (part A): 3 - 45.

Daskal Y, Komaromy L. and H. Busch. 1980. Isolation and partial characterization of perichromatin granules. *Exp. Cell Res.* **126**: 39 - 46.

Davidson E.H. 1976. *Gene activity in early development*. Academic Press. 2d. ed. New York. 3 - 102.

de Moor C.H., van Heugten, H.A.A. and H.O Voorma. 1990. Characterization of messenger ribonucleoprotein particles. *Mol. Biol. Rep.* **14**: 57 - 60.

Denis H. 1968. Role of messenger ribonucleic acid in embryonic development. In: *Advances in morphogenesis*. Academic Press. USA. **7**: 115 - 150.

De Robertis E.D.P. y E.M.F. De Robertis. 1983. *Biología Celular y Molecular*. 10a. Ateneo ed. Argentina. 613 pp.

Dietrich S., Schubert F.R., and P.Gruss. 1993. Altered *Pax* gene expression in murine notochord mutants: The notochord is required to initiate and maintain ventral identity in the somite. *Mechanisms of development*. **44**: 189 - 207.

Dreyfuss G. 1986. Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Ann. Rev. Cell Biol.* **2**: 459 - 498.

Du Praw E.J. 1971. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Omega. Barcelona. 764 pp.

Echeverría O.M., Zavala G., Benítez A. and G.H. Vázquez-Nin. 1980. Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. *Biol. Cell.* **39**: 139 - 142.

Echeverría O.M., Pagán-Santini, R. and G.H. Vázquez-Nin. 1991. Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol. Cell* **72**: 223 - 229.

Echeverría O.M., Hernández I.G. and G.H. Vázquez-Nín. 1992. Three dimensional distribution of extranucleolar extended chromatin and its relation with transcribing and non-transcribing regions. In : Recent Advances in Cellular and Molecular Biology. Wegmann, R.J. and Wegmann, M.A. eds., Paris. 6: 77 - 81.

Edström J.E. 1974. Polytene chromosomes in studies of gene expression. In: The cell Nucleus. Edit. Harris Busch. Academic Press. New York. Vol. II: 293 - 332.

Elgin S.C.R. 1988. The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. J. Biol. Chem. 263: 19259 - 19262.

Esquivel C. 1988. Estudio de la cromatina en núcleos interfásicos de hepatocitos. Tesis de Doctorado en Ciencias, Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1 - 48.

Fakan S.E and W. Bernhard. 1973. Nuclear labelling after prolonged H3 uridine incorporation as visualized by high-resolution autoradiography. Exptl. Cell Res. 79: 431-444.

Fakan S.E. and E. Puvion. 1976. Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes. Exptl. Cell Res. 99: 155 - 164.

Fakan S.E. and N. Odartchenko. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. Biol. Cell. 37: 211 - 218.

Fakan S., Leser G. y T.E. Martin. 1984. Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoprotein (RNP) as visualized by immunocytochemistry on thin sections. J. Cell. Biol. 102: 1654-1665.

Feldherr C.M. and D. Akin. 1994. Role of nuclear trafficking in regulating cellular activity. Int. Rev. Cytol. 151: 183 - 227.

Franke W. and U. Scheer. 1974. Structures and functions of the nuclear envelope. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch Ed. Academic Press. New York. Vol. I (part 1): 219 - 347.

Frederickson R.G. and F.G. Low. 1971. The fine structure of perinotochordal microfibrils in control and enzyme-treated chick embryos. *Am. J. Anat.* **130**: 347 - 376.

Freeman B.M. and M.A. Vince. 1974. Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study. Chapman and Hall Ltd. Londres. 263 - 264.

Fukamachi H. 1992. Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J. Cell Sci.* **103**: 511-519.

Georgiev G.P., Samarina O.P., Lerman M.I., Smirnov M.N. and A.N. Severtzov. 1963. Biosynthesis of messenger and ribosomal ribonucleic acids in the nucleolochromosomal apparatus of animal cells. *Nature*. 4913. **200** (4913): 1291 - 1294.

Gilbert S.F. 1991. Control of development by RNA processing. In. *Developmental Biology. Mechanisms of cellular differentiation*. Sinauer Ed. Massachusetts Cap. 13 : 458 - 481.

Goetnik P.F. 1966. Genetic aspects of skin and limb development. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Ac. Press. **6**: 340-345

Gross D.S. and W.T. Garrard. 1988. Nuclease hypersensitive site in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 159 - 197.

Gurdon J.B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exptl. Morph.* **10** (part 4): 622-640.

Gurdon J.B. 1974. The genome in the specialized cells as revealed by nuclear transplantation in amphibia. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch De. Academic Press. new York. Vol. I (part 2): 471 - 489.

Hadjiolov A.A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. In: Cell Biology. Monographs 12, Springer-Verlag, New York. 30 pp.

Hall Z.W. and E. Ralston. 1989. Nuclear domains in muscle cells. Cell. 59: 771 - 772.

Ham A.W. 1986. Tratado de Histología. Nueva Editorial Interamericana. 8va. ed. México. p. 688 - 702.

Hamburger V. and Hamilton, H.L. 1952. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88: 49 - 92.

Hancock R. and T. Boulikas. 1982. Functional organization on the nucleus. Int. Rev. Citol.. 79: 165 - 206.

Harris H. 1970. Nucleus and cytoplasm. 2nd edition. Clarendon Press. Oxford. 181 pp.

Heitz I. 1931. Nukleolen and chromosomen in der gattung Vicia. Planta 15: 495 - 505.

Heusser S., Colin S., Figiel A., Huet C., Keller J.M., Pornet P., Robine S., Vandamme J., Vandekerckhove J., and M. Dauça. 1992. Amphibian intestinal villin: isolation and expression during embryonic and larval development. J. Cell. Sci. 103: 699 - 708.

Hinterberger T.J., Sassoon D.A., Rhodes S.J. and S.F. Konieczny. 1991. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. Dev. Biol. 147: 144 - 156.

Huang S. and D.L. Spector (1991). Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. Genes Dev. 5: 2288-2302.

Hunt T.E. 1932. Potencies of transverse levels of the chick blastoderm in the definitive-streak stage. Anat. Rec. 55: 41-65.

- Hunt, R.K. 1975. The cell cycle, cell lineage and neuronal specificity. In: Cell cycle and cell differentiation. J. Reinert and H. Holtzer eds. Springer Verlag, New York. pag 43.
- Jarmolowski A., Boelens W., Izurralde E. and I. W. Mattaj. 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* **124** (5): 627 - 635.
- Jenuwein T., Forrester W. and R. Grosschedl. 1993. Role of enhancer sequences in regulating accessibility of DNA in nuclear chromatin. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Vol. LVIII : 97 - 103.
- Jiménez-García L.F.. 1985. Evolución nuclear en animales. Tesis de maestría en Ciencias. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1-29 pp.
- Jiménez-García L.F., Elizundía J.M., López-Zamorano B., Maciel A., Zavala G., Echeverría O.M. and G.H.Vázquez-Nin. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protocists. *Biosystems.* **22**: 108 - 106.
- Jurand A. 1962. The development of the notochord in chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.***10**: 602 - 621.
- Jurand A. 1974. Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* **32** (1): 1 - 33.
- Kalchheim C., Vogel Z. and D. Duksin. 1982. Embryonic brain extract induces collagen biosynthesis in cultured muscle cells. Involvement in acetylcholine receptor agregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 3077 - 3081.
- Kanaar R., Roche S.E., Beall E.L., Green M.R. and D.C. Rio. 1993. The conserved Pre-m RNA splicing factor U2AF from *Drosophila*: Requirement for viability. *Science.* **262**: 569 - 573.

Karasaki S. 1965. Electron microscopic examination of the sites of nuclear RNA synthesis during amphibian embryogenesis *J. Cell Biol.* **26**: 937 - 958.

Kasper Ch.B. 1974. Chemical and biochemical properties of the nuclear envelope. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch Ed., Academic Press. New York. Vol. I (part 2): 349 - 384.

Kedersha N.L., Miquel M.-C., Bittner D. and Rome L.H. 1990. Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J. Cell Biol.* **110**: 895 - 901.

Kohne D.E. 1968. Taxonomic applications of DNA hybridization techniques. *Systematics Association Special Volume. 2 "Chemotaxonomy and Serotaxonomy"* J.G. Hawkes Edit. pag. 117 - 130.

Konigsberg I.R. 1974. The embryological origin of muscle. *Sci. Am.* **211**(2): 61 -66.

Kornberg R.D. 1977. The structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 931 - 954.

Krzyzowska-Gruca S., Kulczycka E., and A. Zborek. 1985. Cytochemical study on the localization of interchromatin granules during the cell division. *Acta histochem.* **76**: 49-55.

Laskey R.A. y J.B. Gurdon. 1970. Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature (London)*, **228**: 1332-1334.

Lawrence J.B., Singer R.H., and L.M. Marselle. 1989. Highly localized tracks of specific transcripts within the interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell*, **57**: 493 - 502.

Leblond C.P. 1965. The time dimension in histology. *Am. J. Anat.* **116**: 1 - 28.

Le Douarin N.M. and J. Smith. 1988. Development of the peripheral nervous system from the neural crest. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4**: 375 - 404.

Leonhardt H. 1975. *Histología, citología y microanatomía humanas*. Salvat Editores. S.A. 509 pp.

Lesson V.C., Threadgold L.T. and N.R.St.C. Sinclair. 1961. Histochemical observations upon the development of the notochord in the chick. *Acta anat.* **46**: 91 - 97.

Levine, L. 1979. *Biología del Gen*. C.V. Mosby Company, Saint Louis. Barcelona. 370 pp.

Littau V.C., Alfrey V.G., Frenster J.H and A.E. Mirsky. 1964. Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope autoradiography. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* **52**: 93 - 100.

Louvard D., Arpin M., Coudrier E., Dudouet B., Finidori J., García A., Godefroy O., Huet C., Pringault E., Robine S. and C. Sahuquillo Merino. 1991. Differentiation of a multipotent human intestinal cell line: Expression of villin, a structural component of brush borders. In: *Molecular mechanisms in cellular growth and differentiation*. Eds. Bellvé A.R. and H.J. Vogel. Academic Press, Inc. pp 341 - 353.

Margulis L. and V.Schwartz. 1982. *Five Kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on earth*. W.H. Freeman, San Francisco. pp 2 - 17.

Medina F.J. 1989. The nucleolus, in the spotlight. *Eur. J. Cell Biol.* **50**: 244 - 246.

McClintock B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucléoli in *Zea mays*. *Zeit. Zellfors Mikrosk. Anat.* **21**: 294 - 328.

Miller O.L. Jr. 1973 The visualization of genes in action. *Sci. Amer.* **229**. 34 - 42.

Mirsky A.E. and S. Osawa. 1961. The interphase nucleus. In: *The Cell*. Vol.II. Cap. 10: 677 - 770.

- Monneron A. and W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* **27**: 266 - 288.
- Moyne G. and E. Puvion. 1976. Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus. 6th. Eur.Congress on Electron Microscopy: 14 - 84.
- Moyne G., Nash, R.E. and E. Puvion. 1977. Perichromatin granules in isolated hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *Biol. Cell.* **30**: 5 - 16.
- Muedra V. 1973. Atlas de anatomía animal. Ediciones Jover, S.A. Barcelona. 86 pp.
- Nakamura Y., Becker L.E. and A. Marks. 1983. S-100 protein in human chordoma and rabbit notochord. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **107**: 118 - 120.
- Nameroff M and E. Munnar. 1976. Inhibition of cellular differentiation by phospholipasa C. II. Separation of fusion and recognition among myogenic cells. *Dev. Biol.* **49**: 288 - 293.
- Nash R.E., Puvion E. and W. Bernhard. 1975. Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA. *J.Ultrastruct. Res.* **53**: 395 - 405.
- Newport J. and Forbes. 1987. The nucleus: Structure, function and dynamics. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 535 - 537.
- Ochs L.R., Lischwe M.A., Spohn W.H. and H. Busch.1985. Fibrilarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmunosera. *Biol. Cell.* **54**: 123 - 134.
- Ogawa Y. 1962. Synthesis of skeletal muscle proteins in early embryos and regenerating tissue of chick and Triturus. *Exp. Cell Res.* **26**: 269 - 27

- Olmedilla A., Testillano P.S., Vicente O., Delseny M. and M.C Risueño. 1993. Ultrastructural rRNA localization in plant cell nucleoli. *J. Cell Sci.* **106**: 1333 - 1346.
- Olson E.N., Brennan Th.J., Chakraborty T., Cheng T.Ch., Cserjesi P., Edmonson D., James G. and L. Li. 1991. Molecular control of myogenesis: Antagonism between growth and differentiation. *Mol. Cell Biochem.* **104**: 1 - 13.
- Oppenheimer J.M. 1971. Problems, concepts and their history. In: *Analysis of development*. Willier, B.H. Weiss, P.A. and V. Hamburger Edit. Hafner Publishing Co. New York. 1 - 24 pp.
- Ortega-Rangel, J.A. 1986. Estudio cuantitativo de las partículas de ribonucleoproteínas nucleares durante la diferenciación y maduración de los neuroblastos en la médula espinal del embrión de pollo. Tesis de Doctorado en Ciencias, Biología, Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1 - 132 pp.
- Paniagua, R., Nistal M., Sesma P., Alvarez-Uría M. y B. Fraile. 1993. *Citología e Histología vegetal y animal*. Interamericana - McGraw-Hill. Madrid. 807 pp.
- Patten B.M. 1975. *Early embryology of the chick*. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York: 173-495.
- Penman S., Smith Y. and E. Holtzman. 1966. Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus. *Science*. **154**: 786 - 788.
- Petrov P. and W. Bernhard. 1971. Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoproteins components of the interphase nucleus. *J. Ultrastruct. Res.* **35**: 385-402.
- Petrov P. and C.E. Sekeris. 1971. Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation. *Exptl. Cell Res.* **69**: 393 - 401.
- Portmann A. 1961. Sensory organs: skin, taste and olfaction. In: *Biology and comparative physiology of birds*. Ed. A.J. Marshall. Ac. Press. New York. Vol II (I) Chap. XIV: 30-48.

Puvion E. and G. Moyné. 1981. In situ localization of RNA structures. In: The Cell Nucleus. H. Busch Ed. Academic Press. New York. Vol. VIII (part 2): 59 - 115.

Puvion E. 1982. Presence of RNA in the interchromatin granules of cells treated with dichlorobenzimidazole riboside (DRB). *Biol. Cell.* **43**: 143 - 150.

Prestaycko A.W., Tonoto M. and H. Busch (1970). Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA. *J. Mol. Biol.* **47**: 505 - 515.

Raska I., Dundr M. and K. Koberna. 1992. Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by the electron microscopic affinity cytochemistry. *Cell Biology International Reports.* **16** (8): 771 - 788.

Raska I. and M. Dundr. 1993. Compartmentalization of the cell nucleus: case of the nucleolus. In: *Chromosomes today*. Volume 11. Chapman & Hall pub. London. 101-119 pp.

Rawles M.E. 1936. A study in the localization of organ-forming areas in the chick blastoderm of the head-process stage. *J. Exp. Zool.* **12**: 271 - 315.

Rawles M.E. 1971. Skin and its derivatives. In: *Analysis of development*. Willier, B.H. Weiss, P.A. and V. Hamburger. W.B. Saunders Co. pp. 499 - 519.

Reddy R. and H. Busch. 1978. U snRNAs of nuclear snRNPs. In: *The Cell Nucleus*. H. Busch. ed. Academic Press. New York. Vol VIII (Part 2): 261 - 305.

Risueño M del C. and F.J. Medina. 1986. The nucleolar structure in plant cells. En: *Revisión sobre biología celular*. Servicio Editorial, Universidad del País Vasco. Vol. 7: 1-145 pp.

Romanoff A.L. 1960. The avian embryo. Structural and functional development. Macmillan Co. New York. 305 pp.

Romanoff A.L. 1967. Biochemistry of the avian embryo. A quantitative analysis of prenatal development. Interscience Publishers. John Wiley and Sons. New York. 398 pp.

Romer A.S. 1973. Anatomía comparada (Vertebrados). 4a. Edición. Interamericana. México. 434 pp.

Rudnick D. and M.E. Rawles. 1937. Differentiation of the gut in chorioallantoic grafts from chick blastoderms. *Physiol. Zool.* **10**: 381 - 395.

Rudnick D. 1971. Teleosts and birds. In: Analysis of development. Willier, B.H., Weiss, P.A and V. Hamburger. W.B. Saunders Co. pp.297 -314

Rugh R. 1971. A guide to vertebrate development. Standard Book 8087 USA. 6th edition. 117 - 222.

Ruggieri A. 1972. Ultrastructural, histochemical and autoradiographic studies on the developing chick notochord. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* **138**: 20 - 33.

Ruiz i Altaba A., Prezioso V.R., DRNAell J.E. and T.M. Jesell. 1993. Sequential expression of HNF-3B and HNF-3a by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mechanisms of development.* **44**: 91 - 108.

Salisbury J.R. 1993. The pathology of the human notochord. *J. Pathol.* **171**: 253 - 255.

Scheer U., Messner K., Hazan R., Raska Y., Hausmann P., Falk H., Spiess E. and W. Franke. 1987. High sensitivity immunolocalization of double and single-stranded DNA by a monoclonal antibody. *Eur. J. Cell. Biol.* **43**: 358 - 371.

Scheer U. and R. Benavente. 1990. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *BioEssays.* **12**: 14 - 21.

Scherrer K., Latham H., and J.E. DRNAell. 1963. Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in the HeLa cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **49**: 240 - 248.

Shimada Y. 1971. Electron microscope observation on the fusion of chick myoblast in vitro. *J. Cell. Biol.* **48**: 128 - 131.

Shinohara H. y O. Tanaka. 1988. Development of the notochord in human embryos: Ultrastructural, histochemical and immunochemical studies. *Anat. Rec.* **220**: 171 - 178.

Sibon O.C.M., Humbel B.M., De Graaf A., Verkleij A.J. and F.M. Cremers. 1994. Ultrastructural localization of epidermal growth factor (EGF)-receptor transcripts in the cell nucleus using pre-embedding in situ hybridization in combination with ultra-small gold probes and silver enhancement. *Histochem.* **101**: 223 - 232.

Sogin M.L. 1989. Evolution of eukariotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Amer. Zool.* **29**: 487 - 499.

Spector D.L., Fu X.D. and T. Maniatis. (1991). Association between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* **10**: 3467 - 3481.

Stein G.S., Stein J.S. and L.J. Kleinsmith. 1975. Chromosomal proteins and gene regulation. *Scient. Amer.* **232** (2): 46 - 57.

Strudel G. 1967. Some aspects of organogenesis of the chick spinal column. In: *Experimental Biology and Medicine*. Vol. 1. Morphological and Biochemical aspects of cytodifferentiation. III. Special organogenesis: B. Cartilage. Hagen E. Edit. Bassel: Karger. 183 - 198 pp.

Swift H.1963. Cytochemical studies on nuclear fine structure. *Exptl. Cell Res. Suppl.* **9**: 54-67.

Thinakaran G. and J. Bag. 1991. Alterations in the expression of muscle-specific genes mediated by troponin C antisense oligodeoxynucleotide. *Experimental Cell Research*. **192**: 227 - 235.

Todorov I.T., Philipova P.N., Zhelev N.Z. and A.A.Hadjilov. 1988. Changes in nuclear matrix antigen during the cell cycle: Interphase and mitotic cells. *Biology of the Cell*. **62** (2): 105 - 110.

Van Driel R., Humbel B., and L.De Jong. 1991. The nucleus: A black box being opened. *J. Cell. Biochem*. **47**: 311 - 316.

van Holde K.E. 1989. *Chomatin*. Springer-Verlag, New York

Vázquez-Nín G.H., Echeverría O.M., Zavala G., Jiménez-García L.F., González M.A. y R. Parra. 1986. Relations between nucleolar morphometric parameters and pre-rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anat*. **126**: 141 - 146.

Vázquez-Nin G.H. y W. Bernhard. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatinian and Balbiani ring granules. *J.Ultrastruct. Res*. **36**: 842 - 860.

Vázquez-Nin G.H., Chavez B. and C.Tomas-Martin. 1973. A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. de Microscopie*. **16**: 243 - 246.

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O., Molina E. and J. Frago. 1978. Effects of ovariectomy and estradiol injection on the nuclear structures of endometrial epithelial cells. *Acta Anat*. **102**: 308 - 318.

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O. and J. Pedron. 1979. Effects of estradiol on ribonucleoproteic constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell*. **35**: 221 - 228.

Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel J.A. and O.M. Echeverría. 1980. Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell*. **39**: 143 - 146.

Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel J.A., Echeverría O.M., Parra M.R. and L.F. Jiménez-García. 1983. Changes in the nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *Biol. Cell.* **48**: 17 - 24.

Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Lesser G. and T.E. Martin. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma.* **99**: 44 - 51.

Villee C.A., Walker W.F. and R.D. BRNAes. 1977. *General Zoology*. W.B.Saunders Co. 5th de. Philadelphia: 1 - 933 pp.

Walter P. 1989. The membranes of a eukariotic cell. *Amer. Zool.* **29**: 501 - 510.

Wang T.Y. and N.C. Kostraba. 1978. Proteins involved in positive and negative control of chromatin function. In: *The Cell Nucleus*. Ed. H. Busch. New York. Vol IV (part A): 289 - 317.

WRNAer J.R., Soeiro R., Birnboim H.C., Girard M. and J.E. DRNAell. 1966. Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* **19**: 349 - 361.

Wassef M. 1979. A cytochemical study of the interchromatin granules. *J. Ultrastruc. Res.* **69**: 121-133.

Watson M.L. 1958a. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophysic. and Biochem Cytol.* Vol 4: 475 - 478.

Watson M.L. 1958b. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* Vol 4: 727 - 729.

Watson M.L. 1962a. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.* **13**: 162 - 167.

Watson J.D. 1962b. La participación del RNA en la síntesis de proteínas. En: *Antología de Biología Molecular. Lecturas Universitarias. Numero 18. UNAM.* 167 - 185.

Whittaker R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science.* **163:** 150 - 160.

Yasuo H. and N. Sato. 1994. An ascidean homolog of the mouse *Brachyury (T)* gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Develop. Growth & Differ.* **36 (1):** 9 -18.

Zavala G., Aguilar X., Jiménez-García L.F., Echeverría O.M. and G.H. Vázquez-Nin. 1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of muscle cells in the chick embryo. *Biol. Cell.* **76:** 159 - 165.

Zieve G. and S. Penman. 1976. Small RNA species of the HeLa Cell: Metabolism and subcellular localization. *Cell.* **8:** 19 - 31.