

41



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"VARIACIONES DE LOS GRANULOS INTERCROMATINIANOS (GIC) DE LOS NUCLEOS INTERFASICOS DE NEUROBLASTOS DE EMBRION DE POLLO EN VARIAS ETAPAS DEL DESARROLLO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
PABLO FABIAN MOLINA FONSECA



DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
2002
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Variaciones de los gránulos intercromatinianos (GIC) de los núcleos interfásicos de neuroblastos de embrión de pollo en varias etapas del desarrollo.

realizado por Pablo Fabián Molina Fonseca

con número de cuenta 9755920-3, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

GHV

Propietario

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Olga M. Echeverría

Propietario

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Guadalupe

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Luis Felipe

Suplente

Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno

Lourdes

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

"Al abrir mis ojos esta ahí, al cerrarlos también,
es como una roca a la que me apego cuando tengo miedo,
es como un farol que alumbró mi camino,
un ángel que marca mi destino.
Mi mejor amiga, mi dador de vida.
La eterna y dulce sonrisa, mi bella escultura,
Simplemente; mi madre" (J.S.E.)

Mija y Youshi, para ustedes con todo el amor del mundo, gracias por todo, por formar la familia que tenemos, por preocuparse siempre por mí, por desvelarse conmigo, por cuidarme, por quererme, pero sobre todo, por ser mis madres.

A mis tíos, Peque y Peluco gracias por todos los consejos de la vida, por su apoyo, ayuda incondicional y por quererme como a uno más de sus hijos.

A mis hermanos, Andrés, Gabe y Quetzalli, gracias por todo, los quiero mucho.

A Julio, Paty, Ana y Ale Labastida, por todos los bellos momentos que han compartido conmigo, ahora yo comparto este logro con ustedes.

A Marcela y mis primos Loredo, por recorrer conmigo el camino también como parte de mi familia.

A las "Guacamayas" por haberme permitido crecer con todas ustedes, por los consejos y tips de ayuda, por la paciencia y por formar parte de este trabajo.

Por último y no por eso menos importante, un agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo a lo largo de mi vida académica y mi vida personal.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin por la dirección de este trabajo, así como por las valiosas lecciones brindadas durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Olga Echeverría Martínez, por el apoyo recibido durante la investigación del presente trabajo y permitirme entrar a su laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla, por su valiosa ayuda, sin la cual este trabajo no hubiera salido adelante, por los consejos que me dio siempre, por la paciencia que tuvo hacia mi, por la dedicación y el empeño que me brindó desde el primer día, por la preocupación y esmero, por ser mi guía en el mundo de la Microscopía Electrónica, por su sinceridad y honestidad, pero sobre todo, por su amistad. Guadalupe, mil gracias!!!!!!

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por aceptar ser parte de jurado y la revisión de este trabajo, por ser una gran persona, por la ayuda a lo largo de la carrera y por iniciarme en el camino de la Microscopía, muchas gracias.

A la Dra. Lourdes Agredano, por aceptar ser parte del jurado y la revisión de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

A mis amigos de la Universidad: Marco, Fernando, Arturo, Roberto, Elías y Marco, por dejarme recorrer con ustedes esta aventura, por los momentos de triunfo y alegría. A mi amiga Ana "Anushka" Wegier, por hacer mucho mas amena la carrera, mil gracias niña.

Índice

RESUMEN - ABSTRACT	I
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 NÚCLEO CELULAR INTERFÁSICO	2
I.1.A. Cromatina	3
I.1.B. Fibras pericromatinianas (FPC)	5
I.1.C. Fibras Intercromatinianas (FIC)	7
I.1.D. Gránulos Pericromatinianos (GPC)	7
I.1.E. Gránulos Intercromatinianos (GIC)	8
I.1.F. Nucleolo	10
I.2. SISTEMA NERVIOSO (DESARROLLO)	13
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIAL	21
IV. MÉTODO	23
IV.1.A. Fijación	23
IV.1.B. Lavados	23
IV.1.C. Deshidratación	24
IV.1.D. Pre-inclusión	24
IV.1.E. Inclusión	25
IV.1.F. Corte	25
IV.1.G. Contraste	26
IV.1.H. Obtención de datos	26
V. RESULTADOS	29
v. 1. Pollos de 2 días	29
v.2. Pollos de 4 días	33
v.3. Pollos de 7 días	39
v.4. Pollos de 9 días	43
v.5. Pollos de 12 días	49
Gráficas	56
VI. DISCUSIÓN	66
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

Los gránulos intercromatinianos (GICs) son partículas ribonucleoproteicas intranucleares que contienen ARNs de bajo peso molecular ricos en uracilo (snRNP). Estas snRNP son esenciales en el proceso de *splicing* que da como resultado la maduración de los mARNs y se les conoce como factores de *splicing*.

En este trabajo se estudian las variaciones de los GIC de los núcleos interfásicos en células nerviosas de embrión de pollo en varias etapas del desarrollo, por medio de microscopía electrónica utilizando la técnica convencional y la técnica preferencial para RNP's.

Los resultados indican que hay una disminución en la densidad de los GIC en el núcleo durante el desarrollo y una tendencia a la formación de cúmulos en etapas del desarrollo avanzadas, lo que refuerza la idea de que estas partículas están relacionadas con el almacén de snRNP.

ABSTRACT

The Interchromatin granules (ICG) are intranuclear ribonucleic particles that have low molecular weight RNAs that are rich in uracil (snRNP). These snRNP are essential in the splicing process that gives as a result mature mRNA.

In this thesis, the variation of the ICG of the interphase nucleus of nerve cells of the chicken embryo in several stages of development have been studied, using Electron Microscopy complemented by conventional and the preferential techniques for RNP.

Results indicate that there is a loss of density of the ICG in the nucleus during development and a tendency to the formation of clusters in advanced stages of development. This supports the idea that these particles are related to the storage of snRNP.

I. INTRODUCCIÓN

Todas las criaturas vivas están formadas por células. Las formas más simples de vida son células solitarias que se propagan dividiéndose en dos. Los organismos superiores, son comunidades celulares en las que agrupamientos celulares realizan funciones especializadas y están unidos por complejos sistemas de comunicación.

Con la excepción de los virus, que podríamos llamar acelulares, todos los organismos terrestres pertenecen a una u otra de estas dos categorías; la de los organismos formados por células que carecen de núcleo, llamados *procariontes*, o bien la de los formados por células que poseen un núcleo, o sea los *eucariontes*. Ambos tipos de organismos pueden estar representados por formas unicelulares o pluricelulares; aunque los procariontes nunca llegan a alcanzar la complejidad y el tamaño de los eucariontes pluricelulares. De hecho, los procariontes típicos, como las bacterias, son organismos simples, en los cuales las moléculas de DNA se encuentran mezcladas con el resto del material del citoplasma. En ellos no existen mitocondrias, cloroplastos ni estructuras ciliares complejas. Las células procariontes, son de dimensiones reducidas y se nutren básicamente por absorción de material, aunque existe un número considerable de bacteria fotosintéticas; en general, los procariontes se reproducen por fisión o por otros mecanismos igualmente sencillos.

Las células eucariontes, en cambio, tienen una membrana nuclear que rodea dos o más cromosomas; así, el núcleo está compartimentalizado dentro de la célula y es el sitio donde se encuentra el material genético fundamental del organismo.

Las células eucariontes, o con núcleo, realizan todas las funciones propias de los seres vivos, se nutren, respiran, crecen, se reproducen y mueren.

I.1. NÚCLEO CELULAR INTERFÁSICO

Actualmente, uno de los aspectos fundamentales de la investigación del núcleo se encuentra en el entendimiento de su ultraestructura en interfase. La interfase es el período en que las células no se están dividiendo y existe gran actividad metabólica.

El núcleo en interfase es el más grande de los organelos intracelulares, mide entre 5 y 10 micras de diámetro, por lo que se ve fácilmente en los microscopios ópticos a bajos aumentos (50x o más).

Las funciones que se llevan a cabo en el núcleo están por un lado relacionadas con el funcionamiento general de la célula y el crecimiento, y por otro lado con la reproducción celular. Sin embargo, no hay límites estrictos entre las funciones existentes en células que se reproducen y las que no se reproducen.

El estudio precursor que sentó las bases del conocimiento sobre la distribución y estructura fina de los diversos componentes que contienen ribonucleoproteínas (RNP), fue realizado por Monneron y Bernhard en 1969 en el núcleo interfásico de células de mamíferos, utilizando el método de tinción preferencial (Bernhard, 1969). Esta técnica se basa en el uso de agentes quelantes que "blanquean" la cromatina y permiten el contraste de las estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) intracelulares, como son los gránulos pericromatinianos (GPC), los gránulos intercromatinianos (GIC), fibras pericromatinianas (FPC), fibras intercromatinianas (FIC) y cuerpos espiralados (ce).

Los núcleos en interfase en el ámbito de ultraestructura, muestran complejos de RNP bien definidos. De estos complejos los más conocidos y estudiados son los gránulos y fibras. Éstos, aparte de estar bien caracterizados morfológicamente, tienen gran correlación

bioquímica y funcional con respecto a la síntesis y procesamiento del RNAr (Hay, 1968; Bernhard y Granboulan, 1968). En el resto del núcleo interfásico se encuentra el gran espacio intercromatiniano. Esta es una zona no bien definida donde se localizan: la cromatina dispersa, los complejos de RNP extranucleolares, proteínas y otros metabolitos. Todo este conjunto de partículas es difícil de distinguir y diferenciar entre sí, cuando se utiliza la tinción ordinaria de Uranilo-plomo para la microscopía electrónica.

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

Los complejos morfológicos de las RNP extracelulares que se distinguen con la tinción con EDTA y que resaltan son: las fibras pericromatinianas (FPC), los gránulos pericromatinianos (GPC), los gránulos intercromatinianos (GIC) y los cuerpos espiralados (ce) (Fig. 1).

I.1.A. CROMATINA.

La cromatina es la denominación para el material nuclear rico en DNA. Es el término designado por Flemming en 1882 para el material del núcleo celular que toma tinciones básicas. El DNA, no se encuentra libre, sino que se encuentra asociado a dos clases de proteínas; las histonas y proteínas cromosomales no histónicas. Kossel en 1884, descubrió las histonas observando que estas proteínas básicas están unidas al DNA de la cromatina. Posteriormente,

Mirsky A. y Ris H., en 1951, descubrieron otro tipo de proteínas no histónicas también unidas al DNA.

La cromatina es un complejo de desoxirribonucleoproteínas (DNP), que forma una estructura llamada nucleosoma, la cual constituye la unidad básica de la estructura del cromosoma (Comings 1972). Los nucleosomas son las unidades fundamentales de organización sobre las que se construye el empaquetamiento de orden superior de la cromatina. Cada nucleosoma contiene ocho moléculas de histonas, dos copias de cada una de las H2A, H2B, H3 y H4. El espaciamiento de las cuentas del nucleosoma a lo largo del DNA define una unidad repetitiva de unos 200 pares de bases, de los cuales 146 están fuertemente unidos alrededor del núcleo de histonas y el resto sirve como elemento de enlace entre nucleosomas. La histona H1 no forma parte del núcleo del nucleosoma, pero suele estar unida al DNA de enlace. Las proteínas no histónicas, que comprenden una proporción menor que las histonas, están involucradas en los niveles superiores de empaquetamiento de la cromatina.

La cromatina en eucariontes se ha dividido de acuerdo a su estado de condensación durante la interfase en dos clases; la heterocromatina y la eucromatina. La heterocromatina es la forma condensada durante la interfase y por lo tanto, se considera inactiva transcripcionalmente. Está dispuesta en una banda de manera irregular en la periferia nuclear y nucleolar así como en grumos a través del nucleoplasma.

La configuración que posee la cromatina durante la interfase está relacionada con su actividad metabólica, asumiendo dos patrones morfológicos, los cuales se pueden reconocer por medio de la tinción con amina de osmio o con PTA (ácido fosfotúngstico) para microscopía electrónica. Las zonas de cromatinas condensadas (heterocromatina) en el núcleo en interfase, que corresponden a DNA inactivo, en la mayor parte de las células tienen localizaciones características; se observa la denominada cromatina periférica como densos cúmulos de

tamaño variable, que están en contacto con la envoltura nuclear y la cromatina asociada a nucleolo, que lo rodea como una lámina discontinua de espesor irregular. Eventualmente se observan prolongaciones de cromatina hacia dentro del mismo.

La eucromatina designa las partes cromosómicas que corresponden a cromatina dispersa, que son sitios donde el DNA es activo transcripcionalmente. Trabajos de citología ultraestructural han demostrado que una gran proporción del RNA extranucleolar es sintetizado en las regiones donde la cromatina posee la forma no condensada (Derenzini 1977).

La proporción de la heterocromatina presente en el núcleo se modifica de acuerdo a la actividad transcripcional. En las células eucarióticas, un promedio aproximado del 90% de la cromatina es transcripcionalmente activa en un tiempo dado, pero toda la cromatina inactiva no puede estar en estado condensado (Manuelidis 1990 y Stuurman 1992). La cromatina en la mayoría de las células mantiene un grado de compactación en particular. En las células nerviosas (Vázquez-Nin y col, 1983) y musculares (Zavala y col. 1992) del embrión de ave, el grado de compactación de la cromatina varía a través de la serie de transformaciones que define gradualmente el proceso de diferenciación.

I.1.B. FIBRAS PERICROMATINIANAS (FPC).

Las fibras pericromatinianas fueron descritas en 1969 por Monneron y Bernhard. Son fibras que aparecen irregularmente principalmente en la vecindad del borde de la cromatina condensada, llamada comúnmente región pericromatiniana, que representa la región nucleoplásmica donde se lleva a cabo la mayor parte de la síntesis del RNA nuclear heterogéneo (RNAhn) (Fakan 1978, Novello 1978). Monneron y Bernhard en 1969, sugirieron

que estas fibras pueden representar la expresión morfológica de la transcripción del RNA extranucleolar.

Por medio de estudios autorradiográficos, exponiendo a células a pulsos cortos con uridina tritiada, se observó un marcaje preferencial en las regiones donde se localizan las fibras pericromatinianas, en el borde de la cromatina condensada (Fakan y Bernhard 1971). El número de las fibras pericromatinianas, se incrementa cuando se activa la transcripción, como fue demostrado al aplicar cortisona a hepatocitos. Por el contrario, el bloqueo de síntesis de RNA por medio de α -amanitina induce una reducción en el número de fibras (Petrov y Sekeris 1971, Simard, 1978, Derenzini 1978). Estos estudios permitieron concluir que las fibras pericromatinianas representan el sustrato morfológico donde se localiza el RNA recién sintetizado (Petrov y Bernhard 1971).

Debido a que las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP's) y el factor de "*splicing*" SC35 se localizan en las fibras pericromatinianas, se ha propuesto que en estas estructuras ribonucleoproteicas, que son los sitios de transcripción (Puvion E. y col. 1996), se efectúa el procesamiento postranscripcional temprano, que involucra el proceso de "*splicing*" (Spector y col. 1991).

Esto se demostró mediante el uso de anticuerpos específicos para diferentes componentes nucleares, empleados en inmunolocalizaciones en el ámbito de microscopía electrónica.

I.1.C. FIBRAS INTERCROMATINIANAS (FIC).

Se ha observado que aparecen en el espacio intercromatiniano como resultado de la migración de las fibras formadas en las áreas pericromatinianas (Nash 1975; Puvion y Moyne 1978). Se ha postulado que éstas podrían representar el sustrato morfológico de los hnRNAs libres en el nucleoplasma o de migración al citoplasma (Busch 1983).

I.1.D. GRÁNULOS PERICROMATINIANOS (GPC).

Fueron observados por Swift (1962) y Watson en 1962 (citado por Monneron y Bernhard 1969). Son estructuras ribonucleoproteicas de entre 30 y 50 nm de diámetro, con un halo claro, que usualmente se localizan en la periferia de los grumos de cromatina compacta (Monneron y Bernhard 1969). Están formadas por fibras de 12 a 15 Å, enrolladas irregularmente y embebidas en una matriz difusa (Vázquez-Nin y Bernhard 1971).

La naturaleza ribonucleoproteica de los gránulos se comprobó por medio de digestiones enzimáticas en combinación con la técnica del EDTA (Bernhard 1969). Se ha observado que los gránulos pericromatinianos son capaces de desenrollarse en forma de fibras y migrar del núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares (Monneron y Bernhard 1969).

Estas partículas son consideradas como estructuras universales de eucariontes superiores relacionadas con el transporte y almacenamiento de RNAm maduro (Jiménez-García y col. 1989), hipótesis que ha sido apoyada en numerosos experimentos con drogas que interfieren el metabolismo del RNA, ya sea inhibiendo la síntesis de RNAn y/o reduciendo la eficiencia del proceso de maduración del RNA, donde se ha observado una alteración en la producción y distribución de los gránulos pericromatinianos.

Se han empleado modelos embrionarios para estudiar el comportamiento de dichas partículas durante la diferenciación. A partir de estos estudios, se ha detectado variación de los GPC, durante la diferenciación celular en estados de desarrollo bien definidos. En motoneuronas durante el desarrollo de las terminaciones sinápticas, se ha detectado un aumento en la frecuencia de los gránulos pericromatinianos, cuando se establecieron los contactos sinápticos entre las neuronas, demostrando que el aumento de los gránulos está relacionado con eventos definidos durante la transformación de los neuroblastos en neuronas (Vázquez-Nin y col. 1980).

I.1.E. GRANULOS INTERCROMATINIANOS (GIC).

Los gránulos intercromatinianos son estructuras polimórficas, con un diámetro de entre 20 y 25nm. Se pueden encontrar como cúmulos distribuidos irregularmente y se les localiza en el espacio intercromatiniano. Son de forma irregular y están unidos entre sí por pequeñas fibras que forman una red fina en el espacio intercromatiniano (Monneron y Bernhard 1969). Estas estructuras fueron descritas por Swift en 1963, pero fue en 1969 que Monneron y Bernhard describen su naturaleza ribonucleoproteica.

Los estudios citoquímicos comprobaron la resistencia de los gránulos intercromatinianos a la pronasa seguida de la RNasa, así como también se comprobó que son altamente contrastados por el método de Bernhard (1969), preferencial para RNP. Esto sugiere que los gránulos intercromatinianos contienen un RNA bien protegido por un resistente componente proteico. Wassef (1979) demostró histoquímicamente que los gránulos contienen una gran cantidad de fosfoproteínas.

Se sabe que muchos de los componentes que son esenciales para el *splicing* están presentes en los gránulos intercromatinianos, o al menos asociados a ellos. Estos incluyen los snRNAs U1 y U2 (Fakan y col. 1984; Huang y Spector 1992), el SC35 (Fu y Maniatis 1990), RNA con poly A (Carter 1991) y pre-mRNA específicos (Huang y Spector 1991).

La localización de los factores de *splicing* es dinámica e involucra el tráfico entre subestructuras nucleares (Jiménez-García y Spector 1993). El uso de la proteína fusionada SF2 (factor de *splicing 2*) y GFP (proteína verde fluorescente) ha permitido observar *in vivo* esta organización, corroborando que los factores de *splicing* se dirigen desde los cúmulos de gránulos intercromatinianos hacia los sitios de transcripción activa (Misteli y col. 1997).

Los gránulos intercromatinianos se han estudiado ampliamente en células animales tanto en condiciones normales como experimentales. Se ha demostrado que la presencia de algunas proteínas nucleolares en ellos corrobora la relación entre los gránulos intercromatinianos y el nucleolo (Clavenger 1984).

También existen evidencias de que los gránulos intercromatinianos son parte de una matriz proteica o matriz nuclear (Comings y Okada 1976; Miller 1978; Spector 1983). Este componente nuclear no solamente serviría de soporte a los núcleos interfásicos, sino que tal vez también sirva como un sendero para el transporte de productos hacia el citoplasma (Busch 1977).

Se ha demostrado que forman parte de la matriz nuclear interna y se supone que son un sitio de acumulación de snRNPs y/o maduración y transporte de rRNPs (Spector 1983).

Estudios realizados han demostrado que están asociados con RNAs intranucleares de tamaño pequeño, ricos en residuos de uridina (UsnRNA) (Spector 1983; Fakan 1984), las cuales

han sido implicadas en el procesamiento (Lener 1980; Rogers 1980), en el transporte de hnRNA (Prestayko 1970) o posiblemente tienen un papel estructural en la arquitectura nuclear (Fakan 1984).

I.1.F. NUCLEOLO.

El nucleolo no tiene una membrana especial que lo delimite, pero se encuentra rodeado de cromatina perinucleolar, la cual está conectada con regiones de cromatina intranucleolar de manera continua.

El nucleolo es el sitio donde se encuentra el DNA que servirá como molde para sintetizar las moléculas precursoras de los RNA ribosomales. A las zonas donde se transcriben estos RNA que forman parte de los ribosomas, se denominan regiones organizadoras nucleolares.

El nucleolo, desde el punto de vista estructural, se puede dividir en cuatro áreas (Spector 1993): a) Componente fibrilar denso, b) centros fibrilares, c) área granular o componente granular y d) cromatina nucleolar.

Los centros fibrilares están rodeados por el componente fibrilar denso, lo que los hace estructuras independientes de los demás componentes. En la periferia de los centros fibrilares se encuentra el DNA que forma la región organizadora nucleolar (NOR) (Spector D.,1993). Este DNA, es la matriz de la cual se transcriben las moléculas precursoras de los RNA ribosomales 18S y 28S, en todas las células animales, vegetales y fúngicas (Jiménez-García, 1993). El componente fibrilar denso y los centros fibrilares llevan a cabo la síntesis de RNA ribosomales (Shaw, 1995).

En el componente granular, se encuentran partículas de 15 a 20 nm de diámetro, las cuales corresponden a los RNA's pre-ribosomales en diversos estados de maduración, así como gran cantidad de proteínas enzimáticas y no enzimáticas, siendo éste el sitio específico para la combinación de RNA con las proteínas nucleolares específicas (Busch H., 1977; Vázquez-Nin, 1993; Hernández-Verdúm, 1993). El componente granular es el sitio de almacenamiento o acumulación de las moléculas pre-ribosomales (Spector, 1993).

La cromatina nucleolar condensada es transcripcionalmente inactiva, y se encuentra esparcida entre la cromatina laxa (Delgado M, 1995).

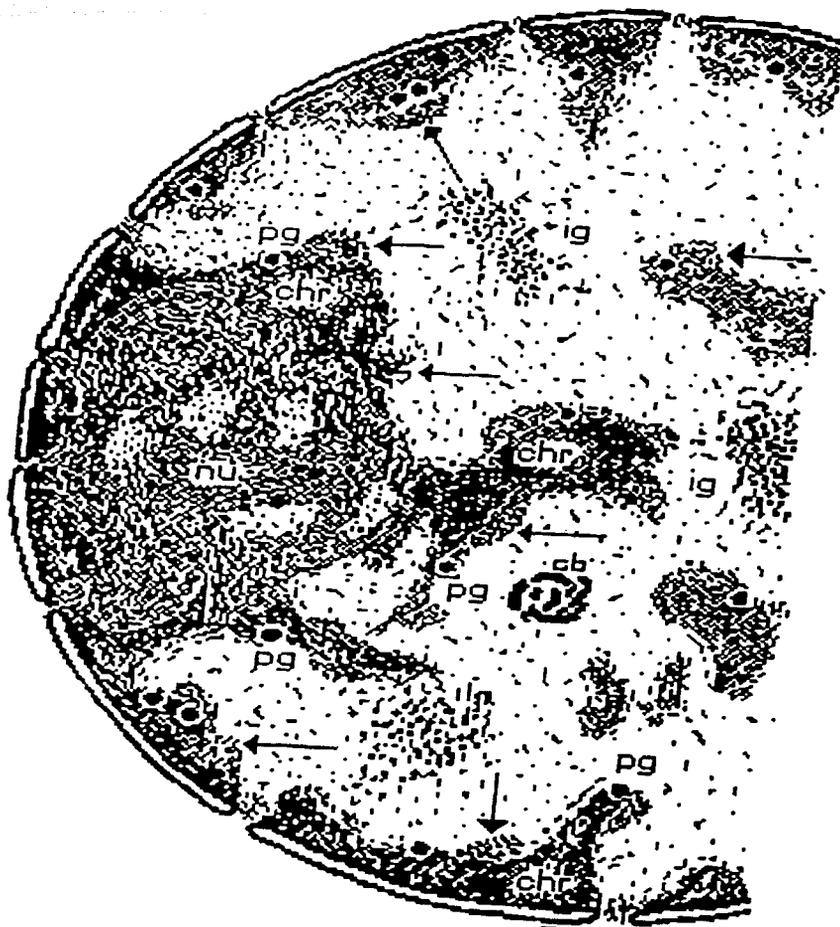


Fig. 1. Estructura del núcleo en interfase de célula diferenciada contrastada con la técnica del EDTA, preferencial para ribonucleoproteínas. Las regiones sombreadas corresponden a masas de cromatina compacta (chr). En el espacio intercromatiniano (fondo blanco) sobresalen diferentes estructuras ribonucleoproteicas, el nucleolo (nu), las fibras pericromatinianas (→), los gránulos pericromatinianos (pg), los gránulos intercromatinianos (ig) y los cuerpos espiralados (cb). (Tomado de Monneron A. y Bernhard W., 1969).

I.2. SISTEMA NERVIOSO (DESARROLLO)

La morfología del tejido nervioso en los vertebrados, se inicia en una etapa temprana del desarrollo embrionario, hecho importante por la función que va a tener casi desde el principio, al constituirse en un sistema integrador de varias funciones generales. Por lo cual, desde el final de la gastrulación (en donde se establecen las tres capas embrionarias primordiales) se integra la placa neural, la cual es el primer esbozo del sistema nervioso, formada por la diferenciación de células ectodérmicas de la línea media del dorso del embrión.

El sistema nervioso central de los vertebrados se desarrolla a partir del esbozo primario, el tubo neural. El tubo, al formarse, tiene un diámetro desigual; su extremo anterior está dilatado, la cavidad es más ancha y las paredes son más gruesas que en la parte posterior del tubo. Esto prefigura el desarrollo del encéfalo a partir de la parte anterior del tubo neural y el desarrollo de la médula espinal a partir de la parte posterior.

El tubo neural, experimenta un alargamiento muy considerable, paralelo al alargamiento general del embrión, especialmente en su mitad posterior. Como este alargamiento se hace a expensas del grosor del tubo, tiende a aumentar la diferencia de volumen entre el encéfalo y la médula espinal.

Las partes posteriores del tubo y de la placa neural experimentan una transformación muy peculiar. En esta zona, la placa neural llega hasta el blastoporo. Cuando la parte posterior del tubo neural se alarga, lo hace en mayor grado que la parte ventral del embrión. El extremo posterior del tubo neural se desplaza, por lo tanto, más allá del blastoporo. La mayor parte del tubo neural, desde su extremo craneal hasta el ápice de la curvatura, se diferencia formando el sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal). No obstante, la parte curvada del tubo,

la parte situada entre el ápice del esbozo y el blastoporo, se diferencia como tejido muscular de la región caudal (en Balinsky B., 1978).

Durante el período de tubo neural, se observan cambios morfológicos notables, como: la separación del ectodermo, el aumento de grosor de su pared y conjuntamente la formación de las crestas neurales. Además, en la periferia de la pared del tubo, se distinguen algunas células de aspecto irregular, con núcleo grande, redondo, pálido y con nucleolo muy aparente (Martín y Langman, 1965). Estas células se diferencian funcionalmente de las denominadas matrices, y estas células corresponden a los primeros neuroblastos, que en el embrión de pollo aparecen aproximadamente en la etapa de 22 somitas, (la cual corresponde al estadio 14 de Hamburger y Hamilton: "HH14" y a un tiempo de 48 a 53 horas de desarrollo) (Martín y Langman, 1965).

La médula espinal en las fases posteriores embrionarias es un tubo cuyo lumen o conducto central tiene la forma de una rendija dorso ventral. El lumen está revestido por una capa de células epiteliales que corresponden al epéndimo primitivo. En los extremos dorsal y ventral del conducto central en forma de rendija, el epéndimo forma una placa dorsal y una placa ventral respectivamente. Lateralmente, hay proliferación de las células de la médula espinal que dan origen a la masa de células nerviosas y a las células neurogliales de la médula espinal.

Las paredes de la médula espinal se engrosan lateralmente y, dado que la proliferación de las células continúa a ambos lados de la médula espinal, el crecimiento de las partes laterales supera pronto al crecimiento de las paredes dorsal y ventral. Ventralmente, el tejido de la médula espinal crece hacia abajo y deja en medio una estrecha rendija, la fisura ventral media. Dorsalmente, el conducto central queda comprimido; las capas ependimales de los lados derecho e izquierdo se fusionan y forman una estructura semejante a una membrana, el septo dorsal medio, que separa las masas de tejido nervioso situadas al dorso del conducto central,

de la misma manera que la fisura central media separa el tejido nervioso situado al vientre del canal central.

Mientras los cambios macroscópicos de la forma de la médula espinal y de su conducto central están teniendo lugar, las células situadas en las paredes de la médula espinal experimentan un conjunto de transformaciones que conducen finalmente al desarrollo de la médula espinal como parte funcional del sistema nervioso. Cuando el tubo neural empieza a formarse, sus paredes están constituidas por una capa única de epitelio neural pseudo-estratificado. Todas las células del epitelio alcanzan la superficie interna del tubo, pero los núcleos de las células se disponen a diferentes distancias del lumen, dando la impresión de diferentes horizontes de células. Todas las células están ancladas en la superficie interna del tubo, mediante conexiones intercelulares en la forma de desmosomas. Todas las células neuroepiteliales en esta fase son capaces de crecimiento y proliferación y, en estos aspectos, son equivalentes entre sí (Fujita 1963; Watterson 1965). Esto se ha demostrado suministrando a las células timidina radiactiva. Se ha observado que al cabo de un periodo de 8 a 10 horas, todas las células del neuroepitelio absorben timidina, lo cual constituye una clara señal de que cada célula se prepara para la división mitótica. Cuando cualquiera de las células se acerca a la mitosis se redondea y al hacerlo se dirige hacia el lumen del tubo donde se conecta mediante desmosomas a otras células situadas en dicho nivel. Por consiguiente, todas las fases de la mitosis desde la profase avanzada hasta la telofase, se ve que ocurren únicamente cerca del lumen del tubo neural. Una vez que la mitosis es completa, las dos células hijas se alargan de nuevo y pasan a ser indistinguibles de las otras células del neuroepitelio. De esta manera, la proliferación de las células neuroepiteliales aumenta el número de células del tubo neural y asimismo incrementa el volumen global del tubo.

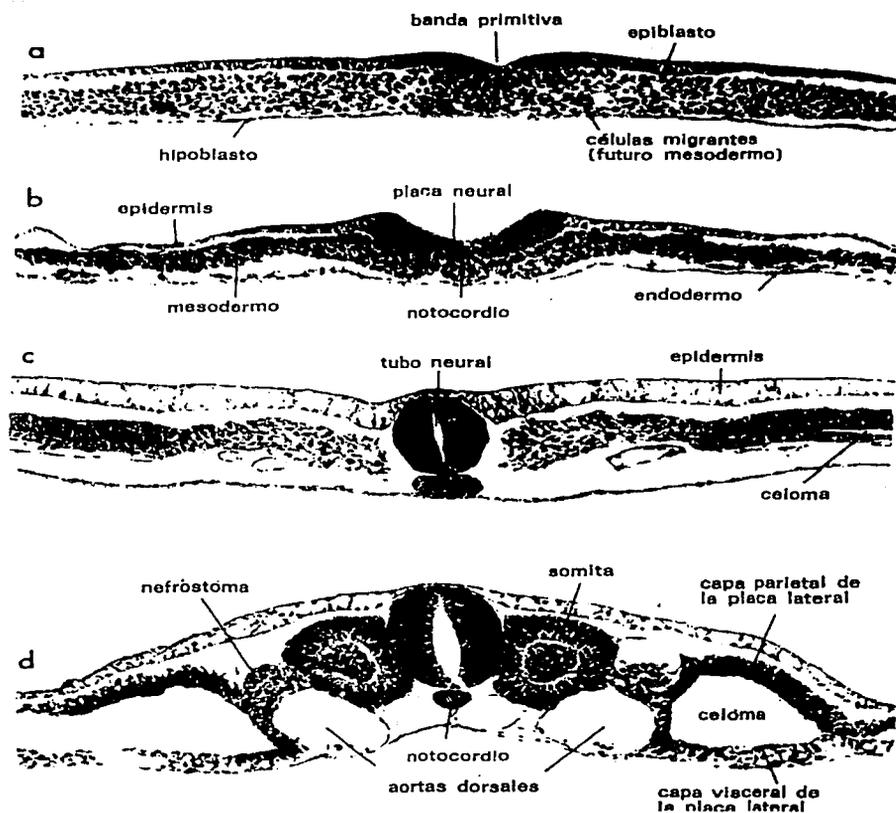


Fig. 2.

Fases del desarrollo temprano del embrión de pollo. (Secciones transversales). A) banda primitiva; B) fase de la placa neural; C) fase del tubo neural; D) esbozos primarios de los órganos.

En una fase posterior, algunas de las células del neuroepitelio empiezan a perder su unión con otras células en la superficie interna del tubo neural, se desplazan hacia fuera, terminan por emerger del neuroepitelio pseudo estratificado. La migración hacia fuera está acompañada por la diferenciación de estas células en forma de neuronas.

Aunque algunas células empiezan a migrar antes de mostrar signos de diferenciación, lo más común entre las células es que empiecen a diferenciarse incluso antes de abandonar el neuroepitelio (Watterson 1965). El extremo reducido de la célula neuroepitelial cilíndrica se convierte en neurita y desarrolla un sistema de neurofibrillas que pueden teñirse por el método del nitrato de plata. El extremo interno de la célula también desarrolla neurofibrillas y se conoce como "dendrita transitoria". La célula adquiere por tanto una manifiesta polaridad.

Las células que migran a partir del neuroepitelio se acumulan inmediatamente debajo de lo que se convertirá en la materia blanca de la médula espinal y forman una capa poco compacta de células denominada manto. Además de la migración primaria hacia fuera, las células nerviosas pueden experimentar migraciones más complicadas hacia arriba y hacia abajo, a lo largo del tubo neural, que forman concentraciones de células nerviosas a las que los anatomistas conocen por diversos núcleos del cerebro y de la médula espinal. En el manto, las neuronas alcanzan su diferenciación funcional plena. La "dendrita transitoria" se reduce, de manera que temporalmente las futuras neuronas son unipolares, pero pronto se forman nuevas dendritas que ya son definitivas. Después de la producción de las neuronas, otra migración de células a partir del neuroepitelio da lugar a los astrocitos, las células de las neuroglías que nunca adquieren función nerviosa. El neuroepitelio residual se convierte en el epéndimo.

La transformación de las células matrices en neuroblastos parte de un punto crítico, que es la incapacidad de incorporar timidina (Fujita, 1963). Este autor, describe que en los núcleos hay una mayor dispersión de cromatina y los nucleolos son más prominentes. Los cambios, se acentúan conforme transcurre el desarrollo.

Las células nerviosas o neuronas están formadas por un cuerpo celular o pericarion, que contiene el núcleo, del cual parten las prolongaciones. De acuerdo con el tamaño y la forma de

sus prolongaciones, la mayoría de las neuronas pueden ser clasificadas en uno de los siguientes tipos:

- a) Neuronas multipolares, que presentan más de dos prolongaciones celulares.
- b) Neuronas bipolares, poseedoras de una dendrita y un axón.
- c) Neuronas pseudomonopolares, con sólo una corta prolongación que se bifurca inmediatamente, dirigiendo una rama hacia la periferia y otra hacia el SNC.

La gran mayoría de las neuronas de los vertebrados son multipolares. Neuronas bipolares se encuentran en los ganglios coclear y vestibular, en la retina y en la mucosa olfatoria. Las neuronas pseudomonopolares se encuentran en los ganglios espinales, que son ganglios sensitivos situados en las raíces dorsales de los nervios espinales.

Las neuronas motoras controlan órganos efectores, las fibras musculares. Las neuronas sensoriales reciben estímulos sensoriales del medio ambiente y del propio organismo. Las interneuronas establecen conexiones entre otras neuronas, formando circuitos completos.

Una etapa fundamental en la ontogenia de la función neural con repercusión directa en la diferenciación de los neuroblastos, es el establecimiento de los contactos especializados, es decir, las sinapsis. En la región cervical de la médula espinal del embrión de pollo, las primeras sinapsis se observan entre las 60 y 72 horas del período de incubación. (Oppenheim, 1975.). El crecimiento precoz de las dendritas de las neuronas motoras del asta anterior, está dirigido en gran parte hacia la zona marginal o futura sustancia blanca.

La diferenciación neuronal implica, por un lado, la pérdida de la división celular (ésta se pierde cuando se forma el neuroblasto a partir de la célula multi-potencial), con el consecuente retardo en la expresión de los genes involucrados en la duplicación del material celular y también, el gran aumento de la expresión de los genes relacionados con las características

propias de todas las neuronas diferenciadas, así como de los genes involucrados en las propiedades fenotípicas de cada tipo neural como pueden ser: a) la arborización dendrítica; b) el alcance del axón; c) el transmisor sináptico; d) los receptores de membrana, etc., y aún de los genes referentes a la posición de la neurona dentro del órgano. (Jobling S., 1987).

La síntesis de este gran conjunto de proteínas característico del estado de diferenciación neuronal, obliga a cambios de la expresión genética que se van suscitando en el tiempo, hasta alcanzar la diferenciación final. La mayoría de las neuronas maduras mantienen altos niveles de síntesis de RNA y proteínas, como se deriva de la incorporación de nucleótidos y aminoácidos marcados, así como de indicadores morfológicos (núcleos grandes con abundante cromatina laxa y nucléolos de gran tamaño).

II. OBJETIVOS

- a) Estudiar la relación entre la cromatina y los gránulos intercromatinianos en neuroblastos de embrión de pollo a través de diversos métodos de tinción para ribonucleoproteínas.
- b) Demostrar si existe una variación de la densidad de gránulos intercromatinianos y de la cromatina.
- c) Determinar el porcentaje del volumen nuclear ocupado por los cúmulos de GIC.
- d) Determinar si el tamaño de los núcleos de los neuroblastos se relaciona con las posibles variaciones de los otros parámetros.

III. MATERIAL

El material biológico que se estudió consistió en embriones de pollo de 2, 4, 7, 9 y 12 días de incubación. Las muestras de tejido se tomaron de la mitad ventral de la región cervical de la médula espinal (Fig. 3) de los embriones de pollo.

Se eligió este material por que está bien estudiado desde varios puntos de vista: diferenciación de los neuroblastos, sinaptogénesis, mielinización, ontogenia de la actividad bioeléctrica, motilidad embrionaria y muerte celular espontánea durante el desarrollo.

Esquema del área de estudio.

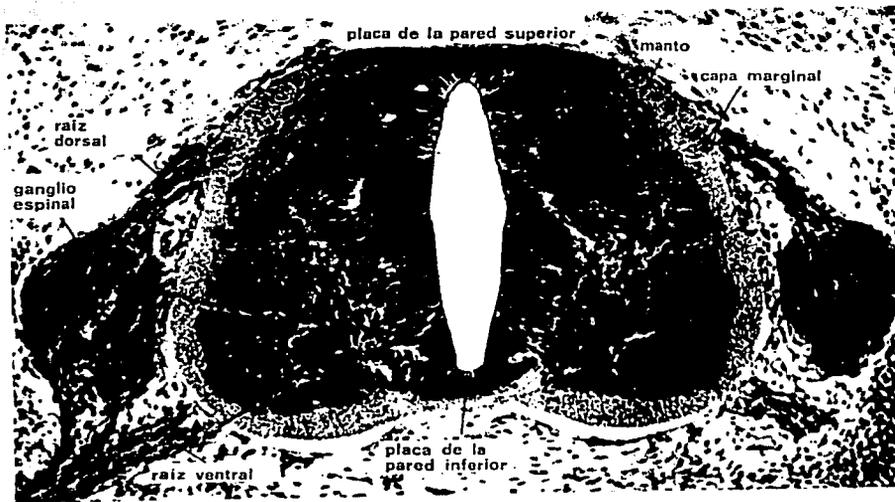


Fig. 3.- Sección transversal de la médula espinal de un embrión de pollo. (Tomado de Balinsky B., 1978).

Esquema de uno de los lados del epéndimo

La zona de estudio se basa en las astas anteriores de este esquema.

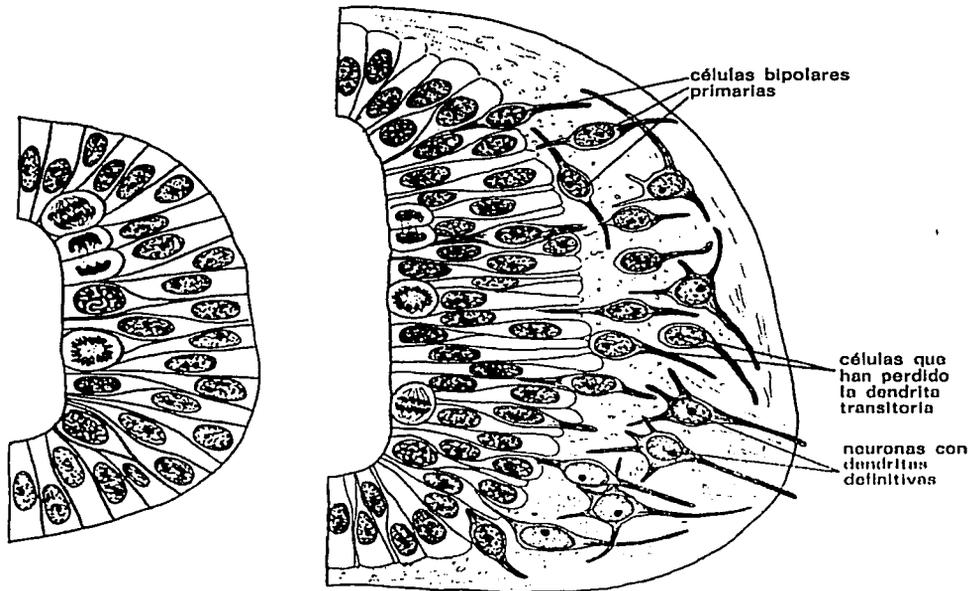


Fig. 4.- Fases del desarrollo de las neuronas del sistema nervioso central. 1) Fase de proliferación de las células neuroepiteliales. 2) Fase posterior, en donde las células individuales se desplazan hasta el manto y desarrollan neuritas y dendritas. (Tomado de Balinsky B., 1978),

IV. MÉTODO

IV.1. PARA LAS MUESTRAS DE EPÓN.

IV.1.A. FIJACIÓN.

Lo primero que se llevó a cabo fue romper el cascarón del huevo para así poder localizar al embrión de pollo. Una vez localizado se le inyectó una solución fijadora, la cual estaba constituida por formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en un amortiguador de fosfatos con un pH de 7.2, esto con la finalidad de que circulara el fijador por todo el organismo y se tuviera una buena fijación de todo el tejido.

Posteriormente, se cortó la región cervical del embrión (tejido de interés). A estos pedazos de tejido obtenidos, se les hicieron unos pequeños cortes para asegurar que el fijador penetrara perfectamente en él. Posteriormente, el tejido fue sumergido en pequeños frascos de vidrio con fijador, en el cual permanecieron por una hora y media, con el objeto de conservar la estructura fina de las células o su ultraestructura y alterar en el menor grado posible su composición.

IV.1.B. LAVADOS.

Una vez transcurrida la hora y media, se enjuagaron con el amortiguador de fosfatos, tres enjuagues de 5 minutos cada uno, para seguir con la deshidratación a través de alcoholes (etanol) graduales.

IV.1.C. DESHIDRATACIÓN.

Una vez que se enjuagaron los tejidos, se llevó a cabo la deshidratación por medio de alcoholes graduales:

- un periodo de 10 minutos en etanol al 70%
- un periodo de 10 minutos en etanol al 80%
- un periodo de 10 minutos en etanol al 90%
- un periodo de 10 minutos en etanol al 96%
- tres periodos de 10 minutos cada uno en etanol absoluto

IV.1.D. PRE-INCLUSIÓN.

Con el fin de lograr una inclusión adecuada se realizó una preinclusión usando como agente intermediario al óxido de propileno, que sirve por un lado para deshidratar y por otro como solvente para la resina EPON, esto facilita la penetración de la resina al tejido.

Se hicieron dos cambios de 15 minutos cada uno en óxido de propileno, seguidos de un cambio de 24 horas en una solución 2:1 de óxido de propileno y EPON. Al cumplirse el tiempo, se cambió la solución por una cuya concentración fue 1:1 (óxido de propileno - EPON) por 12 horas.

Una vez cumplido ese tiempo, se llevó a cabo la inclusión en resina epóxica (EPON).

IV.1.E. INCLUSIÓN.

La inclusión es el proceso mediante el cual el tejido adquiere la consistencia necesaria para que pueda ser cortado. La resina funciona como soporte, la cual al polimerizar, adquiere una consistencia sólida y facilita el corte.

La mezcla de inclusión consistió en EPON con las siguientes proporciones:

EPON	5.8 g
DDSA (Anhidro dodecenil succínico)	3.2 g
NMA (Anhidro 2,3-metilnorbornendicarboxílico)	2.86 g
DMP (2,4,6-dimetil aminometifenol)	0.16 g

Para la polimerización de la resina, las muestras fueron colocadas en moldes planos, donde se orientó la muestra biológica para su mejor corte, se vertió la mezcla de inclusión y se incubó a 60°C por 24 horas, después de las cuales se dejaron a temperatura ambiente por unas horas para poder sacarlas de los moldes y comenzar su corte.

IV.1.F. CORTE.

Una vez obtenidos los bloques, se tallaron pirámides en el extremo de éstos, en donde se encontraba el tejido, y en un ultra microtomo se obtuvieron cortes semifinos, de un grosor aproximado de 160 nm, los cuales se montaron en un porta-objetos y se tiñeron con azul de toluidina para observarlos al microscopio óptico, esto para localizar zonas de interés para el estudio de este trabajo, que son las astas anteriores del tubo neural.

Una vez identificada la mejor zona del bloque, se redujo el área de la pirámide y se procedió a obtener cortes ultrafinos de aproximadamente 50 nm.

Una vez obtenidos los cortes ultrafinos en el ultra microtomo se montaron en rejillas de ranura para facilitar la observación al microscopio electrónico ya que no cuentan con barrotes que obstruyan el paso de los electrones a través del tejido.

IV.1.G. CONTRASTE

Los bloques de EPON fueron contrastados de dos formas:

- a) Acetato de Uranilo alcohólico por 1 hora y después Citrato de Plomo por 10 minutos.
- b) Se siguió la técnica de contraste preferencial para RNP's de Bernhard, con tiempos de: Acetato de Uranilo por 3 minutos, EDTA por 20 minutos y Citrato de Plomo por 3 minutos.

IV.1.H. OBTENCIÓN DE DATOS.

Las rejillas con cortes contrastados se observaron en un microscopio electrónico EM10 de donde se obtuvieron imágenes de video, fotografías y *video prints* de los núcleos de células del asta del tubo neural. Esto con el fin de, posteriormente, cuantificar con un programa de análisis de imágenes, el valor de la densidad numérica de los gránulos intercromatinianos.

Una vez obtenidas las imágenes en un *video tape*, se utilizó el programa de cómputo "*Imagenia 5000*" (*Biocom*) modificado por personal del Centro de Instrumentos de la UNAM (López-Velázquez G., *et al*, 1996), para hacer la cuantificación de los GIC. El área en donde se calculó la densidad de GIC fue de 21.5 micras² (μ^2) para todas las mediciones en cada uno de los casos.

El programa de cómputo se calibra con una medida estándar para evitar al máximo el error de medición. Posteriormente se comienza con el conteo de los GIC por imagen. Para esto

se recorre el *video tape* para que en un monitor de televisión normal, al cual se modificó el brillo y contraste para una mejor imagen, pasara la imagen y posteriormente el programa de cómputo digitalizara la imagen en el monitor de la computadora. Una vez digitalizada la imagen, con el *mouse* de la computadora se comienzan a marcar los GIC. Una vez señalados, se traza el área de estudio, que para todos los casos fue la misma y luego se le pide al programa de cómputo que calcule la densidad numérica y cuente el número de GIC que se marcaron.

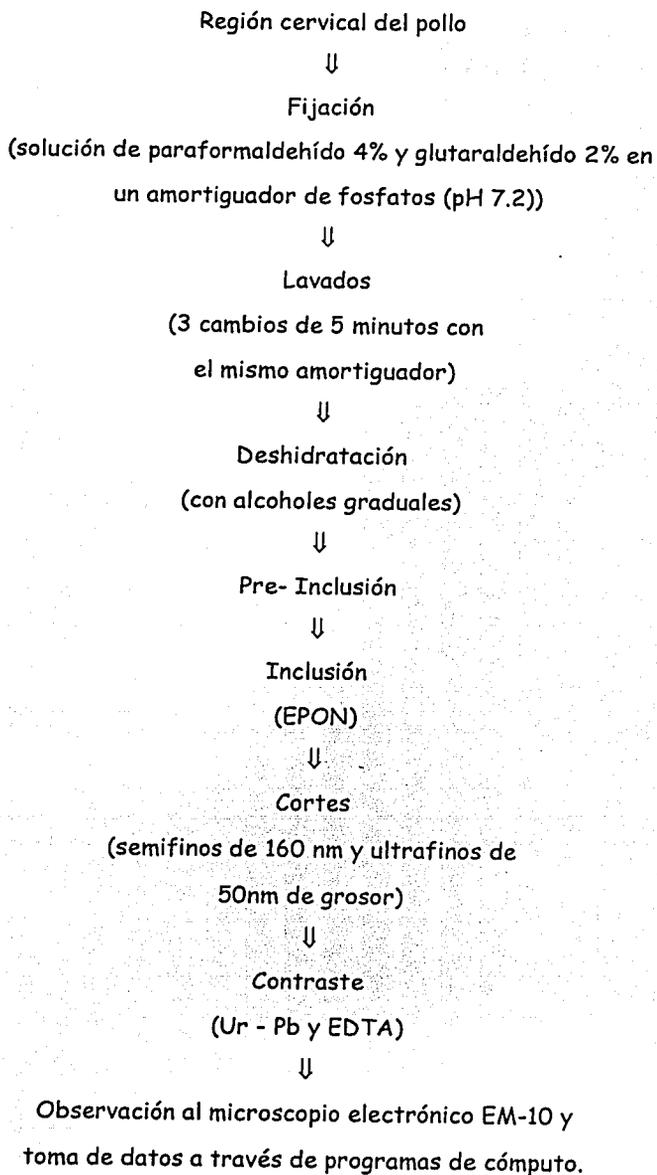
Con los cortes semifinos, montados en los portaobjetos, se cuantificó el área de los núcleos y del nucleolo. Esto se hizo con el programa "*Images 2000*" versión 1.1 de *Motic*. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera.

Los portaobjetos con cortes semifinos se colocaron en un microscopio óptico modelo DMB1-223A que cuenta con una cámara de televisión integrada, la cual manda la imagen directamente al monitor de computadora para poder digitalizar la imagen. Una vez digitalizada, con el *mouse* de la computadora se señalan el área de estudio, en este caso el contorno de los núcleo y nucleolos, para posteriormente pedirle al programa que calcule la superficie del área marcada.

El programa *Images 2000* cuenta con una rejilla especial de calibración, la cual se emplea para evitar al máximo el error de medición.

Una vez obtenidos los datos de número de GIC, densidad numérica, superficie de núcleo y nucleolo, se utilizó el programa *Excel* de *Microsoft* para hacer todo el análisis estadístico y las gráficas correspondientes.

Resumen del método. (Diagrama de flujo)



V. RESULTADOS

V. 1. POLLOS DE 2 DÍAS.

En los cortes semifinos de embriones de pollo con dos días de incubación, teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio (Fig. 5), ya se puede ver una separación entre el tubo neural y el ectodermo superficial. Hacia la luz del tubo se observan células en mitosis y el resto de la pared, está integrada por un conjunto de células fusiformes perpendicular al eje del tubo neural; los extremos de estas células por un lado tocan la luz del tubo neural y, por el otro su membrana basal.

En esta etapa, (aunque se han descrito algunos tipos celulares), se considera que estas células son funcionalmente matrices (Fujita, 1964), y presentan una gran diversidad de formas nucleares, circulares grandes y pequeñas, elípticas e irregulares, las cuales pueden deberse a las adaptaciones que presentan estas células durante las diferentes etapas de su ciclo celular.

Con el microscopio electrónico se hicieron observaciones de los núcleos celulares, los cuales son ovoides grandes y muy juntos unos con otros, debido, tal vez, a la escasa cantidad de citoplasma que los separa. Al ser contrastados con el método de EDTA, preferencial para RNP, los núcleos presentan una gran cantidad de estructuras teñidas, principalmente gránulos y fibras, distribuidas ampliamente, de manera muy dispersa, y por gran parte del espacio intercromatiniano (Fig. 6 y 7). Estos elementos, principalmente los GIC, se distribuyen de una forma dispersa a través de todo el núcleo, sin formar cúmulos (Fig. 7). Un aspecto a tomar en cuenta es que no se presenta una gran área de cromatina decolorada en la mayoría de los casos (Fig. 6), por lo que se puede suponer que buena parte de la cromatina está en fase extendida. Finalmente, también es notable la baja frecuencia de gránulos pericromatinianos en este tipo de núcleos.

Con las imágenes de video del EM-10, se obtuvieron los siguientes resultados para la cantidad de GIC en los núcleos (Gráfica 1) y la densidad numérica (Gráfica 3 y Tabla 1).

Los núcleos son generalmente grandes (34.98 micras^2) (Tabla 6A) su aspecto es compacto, con escasas áreas claras y un nucleolo pequeño de 4.62 micras^2 de superficie (Tabla 7A).

TABLA 1. Variación de GIC en núcleos de embriones de 2 días de desarrollo.

Pollo de 2 días de desarrollo Número de GIC			Pollo de 2 días de desarrollo Densidad numérica		
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
450	438	420	55	54	50
404	432	420	49	53	50
410	464	459	50	57	55
330	402	329	40	49	39
389	494	440	48	60	53
443	457	393	54	56	47
492	389	416	60	59	50
306	482	423	37	59	51
416	469	466	51	57	56
451	476	322	55	58	38
362	403	391	44	60	53
272	492	321	33	60	46
337	470	459	41	57	55
391	370	433	48	53	52
391	416	383	48	51	46
458	499	466	56	61	56
383	470	302	47	57	36
364	421	402	56	51	48
413	386	429	51	55	54
378	425		58	64	
418	365		51	58	
362	447		44	66	
379	368		46	45	
	410			50	
Sumatoria					
8999	10445	7674	1122	1350	93
Núm. Total muestras					
23	24	19	23	24	1
Promedios					
391.26	435.20	403.89	48.78	56.25	49.2
Promedio total		410.12	Promedio total		51.4
Desviación total		51.27	Desviación total		6.8

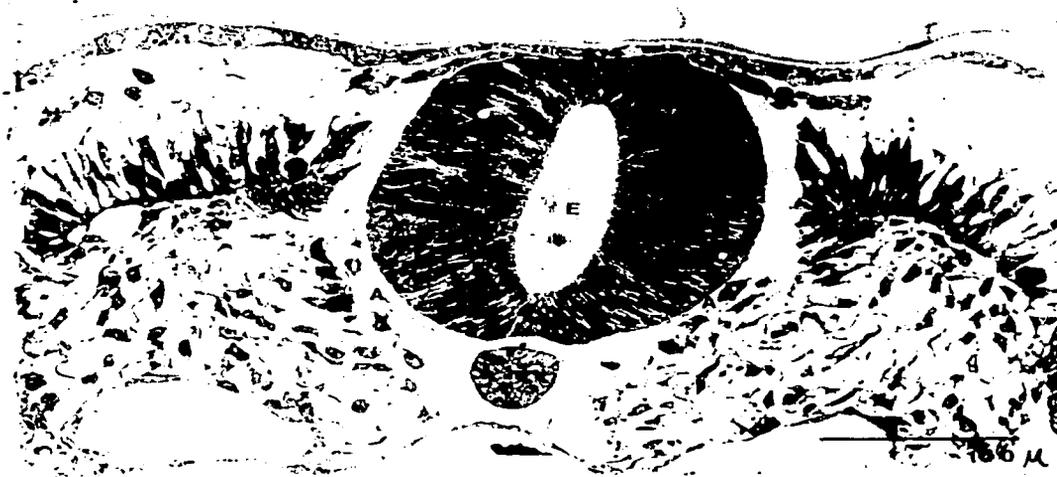


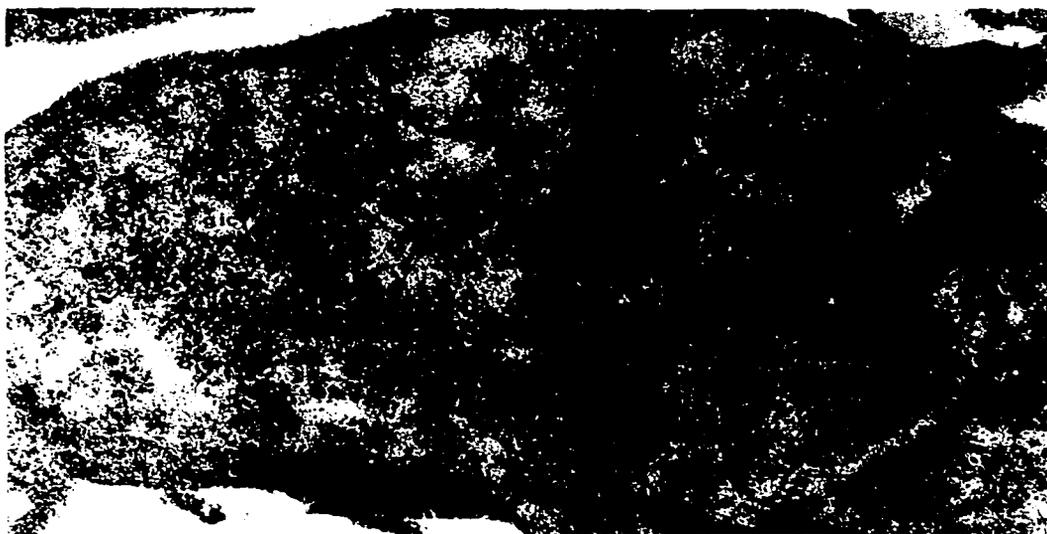
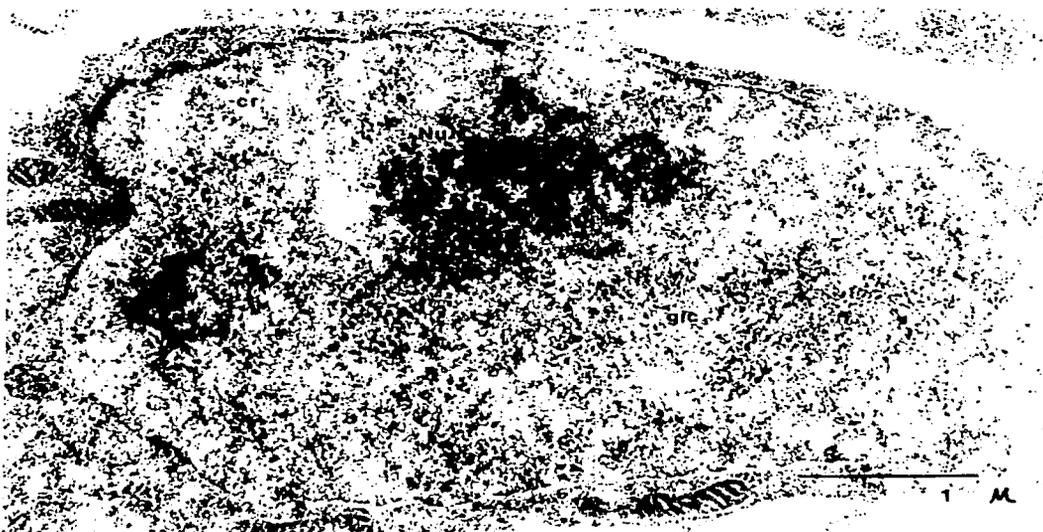
Figura 5.

Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 2 días de incubación. Se puede distinguir perfectamente el tubo neural (T), el epéndimo (E), la notocorda (n) y las futuras dos astas anteriores (A), las cuales no están formadas aun, pero existe la región en donde se formarán.

Se observa también que las células tienen diversas formas, circulares pequeñas, circulares grandes aunque la mayoría son alargadas. Foto de un corte semifino (preparación óptica) (240x).

Figuras 6 y 7.

Micrografías electrónicas de núcleos de células de las astas anteriores del embrión de pollo de 2 días de desarrollo. Contrastadas con Ur-EDTA-Pb, preferencial para RNP's, se observa que los nucleolos (Nu) son grandes, los GIC (gic) se ven con una distribución muy dispersa y no se distingue algún cúmulo definido. No se observan, en todos los casos, grandes áreas decoloradas que representen a la cromatina (cr) (26,250 aumentos).



V.2. POLLOS DE 4 DÍAS.

En los embriones de 4 días de incubación, la médula cervical muestra la luz endimaria aun alargada, pero reducida con respecto a su pared. En la población celular se pueden distinguir tres áreas determinadas por la posición y el aspecto morfológico de las células que las constituyen.

La primera zona está constituida por células pequeñas y ovoides, la segunda está ocupada básicamente por los neuroblastos bipolares; los cuales presentan un aspecto fusiforme, los núcleos son ovoides y su orientación es perpendicular a la luz endimaria. En la tercera zona, la más periférica, se encuentran neuroblastos de mayor tamaño, de forma ovoide o poligonal, con núcleos más grandes y nucleolos prominentes (Fig. 8 y 9).

Este último grupo de células corresponde a los neuroblastos multipolares, que conforme van madurando, se transforman en las neuronas motoras del asta anterior.

La médula espinal en este periodo, está rodeada por una franja estrecha, pálida y de aspecto fibrilar, que corresponde al velo marginal que en un futuro será la sustancia blanca.

Los núcleos de las células localizadas en las astas anteriores presentan abundantes partículas de RNP's, sobre todo fibras y gránulos (Fig. 10 y 11), lo cual nos puede indicar que en esta etapa del desarrollo, se tiene un elevado ritmo de transcripción, expresado por el número de ribonucleoproteínas que no tienen la típica ubicación pericromatiniana, ya que ocupan la mayor parte del volumen nuclear (Fig. 10 y 11).

A pesar de ser un cuantioso número de GIC, se tiene una disminución significativa con respecto al caso de dos días de desarrollo y siguen sin formar cúmulos (Gráfica 1). Tanto el núcleo como el nucleolo, aumentan su tamaño con respecto a los casos de dos días (Gráfica 5 y 7). La cromatina sigue siendo escasa y en algunas imágenes se tiene un pequeño rastro de ésta generalmente asociada al nucleolo (Fig. 11).

En cuanto a los núcleos, éstos son un poco más grandes con respecto a los de 2 días de desarrollo, tienen un tamaño promedio de 37.45 micras^2 , con una forma circular y un nucleolo ligeramente mayor (4.75 micras^2), (Gráfica 5 y 7 y en Tablas 6A y 7A).

TABLA 2. Variación de GIC en núcleos de embriones de 4 días de desarrollo.

Pollos de 4 días de Desarrollo			Pollo de 4 días de desarrollo		
Numero de GIC			Densidad numérica		
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
384	212	238	59	26	28
309	269	388	50	33	46
362	423	354	58	51	42
385	297	302	47	36	36
355	306	267	47	38	32
338	373	263	41	45	32
387	296	273	50	36	33
436	353	290	56	47	49
340	379	459	46	50	57
329	277	305	40	39	36
420	313	319	56	42	38
245	288	294	31	43	35
343	309	397	44	43	47
314	359	360	41	49	43
318		329	40		42
331		268	40		37
		370			44
		315			45
		271			37
		307			40
		303			38
		253			30
		350			42
		326			47
Sumatoria					
5596	4454	7601	746	578	956
Núm. Muestras					
16	14	24	16	14	24
Promedio					
349.75	318.14	316.70	46.62	41.28	39.83
Promedio total		<i>328.27</i>	Promedio total		<i>42.58</i>
Desviación total		52.37	Desviación total		7.66

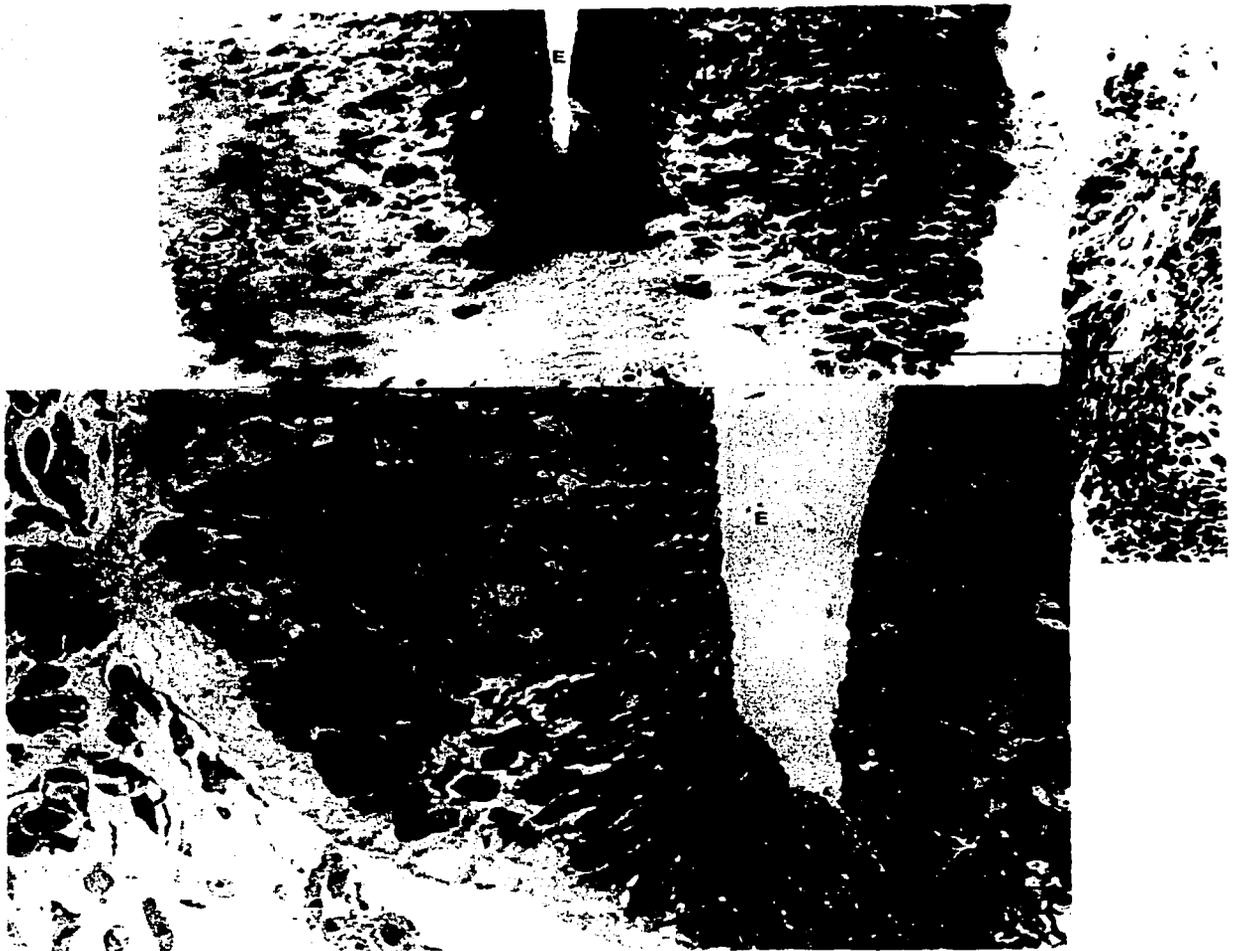


Figura 8.

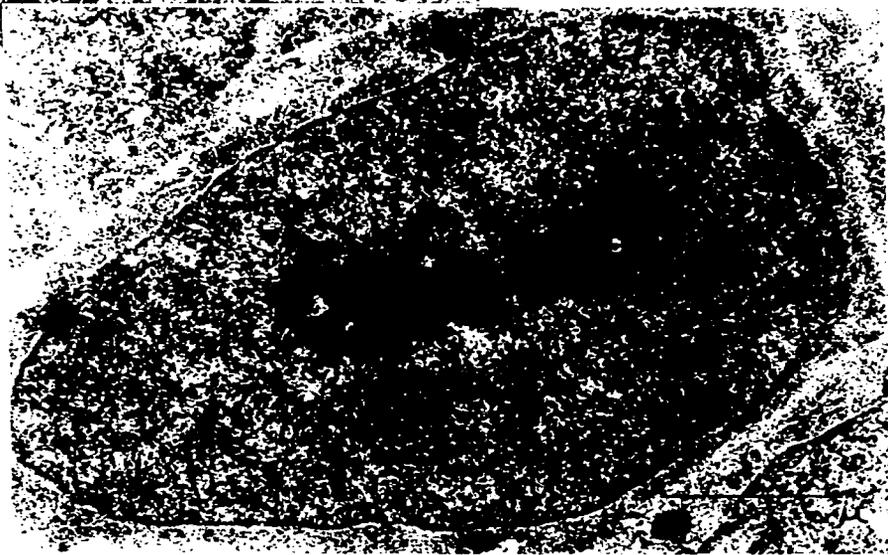
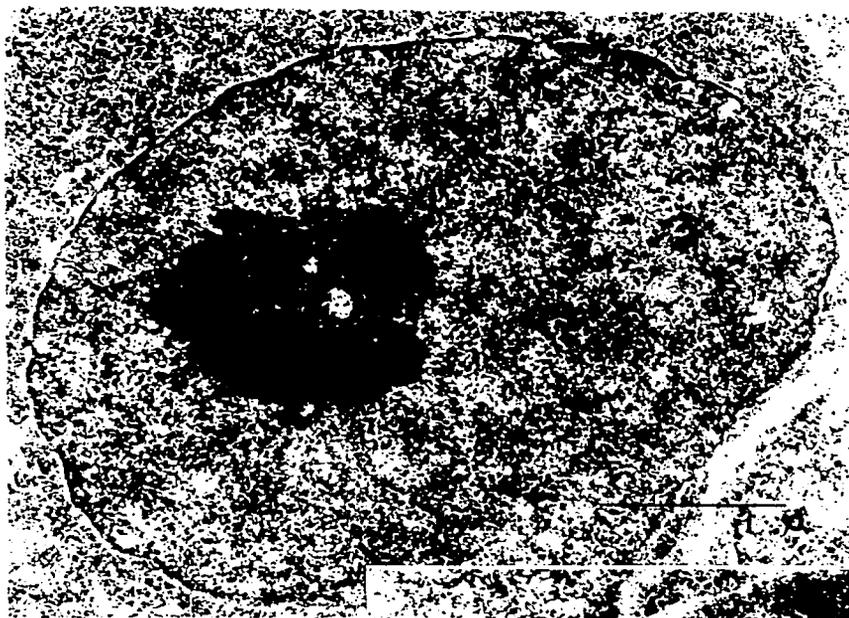
Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 4 días de incubación. La foto muestra el epéndimo (E) y una de las astas anteriores con un grupo grande de células. Se pueden identificar células pequeñas hacia el epéndimo (E), luego se ven células fusiformes y finalmente, en la parte más lejana al epéndimo, células de mayor tamaño, las cuales fueron estudiadas para este trabajo (316x).

Figura 9.

Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 4 días de incubación. Acercamiento a una de las astas anteriores en donde se muestran los grupos de células que se encuentran y el epéndimo (E) (744x).

Figura 10 y 11..

Micrografías electrónicas de núcleos de células de las astas anteriores del embrión de pollo de 4 días de desarrollo. Contrastadas con Ur-EDTA-Pb, preferencial para RNP's, los núcleos (Nu) son grandes, de forma circular o irregular alargada, presentan un gran número de RNP's distribuidas ampliamente, se ve a los GIC (gic) distribuidos ampliamente, pero no forman cúmulos. El nucleolo (nu) es grande y compacto (25000x).



Datos de las áreas nucleares
Comparación entre embriones de 2 y 4 días de desarrollo.

TABLA 6A
Áreas núcleo

Pollo 2 días			Pollo 4 días		
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
37.31	34.31	28.97	35.31	37.18	37.15
27.82	34.98	39.05	36.15	38.38	38.15
36.98	36.81	37.45	37.98	38.16	36.98
36.48	38.65	36.53	38.65	38.48	37.15
38.64	37.98	33.45	36.98	37.54	38.48
36.81	38.48	32.73	37.15	36.16	39.31
38.64	27.48	29.99	36.48	36.54	37.81
36.65	35.65	34.78	37.81	37.18	37.48
35.15	34.81	36.98	37.98	37.65	38.54
37.31	37.49	35.43	35.65	35.65	38.63
37.15	28.98	33.66	36.71	35.84	37.14
34.98	36.15	34.48	35.84	37.98	38.49
38.64	37.48	35.58	37.98	38.42	36.78
29.98	33.57	28.99	39.14	37.71	38.91
32.65	35.48	32.59	38.64	35.84	37.49
Suma			Suma		
535.19	528.3	510.66	558.45	558.71	568.49
Núm. Muestras			Núm. Muestras		
15	15	15	15	15	15
Promedio			Promedio		
35.67	35.22	34.044	37.23	37.24	37.89
Desviación total			Desviación total		
		3.15			1.03
Promedio			Promedio		
		34.98 μ^2			37.45 μ^2

Datos de las áreas nucleolares
Comparación entre embriones de 2 y 4 días de desarrollo.

TABLA 7A
Área del nucleolo

Pollo 2 días			Pollo 4 días			
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	
4.33	4.34	4.35	4.66	4.15	4.58	
3.83	5.56	5.16	4.49	3.89	4.87	
5.83	5.16	4.38	4.98	5.33	4.58	
5.66	4.57	4.78	4.66	4.66	5.16	
4.99	4.99	4.66	4.33	5.56	4.83	
4.98	4.83	5.41	4.66	4.56	4.69	
4.59	4.73	3.98	5.56	4.14	4.78	
4.83	5.49	4.67	4.16	5.16	4.58	
4.73	4.73	4.57	4.66	4.78	4.29	
5.16	3.83	4.37	4.44	4.66	5.01	
3.49	3.98	4.48	4.26	4.49	4.78	
3.83	5.16	5.11	5.78	4.16	4.69	
5.33	4.83	3.87	4.16	5.68	5.07	
3.83	2.98	4.54	5.16	4.24	5.16	
4.33	4.15	4.63	5.53	5.16	4.69	
Suma	69.74	69.33	68.9	71.49	70.62	71.76
Núm. Muestras	15	15	1	15	15	15
Promedio	4.64	4.62	4.5	4.76	4.78	4.78
Desviación total			0.6	Desviación total		0.45
Promedio			4.62 μ	Promedio		4.75 μ^2

V.3. POLLO DE 7 DÍAS.

Los embriones de pollo de siete días de incubación presentan unos núcleos un poco mayores a los de 4 días (Gráfica 5), de forma aproximadamente circular. Los nucleolos nuevamente aumentan de tamaño (Gráfica 7 y Tabla 6B y 7B).

El tamaño de los núcleos nuevamente aumenta de tamaño, y son en esta etapa del desarrollo núcleos ovoides, con un tamaño promedio de 39.94 micras^2 . El nucleolo en estos núcleos también incrementa su tamaño, ahora es de 4.98 micras^2 , y mantienen una tendencia al crecimiento en ambos aspectos, el nuclear y el nucleolar (Gráfica 5 y 7 y Tablas 6B y 7B).

Se ven áreas blanqueadas por el EDTA, y se perciben muchos RNP's; sobresaliendo el aun alto número de GIC (Fig. 15), los cuales se pueden localizar dispersos por todo el nucleoplasma, no tanto como en los estadios anteriores ya que se pueden ir detectando algunas zonas con más gránulos, lo que nos indica que se pueden ir acumulando para que, en fases mas maduras, formen cúmulos.

A pesar de ser bastantes GIC, el número de éstos se reduce (Gráfica 1), tal vez por la disminución en la actividad transcripcional. Se tiene un número considerable de células en las astas anteriores, las cuales no guardan un patrón definido de ubicación pero se observa que se dirigen a los polos de las astas (Fig. 13 y 14).

Figura 13. Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 7 días de incubación. En la foto se puede observar el epéndimo (E) que se ha cerrado días atrás. Se pueden observar las astas anteriores con grupos de núcleos (N) de gran tamaño, también se puede identificar fácilmente a la notocorda (n) (138x).

Figura 14. Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 7 días de incubación. La foto es un aumento (252x) de la foto anterior. En este aumento se muestran los núcleos (N) grandes, de forma circular y a veces alargados, el nucleolo es grande.



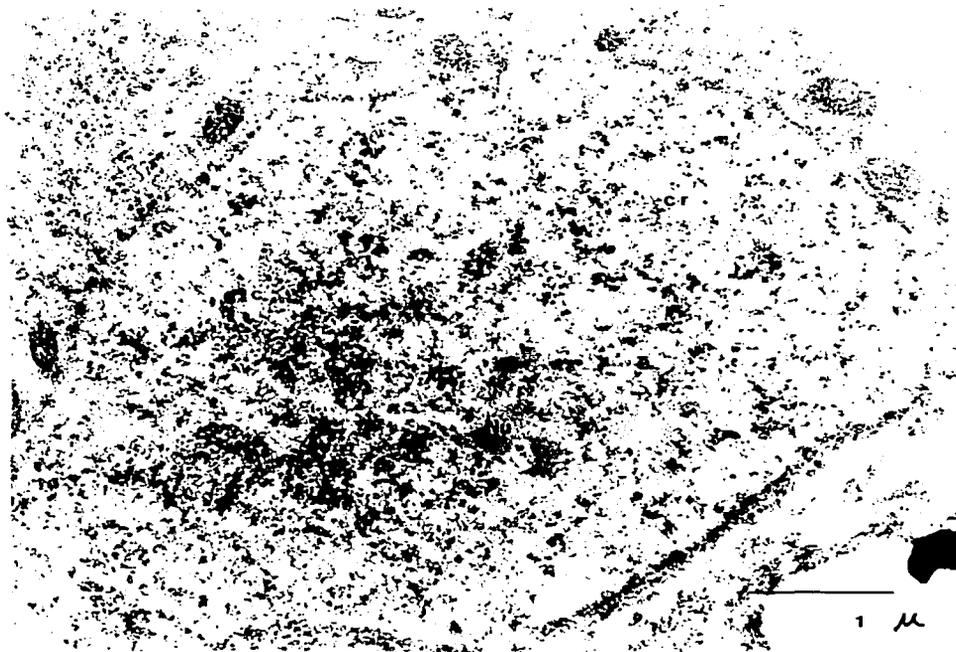


Figura 15. Micrografía electrónica de un núcleo celular de las astas anteriores del embrión de pollo de 7 días de desarrollo. La muestra fue contrastada con Ur-EDTA-Pb con un tiempo de 3, 20 y 3 minutos respectivamente. Se observa un núcleo grande, de forma redondeada, el número de GIC (gic) se ve disminuido y se comienza a ver una organización de éstos hacia el nucleolo (Nu) , pero siguen existiendo GIC por toda el área nuclear (20000x).

V.4. POLLO DE 9 DÍAS.

A los nueve días de incubación, los pollos muestran una médula cervical con cambios acentuados. El conducto del epéndimo es casi circular rodeado por células pequeñas.

En esta etapa, las células matrices han dejado de producir neuroblastos y se transforman en epitelio simple de revestimiento; en cambio, las neuronas del asta anterior están en vías de maduración, tanto en el aspecto morfológico como en el funcional, puesto que ya han tenido contacto con sus tejidos efectoros y han presentado sinapsis aferentes con algunas fibras nerviosas.

También los cambios ultra-estructurales son acentuados, así tenemos que los núcleos de las motoneuronas son voluminosos en este periodo, su tamaño aumenta considerablemente con respecto a los núcleos de siete días; este aumento se debe a una mayor cantidad de nucleoplasma (Gráfica 5).

Las neuronas del asta anterior son grandes, irregulares y un poco alargadas, con núcleos bastante grandes (Fig. 16), los cuales incrementan su tamaño considerablemente con respecto a los de siete días de desarrollo (Gráfica 5). El nucleolo también aumenta su tamaño pero no de manera considerable como el núcleo (Gráfica 7).

El espacio que separa a las neuronas es pequeño con lo cual, en estas zonas, se puede ver la presencia de un conglomerado celular.

En cuanto a los núcleos, es en esta etapa en donde se da un gran cambio en el tamaño, ya que el núcleo aumenta de 39.94 micras^2 de 7 días de desarrollo a un tamaño promedio de 50.83 micras^2 y presenta núcleos más grandes, ovoides y polimórficos (Fig. 18 y Gráfica 5). El nucleolo también crece en relación a la etapa anterior; presentando ahora un tamaño de 5.22 micras^2 (Gráfica 7 y Tablas 6B y 7B).

La distribución de las RNP's varía con respecto a las fases anteriores, los GIC nuevamente disminuyen en densidad y número (Gráfica 3 y 1), pero se dejan ver algunos principios de cúmulo, cercano al nucleolo y no tan dispersos en el nucleoplasma (Fig. 17 y 18).

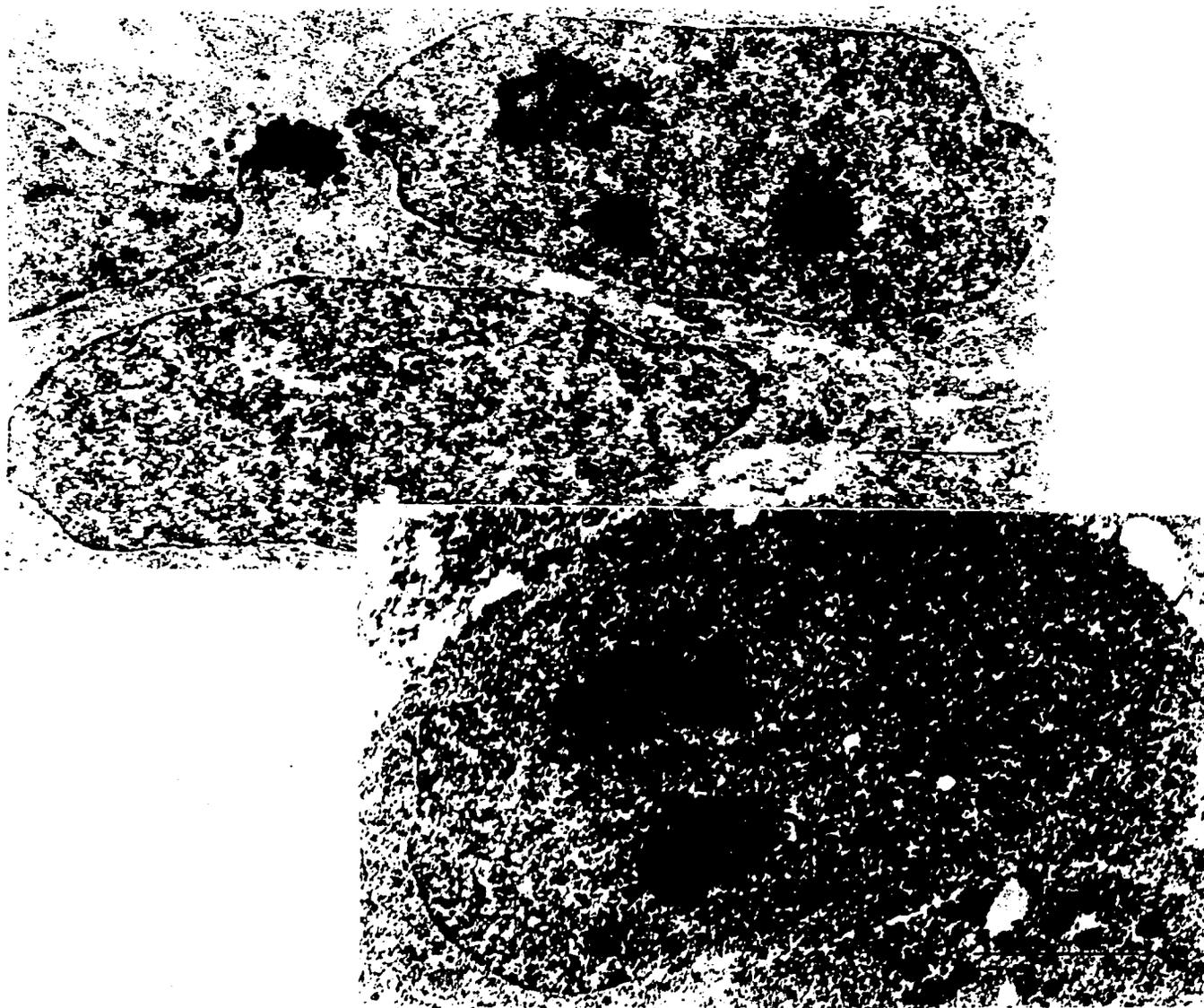
TABLA 4. Variación de GIC en núcleos de embriones de 9 días de desarrollo.
Pollos de 9 días de desarrollo

Número de GIC				Densidad numérica			
Pollo 1		Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1		Pollo 2	Pollo 3
195	167	191	310	27	20	22	37
195	194	174	185	23	24	20	22
174	201	272	199	20	24	31	24
206	176	200	158	24	21	23	19
288	151	147	246	33	19	17	29
183	140	220	192	22	17	25	23
194	137	176	189	23	17	21	22
198	158	152	182	23	19	17	21
208	205	219	170	24	25	25	20
208	185	175	185	24	24	20	22
173	166	169	239	20	20	19	28
165	196	236	199	19	24	27	24
185	184	174	193	22	23	20	23
147	154	189	191	18	20	22	25
247	205	168	139	30	25	19	17
189	228		195	23	28		23
123	169		153	17	21		18
179	157		176	24	20		21
258	119		196	32	16		23
155	214		229	20	26		27
200			173	25			21
105			171	18			20
214			162	27			24
144			167	18			20
195			157	24			19
223			137	27			16
153			149	19			18
Suma							
8610		2862	5042	1059		328	606
Núm. 47		15	27	47		15	27
Promedio							
183.19		190.8	186.74	22.53		21.86	22.44
Promedio			<i>186.91</i>	Promedio			<i>22.28</i>
Desviación de totales			35.14	Desviación de totales			3.96



Figura 16. Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 9 días de incubación. La foto es un aumento del asta anterior del tubo neural, en donde se pueden observar al epéndimo (E), núcleos (N) grandes, de forma irregular, con un espacio pequeño entre ellos y un fragmento de la notocorda (n) (404x).

Figuras 17 y 18. Micrografía electrónica de núcleos celulares de las astas anteriores del embrión de pollo de 9 días de desarrollo contrastados con Ur-EDTA-Pb. En las fotos se pueden ver claramente los cambios que se encontraron, los núcleos (N) son grandes, irregulares y un poco alargadas, el espacio que separa a las neuronas es pequeño y el tamaño es mayor al de otros estadios. Los GIC (gic) disminuyen nuevamente su número, pero su arreglo sigue siendo muy irregular (26250x).



Datos de las Áreas nucleares
Comparación entre embriones de 7 y 9 días de desarrollo.

Tabla 6B

Áreas núcleo

Pollo 7 días			Pollo 9 días		
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
34.65	43.98	42.16	39.81	48.89	54.14
38.83	42.38	38.76	42.87	47.98	53.76
41.71	39.73	41.07	48.47	55.81	49.76
39.89	38.68	39.49	51.97	54.86	51.76
38.98	37.98	39.98	51.76	58.8	48.99
39.84	41.76	38.49	49.76	47.89	49.73
41.61	42.41	41.07	52.64	46.79	50.07
40.08	39.48	40.16	57.08	46.14	55.49
39.76	38.17	39.48	51.76	53.47	48.99
38.89	39.98	40.76	52.86	49.87	52.73
40.1	40.2	38.98	54.93	49.78	44.12
39.88	41.37	38.83	49.99	49.59	53.12
39.78	38.86	40.16	49.48	48.78	48.99
40.09	38.76	42.76	53.76	52.14	54.64
38.49	37.98	41.16	56.86	49.78	46.89
Suma					
592.58	601.72	603.31	764	760.57	763.18
Núm. Muestras					
15	15	15	15	15	15
Promedio					
39.50	40.11	40.22	50.93	50.74	50.87
Desviación total		1.59	Desviación total		3.77
Promedio		39.94 μ^2	Promedio		50.83 μ^2

Datos de las áreas nucleolares
Comparación entre embriones de 7 y 9 días de desarrollo.

Tabla 7B

Pollo 7 días			Pollo 9 días		
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
5.66	5.16	4.86	4.33	5.66	4.99
5.83	5.17	4.78	4.16	5.53	4.49
4.79	4.99	4.86	4.49	4.99	4.73
4.68	4.66	4.76	4.49	4.83	5.33
5.29	4.7	5.17	5.33	5.33	5.68
4.98	4.98	4.98	5.53	5.53	4.92
5.32	5.26	4.88	5.68	4.98	5.53
4.88	4.87	4.69	4.99	5.77	4.98
4.87	5.13	5.07	5.73	4.98	5.66
4.86	4.87	4.76	5.49	5.53	5.33
5.13	4.96	5.12	5.24	4.76	5.76
4.98	5.07	4.66	4.99	7.59	4.68
5.07	5.23	5.17	4.98	5.87	4.87
4.68	4.76	4.76	5.76	4.89	5.87
4.97	4.99	5.08	5.16	4.68	5.68
Suma					
75.99	74.8	73.6	76.35	80.92	78.5
Núm. Muestras					
15	15	15	15	15	15
Promedio					
5.06	4.98	4.92	5.09	5.39	5.23
Desviación total		0.24	Desviación total		0.57
Promedio		4.98 μ^2	Promedio		5.22 μ^2

V.5. POLLO DE 12 DÍAS.

Los embriones de 12 días de incubación presentan las neuronas del asta anterior de la médula cervical con un mayor desarrollo, el epéndimo se reduce considerablemente y en algunos casos no se llega a ver la cavidad (Fig. 19 y 20).

Las observaciones muestran unas neuronas muy voluminosas pero escasas (Fig. 20). Los núcleos de estas neuronas son muy grandes, en promedio de 63.14 micras^2 (aumentan su tamaño de forma considerable con respecto a los nueve días) (Gráfica 5). El nucleolo nuevamente aumenta su tamaño, ahora podemos apreciar nucleolos de 5.8 micras^2 (Gráfica 7C). El espacio que separa a estas neuronas es muy amplio, esto indica un mayor crecimiento de los axones y las dendritas (Fig. 20).

Los GIC, vuelven a presentar una disminución en cuanto a su número y densidad (gráfica 1 y 3), pero se mantiene el comportamiento de agrupación y migración hacia el nucleolo, o el centro del núcleo y se ven espacios muy grandes de cromatina (Fig. 21).

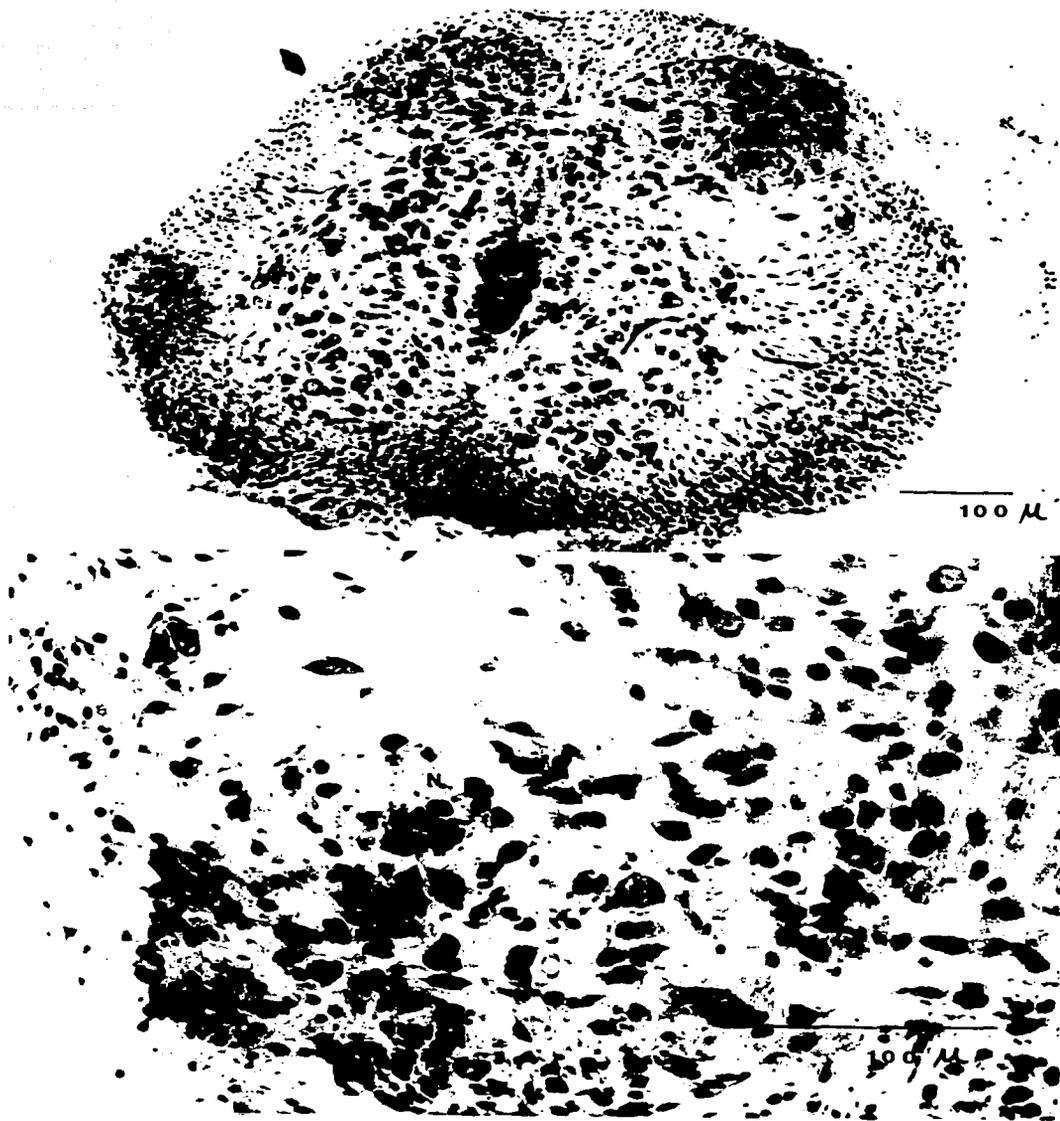


Figura 19. Corte transversal de la región cervical de un embrión de pollo de 12 días de incubación. En esta foto se puede ver como el epéndimo (E) presenta sus bordes adosados y las células son muy grandes pero escasas. El espacio entre ellas es muy amplio (140x).

Figura 20. Aumento de la región anterior del tubo neural de un embrión de pollo de 12 días (400x), en donde se ven los núcleos (N) y nucleolos grandes, de forma irregular pero con tendencia circular. Son escasos los núcleos en esta etapa, pero su tamaño es grande.

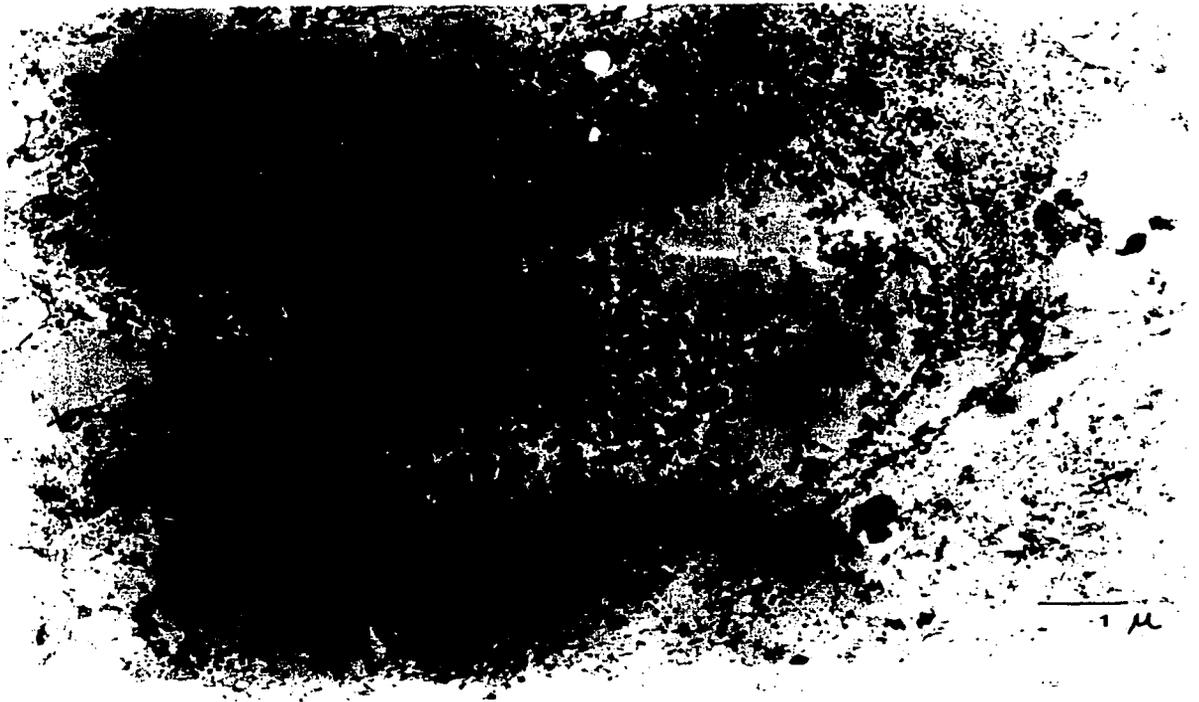
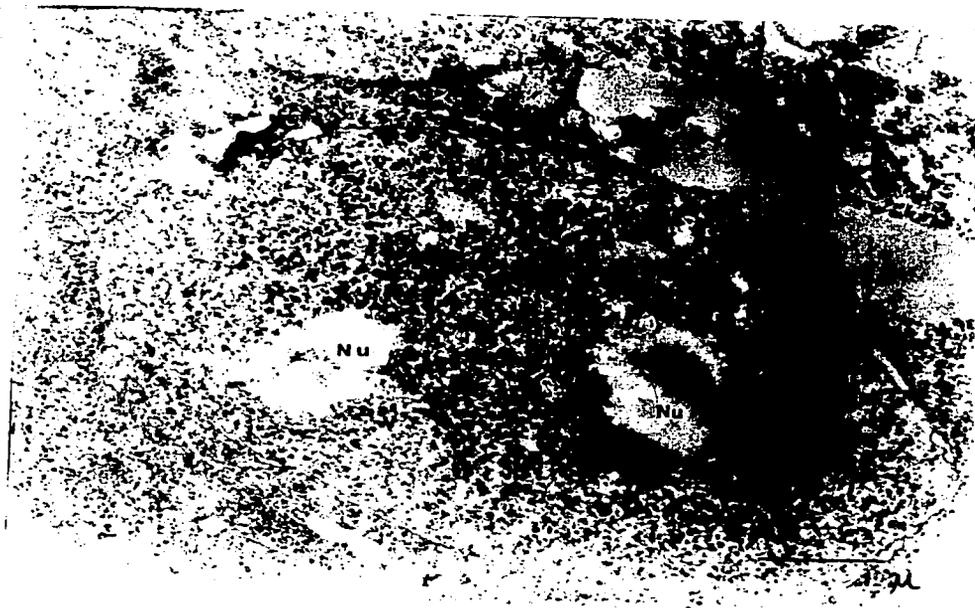


Figura 21 y 22. Micrografía electrónica de núcleos celulares de las astas anteriores del embrión de pollo de 12 días de desarrollo contrastados con Ur-EDTA-Pb. La ultraestructura de este estadio muestra que los GIC (gic) disminuyen su número, la tendencia a formar cúmulos es mas marcada, incluso en algunos pocos casos se puede identificar un cúmulo, pero es en una minoría de casos.

Figura 21 a 13230x muestra un cúmulo de GIC bastante definido, próximo al nucleolo (Nu).

Figura 22 a 16000x señala una distribución irregular de los GIC (gic) y entre los dos nucleolos (Nu) una mayor densidad regional, que puede dar, en estadios mas avanzados, el propio cúmulo de GIC.

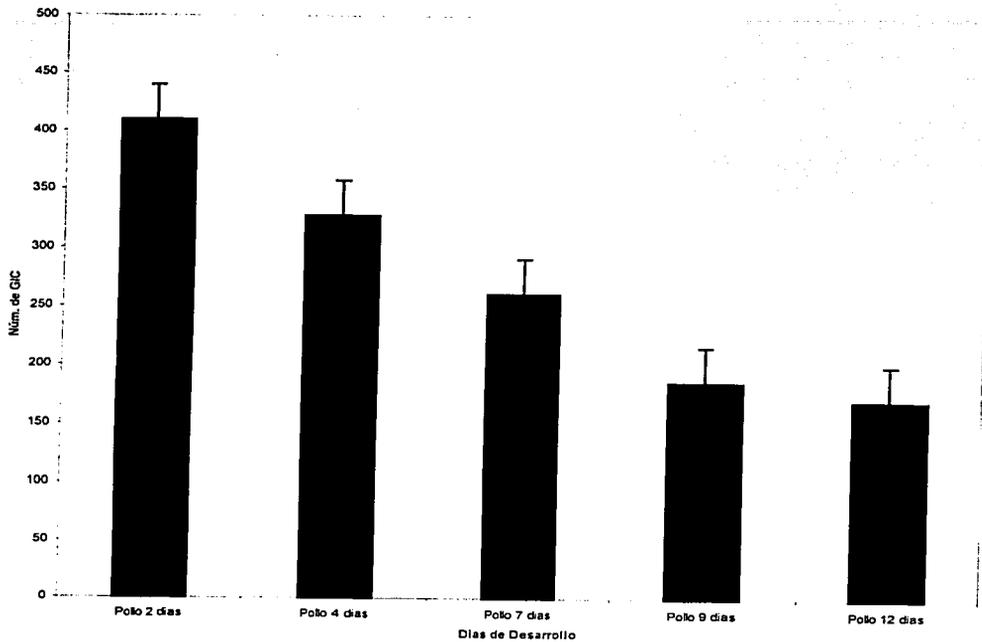


Datos de las áreas nucleolares de embriones de 12 días de desarrollo.

Tabla 7C
 Área del nucleolo
 Pollo 12 días

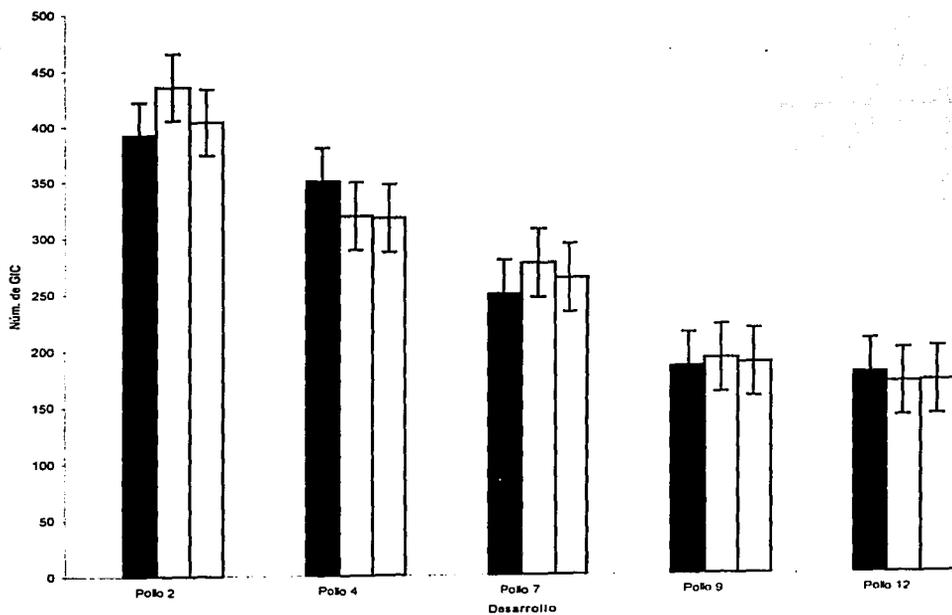
Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
5.98	6.05	5.66
5.68	5.96	5.77
5.87	5.87	5.69
5.68	5.45	5.56
5.83	5.69	5.69
5.78	5.78	6.02
5.68	5.56	5.78
5.89	5.86	5.79
6.03	6.02	5.68
5.18	5.89	6.03
6.04	5.68	5.63
5.67	6.01	5.79
5.98	5.98	6.03
5.78	5.79	5.68
6.02	5.86	5.69
Suma		
87.09	87.45	86.49
Núm. Muestras		
15	15	15
Promedio		
5.86	5.83	5.76
	Desviación total	0.18
Promedio		5.83 μ^2

GIC en Pollos

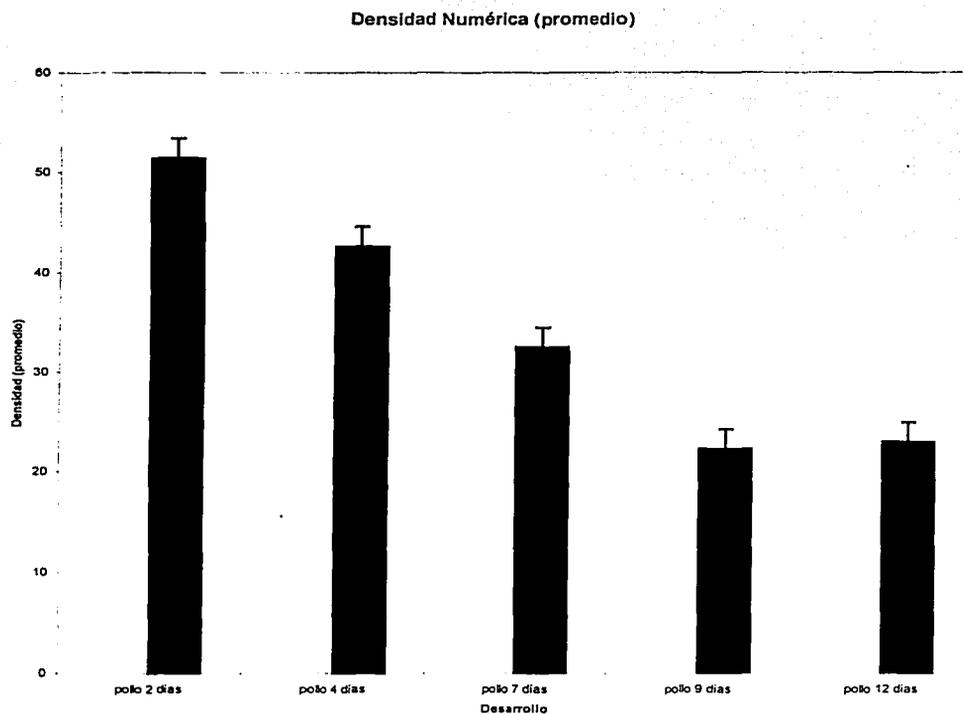


Gráfica 1. Gráfica que muestra el número de GIC que se encontraron en las tomas de video en los casos estudiados. Se puede ver claramente que conforme el embrión se va desarrollando, los GIC disminuyen su número.

GIC en Pollos en el área estudiada

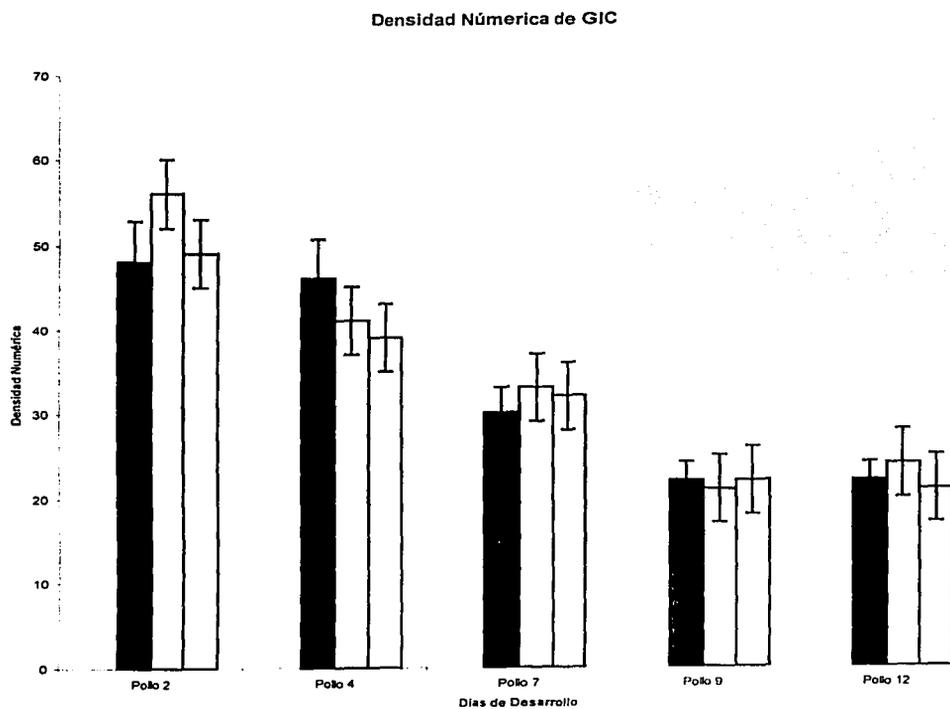


Gráfica 2. Número de GIC (promedio) que se observaron para cada embrión en los 5 diferentes estadios de desarrollo.

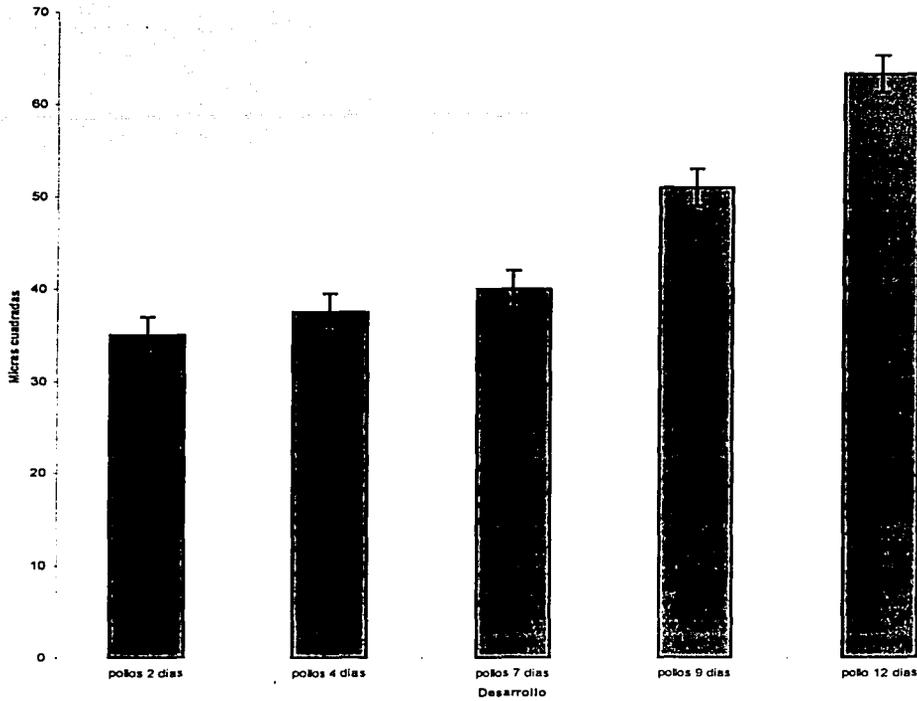


Gráfica 3. La gráfica muestra la densidad numérica que se obtuvo en el programa de computo. Los GIC disminuyen tanto su número como su densidad conforme el embrión va desarrollándose y las neuronas van madurando.

Gráfica 4. La gráfica muestra la densidad numérica que se obtuvo en el programa de cómputo para cada caso de las diferentes edades de desarrollo de los embriones de pollo. Se puede ver que la densidad va disminuyendo conforme el embrión es mayor.



Área de Núcleos



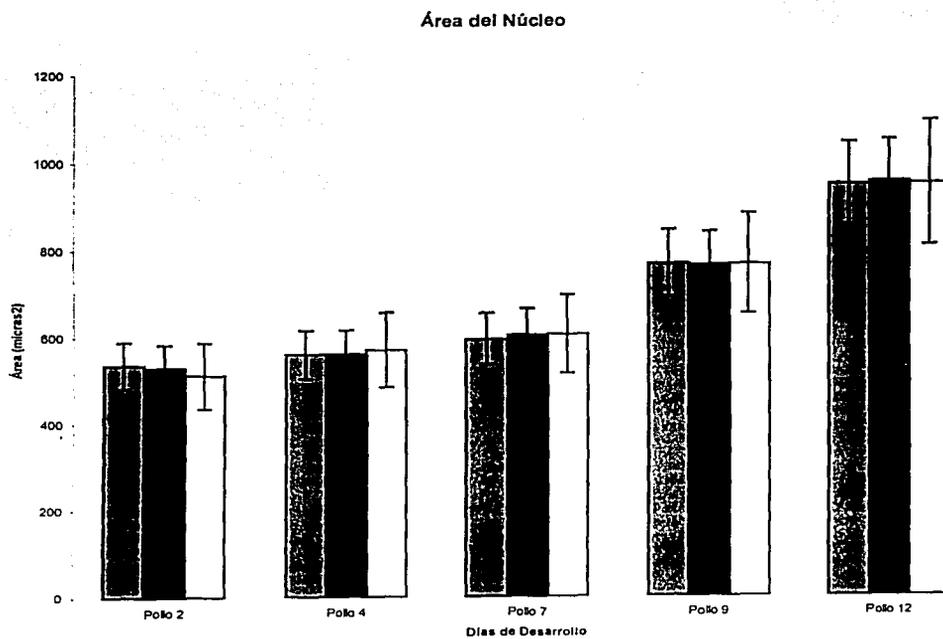
Gráfica 5.

En esta gráfica se muestra el cambio del área nuclear durante el desarrollo de los neuroblastos - neuronas. El área nuclear esta dado en micras².

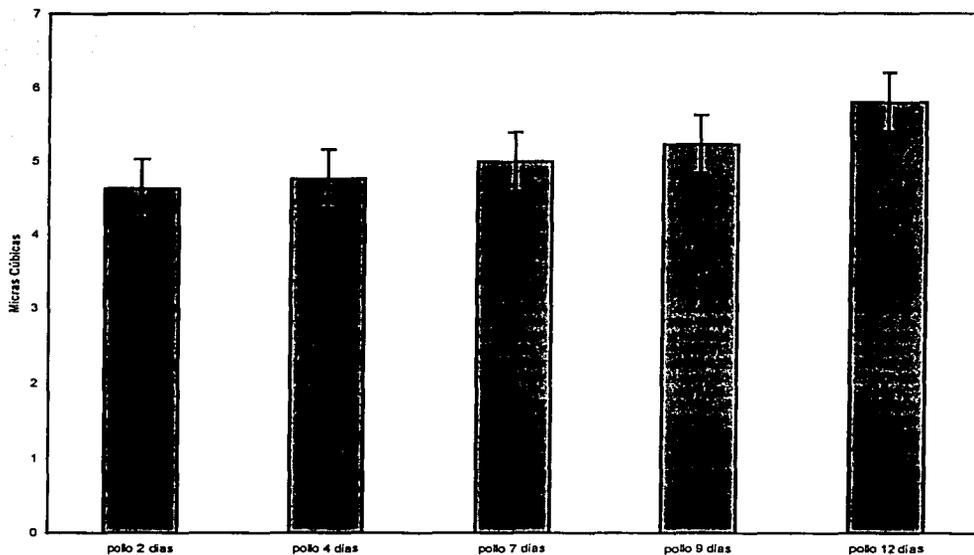
El incremento se presenta constante en los pollos de 2, 4 y 7 días de desarrollo, en donde se tiene un incremento moderado. A partir del día 9, el núcleo presenta un crecimiento considerable con respecto a los días anteriores; y para el día 12, el crecimiento es muy marcado, es en el día 12 donde se presenta el mayor tamaño del núcleo.

Gráfica 6.

En esta gráfica se muestra el cambio del área nuclear durante el desarrollo de los neuroblastos a neuronas. La gráfica representa cada caso de los estudiados.



Área del Nucleolo



Gráfica 7.

La gráfica 7 representa los cambios del área del nucleolo.

El volumen nucleolar se mantiene casi constante, el crecimiento que se observó fue mínimo, aunque consistente en los tres primeros casos. Los embriones de 9 días presentaron un crecimiento marcado a comparación de 2, 4 y 7 días.

Los embriones de 12 días presentaron un aumento considerable en el volumen nucleolar; un marcado aumento en comparación con los otros casos.

Este mismo comportamiento de crecimiento se observó en el volumen nuclear.

Resultados finales
(Cuadro comparativo)

	Área del Núcleo	Área del Nucleolo	GIC		Descripción
			Núm.	Densidad	
2 días	34.98 μ^2	4.62 μ^2	410	51.41	En los embriones de 2 días de desarrollo se puede observar el mayor número de GIC y la mayor densidad. El núcleo y nucleolo son grandes. La cromatina es laxa. Los GIC tienen una distribución dispersa y no se ven cúmulos definidos de GIC.
4 días	37.45 μ^2	4.75 μ^2	328	42.58	A los 4 días de desarrollo se ve una disminución en número de GIC así como en la densidad de éstos, el núcleo y nucleolo crecen en tamaño. Los GIC aun no forman un cúmulo.
7 días	39.94 μ^2	4.98 μ^2	262	32.46	En esta etapa, los núcleos y nucleolos crecen de tamaño a comparación de los otros estados de desarrollo. Los GIC vuelven a reducir su número y densidad y se comienzan a ver algunos indicios de cúmulos, pero su distribución es aun dispersa.
9 días	50.83 μ^2	5.22 μ^2	186	22.28	En esta etapa se presentan varios cambios. Los núcleos y nucleolos aumentan su tamaño de forma considerable. Los GIC reducen drásticamente su número y densidad y se ven algunos "manchones" muy grandes y poco definidos de lo que podría ser un cúmulo.
12 días	63.14 μ^2	5.8 μ^2	171	22.97	En la última etapa estudiada, se mantiene la tendencia mostrada anteriormente, crecimiento de núcleo y nucleolo y los GIC disminuyen. Los núcleos ahora son escasos pero muy grandes. No se ven cúmulos definidos pero sí principios de cúmulos.

**Resultados finales
(Cuadro comparativo)
para GIC**

	Núm. de muestras	Número de GIC (Promedio)	Desviación estándar	Prueba τ	Significativo
Pollo 2 días	66	410.12	51.27	1.652^{-14}	Significativo
Pollo 4 días	54	328.27	52.37	1.205^{-09}	Significativo
Pollo 7 días	63	262.25	35.62	4.104^{-26}	Significativo
Pollo 9 días	89	186.91	35.14	0.0076	No significativo
Pollo 12 días	66	171.44	28.17		

Nota. La Prueba τ se obtuvo comparando 2 días vs. 4 días, 4 días vs. 7 días, 7 días vs. 9 días y 9 días vs. 12 días. Los resultados de la Prueba τ se mencionan en el primer día comparado.

**Resultados finales
(Cuadro comparativo)
para Densidad de GIC**

	Núm. de muestras	Densidad numérica (Promedio)	Desviación estándar	Prueba τ	Significativo
Pollo 2 días	66	51.41	6.82	2.130^{-10}	Significativo
Pollo 4 días	54	42.58	7.66	4.751^{-12}	Significativo
Pollo 7 días	63	32.46	4.33	1.138^{-29}	Significativo
Pollo 9 días	89	22.28	3.96	0.184	No Significativo
Pollo 12 días	66	22.97	3.75		

Nota. La Prueba τ se obtuvo comparando 2 días vs. 4 días, 4 días vs. 7 días, 7 días vs. 9 días y 9 días vs. 12 días. Los resultados de la Prueba τ se mencionan en el primer día comparado.

**Resultados finales
(Cuadro comparativo)
para áreas Núcleo**

	Núm. de muestras	Área (μ^2) (Promedio)	Desviación estándar	Prueba τ	Significativo
Pollo 2 días	15	34.98	3.15	6.552 ⁻⁰⁶	Significativo
Pollo 4 días	15	37.45	1.03	3.930 ⁻¹³	Significativo
Pollo 7 días	15	39.94	1.59	1.609 ⁻²⁵	Significativo
Pollo 9 días	15	50.83	3.77	1.474 ⁻²⁹	Significativo
Pollo 12 días	15	63.14	2.58		

Nota. La Prueba τ se obtuvo comparando 2 días vs. 4 días, 4 días vs. 7 días, 7 días vs. 9 días y 9 días vs. 12 días. Los resultados de la Prueba τ se mencionan en el primer día comparado.

**Resultados finales
(Cuadro comparativo)
para áreas Nucleolo**

	Núm. de muestras	Área (μ^2) (Promedio)	Desviación estándar	Prueba τ	Significativo
Pollo 2 días	15	4.62	0.63	0.250	No significativo
Pollo 4 días	15	4.75	0.45	0.003	No significativo
Pollo 7 días	15	4.98	0.24	0.009	Significativo
Pollo 9 días	15	5.22	0.57	8.331 ⁻⁰⁸	Significativo
Pollo 12 días	15	5.83	0.18		

Nota. La Prueba τ se obtuvo comparando 2 días vs. 4 días, 4 días vs. 7 días, 7 días vs. 9 días y 9 días vs. 12 días. Los resultados de la Prueba τ se mencionan en el primer día comparado.

VI. DISCUSIÓN

La diferenciación celular implica muchos cambios a diferentes niveles. El más obvio es el referente al aspecto morfológico (forma, tamaño, tipo, etc.), pero se sabe perfectamente que esos cambios son el resultado tanto de modificaciones bioquímicas como del metabolismo de las células. Todo esto se da gracias a la acción del genoma de cada célula, que mediante la expresión o represión de algunos genes, determinan en gran parte este fenómeno indispensable para el desarrollo de los organismos multicelulares. Los núcleos celulares, al ser las estructuras que contienen el material genético, representan un material de estudio indispensable, con lo cual puede entenderse la importancia de investigar sus cambios, tanto físicos (forma, tamaño, aspecto) como los químicos o de ultra estructura.

En este trabajo se demuestra que los núcleos de neuroblastos en interfase y motoneuronas inmaduras durante la diferenciación celular sufren cambios muy notorios, tanto en su estructura general como en los GIC, tema de este estudio en particular.

Del embrión de pollo de 2 días de desarrollo se sabe que la pared del tubo neural está casi totalmente formada por células matrices, las cuales presentan un ciclo celular acelerado, con mitosis, que multiplican así la población celular del tubo neural en fases tempranas del desarrollo. El hecho de que en esta etapa se presente el mayor número de GIC puede deberse a que estas células tienen un elevado ritmo de transcripción y escasa cromatina laxa.

En la población de células del embrión de pollo de 4 días de desarrollo, el volumen nuclear y nucleolar, aumenta un poco a comparación de los embriones de 2 días de desarrollo (Gráfica 6 y 7), lo cual podría indicar que la población de células matrices ya no es tan homogénea. Estos resultados contrastan con los observados por Ortega-Rangel (1986) en donde él observó que el volumen nucleolar es significativamente menor. Al ir disminuyendo el número de GIC se puede sospechar que se dan los primeros signos de la diferenciación de los neuroblastos, la cual ocurre antes de los cambios morfológicos (Cajal, 1911).

Entre el día 4 y 9 de desarrollo, se presentan una serie de hechos importantes para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. La mayoría de los axones de los neuroblastos ya han formado un contacto funcional con células musculares (Barron 1946). Los neuroblastos que no contactaron con células efectoras, degeneraron y murieron (Hamburger, 1975).

En este periodo es cuando los contactos sinápticos ya se observan, aunque no del todo maduros, en las motoneuronas de la región cervical (Stelezner, 1973). También es en este periodo en donde aparecen las conexiones funcionales de los nervios espinales (Oppenheim, 1975). Se corrobora que en esta fase del desarrollo el "micro ambiente" que rodea a estas células se ha modificado, ya que se vio que el espacio inter celular es amplio y se pueden observar las primeras células gliales (Martín y Langman, 1965).

Con lo anterior, el paso básico de desarrollo entre neuroblasto y motoneurona inmadura se presenta en este periodo, y se confirma con los cambios registrados en las observaciones, ya que se ratifica que se presenta un aumento en el volumen nuclear y nucleolar significativo, en comparación con células de fases anteriores (mismos resultados que Ortega-Rangel en 1986). Los GIC disminuyen de manera considerable su número (dando pie a pensar que la transcripción ya se reduce). La cromatina comienza a ocupar mas área intranuclear y esto se debe tal vez, a que es propio de células que han iniciado cambios intrínsecos en la configuración de su genoma, previos y tal vez vitales para un futuro requerimiento de un desarrollo metabólico que implique una especialización celular definida.

El volumen nuclear, puede verse modificado tal vez, por que las neuronas inmaduras presentan un metabolismo elevado, teniendo la necesidad de una expresión génica mayor o una expresión rápida de algunos genes. Por el motivo que fuere, da como resultado que la cromatina se extienda y ocupe una mayor área dentro del núcleo, (fenómeno que no se presenta en otras etapas jóvenes), se reduce el número de RNP's, y se puede suponer que la presencia de metabolitos y almacenamiento de RNA, presente en los GIC sean los que modifiquen el volumen nuclear de estas células.

El comportamiento de las partículas ribonucleoproteicas, en particular de los GIC, durante la diferenciación y maduración del sistema nervioso en embrión de pollo, presenta notables variaciones que se relacionan con las diferentes etapas morfológico - funcionales del proceso de desarrollo nervioso, lo cual fue reportado por Ortega-Rangel como las RNP con menos variación durante el desarrollo embrionario.

Los GIC son sitios de acumulación de partículas de RNP's que contienen snRNA de bajo peso molecular ricos en uridina. Estos snRNA son esenciales en el proceso de *Splicing*, que es un proceso denominado de "corte y empalme" en donde se eliminan los intrones del transcrito primario y se juntan los exones para formar la secuencia continua que codifica un polipéptido funcional.

El estudio realizado nos da como resultado que en las primeras etapas del desarrollo, los GIC se presentan en gran número y con una distribución amplia o extensa, a lo largo de toda el área nuclear, debido tal vez al alto grado de transcripción que se tiene en ese momento. Va disminuyendo conforme las células se van diferenciando y madurando, hasta quedar (a los 12 días), en un número reducido y con tendencia a la agrupación, lo que demuestra que los GIC forman cúmulos pero que no está el cúmulo formado siempre, sino que se forma conforme se desarrolla la célula, con lo cual se puede decir que el cúmulo de GIC se presenta en células maduras, las cuales ya sufrieron el proceso de diferenciación celular.

Estos estudios y resultados contrastan con los resultados reportados anteriormente, en donde los GIC fueron las partículas con menos variación durante el desarrollo embrionario (Ortega, 1986), y se pone en duda, tal vez, que los GIC no tienen una relación directa con la transcripción y/o con el transporte del RNA de nueva síntesis.

Un dato curioso es el que podemos encontrar en los resultados de González-Jiménez (2000), cuyo estudio en semillas de vegetales, con la técnica de contraste preferencial para RNP, durante la mitosis, no pudo identificar a los GIC's como se ha reportado para células animales (en cúmulos), y los encontró de forma dispersa en el nucleoplasma, esto tal vez gracias a que al romperse la membrana nuclear, permite que otras RNP invadan estas zonas.

Estudios en invertebrados realizados por Jiménez-García (1989), señalan que los GIC se presentan individuales y no en cúmulo.

Todo lo anterior puede darnos una idea que las células estudiadas en este trabajo, al estar en estados de diferenciación y maduración, no requieren de un procesamiento, almacén y transporte de factores de *splicing*, por lo que se puede tener una idea que durante estos procesos, los GIC no formen cúmulo, ya que no es necesario para la actividad metabólica de ese momento. Esto puede tomar mayor fuerza al ver que en algunos casos de 12 días de desarrollo existen los principios de cúmulo, una vez que la célula está madura.

Lo que queda claro es que durante la diferenciación y maduración neuronal, la cromatina compacta sufre cambios cuantitativos que se traducen en actividades genéticas adaptada a cada etapa del desarrollo, tal vez como una necesidad de la célula por utilizar algún tipo de proteínas en una región específica o más activa.

Los resultados de Sacco-Bubulya,(2002) señalan también que al no haber cúmulos de GIC's, se sigue sintetizando transcritos nacientes, pero la acumulación de factores de *splicing* se ve drásticamente reducida. Esto puede reforzar el hecho que durante la diferenciación y maduración no hay transcripción en un único sitio, sino que se realiza en varias zonas y por lo tanto los GIC están dispersos por todo el núcleo sin formar un cúmulo de GIC.

VII. CONCLUSIONES

- * Los núcleos celulares en interfase durante la diferenciación y maduración del sistema nervioso de pollo, presentan variaciones en cuanto a forma y en su ultra estructura.
- * Los cambios y las variaciones más significativas se presentan durante la transición de neuroblastos a neuronas inmaduras (4 -9 días), con un notable aumento en el volumen nuclear, una mayor área de cromatina, y una disminución en el número de GIC.
- * Los cúmulos de GIC no se presentan en células dentro del proceso de diferenciación celular.
- * Los cúmulos de GIC se van desarrollando a medida que las células dejan o superan la etapa de diferenciación celular.
- * Los GIC presentan una gran variación durante este proceso, con lo cual se puede sugerir que los cúmulos de GIC "sí" tienen un papel importante y están involucrados en procesos de transcripción y no sólo en ser reservorios de material bioquímico para el *splicing*.
- * Las áreas nucleares aumentaron, de una forma escasa, pero la tendencia que se obtuvo fue de un incremento, con lo cual se pone de manifiesto que el desenrollamiento de la cromatina lleva a un aumento en el área nuclear.
- * Los GIC podrían estar íntimamente relacionados con la cromatina, ya que en las etapas primarias del desarrollo, cuando la cromatina se encuentra dispersa por toda el área nuclear, los GIC se encuentran también dispersos, mientras que en los casos de células en donde la cromatina está condensada en el núcleo, los GIC se pueden ver en grandes cúmulos, como en el caso de células ya maduras.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., et al, (1996), *Biología Molecular de la Célula*, Omega, Barcelona, 1440pp.
- Balinsky B., (1978), *Introducción a la Embriología*, Omega, Barcelona, 644pp.
- Barron H., (1946), *Observations of the early differentiation of the motor neuroblast in the spinal cord of the chick*, *Journal of Comparative Neurology*, 85; 149-160.
- Bellairs R., (1998), *The Atlas of Chick Development*, Academic Press, USA, 323 pp.
- Bernhard W. y Granboulan N., (1968), *The Nucleus*, Academic Press, N.Y., 160pp.
- Bernhard W., (1969), *A new Staining procedure for electron microscopical cytology*, *J. Ultrastructure Research* 27, 250-265.
- Busch H., (1977), *Receptors and hormone action*, Academic Press, N.Y., Vol. 1, 32-97.
- Busch H., Reddy R., Rothblum L., et al, (1983), *SnRNAs, SnRNPs and RNA processing*, *Annual Review of Biochemistry*, 43; 617-654.
- Cajal S., (1911), *Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Maloine, Paris.
- Carter K., Taneja K. Y Lawrence J., (1991), *Discrete nuclear domains of poly (A) RNA and their relationship to the functional Organization of the nucleus*, *Journal of Cell Biology*, 115; 1191-1202.
- Clavenger C. y Epstein A., (1984), *Identification of a nuclear protein component of the Interchromatin granules using a monoclonal antibody and immunogold electron microscopy*, *Exp. Cell Research*, 151; 194-207.
- Cmarko D., Verschurre J. et al., (1999), *Ultraestructural Análisis of Transcription and Splicing in the cell nucleus after Bromo-UTP microinjection*, *Molecular Biology of the Cell*, 10, 211-223.
- Comings D. y Okada T., (1976), *The fibrillar nature of the nuclear matrix*, *Experimental cell research*, 103; 341-360.
- Comings D., (1972), *The structure and funtion of chromatin*, *Adv. Hum. Genet* 3, 237-431.

- Delgado M., Morais C., Neves N., et al, (1995), *The influence of B Chromosomes on rDNA Organization in rye interphase nuclei*, Chromosome Research, 3; 487-491.
- Derenzini M., Novello F., y Pession-Brizzi A., (1977), *Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural visualization of transcription at the cellular and molecular level*, Biol Cell 39, 113-116.
- Eils R., Gerlich D, Spector D. (2000), *Quantitative Imaging of pre-mRNA Splicing Factors in living cells*, Mol. Biol. Cell, vol. II, T2, 413-418.
- Fakan S. y Bernhard W., (1971), *Localization of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high-resolution autoradiography*, Exptl. Cell Res 67, 129-141.
- Fakan S., (1978), *High-resolution autoradiography as a tool for the localization of nucleic acid synthesis and distribution in the mamalian cell nucleus*, J. Microsc 106, 159-171.
- Fakan S., Leser G. y Martin E., (1984), *Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoprotein as visualized by immunocytochemistry in thin sections*, Journal of Cell Biology, 98: 358-363.
- Fakan S., Puvion E. y Spohr G., (1976), *Localization and characterization of newly synthesized nuclear RNA in rat isolated hepatocytes*, Experimental Cell Research, 67: 129-141.
- Ferreira J., Carmo-Fonseca M. (1994), *Differential interaction of Splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei*, Journal of Cell Biol., Vol 126, 11-23.
- Fu X. y Maniatis T., (1990), *Factor required for mamalian spliceosome assembly is localized in discrete regions in the nucleus*, Nature, 343: 437-444.
- Fujita S., (1963), *Matrix cell and cytogenesis in central nervous system*, Journal of Comparative Neurology, 120: 37-42.
- Fujita S., (1964), *Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by triated thymidine autoradiography*, Journal of Comparative Neurology, 122: 311-328.

- Fujita S., (1965), *An Autoradiographic study on the origin and fate of the sub pinal glioblast in the embryonic chick spinal cord*, Journal of Comparative Neurology, 124; 51-60.
- Hamburger V. y Hamilton H. (1952), *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. J. Comp. Neurology. 160; 535:546.
- Hamburger V., (1948), *The mitotic patterns in the spinal cord of the chick embryo and their relation to the histogenetic process*, Journal of Comparative Neurology, 88; 121-130.
- Hamburger V., (1975), *Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo*, Journal of Comparative Neurology, 160; 535-546.
- Hay E.D., (1968), *The Nucleus*, Academic Press, N.Y., 160pp.
- Hernández-Verdúm D., (1993), *The Ultrastructure of the chromosome periphery in the human cell lines. An in situ study using cryomethods in electron microscopy*, Chromosoma, 101(8); 502-510.
- Huang S. y Spector D., (1991), *Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors*, Genes Dev., 5; 2288-2302.
- Huang S. y Spector D., (1992), *U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles*, Proc. Natl. Acad. Sci., 89; 305-308.
- Jiménez-García L. Y Spector D., (1993), *In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism*, Cell, 73; 47-59.
- Lehninger A., Nelson D., Cox M., (1993), *Principios de Bioquímica*, Omega, Barcelona, 1020pp.
- Lener M., Boyle J., Mount S., et al, (1980), *Are snRNPs involved in splicing?*, Nature, 283; 220-224.
- López-Velázquez G., et al, (1996), *Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nucleus of Go rat lymphocytes*, Histochem Cell Biol, 105:153-161.
- Manuelidis (1990), *A view of interphase chromosome*, Science, 250; 1533-1540.
- Martin T. y Langman J., (1965), *The development of the spinal cord examined by autoradiography*, Journal of embryology and experimental morphology, 14; 25-35.

- Miller T., Hung C. y Pogo A., (1978), *Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes of mouse ascitis*, Biochemical and Biophysical Acta, 277: 354-367.
- Misteli T., Cáceres J., y Spector D., (1997), The dynamics of pre-mRNA splicing factor in living cells, Nature 387, 6632, 523-527.
- Monneron A., Bernhard W., (1969), *Fine Structural Organization of the Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells*, J. Ultrastructure Research 27, 266-288.
- Moyne G., Nash R., Puvion E., (1976), Visualization of transcriptional activity in the cell nucleus, 6th European Congress on Electron Microscopy, Jerusalem.
- Moyne G., Nash R., y Puvion E., (1977), Perichromatin granules and other nuclear components in isolated hepatocytes treated with cortisol and cicloheximide, Biol. Cell 30, 5-16.
- Nash R., Puvion E., Bernhard W., (1975), Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA, J. Ultrastruct. R. 53, 395-405.
- Novello F., Brizzi P. y Massimo D., (1978), Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural patterns. Exp. Cell Res., 112; 443-451.
- Oppenheim R. y Foelix F., (1972), *Synantogenesis in the chick embryo spinal cord*, Nature New Biology, 235.
- Oppenheim R., (1975), *The role of supraespal input in the embryonic motility*, Journal of Comparative Neurology, 160; 37-50.
- Ortega-Rangel, (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 Doctoral.
- Petrov P., y Bernhard W., (1971), Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of interphase nucleus, J. Ultrast. Res. 35, 386-402.
- Petrov P., y Sekeris C., (1971), Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation, Exptl. Cell Res 69, 393-401.

- Prestayco A., Tonoto M. y Busch H., (1970), *Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA*, Journal of Molecular Biology, 47: 505-515.
- Puvion E. y Moyne G., (1978), *Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins*, Experimental Cell Research, 115: 79-88.
- Puvion E., Puvion-Dutilleul F., (1996), *Ultrastructure of the Nucleus in Relation to Transcription and Splicing: Roles of the Perichromatin Fibrils and Interchromatin Granules*, Experimental Cell Research 229, 217-225.
- Rogers J. y Wall R., (1980), *A mechanism for RNA splicing*, Proc. Natl. Sci., 77: 1877-1879.
- Ruiz F., (1988), *Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción*, UNAM, México, 370pp.
- Ruiz-Dura M., (1988), *Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción*, Ciencias, UNAM, México.
- Sacco-Bubulya P y Spector D., (2002), *Disassembly of Interchromatin granule cluster alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing*. Journal of Cell Biology, V 156 #3, 425-436.
- Shaw P., (1995), *The Nucleolus*, Ann. Rev. Cell Dev. Bio., 11: 93-121.
- Simard R., Royal A., Lacoste-Royal G., et al, (1978), *Transcription in the interphase nucleus*, Electron Microscopy, vol. III.
- Spector D., Fu X. y Maniatis T., (1991), *Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus*, EMBO J., 10: 3467-3481.
- Spector D., Martín A. Y Scott G., (1983), *Immunoelectron microscopic localization of snRNP*, Biology Cell, 49: 1-10.
- Stelezner D., Martin A. y Scott G., (1973), *Early stages of synaptogenesis in the cervical spinal cord of the chick embryo*, Zellforsch 138: 475-488.
- Stuurman N., Lutzein de Jong y Roel van Driel, (1992), *Nuclear Frameworks: Concepts and operational definition*, Cell Biol. International Report, 16.

- Vázquez-Nin G. y Echeverría O., (2000), *Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas*, UNAM-FCE, México, 168pp.
- Vázquez-Nin G., Bernhard W., (1971), *Comparative Ultrastructural Study of Perichromatin and Balbiani Ring Granules*, J. Ultrastructure Research 36, 842-860.
- Vázquez-Nin G., Chávez B., Tomas C., (1973), *A Preferential Staining Method for Chromatin in Electron Microscopy*, J. De Microscopie, vol. 16. No. 2, 243-246.
- Vázquez-Nin G., Ortega-Rangel J., Echeverría O., (1980), *Nuclear Aspects of Neuroblast Differentiation in the Chick Embryo*, Biol. Cellulaire 39, 143-146.
- Vázquez-Nin G., Ortega-Rangel J., Echeverría O., et al, (1983), *Changes in Nuclear Ribonucleoprotein Constituents and Chromatin Disposition during Neural Differentiation and Maturation*, Biol. Cell 48, 17-24.
- Wassef M., (1979), *A cytochemical Study of Interchromatin Granules*, Journal of Ultrastructural Research, 69: 121-133.
- Zavala G., Aguilar X., Jiménez-García L., et al, (1992), *Changes in the ribonucleoprotein constituents of muscle cell in the chick embryo*, Biol Cell, 76: 159-165.
- Zavala G., Vázquez-Nin G., (1997), *Changes of Ribonucleoproteic structure of Embryonic epidermal cell nuclei during differentiation and maturation*, Biology of the Cell 89, 245-255.