

Leji 85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

Estudio de las Variaciones Cuantitativas de la Cromatina Durante la Diferenciación y Maduración Neuronal

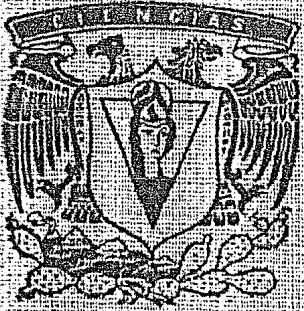
T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Luis Felipe Jiménez García



México, D. F.

1983



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.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION -----	1
1. Núcleo -----	1
2. Cromatina -----	3
3. Médula espinal -----	8
II. OBJETIVO -----	13
III. MATERIALES Y METODOS -----	14
IV. RESULTADOS -----	17
V. DISCUSION -----	26
VI. CONCLUSIONES -----	30
VII. REFERENCIAS -----	31

I. INTRODUCCION.

1. NÚCLEO.

Hace alrededor de mil millones de años que aparecieron los primeros eucariontes en la Tierra (Barghorn y Schopf, 1966). A partir de entonces, la diversidad en el mundo vivo ha sufrido tal explosión, que es prácticamente imposible encontrar hoy día algún habitat vacío.

La importancia evolutiva de los eucariontes radica en su capacidad para producir diversidad mediante los complejos mecanismos de recombinación genética.

La existencia de un núcleo dentro de la célula, compartamentalizando el material genético, permite además que las actividades metabólicas de la misma se lleven a cabo de manera eficiente, a través de la optimización del proceso de síntesis proteica.

No fue sino hasta mil millones de años después de que la naturaleza originó los primeros eucariontes, que Brown y otros autores, hacia 1833, descubren los núcleos celulares. Tienen que pasar muchos años de investigación para que Boveri y Guignard en 1890 observen que al unirse un núcleo de un espermatozoide con el de un óvulo, se reestablece el juego cromosómico normal de una célula somática. Esto llevó a concluir que el material nuclear tiene algo que ver con la herencia (Dyson, 1977).

El hallazgo de que algunos virus contienen ácido desoxirribonucleico (ADN), llevó a Stanley, Bawden y Pirie en 1930, a suponer que esta sustancia tiene cierto papel en los fenómenos de la herencia (Watson, 1974). Heitz en 1931 publica que el nucléolo se encuentra asociado a cromosomas específicos. McClintock en 1933 concluye que este cuerpo intranuclear contiene partículas ribonucleoproteicas (Tomas-Martín, 1976).

Beadle y Tatum en 1940 proporcionan nuevas evidencias de que los genes (ADN), se relacionan con las proteínas (Dyson 1977). Dos años más tarde, Brachet localiza ácido ribonucleico (ARN) en el nucléolo (Castañeda, 1973).

El papel fundamental del ADN en la herencia es evidenciado por

el descubrimiento de que esa sustancia es el mismo principio transformante de los pneumococos (Avery, MacLeod y McCarty, 1944). Posteriormente, utilizando precursores radiactivos se concluye que efectivamente el ADN es la sustancia que transporta la información genética (Hershey y Chase, 1952).

La idea de que ARN participa activamente en la síntesis de proteínas proviene de los trabajos de Brachet en 1942 y de Caspersson en 1947. Estos autores encontraron que las células en síntesis activa de proteínas eran ricas en ARN (Castañeda, 1973).

Finalmente, el código genético es elucidado (Leder y Nirenberg, 1964). De esta forma, los procesos nucleares de la herencia y de la síntesis de proteínas en el citoplasma, se resumen en la actividad del ADN, ARN y de las proteínas, de acuerdo al llamado Dogma Central de la Biología Molecular (Crick, 1970).

Actualmente, uno de los aspectos fundamentales de la investigación del núcleo, se centra en el entendimiento de su ultraestructura en interfase.

Flemming en 1880 había observado la cromatina como una entidad nuclear coloreable. Heitz en 1928 observó dos estados morfológicos distintos en la cromatina y les asignó nombres diferentes (Tomas-Martin, 1976).

Utilizando microscopía electrónica, Callan y Tomlin en 1950 observaron la membrana nuclear (Zavala-Padilla, 1980). Nueve años más tarde, con la misma técnica, comienzan a descubrirse diversas estructuras ribonucleoproteicas intranucleares. Swift en 1959 descubre los gránulos intercromatinianos (Swift, 1962); se descubren los gránulos pericromatinianos (Watson, 1962) y se describen las fibras pericromatinianas y los cuerpos espiralados (Monneron y Bernhard, 1966).

El papel citofisiológico de algunas de estas estructuras ha sido previsto (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971) y corroborado por diversos autores. Se propone que sirven de almacén y/o transporte de ARN del núcleo hacia el citoplasma.

2. CROMATINA.

En 1880, Flemming define la cromatina como la sustancia nuclear que toma tinte con los colorantes denominados entonces nucleares. En 1882 menciona que la red nuclear debe su refracción, además de la naturaleza de sus reacciones y su gran afinidad por colorantes, a una sustancia que, en consideración del último caracter llama cromatina.

Heitz en 1928, por su parte, distingue dos tipos de cromatina, ambos de reacción positiva a la técnica de Feulgen para ADN: la heterocromatina, descrita como la parte del cromosoma que se compacta después de la telofase y se reconoce como cromocentro o nucléolo falso en el núcleo en interfase, y la eucromatina, que corresponde a las partes del cromosoma que se desenredan y se hacen invisibles en telofase (Tomas-Martin, 1976).

Brown en 1966 distingue dentro de la cromatina compacta o heterocromatina dos formas distintas: la heterocromatina facultativa y la heterocromatina constitutiva. La primera forma una zona compacta en uno de los miembros de un par cromosómico. La segunda corresponde a la que se localiza en la región de los centrómeros y telómeros o formando zonas definidas en ambos miembros del par cromosómico, en todas las células de un individuo y en todos los individuos de la especie (De Robertis y De Robertis, 1981).

Tomando en cuenta las técnicas de microscopía electrónica, se ha descrito la cromatina laxa o eucromatina como el material denso a los electrones, no definido en los cúmulos de cromatina condensada pero que es teñido por uranio y plomo tanto como la cromatina compacta (Bouteille y col., 1974).

Hoy día se sabe que la heterocromatina no es bioquímicamente inactiva, como podría suponerse dado su caracter compacto, sino que tiene una función importante en la síntesis de proteínas pues posee gran cantidad de genes repetidos (De Robertis y De Robertis, 1981; Long y Dawid, 1980).

Asociadas a la cromatina existen diversas estructuras ribonucleoproteicas. El nucléolo ocupa buena parte del volumen nuclear y casi siempre está rodeado de cromatina compacta perinucleolar. Los

gránulos intercromatinianos son cúmulos de partículas de 200 a 500 Å de diámetro y están distribuidos al azar en áreas de cromatina laxa. Los gránulos pericromatinianos son partículas individuales de 400 a 500 Å de diámetro, distribuidos en la periferia de la cromatina compacta y con un halo claro que las separa de la cromatina adyacente. Las fibras pericromatinianas tienen forma irregular y un diámetro de 30 a 50 Å. Se localizan en zonas adyacentes a la cromatina compacta. Los cuerpos espiralados son cuerpos esféricos localizados en áreas de cromatina laxa. Son fibras de 50 Å enrolladas a lo largo de un filamento axial de 0.3 a 0.5 μ .

El conocimiento de la composición química y molecular de la cromatina, y en general del núcleo, comienza en 1869 cuando Miescher descubre el ADN (Lehninger, 1975). En 1884, Kossel descubre las proteínas histónicas intranucleares (Zavala-Padilla, 1980) y Brachet en 1944 localiza ARN en el nucléolo (Castañeda, 1973).

Definiendo a la cromatina como un complejo desoxirribonucleo-proteico, se logró observar que en la matriz nuclear existen fibras delgadas de hasta 200 Å de grosor (De Robertis y De Robertis, 1981). Se pensó entonces que podrían representar moléculas individuales de nucleoproteína.

Trabajando con digestiones enzimáticas con ADNasa, se postuló por primera vez que las nucleoproteínas poseen una subestructura regular y repetitiva (Hewish y Burgoyne, 1973). La unidad repetitiva de la cromatina, representada como partículas esféricas, fue denominada cuerpos ν (Olins y Olins, 1974), nucleosomas o collar de cuentas por Oudet y colaboradores en 1975 (Oudet y col., 1978) y partículas PS (van Holde y col., 1974)

Los diversos estudios que sobre el nucleosoma se han hecho, ya han sido revisados (Felsenfeld, 1978; McGhee y Felsenfeld, 1980).

De acuerdo a Kornberg, en 1974, cada nucleosoma contiene cerca de 200 pares de bases de ADN en complejo con histonas. En el interior de la partícula hay un núcleo de histonas, dos de cada uno de los tipos: H2A, H2B, H3 y H4. El ADN se enrolla a este núcleo, dándole aproximadamente dos vueltas y media. La histona H1 es la que mantiene unidos los nucleosomas a través de los puentes de ADN (McGhee y Felsenfeld, 1980).

Hasta ahora, parece que el nucleosoma es una estructura universal en eucariontes; se ha localizado en levaduras, ciliados, anfibios, mamíferos, *Physarum* y muchas plantas (Yakura y col., 1978).

Algunos autores han propuesto que la compactación de la cromatina se debe a la aglomeración de nucleosomas individuales que se encuentran en diferente grado de enrollamiento (Tsanev y Petrov, 1976). También se ha propuesto que el nucleosoma puede tener tres diferentes tipos de compactación: como nucleosomas individuales de unos 120 Å de grosor, como nucleosomas en "solenoide" formando fibras de aproximadamente 300 Å de diámetro y como nucleosomas muy empaquetados que formarían fibras de unos 4,000 Å (Bak, Bak y Zeuthen, 1979).

Los factores de condensación de la cromatina parecen ser universales en animales (Sunkara, Wright y Roo, 1979). Se ha sugerido que los cambios en compactación de la cromatina se deben a la fosforilación, acetilación, metilación y poli(ADP-ribosil)ación de proteínas histónicas, en especial de la H1 (Matsumoto y col., 1980).

Autores como Kleinsmith y col. en 1966, Kaplowitz y col. en 1971, Leake y col. en 1972, han sugerido que el control de la expresión genética se basa en la compactación y descompactación de la cromatina (Derenzini, Novello y Possion-Brizzi, 1978). Por otro lado, otros autores, como Frenster y col. en 1963, Hay y Revel en 1963, Littau y col. en 1964, Frenster en 1965, Granboulan y Granboulan en 1965, Blondel en 1968, Milner y Hayhoe en 1968, Tokuyasu y col. en 1968, han mostrado evidencia de que la cromatina laxa es la forma transcripcionalmente activa del ADN (Derenzini, Novello y Possion-Brizzi, 1978). Por ejemplo, Littau y colaboradores en 1964, encontraron que la mayor síntesis de ARN se asocia con la cromatina menos densa, Tokuyasu y colaboradores en 1968 encontraron que la síntesis de ARN y la duplicación de ADN se deben al incremento en cromatina laxa y decremento en cromatina compacta.

Parece ser que la diferencia bioquímica entre la heterocromatina y la eucromatina es que la última tiene más ARN, proteínas ácidas y fosfoproteínas (Derenzini, Lorenzoni, Marinozzi y Barsotti, 1977).

Diversos estudios sugieren que el patrón de condensación de la cromatina, se debe a una neutralización de cargas de fosfatos del ADN por cationes libres. En la forma eucromatínica, el ADN, debido a la repulsión mutua de cargas negativas, se mantiene muy extendido,

formando tal estado de condensación. Debido a esto, se postula que la eucromatina es el estado cromatínico necesario previo a la síntesis de ADN o ARN (Derenzini y col., 1978).

Se ha considerado que la cromatina es una estructura dinámica que oscila entre una estructura compacta como el nucleosoma y una estructura abierta, que depende del medio ambiente y que representaría hebras de ADN desnudas (Oudet y col., 1978).

Que la cromatina laxa es la forma transcripcionalmente activa ya ha sido visualizado con microscopía electrónica (Villard y Fankan, 1978).

Actualmente, parece que las regiones de ADN transcripcionalmente activas tienen una estructura más abierta o relajada, que se hace más accesible a las enzimas. Esto aportó la primera evidencia de que los genes activos eran realmente distintos en estructura de los inactivos. Molecularmente, las regiones que son más accesibles a las enzimas en una estructura relajada, son llamadas regiones hipersensibles y presentan casi invariablemente la secuencia de bases citosina, adenina, adenina y timina (Kolata, 1980).

También se ha sugerido que las células poseen diferente cantidad de eucromatina y de heterocromatina, dependiendo de la función celular y de una actividad diferencial de genes (Stein y col., 1975).

El estudio de los cambios cualitativos y cuantitativos de los constituyentes intranucleares en la célula, ha llevado a un mejor entendimiento de la citofisiología. La idea original de Vázquez-Nin y Bernhard de 1971, de que los gránulos pericromatinianos son estructuras de almacén y/o transporte intranuclear de ARN mensajero o pre mensajero, ha sido corroborado mediante inhibidores de la síntesis de ARN (Petrov y Sekeris, 1971; Daskal y col., 1975; Moyne, Nash y Puvion, 1977; Vázquez-Nin y col., 1979a, Puvion, 1980), y en células bajo efectos hormonales normales (Vázquez-Nin y col., 1979b; Echeverría y col., 1980).

Sin embargo, los inhibidores producen efectos tóxicos y las hormonas cambios reversibles en la expresión genética y por ello en las estructuras intranucleares (Echeverría y col., 1980). Por esta razón se ideó estudiar estas estructuras intranucleares durante la diferenciación celular, pues este fenómeno natural trae consigo cambios

irreversibles en la expresión genética y en la síntesis de ARN.

Trabajando sólo con gránulos pericromatinianos se encontraron diferencias significativas en cuanto a cantidad de tales estructuras en células en distintas etapas de diferenciación (Vázquez-Nin y col., 1980).

Por otra parte, se había observado que la cromatina laxa asociada a gran cantidad de fibrillas pericromatinianas, era más abundante en células hepáticas en regeneración que las normales (Derenzini y col., 1977).

En un estudio sobre efectos hormonales en estructuras intranucleares, se observó que a concentraciones altas de estradiol, la cromatina laxa aumentaba significativamente, mientras que a concentraciones bajas ocurría lo contrario en células epiteliales endometriales de rata.

A nivel ultraestructural, los cambios en la fracción heterocromatínica o eucromatínica representan el estado morfológico de la actividad genética del núcleo, puesto que la eucromatina es la forma transcripcionalmente activa del ADN.

3. MÉDULA ESPINAL.

Los estímulos que llegan a los receptores provocan señales eléctricas que corren por prolongaciones nerviosas y siguen dos caminos: unos corren por las fibras que realizan sinapsis con las motoneuronas del asta anterior en la médula espinal y producen el arco reflejo; otras siguen una ruta ascendente por la médula y alcanzan formaciones altas como el bulbo, la protuberancia, el pedúnculo, el cerebelo y el cerebro.

La sustancia gris de la médula espinal, formada por las células nerviosas o neuronas, las fibras nerviosas y las células de neuroglía, en corte transversal semeja la forma de la letra H, con dos ramas parasagitales y una transversal. Las ramas parasagitales, denominadas astas, se diferencian en anterior y posterior dependiendo de si son de orientación ventral o dorsal respectivamente. En el centro de la rama transversal se localiza el epéndimo y canal del epéndimo.

Las astas anteriores, formadas principalmente por motoneuronas, son más voluminosas que las posteriores, poseen contornos festoneados y se dirigen hacia afuera y adelante, estando rodeadas por sustancia blanca.

Funcionalmente, la sustancia gris se divide en zona retroependimaria o astas posteriores y en zona preependimaria o astas anteriores, ambas con dos subzonas: posterior y anterior. La zona preependimaria anterior corresponde a la cabeza del asta anterior y realiza la función motora de la médula. Envía sus fibras nerviosas a los músculos somáticos de la vida de relación y se denomina área somatomotora. La parte cervical envía sus prolongaciones, más particularmente, a los músculos de los miembros superiores.

Las motoneuronas de la zona preependimaria anterior son las células más grandes de la médula espinal y envían su axón por la raíz anterior hacia los centros musculares. Son de forma estrellada y su axón es desnudo. Al salir de la sustancia gris se cubre de mielina y de la vaina de Schwann, abandonando la médula por las raíces anteriores.

El Sistema Nervioso Central se origina a partir de tres for-

maciones ectodérmicas: la placa neural, la cresta neural y las placodas. La placa neural sufre una invaginación y forma el surco neural que posteriormente, por una invaginación más fuerte, forma el tubo neural. El tubo neural, en la parte mielencefálica del rombencefalo, forma la médula espinal, que se origina a partir de la mitad posterior adelgazada del tubo neural primitivo y tiene primero una forma cilíndrica que luego se afina progresivamente en sentido caudal. La parte basal del tubo neural, a ambos lados de la notocorda, se ensancha y es lo que más tarde será la zona motora de la médula espinal (Arana-Iñiguez y Rebollo, 1954).

En 1833 His estudió la evolución de las células nerviosas en el embrión humano. Más tarde, en 1890, Cajal confirma muchas de las observaciones de aquel autor, utilizando las técnicas argénticas en embrión de pollo.

His en 1887 propuso la existencia de tres zonas una vez formado el tubo neural: la zona columnar, cercana al epéndimo y formada por citoplasmas de lo que llamó células germinales primitivas; la zona del manto, formada por núcleos de las mismas células; el velo marginal, zona formada por las prolongaciones del citoplasma que se dirigen hacia la periferia del tubo y ocupan la parte más externa del mismo. (Cajal, 1929).

La comprensión actual de los tipos celulares y su génesis en la médula espinal comienza cuando Sauer en 1935 propone que la célula germinal es la fase mitótica de la célula indiferenciada. Tienen que pasar casi treinta años para que se corrobore esta propuesta mediante las modernas técnicas de citofotometría del ADN y autorradiografía con timidina tritiada (Watterson y col., 1956; Sauer y Chittenden, 1959; Sauer y Walker, 1962; Sidman y col., 1959; Sidman, 1962; Fujita, 1964).

Lo que His (1889), Held (1909) y Bailey y Cushing (1926) observaron como un juego heterogéneo de células en la capa ependimaria o zona del manto fue desechado por las observaciones modernas realizadas (Fujita y Fujita en 1963). Utilizando técnicas autorradiográficas y de microscopía electrónica, descubrieron que en la capa columnar o ependimaria había un solo tipo de células, homogéneo, que presentaba diferencias morfológicas debido a que se encon

traban en diferentes estadios de desarrollo o diferenciación, estadios que ya Cajal en 1909 había estudiado.

Actualmente se considera que el tubo neural recién formado consiste de células epiteliales neurales columnares, que dan lugar en diferentes tiempos a neuroblastos y células de glía (Langman y Hadden, 1970).

Las llamadas antiguamente células germinales primitivas son en realidad la fase mitótica redondeada de las células epiteliales. Al llegar a interfase, las células se vuelven columnares y sus núcleos ocupan varios niveles entre los bordes externo e interno del tubo neural. Poco después de que se ha formado el tubo neural, unas cuantas células epiteliales neurales se diferencian a neuroblastos (Windle y Baxter, 1936). Estas células alcanzan los bordes externos de la médula y sus axones salen hacia los mitomos o neuroblastos unipolar y multipolar de Cajal .

Los axones de los neuroblastos ventrales que posteriormente serán motoneuronas, abandonan el tubo neural por lo que más tarde será la raíz ventral del nervio espinal. Estos primeros neuroblastos se dispersan entre las células epiteliales neurales. Posteriormente, el neuroblasto bipolar primitivo se hace piriforme y constituye lo que antes se conocía como neuroblasto monopolar de His.

Durante la formación de prolongaciones adicionales , aparece el estado unipolar del neuroblasto, seguido del estado multipolar para el caso de las motoneuronas (Windle y Baxter, 1936). Cerca de las primeras células nerviosas formadas, se desarrollan más neuroblastos con las características histogénicas mencionadas por Cajal en 1909: neuroblasto apolar , célula redonda ; neuroblasto primitivo bipolar , con dendrita transitoria y axón ; neuroblasto unipolar, con axón ; neuroblasto multipolar , con axón y dendritas .

De esta forma, las capas ventrolateral y lateral de la médula espinal se conforman en la capa del manto y mientras el neuroblasto se diferencia , se va segregando entre la capa marginal externa e interna de células epiteliales neurales, formando la primitiva materia gris y los primordios de las astas anteriores.

En los primeros estadios del desarrollo, en el manto sólo se reconocen grupos celulares grandes, como neuroblastos motores en

la región ventrolateral de la médula espinal. En las últimas fases del desarrollo sigue la histogénesis y más células epiteliales neurales se mueven dentro del manto y se diferencian a neuroblastos y glía, quedando algunos que formarán la capa ependimaria.

Los estudios de Langman y Hadden de 1970, han llevado a determinar que la formación de neuroblastos cesa al octavo día del desarrollo y que las células del asta anterior se forman entre el segundo y sexto días del desarrollo. Además, los neuroblastos formados en los días tres y cuatro del desarrollo, llegan a la parte lateral del asta anterior, de forma tal que los músculos de las extremidades son los primeros en inervarse. Los neuroblastos formados en los días dos y siete llegan a la zona intermedia del asta anterior o zona preependimaria posterior.

La diferenciación continúa en los caracteres nucleares y citoplasmáticos de las células hasta llegar a la etapa adulta.

El conocimiento actual de la célula nerviosa se debe en gran parte a los estudios ultraestructurales de Duncan en 1957, Bellairs en 1959, Tennyson en 1962 (Lyser, 1964) y otros (Palay y Palade, 1955; Palay, 1956).

De manera general, se conocen tres etapas principales en la histogénesis de la médula espinal (Fujita y Fujita, 1963):

-Etapa de multiplicación. Las células matrices, que poseen poco citoplasma, no tienen retículo endoplásmico rugoso ni aparato de Golgi y tienen uno o dos nucléolos.

-Etapa de crecimiento citoplásmico. Los neuroblastos bi, mono y multipolares, tienen poco citoplasma pero aparece retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi.

-Etapa de maduración. Los neuroblastos multipolares poseen dendritas cuando los cilindroejes están cerca de su destino.

El paso de célula matriz a neuroblasto se caracteriza por la aparición de retículo endoplásmico rugoso y por la aparición de neurofibrillas (Vázquez-Nin y Sotelo, 1966).

Los núcleos de las células matrices están localizados junto al epéndimo, al igual que las células mismas. Esta disposición permite tener idea de la dinámica de la diferenciación al estudiar el epéndimo y la periferia.

La capa cercana a la membrana basal externa, donde están los neuroblastos, formará la capa del manto o futura materia gris y se separará de la del velo marginal. Esta disposición permite también tener idea de la dinámica de la diferenciación de las células estudiadas en etapas iniciales, cerca del epéndimo y finales, en la periferia, en la capa del manto cerca de la zona de prolongaciones celulares o velo marginal, el cual comienza a diferenciarse.

Las células matrices en diferenciación tienen uno o dos nucléos accesorios y gotas nucleares dispersas en el citoplasma. Este aumento nucleolar se debe probablemente a la formación de retículo endoplásmico rugoso que marca el paso hacia la formación del neuroblasto.

Ante esta serie de hechos, es de esperarse que la cromatina compacta disminuya cuantitativamente respecto de la laxa en aquellas etapas de mayor requerimiento proteico durante la diferenciación y maduración neuronal.

II. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar los cambios en la cantidad de volumen nuclear ocupado por cromatina compacta en el núcleo interfásico durante la diferenciación y maduración neuronal y relacionar dichos cambios con algunos eventos importantes de estos procesos.

Como ya se ha mencionado, se ha postulado que la síntesis de ARN y la duplicación del ADN se relacionan con un incremento en la cromatina laxa y con una disminución en la cromatina compacta y que el control de estos procesos bioquímicos se debe al dinamismo que presenta la sustancia nuclear para pasar de un estado de compactación a otro.

Asimismo, ya se vió que esto llevó a algunos autores a probar que efectivamente es la cromatina laxa la forma transcripcionalmente activa del ADN.

Este trabajo ha sido llevado a cabo en un sistema donde la acción hormonal induce cambios transcripcionales reversibles en la célula y sólo recientemente se ha realizado un estudio para comprender las variaciones de partículas ribonucleoproteicas intranucleares en un sistema transcripcional irreversible como es la diferenciación celular.

El presente trabajo trata de complementar entonces el conocimiento que sobre el núcleo interfásico se tiene en sistemas transcripcionales irreversibles.

III. MATERIALES Y METODOS.

Se eligió como sistema de estudio el desarrollo de la médula espinal de embrión de pollo, pues se conoce bastante sobre su cito diferenciación (Cajal, 1929; Fujita y Fujita, 1963).

Se utilizaron embriones de pollo incubados dos, cuatro, nueve, trece y veintiún días.

El fijador utilizado fue glutaraldehído al 2.5 %, disuelto en amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.3.

Los embriones de dos y cuatro días se fijan por goteo directo del fijador sobre el blastodisco y luego se separan para seccionar los en pedazos pequeños para su inclusión en resinas plásticas.

Los embriones de nueve, trece y veintiún días de incubación se fijan por perfusión una vez extraídos del huevo. Al ser extraídos se pasan a una solución fisiológica y se deja el corazón al descubierto. Se introduce una aguja hipodérmica por el ventrículo izquierdo, la cual contiene solución lavadora, y se hace un corte en aurícula derecha. Al pasar casi un minuto, se continúa con la perfusión con el fijador. Una vez que el embrión endurece, se separa la médula espinal cervical y se corta en pedazos pequeños para sumergirlos en el mismo fijador.

Las muestras se lavan con amortiguador de cacodilato 0.2 M a pH de 7.0 a 7.3 y se deshidratan e incluyen en glicolmetacrilato (GMA) a concentraciones crecientes para finalmente polimerizar el plástico (Leduc y Bernhard, 1967).

Los cortes de 0.5 μ de espesor realizados en un microtomo MT1 marca Sorvall, se tiñeron con azul de toluidina disuelto en bórax, ambos al 1 % y se eligieron las siguientes zonas de muestreo para cortes de entre 80 y 100 nm de espesor:

Médula espinal de dos días: núcleos celulares del área ependimaria y del área periférica. Células matrices.

Médula espinal de cuatro días: núcleos celulares del área ependimaria, células matrices; del área intermedia, neuroblastos bi y monopolares; y del área periférica, neuroblastos multipolares.

Médula espinal de nueve, trece y veintiún días: sólo se eligieron núcleos de la zona del asta anterior, donde radican los neuro--

blastos multipolares y las motoneuronas maduras.

Los cortes se montaron en rejillas de cobre cubiertas con una membrana plástica y se contrastaron 1/2 hora con ácido fosfotúngstico (PTA) al 3 % en HCl 1N ajustado a pH entre 2.1 y 2.5 (Vázquez-Nin y col., 1973).

La observación de los cortes y las micrografías electrónicas se realizaron con un microscopio electrónico EM-9S, Carl Zeiss.

Para el análisis cuantitativo de la cromatina se utilizó una microcomputadora Hewlett-Packard con digitalizador, graficador y unidad de discos. Los programas fueron generados por personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M.

Para medir la cantidad de cromatina compacta por núcleo se realizó la sumatoria de todas las subáreas ocupadas por cromatina compacta, ya que estas fueron previamente delimitadas con un marcador, con el digitalizador que integra áreas. Después se midió el área nuclear total y se obtuvo el cociente de cromatina compacta entre área total. Esto da un número relativo de la cantidad de cromatina compacta en el núcleo.

Para detectar la cantidad de ADN por núcleo se utilizó la reacción de Feulgen. Se hicieron cortes de 0.5μ de espesor de las correspondientes edades y se practicó la técnica como sigue:

HCl 5N	1 hora a temperatura ambiente (22°C).
Reactivo de Schiff	" " " "
Baño sulfuroso	3 enjuagues, 1 minuto cada uno.

Se fotografiaron los núcleos de las mismas zonas que para microscopía electrónica con un fotomicroscopio Amplival Carl Zeiss, utilizando película de alto contraste y filtro verde. Los negativos se analizaron con un densitómetro integrador, de alta precisión, IPM-2, Carl Zeiss.

La reacción de Feulgen proporciona datos cuantitativos del ácido desoxirribonucleico es útil para medir aumentos o disminución de la material. Los cambios en los tipos de cromatina se deberán a un cambio en la compactación si la cantidad de ADN por núcleo se mantiene constante.

Para obtener la cantidad de ADN por núcleo, se integró la transmitancia de cada uno de ellos en el volumen proporcionado por el diámetro mayor, el menor y el espesor del corte. De esta forma se puede

obtener la cantidad de ADN medido en unidades arbitrarias. Para comparar esa cantidad con la de una célula diploide normal de pollo, se midió la misma en una placa de anafase de una célula matriz en división.

Puede pensarse que el desenvolvimiento de la cromatina trae consigo un aumento en volumen nuclear, por razones de espacio. Por eso se piensa que puede haber alguna relación entre ambos fenómenos.

Para medir el volumen nuclear también se integro el área medida en la fotografía tomando en cuenta el espesor del corte.

En la medición de cromatina compacta se tomaron:

15	núcleos	de	embriones	de	dos	días	de	la	zona	ependimaria.
10	"	"	"	"	"	"	"	"	"	periférica.
16	"	"	"	"	cuatro	días	de	la	zona	ependimaria.
20	"	"	"	"	"	"	"	"	"	intermedia.
16	"	"	"	"	"	"	"	"	"	periférica.
10	"	"	"	"	nueve	días	.			
22	"	"	"	"	trece	"	.			
20	"	"	"	"	veintiún	días	.			

Para la medición de volumen nuclear se tomaron, de las zonas correspondientes, en el mismo orden: 79, 74, 69, 80, 73, 77, 74 y 78 muestras.

Para medir cantidad de ADN se analizaron correspondientemente: 18, 22, 24, 22, 23, 19, 14 y 5 muestras, más 8 de la placa de anafase.

Finalmente, los datos se analizaron estadísticamente y se graficaron.

IV. RESULTADOS.

La técnica de glicolmetacrilato-ácido fosfotúngstico (Vázquez-Nin y colaboradores, 1973) permite contrastar cromatina o desoxirribonucleoproteínas en oscuro y ribonucleoproteínas en claro. La cromatina laxa se observa fibrosa y grisácea y la cromatina compacta se nota en cúmulos oscuros (Figuras 1a-1d).

La cantidad de cromatina compacta disminuye en el núcleo conforme la diferenciación celular avanza desde células matrices hasta neuroblastos y de éstos a neuronas, en médula espinal cervical de pollo (Figuras 1a-1d, Gráfica 1) en tanto que el volumen nuclear (Gráfica 2) y los gránulos pericromatinianos (Vázquez-Nin y col., 1980) aumentan.

A los dos días de incubación, cuando las células matrices realizan una intensa actividad mitótica y comienzan a formarse el retículo endoplásmico rugoso (RER) (Fujita y Fujita, 1963) como signo de diferenciación hacia neuroblasto, el volumen nuclear es relativamente pequeño (Gráfica 2), el núcleo es alargado (Figura 1a), los gránulos pericromatinianos casi ausentes (Vázquez-Nin y col., l.c.) y la cromatina compacta ocupa casi la mitad del área nuclear analizada (Fig. 1a y Gráf. 1, 2E).

A los cuatro días de incubación, en la médula espinal cervical, que ahora es aproximadamente tres veces más grande que en el estadio anterior (Cuadro 1), los neuroblastos multipolares localizados en la región periférica que posteriormente será la zona preependimaria anterior o cabeza del asta anterior, realizan la primera sinapsis (Oppenheim y col., 1975) y se preparan para iniciar la actividad eléctrica (Provine, 1972), el volumen nuclear no aumenta significativamente (Gráf. 2), la forma del núcleo se hace más redonda (Fig. 1b), los gránulos pericromatinianos comienzan a ser abundantes (l.c.) y la cromatina compacta disminuye considerablemente, de la mitad del área que ocupaba en la célula matriz, a casi 1/9 (Gráf. 1, 4P) ($p < 0.001$). Asimismo, hay cambios importantes durante la transformación de célula matriz a neuroblasto bipolar, de éste a monopolar y de éste a multipolar en la región intermedia de médula espinal de cuatro días.

Al llegar al día nueve de incubación, cuando los neuroblastos se han transformado en neuronas inmaduras (Cajal, 1929), ocupando

la zona que ahora es el esbozo de asta anterior, cuando la neurogénesis ha cesado incluso en la región motora (Fujita y Fujita, 1963), cuando ha habido degeneración masiva de células debido a la competencia celular por llevar a cabo la sinapsis periférica (Hamburger, 1975; Oppenheim y col., 1975) y cuando ha comenzado la maduración eléctrica, caracterizada por la producción de impulsos eléctricos cortos y constantes (Provine, 1972), el volumen nuclear aumenta considerablemente ($p < 0.001$) por primera vez, a casi el doble del estadio anterior (Gráf. 2, Cuadro 1), la forma del núcleo es casi redonda (Fig. 1c), los gránulos pericromatinianos son muy abundantes (l.c.) y el área ocupada por cromatina compacta en el núcleo es casi de 1/25 de este organelo ($p < 0.05$) (Fig.1c, Gráf.1,9).

Al día trece, cuando la médula espinal es casi 30 veces el tamaño del tubo neural de dos días de incubación (Cuadro 1), una vez que la actividad eléctrica ha madurado casi en su totalidad (Provine, 1972) y las neuronas del asta anterior están en plena maduración celular y se preparan para iniciar la mielinización de las fibras nerviosas (El-Eishi, 1967), el volumen nuclear ha aumentado nuevamente (Gráf. 2), la forma nuclear es redonda, los gránulos pericromatinianos (l.c.) y la cantidad de cromatina compacta (Gráf. 1, 13) se estabilizan sin sufrir cambio significativos ($p > 0.1$).

Al día veintiuno, cuando el pollo eclosiona del huevo, una vez que la médula espinal ocupa un espacio de unas 40 veces el del tubo neural de dos días (Cuadro 1) y las neuronas son casi maduras morfofisiológicamente, ya que ha concluido la mielinización de fibras (El-Eishi, 1967), el volumen nuclear alcanza su máximo en la embriogénesis (Gráf. 2), la forma del núcleo es muy redonda (Fig. 1d), los gránulos pericromatinianos aumentan (l.c) y el área ocupada por cromatina compacta en el núcleo disminuye de nuevo significativamente, hasta ser de casi 1/100 del área nuclear ($p < 0.001$) (Gráf. 1, 21).

Debe enfatizarse que el aumento más grande en volumen nuclear ocurre en el paso de neuroblasto multipolar a neurona inmadura, es decir, entre 4 y 9 días, mientras que la cantidad de cromatina compacta sufre disminuciones importantes desde el paso de célula matriz a neuroblasto. En otras palabras, parece ser que el desenvolvimiento de cromatina no provoca el aumento en volumen nuclear, como parecería ser por razones de espacio.

La cantidad de ADN medida por la técnica de Feulgen en una placa de anafase, en neuroblastos multipolares de 4 días de la región periférica y en motoneuronas en maduración (9, 13 y 21 días de incubación), resulta ser casi constante pues no hay diferencias significativas entre ellas ($0.4 > p > 0.2$) (Gráf. 3, AF, 4P, 9, 13 y 21).

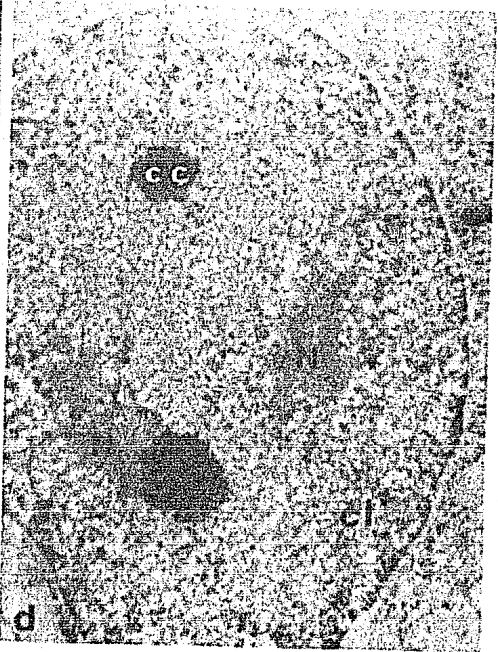
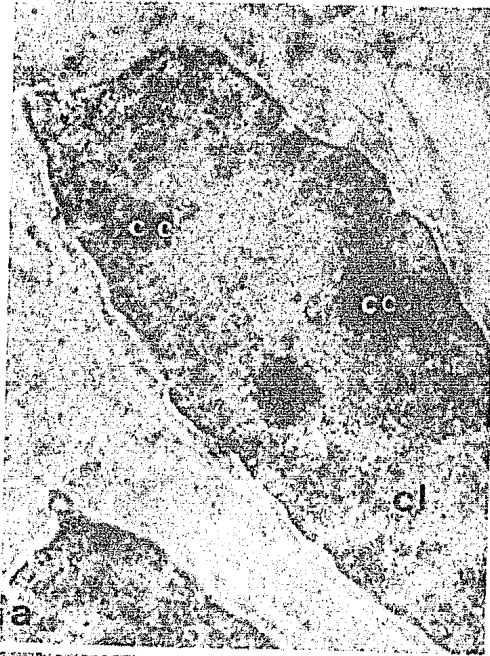
En células matrices y neuroblastos de 4 días de las regiones ependimaria e intermedia, la cantidad de cromatina compacta disminuye significativamente respecto de las células matrices de 2 días ($p < 0.01$ y $p < 0.001$) (gráf. 1, 2E, 4E, 4I). Este fenómeno se presenta también en las mediciones de ADN con la técnica de Feulgen, pero respecto de las células matrices de embriones de 2 días de la región periférica (Gráf. 3, 2P, 4E, 4I).

Figura 1a. Micrografía electrónica de un núcleo de célula matriz en la zona endimaria de la médula espinal cervical de embrión de pollo de 2 días de incubación. GMA-PTA, 14,300 aumentos. La cromatina compacta (cc), que aparece como zonas oscuras en cúmulos, ocupa buena parte del área nuclear, mientras que la cromatina laxa (cl) es escasa.

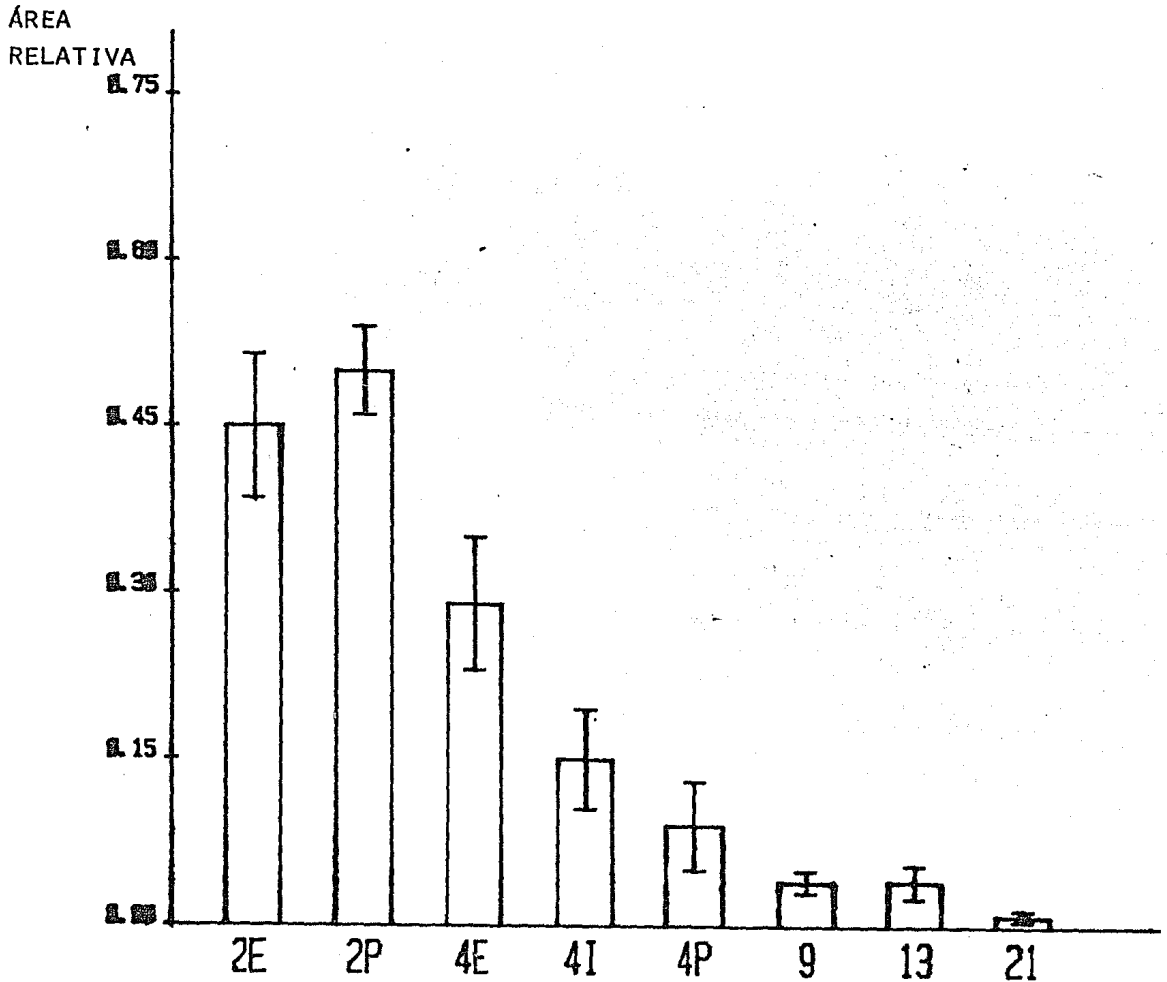
Figura 1b. Micrografía electrónica de un núcleo de neuroblasto multipolar en la zona periférica de la médula espinal cervical de embrión de pollo de 4 días de incubación. GMA-PTA, 14,300 aumentos. Además del nucléolo (N), que se ve como una zona clara y homogénea, se nota una considerable disminución de la cromatina compacta respecto de la célula matriz.

Figura 1c. Micrografía electrónica de un núcleo de neurona inmadura en la zona preendimaria anterior, asta anterior, en médula espinal cervical de embrión de pollo de 9 días de in cubación. GMA-PTA, 14,300 aumentos. Se observan dos nucléolos y muy escasa cantidad de cromatina compacta.

Figura 1d. Micrografía electrónica de un núcleo de neurona en la zona preendimaria anterior, asta anterior, en médula spinal cervical de embrión de pollo recién nacido, 21 días de incubación, GMA-PTA, 14 300 aumentos. Las zonas ocupadas por cromatina compacta puede considerarse que están ausentes.



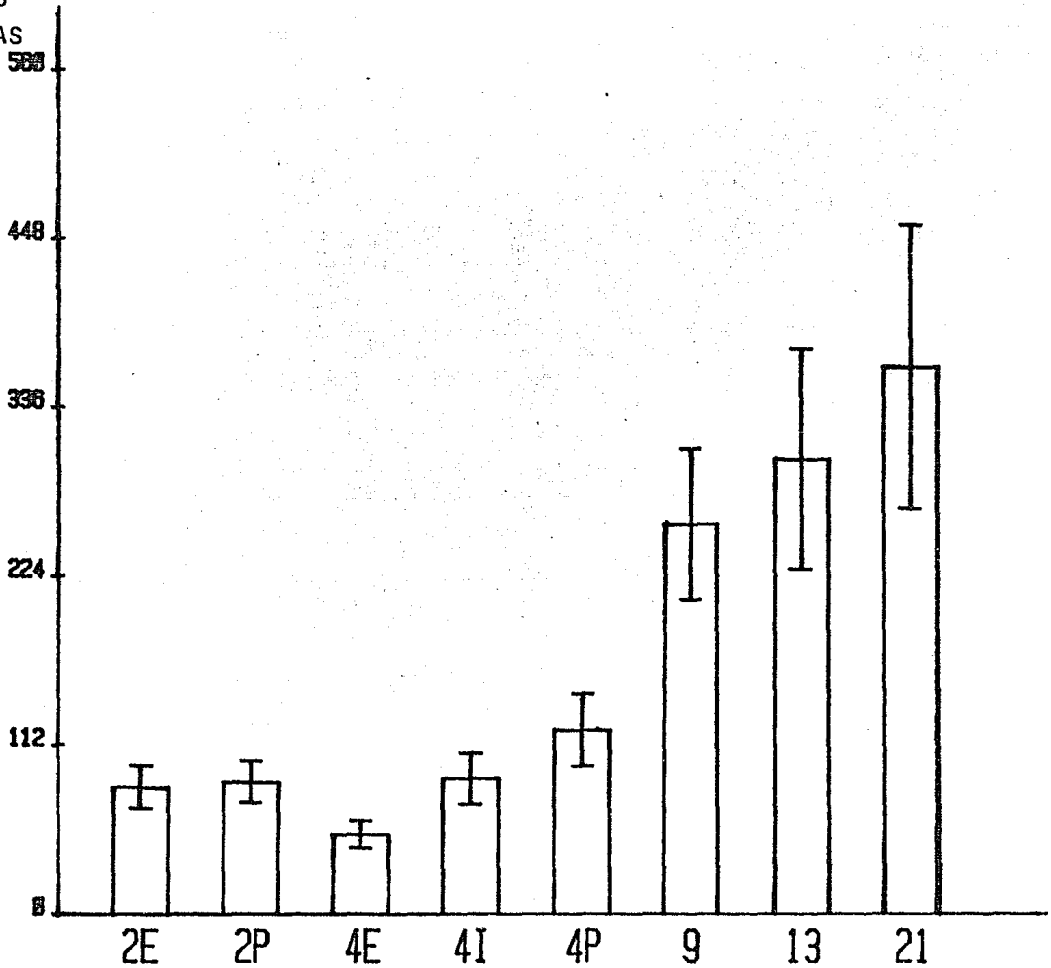
FRACCION DEL ESPACIO NUCLEAR OCUPADO POR CROMATINA COMPACTA



Gráfica 1.- Area nuclear ocupada por cromatina compacta en células matrices (2E, 2P, 4E), neuroblastos (4I, 4P) y neuronas (9, 13, 21). El área relativa se expresa como el cociente de cromatina compacta entre el área nuclear. Hay diferencias significativas entre células matrices y neuroblastos y entre estos y neuronas.

VOLUMEN NUCLEAR

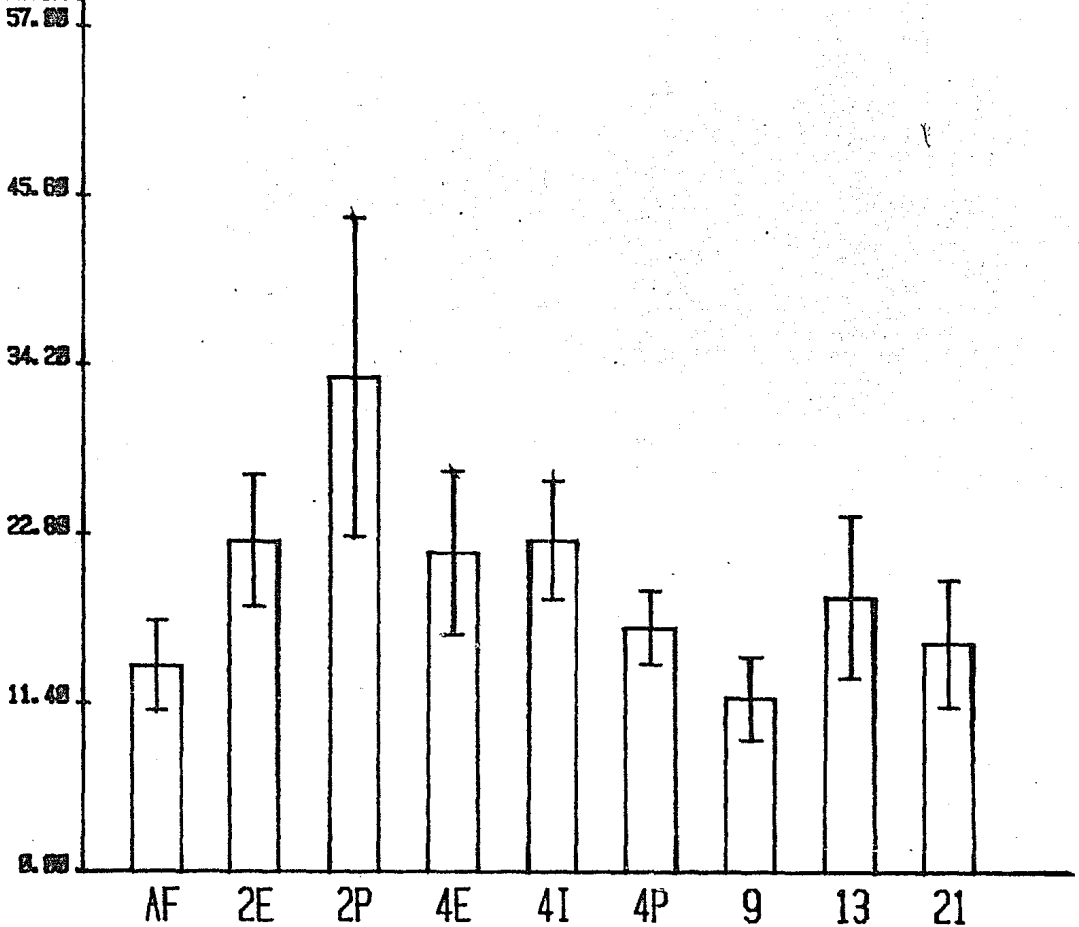
MICRAS
CÚBICAS



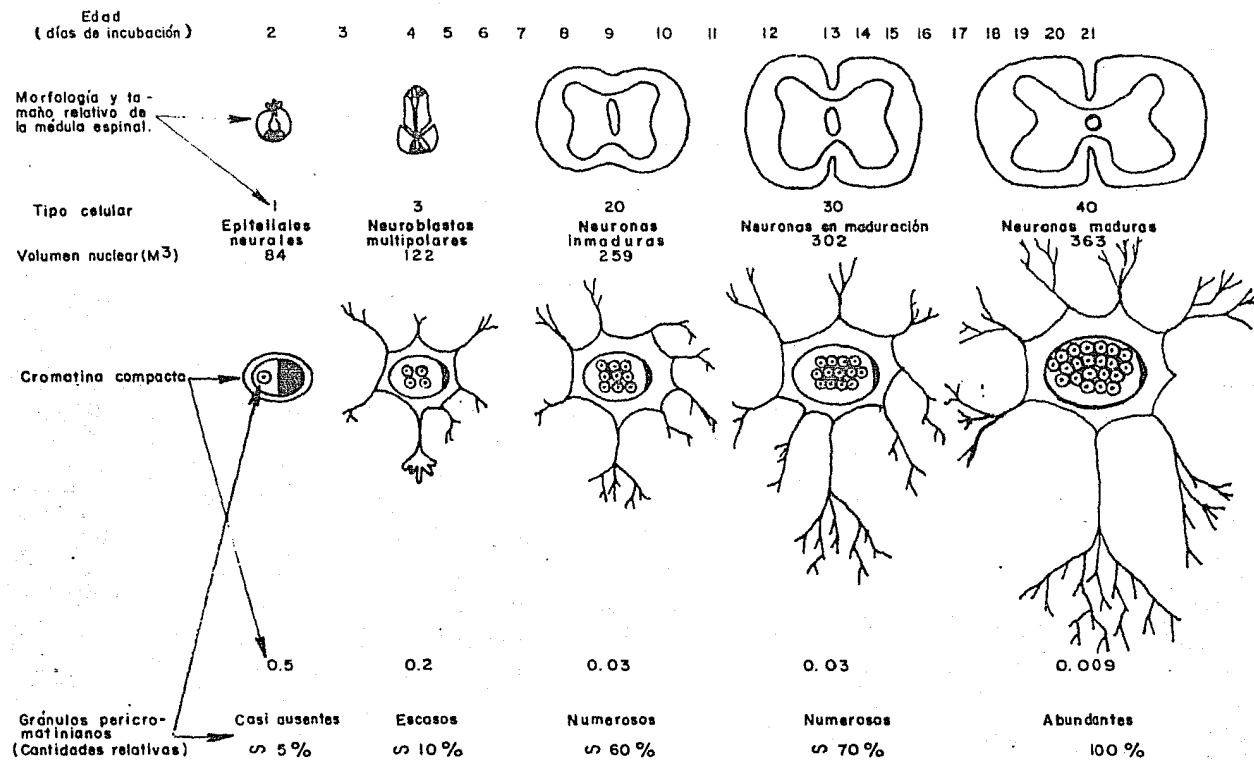
Gráfica 2.- La gráfica representa el volumen nuclear de células matrices (2E, 2P y 4E), neuroblastos (4I, 4P) y neuronas (9, 13 y 21) en médula espinal cervical de embrión de pollo. El incremento en volumen es más marcado en el paso de neuroblasto multipolar (4P) a neurona inmadura (9) (ver texto).

CONTENIDO DE ADN

UNIDADES
ARBITRARIAS

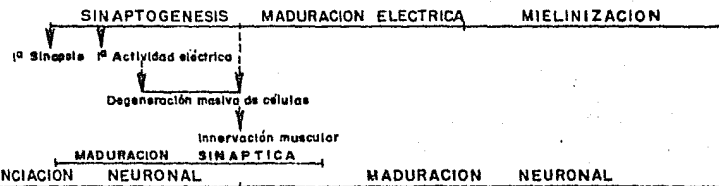


Gráfica 3.- Contenido de ADN en unidades arbitrarias en núcleos de células matrices (2E, 2P, 4E), neuroblastos (4I, 4P) y neuronas (9, 13, 21). Se comparan las cantidades con las de una placa de anafase de una célula matriz (AF). No hay diferencias significativas entre la placa de anafase, las células matrices (2E), los neuroblastos motores (4P) y las neuronas (9, 13, 21) (ver texto).



Eventos de la diferenciación

Mitosis activa
Formación de Reticulo Endoplasmico Rugoso



CUADRO 1 : Esquema que resume los principales cambios nucleares que ocurren durante la diferenciación y maduración neuronal en médula espinal cervical de embrión de pollo.

V. DISCUSION.

El desrollamiento progresivo que sufre la cromatina en el transcurso de células matrices a neuronas, pasando por neuroblasto, es un índice de que aumenta la síntesis de ARN (Derenzini, Lorenzoni, Marinozzi y Barsotti, 1977; Derenzini, Novello y Possion-Brizzi, 1978). Sin embargo, la síntesis de proteínas no aumenta necesariamente, como lo demuestra el incremento gradual de gránulos pericromatinianos en el mismo período (Vázquez-Nin y col., 1980), que resultan ser probablemente un sitio de almacenamiento y/o transporte de ARN mensajero del núcleo al citoplasma (Vázquez-Nin y Bernhard, 1971).

En células matrices y neuroblastos, la escases de gránulos pericromatinianos y la abundancia de cromatina compacta podrían indicar una actividad de síntesis proteica variada, mientras que en neuronas, donde ocurre lo contrario con los gránulos y la cromatina, la variedad de la síntesis proteica probablemente disminuye cuando se almacena bastante ARN mensajero o premensajero.

El aumento en volumen nuclear no necesariamente implicaría un aumento en la síntesis proteica total, pero sí implica que un tipo de ARN que viajaría al citoplasma se quede en el núcleo permaneciendo en equilibrio con la síntesis de esas proteínas.

Los gránulos pericromatinianos sufren cambios significativos desde etapas tempranas de la diferenciación, mientras que el volumen nuclear cambia en el paso de neuroblasto multipolar a neurona inmadura del día 9 al 13, es decir, el aumento en volumen nuclear no se debe a un aumento en la cantidad de gránulos pericromatinianos.

En los primeros días del desarrollo, cuando la mayoría de las células matrices se transforman en neuroblastos, dejan de dividirse y aparecen signos de diferenciación como son la formación de neurofibrillas (Vázquez-Nin y Sotelo, 1966; Fujita y Fujita, 1963) y retículo endoplásmico rugoso, ocurre un cambio significativo en la cantidad de cromatina compacta y de gránulos pericromatinianos, lo cual sugiere una modificación importante en la actividad genética del núcleo.

En el período del día cuatro al nueve, las células son muy acti

vas pues la sinaptogénesis es intensa y el neuroblasto se transforma en neurona mientras los axones siguen su crecimiento (Cajal, 1929). En este período ocurre también una degeneración masiva de células debido a factores de competencia celular (Hamburger, 1975; Oppenheim y col., 1975). Por esta actividad tan intensa en el metabolismo, se espera una modificación en la actividad genética, la cual se manifiesta en el desenvolvimiento de la cromatina.

Entre el día nueve y el trece, mientras ocurre la maduración eléctrica, no hay cambios importantes en la actividad genética, la cromatina compacta es casi constante, al igual que los gránulos pericromatinianos, tal vez porque el proceso de maduración eléctrica depende más del medio ambiente que de la actividad de algunas proteínas.

Cuando las neuronas sufren mielinización de los axones, entre los días trece y veintiuno, se lleva a cabo una modificación importante en la actividad genética, la cual, si bien no es de la importancia de la del paso de célula matriz a neuroblasto, sí tiene significancia biológica ($p > 0.05$).

Si la compactación y descompactación de la cromatina se deben a, o son causa de la actividad genética, no queda claro en este estudio, pero puede considerarse que, ya que los fenómenos ocurrido requieren de la actividad proteica, el desenvolvimiento precede a tales fenómenos puesto que es necesario un molde para que ocurra la transcripción.

Lo que queda claro es que durante la diferenciación y maduración neuronal, la cromatina compacta sufre cambios cuantitativos que se traducen en actividad genética adaptada a cada etapa del desarrollo, quizá como necesidad de la célula por utilizar un juego específico de proteínas en una región más grande y más activa.

La gran variedad en contenido de cromatina compacta en núcleos de células matrices periféricas de embriones de dos días de incubación, en células matrices endimarias de embriones de cuatro días y en neuroblastos de cuatro días de la zona intermedia, ya sean células bi o monopolares, puede explicarse por diferencias en la cantidad de ADN, puesto que estas células poseen actividad mitótica intensa y no es posible saber en qué etapa del ciclo celular están.

Por otro lado, la cantidad de ADN por núcleo en células matrices (2E), en neuroblastos multipolares (4P) y en neuronas en maduración (9, 13, 21 días) es constante y similar al contenido en una placa de anafase (AF) de una célula matriz en división. Esto claramente pone en evidencia que, puesto que el contenido de ADN es constante, los cambios en la cantidad de cromatina compacta se deben a causas biológicas que actúan sobre la conformación de la misma y no a la presencia de menor o mayor cantidad de ADN.

Es cierto también que los cambios cuantitativos de la cromatina, por esto mismo, se deben en última instancia a cambios en la conformación de esta sustancia, al pasar de una forma transcripcional a otra.

Debe notarse que en el núcleo, cuando es poco el volumen, la cromatina compacta es abundante y los gránulos pericromatinianos escasos. Es decir, el ARN proveniente de las escasas zonas eucromatínicas sale del núcleo y se incorpora al proceso de síntesis proteica, en etapas tempranas del desarrollo, cuando la célula es muy activa mitóticamente.

El núcleo, cuando tiene mayor volumen, tiene asimismo mayor cantidad de eucromatina y abundantes gránulos pericromatinianos. Parecería ser entonces que, aún cuando la eucromatina sintetiza abundantemente, la mayoría o buena parte del ARN es almacenado para su posterior transporte o maduración. Por otro lado, puede pensarse que no toda la eucromatina sintetiza o se transcribe en ARN, sino que sea solamente una parte de la misma la que realice tales procesos bioquímicos. Más aún, podría ser que esta parte posea genes repetidos que aumentarían la transcripción del genoma que no ha sido inactivado por la diferenciación.

El presente estudio indica que el aumento significativo de volumen nuclear en el paso de neuroblasto a neurona, no es consecuencia del desenvolvimiento de la cromatina, pues este ocurre de manera importante desde la transformación de célula matriz a neuroblasto y de este a neurona.

De esta forma, la acumulación de pequeños cambios cuantitativos aparentemente insignificantes ocurridos en el núcleo, se traducen a

cambios cualitativos manifiestos, ocurridos por ejemplo en el movimiento embrionario y en la rotura del cascarón, como consecuencia de la actividad proteica desarrollada por la neurona, según una de las leyes fundamentales del materialismo dialéctico que dice precisamente que los pequeños cambios cuantitativos producen cambios cualitativos notables (Stalin, 1950). En la médula espinal, al igual que en toda la naturaleza, los objetos y fenómenos están en continuo cambio y movimiento y se hallan vinculados y dependen unos de otros en una intrincada red de interacciones.

VI. CONCLUSIONES.

1. El análisis morfológico en núcleos de células matrices, neuroblastos y neuronas en médula espinal cervical de embrión de pollo es posible y útil para inferir aspectos citofisiológicos.
2. Los cambios cuantitativos de la cromatina compacta se deben a cambios en su disposición, al desenrollarse y formar cromatina laxa.
3. Los cambios cromatínicos más importantes ocurren durante el paso de célula matriz a neuroblasto y durante la sinaptogénesis e implica que hay cambios en la síntesis de ARN intranuclear debidos a requerimientos importantes de proteínas.
4. La cantidad de cromatina compacta y de gránulos pericromatinianos es inversa en los diferentes estadios del desarrollo, apoyando esto la hipótesis de que los gránulos son un sitio de almacén y/o transporte de ARN mensajero y están en equilibrio entre la salida de esta sustancia al citoplasma y su producción en el núcleo.
5. El aumento en volumen nuclear no es consecuencia del aumento en gránulos pericromatinianos ni de la disminución de cromatina compacta o aumento de la cromatina laxa.
6. Las variaciones en la disposición de cromatina en sistemas transcripcionalmente irreversibles son graduales y continuos y no cíclicos como en sistemas transcripcionales reversibles.

VII. REFERENCIAS.

- Arana-Iñiguez, R. y M.A. Rebollo (1954): Neuroanatomía. El Ateneo, México, pp. 11-123.
- Avery, O.T., C.M. MacLeod and M. McCarty (1944): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med., 79:137.
- Bak, A.L., P. Bak and J. Zeuthen (1979): Higher levels of organization in chromosomes. J. theor. Biol., 76: 205-217.
- Barghoorn, E. and W. Schopf (1966): Microorganisms three billion years old from the Precambrian of South Africa. Science, 152:758-763.
- Bouteille, M., M. Laval and A.M. Dupoy-Coin. En Busch, H. (Ed.), The Cell Nucleus, vol. 1, chapt. 1, p. 3. Ac. Press, New York, 1974.
- Cajal, S.R. (1929): Etudes sur la neurogénèse de quelques vertébrés. Madrid, pp. 1-145.
- Castañeda, M. (Ed.) (1973): Antología de Biología Molecular. U.N.A.M. México.
- Crick, F.H.C. (1970): Central Dogma of Molecular Biology, Nature, 227: 561-563.
- Daskal, Y. A. Merski, A.B. Hughes and H. Busch (1975): The effects of cycloheximide on the ultrastructure of rat liver cells. Exptl. Cell Res., 93: 395-401.
- Derenzini, M., E. Lorenzoni, V. Marinozzi and P. Barsotti (1977): Ultrastructural cytochemistry of active chromatin in regenerating rat hepatocytes. J. Ultrast. Res., 59: 250-267.
- Derenzini, M., F. Novello and A. Pession Brizzi (1978): Perichromatin fibrils and chromatin ultrastructural pattern. Exp. Cell Res. 112: 443-454.
- De Robertis, E.D.P. y E.M.F. De Robertis (1981): Biología Celular y Molecular. El Ateneo, México.
- Dyson, R.D. (1977): Principios de Biología Celular. Fondo Educativo Interamericano, México.
- Echeverría, O.M., G. Zavala, A. Benítez and G.H. Vázquez-Nin (1980): Changes during estral cycle in the nucleus of endometrial cells of the rat. Biol. Cell., 39: 139-142.

- El-Eishi, H.I. (1967): Biochemical and histochemical studies on myelination in the chick embryo spinal cord. *J. Neurochem.*, 14; 405-417.
- Felsenfeld, G. (1978): Chromatin. *Nature*, 271: 115-122.
- Fujita, H. and S. Fujita (1963): Electron microscopic studies on neuroblast differentiation in central nervous system of domestic fowl. *Z. Zellforsch.*, 60: 463-478.
- Fujita, S. (1964): Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, 122: 311-328.
- Hamburger, V. (1975): Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 160: 535-546.
- Hershey, A.D. and M. Chase (1952): Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Phys.*, 36: 39.
- Hewish, D.R. and L.A. Burgoyne (1973): Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 52: 504-510.
- Kolata, G.B. (1981): Genes regulated through chromatin structure. *Science*, 214: 775-776.
- Langman, J. and C. Hadden (1970): Formation and migration of neuroblasts in the spinal cord of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 138: 419-432.
- Leder, P. and M. Nirenberg (1964): RNA code-words and protein synthesis, II. Nucleotide sequence of a valine RNA code-word. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 53: 420.
- Leduc, E.H. and W. Bernhard (1967): Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. *J. Ultrastr. Res.*, 19: 196-199.
- Lehninger, A. (1975): *Biochemistry*. Worth Publ., Inc., New York. p. 1059.
- Long, E.O. and I.B. Dawid (1980): Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 727-764.
- Lyser, K.M. (1964): Early differentiation of motor neuroblasts in the chick embryo as studied by electron microscopy. I. General aspects. *Developmental Biology*, 10: 433-466.

- Matsumoto, Y., H. Yasuda, S. Mita, T. Marunouchi and M. Yamada (1980): Evidence for the involvement of H1 histon phosphorylation in chromosome condensation. *Nature*, 284: 181-183.
- McGhee, J.D. and G. Felsenfeld (1980): Nucleosome structure. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 1115-1156.
- Monneron, A. and W. Bernhard (1969): Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastr. Res.*, 27: 266-288.
- Moyne, G., R.E. Nash and E. Puvion (1977): Perichromatin granules in isolated hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide. *J. Micr. Biol. Cell*, 30: 5-16.
- Olins, A.L. and D. Olins (1974): Spheroid chromatin units (ν bodies). *Science*, 183: 330-332.
- Oppenheim, R.W., I. Chu-Wang and R. Foelix (1975): Some aspects of synaptogenesis in the spinal cord of the chick embryo: a quantitative electron microscopic study. *J. Comp. Neur.*, 161: 383-418.
- Oudet, P., J.E. Germond, H. Bellard, C. Spadafora and P. Chambon (1978): Nucleosome structure. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 283: 241-258.
- Palay, S.L. and G. E. Palade (1955): The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 69-88.
- Palay, S.L. (1956): Synapses in the central neurosystem. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 suppl.: 193-202.
- Petrov, P. and L.E. Sekeris (1971): Early action of α -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins as revealed by electron microscopic observation. *Exptl. Cell Res.*, 69: 393-401.
- Provine, R.R. (1972): Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. *Brain Res.*, 41: 365-378.
- Puvion, E. (1980): Les graines perichromatiniens: nouvelles données structurales et fonctionelles. *Biol. Cell.*, 39: 117-120.
- Sauer, M.E. and A.C. Chittenden (1959): Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of chick embryo. *Rxptl. Cell Res.*, 16: 1-6.
- Sauer, M.E. and B.E. Walker (1962): Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 101: 557-560.

- Sidman, R.L., I.L. Miale and N. Feder (1959): Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone, and autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.*, 1: 322-323.
- Sidman, R.L. (1962): Histogenesis of mouse retina studied with thymidine $^3\text{H}^+$ in the structure of the eye. *Ac. Press, New York.*
- Stalin, J. (1950): Sobre el materialismo histórico y el materialismo dialéctico. *Pravda, U.R.S.S.*
- Stein, G.S., J. Swinehart and J. Kleinsmith (1975): Chromosomal proteins and gene regulation. *Sci. Am.*, 232: 46-57.
- Sunkara, P.S., D.A. Wright and P.N. Roo (1979): Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 2799-2802.
- Swift, M. (1962): Interpretation of ultrastructure. *Symp. Int. Soc. Cell Biol.*, 1: 213-232.
- Tomas-Martin, M.C. (1976): *Citoquímica estructural de la cromatina sexual en núcleo interfásico de células animales y vegetales. Tesis Doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.*
- Tsanev, R. and P. Petrov (1976): The substructure of chromatin and its variations as revealed by electron microscopy. *J. Mic. Biol. Cell.*, 27: 11-18.
- Van Holde, K.E., C.G. Sahasrabudde and B.R. Shaw (1974): A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 1: 1579.
- Vázquez-Nin, G.H. and J.R. Sotelo (1966): Neurofibrillar differentiation during embryony growth. *J. Comp. Neurol.*, 128: 313-331.
- Vázquez-Nin, G.H. and W. Bernhard (1971): Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastr. Res.*, 27: 266-288.
- Vázquez-Nin, G.H., B. Chávez and M.C. Tomas-Martin (1973): A preferential staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie*, 16: 243-246.
- Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedron (1979a): Ultrastructural and autoradiographic study of the effects of bleomycin on the interphase nucleus of cultured cells. *Cancer Res.*, 39:4218-4223.
- Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedron (1979b): Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cul-

- tured endometrial epithelial cells. *Biol. Cell.*, 35: 221-228.
- Vázquez-Nin, G.H., J.A. Ortega and O.M. Echeverría (1980): Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell.*, 39: 143-146.
- Villard, D. et S. Fakan (1978): Visualisation del complexes de transcription dans la chromatin étalée de cellules de mammifères: étude en autoradiographie á haute resolution. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 286:777-780.
- Watson, J.D. (1974): *Biología Molecular del Gen*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.
- Watson, M.L. (1962): Observations a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell. Biol.*, 14: 162-167.
- Watterson, E.R., L.P. Veneziano and A. Bertha (1959): Absence of a true germinal zone in neural tubes of young chick embryos as demonstrated by colchicine technique. *Anat. Rec.*, 124: 379.
- Windle, W.F. and R.E. Baxter (1936): The first neurofibrillar development in albino rat embryos. *J. Comp. Neurol.*, 63: 173-187.
- Yakura, K., K. Fukuei and S. Tanifuji (1978): Chromatin subunits structure in different tissues of higher plants. *Plant and Cell Physiol.*, 1958: 1381-1390.
- Zavala-Padilla, G. (1980): Cambios de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares de las células epiteliales endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.

J16LF'82-'83

