

43  
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"ESTUDIO CITOQUIMICO DE LOS CAMBIOS DE LA EXPRESION  
GENICA DURANTE EL DESARROLLO DEL RIÑON METANEFRICO  
DE AVE"**

**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 :

**ELIZABETH CORDOBA MARTINEZ**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTORA: DRA. **OLGA MARGARITA ECHEVERRIA MARTINEZ**



MEXICO, D. F.

MAYO 1996

**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Estudio citoquímico de los cambios de la expresión génica durante el desarrollo del riñón metanéfrico de ave"

realizado por Elizabeth Córdoba Martínez

con número de cuenta 8816911-8, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. en C. (Biología) Olga Margarita Echeverría Martínez

Propietario Dr. en C. (Biología) Gerardo Hebert Vázquez Nin

Propietario Dr. en C. (Biología) Luis Felipe Jiménez García

Suplente Dra. en C. (Biología) Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Suplente Dra. en C. (Biología) Clara Equival Huesca

*[Firma]*  
Consejo Departamental de Biología  
M. en C. Alejandro Martínez Mena  
COORDINACION GENERAL  
DE BIOLOGIA

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, directora de la presente Tesis, quien me brindó su apoyo hasta la culminación de este trabajo y durante mi estancia en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias.

A los Dres. Guadalupe Zavala Padilla, Clara Esquivel Huesca, Gerardo Hebert Vázquez Nin y Luis Felipe Jiménez García, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Microscopía Electrónica: Lourdes, Rosario, Ernestina, Marco Antonio, Francisca, Guadalupe, Gabriel, Luis Felipe y Rafael porque de ellos aprendí a observar lo que mis ojos veían.

A Alejandro Soria por su ayuda y sugerencias a la redacción de este trabajo; por compartir conmigo esta experiencia.

A TODOS mis compañeros de la Facultad de Ciencias. En especial a Yolanda Nava, Luis Manuel Gutiérrez y Fernando Peña, porque algún día tuvimos un sueño común.

A mis compañeros del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.

A mis Padres Isabel y Cuauhtémoc  
y queridas hermanas, Erika, Claudia y Xochitl  
por su gran amor, comprensión y apoyo.

Alex  
por su paciencia, por ser una magnífica compañía en mi vida, por su amor...  
por lo que hemos compartido durante este tiempo al hacer nuestros esos sueños.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	
Envoltura nuclear.....	2
Complejo de poro.....	2
Cromatina.....	4
Ribonucleoproteínas.....	6
Fibras pericromatinianas (FPCs).....	9
Gránulos pericromatinianos (GPCs).....	11
Gránulos intercromatinianos (GICs).....	12
Nucléolo.....	13
Cuerpos espiralados.....	14
Matriz nuclear.....	14
Desarrollo del sistema urinario.....	15
OBJETIVO.....	18
MATERIAL Y METODO.....	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

## RESUMEN

Este trabajo se enfocó al estudio de las variaciones en la frecuencia de gránulos pericromatinianos (GPCs) durante la diferenciación del riñón metanéfrico de ave. Se procesaron muestras de riñón metanéfrico de embriones de pollo White Leghorn de 7.5, 12, 13, 15 días de desarrollo embrionario y recién nacido (HH33, HH38, HH39, HH41 y HH45, respectivamente). Se obtuvieron cortes ultrafinos que se contrastaron por medio de la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas, desarrollada por Bernhard. Se obtuvo la densidad de gránulos en cada núcleo por medio de un programa de análisis de imágenes (MIMA BioCom).

A partir de este estudio se detectaron diferencias significativas en la densidad de GPCs en células del túbulo contorneado proximal en los distintos estadios estudiados.

El riñón metanéfrico comienza a ser funcional a partir del día 12 de desarrollo (HH38). Un aumento en la frecuencia de estas partículas se hace evidente en estadios posteriores a este evento que corresponden a los estadios HH39 y HH41 (13 y 15 días de desarrollo, respectivamente) y se observa una reducción en el organismo recién nacido que corresponde a la mitad del valor máximo detectado en el estadio HH39 ( $1.55/\mu\text{m}^2$ ).

Se han descrito variaciones en la expresión de transcritos durante la embriogénesis de ave. Entre éstos se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidermal (R-EGF), el cual posee un período de alta expresión a partir del día 13, que coincide con el disparo de la diferenciación y con la acumulación de GPCs detectada en este trabajo. Otros ARN mensajeros que registran niveles máximos de expresión durante este estadio son los que codifican para TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 (factor de transformación del crecimiento  $\beta$ ). La disminución de estas partículas en el organismo recién nacido podría deberse a cambios en la relación entre la síntesis y exportación de mensajeros que habían sido almacenados y que los nuevos requerimientos del organismos inducen la supresión de dicho almacén.

Considerando que la expresión es diferencial durante el desarrollo del riñón metanéfrico, los resultados de las variaciones de los GPCs observadas en el presente estudio, sugieren que estas estructuras de almacenamiento de RNAm están involucradas en el proceso de diferenciación.

## RESUMEN

Este trabajo se enfocó al estudio de las variaciones en la frecuencia de gránulos pericromatinianos (GPCs) durante la diferenciación del riñón metanéfrico de ave. Se procesaron muestras de riñón metanéfrico de embriones de pollo White Leghorn de 7.5, 12, 13, 15 días de desarrollo embrionario y recién nacido (HH33, HH38, HH39, HH41 y HH45, respectivamente). Se obtuvieron cortes ultrafinos que se contrastaron por medio de la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas, desarrollada por Bernhard. Se obtuvo la densidad de gránulos en cada núcleo por medio de un programa de análisis de imágenes (MIMA BioCom).

A partir de este estudio se detectaron diferencias significativas en la densidad de GPCs en células del túbulo contorneado proximal en los distintos estadios estudiados.

El riñón metanéfrico comienza a ser funcional a partir del día 12 de desarrollo (HH38). Un aumento en la frecuencia de estas partículas se hace evidente en estadios posteriores a este evento que corresponden a los estadios HH39 y HH41 (13 y 15 días de desarrollo, respectivamente) y se observa una reducción en el organismo recién nacido que corresponde a la mitad del valor máximo detectado en el estadio HH39 ( $1.55/\mu\text{m}^2$ ).

Se han descrito variaciones en la expresión de transcritos durante la embriogénesis de ave. Entre éstos se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidermal (R-EGF), el cual posee un período de alta expresión a partir del día 13, que coincide con el disparo de la diferenciación y con la acumulación de GPCs detectada en este trabajo. Otros ARN mensajeros que registran niveles máximos de expresión durante este estadio son los que codifican para TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3 (factor de transformación del crecimiento  $\beta$ ). La disminución de estas partículas en el organismo recién nacido podría deberse a cambios en la relación entre la síntesis y exportación de mensajeros que habían sido almacenados y que los nuevos requerimientos del organismo inducen la supresión de dicho almacén.

Considerando que la expresión es diferencial durante el desarrollo del riñón metanéfrico, los resultados de las variaciones de los GPCs observadas en el presente estudio, sugieren que estas estructuras de almacenamiento de RNAm están involucradas en el proceso de diferenciación.



## **INTRODUCCION**

En el núcleo se encuentra la mayor cantidad del material genético de las células eucariontes, el ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta molécula contiene la información que condiciona la estructura y función de la célula y de todo el organismo. A partir del DNA, por mecanismos de regulación, se producen otras moléculas informacionales, que colaboran para llevar a cabo la síntesis de proteínas en el citoplasma. Tales moléculas son los ácidos ribonucleicos (RNA), el mensajero (mRNA), el ribosomal (rRNA) y el de transferencia (tRNA).

La interfase es un período dentro del ciclo celular donde la célula presenta una intensa actividad biosintética. Durante este período, mediante estudios bioquímicos y ultraestructurales, se han podido evidenciar los componentes moleculares, estructurales e informacionales, del núcleo, así como su organización espacial.

### **Envoltura nuclear.**

La envoltura nuclear, presente sólo en los organismos eucariontes, confina al DNA y define al compartimento nuclear. Está formada por dos membranas concéntricas que tienen una estructura en bicapa similar a la de otras membranas biológicas: la membrana nuclear interna y la membrana nuclear externa, separadas por un espacio perinuclear de 10 a 15 nm de ancho. A pesar de que las dos membranas son continuas, poseen una composición proteica distinta. La membrana interna tiene proteínas específicas que le permiten unirse a la lámina nuclear. La membrana externa es similar a la membrana del retículo endoplásmico rugoso. A ésta se encuentran adosados ribosomas encargados de la síntesis proteica. Las membranas tienen continuidad con el retículo endoplásmico rugoso, por lo tanto el espacio perinuclear se continua con el lumen del mismo (Alberts et al., 1994; De Robertis y De Robertis, 1986).

La envoltura está soportada por dos redes de filamentos intermedios: la lámina nuclear, de constitución proteica fibrosa que forma una delgada cubierta sobre la membrana nuclear interna y se une fuertemente a la cromatina; y otra que rodea a la membrana nuclear externa, con menor organización que la anterior ( Alberts et al., 1994; Darnell et al., 1986).

### **Complejo de poro.**

El sistema de membranas (o envoltura nuclear) no aísla completamente al núcleo ya que se encuentra perforado por numerosos poros. Es alrededor de los bordes de estos

poros donde ambas membranas se continúan, preservando la independencia del espacio perinuclear y el medio interno celular.

Los poros no son simplemente aberturas que permiten la comunicación libre entre el nucleoplasma y el citoplasma. Más bien están constituidos por estructuras proteicas supramoleculares altamente organizadas embebidas en la doble membrana nuclear, que regulan el movimiento de las macromoléculas (Feldherr y Akin, 1994). De esta manera cada poro está constituido por una estructura conocida como complejo de poro, compuesta por más de 100 proteínas distintas, denominadas nucleoporinas (Alberts et al., 1994).

Aunque se han desarrollado diversos modelos que explican la estructura del complejo de poro, el más aceptado es el propuesto por Franke y Scheer (1970, 1974), consiste en 2 estructuras anulares, localizadas en los márgenes nuclear y citoplásmico del poro. Ambos anillos tienen un diámetro externo de aproximadamente 110 nm conformados por 8 gránulos esféricos. Hacia la región externa y lejos de la apertura del poro, se extienden fibrillas que parten de los elementos granulares. Entre los dos anillos se encuentran ocho rayos en forma de cuña, cuyas bases se encuentran ancladas al margen del poro (región de fusión de la membrana) y sus ápices se extienden hacia el centro del poro. El anillo nuclear se encuentra asociado a elementos fibrosos que se extienden hacia el interior del núcleo formando una especie de receptáculo conocido como canasta nuclear, la cual posee un anillo terminal. Se ha observado que el centro del poro está ocupado por una estructura cilíndrica de 62.5 nm de largo y de talla variable, se sugiere que esta estructura funciona como un transportador (Feldherr y Akin, 1994). Diversas proteínas han sido identificadas como componentes del complejo de poro, entre ellas las proteínas integrales de membrana, POM121 y gp120, y otros polipéptidos denominados p250, NUP153 y p62, que han sido clonados y secuenciados. Actualmente se investiga el arreglo tridimensional de los distintos componentes moleculares del complejo de poro, así como sus interacciones y localización dentro de éste (Panté et al., 1994; Söderqvist y Hallberg, 1994).

El transporte a través de los poros puede ser por medio de difusión pasiva, como lo han revelado estudios de microinyección de partículas de oro coloidal cubiertas con proteínas cariofilicas (Feldherr et al., 1984) en el citoplasma y su subsecuente incorporación en el nucleoplasma; o bien por medio de transporte mediado por señales que corresponde a secuencias específicas de aminoácidos, que se sugiere pueden dilatar el diámetro del poro. Este último tipo de transporte involucra dos pasos principales: unión al complejo de poro y una translocación ATP-dependiente (Feldherr y Akin, 1994). El transporte nucleocitoplásmico

puede modificarse por el incremento del número de poros, como se ha observado en el estudio de células de riñón tratadas con aldosterona, donde se ha sugerido que la aldosterona controla los mecanismos de transporte aunque no modifica las propiedades biofísicas del complejo de poro (Oberleithner et al., 1994).

### **Cromatina.**

Cromatina es la denominación para el material nuclear rico en DNA. El DNA no se halla libre sino que se encuentra asociado a dos clases de proteínas: las histonas y proteínas cromosomales no histónicas.

La asociación del DNA a las histonas constituye las unidades fundamentales de empaquetamiento de la cromatina denominadas nucleosomas. Cada nucleosoma consiste en un núcleo proteico conformado por un octámero de histonas, constituido por dos copias de cuatro histonas diferentes denominadas H2A, H2B (ricas en lisina), H3 y H4 (ricas en arginina). Alrededor de éstas el DNA se enrolla dándole 2 vueltas, comprendiendo aproximadamente 146 pb en cada nucleosoma (Oudet, 1978), aunque la cantidad de DNA por nucleosoma puede variar de una especie a otra y durante el desarrollo embrionario.

La forma del nucleosoma corresponde a un disco o cilindro aplanado, con un diámetro de 11nm y una altura de 6 nm (Lewin, 1994). Una quinta histona, la H1 (rica en lisina), no forma parte del nucleosoma, pero se encuentra asociado con él. Las histonas nucleosomales son proteínas pequeñas, constituidas por 102-135 aminoácidos, mientras que la histona H1 es más grande conteniendo cerca de 220 aminoácidos (Alberts et al., 1994). Los nucleosomas no sólo son estructuras que empaquetan el DNA; a partir del hecho de que estas estructuras no se encuentran uniformemente distribuidas a través de los genes y que por lo tanto su posición tiene un papel dinámico en la organización de la cromatina, se les considera como una parte integral del aparato regulatorio de la expresión génica (Lu et al., 1994; Wallarth et al., 1994).

A partir del nucleosoma existen varios niveles de compactación de la cromatina, el primero está constituido por filamentos delgados de cromatina, que poseen un diámetro de 100 Å, corresponden a una hilera de nucleosomas que se encuentran en contacto unos con otros, estas estructuras han sido evidenciadas por medio de microscopía electrónica *in situ*, por medio de la fijación de células y un tratamiento con amina de osmio (Derenzini y Hernandez-Verdum, 1983). En presencia de la histona H1, estas fibras delgadas sufren un plegamiento dando origen a fibras más gruesas con un diámetro de 200-300Å, conformada

por un enrollamiento en solenoide con cerca de 6 nucleosomas por turno con un agujero en el eje central de 100 Å de diámetro. Las interacciones entre los nucleosomas son modificadas y establecidas por la histona H1 (Leth et al., 1979).

Las proteínas no histónicas, que comprenden una proporción menor que las histonas, están involucradas en los niveles superiores de empaquetamiento de la cromatina. Incluyen al grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), entre ellas la HMG1, cuya función está relacionada con el mantenimiento de la estructura de la fibra de 300 Å en solenoide, esta proteína y la HMG2 parecen inducir el superenrollamiento del DNA. Otra proteína, la ubiquitina, se encuentra asociada a la histona H2A, y en algunos casos la modifica (Felsenfeld, 1978; Gaubatz, 1978).

La cromatina es relativamente resistente a la digestión con la enzima DNAsa I, sin embargo en las corcanías de genes potencialmente activos la cromatina es aproximadamente 25 veces más sensible al ataque con DNAsa I. Los experimentos de digestión con DNAsa I indican una periodicidad de 200 pb, sugiriendo que la cromatina activa sensible a DNAsa I presenta una conformación más laxa. Ciertos sitios limitados son especialmente susceptibles al ataque con DNAsa I, estos sitios DNAsa I hipersensibles (DHS) se encuentran cercanos al extremo 5' en genes activamente transcritos (De Pomerai, 1990).

La configuración que posee la cromatina durante la interfase está relacionada con su actividad metabólica, asumiendo dos patrones morfológicos: una forma condensada y una descondensada, que es posible reconocer por medio de la tinción con amina de osmio o con PTA, para microscopía electrónica. Las zonas cromatínicas condensadas o heterocromatínicas en el núcleo en interfase, que corresponden a DNA inactivo, en la mayor parte de las células tiene 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 nucléolo, que lo rodea como un anillo. 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 citoquímica ultraestructural han demostrado que una gran proporción del RNA extranucleolar es sintetizado en las regiones donde la cromatina posee la forma no condensada (Derenzini et al., 1977).

### **Ribonucleoproteínas.**

La expresión génica de las células eucariontes involucra la transcripción, el procesamiento de pre-mRNA (RNA premensajero ó RNA mensajero inmaduro), el transporte y la translocación núcleo-citoplásmica del mRNA. En las células eucariontes los eventos de transcripción y traducción están separados espacial y temporalmente, debido a que el DNA (fuente del primer transcrito) permanece "aislado" del citoplasma donde se encuentra la maquinaria de síntesis de proteínas. Estos eventos aislados constituyen mecanismos de regulación de la expresión génica.

La transcripción, primer evento de la expresión génica, se encuentra mediada por la RNA polimerasa (RNAPol), enzima encargada de sintetizar una hebra complementaria de RNA a partir de la cadena de DNA con sentido 3'-5', a partir de la cual se producirá una cadena de RNA con dirección 5'-3'. En eucariontes existen tres RNA polimerasas que difieren en su composición de subunidades, en su sensibilidad hacia  $\alpha$ -amanitina y en el grupo de genes que transcriben (Lewin, 1994).

La RNA polimerasa que transcribe los genes precursores de mRNAs de todas las proteínas, así como la mayoría de los snRNAs (RNAs pequeños nucleares) y una variedad de transcritos sin función aún definida, es la RNAPol II cuya localización es nucleoplásmica y presenta sensibilidad a bajas concentraciones de  $\alpha$ -amanitina (De Pomerai, 1990).

El primer transcrito a partir del DNA se denomina RNA heterogéneo nuclear (RNAhn), incluyendo al pre-mRNA (Dreyfuss, 1986). Conforme es sintetizado se asocia a proteínas que se encuentran en gran cantidad, en al menos 20 tipos diferentes en el núcleo y que poseen alta afinidad por el RNA, constituyendo complejos RNA-proteína que se conocen como ribonucleoproteínas heterogéneo nucleares (RNPhn) (Burd y Dreyfuss, 1994; Shamoó et al., 1994; Ecomidís y Pederson, 1983). En adición al papel de empacamiento de RNAhn y transporte de mRNA, se sugiere que también las RNPhn son esenciales para el "splicing" (Shamoó et al., 1994).

La mayoría de los genes eucariontes presentan interrupciones dentro de su secuencia que corresponden a secuencias que no codifican para el producto final, los intrones, que se ubican entre las secuencias codificantes, denominadas exones. De esta manera el tamaño de los genes es mucho mayor que el de sus productos (Lewin, 1994).

El transcrito primario tiene la misma organización del gen y es conocido como pre-mRNA. Este transcrito es procesado con la finalidad de eliminar a los intrones y unir a los exones mediante el proceso de "splicing" que se lleva a cabo en el núcleo, acompañado de

otras modificaciones que sufre el RNAhn, para producir el mRNA maduro. Al extremo 5' del primer transcrito se une un "cap" de trimetilguanosina, mientras que el extremo 3' es poliadenilado, se añaden a éste varios residuos de ácido adenilico, conformando una cola de poli A.

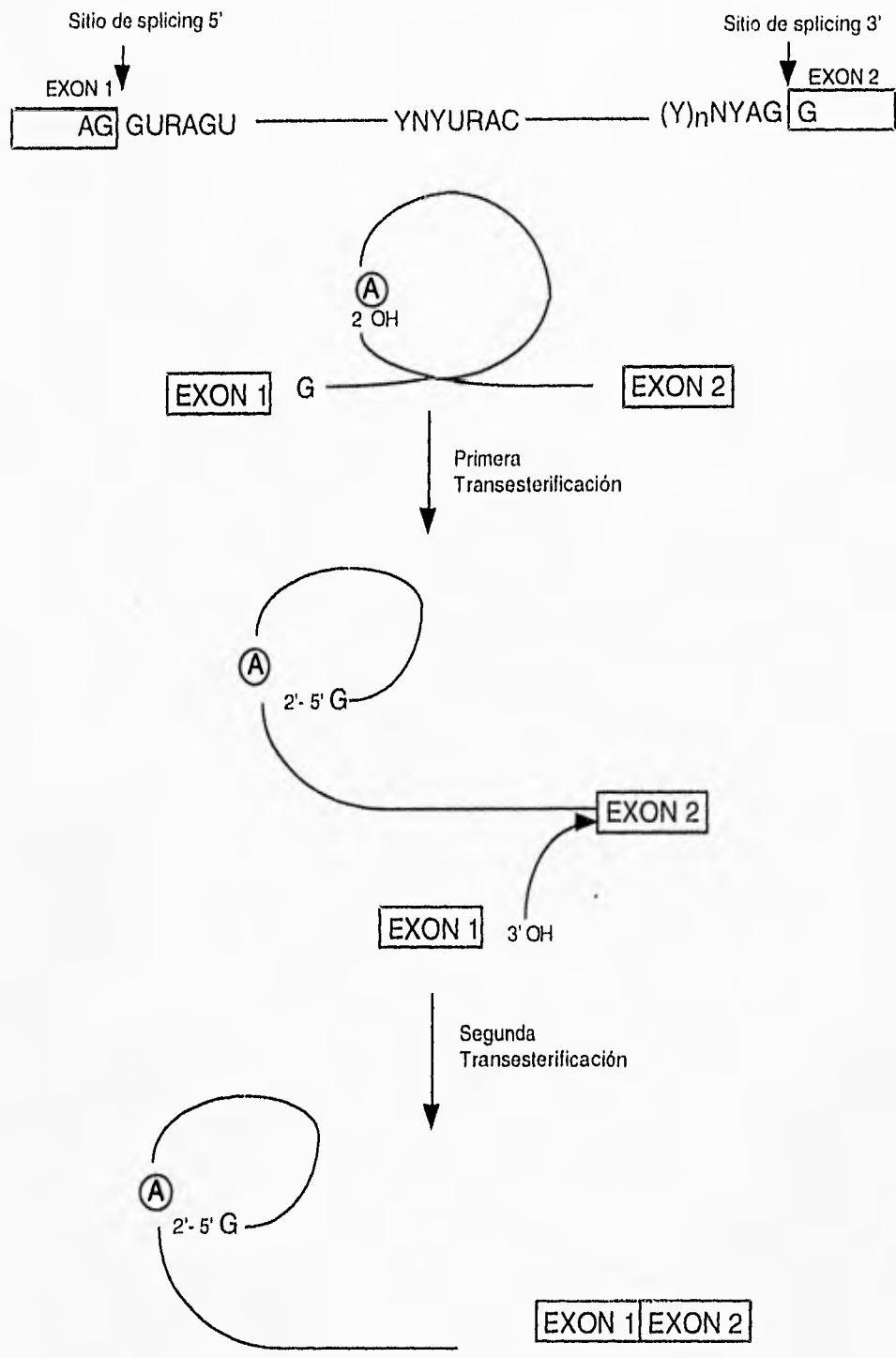
Posteriormente el mRNA maduro es transportado a través de los poros nucleares hacia el citoplasma donde será traducido.

El mecanismo de "splicing" requiere la presencia de elementos *cis* como *trans*. Los elementos *cis* corresponden a secuencias específicas dentro del RNA que se encuentran en los bordes del intrón (donde se une a los exones), que se denominan sitios de unión de splice 5' y 3', y a una secuencia que se encuentra en una región definida dentro del intrón, el sitio de unión (branch point). Los elementos *trans* necesarios para el proceso de "splicing" son cinco pequeños RNA nucleares (U1, U2, U4, U5 y U6) que se encuentran unidos a proteínas por lo que constituyen ribonucleoproteínas conocidas como U snRNPs (Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares, ricas en uridina). También corresponden a estos elementos otras proteínas nucleares que se unen al pre-mRNA, las RNPhn, que tienen sitios de unión que se unen específicamente al pre-mRNA (Legrain y Chanfreau, 1994; Lührmann, 1990).

Todos estos elementos involucrados en el "splicing" forman un complejo donde se lleva a cabo el procesamiento del pre-mRNA, denominado spliceosoma (Rio, 1993).

Los intrones son eliminados por un mecanismo de 2 pasos que involucran dos reacciones de transesterificación (Esquema 1). Primeramente se presenta un ataque nucleofílico al sitio 5' por el grupo hidroxilo 2' de la adenosina del sitio de unión formándose un enlace fosfodiéster 2'-5'. De esta reacción se libera un exón con el extremo 3'OH libre y al intrón en forma de horquilla ("lariat") que aún permanece unido al segundo exón. La segunda transesterificación involucra el ataque nucleofílico al sitio de splice 3' por el extremo 3'OH libre del exón liberado en el paso anterior. El resultado de esta reacción es la producción de los exones ligados y la liberación del intrón en forma de lazo. El producto final es el mRNA maduro que será transportado a través de los poros nucleares y traducido en el citoplasma (Legrain y Chanfreau, 1994; Nielsen, 1994; Lewin, 1994).

De esta forma, durante el metabolismo intracelular, el RNA se asocia con proteínas específicas para constituir los complejos ribonucleoproteicos (RNP). Para entender en detalle el funcionamiento de estas partículas se ha investigado su estructura, localización y función.



**Esquema 1.** Mecanismo de splicing . Los exones 1 y 2 se localizan en las regiones 5' y 3' del intrón, respectivamente. El sitio de adenosina en el "branch point" está encerrado en un círculo. R= purina, Y= pirimidina, N=cualquier nucleótido. Tomado de Legrain y Chanfreau, 1994.

Las estructuras ribonucleoproteicas pueden evidenciarse al microscopio electrónico fácilmente mediante la técnica de contraste regresivo preferencial, desarrollada por Bernhard, para microscopía electrónica (Bernhard, 1969). Esta técnica hace uso de las propiedades del EDTA que actúa como quelante de la tinción en las regiones donde se encuentra DNA, extrae selectivamente el uranilo depositado en los complejos de cromatina compacta, la cual se decolora. Posteriormente al agregar sales de plomo, las ribonucleoproteínas adquieren un mayor contraste que las demás estructuras. Los componentes ribonucleoproteicos forman diversas estructuras (Esquema 2) que se describirán a continuación.

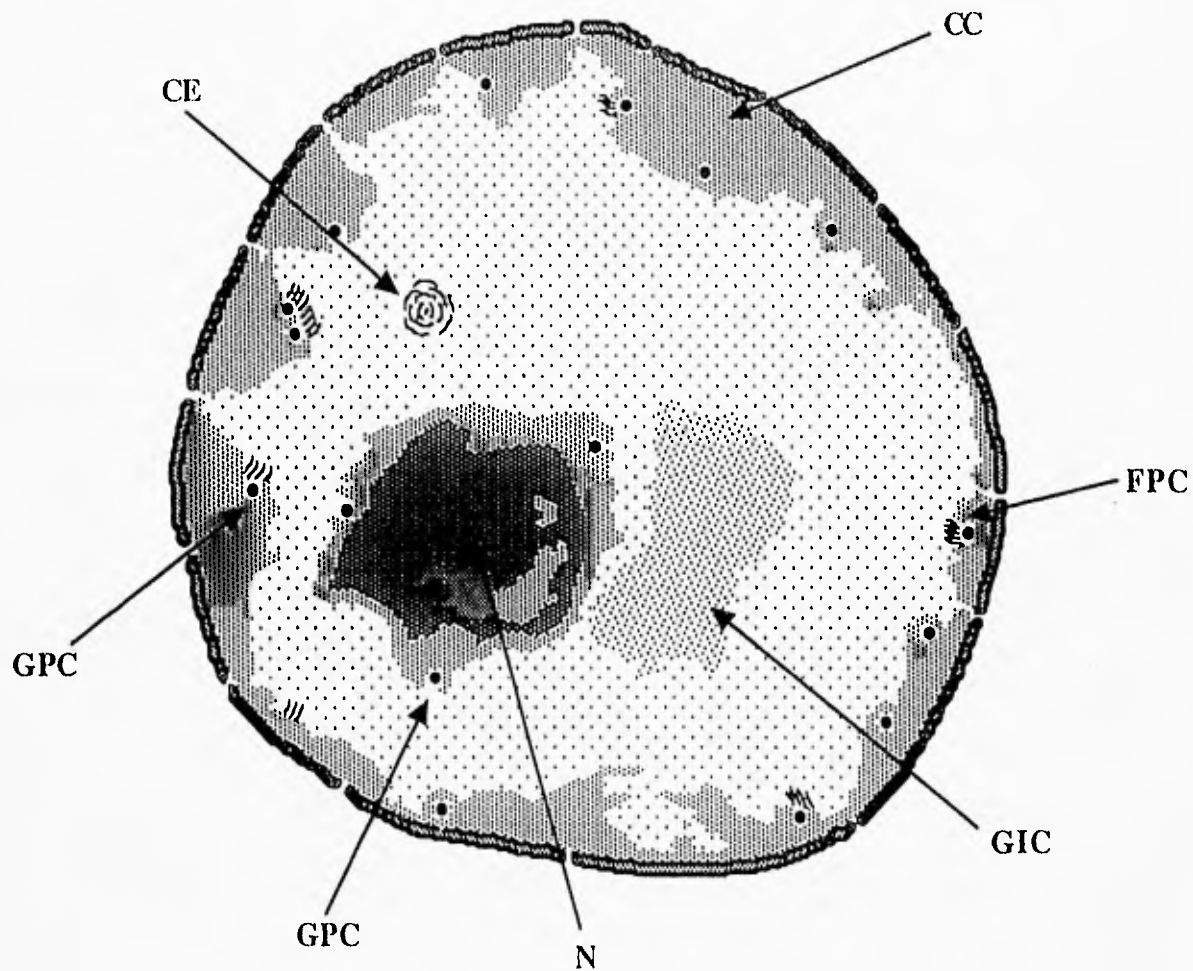
#### **Fibras pericromatinianas (FPCs).**

Descritas por primera vez en 1969 por Monneron y Bernhard, son fibras que aparecen irregularmente enrolladas, concentradas en el límite de la heterocromatina y en el espacio intercromatiniano, tienen un diámetro que varía de 5-10 nm. Se ha demostrado que contienen mRNA inmaduro protegido por un material proteico y RNAs relacionados con su maduración postranscripcional. Se les considera como estructuras presentes en eucariontes superiores (Jiménez-García y Segura Valdez, 1993).

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 FPCs se incrementa cuando se activa la transcripción, como fue demostrado al aplicar cortisona a hepatocitos. Inversamente, el bloqueo de síntesis de RNA por medio de  $\alpha$ -amanitina induce una reducción en el número de FPCs (Petrov y Sekeris, 1971; Simard, et al. 1978; Derenzini et al. 1978); estos estudios permitieron concluir que las FPCs representan el sustrato morfológico donde se localiza el RNAhn (RNA heterogéneo nuclear) recién sintetizado (Nash et al., 1975; Petrov y Bernhard, 1971).

Debido a que las snRNPs (ribonucleoproteínas pequeñas nucleares) y el factor de "splicing" SC35 se localizan en las FPCs, se ha propuesto que en estas estructuras ribonucleoproteicas, que son los sitios de transcripción, se efectúa el procesamiento postranscripcional temprano, que involucra el proceso de "splicing" (Spector et al., 1991; Jiménez-García y Spector, 1993).





**Esquema 2.** Distribución de las partículas ribonucleoproteicas, evidenciadas por la técnica de contraste preferencial con EDTA. Las estructuras ribonucleoproteicas se encuentran distribuidas en el espacio intercromatiniano, un cúmulo de gránulos intercromatinianos (GIC) cercano al nucleolo (N), se observan fibras ribonucleoproteicas (FPC), gránulos pericromatinianos rodeados por su halo característico (GPC) que se encuentran cercanos a la cromatina compacta decolorada perinuclear (CC) y cuerpos espiralados (CE). Elaborado, según Monneron y Bernhard (1969).

### **Gránulos pericromatinianos (GPCs) .**

Descritos por Swift (1962) y Watson (1962), son cuerpos esféricos con un diámetro de 30-50 nm, localizados en la periferia de la cromatina compacta, rodeados por un halo de 250 Å de diámetro. Estos gránulos están constituidos por fibras de RNA empaquetadas (de un diámetro de 15-30 Å) protegidas por una matriz proteica (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Vázquez-Nin y Bernhard, en 1971, realizan un estudio comparativo entre los GPCs de células de mamífero y los gránulos de Balbiani en núcleos de las glándulas salivales de *Chironomus thummi*, demostrando que ambas son estructuras ribonucleoproteicas que poseen características morfológicas y propiedades citoquímicas similares. Considerando que los gránulos de Balbiani se encuentran principalmente en regiones de alta síntesis de RNA, se sugiere que son almacenes de mRNA. Se concluyó, a partir de este estudio que ya que los GPCs guardan similitudes con los gránulos de Balbiani, podrían tener la misma función (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). Se ha demostrado que los GPCs se encuentran íntimamente relacionados con las FPCs y que éstas son precursoras de los primeros (Vázquez-Nin et al., 1989), formándose a partir del enrollamiento del RNA recién sintetizado (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971). En 1990 Vázquez-Nin y col. sugieren que estos gránulos contienen mRNA maduro, que ha sufrido el proceso de "splicing" (Vázquez-Nin et al., 1990).

Estas partículas son consideradas como estructuras universales de eucariontes superiores relacionadas con el transporte y almacenamiento de mRNA maduro (Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993), hipótesis que ha sido confirmada en numerosos experimentos utilizando drogas que interfieren con el metabolismo del RNA, ya sea inhibiendo la síntesis de RNA y/o reduciendo la eficiencia del proceso de maduración del RNA, donde se ha observado una alteración en la producción y distribución de los GPCs. Esta alteración involucra un incremento significativo en el número de GPCs al aplicar drogas como la ciclohexamida (Daskal et al., 1975; Lafarga et al., 1993),  $\alpha$ -amanitina (Petrov y Sekeris, 1971) DRB, un análogo de la adenosina (Puvion-Dutilleul et al., 1983) y CdCl<sub>2</sub> (Cloruro de cadmio) (Puvion y Lange, 1980). La cantidad de GPCs aumenta, ya que aunque estas drogas bloquean la síntesis y/o exportación de RNA, la síntesis de éste prosigue durante cierto tiempo, lo que provoca la acumulación de GPCs por una alteración en el balance síntesis-exportación de mensajeros.

La acción de hormonas, como el cortisol también induce un aumento en el número de GPCs, al incrementar los niveles de transcripción en hepatocitos aislados (Moyne et al.,

1977). Por el contrario el efecto del estradiol, en ratas ovariectomizadas, es el de reducir la frecuencia de GPCs en las células del endometrio (Vázquez-Nin et al., 1978). De la misma manera la presencia de testosterona en ratas castradas induce a una reducción en el número de GPCs (Echeverría et al., 1991). El rápido decremento en el número de GPCs, posterior al tratamiento hormonal, en ambos casos, está determinado por un incremento en el transporte de RNA hacia el citoplasma, impidiendo la acumulación de GPCs en el núcleo.

Los sistemas en desarrollo se han utilizado como modelo para estudiar el comportamiento de estas partículas durante la diferenciación. A partir de estos estudios se han detectado variaciones de estas estructuras ribonucleoproteicas durante la diferenciación celular en estados de desarrollo bien definidos. Durante el desarrollo del músculo se observó un incremento en la frecuencia de GPCs cuando ocurre la innervación y el desarrollo de la placa motora (Zavala et al., 1992). Cambios similares se han detectado en motoneuronas durante el desarrollo de las terminaciones sinápticas, donde se observó un aumento en la frecuencia de GPCs cuando se establecieron los contactos sinápticos entre las neuronas, demostrando que el aumento de GPCs está relacionado, por lo tanto, con eventos definidos durante la transformación de los neuroblastos en neuronas (Vázquez-Nin et al., 1980). Por lo tanto, el incremento en la frecuencia de estas partículas se relaciona con cambios específicos de las células, que a su vez se relacionan con una importante modificación de la expresión génica.

#### **Gránulos intercromatinianos (GICs).**

Se observan como estructuras esféricas con un diámetro que va de 200 a 300 Å, frecuentemente se encuentran formando agregados en el nucleoplasma interconectándose con fibrillas delgadas que forman una red fina en el espacio intercromatiniano (Monneron y Bernhard, 1969)

Son estructuras que contienen RNA protegido por proteínas (Fakan y Puvion, 1980), algunos autores los consideran como componentes de la matriz nuclear debido a que conservan su distribución característica después de extracciones con DNAsa y altas concentraciones de sales (Krzyszowska-Gruca et al., 1983). Debido a que incorporan uridina trititada lentamente, se sugiere contienen RNA estable, de poco recambio.

En estas partículas ribonucleoproteicas se han localizado proteínas con actividad enzimática, entre ellas la ATPasa, GTPasa y NAD-pirofosfatasa (Fakan y Puvion, 1980).

Wassef, en 1979, demostró que los GICs contienen grandes cantidades de fosfoproteínas. Utilizando la tinción de nitrato de plata amoniacal (Ag-AS) se hacen evidentes las estructuras que poseen fosfoproteínas, entre ellas los GICs. Busch y col. demostraron que la mayoría de las proteínas teñidas con este método son la C23 y la B23, las cuales son proteínas ácidas que se caracterizan por poseer alto contenido de ácidos aspártico y glutámico así como grupos fosfatos (Takeuchi y Takeuchi, 1984). Por medio de inmunodetección se ha establecido que los GICs contienen snRNPs y el factor de "splicing" SC35, considerándose como estructuras de almacén o ensamblado de proteínas y RNAs, involucrados en el procesamiento postranscripcional de pre-mRNA. Jiménez-García y Spector, en 1993, postularon un movimiento de estos factores de procesamiento y maduración del pre-mRNA de los GICs hacia las FPCs, en donde realizan su función (Jiménez-García y Segura-Valdez, 1993).

#### **Nucléolo.**

El nucléolo más que un organelo puede considerarse como la expresión morfológica de la transcripción del RNA ribosomal. Es el sitio de síntesis y procesamiento del RNA prerribosómico (pre-rRNA) y del ensamblado del ribosoma. Su presencia y actividad van estrechamente ligadas a la necesidad de ribosomas en la célula y por tanto, a la fabricación de proteínas. Por eso es mucho más visible en los momentos de mayor síntesis de ribosomas. Cuando no hay transcripción, como durante la mitosis, se disgrega. Aunque no se encuentra separado por una membrana del contenido nuclear tiene una composición distintiva de proteínas, enzimas que están en altas concentraciones requeridas para la síntesis y procesamiento de precursores ribosomales para producir los RNA ribosomales 28s, 18s y 5.8s, que se encuentran en los ribosomas maduros (Watson et al., 1987).

Estudios ultraestructurales han permitido distinguir sus distintos componentes, los centros fibrilares, el componente fibrilar denso y la región granular.

Los centros fibrilares se evidencian como fibras que poseen aproximadamente 5 nm de espesor. En este sitio se ha detectado la presencia de la RNAPol I, y de otras proteínas como las fosfoproteínas C23 y B23, así como de la fibrilarina. El componente fibrilar denso está constituido por fibras abundantes de 40 a 80 Å de espesor, es en esta región donde se ha detectado una alta actividad transcripcional y el procesamiento temprano del pre-rRNA. La región granular está formada por gránulos de 15-20 nm de diámetro que contienen ribonucleoproteínas que formarán parte de la futura unidad mayor ribosomal, es decir,

representan el sitio de procesamiento tardío, maduración y almacenamiento de prerribosomas (Jiménez-García, 1988).

### **Cuerpos espiralados.**

Descritos en 1969 por Monneron y Bernhard en hepatocitos, fueron evidenciados por Ramón y Cajal en 1903 como inclusiones argirófilas esféricas en varios tipos de células neuronales. En la actualidad son consideradas como estructuras ribonucleoproteicas presentes tanto en células vegetales como en animales eucariontes. Se describen como estructuras de cerca de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, constituidas por fibras de 15 a 25  $\mu\text{m}$  de grosor, enrolladas sobre un eje por lo que muestran un arreglo concéntrico, dando una apariencia de una espiral.

Se les considera como estructuras dinámicas involucradas en el metabolismo nuclear del RNA. Contienen snRNPs, proteína nucleolar fibrilarina y una proteína específica, la p80-coilina. Con base en estos datos se ha propuesto que los cuerpos espiralados pueden estar participando en varios estados del proceso de "splicing" de los RNAs.

En estudios utilizando ciclohexamida, agente que interfiere con la síntesis de rRNA nucleololar, se observa una alteración en la estructura de estos cuerpos, evidenciándose una compactación de las fibras que los constituyen (Lafarga et al., 1994). Por otra parte la estimulación de hepatocitos con estrógeno, provoca un incremento en la cantidad de cuerpos espiralados (Ochs et al., 1995).

### **Matriz Nuclear.**

La estructura residual que se preserva después de hacer extracciones con sales altamente concentradas y digestión con nucleasas constituye la matriz nuclear. De esta manera esta estructura posee un componente proteico que corresponde a un 10% del contenido de proteínas nucleares, está virtualmente desprovista de lípidos, DNA e histonas (Getzenberg, 1994; Ghosh et al., 1978; Berenzney, 1977).

La matriz está constituida por una red tridimensional de filamentos que corresponden a un esqueleto de ribonucleoproteínas, que retienen la integridad y forma del núcleo, acompañado de otras estructuras como lo son la lámina nuclear, el complejo de poro y el nucléolo residual, todos estos componentes se interconectan entre sí.

Aunque la caracterización de las proteínas de la matriz nuclear es complicada por su heterogeneidad, se ha sugerido que las glicoproteínas, entre ellas las HMG, forman parte de esta estructura (Ferraro, 1994).

Esta red proteica provee los sitios de anclaje de la cromatina y tiene un papel central en la organización topológica específica del DNA, se ha sugerido que está involucrada en el proceso de regulación de replicación y transcripción del DNA (Capco, 1982; Hancock, 1982).

La matriz nuclear también participa en el procesamiento del RNA. El RNAhn y los snRNPs son abundantes en la matriz nuclear, es el sitio de unión de los productos intermedios del procesamiento del RNA y se ha demostrado que aquí se transcribe mRNA ya que se han encontrado genes activos asociados a la matriz. Los spliceosomas se han localizado en matriz nuclear (Getzenberg, 1994).

#### **Desarrollo del sistema urinario.**

Los órganos excretores de los vertebrados son derivados del mesodermo, corresponden a agregados de túbulos uriníferos que se conectan al celoma en su extremo proximal por medio de los nefrostomas (embudos ciliados) y se comunican al exterior mediante un sistema de conductos que, en los vertebrados inferiores, se abre en la cloaca.

Los túbulos y los conductos se desarrollan a partir de los pedúnculos de los somitas, los nefrotomas. El nefrotoma es una banda de células que conecta a los somitas con el mesodermo de la capa lateral. Las células se separan formando una capa parietal y otra visceral, entre éstas se forma una cavidad que se denomina nefrocele (que durante un tiempo es continua con el miocelo y el celoma definitivo). El nefrocele que se mantiene unido a la placa lateral persiste en el sistema primitivo de órganos excretores convirtiéndose en el nefrostoma. La pared dorsolateral del nefrostoma es atravesada por un tubo hueco que se encuentra conectado a la cavidad celómica que da lugar al conductillo urinífero o renal. Los extremos distales de los conductillos más anteriores se vuelven hacia atrás y se fusionan, dando origen al conducto excretor común, el conducto pronéfrico. Los conductillos están asociados a agregados de finos vasos sanguíneos que se denominan glomérulos que se encargan de filtrar la sangre a partir de su endotelio. Los conglomerados de vasos sanguíneos se invaginan en la pared del conductillo renal, que se ensancha para contener los glomérulos, para dar lugar a la cápsula de Bowman. El desarrollo de los conductillos excretores es en dirección céfalocaudal. Los primeros conductillos que se diferencian tienen una organización más primitiva que los siguientes, de esta manera en los vertebrados

superiores el sistema néfrico se desarrolla como tres entidades distintas: el pronefros, el mesonefros y el metanefros, los cuales aparecen sucesivamente, en un orden temporal y espacial (Willier et al., 1971). Los nefrotomas más anteriores forman el pronefros, el mesonefros se desarrolla a partir de los de la región caudal y el metanefros procede de los nefrotomas de la región posterior del tronco. Es así como el pronefros es el primer riñón en desarrollarse, el mesonefros es el segundo y el último en aparecer es el metanefros (Balinsky, 1978).

El riñón metanéfrico se desarrolla a partir de la parte posterior del cordón nefrogénico, la parte adyacente de la cloaca. Aunque no existen trazas de relación de los conductillos con los nefrostomas, el tejido nefrogénico deriva primariamente de éstos. El metanefros no forma su conducto propio, sino que emplea el conducto pronefrico para eliminar la orina que excreta (Balinsky, 1978).

La diferenciación del rudimento del riñón metanéfrico requiere la intervención de un epitelio competente, la yema uretral y un componente del mesénquima; el mesénquima metanéfrico. Esta interacción resulta en la formación de agregados de células del mesénquima, la cual continúa hasta diferenciarse en tubos secretores (Lehtonen, 1975).

En 1988 Sariola y col. determinaron que en el rudimento de riñón metanéfrico indiferenciado existe un tercer tipo de célula que puede ser detectada por métodos inmunohistoquímicos; se trata de neuronas que se evidencian con anticuerpos contra gangliósidos de la superficie celular. Se observó que las terminales neuronales se encuentran alrededor del mesénquima, cercanas a la yema uretral. A partir de este estudio y de anteriores, donde se había demostrado que las neuronas están involucradas en la regulación de la morfogénesis del riñón *in vitro*, se ha sugerido que la yema uretral podría ser la responsable de la condensación inicial del mesénquima y las neuronas de disparar la diferenciación durante la diferenciación del riñón *in vivo* (Sariola et al, 1988).

Se ha demostrado, por los métodos utilizados por Grobstein donde aislaba los dos tejidos primordiales en la diferenciación del riñón (la yema uretral y el mesénquima nefrogénico) y los combinaba "in vitro", que existe una interacción inductiva que convierte el mesénquima a epitelio tubular y que promueve la proliferación y ramificación de la yema uretral (Grobstein, 1956). A través de una serie de eventos morfológicos bien definidos, el epitelio formado nuevamente se desarrolla en los tubulos renales y glomerulos, mientras que la yema uretral forma el sistema de tubos colectores. Las primeras nefronas son unidas a los tubos colectores, mientras son embebidas en el mesénquima metanefrogénico conforme la

yema uretral continúa creciendo (Gilbert, 1991). Esta conversión característica del mesénquima a epitelio permite una proliferación continua de diversos tipos celulares funcionales que están diseñados, a lo largo de la nefrona, para integrar la regulación fisiológica de sal, agua y productos de desecho.

La función propia también requiere una asociación precisa con el sistema renal vascular y la creación de un adecuado número de nefronas para sostener al organismo a través de su vida adulta.

Aunque las propiedades de las señales de inducción están bien definidas, las moléculas que inducen la diferenciación del mesénquima del riñón permanece sin esclarecerse. La inducción requiere el contacto íntimo entre las células o entre las células y su matriz extracelular y no puede ser transmitido de una célula inducida a otra. Como esta señal no es difundible, debe ser capaz de penetrar varias capas de células en el mesénquima. Un péptido secretado asociado con la matriz extracelular debe ser consistente con los datos disponibles, aunque tal candidato aún no ha sido identificado. Diversos factores de crecimiento y receptores que se expresan en el riñón en el periodo de inducción se cree poseen un papel determinante en el desarrollo del riñón (Patterson y Dressler, 1994).

El riñón metanéfrico es el sistema renal funcional en las etapas finales del desarrollo embrionario en ave. Mientras que el pronefros ya ha degenerado y el mesonefros comienza a degradarse, el riñón metanéfrico adquiere la función de desechar los productos nitrogenados de la sangre, función que seguirá manteniendo después de que el organismo haya eclosionado del huevo y durante su vida adulta.



## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo consistió en la determinación de las variaciones en frecuencia de las partículas ribonucleoproteicas, en especial de los gránulos pericromatinianos (GPCs) en el núcleo interfásico de células epiteliales del túbulo contorneado proximal durante el proceso de diferenciación del riñón metanéfrico de ave.

Dado que los gránulos pericromatinianos son partículas relacionadas con el almacén y procesamiento de mRNAs, las variaciones numéricas que de éstos se presenten en los diferentes estadios de desarrollo del organismo, estarán relacionados con eventos particulares en el proceso de diferenciación que atenderán a cambios en la expresión génica, con lo que seguramente se llevará a cabo la liberación de mensajeros hacia citoplasma que se habían mantenido almacenados así como a la retención de otros en el núcleo.

Debido a que la diferenciación celular es un proceso dinámico, se han determinado bioquímica y molecularmente cambios en la expresión génica, como lo es la síntesis de distintos transcritos que varían según el estado de desarrollo. Durante la diferenciación celular se han observado cambios en la frecuencia numérica de los gránulos pericromatinianos en órganos que derivan de las distintas capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). En este estudio el riñón metanéfrico es de interés debido a que es un órgano que comienza a diferenciarse en un estadio tardío de desarrollo, que comienza a ser funcional en los estadios embrionarios y mantiene su funcionalidad en el organismo recién nacido.

## MATERIAL Y METODO

El material biológico utilizado en este estudio consistió de embriones de pollo, raza White Leghorn, que han sido procesados en diferentes estadios de desarrollo, el cual fue determinado de acuerdo a la clasificación elaborada por Hamburger y Hamilton (1951). Se seleccionaron los estadios a partir del 33, considerando que en éste el riñón metanefros aún no ha completado su diferenciación y que aún no es funcional. Se procesaron las muestras de 3 riñones metanéfros para cada estado de desarrollo estudiado, siendo éstos los estadios HH33, HH38, HH39, HH41 y recién nacido, que corresponden a 7.5, 12, 13, 15 y 21 días de desarrollo, respectivamente.

### Procesamiento de muestras.

Los riñones se obtuvieron rápidamente después de haber decapitado al embrión y haber hecho una incisión en la región ventral, goteándola con solución fijadora. Una vez extraídos ambos riñones, éstos se colocaron en una gola de solución fijadora y se cortaron en pequeños fragmentos, posteriormente se colocaron en nueva solución fijadora que consistió en una mezcla de glutaraldehído 2%-paraformaldehído 4%, diluidos en una solución amortiguadora de fosfatos 0.2M a un pH de 7.3.

Las muestras se fijaron por un período de una hora. Previamente lavadas, utilizando el amortiguador antes mencionado (3 lavados de 10 min. c/u), se efectuó el proceso de deshidratación con alcohol etílico de concentraciones crecientes, partiendo de una concentración de 70% y prosiguiendo con las siguientes de 80%, 90% y 100%, con dos baños de 10 minutos cada uno. Por último con óxido de propileno con 3 baños de 15 minutos cada uno.

Las muestras fueron sometidas a una preinclusión lenta, colocándose en mezclas de proporción creciente de medio de inclusión decreciente de óxido de propileno por periodos de 12 horas, de acuerdo a la siguiente relación:

Oxido de propileno	Medio de inclusión
	2 : 1
	1 : 1
	1 : 2

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

EPON	10.13 g
DDSA (Anhído dodecenil succínico)	9.3 g

NMA (Anhído 2,3-metilnorbornendicarboxílico)	3.8 g
DMP (2,4,6-dimetil aminometilfenol)	0.33 g

Para la polimerización, las muestras fueron colocadas en moldes planos donde se vertió la mezcla de inclusión y se incubó a 60°C por 24 horas después de las cuales se dejaron a temperatura ambiente y se comenzaron a trabajar.

#### **Obtención de cortes para microscopía electrónica.**

Se tallaron pirámides en el extremo de los bloques y se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo Sorvall MT2, de un grosor aproximado de 240 nm que se montaron en portaobjetos, fueron teñidos con azul de toluidina para ser observados al microscopio óptico con el fin de localizar la zona de interés para este estudio: los túbulos contorneados proximales. Una vez habiendo identificado la zona y reducido el área de la cara de la pirámide se procedió a obtener cortes ultrafinos de aproximadamente 60 a 90 nm de grosor.

#### **Contraste y observación de cortes ultrafinos.**

Los cortes ultrafinos se montaron en rejillas de cobre cubiertas con membrana de formvar. Los cortes se contrastaron con la técnica de contraste preferencial para ribonucleoproteínas desarrollada por Bernhard (Bernhard, 1969): por flotación 3 minutos en acetato de uranilo, 14 minutos en EDTA 0.2M pH 6.8 y finalmente 1 minuto en citrato de plomo. Entre cada contrastante se realizó un lavado con agua bidestilada y se secaron con papel filtro.

Los cortes contrastados se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM-9 y se obtuvieron micrografías electrónicas de los núcleos de los túbulos contorneados proximales tomadas a 8 800 aumentos.

Las impresiones de los núcleos fotografiados dieron un aumento total de 35 200X. A partir de estas fotografías se cuantificó directamente el número de gránulos pericromatinianos para posteriormente, con un programa de análisis de imágenes (MIMA BioCom), obtener los valores de densidad numérica de gránulos pericromatinianos de 30 núcleos para cada estadio estudiado, tomando en cuenta la relación número de gránulos/ $\mu\text{m}^2$ .

Con estos datos se calcularon los valores de media, varianza, desviación estandar y error estandar. Se utilizó la prueba t de student para analizar la significancia estadística de las diferencias entre los grupos de medidas.

## RESULTADOS

Se estudiaron los estadios HH33, HH38, HH39, HH41 y recién nacido, donde se evidenciaron variaciones significativas en la densidad de gránulos pericromatinianos en el núcleo interfásico, así como rearrreglos en los componentes principales del núcleo en interfase.

La densidad numérica de gránulos pericromatinianos varió en los distintos estadios estudiados ( ver Tablas 1, 2 y 3). En el estadio HH38 el riñón metanéfrico comienza a ser funcional, se registra un aumento de GPCs en estadios posteriores a este evento (HH39 y HH41) con un evidente descenso de su frecuencia en el organismo recién nacido, cuyo valor es aproximadamente la mitad del registrado en el estadio HH39 que posee el máximo nivel, cuyo valor es de  $1.55/\mu\text{m}^2$  (Gráfica 1).

Se localizaron, al microscopio óptico, los túbulos contorneados proximales constituidos por un epitelio cúbico (o de células cilíndricas bajas) que poseen el lumen obliterado, debido a que la superficie orientada hacia el lumen posee microvellosidades, que no se evidencian al microscopio óptico (Geneser, 1989). Aunque al microscopio óptico los límites laterales de las células no se observan, se evidencia por medio de las observaciones al microscopio electrónico que las superficies laterales forman un complejo de interdigitaciones. Las microvellosidades son largas, regularmente orientadas y densamente agrupadas. En general, en todos los estadios estudiados las células poseen gran cantidad de lisosomas y mitocondrias, orientadas, en su mayoría, perpendicularmente a la membrana basal, aunque puede variar su cantidad de una célula a otra en el mismo estadio.

En el estadio HH33 se observan los tubulos contorneados proximales conformados por el epitelio de células cúbicas, al microscopio óptico. Por medio de observaciones al microscopio electrónico, aunque la técnica de contraste es preferencial para ribonucleoproteínas se pueden evidenciar las microvellosidades características de este epitelio y las interdigitaciones que existen entre las paredes celulares.

El núcleo de estas células es basal y se observa la envoltura nuclear, no se aprecian cúmulos de cromatina compacta. En todo el núcleo se observa un entramado de fibras RNPs entre las que se disponen pequeños cúmulos de GICs en regiones cercanas al nucléolo, el cual presenta un mayor contraste.

Los GPCs se localizan en la periferia del núcleo, muy cercanos a la envoltura nuclear así como dispersos en la región intercromatiniana, distinguiéndose del resto de RNPs por su

halo característico (Fig. 1). La frecuencia de estas partículas en núcleos de este estadio (HH33) es de  $0.83/\mu\text{m}^2$  (ver Tabla 1).

Los túbulos contorneados conformados por el epitelio de células cilíndricas bajas pueden apreciarse fácilmente en cortes semifinos para microscopía óptica, con sus núcleos basales en el estadio HH38, cuando el riñón metanéfrico ha comenzado a ser funcional y el mesonefros comienza a degenerar.

En núcleos correspondientes al estadio HH38 de desarrollo (Fig. 2), se puede apreciar una distribución homogénea de las partículas ribonucleoproteicas homogéneas en el espacio intercromatiniano. Se observan cúmulos de GICs entre fibras de RNPs y GPCs dispersos, cercanos a la envoltura nuclear. En este estadio de desarrollo la frecuencia de GPCs es de  $0.94/\mu\text{m}^2$  (ver Tabla 1).

El epitelio de los túbulos contorneados proximales del estadio HH39 se aprecia en cortes semifinos para microscopía óptica conformado por células cúbicas con núcleos basales y el lumen obliterado. Al microscopio electrónico se observan las microvellosidades del epitelio con las típicas interdigitaciones presentes en las paredes laterales de las células y la presencia de mitocondrias y lisosomas en el citoplasma.

En núcleos que corresponden al estadio HH39 se observan cambios ultraestructurales de los componentes RNPs nucleares apreciables con respecto al estadio anterior, un marcado incremento en la cantidad de cromatina compacta que se observa en acumulaciones que se disponen en la región perinuclear, así como en los bordes del nucléolo. Se ha dado una redistribución en las partículas RNPs, apreciándose cúmulos más grandes de GICs entre una red fina de fibras RNPs. Se observa una mayor cantidad de GPCs en la periferia de la cromatina perinucleolar, así como en el espacio intercromatiniano (Fig. 3). Aunque en algunos núcleos puede no apreciarse el acumulamiento de cromatina en la periferia del núcleo sí se observa un aumento en la cantidad de gránulos pericromatinianos (Fig.4). La frecuencia de estas partículas, que es mayor que en los estadios anteriores, se sitúa en un valor de  $1.55/\mu\text{m}^2$  (ver Tabla 1).

En el estadio HH41 se aprecia un incremento en la condensación de la cromatina, cúmulos de cromatina compacta se sitúan en la región perinuclear así como en la región perinucleolar. Los GICs han disminuido y sólo se observan pequeños cúmulos de éstos en el espacio intercromatiniano. Se observan las fibras RNPs entre estos cúmulos. Los GPCs se distribuyen en la zona intercromatiniana pero preferentemente en la periferia de la cromatina compacta (Fig. 5). Estas partículas ribonucleoproteicas alcanzan una frecuencia de  $1.39/\mu\text{m}^2$

en núcleos de este estadio (HH41), que es menor al del estadio anteriormente mencionado (ver Tabla 1).

En núcleos de organismos recién nacidos se observa un rearrreglo en el patrón de distribución de los componentes del núcleo. Se aprecian pequeños cúmulos de cromatina compacta en la periferia del núcleo de bajo contraste. Se observan agregados de GICs distribuidos en el espacio intercromatiniano, el nucléolo se evidencia fuertemente contrastado. Se observa una reducción en la frecuencia de GPCs con respecto a los estadios HH39 y HH41, siendo de  $0.79/\mu\text{m}^2$  (Gráfica 1). Los GPCs se distribuyen principalmente en la periferia del núcleo, cercanos a la envoltura nuclear (Fig. 6).

	HH33	HH38	HH39	HH41	R.N.
	0.73	0.67	1.79	1.18	0.74
	0.81	0.66	1.85	1.61	0.72
	0.74	0.78	1.74	1.61	0.69
	0.75	0.72	1.47	1.52	0.79
	0.77	0.72	1.37	1.67	0.78
	0.72	0.68	1.33	1.51	0.75
	0.76	0.74	1.32	1.45	0.81
	0.77	0.69	1.30	1.48	0.83
	0.74	0.67	1.26	1.45	0.82
	0.80	0.68	1.25	1.29	0.82
	0.84	0.69	1.27	1.18	0.84
	0.87	0.96	1.32	1.39	0.89
	0.87	0.77	1.35	1.39	0.83
	0.86	0.83	1.49	1.56	0.81
	0.83	0.79	1.55	1.52	0.78
	0.87	0.94	1.56	1.64	0.77
	0.83	0.98	1.62	1.58	0.75
	0.84	0.93	1.59	1.52	0.72
	0.82	0.95	1.57	1.51	
	0.86	0.99	1.52	1.54	
	0.89	0.81	1.53	2.01	
	0.88	1.01	1.53	1.57	
	0.89	1.13	1.51	1.25	
	0.87	1.12	1.86	1.20	
	0.90	1.28	1.80	1.01	
	0.91	1.25	1.69	1.00	
	0.88	1.20	1.95	1.00	
	0.88	1.43	1.77	1.01	
	0.87	1.47	1.68	1.04	
		1.25	1.62	1.06	
		1.14			
		1.09			
<b>N</b>	<b>29</b>	<b>32</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>18</b>
<b>X</b>	<b>0.83</b>	<b>0.94</b>	<b>1.55</b>	<b>1.39</b>	<b>0.79</b>
<b>ε</b>	<b>0.06</b>	<b>0.24</b>	<b>0.20</b>	<b>0.25</b>	<b>0.05</b>

Tabla 1. Densidad numérica de gránulos pericromatinianos (número de gránulos / $\mu\text{m}^2$ ) en los distintos estadios de desarrollo estudiados.



Estadio	HH33	HH38	HH39	HH41	R.N.
HH33	--	--	-18.73	-11.82	2.59
HH38	-2.43	--	--	--	--
HH39	--	10.87	--	--	-15.89
HH41	--	--	-2.68	--	--
R.N.	--	--	--	-10.11	--

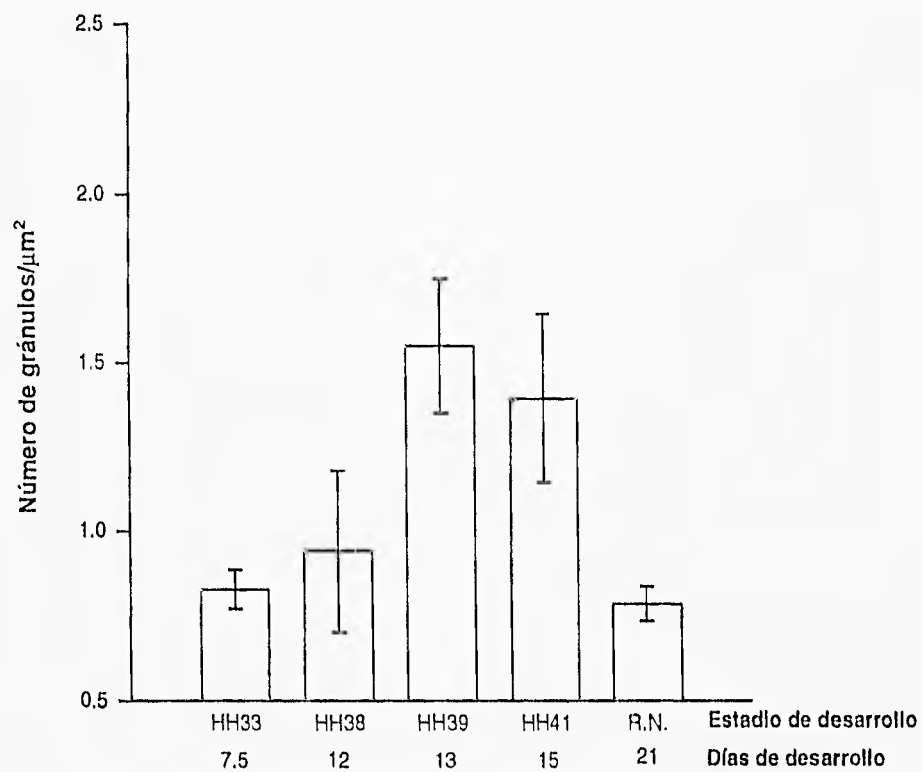
Tabla 2. Valor de t de student entre dos grupos de medidas pertenecientes a los estadios estudiados.

Estadio	HH33	HH38	HH39	HH41	R.N.
HH33	--	--	0	0	0.013
HH38	0.0183	--	--	--	--
HH39	--	$8.8 \times 10^{-16}$	--	--	0
HH41	--	--	$9.6 \times 10^{-3}$	--	--
R.N.	--	--	--	$2.9 \times 10^{-13}$	--

Tabla 3. Valor del nivel de significancia entre dos grupos de medidas pertenecientes a los distintos estadios estudiados.

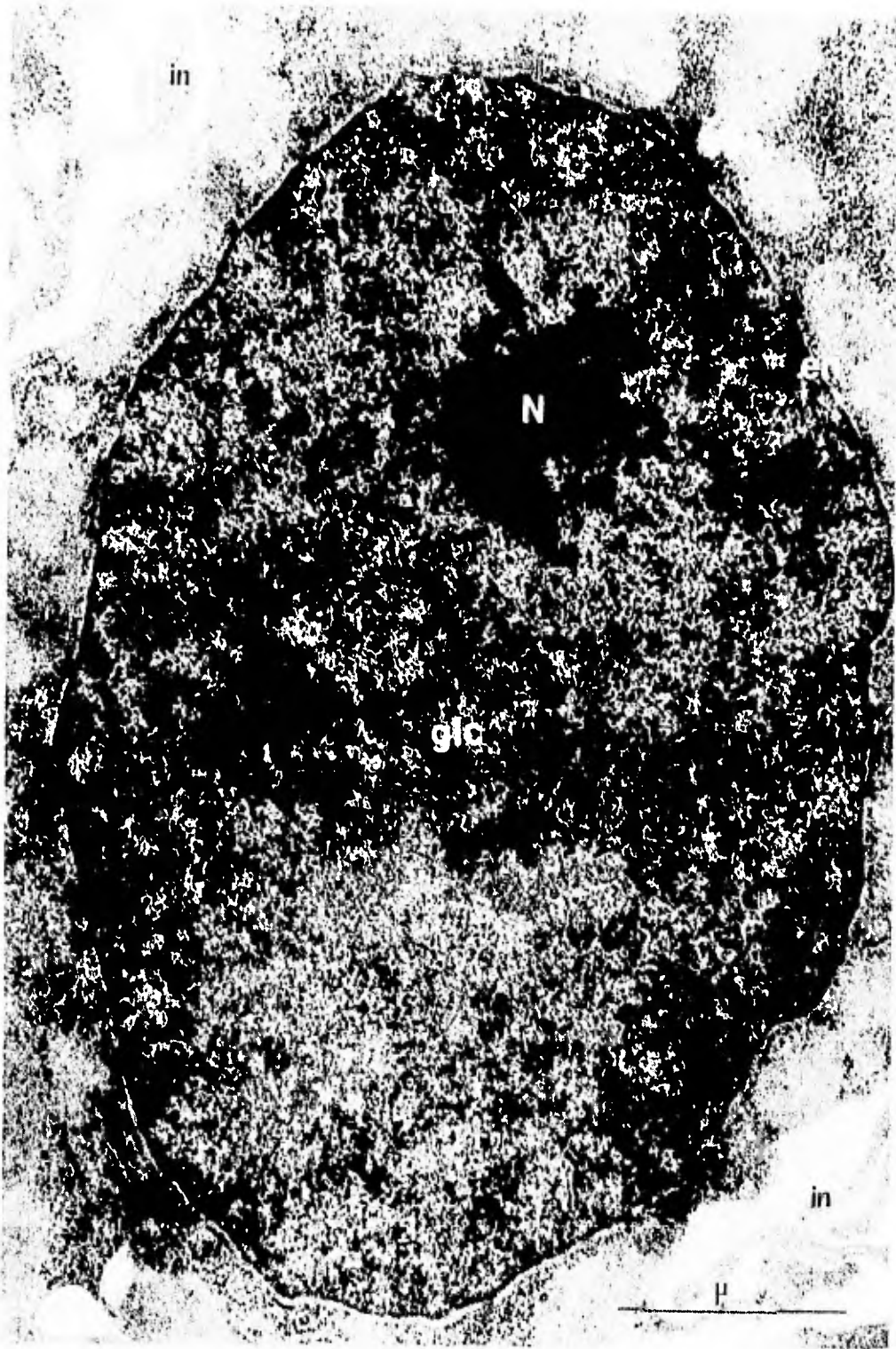
## VARIACION DE GRANULOS PERICROMATINIANOS EN EL RIÑON

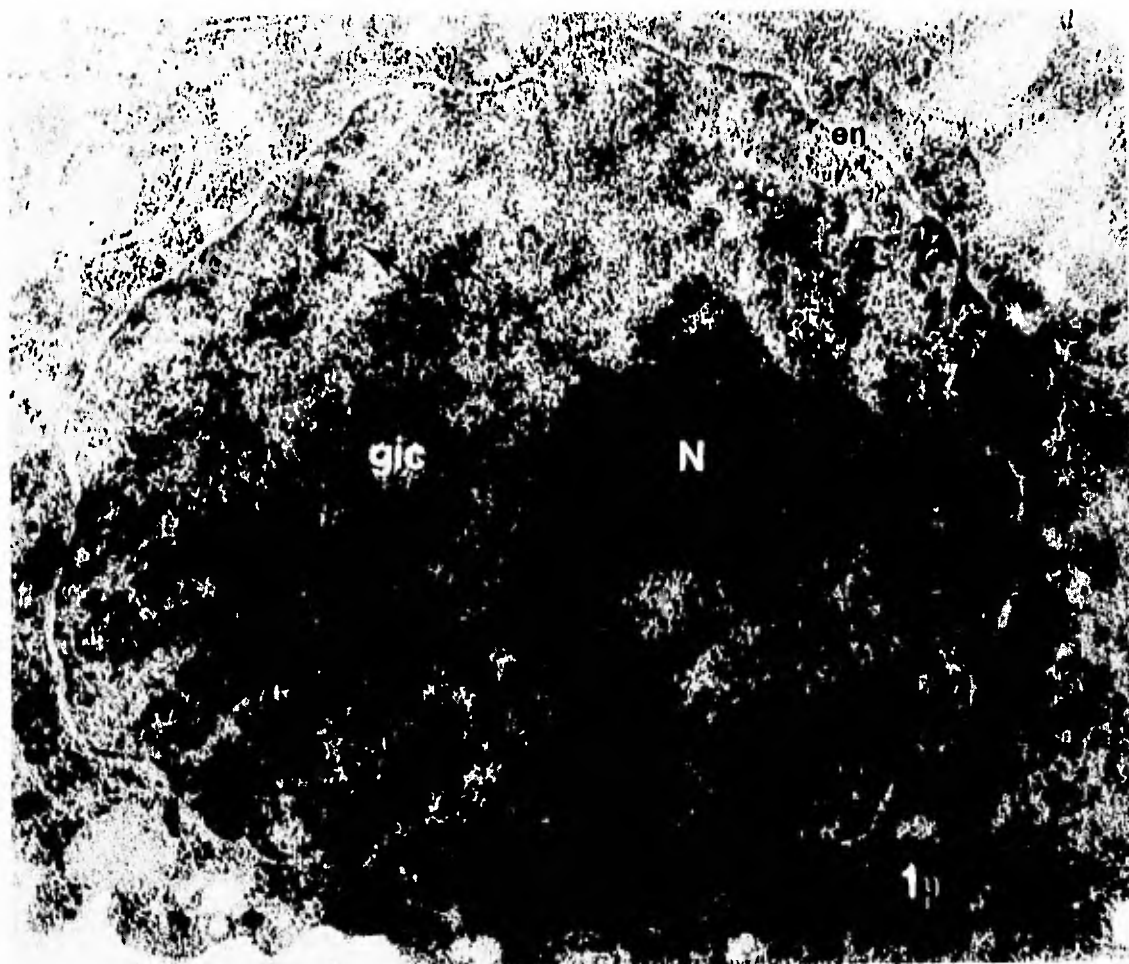
### METANEFRICO DE AVE



**Gráfica 1.** Se muestran las variaciones en la frecuencia de gránulos pericromatinianos en el núcleo interfásico del túbulo contorneado proximal durante el desarrollo del riñón metanéfrico de ave. Se aprecia una mayor frecuencia de estas partículas en los estadios HH39 y HH41 (correspondientes a 13 y 15 días de desarrollo, respectivamente) y una reducción en su frecuencia en el organismo recién nacido.

**Figura 1.** Núcleo interfásico del túbulo contorneado proximal de riñón metanéfrico de ave a los 7.5 días de desarrollo embrionario (HH33). Presenta numerosas estructuras ribonucleoproteicas distribuidas homogéneamente en el área nuclear. Se pueden apreciar gránulos pericromatinianos (flechas) dispuestos en la periferia del núcleo, cercanos a la envoltura nuclear (en). Se observa un entramado de fibras ribonucleoproteicas entre las que se disponen cúmulos de gránulos intercromatinianos (gic) y el nucléolo (N). Interdigitaciones celulares laterales (ln). Contraste con EDTA (39 600X)

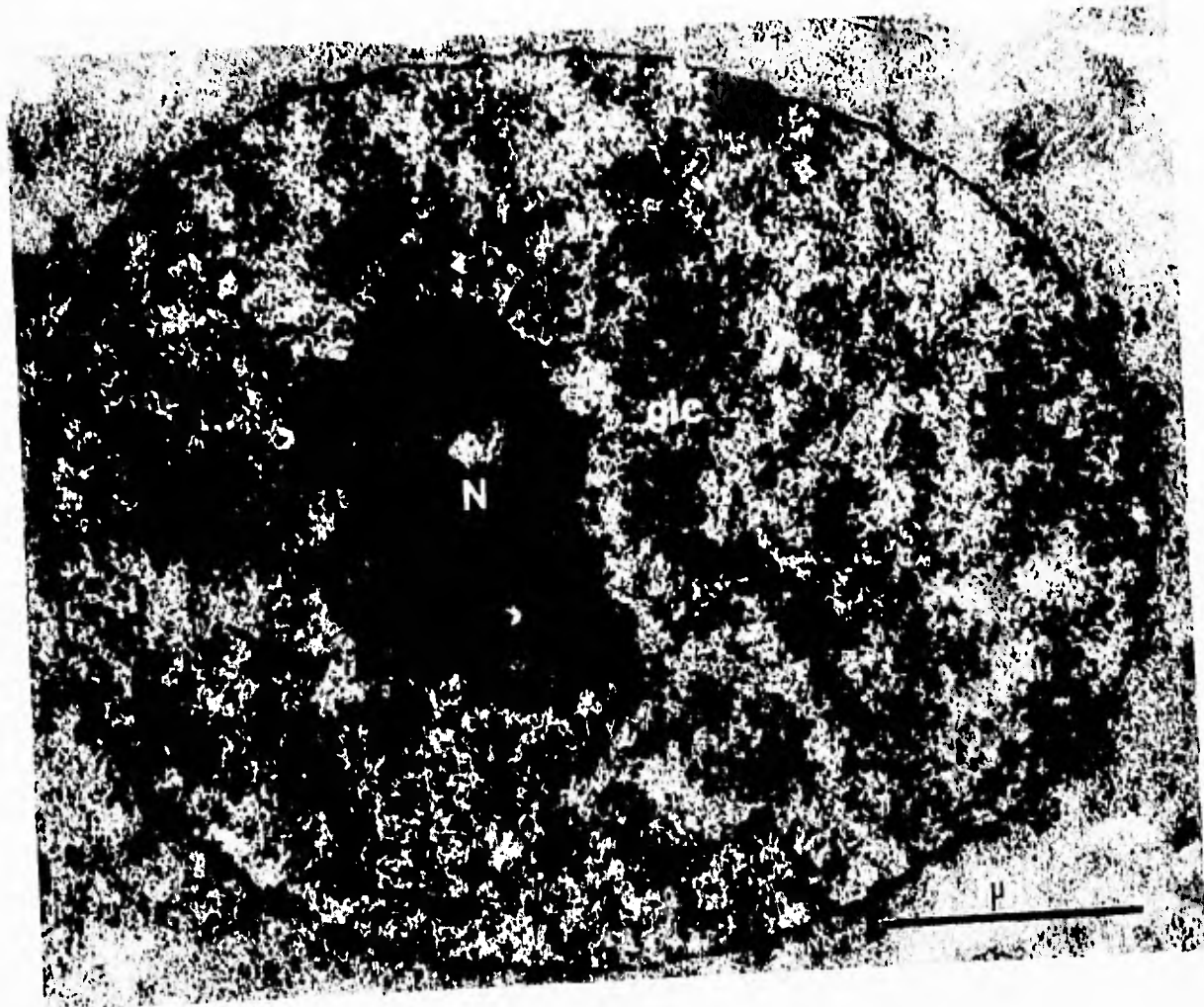




**Figura 2.** Micrografía del núcleo interfásico del epitelio de los túbulos contorneados proximales del riñón metanéfrico a los 12 días de desarrollo embrionario (HH38). Se aprecia una red de fibras ribonucleoproteicas entre las que se disponen gránulos intercromatinianos (gic) y el nucléolo (N). Se observan gránulos pericromatinianos dispuestos en la periferia del núcleo (flechas), cercanos a la envoltura nuclear (en) y en el espacio intercromatiniano. Contraste con EDTA. (39 600X).



**Figura 3.** Aspecto de un núcleo en interfase del epitelio cúbico de los túbulos proximales de riñón metanéfrico del estadio de desarrollo HH39 (13 días de incubación) donde se aprecian cúmulos de cromatina compacta (c) en la periferia del núcleo y alrededor del nucléolo (N), se observa la distribución de los componentes ribonucleoproteicos: gránulos intercromatinianos (gic) formando un cúmulo cercano al nucléolo, los gránulos pericromatinianos se observan distribuidos en la zona intercromatiniana y cercanos a la cromatina compacta (flechas). Contraste con EDTA (39 600X).

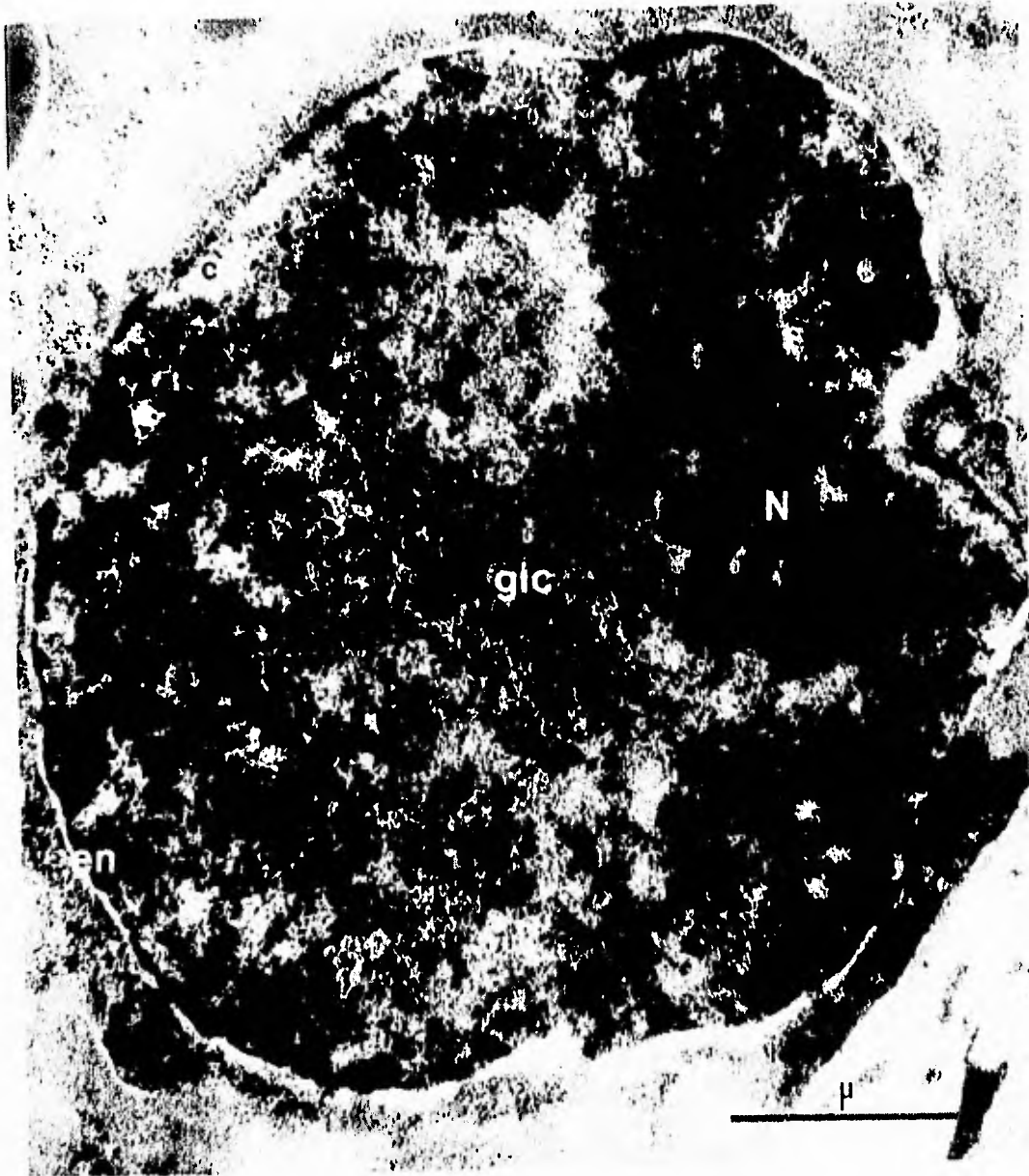


**Figura 4.** La micrografía muestra a un núcleo interfásico del túbulo contorneado proximal a los 13 días de desarrollo (HH39), donde se aprecia la distribución de las partículas ribonucleoproteicas: cúmulo de gránulos intercromatinianos (gic) entre un entramado de fibras ribonucleoproteicas, el nucléolo (N) y gránulos pericromatinianos (flechas) en cercanías a la envoltura nuclear aislados o formando pequeños cúmulos. Contraste con EDTA (39 600X).



**Figura 5.** Núcleo interfásico del túbulo proximal de riñón metanéfrico correspondiente al estadio HH41 de desarrollo embrionario (15 días de incubación) donde se observa la cromatina compacta decolorada (c) perinuclear y alrededor del nucléolo (N). Los gránulos pericromatinianos (flechas) se disponen dispersos en el área intercromatiniana y cercanos a la envoltura nuclear. Contraste con EDTA (39 600 X).





**Figura 6.** Micrografía donde se muestra un núcleo interfásico correspondiente al epitelio de los túbulos contorneados proximales del riñón metanéfrico del organismo recién nacido. Puede apreciarse la distribución de los componentes ribonucleoproteicos: cúmulos de gránulos intercromatinianos (gic) dispuestos en una red de fibras ribonucleoproteicas, gránulos pericromatinianos (flechas) dispuestos en la periferia del núcleo cercanos a la envoltura nuclear (en) y al nucléolo (N). Se observa poca cromatina compacta perinuclear decolorada (c). Contraste EDTA (39 600X).

## DISCUSION

Un aspecto importante de los metazoarios es la especialización de un tipo celular en particular para llevar a cabo determinadas funciones. Comúnmente esto se refleja en la expresión tejido-específica de algún gen. El mecanismo fundamental responsable de la diversidad fenotípica es la expresión de un grupo de genes específico para un tipo particular de célula (Nagy et al, 1994). Las diferencias en la expresión génica entre tipos celulares está mayormente determinada por regulación transcripcional (Alberts et al, 1994).

Cuando se comparan los distintos tipos celulares de un animal, sus patrones de expresión generalmente se sobrelapan en parte, ya que involucran funciones comunes (como enzimas de vías metabólicas comunes), pero por otro lado son distintos ya que pueden estar sintetizando productos característicos para su función específica. El proceso que la célula adquiere para presentar estos patrones distintos de expresión se denomina **diferenciación**. Se ha determinado que existen distintos grupos de genes, aunque parcialmente sobrelapados, que se expresan como mRNAs en distintos estados de desarrollo. La población de mRNAs en el núcleo es mucho mayor que la población de mRNAs citoplásmico, derivado de esta observación se ha postulado que existe una población de secuencias transcritas dentro del núcleo que son retenidas y que de manera diferencial son exportadas hacia el citoplasma (De Pomerai, 1990). La expresión morfológica de los almacenes de este mRNA son los gránulos pericromatinianos, por lo tanto los cambios en la expresión génica están relacionados con las variaciones de estas estructuras ribonucleoproteicas. En un tiempo determinado, no todos los mRNAs potencialmente traducibles son expresados en forma de proteína; la población de mRNAs que se traducen cambia drásticamente como respuesta a señales específicas, por alguna circunstancia ambiental o durante el desarrollo (Dreyfuss, 1986).

Siendo la diferenciación un proceso en el que se presentan cambios de la expresión genética debido a los patrones diferenciales de expresión, en el cual se suprimen o actúan algunos genes específicos, los sistemas en desarrollo han permitido dilucidar el comportamiento de las estructuras ribonucleoproteicas, como los GPCs como estructuras que están involucradas en este proceso celular.

Entre los sistemas que han sido estudiados se encuentran la diferenciación de neuronas de la médula espinal (Vázquez-Nin et al., 1980), músculo (Zavala et al., 1992), la notocorda, la piel y el intestino en embriones de ave (Zavala, 1995). En estos estudios se

determinó que los patrones particulares de distribución de las partículas ribonucleoproteicas varía atendiendo a cambios morfológicos de las células en diferenciación.

En la diferenciación de la piel a partir del ectodermo, cuando se incrementó el número de GPCs se observó un aumento en la condensación de la cromatina periférica y perinucleolar en las células de la capa de transición de la piel. Mientras que en los estadios que corresponden a etapas embrionarias se conserva este mismo patrón, en organismos recién nacidos se observan cambios, donde en la capa escamosa de la piel se registra un máximo nivel de GPCs acompañada de la condensación de cromatina (Zavala, 1995).

Durante la diferenciación de la notocorda también se observa un rearrreglo de la distribución de los GPCs. En el período previo a la diferenciación del citoplasma y la capa externa que cubre la notocorda, se aprecia un incremento en la densidad de GPCs. En los estadios posteriores se observa una disminución de estas partículas. Se sugiere que el aumento de los GPCs en etapas tempranas se podría relacionar con el papel inductor que posee esta estructura. En el epitelio del intestino (derivado endodérmico), se determinó que la elevación de GPCs coincide con cambios morfológicos en el epitelio antes de la eclosión (Zavala, 1995).

El riñón metanéfrico comienza a ser funcional a partir del día 12 de desarrollo. Un aumento considerable de GPCs se hace evidente en estadios posteriores a este evento en los estadios HH39 y HH41, que registran un valor de densidad de  $1.55/\mu\text{m}^2$  y  $1.39/\mu\text{m}^2$ , respectivamente. Se ha detectado la expresión del factor alfa de transformación del crecimiento ( $\text{TGF-}\alpha$ ) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) durante el desarrollo del riñón de ave, evidenciándose que la expresión de  $\text{TGF-}\alpha$  se restringe a células del túbulo distal del riñón metanéfrico a partir del día 14 de desarrollo hasta el estado adulto, mientras que la expresión del R-EGF se encuentra en células del túbulo proximal del riñón metanéfrico, con un período de alta expresión a partir del día 13, que coincide con el período de disparo de la diferenciación (día 11 aproximadamente) (Díaz-Ruiz et al., 1993) y coincidiendo también con la acumulación de GPCs observada en este estudio que corresponde al estadio HH39. Se sugiere que el  $\text{TGF-}\alpha$  tiene un posible papel en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. El R-EGF es una proteína transmembranal que cuando se une a su ligando (el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o a el  $\text{TGF-}\alpha$ ), permite la iniciación de una respuesta pleiotrópica que resulta en la proliferación celular (Díaz- Ruiz et al. 1993).

La expresión de mRNAs de TGFs  $\beta 2$  y  $\beta 3$  se detectó en varios tejidos durante el desarrollo embrionario de ave, entre estos el riñón metanéfrico alcanzó un máximo de expresión de estos mensajeros a partir del día 12 para decrecer el día 16 de desarrollo que coinciden con el aumento en la densidad de GPCs en el estadio HH39. Las proteínas TGF- $\beta 2$  y  $\beta 3$  y sus respectivos mensajeros son expresados de manera espacial y temporal sugiriendo que estas isoformas juegan un papel importante en los procesos de desarrollo (Jakowlew et al, 1994).

El nivel de expresión de mRNA de aldehído dehidrogenasa (ALDH) fue examinado en distintos estadios de desarrollo en diferentes tejidos de ave. Se evidenció que altos niveles de mRNA de ALDH se encuentran en el riñón en estadios tardíos de desarrollo, aproximadamente en el día 16, que es un período cercano al estadio HH41 donde aún se detecta una densidad alta de GPCs, pero que ya ha comenzado a disminuir. Se considera que la ALDH es una enzima involucrada en la maduración de los tejidos durante el desarrollo, de esta manera su expresión y actividad se incrementan durante el desarrollo alcanzando altos niveles en estadios tardíos de diferenciación (Godbout, 1992).

En el organismo recién nacido se observa una reducción en la densidad de GPCs, registrando el valor más bajo de densidad, con un valor de  $0.79/\mu\text{m}^2$ . Esta reducción atiende posiblemente a cambios en la relación entre la síntesis y exportación de ciertos mensajeros hacia citoplasma que habían sido retenidos, que los nuevos requerimientos del organismo inducen a ser liberados para poder ser traducidos a proteína. En un análisis de los niveles de expresión de mRNA de neuroleucina (NLK), que se considera como un factor neurotrófico, durante el desarrollo embrionario de ave, se determinó que los más altos niveles de este mensajero se encontraron en riñón en el organismo adulto, conformando alrededor del 0.1% del total de mRNA en este tejido (Hallböök et al, 1989).

Se ha comprobado que la expresión de un mRNA está regulada de manera espacial y temporal y por lo tanto se puede sugerir que la variación de densidad de GPCs durante los estadios de desarrollo estudiados puede estar indicando que existe un complejo patrón de transcripción, almacenamiento y exportación hacia citoplasma de mensajeros durante la diferenciación del riñón metanéfrico. Considerando que los GPCs son el almacén intranuclear de mRNA, que su distribución es diferencial durante el desarrollo del riñón metanéfrico y que se han detectado variaciones de algunos mensajeros durante el mismo, se puede sugerir que estas estructuras pueden estar involucradas en esta expresión diferencial.

## CONCLUSIONES

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Existen variaciones en la frecuencia de GPCs durante el desarrollo del riñón metanéfrico de ave.

El riñón metanéfrico comienza a ser funcional a partir del estadio HH38 de desarrollo. Un aumento considerable en la frecuencia de GPCs se hace evidente en estadios posteriores a este evento. En el estadio HH39 se observa la máxima elevación en la densidad de GPCs, que coincide con el disparo de la diferenciación y la elevación en algunos mensajeros como el R-EGF.

Por lo tanto se sugiere que las variaciones detectadas en la densidad de GPCs en este estudio obedecen a cambios en la expresión génica en estadios particulares durante el desarrollo del riñón metanéfrico.

## **BIBLIOGRAFIA**

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1994. **Molecular Biology of the cell**. 3a. ed. Garland. U.S.A. 1294 p.

Balinsky, B.I. 1978. **Introduccion a la embriología**. ed. Omega. pp. 296-440

Berezney, R. and D. J. Coffey. 1977. Nuclear Matrix. Isolation and characterization of framework structure from rat liver nuclei. **J. Cell. Biol.** **73**: 616-637.

Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical citology. **J. Ultrastruct. Res.** **27**: 250-265.

Burd, C. G. and Dreyfuss, G. 1994. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. **EMBO J.** **13** (5): 1197-1204.

Capco, D. G., K. M. Wan, and S. Penman. 1982. The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition. **Cell.** **296**: 847-851.

Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore. 1986. **Molecular cell biology**. Scientific American Books. U.S.A. pp.131-186.

Daskal, I., J.A. Merski, J.B. Hughes and H. Busch. 1975. The effects of cyclohexamide on the ultrastructure of rat liver cells. **Exp. Cell Res.** **93**: 935-401.

De Pomerai, D. 1990. **From gene to animal**. 2a. ed. Cambridge. 417p.

De Robertis, E.D.P. y E.M.F. De Robertis. 1986. **Biología celular y molecular**. 11a. ed. El Ateneo. Argentina. pp. 308-339.

Derenzini, M., E. Lorenzoni, V. Marinozzi and P. Barsotti. 1977. Ultrastructural cytochemistry of active chromatin in regenerating rat hepatocytes. **J. Ultrastruc. Res.** **59**: 250-262.

Derenzini, M., F. Novello and A. Pession-Brizzi. 1978. Perichromatin Fibrils and chromatin ultrastructural pattern. **Exptl. Cell Res.** **112**: 443-454.

Derenzini, M., D. Hernandez-Verdum and M. Bouteille. 1983. Visualization of repeating subunit organization in rat hepatocyte chromatin fixed in situ. **J. Cell. Sci.** **6**: 137-149.

Díaz-Ruiz, C., R. Pérez-Tomás, X. Culleré, and J. Domingo. 1993. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor-receptor in the mesonephros and metanephros of the chicken. **Cell. Tissue Res.** **271**: 3-8.

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

Ecomidis, I. and T. Pederson. 1983. In vitro assembly of pre-messenger ribonucleoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **80**: 4296-4300.

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

Fakan, S.E. and W. Bernhard. 1973. Nuclear labelling after prolonged H<sup>3</sup> uridine incorporation as visualized by high-resolution autoradiography. **Exptl. Cell Res.** **79**: 431-444.

Fakan, S.E. and E. Puvion. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. **Int. Rev. Citol.** **65**: 255-269.

Feldherr, C.M., E. Kallenbach and N. Schultz. 1984. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. **J. Cell. Biol.** **99**: 2216-2222.

Feldherr, C.M. y D. Akin. 1994. Role of nuclear trafficking in regulating cellular activity. **Int. Rev. Citol.** **151**: 183-228.

Felsenfeld, G. 1978. Chromatin. *Nature*. 271 (5641): 115-122.

Ferraro, A., M. Eufemi, F. Altieri, L. Cervoni and C. Turano. 1994. Glycoproteins of the Nuclear Matrix from Chicken Liver Cells. *Cell Biology International* 18 (6): 655-661.

Gaubatz, J., R. Hardison, J. Murphy, M.E. Eichner and R. Chalkley. 1978. The role of H1 in the structure of chromatin. *Cold Spring Harbor. Symposia on Qualitative Biology. Volume XIII*: 265-271.

Geneser, F. 1989. *Histología*. Ed. Medica Panamericana. México. pp. 740.

Getzenberg, R. H. 1994. Nuclear Matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. *J. Cell. Biochem.* 55: 22-31.

Ghosh, S., N. Paweletz and I. Ghosh. 1978. Cytological identification and characterization of the nuclear matrix. *Exptl. Cell. Res.* 111: 363-371.

Gilbert, S.F. 1991. *Developmental biology*. 3a. ed. SINAUER. U.A.S. pp.582-593.

Godbout, R. 1992. High levels of aldehyde dehydrogenase transcripts in the undifferentiated chick retina. *Exp. Eye Res.* 54: 297-305.

Grobstein, C. 1956. Trans-filter induction of tubules in mouse melanephric mesenchyme. *Exp. Cell. Res.* 10: 424-440.

Hallböök, F., H. Persson, G. Barbany and T. Ebendal. 1989. Development and regional expression of chicken neurorleukin (Glucosa-6-phosphate isomerase) messenger RNA. *Journal of Neuroscience Research*. 23: 142-151.

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



Hancock, R. and T. Boulikas. 1982. Functional organization in the nucleos. *Int. Rev. Cytol.* **79**: 165-213.

Jakowlew, S. B., G. Ciment, R. S. Tuan, M. B. Soporn, A. B. Roberts. 1994. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 mRNAs and proteins in the developing chicken embryo. *Differentiation.* **55**: 105-118.

Jiménez-García, L. F. y Segura-Valdez, M. de L. El origen y la evolución del núcleo celular. Un enfoque ultraestructural de la evolución del procesamiento postranscripcional del ARN premensajero. 155-174. En: Núñez-Farfán J. y C. Cordero. 1993. *Tópicos de Biología Evolutiva Diversidad y Adaptación*. Centro de Ecología, UNAM. Méx. 183 pp.

Jiménez-García, L.F. 1988. El nucléolo: relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis Doctoral, Biología, Fac. de Ciencias. U.N.A.M. México.

Jiménez-García, L.F. and D.L. Spector. 1993. In vivo evidence that transcription and pre-mRNA splicing are coordinated by recruiting mechanism. *Cell.* **73**: 47-60.

Krzyzowska-Gruca, S., A. Zborek and S. Gruca. 1983. Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of chromatin condensation. *Cell Tissue Res.* **231**: 427-437.

Lafarga, M., M. T. Berciano and M. A. Andres. 1993. Protein-synthesis inhibition induces perichromatin granule acumulation and intranuclear rodlet formation in osmotically stimulated supraoptic neurons. *Anat. Embryol.* **187**: 363-369.

Lafarga, M., M. T. Berciano, M. A. Andres and P. S. Testillano. 1994. Effects of cicloheximide on the structural organization of the nucleolus and coiled body in normal an stimulated supraoptic neurons of the rat. *Journal of Neurocytology.* **23**: 500-513.

Lehtonen, E. 1975. Epithelio-mesenchymal interface during mouse kidney tubule introduction in vivo. *J. Embryol. Exp. Morph.* **34** (3) : 695-705.

Legrain, P. and G. Canfreau. 1994. Pre-mRNA splicing: from intron recognition to catalysis. **Bull. Inst. Pasteur. 92:** 153-179.

Leth Bak, A., P. Bak and J. Zeuthen. 1979. Higher levels of organization in chromosomes. **J. Theor. Biol. 76:** 205-217.

Lewin, B. 1994. **Genes V.** Oxford University Press. pp.1272.

Lu, Q., L.L. Wallarth and S.C.R. Elgin. 1994. Nucleosome positioning and gene regulation. **J. Cell. Biochem. 55:** 83-92.

Lührmann, R. 1990. Functions of U-snRNPs. **Molecular Biology Reports. 14:** 183-192.

Monneron, A. and W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. **J. Ultrastruct. Res. 27:** 266-288.

Moyne, G., Nash R. E., Puvion E. 1977. Perichromatin granules and other nuclear components in isolated hepatocytes treated with cortisol and cicloheximide. **Biol. Cell. 30:** 5-16.

Nagy, P., H.C. Bisgaard and S.S. Thorgeirsson. 1994. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. **J. Cell Biol. 126 (1):** 223-233.

Nash, R. E., E. Puvion, and W. Bernhard. 1975. Perichromatin fibrils as components of rapidin labeled Extranucleolar RNA. **J. Ultrastructure R. 53:** 395-405.

Nielsen, T.W. 1994. RNA-RNA interactions in the spliceosome: unraveling the ties that bind. **Cell. 78:** 1-4.

Oberleithner, H., E. Brinckmann, A. Schwab and G. Krohne. 1994. Imaging nuclear pores of aldosterone-sensitive kidney cells by atomic force microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. 91:** 9784-9788.

Ochs, R. L., T. W. Stein Jr., L. E. C. Andrade, D. Gallo, E. K. L. Chan, E. M. Tan, and K. Brasch. 1995. Formation of nuclear bodies in hepatocytes of estrogen-treated roosters. **Molecular Biology of the Cell**. **6**: 345-356.

Oudet, P., J.E. Germond, M. Bellard, C. Spadafora and P. Chambon. 1978. Nucleosoma structure. **R. Phil. Trans. Soc. Lond. B**. **283**: 241-258.

Panté, N., R. Bastos, I. McMorrow, B. Burke and U. Aebi. 1994. Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins. **J. Cell. Biol.** **126** (3): 603-617.

Patterson, L.T. and G.R. Dressler. 1994. The regulation of kidney development: new insights from an old model. **Current Pinion in Genetics and Development**. **4**: 696-702.

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

Petrov, P. and C.E. Sekeris. 1971. Early action of  $\alpha$ -amanitin on extranuclear ribonucleoproteins, as revealed by electron microscopic observation. **Exptl. Cell Res.** **69**: 393-401.

Puvion-Dutilleul, F., M. Nicoloso and J. Bachellerie. 1983. Altered structure of ribosomal RNA transcription units in hamster cells after DRB treatment. **Exp. Cell Res.** **146**: 43-52.

Puvion, E. and M. Lange. 1980. Functional significance of perichromatin granule accumulation induced by cadmium chloride in isolated rat liver cells. **Exp. Cell Res.** **128**: 47-58.

Rio, D.C. 1993. Splicing of pre-mRNA: mechanism, regulation and role in development. **Current Opinions in Genetics and Development**. **3**: 574-584.

Sariola, H., K. Holm and S. Henke-Fahle. 1988. Early innervation of metanephric kidney. **Development**. **104**: 589-599.

Shamoo, Y., N. Abdul-Mahan, A. M. Patten, J. K. Crawford, M. C. Pellegrini, and K. R. Williams. 1994. Both RNA binding domains in heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. **Biochemistry**. **33** (27): 8272-8281.

Simard, R., A. Royal, G. Lacoste-Royal, D. Banville. 1978. Transcription in the interphase nucleus. **Electron Microscopy**. Vol. III.

Söderqvist, H. and E. Hallberg. 1994. The large C-terminal region of the integral pore membrane protein, POM 121, is facing the nuclear pore complex. **Eur. J. Cell Biol.** **64**: 186-191.

Spector, D.L., X.D. Fu and T. Maniatis. 1991. Associations between distinct pre mRNA splicing components and the cell nucleus. **European Molecular Biology Organization Journal**. **10**: 3467-3481.

Takeuchi, I. K. and Y. K. Takeuchi. 1984. Interchromatin granules in the dividing embryonic ectoderm cells of postimplantation rat embryos: an electron microscopic silver-staining study. **J. Electron Microsc.** **33** (2): 151-159.

Vázquez-Nin, G. H. and W. Bernhard. 1971. Comparative ultrastructural study of perichromatin and balbiani ring granules. **J. Ultrastruc. Res.** **36**: 842-860.

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

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

Vázquez-Nin, G. H., A. Ortiz, A. López and O. M. Echeverría. 1989. Electron Microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and their relation to perichromatin granules. **Biol. Cell.** **65**: 133-138.

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

Wallarth, L.L., Q. Lu, H. Granok y S.C.R. Elgin. 1994. Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. **BioEssays.** **16** (3): 165-170.

Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz and A.M. Weiner. 1987. **Molecular Biology of the gene.** 4a. ed. Vol. I. Benjamin/Cummings eds. USA. pp. 774.

Willier, D.H., P. A. Weiss and V. Hamburger. 1971. **Analysis of development.** Hafner. U.S.A. pp. 735.

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

Zavala, P.G.T. 1995. Análisis ultraestructural de partículas ribonucleoproteicas (RNP) durante la diferenciación de tejidos derivados de las principales capas embrionarias. Tesis doctoral, Biología, Fac. de Ciencias, U.N.A.M. México.