



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Reproducción y diferenciación estructural del hepatocito de pollo durante el desarrollo embrionario

Jordi Domingo i Feliudabaló



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR

"Reproducción y diferenciación estructural del
hepatocito de pollo durante el desarrollo embrionario"

TESIS DOCTORAL

Jorge Domingo Feliubadaló

Septiembre de 1982

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700389255

3. Material y Métodos

3.1. Material

El material biológico utilizado en los diversos estudios realizados (crecimiento, citocinética y estructura) ha consistido en 787 huevos fértiles de gallina raza "Golden Comet" (híbrido New Hampshire x Leghorn) procedentes de la granja Albà-Solicrup de Vilanova i la Geltrú (Barcelona).

El peso medio de los huevos era de 61 ± 3 gramos y el tiempo de almacenamiento a la temperatura ambiente desde la puesta hasta el principio de la incubación entre 24 y 48 horas.

Antes de iniciar la incubación, los huevos eran pesados, numerados y limpiados con un trapo seco. La numeración de los huevos y la anotación de su peso permitía escoger muestras compensadas para cada experimento.

La incubación se realizó a $37,5 \pm 0,5$ °C en dos incubadoras para huevos Masallés (Barcelona) y una estufa Selecta-200. El tiempo de incubación se empezaba a contar una vez estabilizada la temperatura de la estufa, que en nuestras condiciones ocurría 4 horas después de haber introducido los huevos. La temperatura fué controlada dos veces por día y corregida la posición del termostato si sobrepasaba los 38 °C o era inferior a los 37.

Durante todo el tiempo de incubación, los orificios de ventilación de las estufas se mantenían abiertos y debajo de la bandeja de los huevos una cubeta de aproximadamente 112 cm^2 de superficie se mantenía siempre llena de agua destilada, con el objeto de proporcionar unas condiciones de humedad relativamente uniformes. Los huevos eran volteados dos veces al día, excepto en los dos últimos días del desarrollo (20 y 21).

3.2. Estudios de crecimiento

3.2.1. Determinación de la cantidad de DNA/órgano

La determinación de la cantidad de DNA/órgano se realizó en hígado, corazón y encéfalo de embrión de pollo entre los 8 y los 20 días de incubación.

La cantidad de DNA se midió en homogenizados de los órganos mediante la técnica de extracción del DNA con ácido tricloroacético caliente y la reacción de la difenilamina, según la pauta de Schneider (1957) adaptada a nuestras condiciones.

Las curvas patrón se realizaron con soluciones de distinta concentración de desoxirribosa y los resultados se expresan, por tanto, en forma de desoxirribosa unida al DNA (dR-DNA). Con la técnica utilizada, el producto coloreado cuya concentración se mide fotocolorimétricamente, resulta de la reacción de la difenilamina con la desoxirribosa, o más exactamente, con la desoxirribosa unida a purinas.

El número de órganos necesarios para cada determinación depende de su tamaño. En los embriones de 8 días utilizábamos 15 órganos para cada determinación, 10 en los de 9 días y 5 en los de 12 a 18 días. La cantidad de órgano fresco de partida para un volumen de ácido tricloroacético de 3 ml es un factor importante : Si se trabaja con cantidades inferiores a los 100 mg, las concentraciones finales del producto de reacción son, en nuestras condiciones, demasiado bajas para una buena lectura, pero con cantidades mayores el rendimiento de la extracción del DNA no es constante. Realizamos un estudio sobre el rendimiento de la extracción (Tabla 5) y comprobamos una disminución aproximadamente lineal del rendimiento al aumentar la cantidad de órgano fresco de 100 a 600 mg. Por esta razón es esencial utilizar siempre la misma cantidad de órgano para la extracción. Hemos realizado todas las determinaciones partiendo de 200 mg en cada caso, con lo cual se consiguen densidades ópticas del producto de reacción comprendidas entre 10 y 17 unidades según el órgano.

TABLA 5

Rendimiento de la extracción del DNA en homogenizados hepáticos con ácido tricloroacético (véase texto)

<u>mg de hígado</u>	<u>microg dR-DNA / mg de hígado</u>
100	0,40
200	0,37
300	0,35
400	0,30
500	0,27
600	0,22

La pauta de la técnica utilizada es la siguiente :

- 1- Aislamiento de los órganos del embrión con la ayuda de pequeñas pinzas y agujas de vidrio, procurando eliminar los grandes vasos que dificultan la homogenización y extirpando cuidadosamente la vesícula biliar en el aislamiento del hígado, ya que de reventarse, los pigmentos biliares contaminan el homogenizado e interfieren con la lectura fotocolorimétrica.
- 2- Conservación de los órganos en el congelador a -14°C , previo enfriamiento rápido por inmersión en nitrógeno líquido.
- 3- Pesada de la muestra de órganos que va a utilizarse en la homogenización.
- 4- Homogenizado de la muestra en agua destilada mediante un homogenizador coaxial.
- 5- Tomar un volumen del homogenizado correspondiente a 200 mg de órgano fresco (esto se calcula fácilmente conociendo el peso de la muestra y el volumen del homogenizado) y transferirlo a un tubo de ensayo de tapón roscado y resistente al calor (Sovirel).
- 6- Añadir 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % mezclando bien con una varilla de vidrio.

- 7- Centrifugar durante 15 minutos a 2.800 g, decantar el sobrenadante y añadir 3 ml de TCA al 10 %, removiendolo bien el precipitado con una varilla de vidrio. Este lavado con TCA tiene por objeto eliminar la desoxirribosa libre.
- 8- Centrifugar de la misma forma que en el paso anterior, decantar el sobrenadante y añadir 5 ml de etanol de 95%, mezclar bien, centrifugar, decantar y repetir esta operación tantas veces como sea necesario. Este lavado es especialmente importante en el homogenizado de hígado, ya que permite eliminar los pigmentos biliares que interferirían con la lectura fotocolorimétrica; deben repetirse los lavados hasta que el sobrenadante resulte incoloro.
- 9- Una vez decantado el último sobrenadante de etanol, añadir al precipitado 3 ml de TCA al 5 % e incubar el tubo tapado durante 15 minutos en un baño-maría a 90 °C, agitando el tubo de vez en cuando. Dejar enfriar, centrifugar y filtrar, recogiendo el sobrenadante o extracto.
- 10- Tomar 1 ml del extracto anterior y ponerlo en un tubo de ensayo del tipo mencionado y añadir 2 ml del reactivo de difenilamina según Schneider (1957) :
- | | |
|----------|-----------------------------|
| 1 g | difenilamina |
| 100 ml | ácido acético glacial |
| 0,275 ml | ácido sulfúrico concentrado |
- 11- Preparar cuatro soluciones patrón de desoxirribosa de 40, 100, 120 y 200 microg/ml, tomar 1 ml de cada una de ellas y colocarlos en cuatro tubos de ensayo de tapón roscado, añadir 2 ml del reactivo de difenilamina a cada tubo e incubarlos simultáneamente con los tubos problema.
- 12- Incubar los tubos patrón y los tubos problema debidamente tapados, durante 15 minutos en un baño-maría a 90 °C y dejar enfriar.
- 13- La lectura de la densidad óptica del producto de reacción, de color azulado, se realiza a 600 nm de longitud de onda (en realidad, nosotros realizamos las lecturas a 570 nm, ya que nuestro fotocolorímetro

(Gricel) no permitía una variación continua del espectro y, entre las longitudes de onda posibles, 570 nm era la más intensamente absorbida por el producto de reacción).

- 14- Construir la curva patrón (concentración de desoxirribosa - densidad óptica) y determinar a partir de ella las concentraciones de desoxirribosa de los extractos problema.

Los resultados se expresan como desoxirribosa unida al DNA / órgano (dR-DNA/org.) y el cálculo se realiza de la siguiente forma :

$$\text{dR-DNA/org} = \text{dR-DNA extrac.} \times \frac{\text{VHT}}{\text{VHU}} \times \frac{1}{n}$$

Donde,

dR-DNA/org = Microgramos de desoxirribosa unida la DNA / órgano.

dR-DNA extrac. = Microgramos de desoxirribosa unida al DNA en el extracto. Se obtiene multiplicando la concentración del extracto leída sobre la curva patrón por el volumen del extracto.

VHT = Volumen del homogenizado total (ml).

VHU = Volumen del homogenizado utilizado (ml).

n = Número de órganos utilizados para preparar el homogenizado.

En realidad, esta cantidad es la mitad de la desoxirribosa del DNA ya que únicamente reacciona la unida a las purinas, sin embargo, para estudios de crecimiento donde interesan las cantidades relativas de DNA no es necesario considerar este factor.

Con los datos obtenidos se han estudiado analíticamente los crecimientos absolutos y relativos de los tres órganos. En el caso del hígado, los resultados pueden compararse con los de la parte citocinética, siendo posible determinar por caminos independientes la duración media del ciclo celular de la población.

3.3. Estudios citocinéticos

3.3.1. Medida del índice mitótico en el parénquima hepático, preparación del material para microscopía óptica

La determinación del índice mitótico basal y después de la acumulación con bloqueantes durante distintos tiempos permite calcular la constante de proliferación (PK), el período de duplicación de la población (DT), que en poblaciones expansivas y homogéneas corresponde a la duración media del ciclo celular (GT), y también la duración de la mitosis (MT).

La medida del índice mitótico se ha realizado en cortes histológicos de hígado embrionario. La preparación del material para esta finalidad requiere rapidez en la fijación y en la disección, ya que durante las mismas el balance celular de entrada y salida de la mitosis puede desequilibrarse determinando índices mitóticos artefactuales.

Los huevos se sacaban de la estufa en pequeños grupos para evitar que permanecieran demasiado tiempo a temperatura ambiente en espera de ser abiertos. Una vez rota la cáscara, el contenido del huevo era depositado en una cápsula de Petri y con la ayuda de un par de pinzas se separaba el embrión de los anejos. La disección del hígado se realizaba mediante pequeñas pinzas y agujas de vidrio sobre la superficie de una cápsula invertida. Una vez aislado se partía con una cuchilla en dos o más trozos según su tamaño para facilitar la penetración del fijador. En embriones de menos de 8 días no se disecaba el hígado, simplemente se extirpaba la cabeza y las extremidades y se abría completamente el tronco, de modo que el fijador entrara inmediatamente en contacto con el hígado. La manipulación de los fragmentos se hacía siempre evitando su compresión, siendo transferidos al fijador mediante la propia cuchilla y empujando con las pinzas.

Para la fijación se ha utilizado el fijador de Carnoy, que difunde muy rápidamente en los tejidos, su composición es la siguiente :

ácido acético glacial	10 ml
cloroformo	30 ml
etanol absoluto	60 ml

El tiempo de fijación en Carnoy era de 15 minutos y después se cambiaba por formaldehído al 4 %, donde los fragmentos permanecían hasta el momento de iniciar el proceso de inclusión (generalmente 24 horas, aunque el tiempo de permanencia en este fijador no es crítico, ya que no deshidrata ni retrae los tejidos como lo hacen los fijadores alcohólicos).

La inclusión en parafina se hizo de acuerdo con la siguiente pauta :

1- etanol de 95 g	15 min
2- etanol de 95 g	15 min
3- etanol absoluto	10 min
4- etanol absoluto	10 min
5- xilol	5 min
6- parafina a 60 °C	20 min

Todos los pasos se realizaban sin sacar la muestra del frasco, utilizando una pipeta Pasteur para los cambios, excepto la introducción del tejido en la parafina, para lo cual se depositaba sobre un pedazo de cartulina que absorbía el exceso de xilol y mediante las pinzas o una aguja se empujaba hasta dejarlo caer en la parafina líquida. Transcurridos 20 minutos se vertía la parafina junto con la muestra en un molde y se dejaba enfriar. La preservación de la integridad estructural de los órganos embrionarios aislados hace necesario tomar las anteriores precauciones.

Se realizaron cortes de 5 micras de espesor con un microtomo tipo Minot (Leitz) y una vez desparafinados, se teñían con hematoxilina-eosina y se montaban las preparaciones según los procedimientos usuales (Gurr 1973 y Gabe 1976).

Los contajes se realizaron en un microscopio con pantalla de proyección de vidrio esmerilado (Reichert-Visopan). Sobre la pantalla se colocaba un retículo de orientación. Trabajamos a 780 aumentos y se contaron unos 40 campos/embrión que equivale, por término medio, a unos 4.000

hepatocitos. En las preparaciones de embriones de 5 a 8 días, donde el hígado presenta una proporción importante (más del 20 %) de espacios vasculares, el número de células por campo es muy variable, por lo que se contó el número de mitosis y el número de células en todos los campos. En las preparaciones de embriones de edad superior a los 8 días, en las que el número de células por campo es mucho menos variable, debido a la menor abundancia de espacios vasculares, se contó el número de células en 10 campos y se obtuvo la media, el número de mitosis se contó en 40 campos.

3.3.2. Acumulación mitótica con bloqueantes

El fundamento de este método, así como sus ventajas e inconvenientes con respecto al de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM), han sido ya tratados previamente (véase 2.1.3.4 y 2.1.3.5).

En esencia, la acumulación mitótica con bloqueantes permite medir la constante de proliferación (PK) en función del incremento del índice mitótico (ΔMI) y del tiempo de acumulación correspondiente (t) :

$$PK = \frac{\Delta MI}{t} \quad (68)$$

Si la población es expansiva y cinéticamente homogénea, como es el caso del parénquima hepático embrionario, la duración media del ciclo de reproducción (GT) para las células de dicha población es

$$GT = \frac{\ln 2}{PK} = \frac{\ln 2 \cdot t}{\Delta MI} \quad (69)$$

Una vez calculado GT , puede determinarse la duración de la mitosis (MT) en función de GT y del índice mitótico basal (MI)

$$MT = \ln 2 \cdot \frac{MI}{GT} \quad (70)$$

Las anteriores expresiones son solamente aproximadas, pero pueden utilizarse siempre que el MI sea bastante inferior a la unidad (véase 2.1.3.3 y 2.1.3.4).

Los bloqueantes mitóticos utilizados fueron la colchicina (Merck) y la vinblastina (Lilly), hicimos también unas pruebas iniciales con colcemid, pero no pudimos seguir utilizando este producto por falta de suministro regular.

La puesta en práctica de la técnica en el embrión de pollo in vivo nos planteó tres problemas fundamentales que tuvimos que resolver :

- 1º - Vía de inyección
- 2º - Condiciones ambientales durante la manipulación (temperatura y asepsia)
- 3º - Dosificación y tiempo de acumulación

La vía de inyección debía permitir una rápida distribución del compuesto, pero evitando una manipulación demasiado larga, dado el elevado número de huevos a inyectar y la necesaria precisión en la medida del tiempo de acumulación mitótica.

Elegimos la inyección en la cámara de aire, ya que los experimentos de acumulación mitótica fueron realizados en embriones de más de 7 días y a partir de esta edad la membrana corioalantoidea contacta directamente con la membrana interna de la cáscara por debajo de la cámara de aire, de modo que las sustancias difusibles inyectadas en la cámara deberían pasar rápidamente al embrión a través de la circulación corioalantoidea. En efecto, diversos autores (véase Romanoff 1960) han comprobado como el colorante coloidal Azul tripán inyectado en la cámara de aire pasa rápidamente al ectodermo corioalantoideo y después al mesénquima y a los vasos sanguíneos de la misma membrana, llegando a la circulación general y siendo excretado por el riñón.

Un día antes del experimento de acumulación mitótica, los huevos eran observados por transiluminación para comprobar si estaban embrionados y para precisar la situación de la cámara de aire, cuyo contorno se marcaba con lápiz.

Las condiciones de asepsia, que creímos necesarias para evitar posibles infecciones del huevo durante la inyección, consistieron primeramente en frotar los huevos con un algodón empapado con un desinfectante (Lugol) y en realizar todas las operaciones con material estéril dentro de una cámara provista de una lámpara ultravioleta. Para ello una incubadora de prematuros que acondicionamos a este fin. Una vez inyectada la solución del bloqueante mitótico, el orificio de la aguja en la cáscara se tapaba con cinta adhesiva. El volumen inyectado fué siempre de 1 ml independientemente de la concentración.

Mediante una lámpara de 100 W manteníamos dentro de la cámara una temperatura de alrededor de 37 °C, ya que una disminución de la temperatura afecta a la actividad proliferativa. En efecto, realizamos un estudio sobre la influencia de la temperatura sobre el índice mitótico en embriones de 10 días y encontramos que la permanencia de los huevos a 25 °C durante 10 minutos disminuía el índice mitótico respecto a los controles que habían permanecido a 37 °C en un 31 % y si el tiempo era de 20 minutos la disminución alcanzaba el 46 %. También pudimos comprobar que los huevos que habían permanecido 10 ó 20 minutos a 25 °C recuperaban el índice mitótico del control antes de 6 horas de incubación a 37°C. Sin embargo, en un experimento de acumulación, cualquier disminución transitoria de la constante de proliferación repercute negativamente en la cantidad final de mitosis bloqueadas, por lo que el mantenimiento de la temperatura de incubación durante el proceso de inyección es realmente importante.

El problema de la dosificación de los bloqueantes mitóticos para la medida de la constante de proliferación consiste en encontrar la dosis que bloqueando el 100 % de las mitosis que se inician no produzca efectos tóxicos que ocasionen una disminución de la actividad proliferativa.

Para Bertalanffy (1964) la dosis óptima de colchicina para la rata es de 1 microgramo por gramo de peso corporal. Sin embargo, en la revisión de trabajos en los que se usa esta técnica realizada por nosotros (véase 2.1.3.4) hemos encontrado una gran variación de dosis de bloqueante

(colchicina, colcemid y vinblastina) utilizada : de 1 a 12 microgramos por gramo de peso corporal.

Partiendo de estos datos nos planteamos el problema de la dosificación en nuestro material. Cabían dos posibilidades principales, primera, que la colchicina y la vinblastina difundieran libremente por todo el volumen del huevo (embrión, saco vitelino, amnios, alantoides, albúmina) estableciendo uniones reversibles y alcanzando una distribución más o menos uniforme y segunda, que dichos compuestos difundieran únicamente por el embrión o se concentraran en él por unión irreversible a receptores celulares. En el primer caso la dosis debería calcularse en relación al peso del huevo, en el segundo caso en relación al peso del embrión.

Realizamos unas pruebas con la colchicina y con la vinblastina en huevos de 8, 9 y 10 días, inyectando dosis de 2 a 600 microgramos, siendo el volumen inyectado invariante (1 ml). Se incluyeron controles inyectados en las mismas condiciones con 1 ml de agua destilada estéril. Las dosis superiores a los 50 microgramos eran letales en el 100 % de los casos. Ello significaba que la hipótesis de la distribución uniforme era falsa ya que para huevos de aproximadamente 60 gramos, las dosis de 600 a 50 microgramos por huevo equivaldrían a dosis de 10 a 0,8 microgramos por gramo, es decir, dentro del rango de dosis utilizadas en otros sistemas.

Calculando la dosis en función del peso del embrión para el caso del embrión de 10 días, por ejemplo, encontramos que una dosis de 20 microgramos correspondía a 7,1 microgramos por gramo de peso corporal, la de 15 microgramos a 5,3 y la de 10 a 3,5. Hicimos un estudio de la toxicidad y de la relación dosis - efecto para la colchicina y la vinblastina y comprobamos que dentro de estos niveles se encontraban las dosis óptimas. Esto indicaba que la segunda posibilidad era la correcta, concordando con los resultados de Bouck y Green (1974), que en el unicelular Ochromonas, in vivo, encuentran que la colchicina se une irreversiblemente a receptores celulares.

Una vez establecidos aproximadamente los niveles de dosificación adecuados,

realizamos un estudio de optimización más detallado para la colchicina y la vinblastina en embriones de 10 y 14 días, incluyendo controles con agua destilada.

Los efectos tóxicos de la colchicina y la vinblastina se manifestaban por congestión visceral, especialmente en el hígado donde los capilares sinusoides aparecían más o menos dilatados. En el caso extremo, el embrión estaba muerto con el corazón parado en sístole y las vísceras muy congestivas. En la Tabla 6 se presentan los resultados del estudio de toxicidad de la colchicina en huevos de 7, 10, 14 y 17 días de incubación y en la Tabla 7 el estudio correspondiente con Vinblastina y en huevos de 10 y 14 días. En ambas tablas se dan para cada edad, dosis y tiempo de tratamiento el número de embriones con lesiones tóxicas del tipo mencionado en relación al número total de embriones tratados. Todos los controles con agua destilada tenían un aspecto normal.

Las dosis a partir de las cuales empiezan a observarse efectos tóxicos dependen de la edad del embrión, pero no de una forma simple. Así, para la colchicina (Tabla 6), comparando los huevos tratados durante 6 horas, los efectos tóxicos se producen en los embriones de 7 días a partir de 1-2 microgramos, en los de 10 días a partir de 15 microgramos y en los de 14 y 17 días a partir de los 10 microgramos. El efecto depende de otros factores además del peso del embrión (velocidad de absorción, por ejemplo).

En el caso de la vinblastina (Tabla 7) se empiezan a observar efectos tóxicos en embriones de 10 días, a partir de los 10 microgramos, mientras que en embriones de 14 días, dosis de hasta 12 microgramos no producen efectos tóxicos detectables por simple inspección.

La relación entre la dosis de colchicina y el efecto bloqueante sobre la mitosis fué estudiado en huevos de 10 días de incubación según se resume en la Tabla 8.

El aumento de la dosis de colchicina de 10 a 15 microgramos aumenta el MI de 0,022 a 0,043, pero a partir de 15 microgramos, el aumento de la dosis no incrementa el efecto (el MI correspondiente a 22,5 microgramos

no es significativamente distinto). El efecto bloqueante no es completo a 20 microgramos, ya que a esta dosis se observan anafases y además el MI máximo alcanzable con la colchicina para un determinado período de acumulación era inferior al valor correspondiente utilizando vinblastina. Resultaba claro de los estudios de dosificación realizados que la colchicina no podía ser utilizada en el embrión de 10 días para la medida de la constante de proliferación, debido a su excesiva toxicidad o, más exactamente, a su baja relación del efecto bloqueante de la mitosis con respecto a los efectos tóxicos generales. Decidimos, por tanto, utilizar la vinblastina.

La medida definitiva de la constante de proliferación del parénquima hepático se realizó en embriones de 10 días y en embriones de 14 días, inyectando en ambos casos 10 microgramos de vinblastina. Esta dosis bloquea completamente la mitosis en ambas edades, ya que las anafases fueron observadas solo muy raramente en alguna preparación. La ausencia de toxicidad de esta dosis para el embrión de 14 días (Tabla 7) permite suponer que las medidas de la constante de proliferación en estas condiciones deberían aproximarse mucho a la realidad. En el caso del embrión de 10 días, la dosis de 10 microgramos estaba en el límite de toxicidad y las medidas de MI se hicieron descartando los embriones con efectos tóxicos más acusados.

La medida del MI se hizo a dos tiempos distintos después de la inyección del bloqueante (a las 3 y 4,5 horas en los embriones de 10 días y a las 4 y 6 horas en los embriones de 14 días) y se midió la diferencia de MI entre ambos tiempos. Utilizamos un intervalo de medida relativamente alejado del tiempo de inyección, para asegurar la absorción del bloqueante y evitar el período de latencia inicial en el que no existe acumulación mitótica (véase 2.1.3.4). Aplicando las relaciones (68) y (69), calculamos la constante de proliferación (PK), la duración media del ciclo celular (GT) para las dos edades (10 y 14 días) y además, a partir del MI basal en cada edad y el GT correspondiente, calculamos la duración de la mitosis (MT) utilizando la expresión (70). Esta expresión

permitió calcular los valores de PK y GT de otras edades embrionarias (entre 5 y 20 días del desarrollo) a partir de sus respectivos MI basales y del valor invariante de MT determinado en los embriones de 10 y de 14 días.

TABLA 6

Toxicidad de la colchicina sobre el embrión de pollo (véase texto)

<u>Edad (días)</u>	<u>Dosis (microgramos)</u>	<u>Tiempo (horas)</u>	<u>Embriones tox/total</u>
7	0,4	6	0/3
7	0,6	6	0/3
7	0,8	6	1/3
7	1,0	6	0/4
7	2,0	6	2/2
7	3,0	6	2/2
7	4,0	6	2/2
10	5,0	6	0/3
10	10,0	6	0/3
10	15,0	6	0/9
10	20,0	6	4/16
10	22,5	6	1/3
10	25,0	6	1/3
10	30,0	6	2/2
14	8,0	6	0/2
14	10,0	6	0/2
14	11,0	6	1/2
14	12,5	6	2/2
14	15,0	6	2/3
14	17,5	6	6/6
14	20,0	6	2/3
17	2,5	6	0/3
17	5,0	6	0/3
17	10,0	6	1/3
17	12,5	6	3/5
17	15,0	6	3/3
17	17,5	6	3/3

TABLA 7

Toxicidad de la vinblastina sobre el embrión de pollo (véase texto)

<u>Edad (días)</u>	<u>Dosis (microgramos)</u>	<u>Tiempo (horas)</u>	<u>Embriones tox/total</u>
10	2,5	6	0/3
10	5,0	4	0/2
10	5,0	6	0/3
10	7,0	6	0/4
10	8,0	6	0/4
10	9,0	6	0/4
10	10,0	3	6/9
10	10,0	4	1/2
10	10,0	4,5	4/10
10	10,0	6	8/19
10	11,0	6	0/3
10	12,0	6	0/4
10	15,0	6	4/4
10	20,0	6	4/4
10	30,0	6	4/4
14	2,0	4	0/1
14	2,0	6	0/3
14	4,0	4	0/2
14	4,0	6	0/2
14	5,0	6	0/4
14	6,0	4	0/2
14	6,0	6	0/7
14	7,0	6	0/4
14	9,0	6	0/4
14	10,0	4	0/4
14	10,0	6	0/4
14	11,0	6	0/3
14	12,0	6	0/4

TABLA 8

Dosis de colchicina e índice mitótico (MI) a las 6 horas, en parénquima hepático de embrión de pollo de 10 días (véase texto)

<u>Número de embriones</u>	<u>Dosis (microgramos)</u>	<u>MI</u>	<u>Desviación típica</u>
12	0	0,011	0,003
3	10,0	0,022	0,002
10	15,0	0,043	0,014
21	20,0	0,043	0,017
5	22,5	0,050	0,022
3	25,0	0,044	0,002
2	40,0	0,043	0,003

3.3.3. Incorporación de timidina tritiada al DNA

Si bien en nuestro sistema no es posible la aplicación del método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM) debido a la imposibilidad de realizar un tratamiento puntual con el trazador (pulsación), según hemos explicado en 2.6.2, sí puede realizarse la incorporación continua de la timidina tritiada.

Medir el incremento porcentual de trazador radiactivo incorporado al DNA hepático en un intervalo determinado significa medir la entrada de las células hepáticas en la fase S del ciclo, de la misma manera que el bloqueo mitótico mide la entrada de las células en la mitosis. Sin embargo, la incorporación de timidina tritiada medida en cuentas por minuto/ /DNA depende también de la progresión a través del intervalo S y de la actividad timidinquinasa necesaria para la incorporación del precursor, es decir, se trata de un dato compuesto a partir del cual no puede deducirse simplemente la constante de proliferación, aunque evidentemente está relacionado con ella.

Los experimentos de incorporación de timidina tritiada se realizaron en embriones de 10 y 14 días, de acuerdo con la siguiente técnica :

- 1- Inyección de 1 ml de una solución de timidina tritiada de una actividad

de 3 microCi/ml (6-³H-timidina, A = 2 Ci/mM, The Radiochemical Centre - Amersham) en la cámara de aire del huevo. Las condiciones de inyección fueron las mismas que las descritas para los bloqueantes mitóticos.

- 2- A las 3 y a las 4 horas se sacaron huevos para la medida de la incorporación del trazador al DNA hepático. En el caso de los embriones de 10 días se utilizaron 6 hígados para cada medida y en el caso de los de 14 días 4.
- 3- Homogenización en un homogenizador coaxial añadiendo 1 ml de agua destilada. El homogenizado se vierte en un tubo con tapón roscado y se le añade 1 ml de agua de lavado del homogenizador y 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. Se centrifuga a 2.800 g durante 15 minutos. Los 5 ml de sobrenadante contienen la fracción soluble (FS) de la timidina tritiada y el precipitado la fracción incorporada al DNA.
- 4- Se toman 0,1 ml del sobrenadante y se añaden a 5 ml de líquido de centelleo para la medida de la radiactividad.
- 5- Se procesa el precipitado igual que en la técnica de extracción de Schneider (1957) descrita en 3.2.1.
- 6- Obtenidos los 3 ml de extracto en TCA al 5 % caliente (paso 9 de la técnica 3.2.1) se toman 0,1 ml para la medida de la radiactividad siguiendo el mismo procedimiento que para la fracción soluble y 1 ml para la medida de la cantidad de DNA según los pasos 10 a 14 de la técnica 3.2.1.
- 7- Cálculos :

Las medidas de radiactividad en cuentas por minuto (cpm) se corrigieron para un fondo de 36 cpm.

Teniendo en cuenta el volumen total (VT) y el volumen utilizado en cada medición (VU), las lecturas deben corregirse multiplicando

por :

<u>Medición</u>	<u>VU</u>	<u>VT</u>	<u>Factor</u>
cpm-DNA	0,1 ml	3 ml	x 30
DNA (microg dR/ml)	1,0 ml	3 ml	x 3
cpm-FS	0,1 ml	5 ml	x 50

La actividad específica (AE) se corrige de acuerdo con la actividad de la fracción soluble (FS) :

$$AE = \frac{\text{cpm-DNA} \times 30}{\text{DNA} \times 3 \times \text{cpm-FS} \times 50}$$

El incremento de incorporación por hora entre las 3 y las 4 horas se expresa en forma de incremento porcentual por hora, calculado por la diferencia entre los logaritmos naturales de las dos actividades específicas :

$$\ln AE (4h) - \ln AE (3h)$$

3.3.4. Coincidencia mitótica

El método de la coincidencia mitótica es original nuestro y fué ideado para la medida del grado de sincronía de ciclo celular entre células hermanas.

El modelo de probabilidad de transición del ciclo celular (Smith y Martin 1973), según se ha explicado con detalle en 2.3.3, supone la existencia de una discontinuidad en el intervalo G_1 , que es salvada con una cinética de primer orden. Los pares de células hermanas, es decir, originadas en la misma división perderían la sincronía inicial al pasar por la discontinuidad y esta sería la única fuente de variación de la duración del ciclo celular (GT) entre células hermanas, de modo que la distribución acumulativa de diferencias de GT entre hermanas (curvas beta, véase 2.3.3) debería ser exponencial.

El carácter exponencial de las curvas beta había sido demostrado repetidamente en cultivos celulares (Minor y Smith 1974, Smith y Martin 1974 y Shields 1977). La construcción de una curva beta se hace a partir de medidas individuales de GT en células hermanas por medio de la cinematografía a intervalos ("time - lapse") sobre cultivos en monocapa. Esta aproximación es inviable in vivo en el seno de un tejido pluricelular tridimensional.

El indudable interés de probar la aplicabilidad del modelo de probabilidad de transición en un organismo pluricelular in vivo y concretamente

a nuestro sistema, el hígado embrionario de pollo, nos estimuló a desarrollar un método que permitiera medir la pérdida de sincronía de los pares de células hermanas a lo largo de su primer ciclo.

La coincidencia mitótica de células vecinas es un parámetro citocinético relacionado con el grado de sincronía entre células hermanas. Cuando una célula se divide las dos células hijas permanecen en general adyacentes. Esto puede admitirse en tejidos "sólidos" (epiteliales), donde las células se hallan firmemente unidas por complejos de unión y no pueden moverse libremente. En el parénquima hepático de mamífero los complejos de unión se encuentran cerca del canalículo biliar formado por los hepatocitos (Rhodin 1974) y lo mismo ocurre en el hígado de embrión de pollo (véase Fig. 82). Por tanto, si las células hermanas son vecinas, el grado de sincronía entre hermanas debe repercutir en la proporción de células vecinas que están en mitosis al mismo tiempo, es decir, en la proporción de pares de mitosis en los cortes histológicos.

Definimos coincidencia mitótica M_{co} como la probabilidad de que una célula adyacente a una célula mitótica dada se halle también en mitosis. Este parámetro puede calcularse de la forma

$$M_{co} = N_v \cdot (1 - s) \cdot MI + N_v \cdot s \cdot SP_{co}(MT) \quad (71)$$

donde :

- M_{co} es la proporción de mitosis asociadas en pares en el corte histológico.
- N_v es el número medio de células vecinas o adyacentes a cualquier célula en la sección histológica bidimensional (número de núcleos que rodean a cada núcleo).
- s es la probabilidad de que una célula sea la hermana de una célula adyacente dada (calculada como 1 dividido por el número de células vecinas en el tejido tridimensional).
- MI es el índice mitótico
- SP_{co} es la fracción de pares de hermanas que coinciden en la mitosis de duración MT en un instante.

La expresión (71) corresponde a la coincidencia mitótica simple, cuyo valor puede suponerse muy bajo a menos que la sincronía fuera muy buena, ya que exige que los miembros del par coincidentes tengan un desfase inferior a la duración de la mitosis (MT), lo cual significa menos de una hora. Por ello, resulta más conveniente medir la coincidencia mitótica después de un tiempo de bloqueo mitótico de duración MBT, con lo cual la expresión (71) se convierte en

$$M_{co}(MBT) = N_v \cdot (1-s) \cdot MI(MBT) + N_v \cdot s \cdot SP_{co}(MBT) \quad (72)$$

donde :

- MI(MBT) es el índice mitótico después de un bloqueo de duración MBT.
- SP_{co}(MBT) es la fracción de pares de hermanas que coinciden en la mitosis después de un bloqueo mitótico de duración MBT.

El primer término del segundo miembro en las ecuaciones (71) y (72) es la probabilidad de encontrar una célula mitótica entre las vecinas no hermanas de la célula mitótica de referencia. El segundo término es la correspondiente probabilidad para la célula hermana de la célula de referencia.

La proporción de pares de hermanas que coinciden en la mitosis de duración MT es

$$SP_{co}(MT) = \int_0^{MT} SP_{co}(t) \cdot SP_D(t) \cdot dt \quad (73)$$

Esto es, la integral definida entre 0 y MT del producto de dos funciones de probabilidad :

- La función SP_{co}(t) es la probabilidad de coincidencia en función del tiempo de desfase y
- La función SP_D(t) es la distribución de probabilidad de desfases entre células hermanas que debe ser supuesta de acuerdo con un determinado modelo del ciclo celular.

En el caso de un bloqueo mitótico de duración MBT, la expresión (73)

se convierte en

$$SP_{co} (MBT) = \int_0^{MBT} SP_{co} (t) \cdot SP_D (t) \cdot dt \quad (74)$$

La probabilidad de coincidencia en función del desfase es una función lineal :

$$SP_{co} (t) = 1 - \frac{t}{MT} \quad (75)$$

donde $0 \leq t \leq MT$

O bien,

$$SP_{co} (t) = 1 - \frac{t}{MBT} \quad (76)$$

donde $0 \leq t \leq MBT$

En la figura 16 se representa dicha función. Cuando el desfase es mayor que la duración de la mitosis o del bloqueo mitótico, la función vale 0 y cuando no hay desfase la función vale 1, existiendo entre ambas situaciones todos los valores de probabilidad.

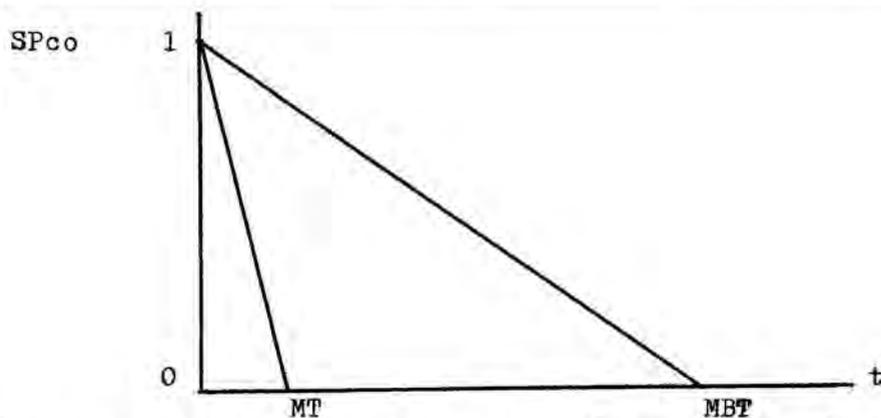


Figura 16 : Probabilidad de coincidencia mitótica en función del desfase $SP_{co} (t)$. El tiempo de bloqueo mitótico (MBT) se ha tomado arbitrariamente igual a 6 veces la duración normal de la mitosis (MT).

Si el desfase entre dos células es inferior a MT o MBT , las células coincidirán durante un intervalo tanto mayor cuanto menor sea el desfase. En la figuras 17 y 18 se representa este concepto para la coincidencia mitótica simple y para la coincidencia después de un período de bloqueo respectivamente. Lo que en realidad significan las expresiones (75) y (76) es la probabilidad de encontrar simultáneamente en mitosis al par de células en el instante de nuestra observación. La introducción de esta función de probabilidad se hace necesaria ya que la preparación histológica no es solamente una sección en el espacio sino también en el tiempo.

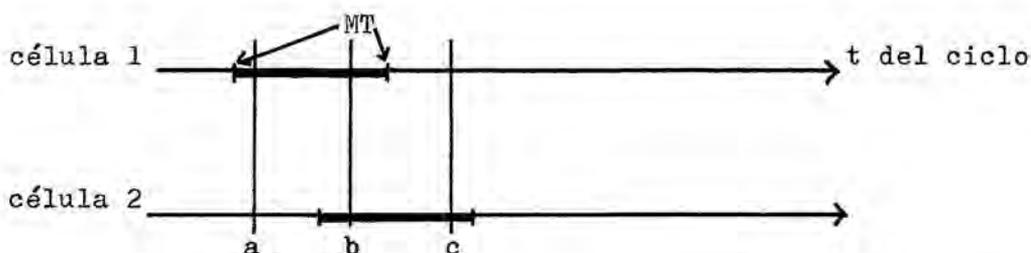


Figura 17 : Superposición de los "segmentos mitóticos" de las células 1 y 2. MT es la duración de la mitosis. a , b , y c representan tres tiempos de observación, únicamente hay coincidencia en b . La probabilidad de coincidencia disminuye con el desfase.

La función de probabilidad de desfases entre células hermanas : $SP_D(t)$, según el modelo de probabilidad de transición se obtiene derivando la función acumulativa

$$SP_{c_0} = 1 - \beta(t) \equiv 1 - e^{-k \cdot t} \quad (77)$$

donde :

- SP_{c_0} es la proporción de pares de hermanas cuyo desfase es igual o inferior a t .
- $\beta(t)$ es la proporción de pares de hermanas cuyo desfase es igual o mayor a t (véase 2.3.3) y

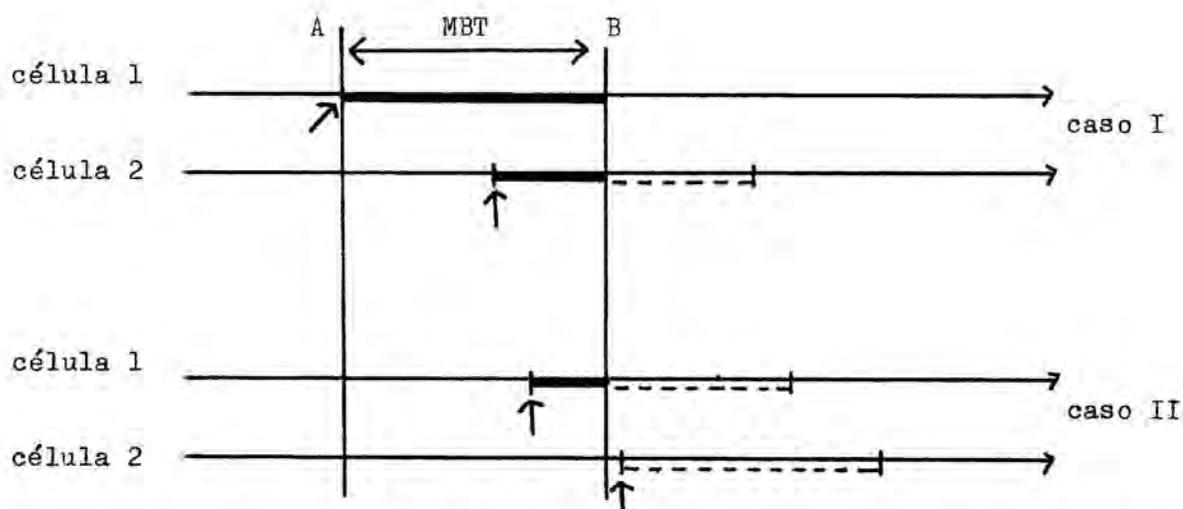


Figura 18 : Superposición de segmentos mitóticos en condiciones de bloqueo mitótico. MBT es la duración del bloqueo, que se inicia en A y termina en B (momento de la observación). Aunque el desfase entre la célula 1 y la célula 2 es inferior a MBT en ambos casos, únicamente se encuentran en coincidencia en el momento de la observación en el caso I. La iniciación de las mitosis se señala con flechas. Las líneas discontinuas hasta completar un MBT más allá del tiempo de observación se han trazado para remarcar la similitud formal con la coincidencia mitótica simple (Fig. 17).

- k es la constante de transición del estado A a la fase B (véase 2.3.3), es decir, la constante de velocidad con que las células salvan la discontinuidad del ciclo según el modelo de probabilidad de transición.

Derivando la expresión (77) se obtiene la correspondiente distribución de probabilidad de desfases :

$$SP_D(t) = \frac{d}{dt} (1 - e^{-k \cdot t}) = k \cdot e^{-k \cdot t} \quad (78)$$

Substituyendo en la expresión (73) las funciones (75) y (78) :

$$SP_{Co}(MT) = \int_0^{MT} \left(1 - \frac{t}{MT}\right) \cdot k \cdot e^{-k \cdot t} \cdot dt \quad (79)$$

que operando se convierte en

$$SP_{co}(MT) = \int_0^{MT} k \cdot e^{-k \cdot t} \cdot dt - \frac{1}{MT} \cdot \int_0^{MT} t \cdot k \cdot e^{-k \cdot t} \cdot dt \quad (80)$$

donde el primer término del segundo miembro es una integral inmediata :

$$\int_0^{MT} k \cdot e^{-k \cdot t} \cdot dt = \left[e^{-k \cdot t} \right]_0^{MT} \quad (81)$$

y el segundo término puede resolverse mediante una integración por partes, resultando :

$$- \frac{1}{MT} \cdot \int_0^{MT} t \cdot k \cdot e^{-k \cdot t} \cdot dt = \frac{1}{MT} \cdot \left[t \cdot e^{-k \cdot t} + \frac{1}{k} \cdot e^{-k \cdot t} \right]_0^{MT} \quad (82)$$

Substituyendo (81) y (82) en (80) y sumando, obtenemos :

$$SP_{co}(MT) = 1 - \frac{1 - e^{-k \cdot MT}}{k \cdot MT} \quad (83)$$

que en situación de bloqueo mitótico sería

$$SP_{co}(MBT) = 1 - \frac{1 - e^{-k \cdot MBT}}{k \cdot MBT} \quad (84)$$

Las expresiones (83) y (84) pueden compararse con la expresión de Domingo et al. (1978) :

$$SP_{co}(t) = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (85)$$

donde t puede ser MT o MBT . Esta expresión no es exacta y debe considerarse únicamente como una primera aproximación, ya que no tiene en cuenta la probabilidad de coincidencia en función del desfase, es decir, se basa únicamente en la distribución de probabilidad de desfases y asume que $SP_{co}(t) = 1$, para todos los valores de t inferiores a MT o a MBT . Según hemos razonado anteriormente, si los segmentos mitóticos

(Fig. 17 y 18) de dos células se hallan solo parcialmente superpuestos (desfase inferior a MT o a MBT) la probabilidad de observar la coincidencia es inferior a la unidad.

La aplicación del método de la coincidencia mitótica al parénquima hepático de embrión de pollo se realizó utilizandolas preparaciones correspondientes a embriones de 10 y 14 días a los que se había inyectado 10 microgramos de vinblastina a través de la cámara de aire (véase el apartado 3.3.2). Los tiempos de bloqueo en este caso fueron de 4,5 horas para el embrión de 10 días y de 6 horas para el de 14.

La coincidencia mitótica (proporción de mitosis asociadas en pares adyacentes) fué medida en las preparaciones de los distintos embriones de cada edad y el valor medio obtenido se comparó con el calculado utilizando la expresión (84). Para dicho cálculo es necesario determinar previamente los parámetros N_v y s , que se realizó directamente observando nuestras preparaciones, y la constante de transición k , esto último puede hacerse a partir de la constante de proliferación PK y de la duración de la fase B del ciclo celular T_B utilizando la expresión (10) de Smith y Martin (1973) :

$$k = \frac{PK \cdot e^{PK \cdot T_B}}{2 - e^{PK \cdot T_B}} \quad (86)$$

La PK fué medida por el método de la acumulación mitótica según se ha expuesto previamente (véase parte 3.3.2).

Ya que nuestro sistema no permite la aplicación del método de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM) que hubiera proporcionado una estimación directa de T_B (véase parte 3.3.2), tomamos como T_B el valor de GT más corto determinado en nuestra población, que correspondía al embrión de 5 días. Con ello seguimos el criterio que define a T_B como el tiempo entre el principio de la primera onda y el principio de la segunda en la curva FLM (Smith y Martin 1973), esto es, el ciclo celular mínimo que corresponde al de las células que no se detienen en el estado A, siendo la duración de su ciclo equivalente a la fase B.

Tomar T_B como aproximadamente igual al ciclo celular mínimo observado (GT del embrión de 5 días) significa suponer que todo el alargamiento de GT durante el desarrollo es debido únicamente a la disminución de la constante de transición, es decir al tiempo de residencia medio en el estado A. En las partes 2.2 y 2.3 hemos discutido las evidencias experimentales sobre la variabilidad del intervalo G_1 y la relativa constancia de los demás intervalos del ciclo, que constituyen esencialmente la fase B del modelo de probabilidad de transición (Smith y Martin 1973 y 1974).

El método de la coincidencia mitótica permite, por tanto, poner a prueba in vivo el modelo de probabilidad de transición y, en general, cualquier modelo del ciclo celular que realice una predicción sobre la distribución de probabilidad de desfases entre los ciclos de células hermanas. En todo caso, es una medida de la variabilidad del ciclo celular entre células hermanas.

3.4. Estudios estructurales

3.4.1. Preparación del material para microscopía electrónica

El hígado embrionario fué aislado con las mismas precauciones indicadas en la preparación para microscopía óptica (3.3.1), cortado en dos o más fragmentos según su tamaño y transferido rápidamente al fijador.

La fijación se efectuaba con glutaraldehído al 2 % en tampón cacodilato 0,15 M pH 7,4 , a 4 °C durante 1 hora. Después la muestra era cortada en fragmentos de menos de 0,5 mm de diámetro máximo y se realizaban tres lavados con sacarosa 0,25 M en tampón cacodilato 0,15 M , siendo la duración de cada lavado de 5 minutos.

La postfijación ósmica se realizó mediante la solución cromo-ósmica de Dalton (Hayat 1970), durante 2 horas a temperatura ambiente. La composición del fijador es la siguiente :

dicromato potásico al 4 %	pH 7,2	10 ml
cloruro sódico al 3,4 %		10 ml
tetraóxido de osmio al 2 %		20 ml

El PH de la solución de dicromato potásico se ajusta con hidróxido potásico 2,5 N.

Para el proceso de deshidratación -inclusión se utilizó la siguiente pauta :

- 1- acetona al 40 % conteniendo acetato de uranilo a saturación durante unas 12 horas (toda la noche). El tratamiento con acetato de uranilo antes de la deshidratación aumenta el contraste y la estabilización de las estructuras (Hayat 1970).
- 2- acetona al 70 % durante 15 minutos.
- 3- acetona al 90 % durante 15 minutos.
- 4- acetona al 100 % durante 15 minutos.
- 5- acetona al 100 % durante 15 minutos.
- 6- inclusión.

El medio de inclusión utilizado fué la resina epoxi araldita comercializada

por FLUKA con el nombre de DURKUPAN ACM FLUKA. Consiste en cuatro componentes :

- A/M resina epoxi
- B endurecedor
- C acelerador
- D plastificante (ftalato de butilo)

con los que se preparan dos medios de inclusión :

- medio I : A/M 10 ml, B 10 ml, y D 0,2 ml
- medio II : A/M 10 ml, B 10 ml, D 0,2 ml y C 0,4 ml

La pauta de inclusión es la siguiente :

- 6- acetona 100 % 3 vol / medio I 1 vol (1 hora)
- 7- acetona 100 % 1 vol / medio I 1 vol (1 hora)
- 8- acetona 100 % 1 vol / medio I 3 vol (1 hora)
- 9- medio I a 50 °C (1 hora)
- 10- medio I a 50 °C (1 hora)
- 11- medio II a 50 °C (15 minutos)
- 12- medio II a 50 °C (15 minutos)
- 13- colocación de los fragmentos en los moldes con medio II y dejar a 50 °C durante 24 horas o más para el endurecimiento de los bloques.

Mediante un ultramicrotomo Reichert modelo Om U3 se obtuvieron cortes ultrafinos de alrededor de 900 Å de espesor. El espesor se mide por el color de interferencia del corte, los cortes obtenidos eran entre plateados y dorados.

Una vez montados en rejillas de cobre, los cortes eran contrastados con citrato de plomo según Reynolds (Hayat 1970).

nitrate de plomo	1,33 g
citrato sódico	1,76 g
agua destilada hervida	30 ml

La mezcla debe agitarse vigorosamente a intervalos de 30 minutos para conseguir la conversión completa del nitrate de plomo en citrate de plomo, cuando esto ocurre la mezcla aparece como una suspensión lechosa.



Entonces se añaden 8 ml de hidróxido sódico 1 N, se diluye hasta 50 ml y se mezcla por inversión hasta la completa disolución del citrato de plomo (aclaramiento completo).

El procedimiento de contraste consiste en colocar la rejilla invertida sobre una gota de la solución de citrato de plomo de modo que los cortes contacten con la superficie de la misma, durante 20 minutos. Esta operación se lleva a cabo dentro de una cápsula de Petri tapada y llena de lentejas de hidróxido sódico para mantener una atmósfera libre de CO_2 que precipitaría el plomo en forma de carbonato. Las gotas de la solución se depositan encima de una superficie de parafina. Una vez realizado el contraste, los cortes son lavados en agua destilada, sujetando la rejilla con la pinza y moviéndola dentro de un pocillo.

Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Hitachi modelo HU-12, trabajando de 2.500 a 45.000 aumentos.

3.4.2. Morfometría

El estudio morfométrico del parénquima hepático del embrión de pollo se realizó entre los días 5 a 20 del desarrollo a dos niveles principales :

a- nivel de microscopía óptica (780 aumentos) : Medida de la fracción de volumen hepático ocupado por el parénquima (hepatocitos).

b- nivel de microscopía electrónica

.b 1) de 3.000 a 4.000 aumentos en placa : Medida de la fracción de volumen (V_V) del hepatocito correspondiente al núcleo.

.b 2) de 7.000 a 13.000 aumentos en placa : Medida de la fracción de volumen (V_V) del núcleo correspondiente al nucléolo y del citoplasma correspondiente a mitocondrias y a inclusiones lipídicas.

.Todas las secciones nucleares de las placas de 3.000 aumentos , que corresponden a vistas panorámicas con secciones nucleares al azar, fueron utilizadas para la medida absoluta del volumen nuclear medio de los hepatocitos en cada edad, lo cual ha permitido convertir las medidas relativas de b1 y b2 en absolutas.

La medición de las fracciones o densidades de volumen (V_V) se realizó por medio de las fracciones de área de sección (A_A), ya que, según el principio de Delesse, la densidad de volumen de una determinada clase de partículas equivale a la fracción de superficie ocupada por las secciones de las partículas en relación al área total de la sección, siempre que la orientación de las partículas sea al azar con respecto al plano de sección y que el número de secciones sea suficientemente grande (véase Weibel 1969 y Weibel y Bolender 1973).

A su vez, las fracciones de área de sección, por ejemplo la proporción de área de sección nuclear con respecto a la celular, se determinaron por el procedimiento de Glagoleff (véase Weibel 1969 y Weibel y Bolender 1973), consistente en superponer un retículo de puntos, es decir, un conjunto de puntos regular o irregularmente distribuidos en una hoja transparente, sobre la imagen suficientemente ampliada de la sección y contar la fracción de puntos incluidos dentro de los perfiles de sección de una estructura respecto del total (P_P). Así, por ejemplo, el número de puntos incluidos en los perfiles de sección nuclear dividido por el número total de puntos en las secciones celulares mide la fracción de volumen correspondiente al núcleo.

La validez de las relaciones

$$V_V = A_A = P_P \quad (87)$$

ha sido demostrada empírica y racionalmente por diversos autores (véase Weibel 1969 y Weibel y Bolender 1973).

Construimos un retículo con dos clases de puntos, regularmente distribuidos, que podría utilizarse a dos niveles según el tamaño de las áreas de sección. En el primer nivel, los puntos (representados por el entrecruzamiento de una cuadrícula) estaban separados 15 mm y en el segundo nivel, que incluía los puntos anteriores más dos puntos entre cada dos entrecruzamientos, la separación era de 5 mm (Fig. 19).

En el nivel de microscopía óptica el retículo se aplicó directamente

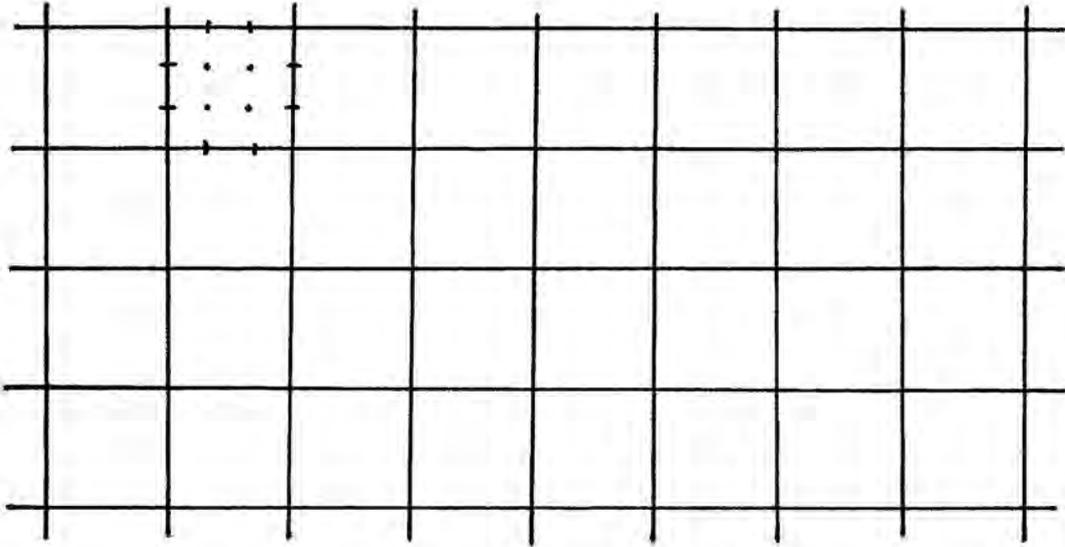


Figura 19 : Retículo de puntos de dos niveles (15 mm y 5 mm de distancia entre puntos) utilizado en la determinación de las densidades de volumen (V_V) a partir de las fracciones de puntos incluidos en las áreas de sección (P_P). (véase texto).

sobre la pantalla de proyección del microscopio (Reichert, modelo Visopan) y en los niveles de microscopía electrónica se utilizaron positivos fotográficos con una ampliación de 1,8 a 2,5 veces con respecto al negativo en placa.

Para la determinación del volumen nuclear medio del hepatocito en las diferentes edades del embrión, utilizamos el método de Lindberg y Vorwerk (1972) que es aplicable a la estimación del volumen de cuerpos elipsoides en conglomerados, a partir de secciones en planos al azar. Este método consiste en medir las áreas de sección de los cuerpos, en nuestro caso de los núcleos, y calcular el área media (a) y la desviación típica (s), que permiten determinar el volumen (V) del cuerpo de acuerdo con la expresión

$$V = \beta \cdot a^{3/2} \quad (88)$$

calculando el coeficiente Beta mediante la siguiente relación :

$$\beta = 1,382 + 3,4 \cdot (s^2/a^2 - 0,2) \quad (89)$$

El error de la medida expresado en forma de coeficiente de variación viene dado por :

$$CV = c(\epsilon) / \sqrt{n} \quad (90)$$

donde n es el número de mediciones y $c(\epsilon)$ es un parámetro relacionado con la excentricidad, que aparece en la tabla del citado trabajo, junto con otros parámetros y el número de mediciones necesario para que el coeficiente de variación sea inferior al 10 %.

La medición de las áreas de sección nuclear se hizo pasando a lápiz sobre papel vegetal los perfiles nucleares, calcándolos directamente de los negativos en placa y midiendo después las áreas con un planímetro polar Kent. Para la determinación del área real a partir del área de la placa, se calibró el microscopio electrónico mediante una red de 2.160 líneas / mm, con lo cual los aumentos aproximados indicados en las placas fueron substituidos por los valores exactos.

4. Resultados

4.1. Contenido de DNA en hígado, corazón y encéfalo, en embriones de 8 a 18 días : Curvas de crecimiento absoluto y relativo entre órganos

La cantidad de DNA se expresa como cantidad de desoxirribosa (en microgramos) determinada según el procedimiento explicado. En la Tabla 9 se expresan los valores obtenidos en embriones de 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 días. En las figuras 20 y 21 se representan las curvas de crecimiento correspondientes en forma aritmética y en forma logarítmica respectivamente. El número de embriones utilizados en cada determinación fué de 15 para los de 8 días, 10 para los de 9 días y 5 para las demás edades.

TABLA 9

Contenido de DNA en hígado, corazón y encéfalo de embrión de pollo. La cantidad de DNA/órgano se expresa en microgramos de desoxirribosa según la técnica explicada en 3.2.1.

<u>Edad del embrión</u>	<u>Hígado</u>	<u>Corazón</u>	<u>Encéfalo</u>
8	23	7	-
9	29	8	92
12	90	27	150
13	107	33	162
14	169	44	202
15	230	62	238
16	312	84	300
17	320	94	311
18	441	126	368

En la figura 21 puede apreciarse que la variación en la velocidad específica de crecimiento de los tres órganos en el período estudiado es poco importante, ya que la representación semilogarítmica es casi lineal para el encéfalo y con una ligera curvatura en los casos del hígado y del corazón.

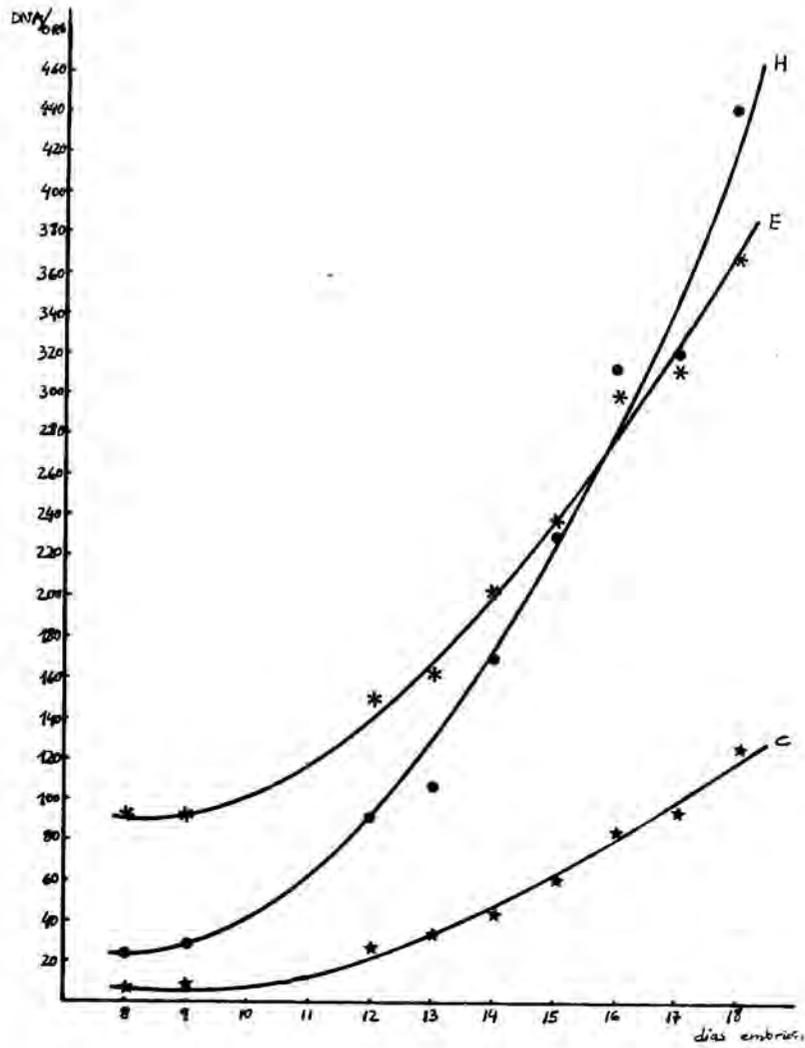


Figura 20 : Curva de crecimiento del hígado (H), corazón (C) y encéfalo (E) de embrión de pollo de 8 a 18 días, representada por el contenido de DNA. (véase texto)

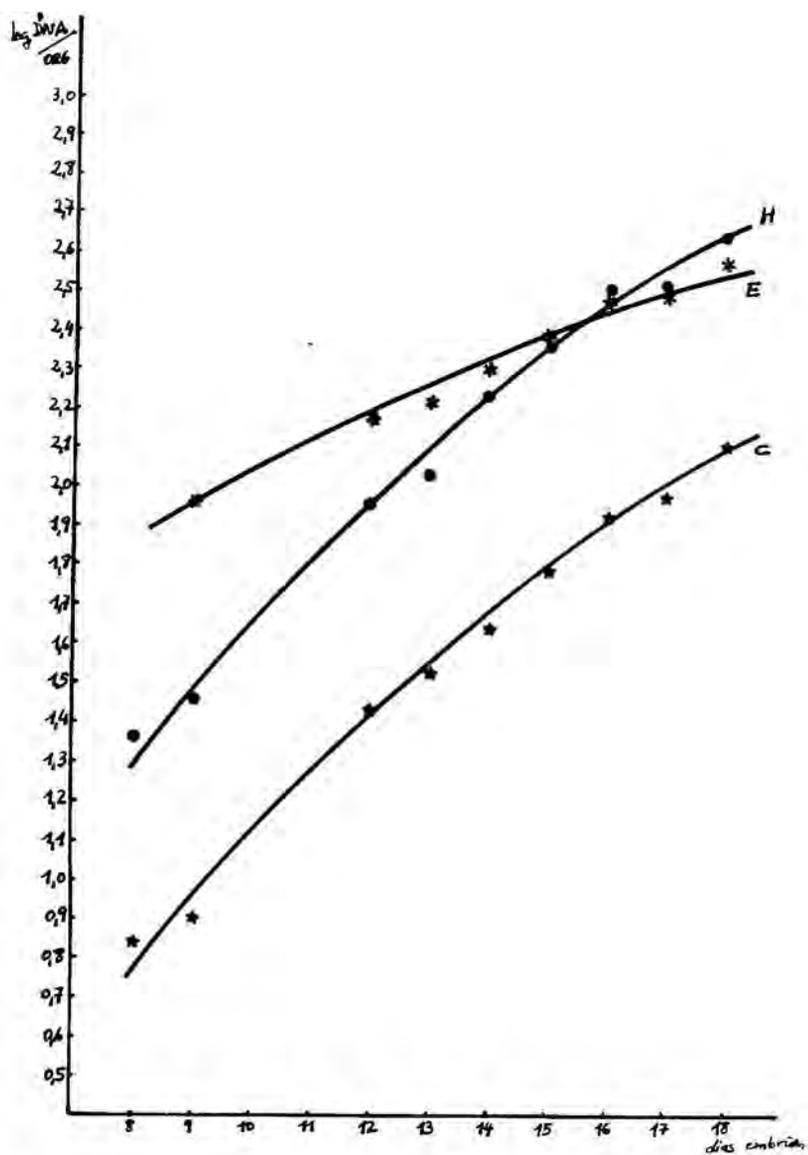


Figura 21 : Curva logarítmica de crecimiento del hígado (H), corazón (C) y encéfalo (E) de embrión de pollo de 8 a 18 días, representada por el logaritmo decimal del contenido de DNA. (véase texto)

La velocidad específica de crecimiento (K) de cada órgano entre los días 9 y 18, calculada como el promedio de los distintos valores :

$$\left(\ln X_2 - \ln X_1 \right) / t$$

siendo X_1 y X_2 las cantidades de DNA de dos determinaciones consecutivas, es

- hígado $K_H = 0,3025 / \text{día} = 0,0126 / \text{hora}$

- corazón $K_C = 0,3064 / \text{d} = 0,0127 / \text{h}$

- encéfalo $K_E = 0,1540 / \text{d} = 0,0064 / \text{h}$

Ya que en poblaciones celulares expansivas, como las embrionarias, la velocidad específica de crecimiento medida como

$$1 / \text{DNA} \times \text{d DNA} / \text{d} t$$

puede suponerse equivalente a la velocidad o constante de proliferación (PK), el período de duplicación correspondiente puede igualarse a la duración media del ciclo celular (GT) en la población durante el intervalo estudiado :

$$GT = DT = \ln 2 / K$$

Los valores de DT o GT calculados son

$$DT_H = GT_H \left(\text{promedio de 9 a 18 d} \right) = 55,01 \text{ h}$$

$$DT_C = GT_C \left(\text{promedio de 9 a 18 d} \right) = 54,58 \text{ h}$$

$$DT_E = GT_E \left(\text{promedio de 9 a 18 d} \right) = 108,30 \text{ h}$$

La variación de la velocidad específica de crecimiento puede apreciarse, no obstante, en los tres casos, comparando la velocidad específica media del período anterior (K_1) y posterior (K_2) al día 14 :

Período 1 : días 9 a 14 (5 días)

Período 2 : días 14 a 18 (4 días)

- hígado $K1_H = 0,3528 / \text{d}$ $K2_H = 0,2397 / \text{d}$

- corazón $K1_C = 0,3412 / \text{d}$ $K2_C = 0,2630 / \text{d}$

- encéfalo $K1_E = 0,1572 / \text{d}$ $K2_E = 0,1500 / \text{d}$

La disminución de la velocidad específica entre los períodos 1 y 2 con respecto a la velocidad específica media del intervalo total (días 9 a 18) es de

37,39 % para el hígado

25,52 % para el corazón

4,67 % para el encéfalo

El crecimiento relativo entre los tres órganos puede evaluarse calculando las proporciones de crecimiento diferencial o constantes alométricas (véase 2.6.1). En la Tabla 10 se dan los valores correspondientes para el intervalo total y para los dos períodos en que lo hemos dividido.

TABLA 10

Constantes alométricas de los crecimientos DNA/órgano (t) correspondientes a hígado, corazón y encéfalo de embrión de pollo

<u>Período (días)</u> :	<u>9 a 14</u>	<u>14 a 18</u>	<u>9 a 18</u>
$K_{HC} = K_H / K_C$	1,0340	0,9114	0,9873
$K_{HE} = K_H / K_E$	2,2443	1,5980	1,9643
$K_{CE} = K_C / K_E$	2,1706	1,7535	1,9896

Según se puede ver en la Tabla 10, la proporción de crecimiento diferencial del hígado con respecto al corazón es prácticamente igual a la unidad entre los días 9 y 18, por esta razón las curvas logarítmicas de crecimiento del hígado y del corazón son casi paralelas (Fig. 21), en cambio, las constantes del hígado y del corazón con respecto al encéfalo son superiores a la unidad.

Al considerar los dos períodos en que se ha dividido el intervalo

estudiado, puede apreciarse una disminución de las tres proporciones de crecimiento diferencial :

K_{HC} disminuye un 12,42 %

K_{HE} disminuye un 32,90 %

K_{CE} disminuye un 20,96 %

En las figuras 22, 23 y 24 se representan las relaciones bilogarítmicas DNA / órgano correspondientes a hígado-corazón, hígado-encéfalo, y corazón-encéfalo durante el intervalo del día 9 al 18 del desarrollo. Los puntos de la figura 22 se han ajustado con una sólo recta para todo el intervalo, ya que entre la primera y segunda partes del mismo, la variación de pendiente es muy pequeña (12,42 %). En las figuras 23 y 24 se ha dibujado la recta de ajuste para cada uno de los períodos (del día 9 al 14 y del día 14 al 18).

De los datos anteriores resulta que las proporciones de crecimiento diferencial entre los tres órganos en el intervalo estudiado no se mantienen invariantes, sino que se modifican, especialmente las proporciones K_{HE} y K_{CE} y, en menor medida, K_{HC} . En el caso del hígado y del corazón, la constante alométrica pasa de mayor a menor que la unidad, es decir, la velocidad específica del hígado en el primer período es algo mayor que la del corazón y en el segundo período ocurre lo contrario. En las relaciones entre hígado y corazón con respecto al encéfalo, las constantes se mantienen en ambos períodos superiores a la unidad, pero disminuyendo claramente del primero al segundo.

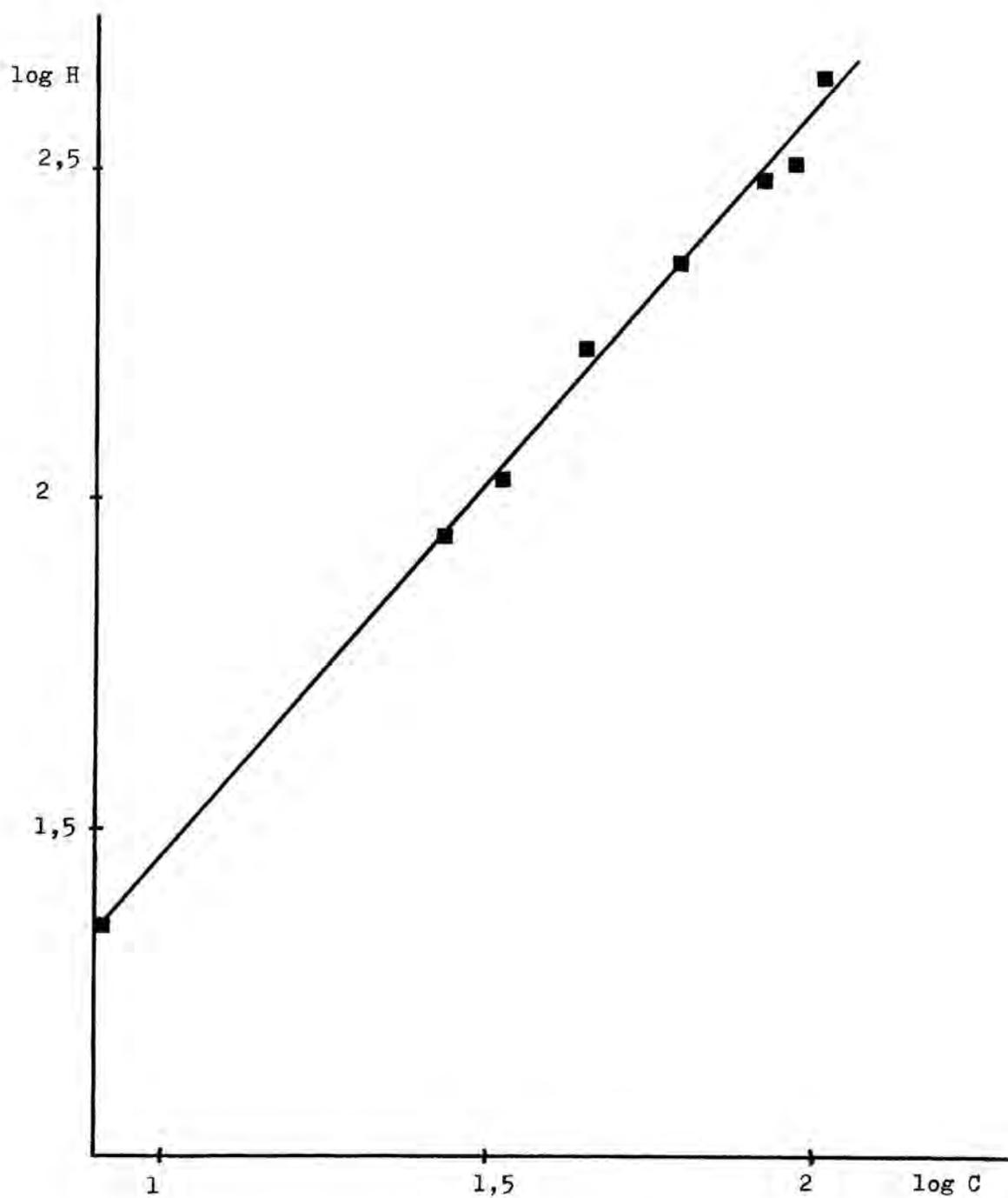


Figura 22 : Crecimiento relativo del hígado (H) con respecto al corazón (C) en embrión de pollo de 9 a 18 días, relación bilogarítmica del contenido de DNA/órgano. (véase texto)

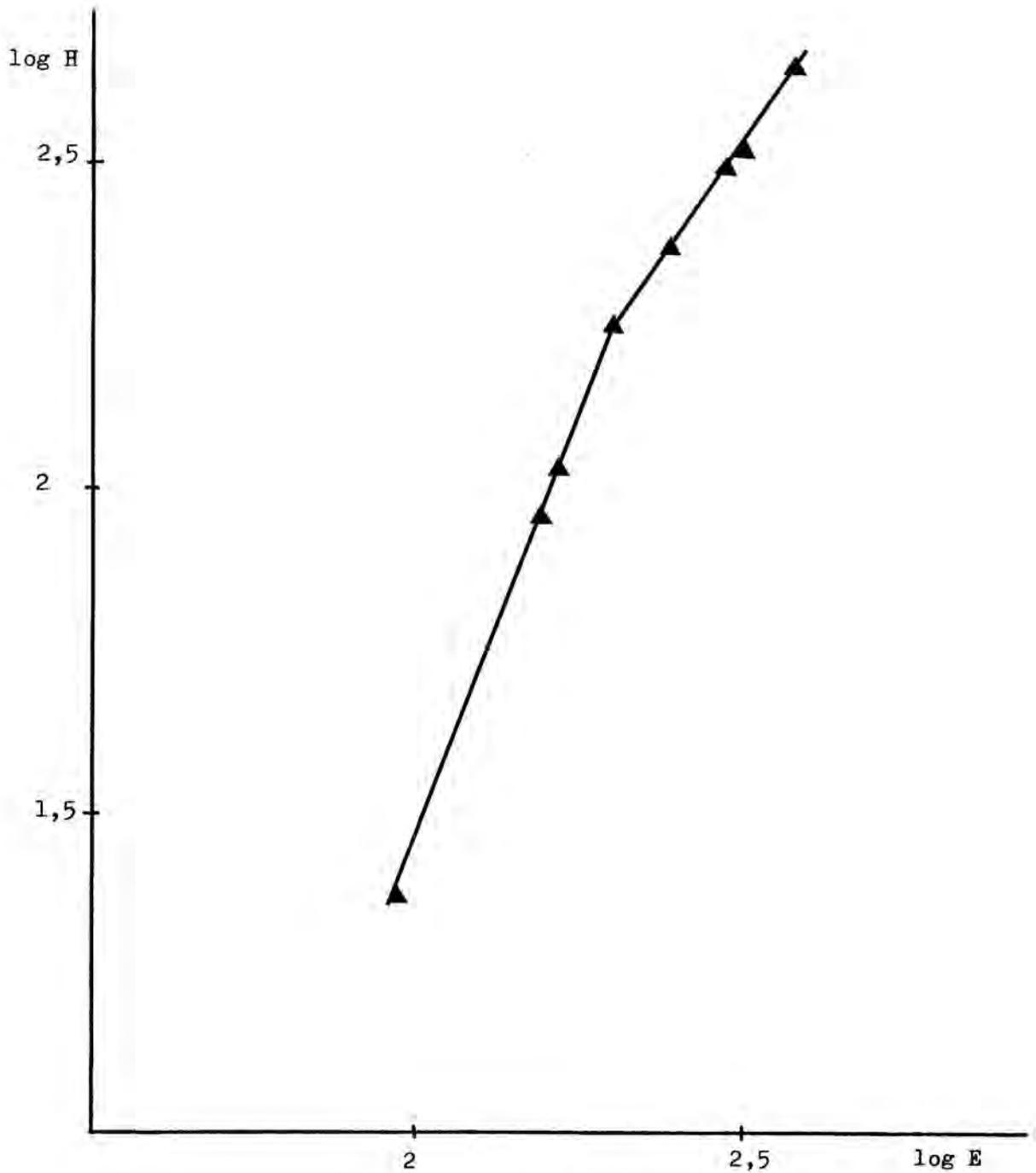


Figura 23 : Crecimiento relativo del hígado (H) con respecto al encéfalo (E) en embrión de pollo de 9 a 18 días, relación bilogarítmica del contenido de DNA/órgano. (véase texto)

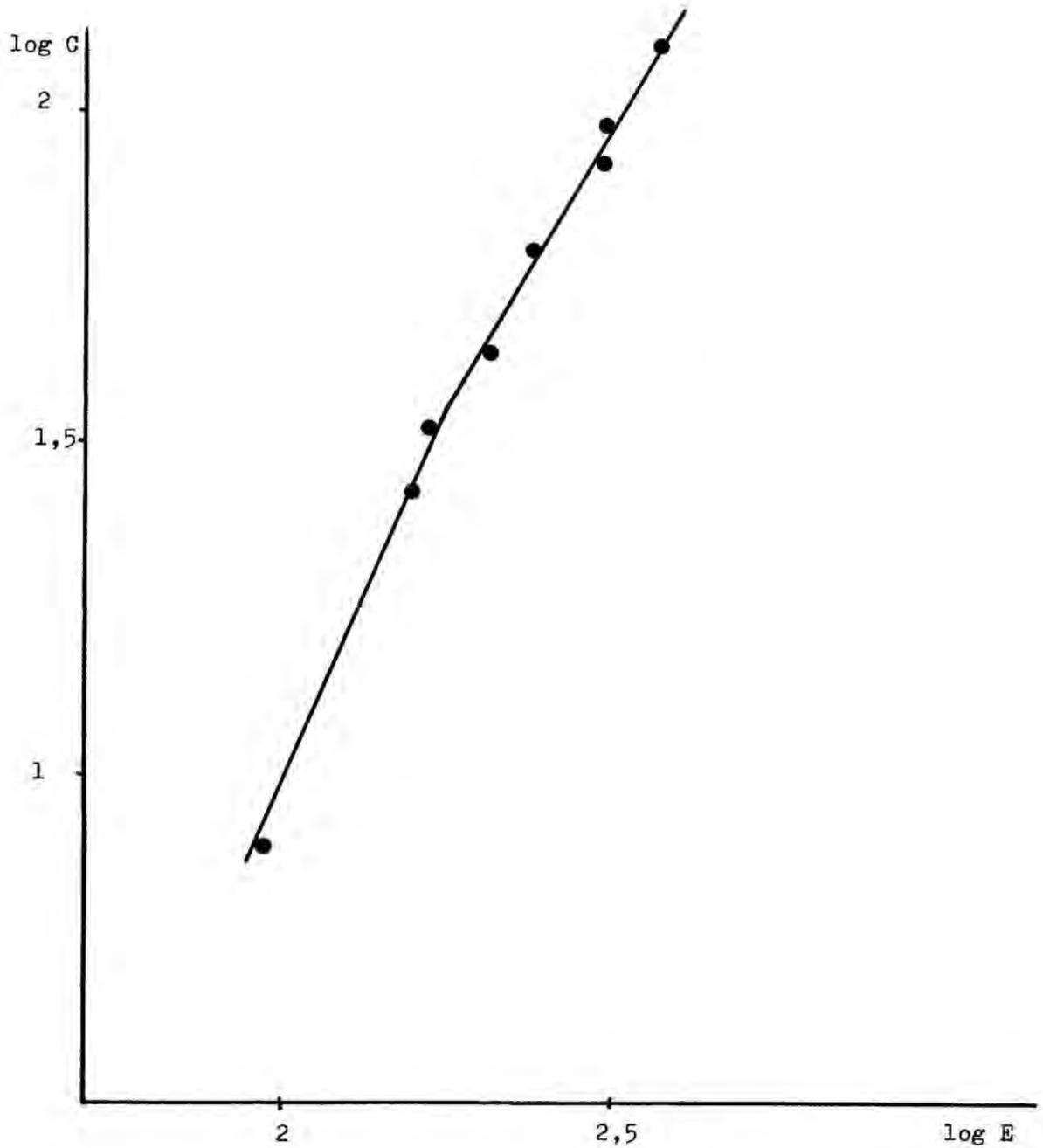


Figura 24 : Crecimiento relativo del corazón (C) con respecto al encéfalo (E) en embrión de pollo de 9 a 18 días, relación bilogarítmica del contenido de DNA/órgano. (véase texto)

4.2. Determinación de la constante de proliferación (PK), de la duración media del ciclo celular (GT) y de la duración de la mitosis (MT) de los hepatocitos en embriones de 10 y 14 días, por el método de la acumulación mitótica.

Huevos de 10 y 14 días de incubación fueron inyectados en las condiciones descritas en 3.3.2 con 1 ml de solución de vinblastina (Lilly) de 10 microgramos / ml. La medida del índice mitótico (MI) en el parénquima hepático se realizó a las 3 y 4,5 horas en los embriones de 10 días y a las 4 y 6 horas en los de 14. Todos los embriones de 14 días parecían completamente normales después del tratamiento, en cambio, algunos embriones de 10 días presentaban congestión visceral. La medida del índice mitótico se hizo únicamente con embriones de aspecto normal o solo ligeramente congestivos.

Se midió el índice mitótico basal en controles no inyectados o inyectados con 1 ml de agua destilada, no observándose diferencias entre ambos controles.

El cálculo de la constante de proliferación (PK), del período medio del ciclo celular de la población (GT) y la duración de la mitosis (MT) se realizó a partir del incremento del índice mitótico entre las 3 y 4,5 horas de acumulación (embriones de 10 días) y entre las 4 y 6 horas de acumulación (embriones de 14 días), utilizando las expresiones (68), (69) y (70) de la parte 3.3.2. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12.

La duración de la mitosis determinada en el experimento con el embrión de 14 días es de 50 minutos y en el embrión de 10 días es de 52 minutos, pero esta diferencia no es significativa dada la variabilidad de las medidas de MI. Ya que la duración de la mitosis determinada en el mismo tipo celular en diferentes condiciones e incluso en células de origen distinto se ha encontrado relativamente invariante y que los resultados del experimento con embriones de 14 días no ofrecen dudas debido a la ausencia completa de efectos tóxicos, tomaremos el valor de 50 minutos como la duración de la mitosis en el hepatocito de embrión de pollo

en muestras condiciones de incubación.

TABLA 11

Determinación de la constante de proliferación (PK), de la duración media del ciclo celular (GT) y de la duración de la mitosis (MT) en los hepatocitos de embrión de pollo de 10 días, por el método de la acumulación mitótica con vinblastina. (véase texto)

MI (3h)	=	0,037 ± 0,015	n = 4
MI (4,5h)	=	0,056 ± 0,013	n = 6
Tiempo acumulación	=	1,5 h	
Incremento MI	=	0,019	
PK	=	0,0127 / h	
GT	=	54,72 h	
MI basal	=	0.0110	
MT	=	52,10 min	

La duración del ciclo celular en el embrión de 14 días (GT = 55,45 horas) puede compararse con el período de duplicación de la cantidad de DNA/hígado promedio entre los días 9 y 18 del desarrollo (DT = 55,01 horas) según se ha visto en la parte 4.1 y que, al tratarse de una población expansiva, puede suponerse equivalente a la duración media del ciclo celular.

Estando el embrión de 14 días situado aproximadamente en el centro del intervalo de crecimiento estudiado (del día 9 al 18), la duración del ciclo celular en el embrión de esta edad debería ser bastante parecida al promedio de GT durante el intervalo, pues aunque la variación de GT durante el mismo no fuera lineal, se diferenciaría inapreciablemente de esta situación dada la mínima variación de GT durante el intervalo,

que puede apreciarse por la escasa curvatura de la gráfica semilogarítmica DNA/hígado en función de la edad del embrión (Fig. 21).

La coincidencia de dos mediciones por métodos distintos en el valor de GT de los hepatocitos del embrión de pollo de 14 días es una indicación de la fiabilidad de los resultados.

TABLA 12

Determinación de la constante de proliferación (PK), de la duración media del ciclo celular (GT) y de la duración de la mitosis (MT) en los hepatocitos de embrión de pollo de 14 días por el método de la acumulación mitótica con vinblastina. (véase texto)

MI (4h)	=	0,059 ± 0,014	n = 4
MI (6h)	=	0,084 ± 0,014	n = 4
Tiempo acumulación	=	2 h	
Incremento MI	=	0,025	
PK	=	0,0125 / h	
GT	=	55,45 h	
MI basal	=	0,0105	
MT	=	50,34 min	

4.3. Constante de proliferación (PK) y duración media del ciclo celular (GT) de los hepatocitos en embriones de 5 a 20 días de desarrollo.

El índice mitótico del parénquima hepático fué determinado en embriones de 5 a 20 días de desarrollo según las condiciones especificadas en 3.3.1. El número de embriones utilizados para cada edad fué de 3 a 4, con dos preparaciones contadas para cada hígado. En la Tabla 13 se muestran los índices mitóticos de las diferentes edades y las correspondientes constantes de proliferación (PK) y duraciones medias del ciclo celular (GT) calculadas mediante la expresión (70) y tomando para la duración de la mitosis (MT) el valor determinado en el experimento de acumulación mitótica con vinblastina en el embrión de 14 días (50 minutos). El coeficiente de variación medio en la medida del índice mitótico basal fué del 15 %, quedando los valores de PK y GT afectados por el mismo error.

Para el embrión de 10 días, creemos más ajustados a la realidad los valores de PK y GT calculados a partir del experimento de acumulación mitótica en el embrión de 14 días (MT = 50 minutos), que son los que figuran en la Tabla 13, que los obtenidos directamente por acumulación mitótica en embriones de dicha edad debido a que se observaron algunos embriones con signos de toxicidad (véase Tabla 7).

En la figura 25 se representan gráficamente los datos de la Tabla 13 : MI y GT en función de la edad del embrión y en la figura 26 las correspondientes curvas semilogarítmicas ($\log MI(t)$ y $\log GT(t)$). Resulta claro en esta última figura la existencia de una discontinuidad en la variación de MI y GT con la edad del embrión : Entre los días 10 y 20 las gráficas semilogarítmicas son prácticamente lineales, indicando su carácter exponencial, y de escasa pendiente que significa que la constante de la exponencial es relativamente pequeña. En cambio, entre los días 5 y 8 las gráficas semilogarítmicas no están completamente rectificadas y, en todo caso, tienen una pendiente bastante superior a la del período de 10 a 20 días.

Estos resultados serán discutidos más adelante en relación al modelo de crecimiento propuesto por Goedbloed (1972, 1974, 1975, 1976 y 1977).

TABLA 13

Indice mitótico (MI), constante de proliferación (PK) y duración media del ciclo celular (GT) en el parénquima hepático de embrión de pollo entre los días 5 y 20 del desarrollo (véase texto).

Los valores de PK y GT se han calculado tomando $MT = 50$ minutos. Para el embrión de 14 días se dan además, entre paréntesis, los valores exactos tomando $MT = 50,34$ minutos.

<u>Edad (días)</u>	<u>MI</u>	<u>PK (h⁻¹)</u>	<u>GT (h)</u>
5	0,0355	0,0425	16,3
6	0,0238	0,0285	24,3
7	0,0184	0,0221	31,4
8	0,0151	0,0181	38,2
10	0,0110	0,0132	52,5
14	0,0105	0,0126 (0,0125)	55,1 (55,4)
17	0,0089	0,0107	64,9
20	0,0080	0,0096	72,2

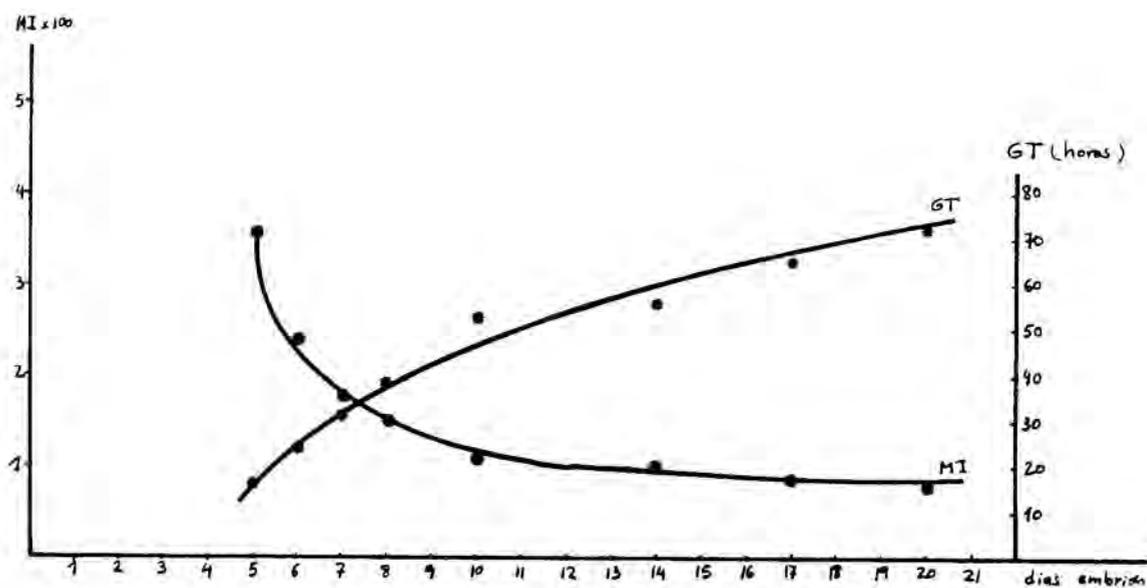


Figura 25 : Índice mitótico (MI x 100) y duración media del ciclo celular (GT en horas) en el parénquima hepático del embrión de pollo en función de la edad (véase texto y Tabla 13).

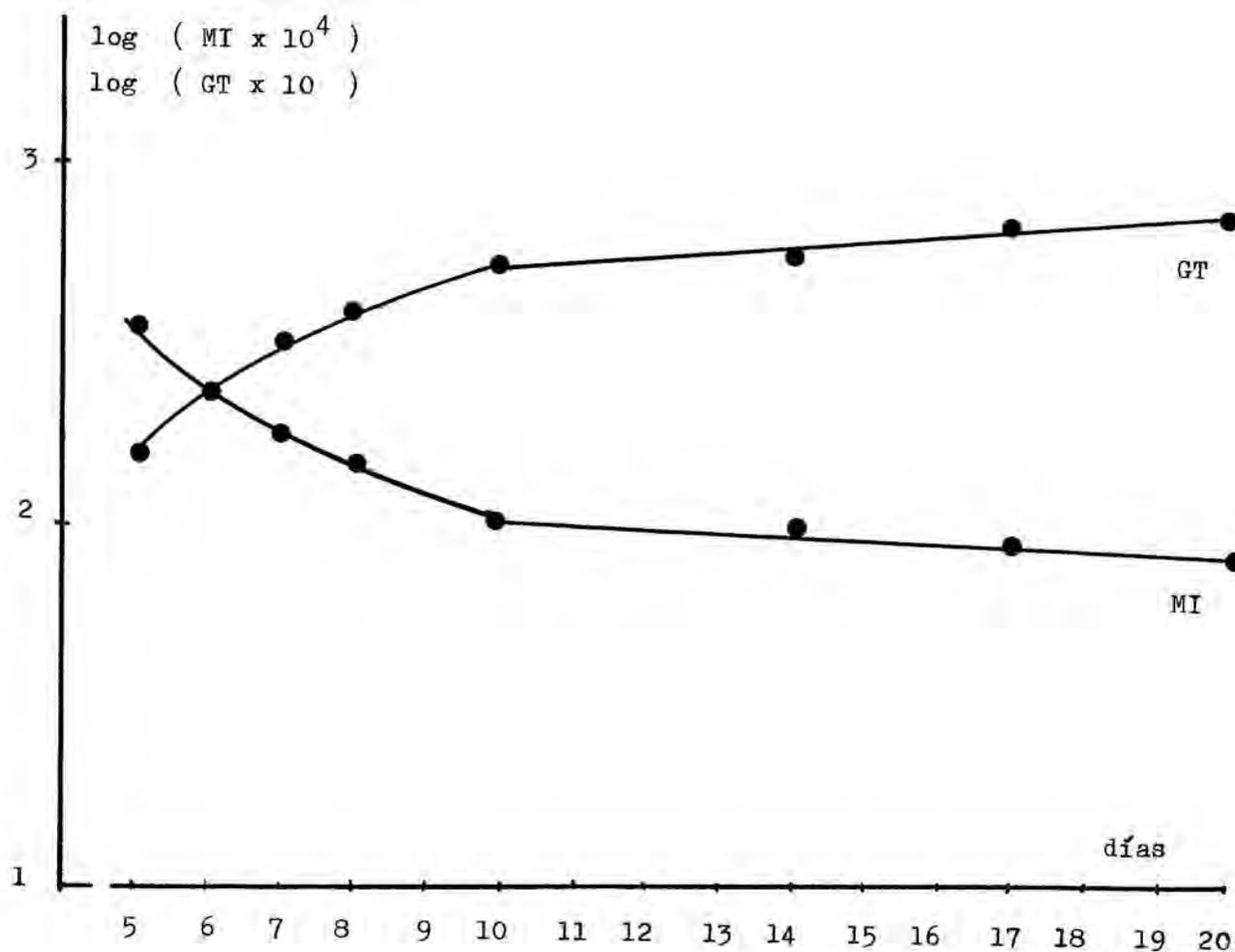


Figura 26 : Logaritmo del índice mitótico ($\log \text{MI} \cdot 10^4$) y logaritmo de la duración media del ciclo celular ($\log \text{GT} \cdot 10$) en el parénquima hepático del embrión de pollo en función de la edad (véase texto).

4.4. Síntesis de DNA en el hígado de embriones de pollo de 10 y 14 días.

La medida de la síntesis de DNA en el hígado de embriones de 10 y 14 días se realizó mediante la incorporación de timidina tritiada. Se inyectó 1 ml de solución de timidina tritiada de 3 microCi / ml a la cámara de aire de los huevos y se midió la incorporación del trazador al DNA hepático a las 3 y a las 4 horas según el procedimiento explicado en la parte 3.3.3. Para cada tiempo de incorporación se utilizaron 6 embriones (10 días) ó 4 embriones (14 días).

El incremento porcentual de la actividad específica del DNA (3.3.3.) entre las 3 y las 4 horas fué :

$$\text{Incremento actividad específica (emb. 10 d)} = 36,93 \%$$

$$\text{Incremento actividad específica (emb. 14 d)} = 27,34 \%$$

La relación de los incrementos porcentuales de actividad específica (Incremento AE %) es :

$$\text{Incremento AE \% (10 d)} / \text{Incremento AE \% (14 d)} = 1,3507$$

Esta relación puede compararse con la de las constantes de proliferación correspondientes (véase tabla 13)

$$\text{PK (10 d)} / \text{PK (14 d)} = 1,0476$$

Ya que los resultados de la incorporación de timidina tritiada se expresan en forma relativa a la cantidad de DNA y están corregidos para la concentración del precursor en la fracción soluble (véase 3.3.3.), la diferencia entre las dos relaciones comparadas - 1,3507 y 1,0476 - solo puede explicarse por una utilización más eficiente del precursor por parte del embrión de 10 días, lo cual sugiere una mayor actividad timidinkinasa en el hígado de esta edad.

4.5. Coincidencia mitótica en el parénquima hepático de embriones de pollo de 10 y 14 días.

La coincidencia mitótica (M_{co}), medida como la proporción de mitosis asociadas en pares (2 células vecinas en mitosis), fué determinada en el parénquima hepático de embriones de 10 días después de un bloqueo mitótico con vinblastina de duración (MBT) igual a 4,5 horas y de embriones de 14 días después de un bloqueo de duración (MBT) igual a 6 horas. La dosis de vinblastina fué para ambas edades de 10 microgramos / huevo.

Ya que la coincidencia mitótica es una medida del grado de sincronía en el ciclo de reproducción de células hermanas, ha sido posible según hemos visto en 3.3.4. calcular el valor de M_{co} a partir del modelo de probabilidad de transición (Smith y Martin 1973 y 1974). La constante de transición (k) ha sido calculada utilizando la expresión (86). El valor de la constante de proliferación (PK) se ha determinado en los experimentos de acumulación mitótica (4.2.) y el de la duración de la fase B del ciclo celular (T_B) se ha igualado a la duración mínima del ciclo celular medida en nuestro sistema :

$$T_B = GT \text{ (emb. 5 días) } = 16,3 \text{ horas}$$

El número medio de células rodeando a una célula (número de vecinas) en la sección histológica es en nuestro material aproximadamente 3 ($N_v = 3$) y el número medio de células rodeando a una célula en el espacio tridimensional es aproximadamente 5 y, por tanto, la probabilidad de que una célula vecina sea la hermana de una célula determinada es $1 / 5$ ($s = 1/5$). Sin embargo, si se toma $s = 1/6$ o incluso $1/8$ en lugar de $1/5$, nuestros resultados no se modifican sensiblemente.

En la figura 27 se observan mitosis bloqueadas y cuatro de ellas forman dos pares. Al tratarse de mitosis bloqueadas no hay confusión posible con una telofase.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de las mediciones y cálculos de la coincidencia mitótica.

La correspondencia entre el valor de M_{co} observado y el calculado

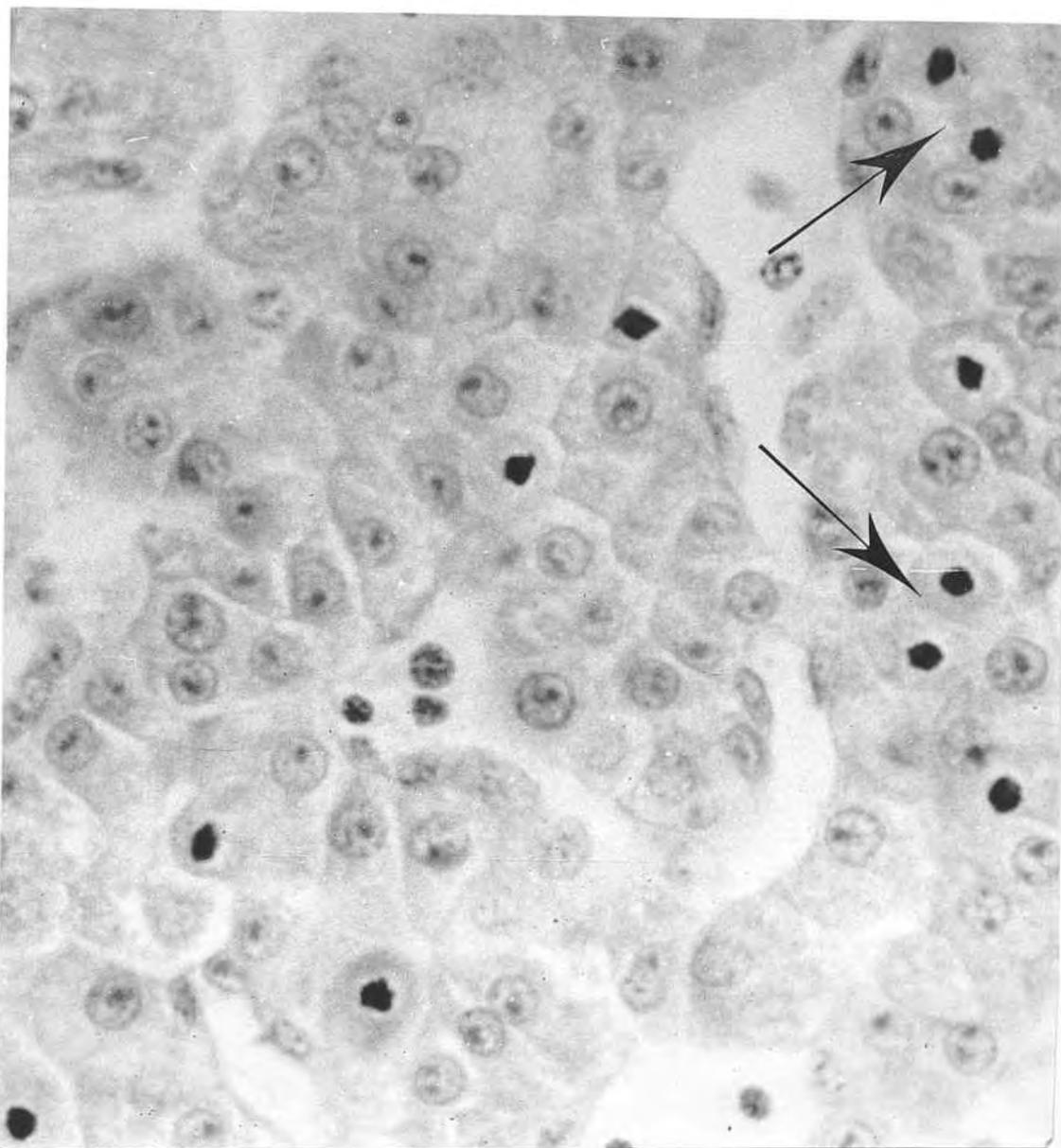


Figura 27 : Preparación de hígado de embrión de pollo de 10 días con mitosis bloqueadas. Aumento total aproximado 1.400. Las flechas señalan los pares de mitosis. La coincidencia mitótica (Mco) se mide por el número de mitosis asociadas en pares en relación al número total de mitosis.

TABLA 14

Medida de la coincidencia mitótica de células vecinas (Mco) después de un bloqueo mitótico con vinblastina en el parénquima hepático de embrión de pollo y su cálculo a partir del modelo de probabilidad de transición (véase texto y parte 3.3.4.).

<u>Embrión de 10 días</u>	<u>Embrión de 14 días</u>
<u>Parámetros medidos</u>	<u>Parámetros medidos</u>
vinblastina/huevo = 10 microg	vinblastina/huevo = 10 microg
t = MBT = 4,5 h	t = MBT = 6,0 h
n = 6	n = 4
MI (t) = 0,056 0,013	MI (t) = 0,084 0,014
Mco (t) = 0,18 0,09	Mco (t) = 0,24 0,03
PK = 0,0132 / h	PK = 0,0125 / h
T _B = 16,3 h	T _B = 16,3 h
Nv = 3	Nv = 3
s = 1/5	s = 1/5
<u>Parámetros calculados</u>	<u>Parámetros calculados</u>
k = 0,0216 / h	k = 0,0198 / h
SPco (t) = 0,0473	SPco (t) = 0,0572
Mco (t) = 0,16	Mco (t) = 0,24

a partir del modelo de probabilidad de transición es muy buena en el caso del embrión de 14 días, donde además la variabilidad de la medida de Mco (t) es relativamente pequeña (coeficiente de variación 12 %). En el caso del embrión de 10 días existe una pequeña diferencia que cae, sin embargo, dentro del margen de error de la medida de Mco (t), que en el embrión de esta edad es bastante amplio a causa, probablemente, de la

toxicidad del tratamiento con vinblastina (véase Tabla 7 en la parte 3.3.2).

Estos resultados no son evidentemente una prueba de la validez del modelo de probabilidad de transición ya que únicamente un punto de la distribución acumulativa de diferencias de GT entre hermanas (curva Beta) ha sido realmente determinado. Únicamente puede concluirse que los resultados son compatibles con y predictibles por el modelo de probabilidad de transición.

El hecho experimental es que la pérdida de sincronía de los pares de células hermanas en el parénquima hepático de embriones de 10 y 14 días es considerable y puede medirse indirectamente por medio de la coincidencia mitótica. En la figura 28 se representan las curvas Beta logarítmicas (véase 2.3.3.) correspondientes a distintas constantes de transición :

Las curvas a y b corresponden al parénquima hepático de embrión de pollo de 14 y 10 días respectivamente y han sido dibujadas teóricamente a partir de la constante de transición, que es precisamente la pendiente de la curva ($0,0198 / h$ para el embrión de 14 días y $0,0216/h$ para el embrión de 10 días). El único punto de ambas curvas realmente determinado mediante la coincidencia mitótica es el del tiempo de bloqueo mitótico (MBT) correspondiente : 4,5 horas para el embrión de 10 d y 6 horas para el embrión de 14 d, siendo los valores de Beta respectivos de 0,91 y 0,89 : Esto significa que en el embrión de 10 días, el 91 % de los pares de células hermanas presentan una diferencia de duración del ciclo mayor de 4,5 horas y en el embrión de 14 días, el 89 % de los pares se desfasa en más de 6 horas.

La curva c es una curva ideal puesta como referencia comparativa, correspondiente a una constante de transición de $0,100 / h$.

Las curvas d y e son curvas experimentales tomadas de la bibliografía y que corresponden a células in vitro proliferando más rápidamente que los hepatocitos embrionarios de 10 y 14 días in vivo :

- d) células HeLa, $k = 0,150 / h$ ($p = 0,14$) y
- e) células de sarcoma de rata, $k = 0,598$ ($p = 0,45$) Smith y Martin 1973

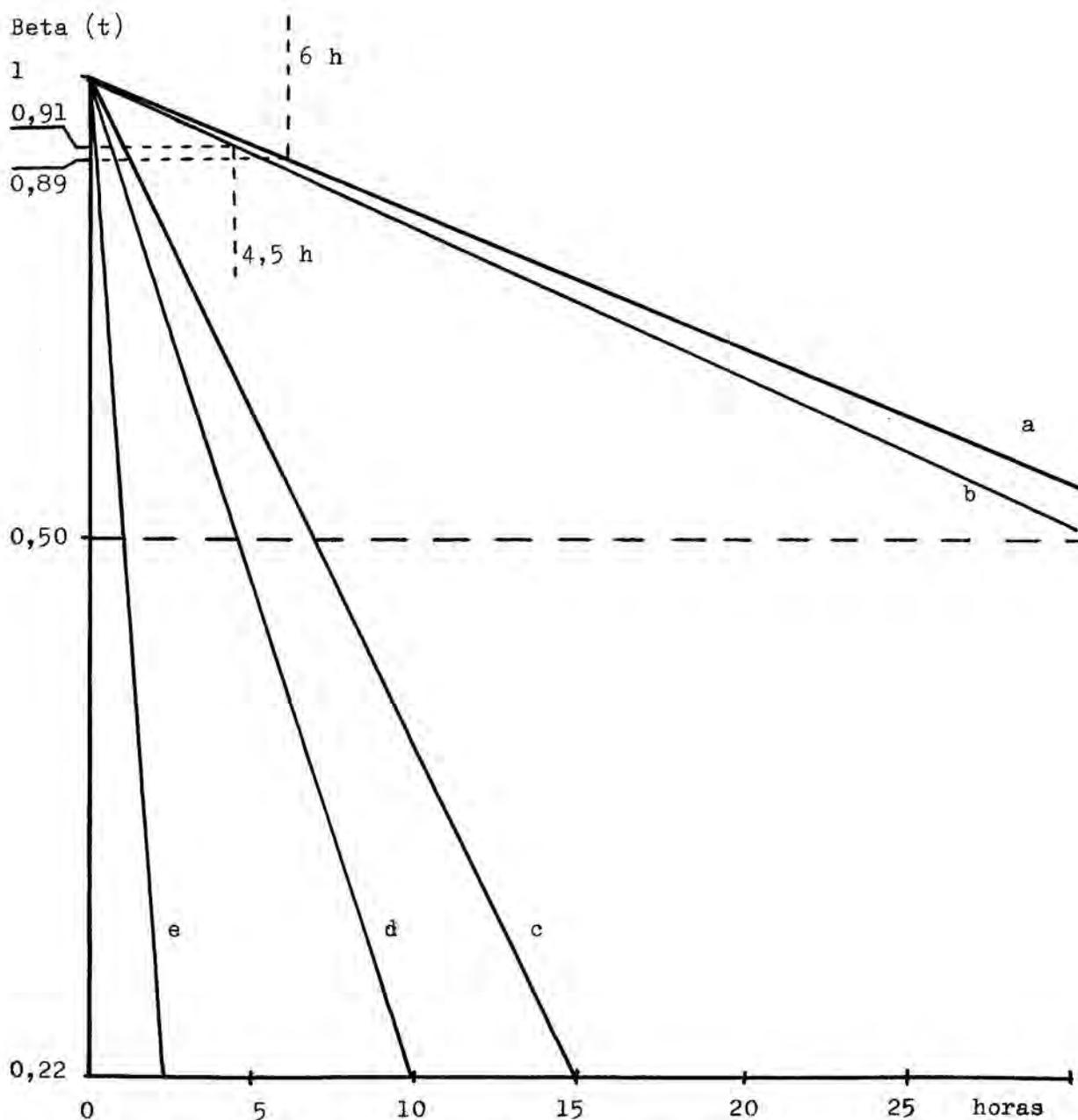


Figura 28 : Curvas Beta semilogarítmicas (log proporción de pares de hermanas desfasados igual o más que t). Véase texto.

a- parénquima hepático de embrión de pollo de 14 d ($k = 0,0198 / h$)

b- parénquima hepático de embrión de pollo de 10 d ($k = 0,0216 / h$)

c- curva ideal de referencia ($k = 0,100 / h$)

d- cultivo de células HeLa ($k = 0,150 / h$)

e- cultivo de células de sarcoma de rata ($k = 0,598 / h$)

Puede calcularse fácilmente a partir de las constantes de transición la diferencia de GT entre hermanas ($GT_1 - GT_2$) correspondiente al nivel 0,5 de la curva, es decir, que el 50 % de los pares de hermanas presentan un desfase en su progresión por el ciclo celular igual o mayor que dicho valor :

	$k (h^{-1})$	$(GT_1 - GT_2)_{0,5}$
- curva a	0,0198	35,0
- curva b	0,0216	32,1
- curva c	0,1000	6,9
- curva d	0,1500	4,6
- curva e	0,5980	1,2

Naturalmente, esto es un hecho en los cultivos celulares mencionados (curvas d y e, tomadas de Smith y Martin 1973) y solamente una predicción del modelo de probabilidad de transición en el caso del parénquima hepático embrionario (curvas a y b), cuyo único soporte experimental en este sistema es el valor de Beta determinado indirectamente por la coincidencia mitótica a $t = 4,5$ h en el embrión de 10 días (b) y a $t = 6$ h en el embrión de 14 días (a).

Por tanto, la variabilidad de GT entre células hermanas en nuestro sistema puede explicarse por el modelo de probabilidad de transición, que en esencia supone la existencia de una discontinuidad en el ciclo de reproducción, que las células traspasan con una cinética de primer orden . La posibilidad de otras explicaciones y los pros y los contras con respecto al modelo de probabilidad de transición serán discutidos más adelante.

4.6. Estructura general del hígado embrionario : Fracción del órgano ocupada por el parénquima a lo largo del desarrollo.

El parénquima hepático del embrión de pollo está organizado en forma de trabéculas epiteliales anastomosadas, entre las cuales se encuentran los capilares sanguíneos constituidos por las células endoteliales, las células de Kupffer y las células hematopoyéticas (Fig. 29 y 31). Por el interior de las trabéculas discurren los canalículos biliares formados por los propios hepatocitos (Fig. 30).

Los capilares sanguíneos tienen trayectos sinuosos y ocupan al principio una proporción importante del volumen del hígado, que va disminuyendo con la edad del embrión al ir aumentando el componente epitelial.

La fracción de volumen hepático ocupado por parénquima (FP) se midió por el procedimiento indicado en 3.4.2. En la Tabla 15 figuran los resultados correspondientes, para cada edad se utilizaron de 2 a 4 embriones. La densificación del órgano es evidente pasando de alrededor del 68 % en el embrión de 5 días al 96 % en el embrión de 20 días.

En las figuras 32 y 33 se relaciona la proporción de hígado ocupada por el parénquima (FP) con la edad del embrión (Fig. 32) y con la duración media del ciclo celular (Fig. 33). Puede observarse como la densificación es primero más rápida y después más lenta (Fig. 32) de forma parecida a la variación de GT en función de la edad del embrión (Fig. 25).

Entre FP y GT (Fig. 33) existe una relación lineal positiva con un coeficiente de correlación igual a 0,96. El posible significado de esta relación será discutido más adelante.

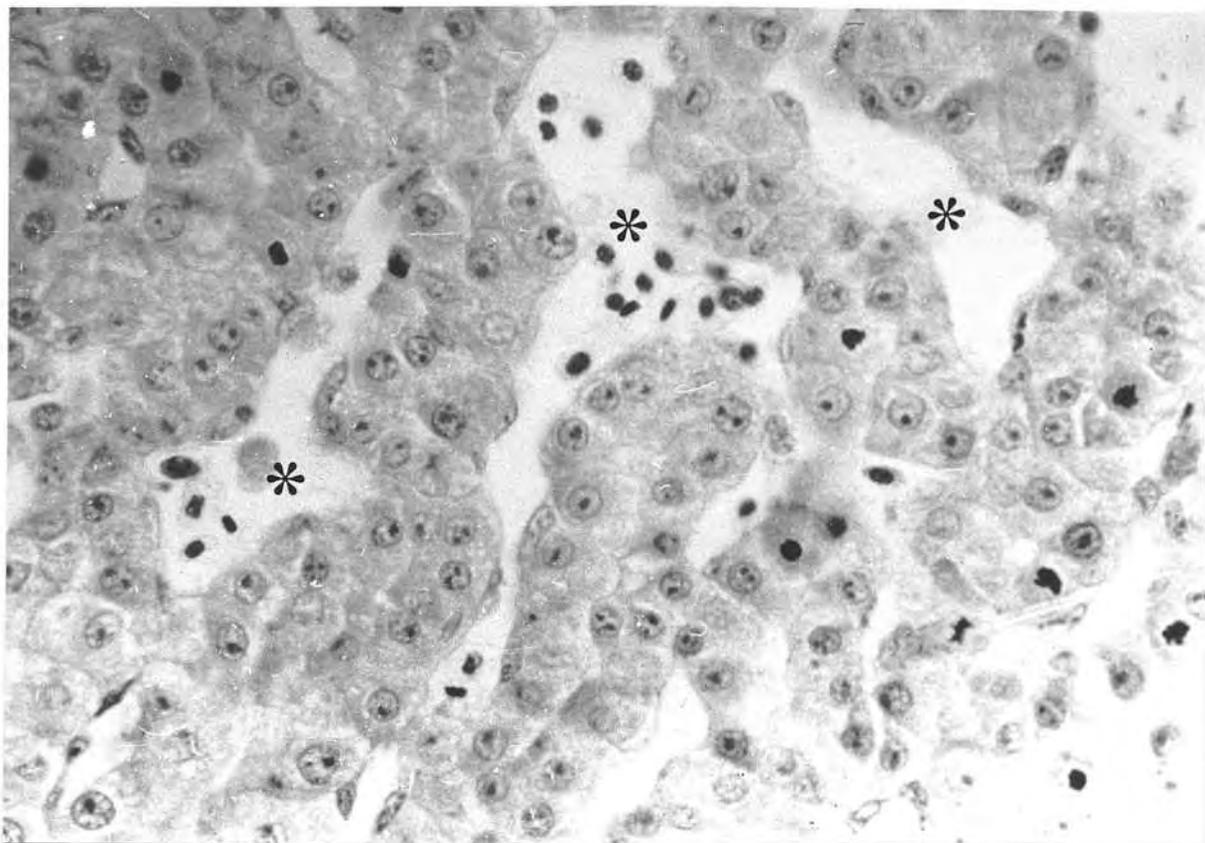


Figura 29 : Hígado de embrión de pollo de 10 días. Microscopía óptica, preparado según 3.4.1. Aumento total aproximado 700. Capilares sinusoides señalados con asteriscos.

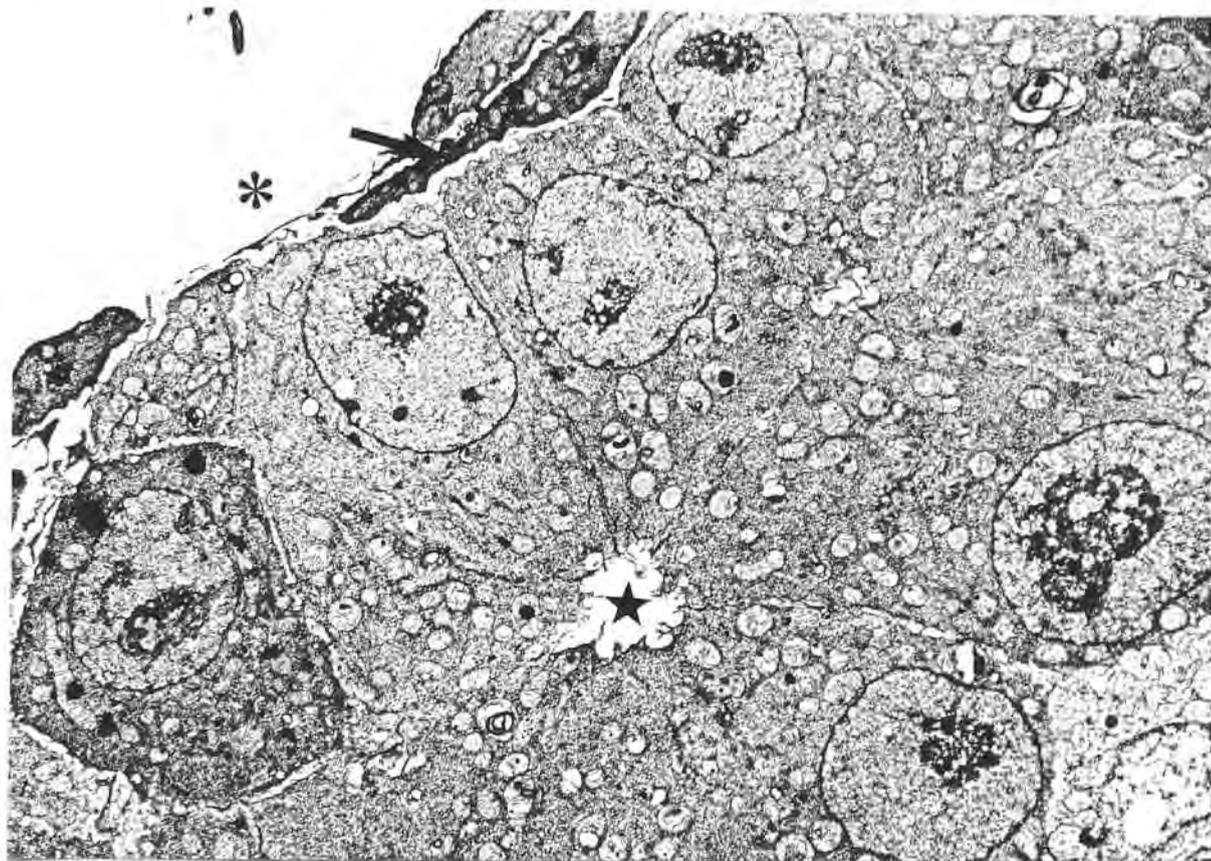


Figura 30 : Hígado de embrión de pollo de 6 días. Microscopía electrónica, preparado según 3.4.1. Aumento total aproximado 5.000. Capilar sinuoso señalado con asterisco y célula endotelial señalada con flecha. Capilar biliar señalado con estrella.

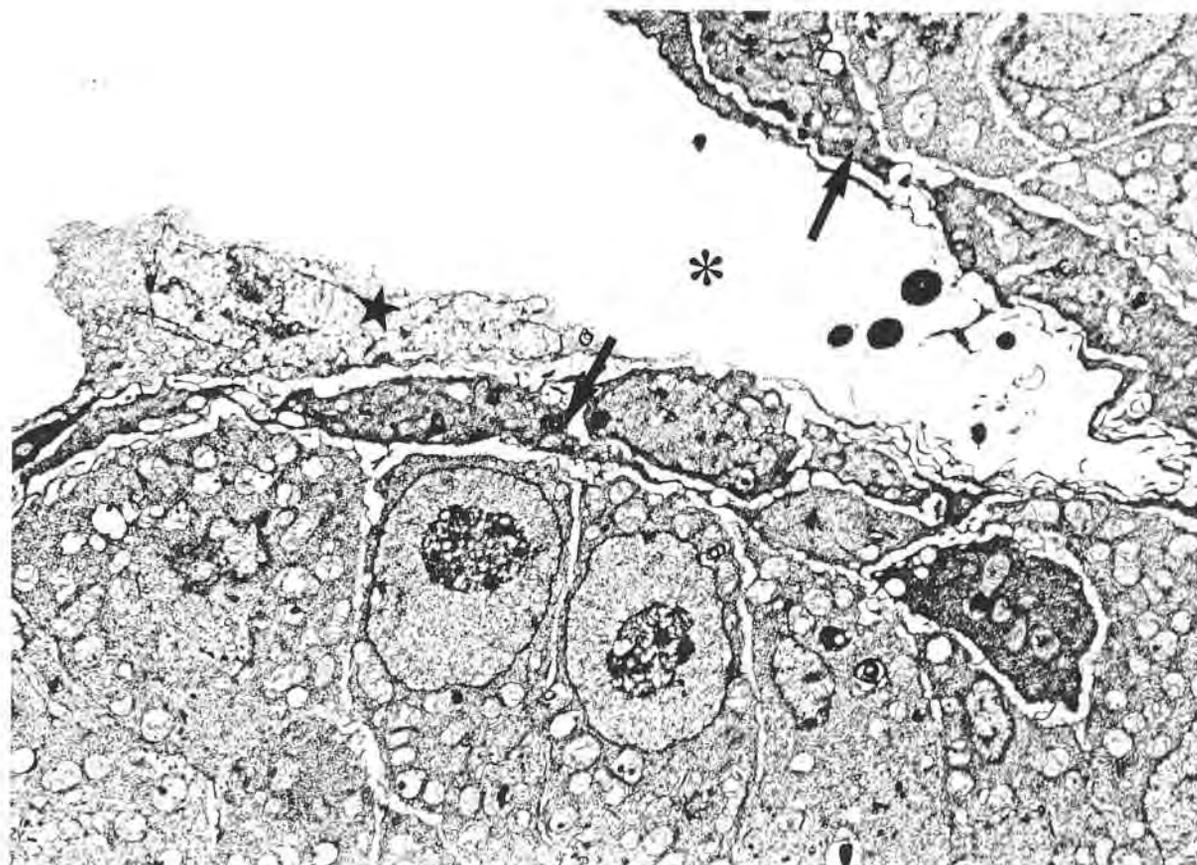


Figura 31 : Hígado de embrión de pollo de 6 días. Microscopía electrónica, preparado según 3.4.1. Aumento total aproximado 5.000. Capilar sinusoide : Luz (asterisco), células endoteliales (flechas) y célula de Kupffer (estrella).

TABLA 15

Fracción del hígado embrionario de pollo ocupado por el parénquima (FP)

<u>Edad</u>	<u>n</u>	<u>FP</u>	<u>desviación típica</u>
5	3	0,6773	0,0590
6	3	0,7503	0,1270
7	4	0,8153	0,0555
8	3	0,8448	0,0074
10	4	0,8658	0,0414
13	2	0,8975	0,0120
15	3	0,9004	0,0036
17	3	0,9547	0,0038
20	3	0,9603	0,0025

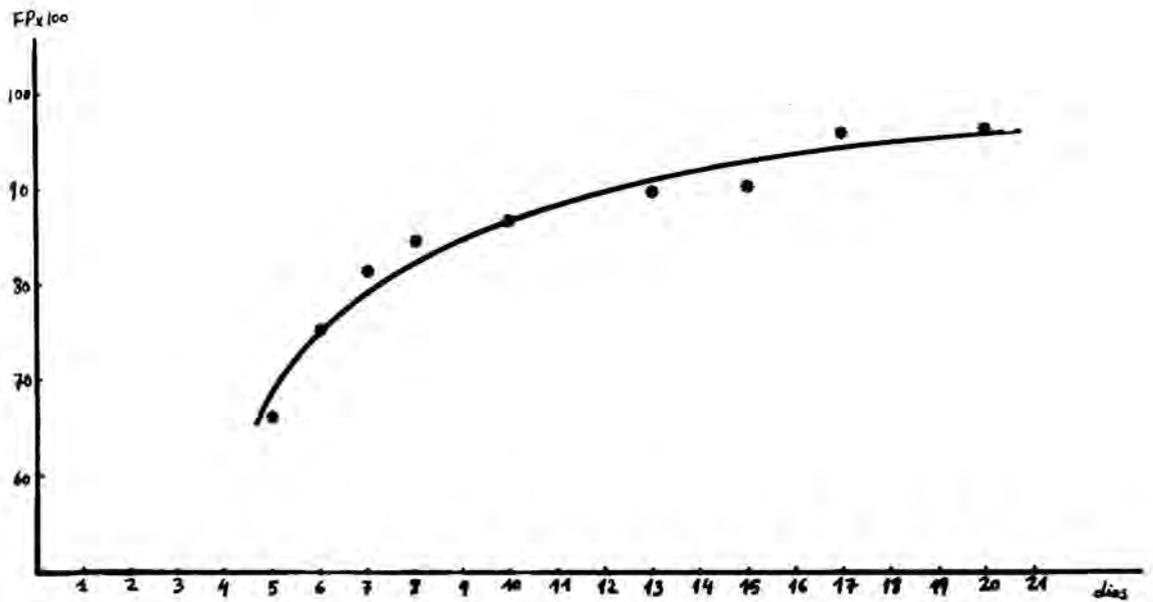


Figura 32 : Fracción de hígado embrionario ocupado por parénquima (FP) en relación a la edad del embrión.

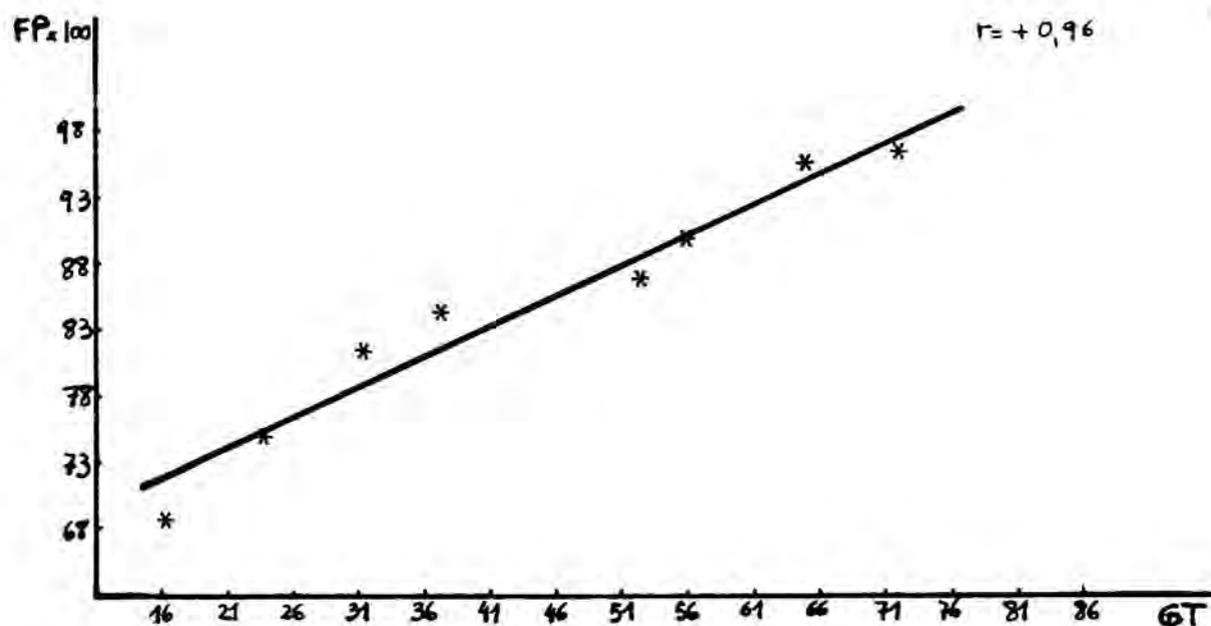


Figura 33 : Fracción de hígado ocupado por parénquima (FP) en el embrión de pollo en función de la duración del ciclo celular (GT) de los hepatocitos embrionarios , coeficiente de correlación = 0,96.

4.7. Microscopía electrónica del hepatocito embrionario de pollo.

Utilizando el método de preparación para microscopía electrónica (ME) indicado en 3.4.1 se realizó el estudio ultraestructural del hepatocito embrionario de pollo de 6, 8, 10, 15 y 20 días de desarrollo y también de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión.

La aplicación de las técnicas morfométricas explicadas en 3.4.2. a embriones de 6, 10, 15 y 20 días ha permitido una caracterización cuantitativa de la estructura del hepatocito embrionario. Para el estudio morfométrico se utilizaron 405 fotografías a las ampliaciones indicadas en 3.4.2. El área de sección examinada en cada edad fue, por término medio, de 16.753 micras², lo cual corresponde a una media de 163 secciones celulares.

La medición del volumen nuclear del hepatocito a cada edad permitió transformar los valores morfométricos relativos (densidades de volumen) en valores absolutos. Para cada edad se utilizó un promedio de 43 secciones nucleares al azar, estando, en todo caso, el número de secciones por encima del número mínimo necesario para un error típico inferior al 10 % según Lindberg y Vorwerk (1972). En la Tabla 16 se indican los resultados.

TABLA 16

Volumen nuclear medio del hepatocito de embrión de pollo a distintas edades, determinado a partir de las áreas de sección según Lindberg y Vorwerk (1972). (véase texto y parte 3.4.2.)

<u>Edad</u>	<u>Número de secciones</u>	<u>Volumen</u>
6	66	66
10	23	73
15	50	45
20	34	41

El volumen se da en micras³. El coeficiente Beta (véase 3.4.2.) de los núcleos es 1,413. El error típico medio del volumen es de 7,2 %

Las fracciones o densidades de volumen (V_V) se midieron para núcleo, nucléolo, mitocondrias e inclusiones lipídicas con respecto al volumen celular. Los resultados se presentan en la Tabla 17, donde cada valor representa la fracción del volumen celular correspondiente a un orgánulo (núcleo, nucléolo) o conjunto de orgánulos (mitocondrias, inclusiones lipídicas).

TABLA 17

Fracción de volumen del hepatocito embrionario de pollo correspondiente a diferentes compartimentos morfométricos celulares. (véase texto)

<u>Edad</u>	<u>Núcleo</u>	<u>Nucléolo</u>	<u>Mitocondrias</u>	<u>Inclusiones lipídicas</u>
6	0,202	0,031	0,147	-
10	0,166	0,020	0,142	0,012
15	0,094	0,008	0,169	0,033
20	0,050	0,004	0,148	0,076

En la figura 34 se representan gráficamente las fracciones de volumen (V_V) de la Tabla 17.

A partir de la fracción de volumen nuclear (Tabla 17) y del volumen nuclear medido para cada edad (Tabla 16) pudo calcularse el volumen celular medio para cada edad y a partir de dicho valor, las fracciones de volumen correspondientes a nucléolo, mitocondrias e inclusiones lipídicas pudieron convertirse en los correspondientes valores absolutos. Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 18 y se representan gráficamente en la figura 35.

Puede observarse en la figura 35 que el hepatocito embrionario no mantiene un volumen constante durante el desarrollo, sino que crece desde 327 micras³ en el embrión de 6 días hasta 820 micras³ en el embrión de 20 días. Durante el mismo período, la duración media del ciclo celular

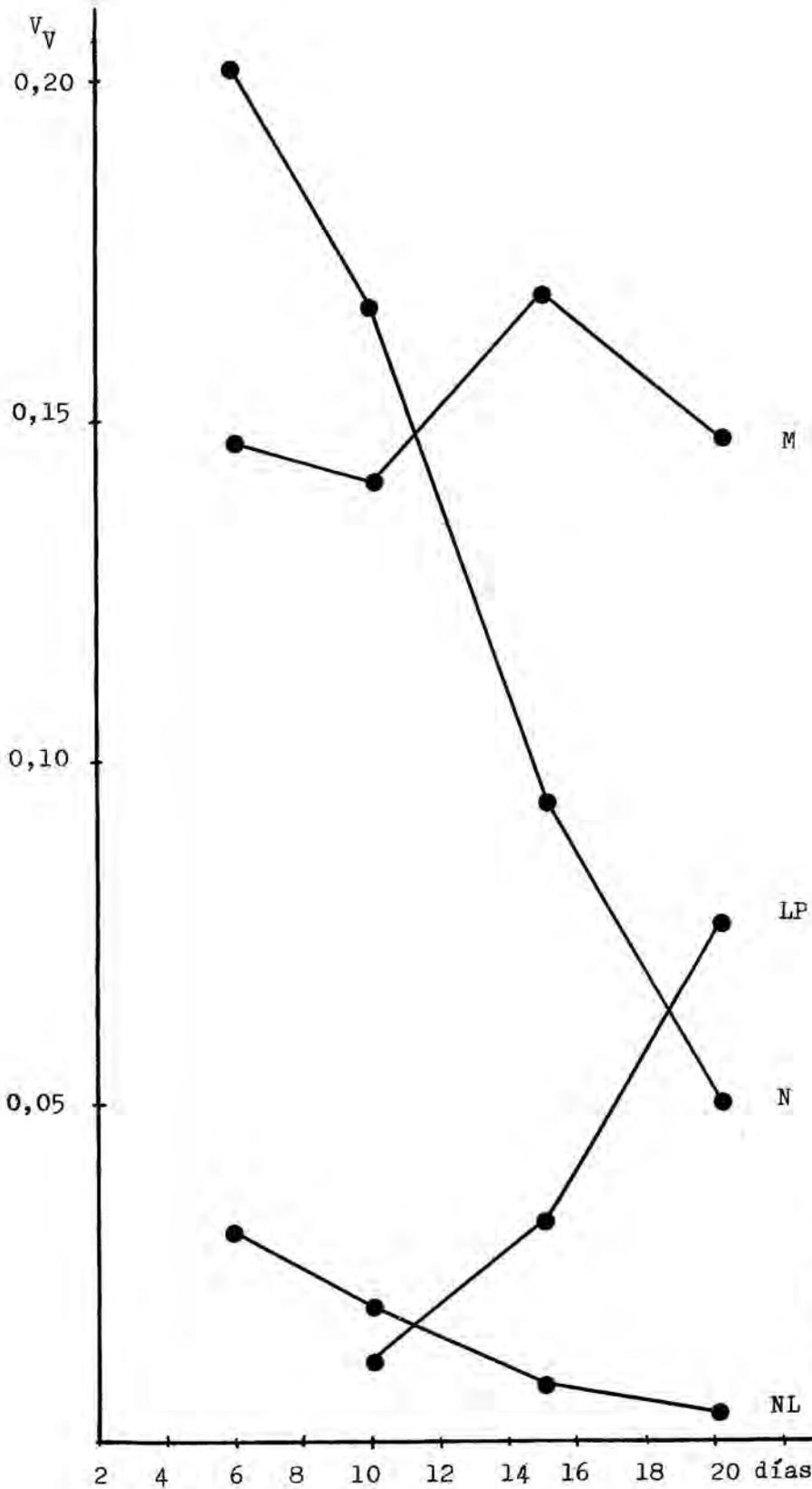


Figura 34 : Fracción de volumen del hepatocito embrionario de pollo correspondiente a : Núcleo (N), nucléolo (NL), mitocondrias (M) e inclusiones lipídicas (LP).

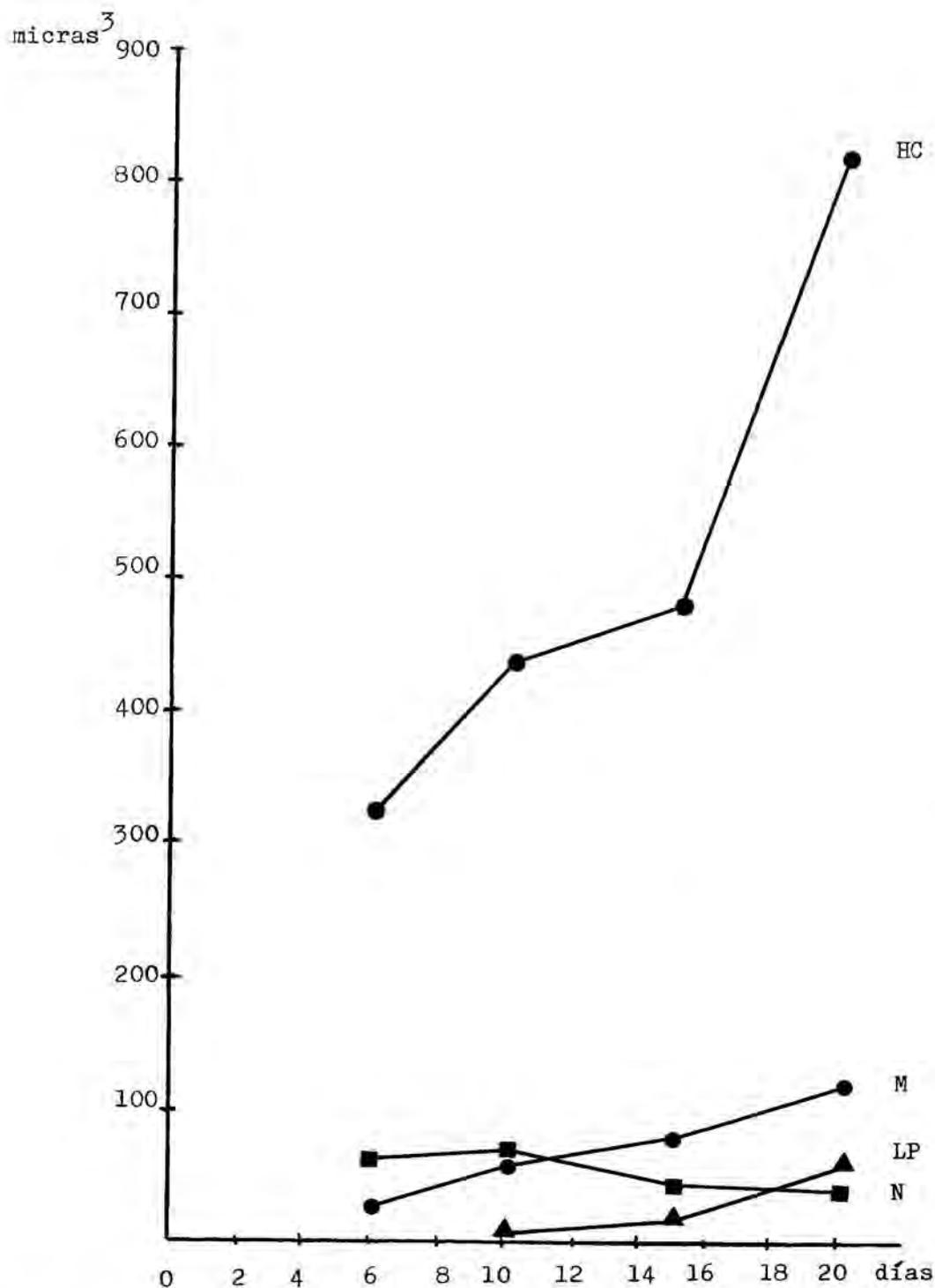


Figura 35: Volumen (micras³) del hepatocito embrionario de pollo (HC) y de diferentes compartimentos morfométricos celulares : Núcleo (N), mitocondrias (M) e inclusiones lipídicas (LP) en función de la edad del embrión. (véase texto y Tabla 18)

TABLA 18

Volumen (micras³) del hepatocito embrionario de pollo y de diferentes compartimentos morfométricos celulares. (véase texto)

<u>Edad</u>	<u>Hepatocito</u>	<u>Nucléolo</u>	<u>Mitocondrias</u>	<u>Inclusiones lipídicas</u>
6	327	10,1	48,1	-
10	440	8,8	62,5	5,3
15	479	3,8	80,9	15,8
20	820	3,3	121,4	62,3

(GT) pasa de 24,3 a 72,2 horas (Tabla 13). La posible relación entre ambos cambios será discutida más adelante.

Comentamos a continuación las principales características cualitativas y cuantitativas de la estructura del hepatocito durante el desarrollo.

a) Núcleo, nucléolo y mitosis.

El núcleo del hepatocito embrionario tiene forma de elipsoide de revolución con un coeficiente de excentricidad (relación entre los ejes) comprendido entre 0,75 y 0,80. Su volumen disminuye ligeramente a partir del día 10 (Tabla 16, figura 35), lo cual junto con el crecimiento de la célula determina una disminución importante de la proporción de volúmenes Núcleo/Célula a lo largo del desarrollo (Tabla 17 y figura 34).

La disminución de volumen del núcleo podría estar relacionada con su actividad funcional pero también podría ser una simple consecuencia del aumento de la duración del ciclo celular (GT) a lo largo del desarrollo : En efecto, el volumen medido no es más que un valor promedio y es conocido que el volumen nuclear se dobla durante la fase S del ciclo como consecuencia de la duplicación de los cromosomas. Por tanto, la proporción de células en S y G₂ sobre el total de la población condicionará el volumen nuclear medio y ya que el alargamiento del ciclo celular se produce

esencialmente a expensas de G_1 o G_0 , dicha proporción disminuye al aumentar GT y el volumen nuclear promediado será menor.

En cuanto al nucléolo, tanto su proporción con respecto a la célula como su volumen absoluto disminuyen durante el desarrollo (Tablas 17 y 18 y figura 34) pudiendo ello relacionarse probablemente con la disminución de la actividad proliferativa (véase Discusión).

Las fotografías de ME de las figuras 36 a 57 muestran algunas características estructurales del nucléolo y de la cromatina del núcleo del hepatocito de embrión de pollo de 6 días (Fig. 36 y 37), de 8 días (Fig. 38 a 41), de 10 días (Fig. 42 a 47), de 15 días (48 y 49), de 20 días (Fig. 50 a 55) y de pollo de 1 mes después de la eclosión (Fig. 56 y 57).

La cromatina se encuentra muy relajada (eucromatina) en todas las edades, aunque pueden observarse algunos cromocentros (masas de heterocromatina) relativamente grandes a partir de los 10 días, principalmente junto al nucléolo y a la envoltura nuclear, pero también en otras partes (Fig. 38, 41 y 48 a 54).

Las fibras de cromatina pueden identificarse directamente en algún caso (Fig. 52 y 57) y más frecuentemente por la disposición en hileras de partículas de carácter probablemente ribonucleoproteico (Fig. 39 y 43).

En la mayor parte de secciones nucleares se observa únicamente un nucléolo pero en algunos casos se observan dos (Fig. 43, 48 y 56). Pueden observarse nucleolonemas y los espacios intersticiales o áreas claras. Las partículas son mayormente de tipo granular, aunque en algunas fotografías pueden verse pequeñas regiones fibrilares identificables por su mayor densidad de empaquetamiento y su menor granulosidad (Fig. 41, 44, 45 y 46).

Además de la disminución de volumen, el nucléolo presenta modificaciones de estructura a lo largo del desarrollo : Inicialmente tienen contornos irregulares, nucleolonemas claramente visibles y numerosas áreas claras muy pequeñas entre los nucleolonemas (Fig. 36, 38, 41 y 45). A medida que aumenta la edad del embrión, el nucléolo se hace más pequeño,

de contornos más regulares y las áreas claras son menos numerosas pero mucho más grandes, con lo cual el ovillo de nucleolonemas va siendo substituido por estructuras con grandes ojales y formas anulares (Fig. 44, 46, 47 y 50 a 53).

La anterior descripción se refiere al tipo de estructura más frecuentemente observada - el nucléolo promedio - pero hay que tener en cuenta que para cada edad existe una amplia heterogeneidad de formas. Así, por ejemplo, en las fotografías de núcleos correspondientes a embriones de 8, 10 y 20 días pueden verse en la misma edad formas relativamente densas con nucleolonemas (Fig. 36, 38, 41, 43, 45 y 55) y formas con grandes áreas claras, de las cuales una suele ser bastante mayor o incluso nucleolos anulares (Fig. 37, 39, 40, 44, 46, 47 y 50 a 53). Sin embargo, la proporción de nucléolos de una y otra formas es distinta según la edad, permitiendo detectar una evolución estructural durante el desarrollo.

El significado funcional de esta heterogeneidad podría ser el de distintos niveles de actividad, posiblemente dependientes de la posición de la célula en el ciclo de reproducción. Las formas con grandes áreas claras y específicamente los nucléolos anulares han sido descritos en hepatocitos de ratón senil y en hepatocitos de rata después de un tratamiento con bajas dosis de actinomicina D para la inhibición de la síntesis de rRNA (Andrew 1962, Smetana y Potmesil 1968 y Busch y Smetana 1970), de manera que pueden ser interpretados como formas vacías de partículas ribonucleoproteicas por falta de producción, mientras que los nucléolos densos con nucleolonemas y áreas claras pequeñas representarían las formas realmente activas. Esta interpretación viene reforzada por el hecho de que en cultivos de leucocitos estimulados con fitohemaglutinina se ha observado la transformación de los nucléolos anulares en formas con nucleolonemas coincidiendo con el aumento de síntesis de RNA (Possnerova y Smetana 1966).

Las figuras 59 a 63 corresponden a fases de la mitosis en hepatocitos de distintas edades. Los microtúbulos del aparato mitótico pueden observarse en la figura 59 pero no los centriolos, sin embargo, su posición

queda marcada por vesículas del aparato de Golgi que se asocian a las mismas. En la figura 58 que corresponde a células interfásicas del mesénquima hepático del embrión de 8 días se comprueba la asociación de un centriolo con elementos del aparato de Golgi.

En la figura 62 que corresponde a una telofase de un hepatocito puede observarse un centriolo junto a uno de los núcleos hijos.

Nos parece interesante indicar que en las dos telofases que presentamos (Fig. 62 y 63) se observa una diferencia del grado de condensación de la cromatina entre los núcleos hijos. No habiendo realizado un estudio sistemático de las telofases es imposible valorar la importancia de la observación, que podría explicarse simplemente por diferencias en el plano de sección relativo, sin embargo, resulta sugestiva la idea de un desfase entre células hermanas a nivel del desplegamiento de la cromatina después de la mitosis, en vista de los resultados obtenidos sobre la pérdida de sincronía de las células hermanas (parte 4.5.).

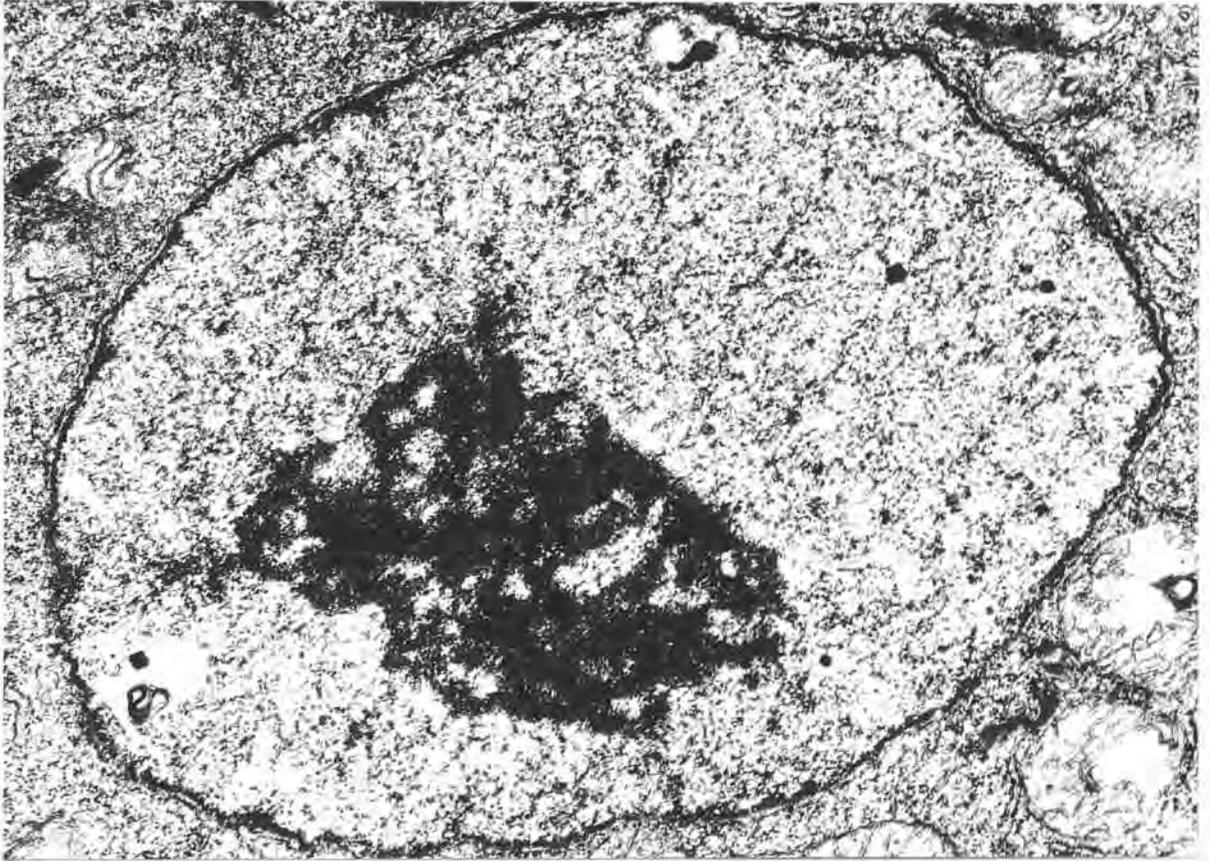


Figura 36 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 6 días. Aumento aproximado 32.000. Núcleo de cromatina bastante laxa, nucléolo de contorno irregular con nucleolonemas y áreas claras pequeñas.

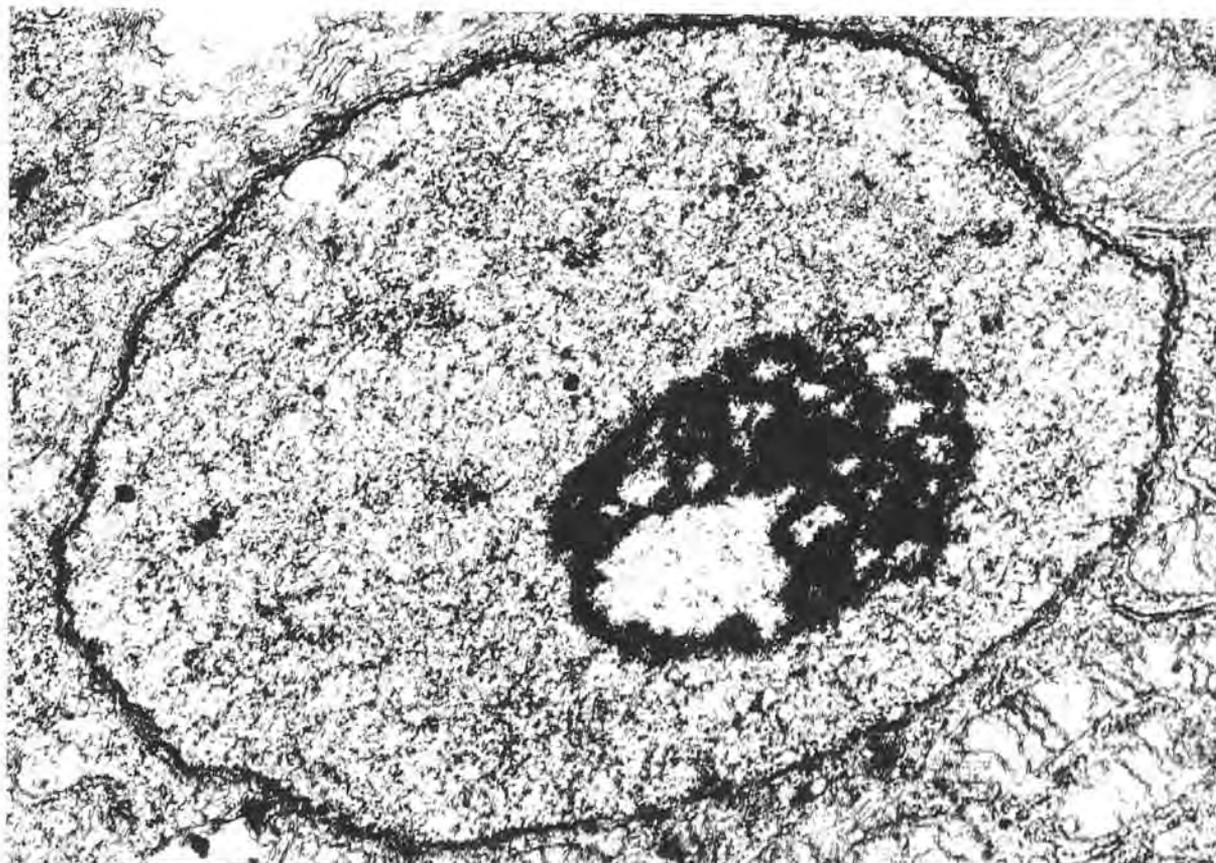


Figura 37 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 6 días. Aumento aproximado 33.000. Núcleo de cromatina bastante laxa, nucléolo con nucleolonemas, destaca una área clara mucho mayor que las demás.

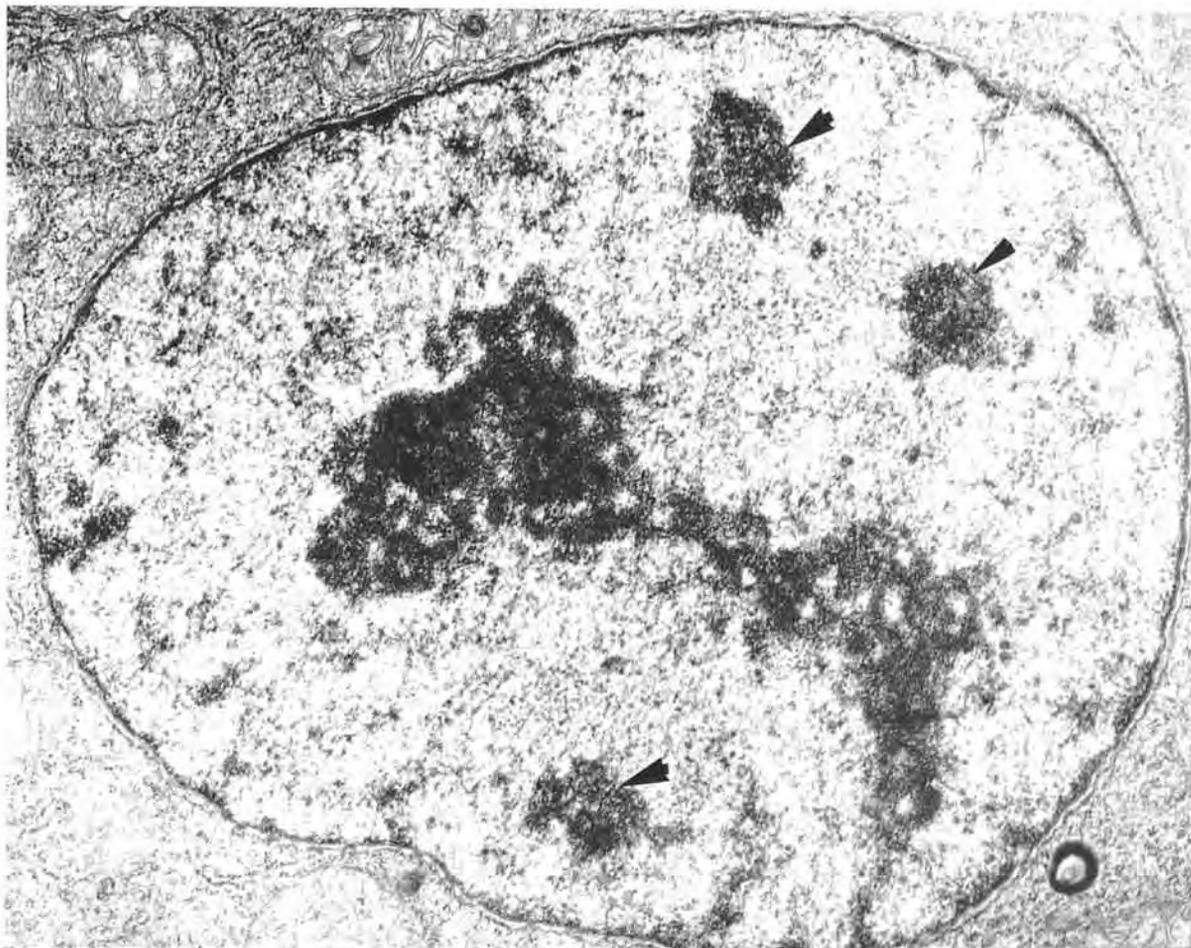


Figura 38 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 30.000. Núcleo con algunos cromocentros (puntas de flecha) y nucléolo de forma irregular con nucleolonemas y áreas claras pequeñas.

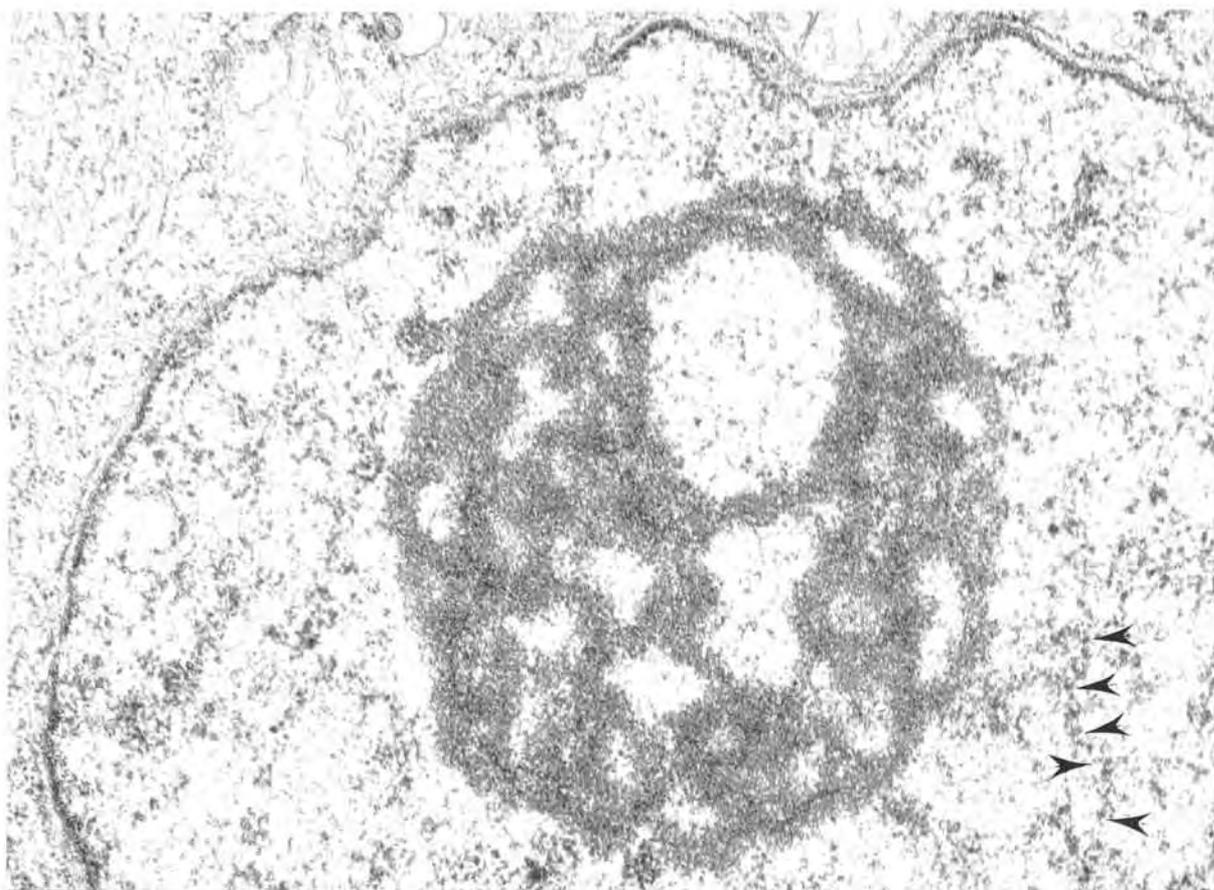


Figura 39 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 52.000. Núcleo con cromatina bastante laxa. Las flechas señalan una fibra de cromatina recubierta por partículas. Nucléolo esferoide con nucleolonemas y áreas claras de diferentes tamaños.

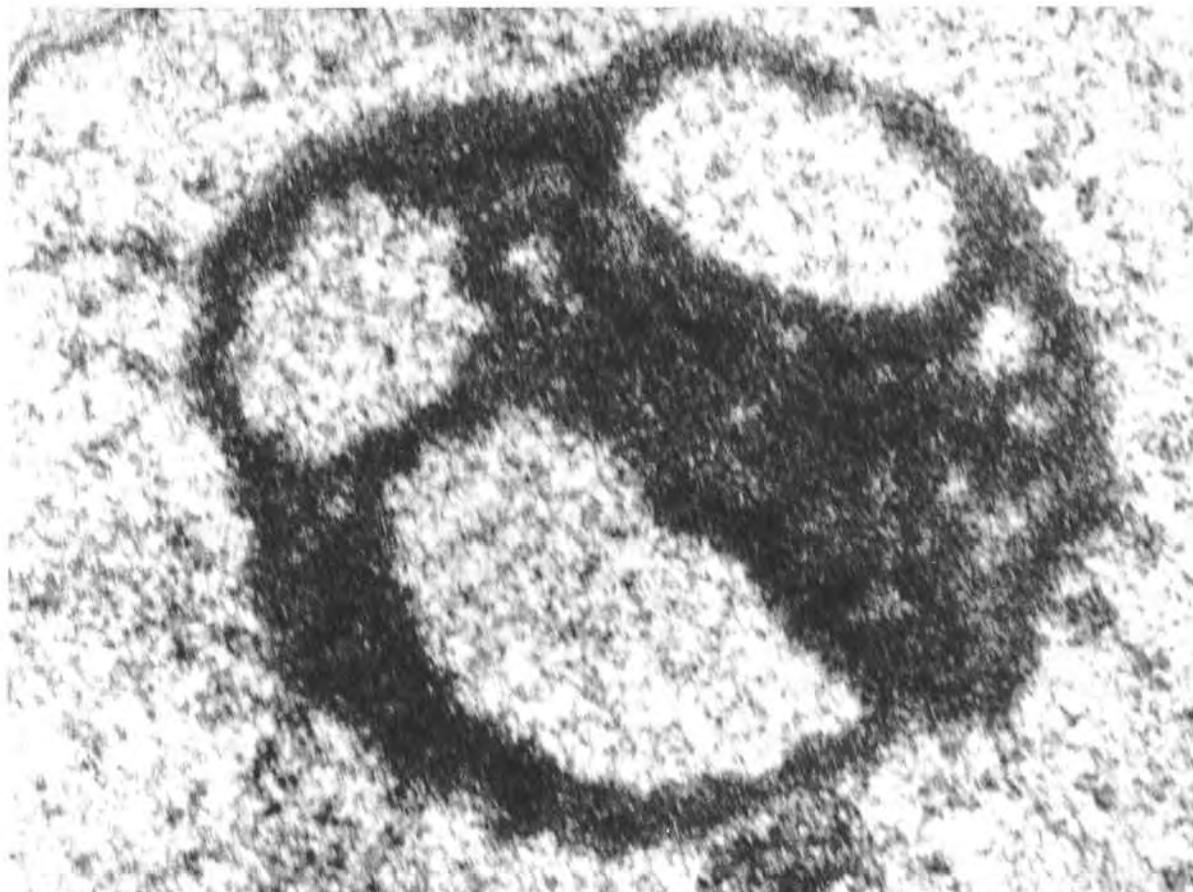


Figura 40 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 65.000. Nucléolo con tres áreas claras grandes.

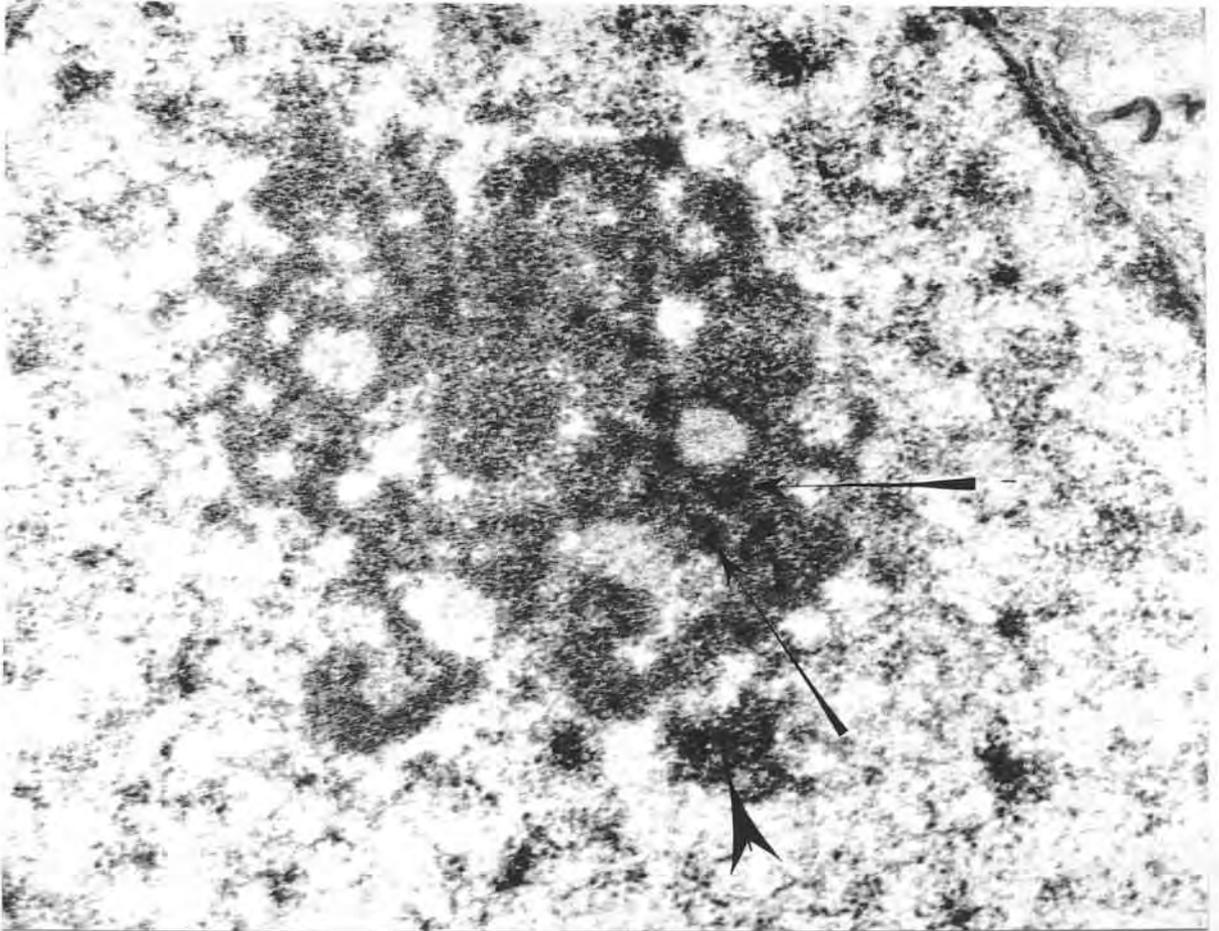


Figura 41 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 44.000. Nucléolo con nucleolonemas y áreas claras pequeñas. Las flechas señalan las regiones fibrilares. Cromocentro señalado con una punta de flecha.

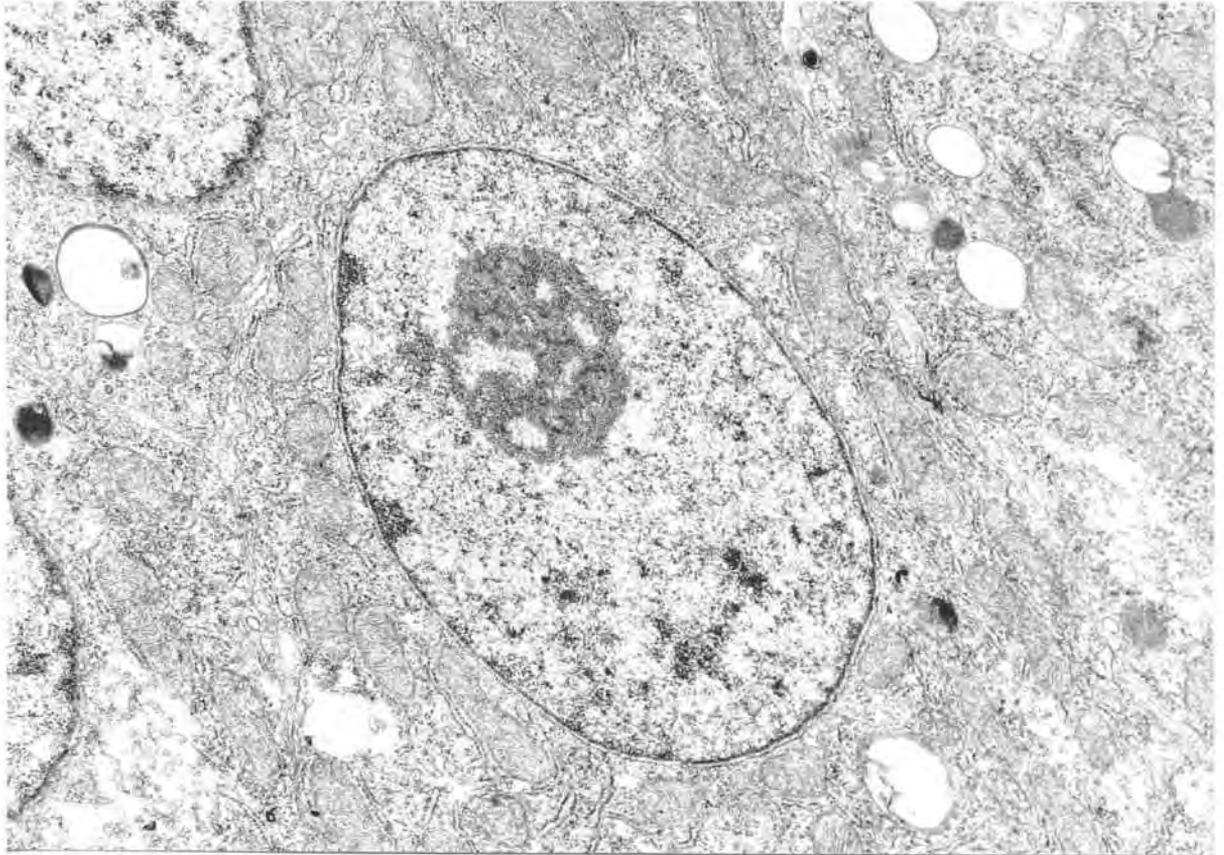


Figura 42 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 22.000. Núcleo con algunos cromocentros y un nucléolo esférico con áreas claras medianas. Alrededor citoplasma con mitocondrias, retículo endoplasmático liso y granular e inclusiones lipídicas.

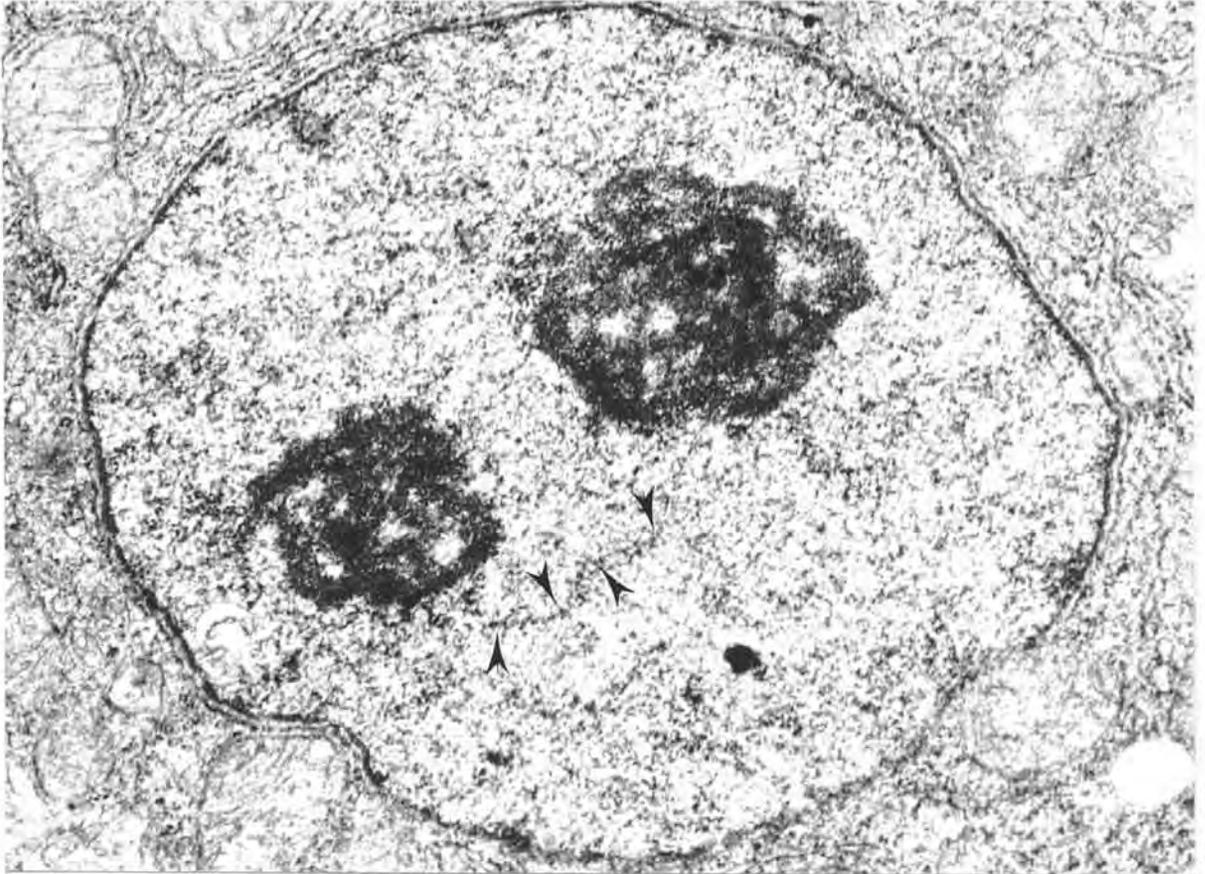


Figura 43 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 40.000. Núcleo con cromatina bastante laxa. Las puntas de flecha señalan una fibra de cromatina recubierta por partículas. Dos nucléolos con nucleolonemas y áreas claras pequeñas.

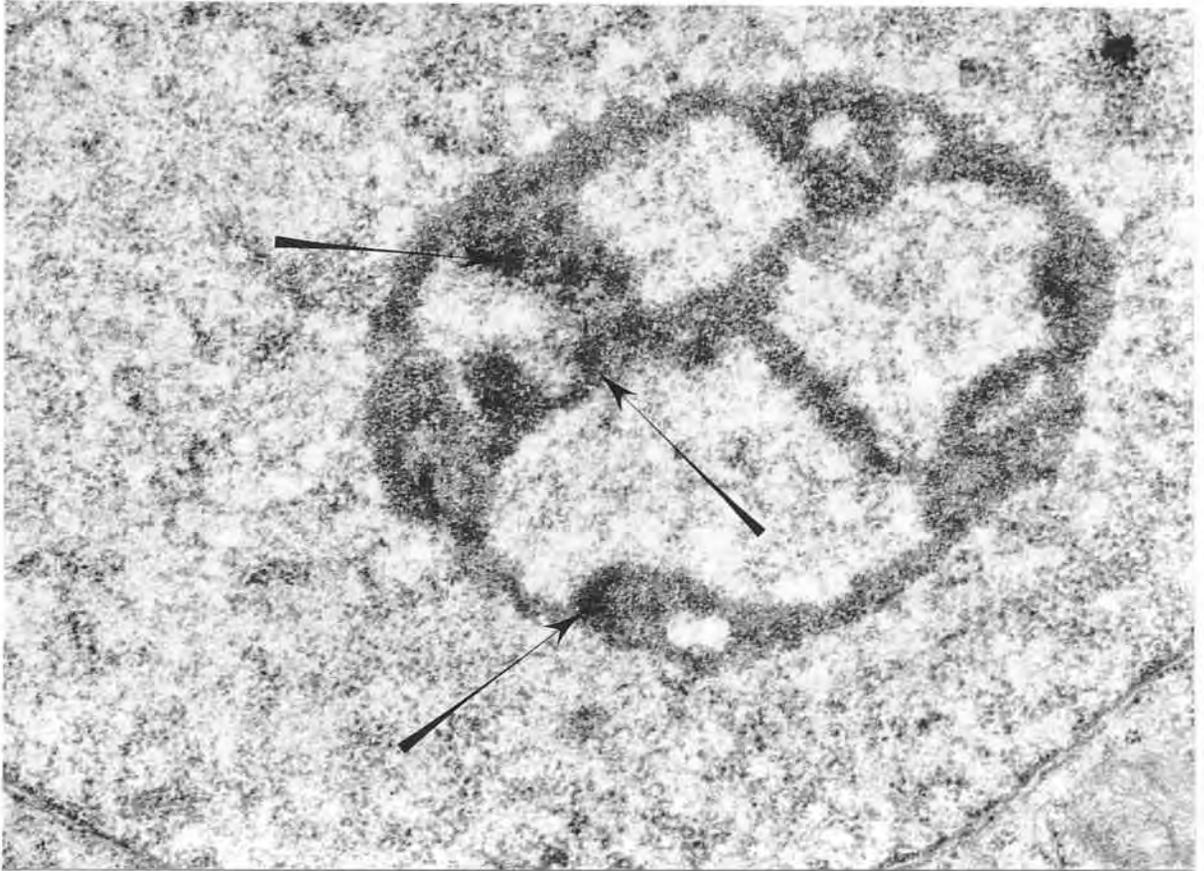


Figura 44 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 40.000. Nucléolo con grandes áreas claras. Las flechas señalan regiones fibrilares.

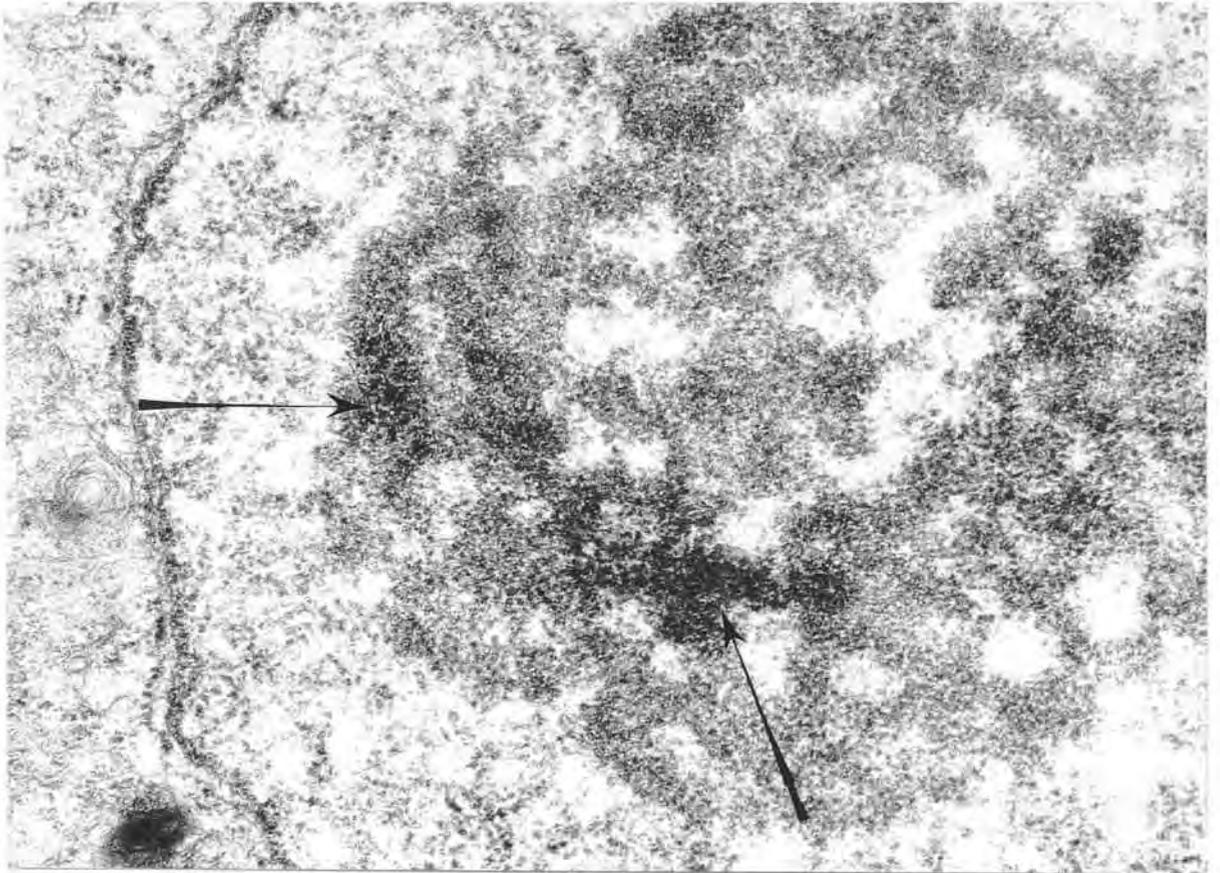


Figura 45 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 64.000. Nucléolo con nucleolonemas y pequeñas áreas claras, las flechas señalan regiones fibrilares.

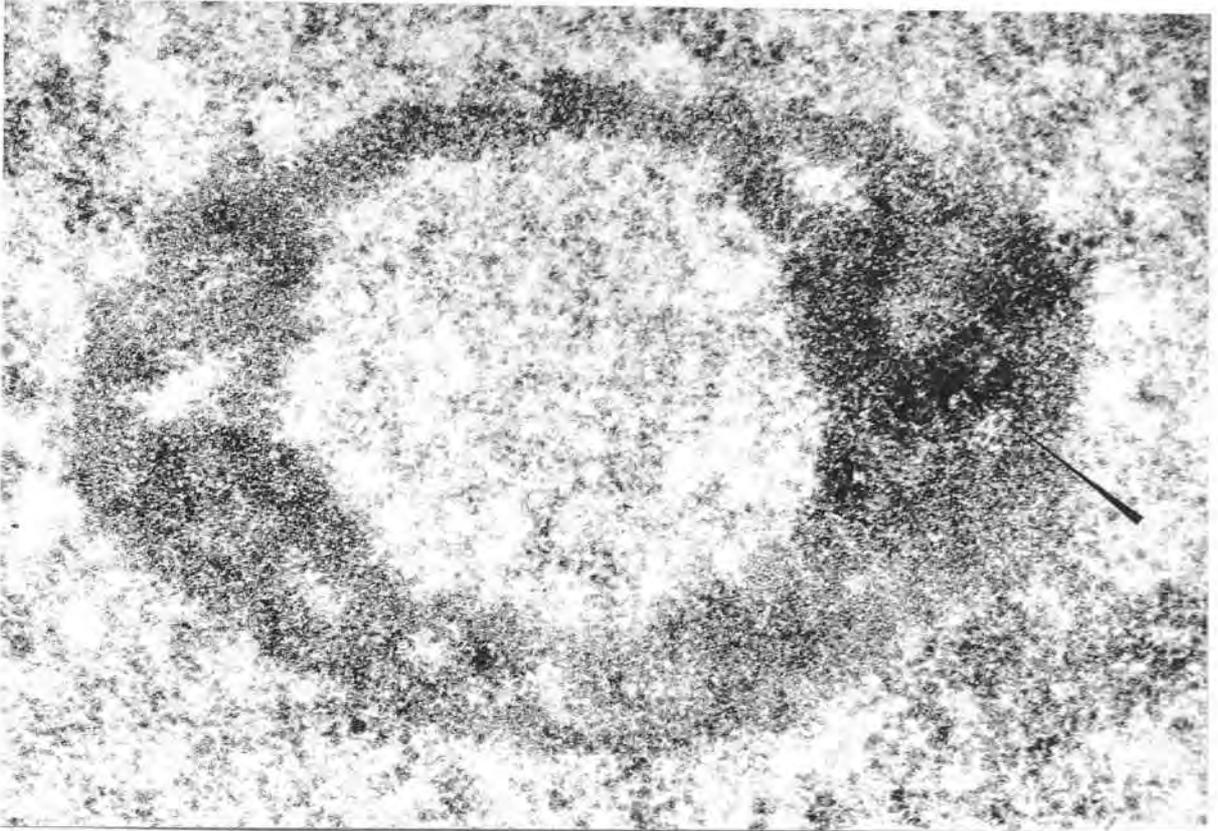


Figura 46 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 82.000. Nucléolo anular. En el seno del anillo que rodea la gran área central se observan áreas claras más pequeñas. La flecha señala una región fibrilar.



Figura 47 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 40.000. Núcleo con un nucléolo casi anular con algunas áreas claras más pequeñas que la central. La punta de flecha señala un cromocentro adyacente al nucléolo.

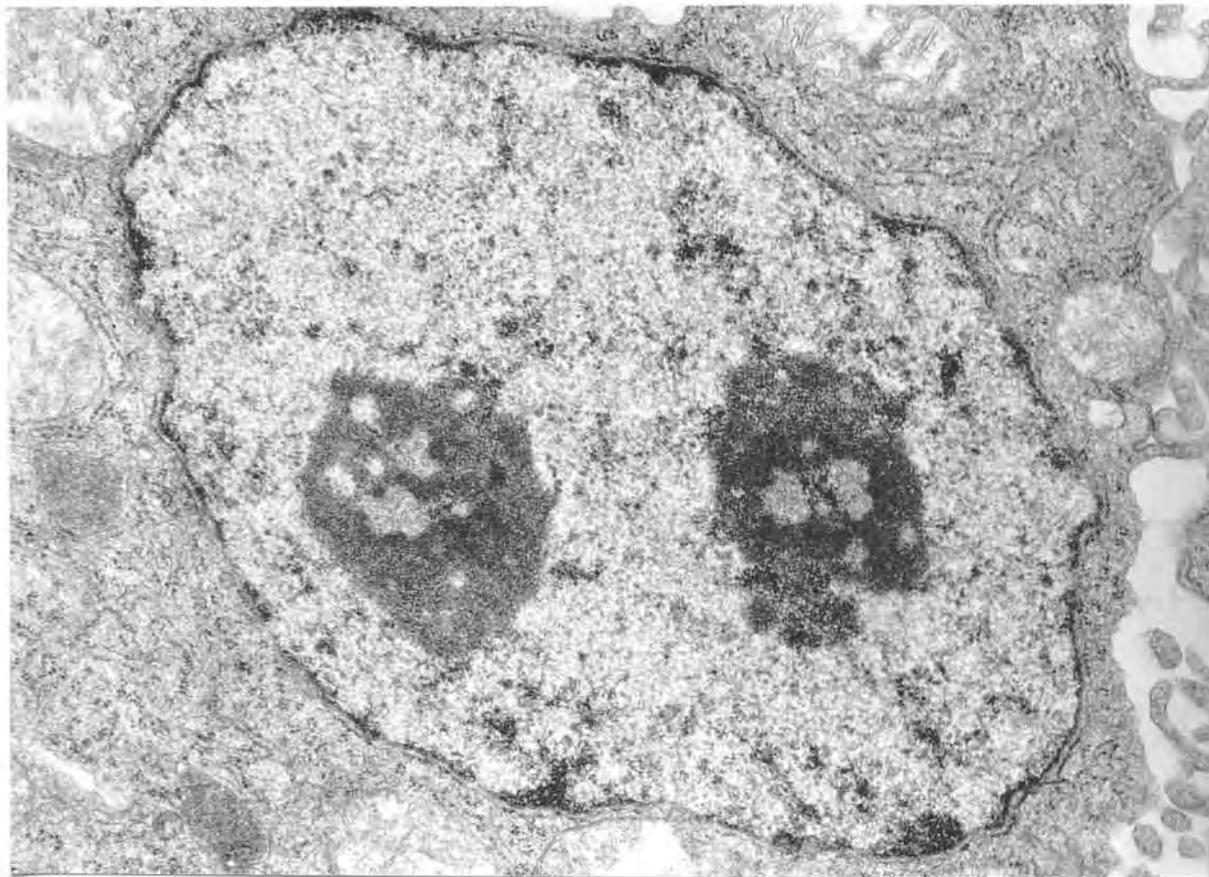


Figura 48 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 41.000. Núcleo con algunos cromocentros de pequeño tamaño. Dos nucléolos esferoides con áreas claras de diferentes tamaños.

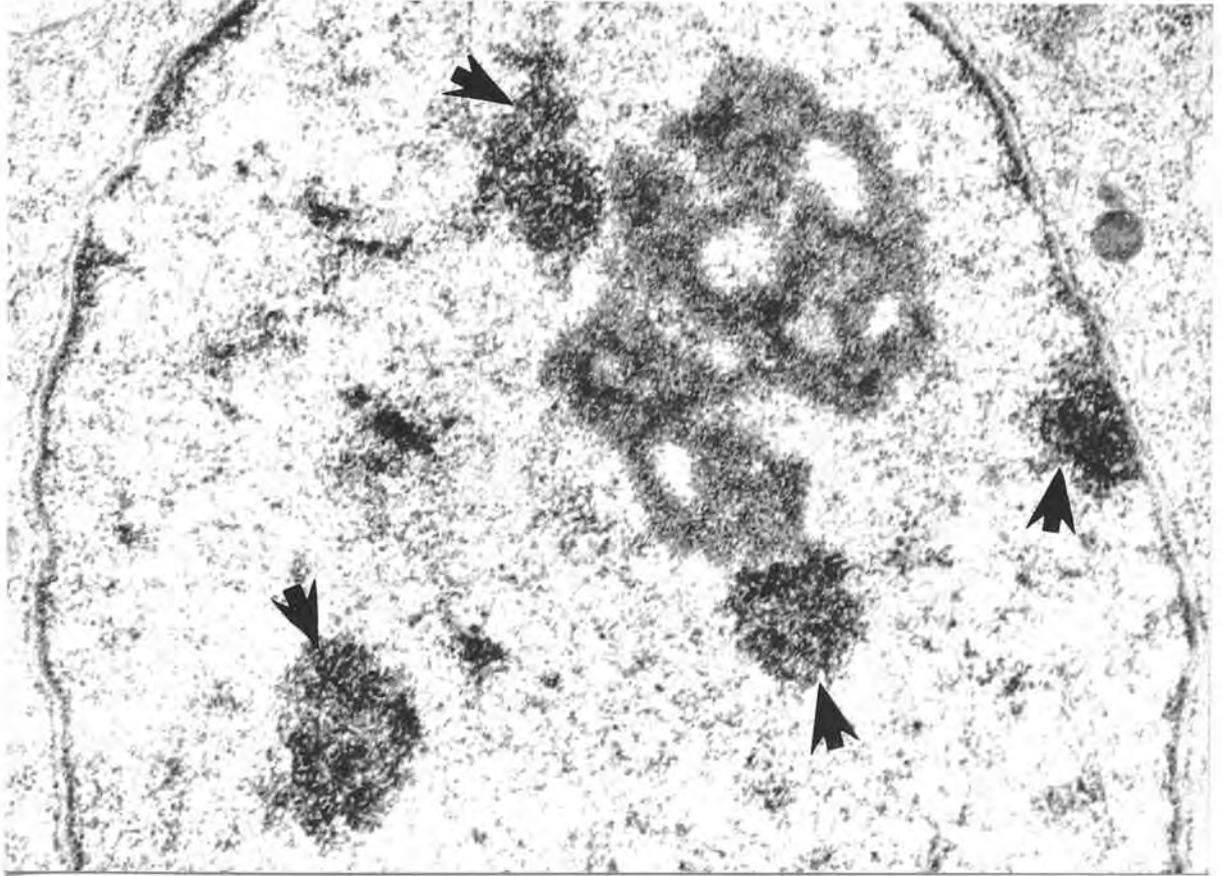


Figura 49 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 49.000. Núcleo con cromocentros de tamaño medio (puntas de flecha), uno de ellos asociado al nucléolo y otro a la envoltura nuclear. La sección del nucléolo es pequeña y presenta algunas áreas claras.

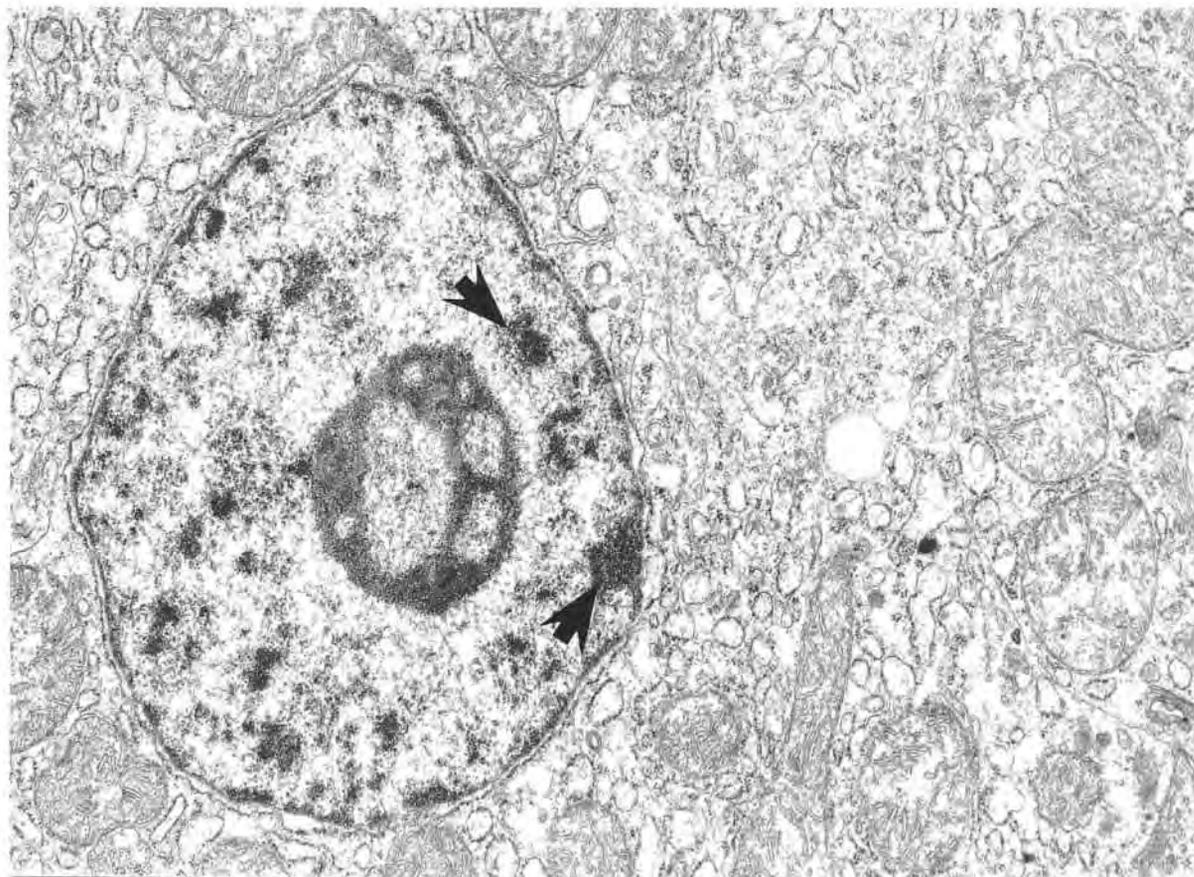


Figura 50 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 22.000. Núcleo con bastantes cromocentros (dos están señalados con puntas de flecha) que podría corresponder a una profase inicial. Nucléolo con tres grandes áreas claras. Alrededor del núcleo, citoplasma con mitocondrias, retículo endoplasmático granular y polisomas libres.

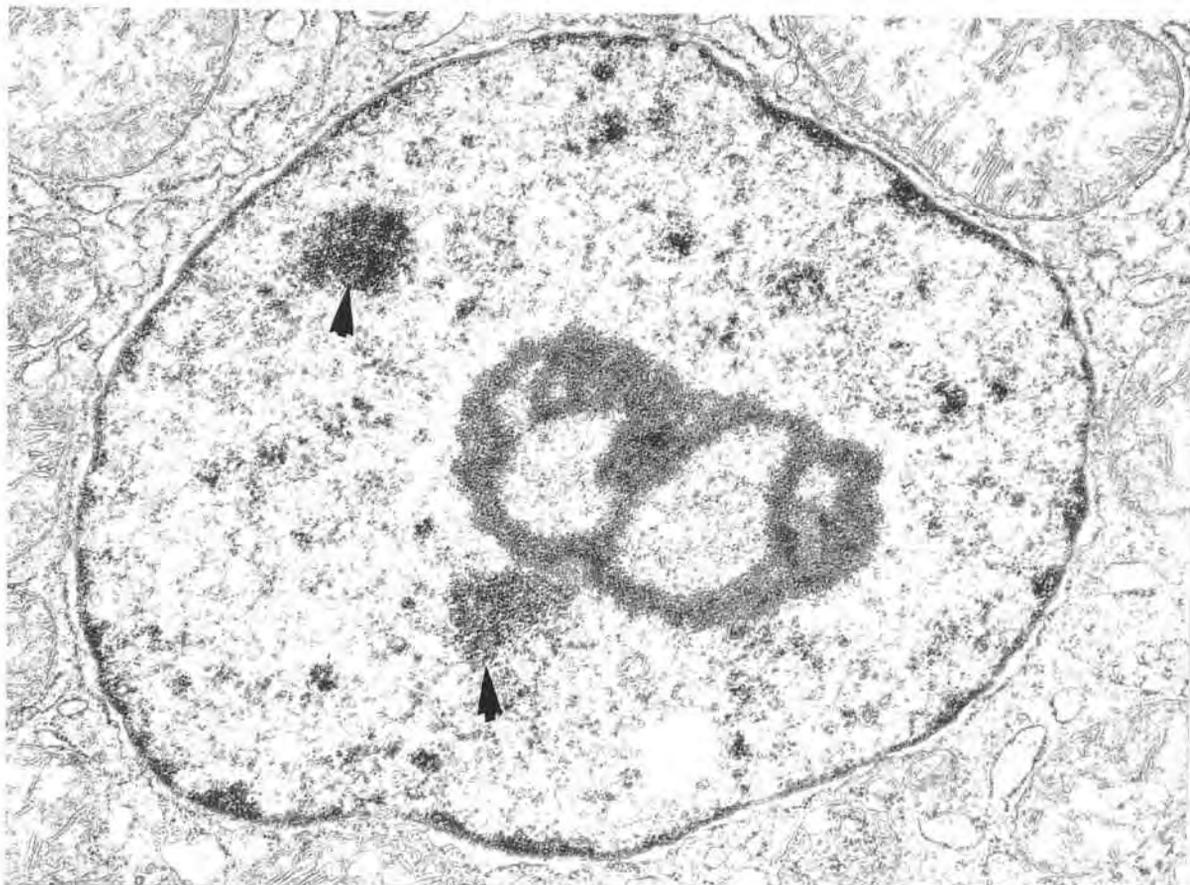


Figura 51 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 31.000. Núcleo con cromatina bastante laxa, en las zonas eucromáticas pueden distinguirse fibras de cromatina, dos cromocentros relativamente grandes : uno de ellos asociado al nucléolo (puntas de flecha). El nucléolo presenta grandes áreas claras.

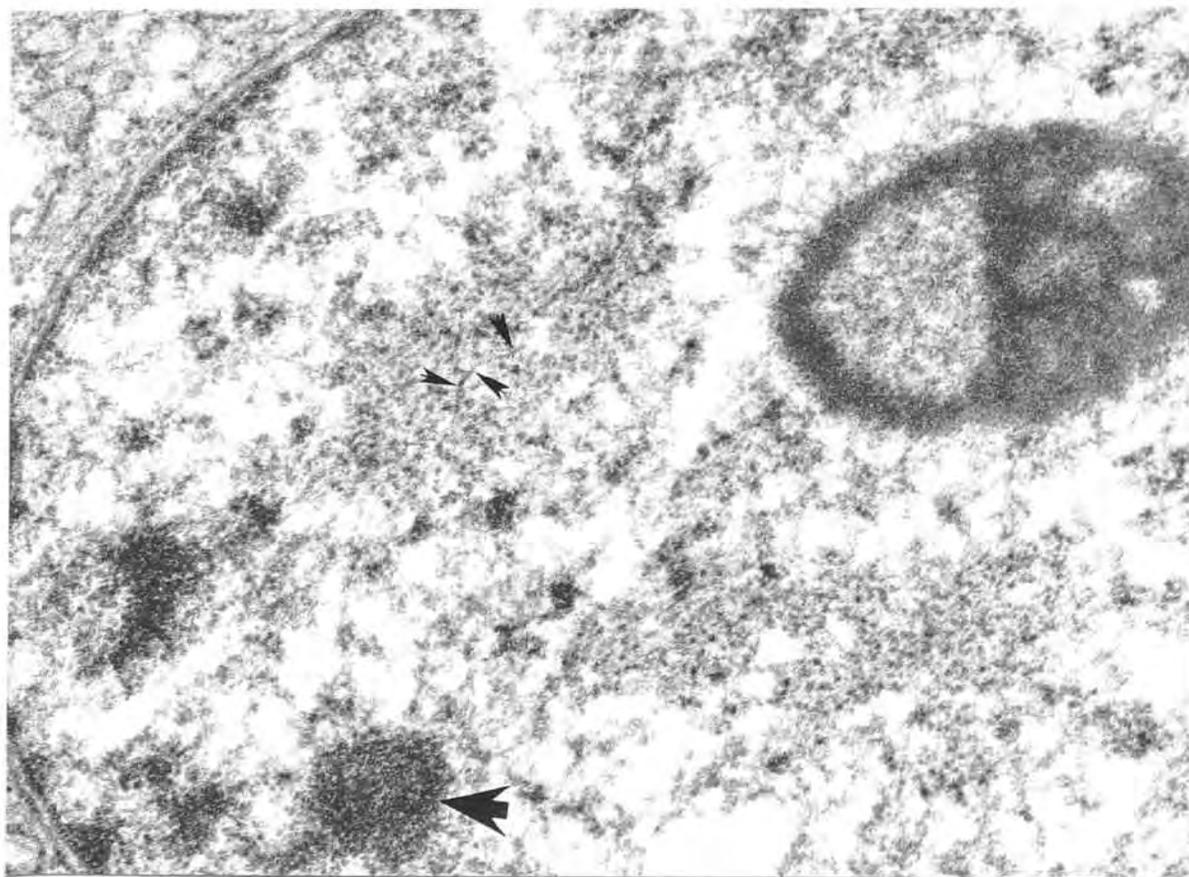


Figura 52 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 45.000. Núcleo con cromatina en diversos grados de condensación, las puntas de flecha pequeña señalan una fibra de cromatina relajada, la punta de flecha grande señala un cromocentro. El nucléolo es pequeño y con una área clara relativamente grande.

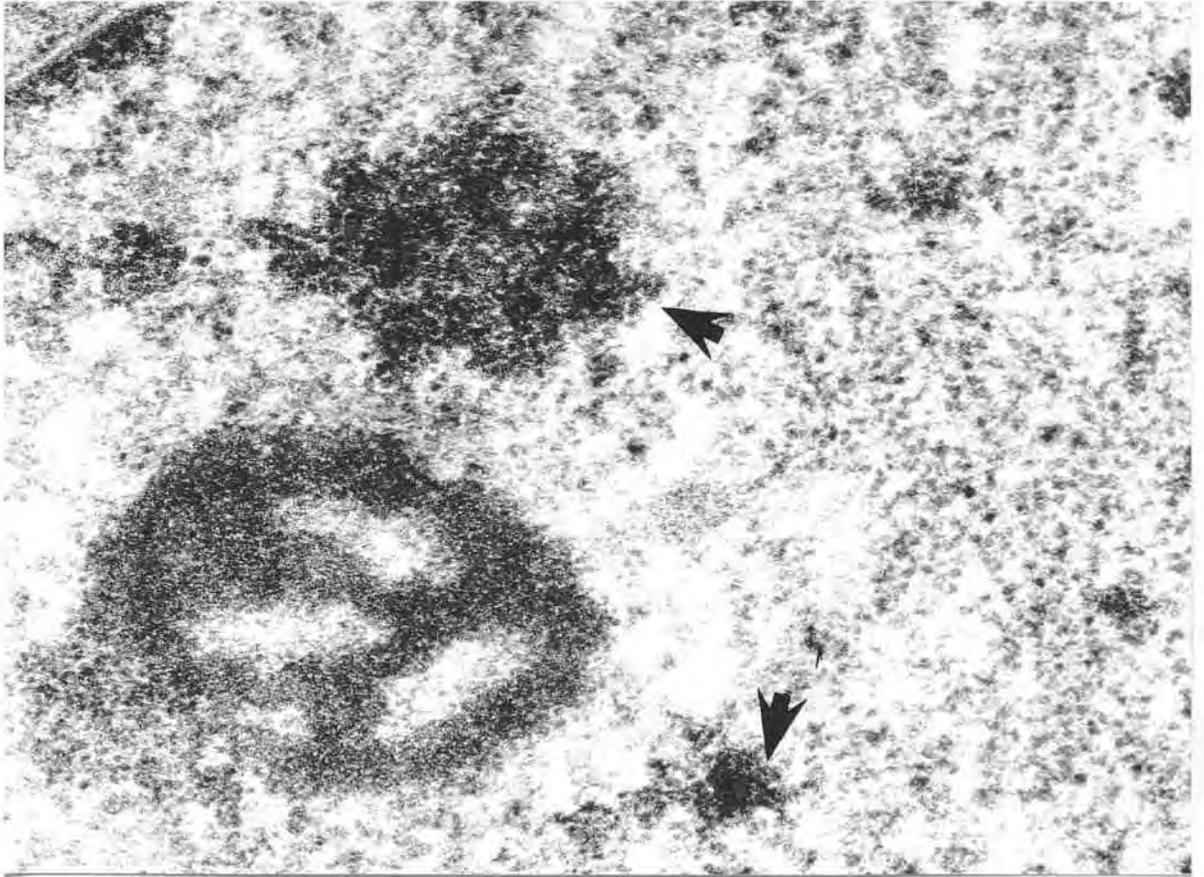


Figura 53 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 84.000. Núcleo en el que destacan algunos cromocentros (puntas de flecha) y un nucléolo pequeño con áreas claras medianas.

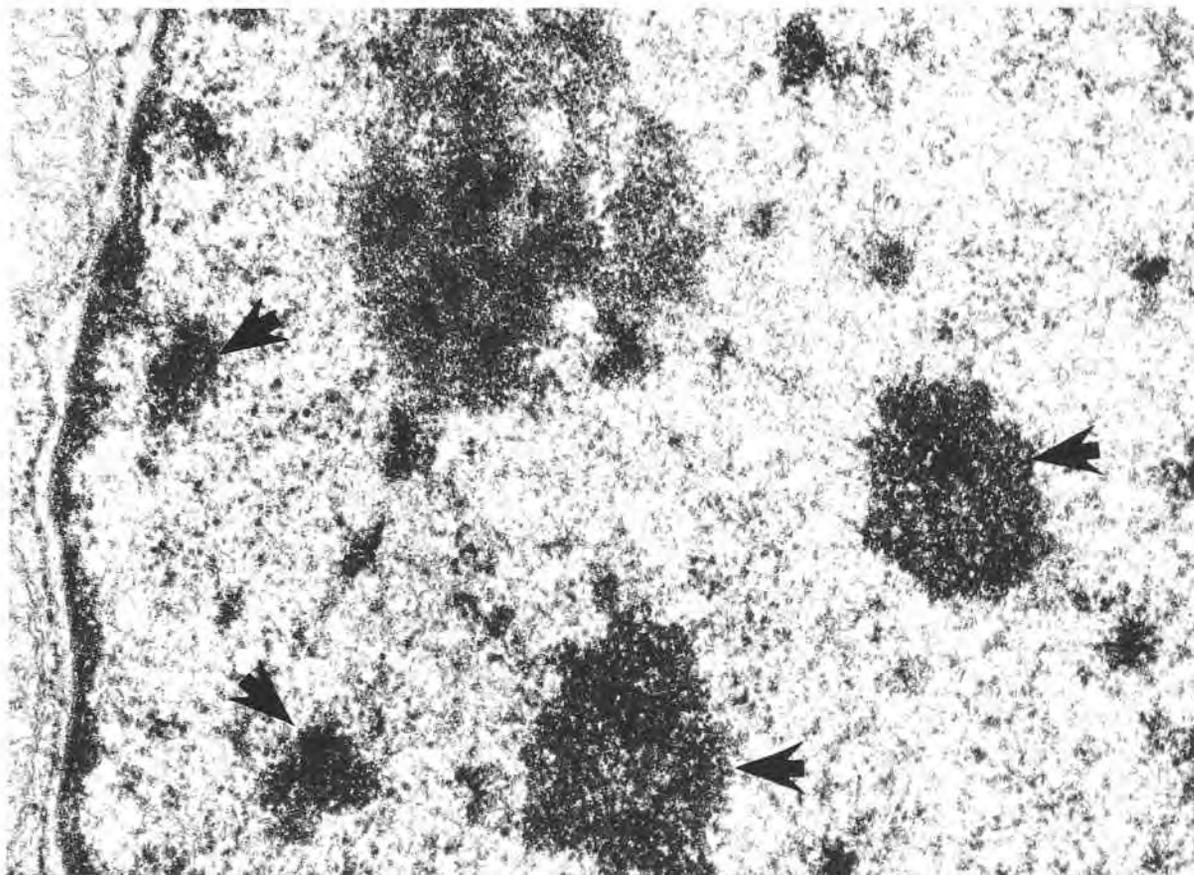


Figura 54 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 64.000. Núcleo en el que se distinguen varios cromocentros (señalados por puntas de flecha) y un nucléolo con pequeñas áreas claras.

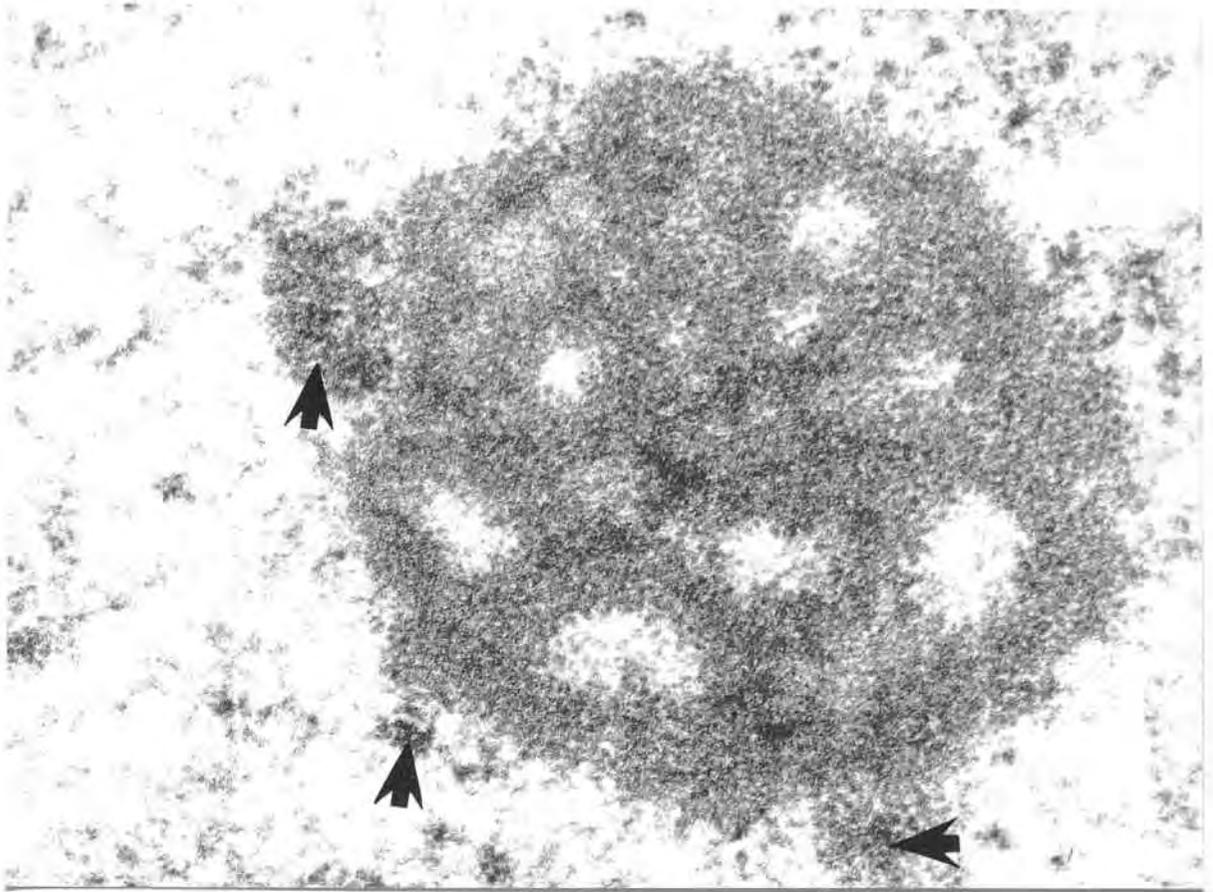


Figura 55 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 92.000. Sección nucleolar con nucleolonemas y pequeñas áreas claras. Las flechas señalan cromocentros asociados al nucléolo.

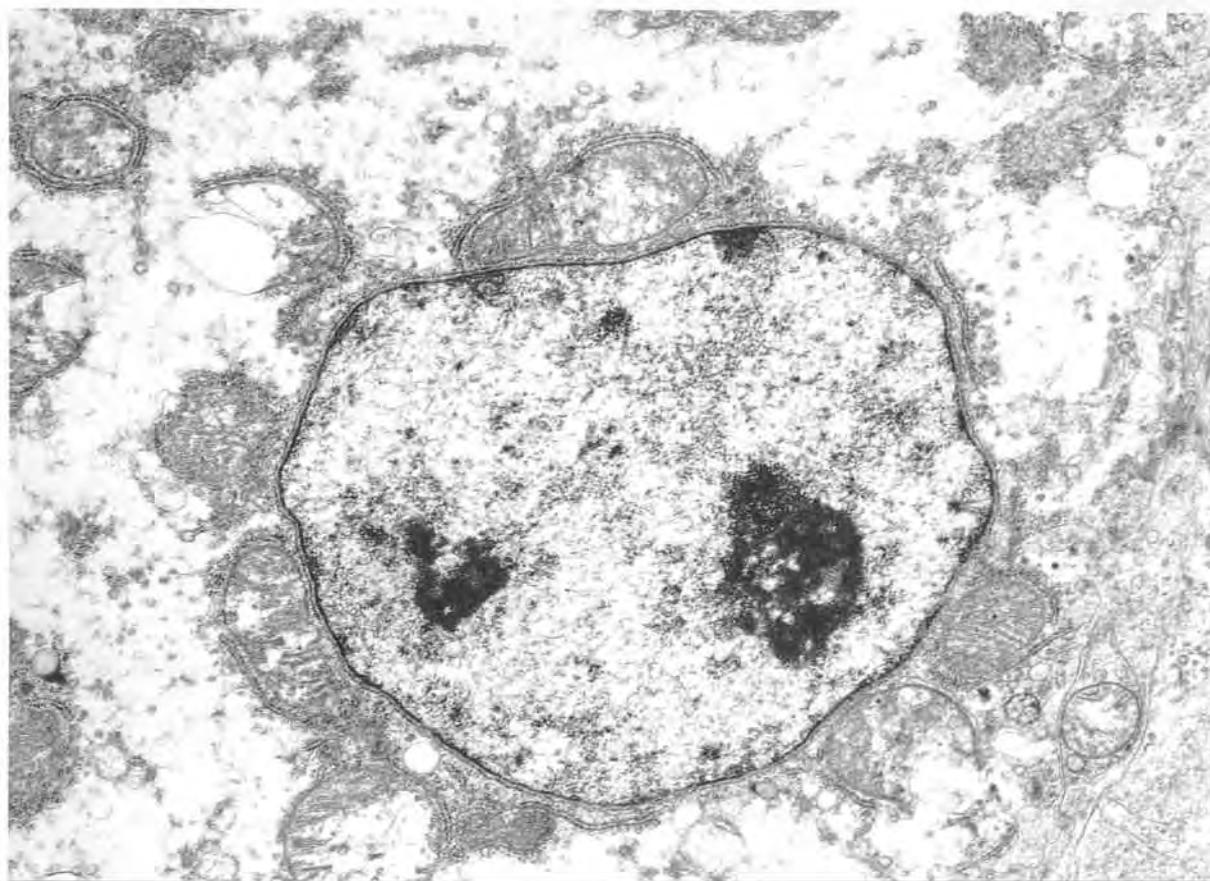


Figura 56 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 19.000. Núcleo de cromatina bastante relajada con dos nucléolos. Alrededor, citoplasma con mitocondrias, retículo endoplasmático granular y depósitos de glucógeno.

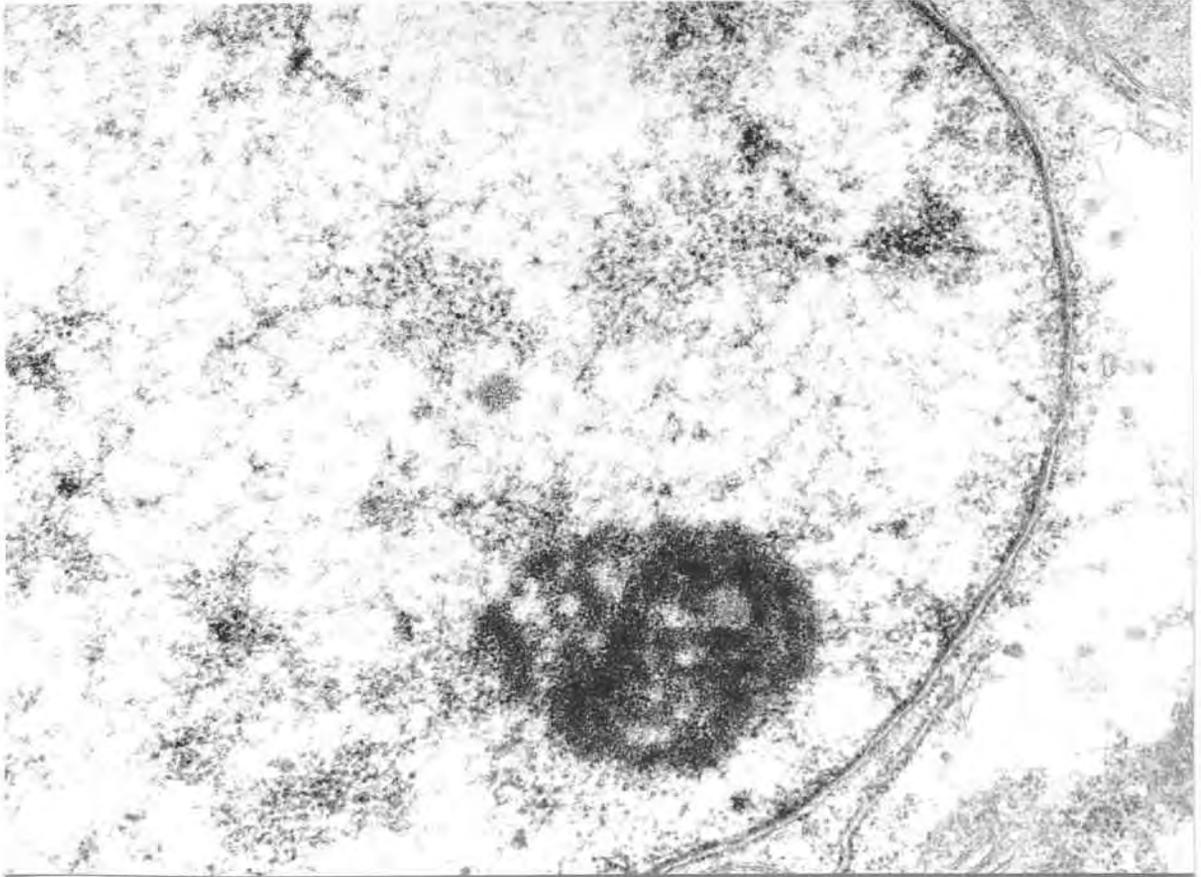


Figura 57 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 36.000. Núcleo con cromatina muy relajada en la que pueden identificarse fibras, partículas densas y un nucléolo esferoide pequeño y bastante compacto con algunas áreas claras pequeñas.

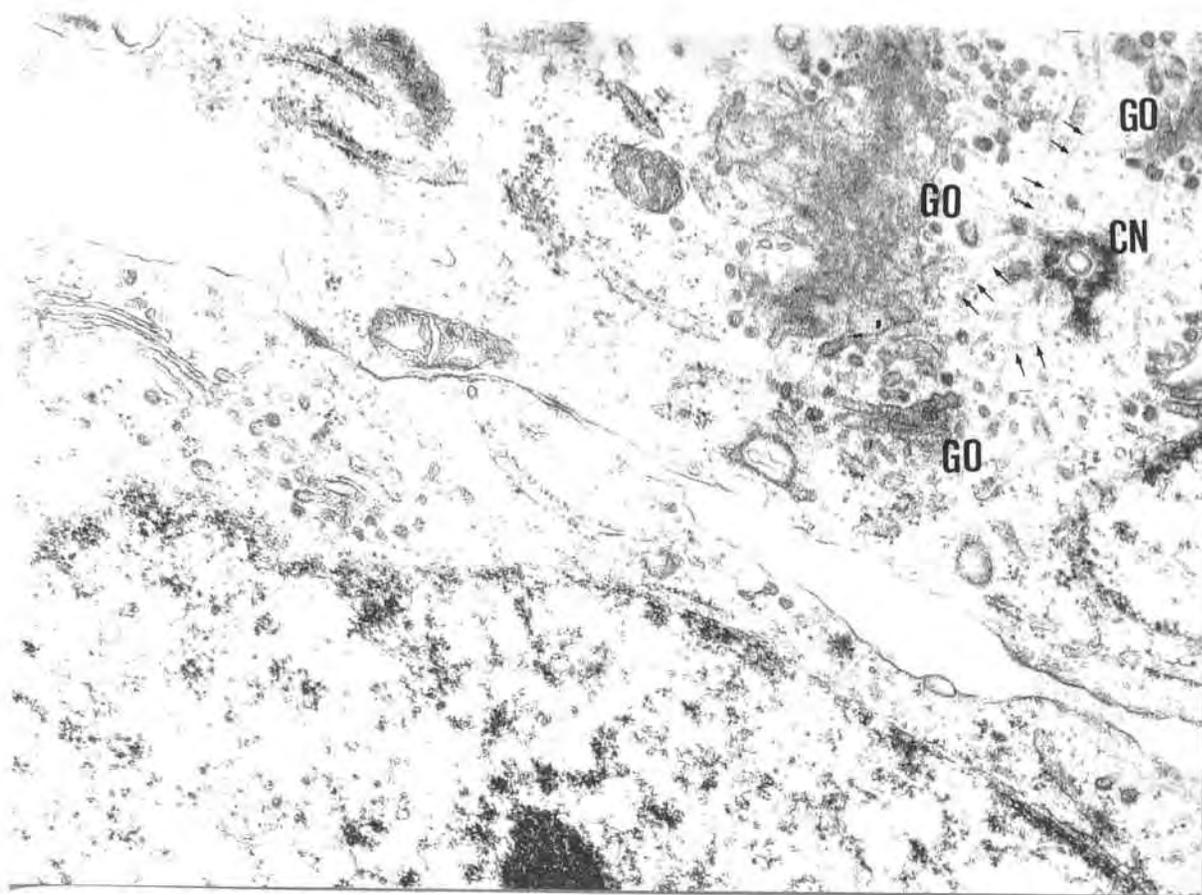


Figura 58 : ME de células del mesénquima hepático de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 39.000. Se observan dos células, en la superior aparece un centriolo (CN) rodeado por vesículas del aparato de Golgi (GO) con las cuales parece conectar mediante microtúbulos (flechitas).

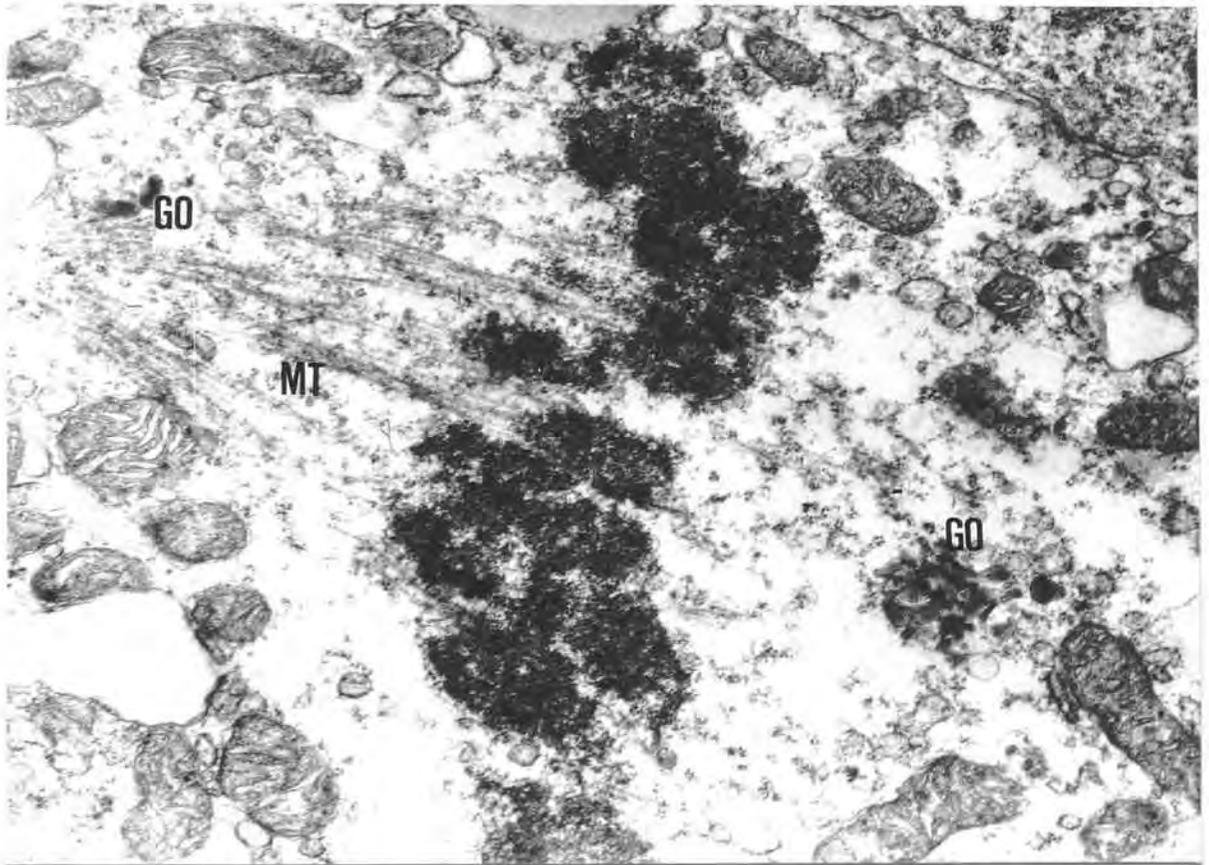


Figura 59 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 6 días en mitosis. Aumento aproximado 23.000. Metafase, la sección es paralela al eje del aparato mitótico. Se observan los cromosomas en la placa ecuatorial, algunos microtúbulos (MT) de uno de los semihusos y algunas vesículas del aparato de Golgi (GO) en los polos que marcan aproximadamente la situación de los centriolos no visibles en la sección.

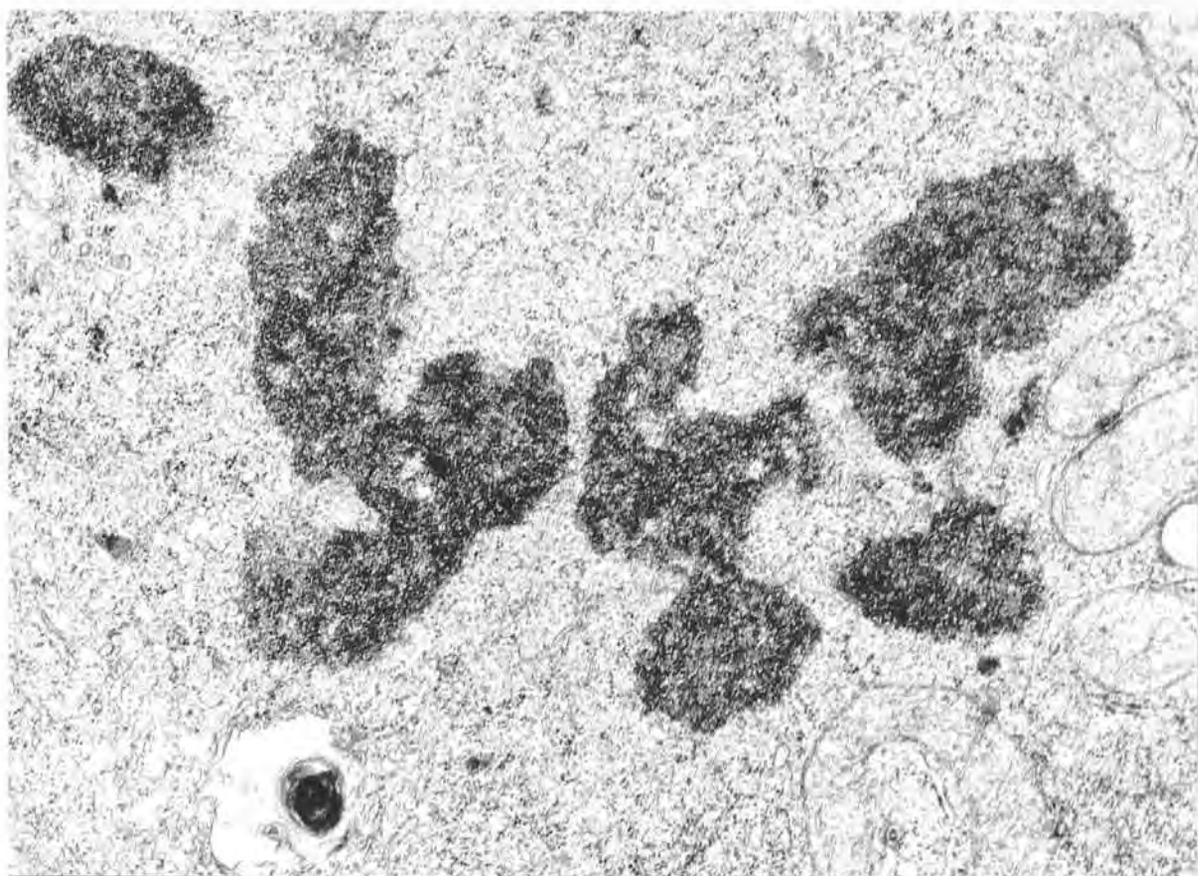


Figura 60 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días en mitosis. Aumento aproximado 32.000. Metafase, la sección es ecuatorial o paraecuatorial. Pueden observarse partes de cromosomas.

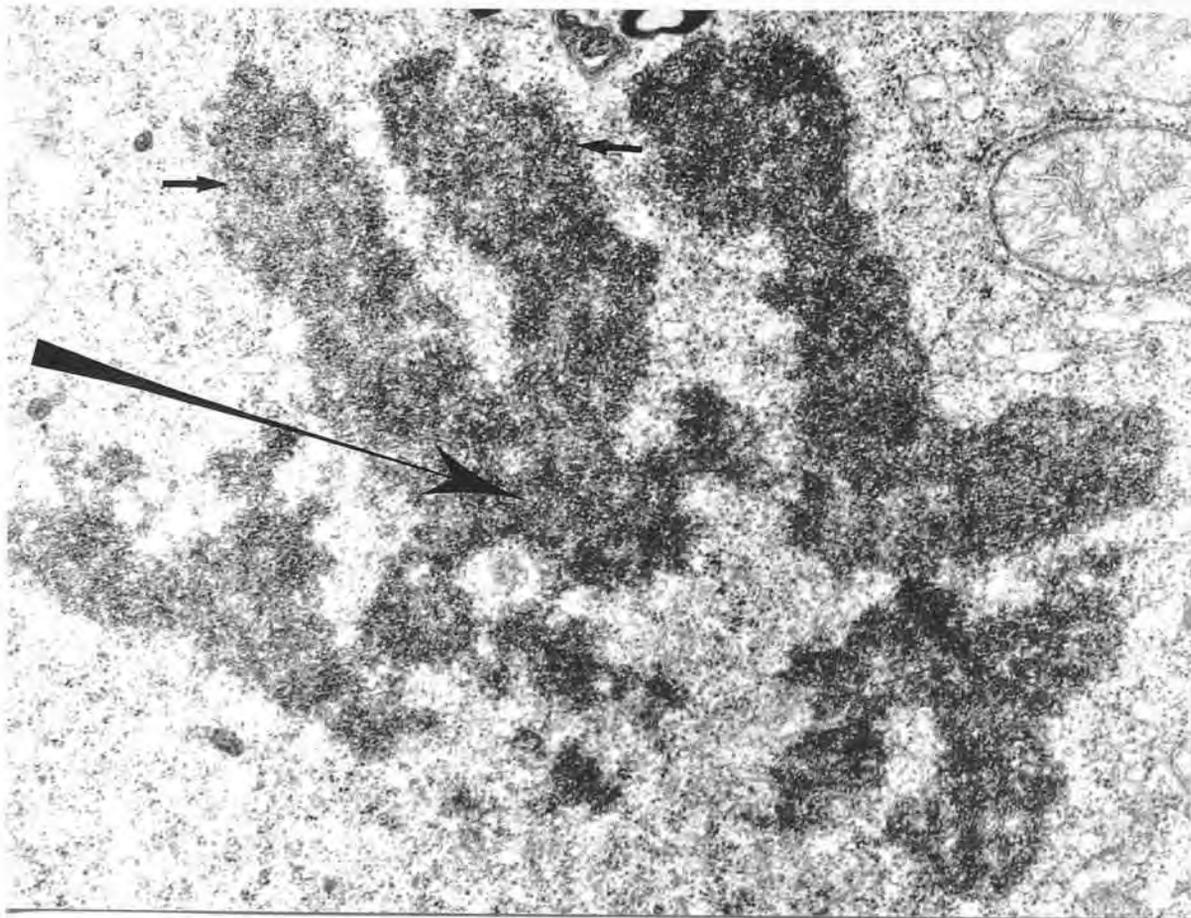


Figura 61 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días en mitosis. Aumento aproximado 36.000. Metafase, la sección es ecuatorial o para - ecuatorial. Pueden observarse partes de cromosomas, la flecha larga señala el centrómero de un cromosoma y las cortas sus dos cromátidas.

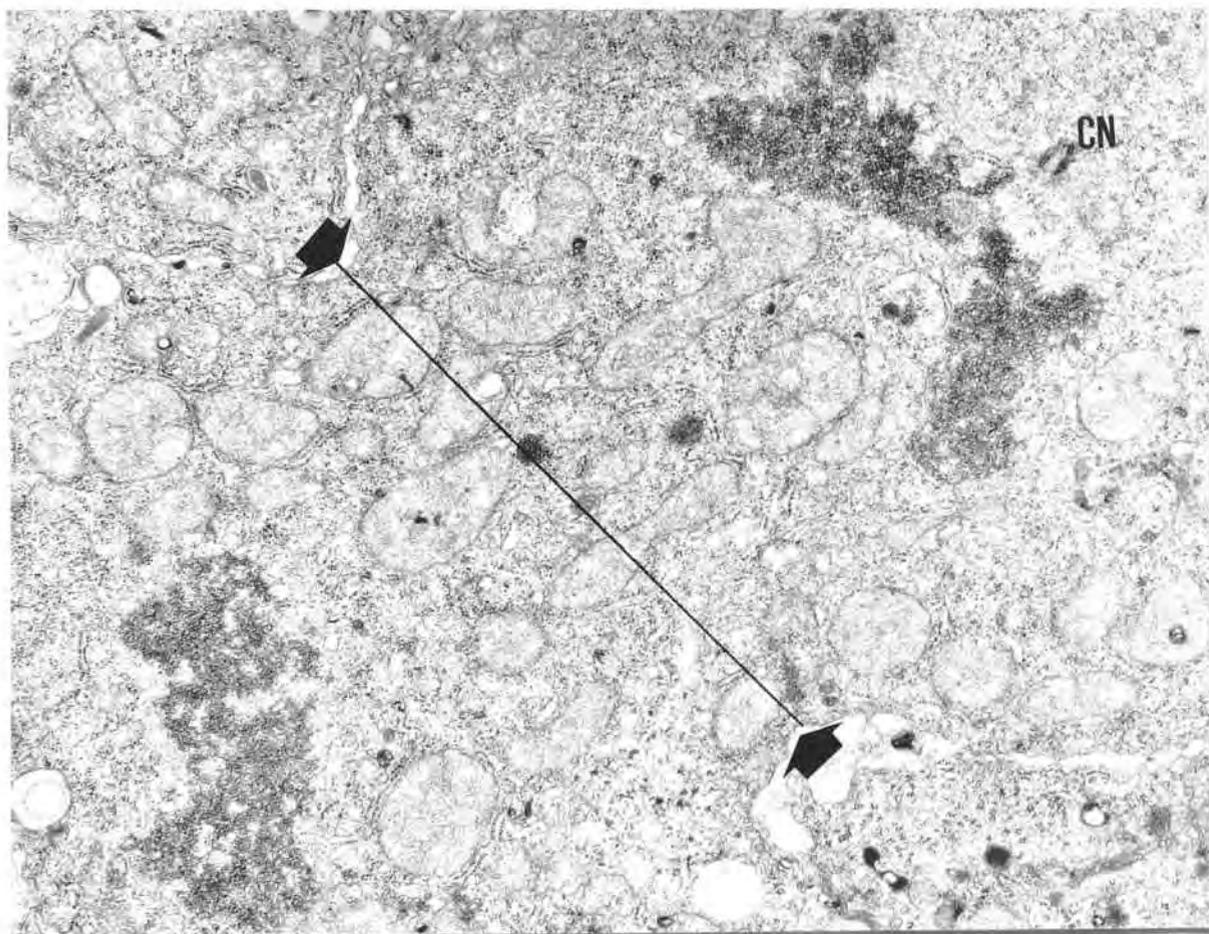


Figura 62 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días en mitosis. aumento aproximado 18.000. Telofase, la sección es aproximadamente paralela al eje del aparato mitótico. Puede observarse un centriolo (CN) en uno de los polos. Obsérvese también el distinto grado de condensación de los cromosomas en los núcleos hijos. Las puntas de flecha gruesa señalan la constricción citoplasmática de la citocinesis que se está iniciando y la línea que las une marca la posición probable del plano de división celular.

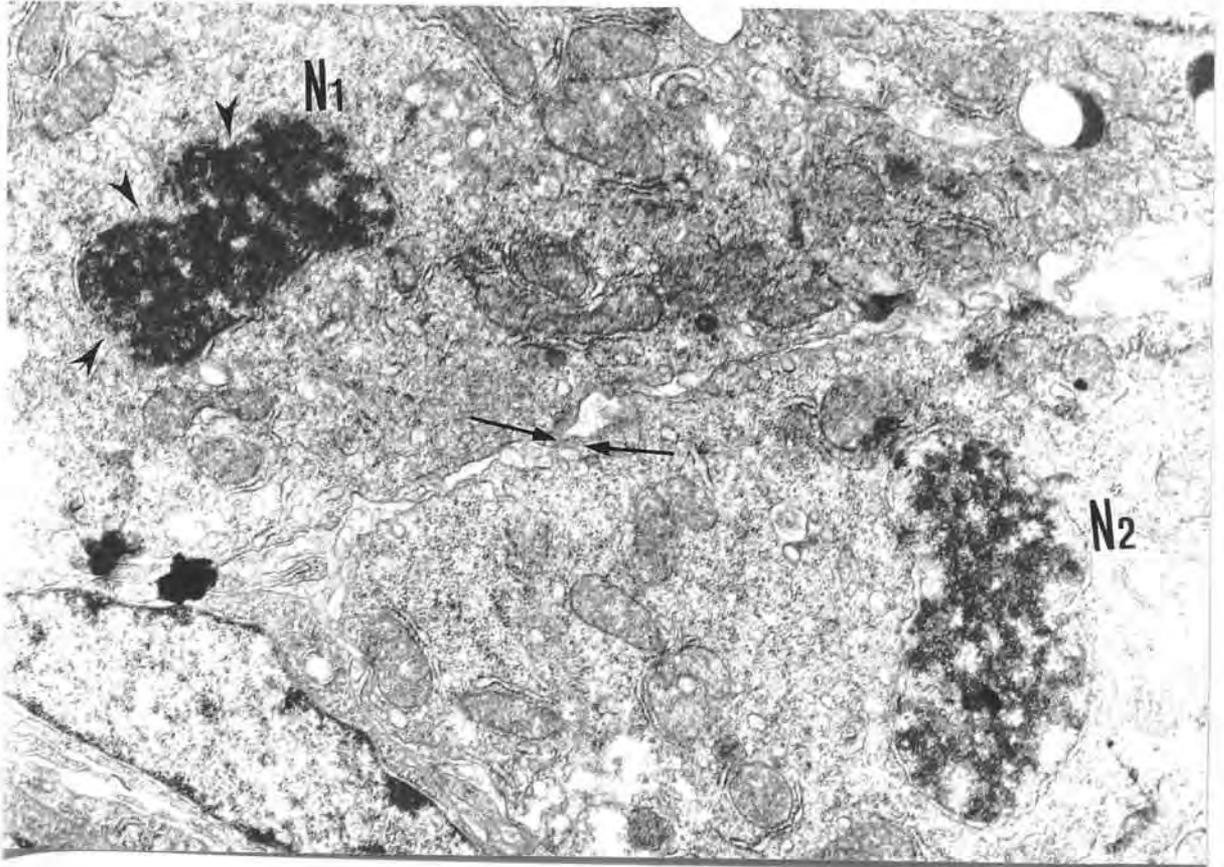


Figura 63 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 9 días en mitosis. Aumento aproximado 17.000. Telofase tardía con citocinesis terminada, la sección es aproximadamente paralela al eje de rotación del aparato mitótico. Las flechas señalan un puente citoplasmático entre las células hijas. Obsérvese el distinto grado de condensación de los cromosomas entre los dos núcleos hijos. El núcleo más relajado (N_2) tiene la envoltura ya reconstruida, mientras que el más condensado (N_1) presenta todavía zonas sin envoltura (puntas de flecha).

b) Citoplasma.

La diferenciación del hepatocito durante el desarrollo embrionario se manifiesta en importantes modificaciones en las proporciones relativas de los diversos orgánulos o compartimentos morfométricos celulares y consecuentemente en el patrón funcional de la célula.

Durante el desarrollo, el citoplasma del hepatocito crece mucho más que el núcleo, en realidad el tamaño medio de éste disminuye algo, con lo que decrece el valor de la relación de volúmenes Núcleo/Célula (Tabla 17 y Fig. 34). El crecimiento del citoplasma no se realiza de manera uniforme para todos los componentes. En las Tablas 17 y 18 y en las figuras 34 y 35 se muestran los resultados del estudio morfométrico realizado entre los días 6 y 20 del desarrollo, expresados en forma relativa, es decir, en fracciones de volumen celular (Tabla 17 y Fig. 34) y en forma absoluta : Volumen en micras³ del orgánulo o compartimento celular (Tabla 18 y Fig. 35) :

La fracción de volumen correspondiente al compartimento mitocondrial presenta un máximo a los 15 días, lo cual es interesante ya que coincide con el máximo de las actividades palmitil-carnitina transferasa, acetil-CoA sintetasa y palmitil-CoA sintetasa en el hígado de embrión de pollo (Warshaw 1972), siendo las dos primeras enzimas mitocondriales y la tercera con una fracción mitocondrial y otra citoplasmática.

Otro cambio destacado es el aumento de la fracción de volumen correspondiente a las inclusiones lipídicas entre los días 10 y 20.

La suma de los dos compartimentos cuantificados (mitocondrial y lipídico) representa únicamente el 18 % del volumen del citoplasma en el embrión de 10 días, el 22 % en el de 15 y el 24 % en el de 20. El resto de citoplasma (82 %, 78 % y 76 % respectivamente) corresponde al retículo endoplasmático liso y granular, aparato de Golgi y derivados y al hialoplasma conteniendo polisomas libres, depósitos de glucógeno etc. Aunque no hemos realizado un estudio morfométrico de cada uno de estos componentes, la simple observación de las imágenes de la microscopía electrónica permite describir las principales características

y modificaciones que les afectan.

Las figuras 64 a 83 corresponden a fotografías de la microscopía electrónica de secciones de citoplasma de hepatocito embrionario de 8 días (64 y 65), 9 días (66), 10 días (67), 12 días (68 y 69), 15 días (70 a 73 y 82), 20 días (74 a 77) y de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión (78, 79, 80 y 83).

Es posible que las modificaciones en la fracción de volumen del compartimento mitocondrial sean debidos principalmente a cambios en el número de mitocondrias por célula, ya que la simple inspección no revela diferencias importantes en el tamaño y en la forma. Sin embargo, la importancia relativa de las modificaciones del número y del tamaño individual de los orgánulos únicamente podría determinarse mediante un análisis morfométrico adecuado.

El aspecto y el tamaño de las inclusiones lipídicas es distinto según la edad del embrión: Hasta el día 12 aproximadamente las inclusiones presentan una corteza muy electrodensa y asimétrica que encierra una porción central más clara, que tiene la densidad común a las inclusiones lipídicas generalmente observadas en las células (Fig. 64, 66, 67 y 68). En algunos casos, la parte densa parece una partícula independiente unida a una partícula más clara. En el embrión de 15 días, las inclusiones lipídicas son de mayor tamaño y constituidas por el componente electroclaro rodeado de una corteza electrodensa más delgada y uniformemente distribuida (Fig. 70 a 73). Las inclusiones del embrión de 20 días (Fig. 74 a 76) son todavía de mayor tamaño y su corteza electrodensa más delgada y uniformemente distribuida, tiene un espesor aproximadamente igual al del conjunto de las dos membranas mitocondriales y el espacio que las separa.

Todas las inclusiones se encuentran limitadas exteriormente por una membrana con la estructura de membrana unitaria característica (Fig. 67).

En algunas fotografías (Fig. 72, 75 y 76) es posible observar imágenes de inclusiones lipídicas unidas, indicando o una fusión de dos inclusiones o bien su escisión.

El aumento de tamaño de las inclusiones es probablemente más importante que el aumento en el número de las mismas como factor responsable del incremento observado en la fracción de volumen celular correspondiente a las inclusiones lipídicas.

Para la interpretación de las imágenes descritas debe tenerse en cuenta que su composición varía a lo largo del desarrollo : Inicialmente se componen principalmente de fosfolípidos y a partir del día 11 empiezan a acumular colesterol (Romanoff 1960). Podría suponerse que la corteza electrodensa estuviera formada principalmente por fosfolípidos que son muy osmiofílicos y la parte central más clara por colesterol y triglicéridos, ya que el aumento de tamaño de las inclusiones se debe al de la parte central clara y coincide con el período de acumulación de colesterol, es decir a partir del día 11. Sin embargo, esta interpretación presenta el problema de explicar por qué los diferentes lípidos se mantienen separados en lugar de mezclarse.

Otra interpretación posible consiste en suponer que únicamente la parte central contiene lípidos mientras que la corteza densa estaría constituida por proteínas, de forma semejante a los lipocondrios del ovocito de los anfibios (Balinsky 1978). Cabría también la posibilidad de que la parte densa proviniera de un lisosoma y que el conjunto sea en realidad un lipo-lisosoma o lipo-fagosoma.

En los primeros días del desarrollo hepático los ribosomas se encuentran mayormente en forma de polisomas libres en el hialoplasma y solamente se observan algunos pocos elementos del retículo endoplasmático granular asociados a las mitocondrias (Fig. 64 a 69).

En las fotografías del día 15 (Fig. 70 a 73), la cantidad de cisternas del retículo endoplasmático granular es mayor y se observan en los espacios que quedan entre las mitocondrias además de las que están adosadas a las mismas. El desarrollo del retículo endoplasmático granular sigue progresando hasta el día 20 (Fig. 74 a 77).

El aparato de Golgi y sus derivados : cuerpos densos y cuerpos multivesiculares es fácilmente observable en todas las edades, aunque hacia

el final del desarrollo embrionario su tamaño es probablemente mayor ya que sus elementos aparecen con más frecuencia en las secciones (Fig. 65, 68, 70, 71, 73 a 77 y 82). Es usual observar el complejo de Golgi en el polo biliar de la célula, donde probablemente interviene en la secreción al canalículo biliar (Fig. 71 y 82).

El desarrollo del retículo endoplasmático granular y del aparato de Golgi es un aspecto fundamental de la diferenciación del hepatocito. El hepatocito inmaduro de los primeros días de la organogénesis hepática es una célula que se reproduce rápidamente y destina la mayor parte de las proteínas que sintetiza a su propio crecimiento ya que la mayor parte de sus ribosomas se encuentran constituyendo polisomas libres, en cambio, la célula hepática madura se reproduce muy raramente y dedica una gran parte de sus ribosomas a la síntesis de proteínas de secreción (ribosomas del retículo endoplasmático).

El retículo endoplasmático liso forma agrupaciones de vesículas entre las cuales suelen observarse depósitos de glucógeno (Fig. 66, 69 y 73).

Houssaint y Le Douarin (1974) han demostrado la presencia de glucógeno en forma de partículas alfa (rosetas) en los hepatocitos del embrión de pollo de 6 días y antes - en el endodermo hepático presuntivo del embrión de 20 somitas - en forma de partículas Beta, mediante técnicas citoquímicas.

En nuestras condiciones de preparación del material para microscopía electrónica es probable que una buena parte del glucógeno sea extraído y así lo sugieren las imágenes del hepatocito de pollo de 1 mes posteclosión (Fig. 78, 79 y 80) donde pueden observarse algunas rosetas bien contrastadas junto a huellas o sombras del mismo tamaño y de bajo contraste. Es interesante observar que el glucógeno del hígado de rata es más resistente a la extracción en las mismas condiciones (Fig. 81).

En el embrión de 12 días la actividad glucógenosintetasa alcanza un máximo (Houssaint y Le Douarin 1974) y es precisamente en los embriones de esta edad donde nosotros hemos observado mejor los depósitos del polisacárido (Fig. 6).

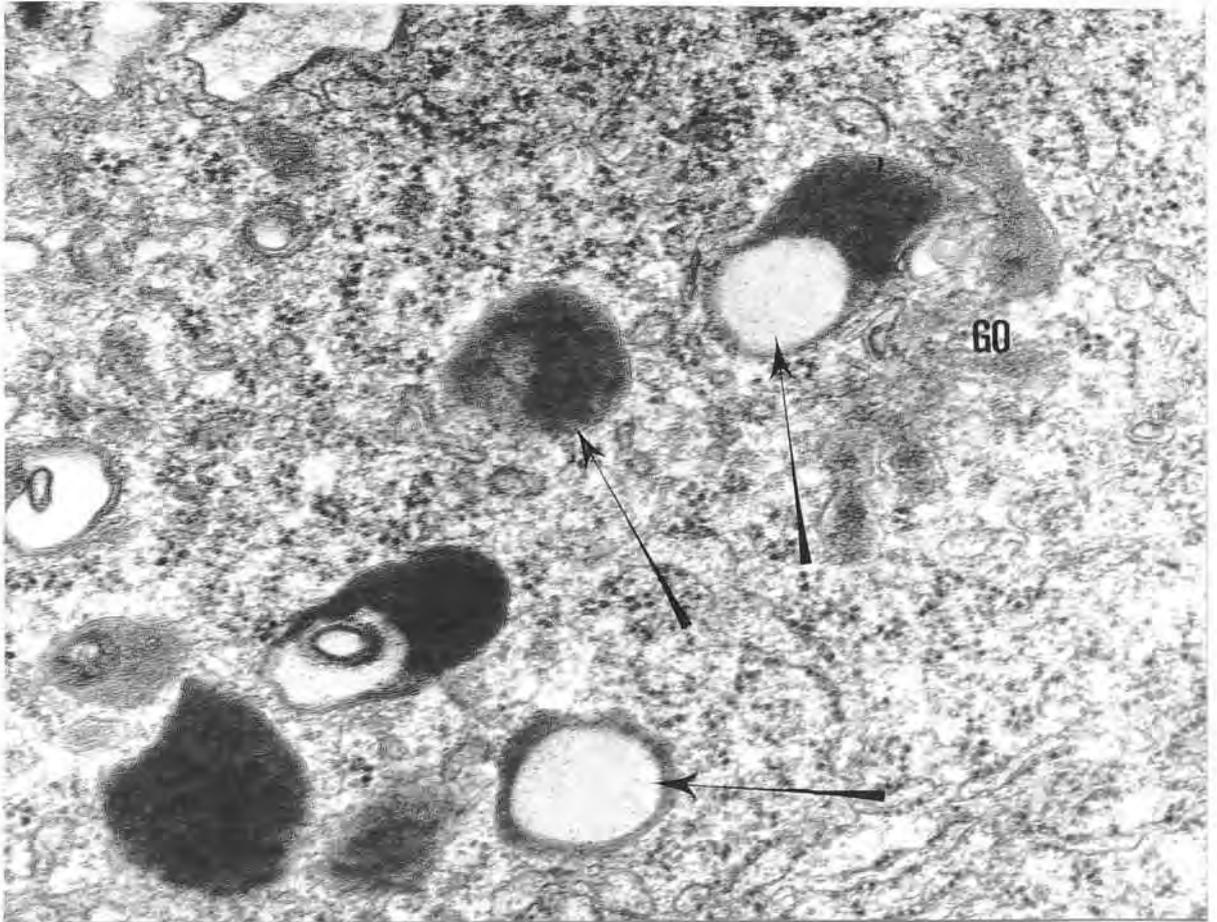


Figura 64 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 80.000. Citoplasma : Ribosomas constituyendo polisomas libres en la mayor parte del campo, inclusiones lipídicas con corteza densa y centro claro (en algunas solo se observa la parte densa) señaladas con flechas, elementos del aparato de Golgi (GO).

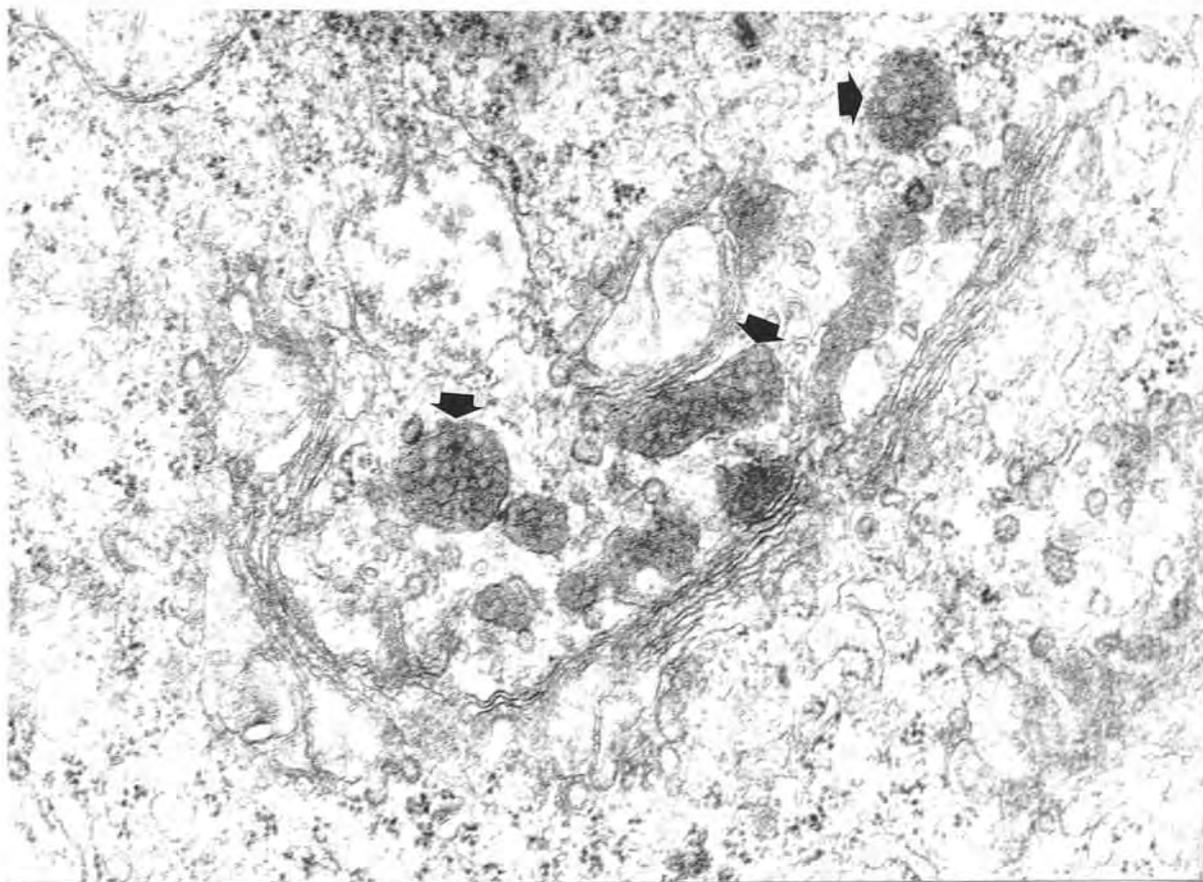


Figura 65 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 8 días. Aumento aproximado 60.000. Citoplasma : aparato de Golgi con cuerpos multivesiculares (puntas de flecha).

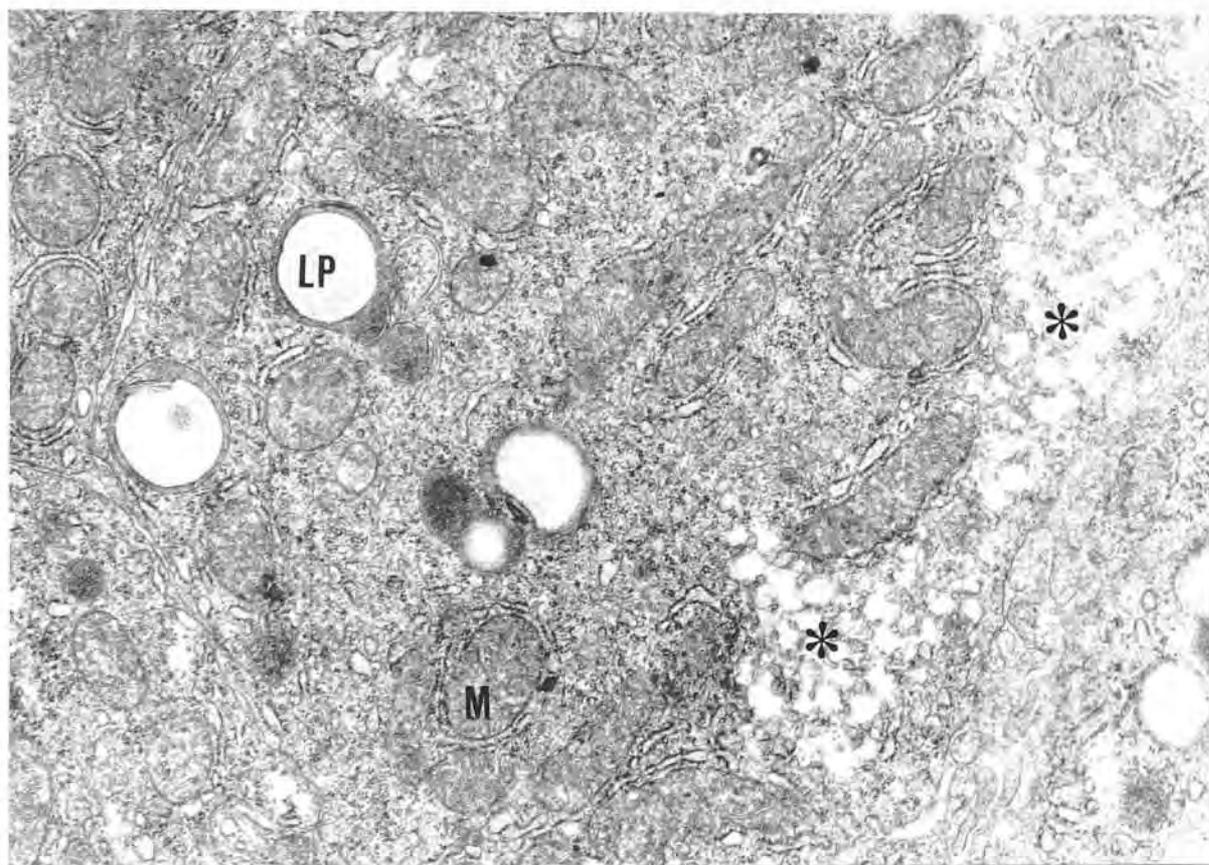


Figura 66 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 9 días. Aumento aproximado 22.000. Citoplasma : mitocondrias rodeadas de cisternas de retículo endoplasmático granular (M), inclusiones lipídicas (LP), región de retículo endoplasmático liso (asteriscos) con espacios blancos entre las vesículas que probablemente contenían glucógeno y que ha sido completamente extraído.

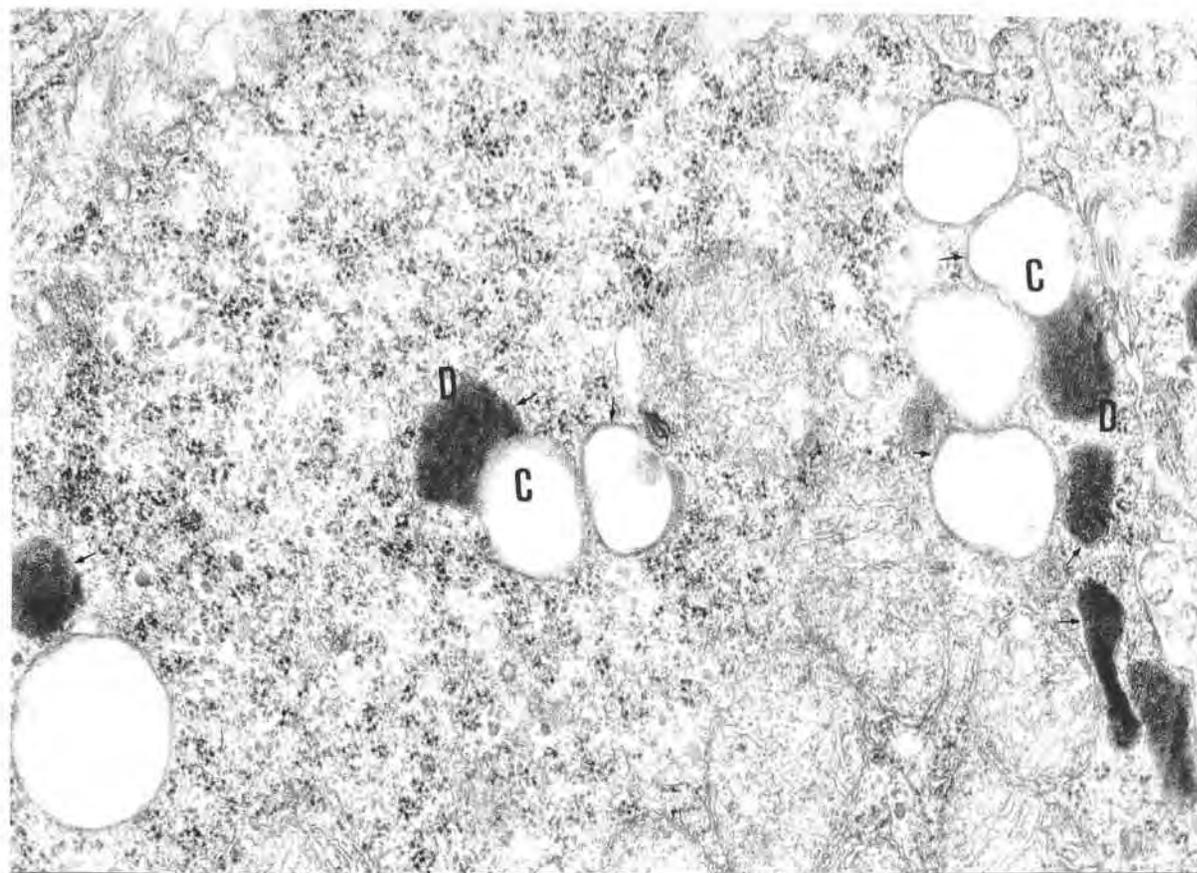


Figura 67 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 10 días. Aumento aproximado 48.000. Polisomas libres ocupando la mayor parte de la sección de citoplasma. Inclusiones lipídicas en las que es posible distinguir claramente la membrana limitante (flechitas) tanto en la parte clara (C) como en la electrodensa (D).

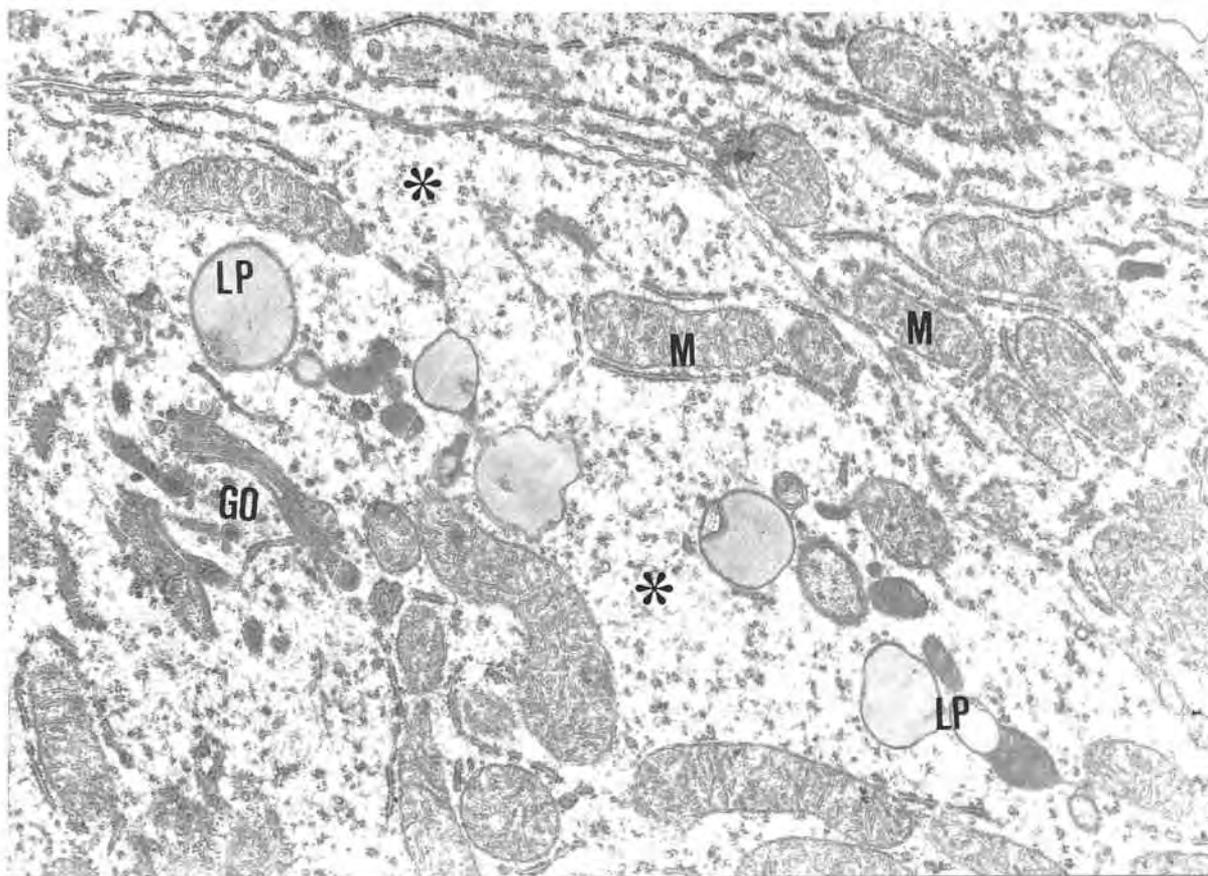


Figura 68 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 12 días . Aumento aproximado 17.000. Mitocondrias con algunas cisternas del retículo endoplasmático granular adosadas (M), inclusiones lipídicas (LP), cisternas del aparato de Golgi (GO) y polisomas libres en el hialoplasma (asteriscos).

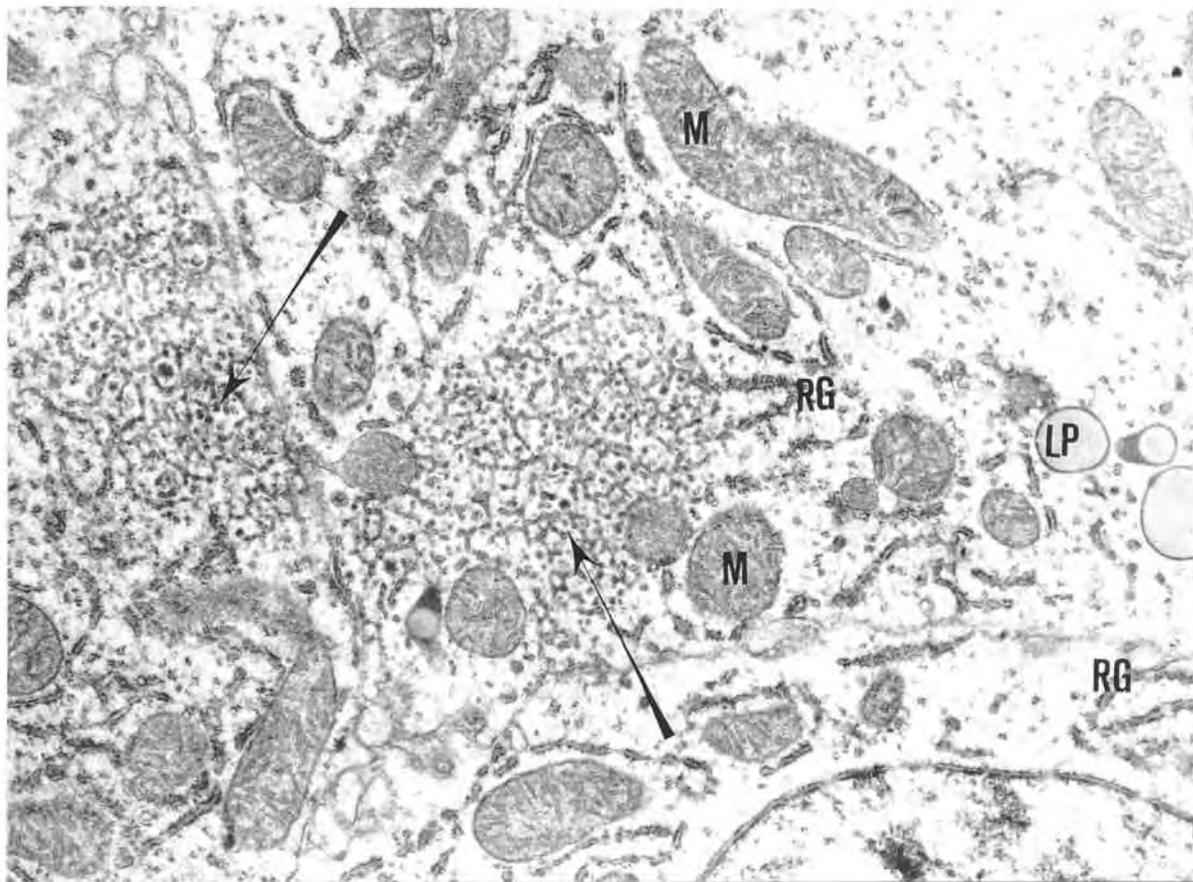


Figura 69 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 12 días. Aumento aproximado 14.000. Regiones de retículo endoplasmático liso con depósitos de glucógeno entre las vesículas (flechas). Mitochondrias (M), inclusiones lipídicas (LP) y retículo endoplasmático granular (RG).

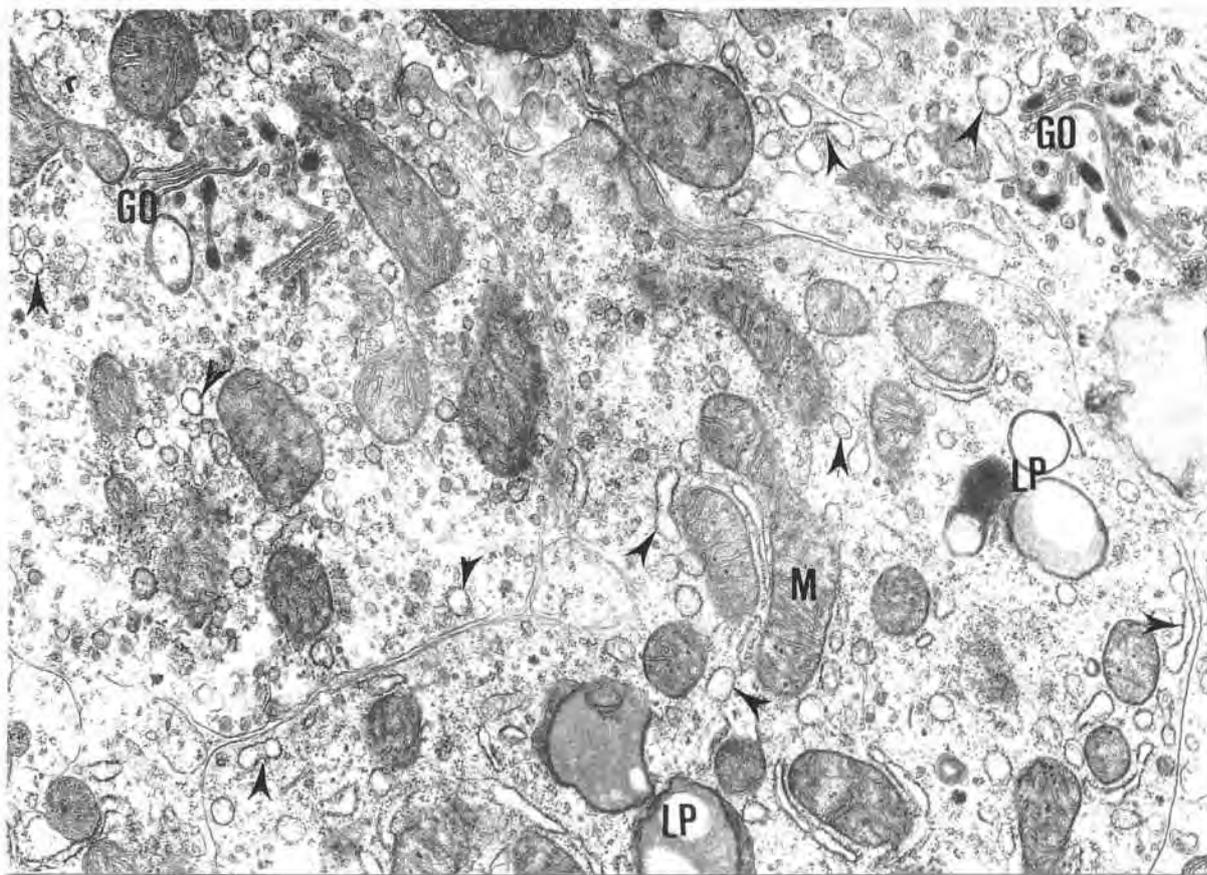


Figura 70 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 20.000. Mitocondrias (M), inclusiones lipídicas (LP), complejos de Golgi (GO), retículo endoplasmático granular (puntas de flecha) y polisomas libres entre los orgánulos.

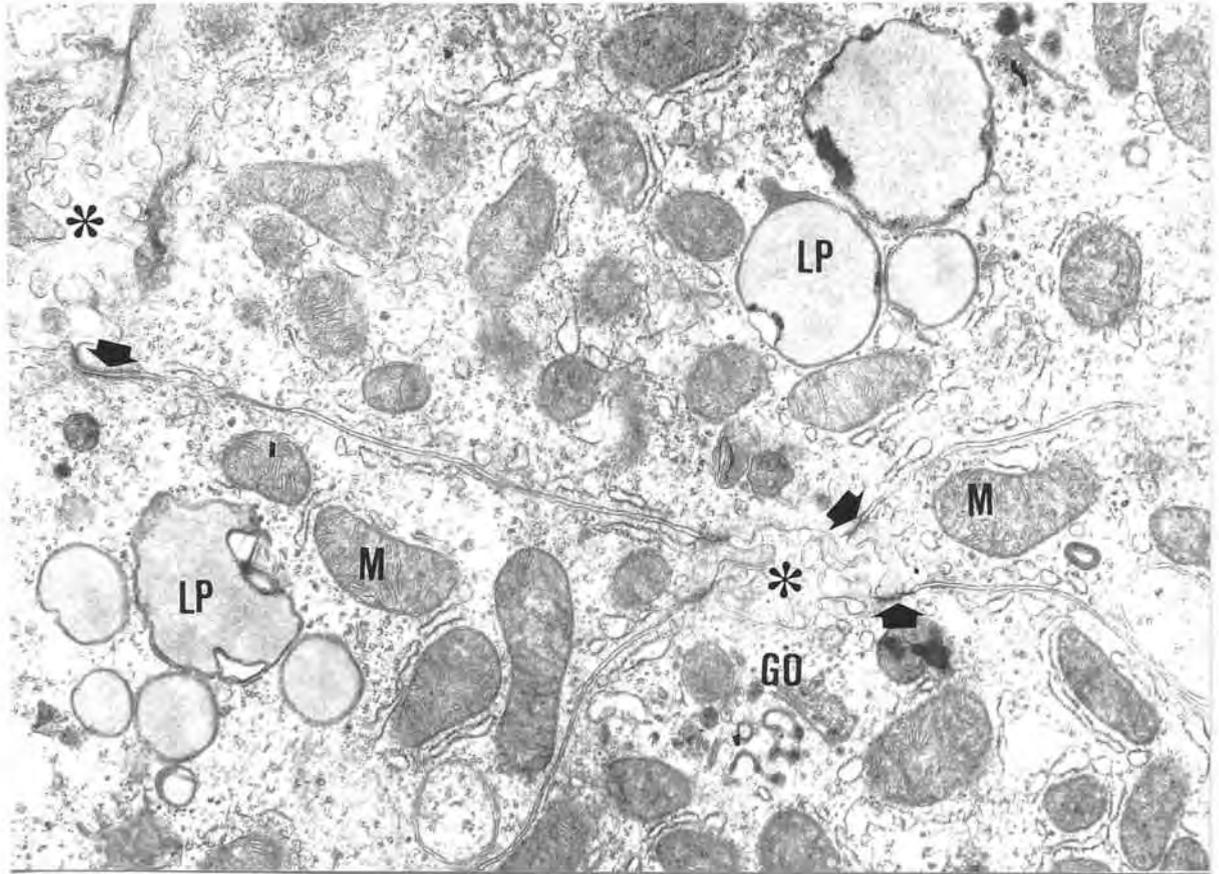


Figura 71 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 19.000. Mitochondrias (M). Inclusiones lipídicas (LP) en las que pueden observarse la corteza densa más delgada que en edades anteriores. Complejo de Golgi junto a un canalículo biliar (GO). Los canalículos biliares (asteriscos) están limitados por los extremos apicales de los hepatocitos que presentan microvellosidades. Los canalículos quedan cerrados por complejos de unión (puntas de flecha) entre las células. Se observan también cisternas del retículo endoplasmático granular y polisomas libres.

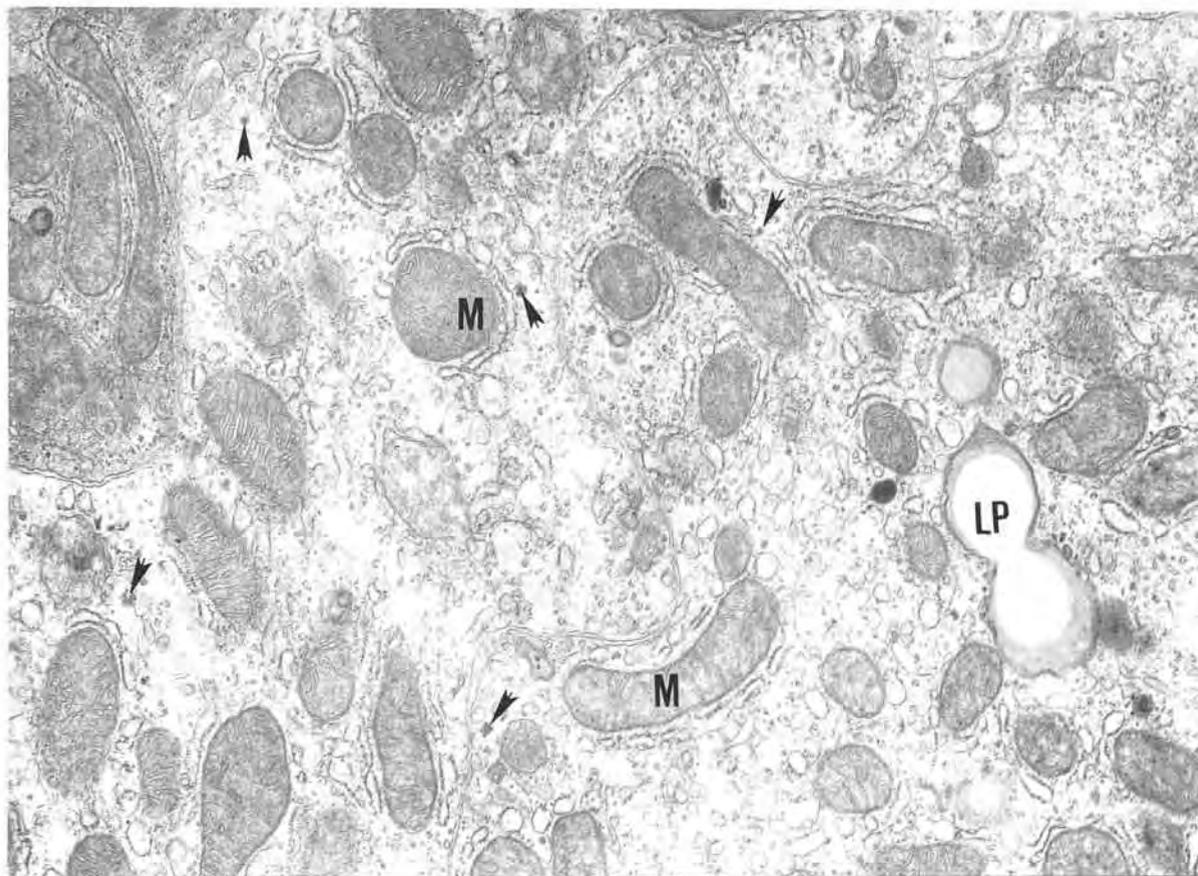


Figura 72 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 20.000. Mitocondrias (M). Inclusiones lipídicas : la inclusión señalada presenta una constricción que podría indicar una fusión o una escisión. Partículas alfa de glucógeno dispersas (puntas de flecha). Abundantes vesículas del retículo endoplasmático granular entre los demás orgánulos.

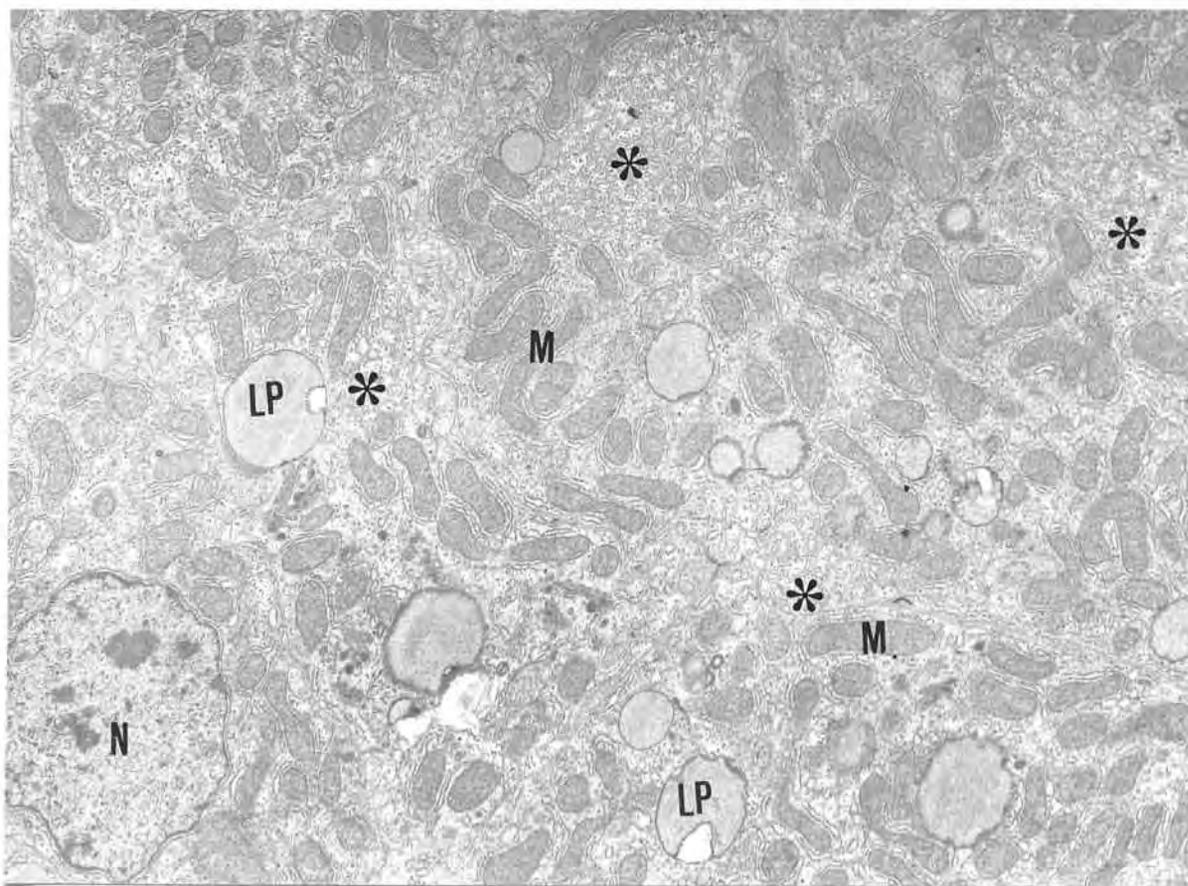


Figura 73 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 13.000. Núcleo (N), mitocondrias (M), inclusiones lipídicas (LP) y partículas alfa de glucógeno especialmente en las regiones de retículo endoplasmático liso (asteriscos).

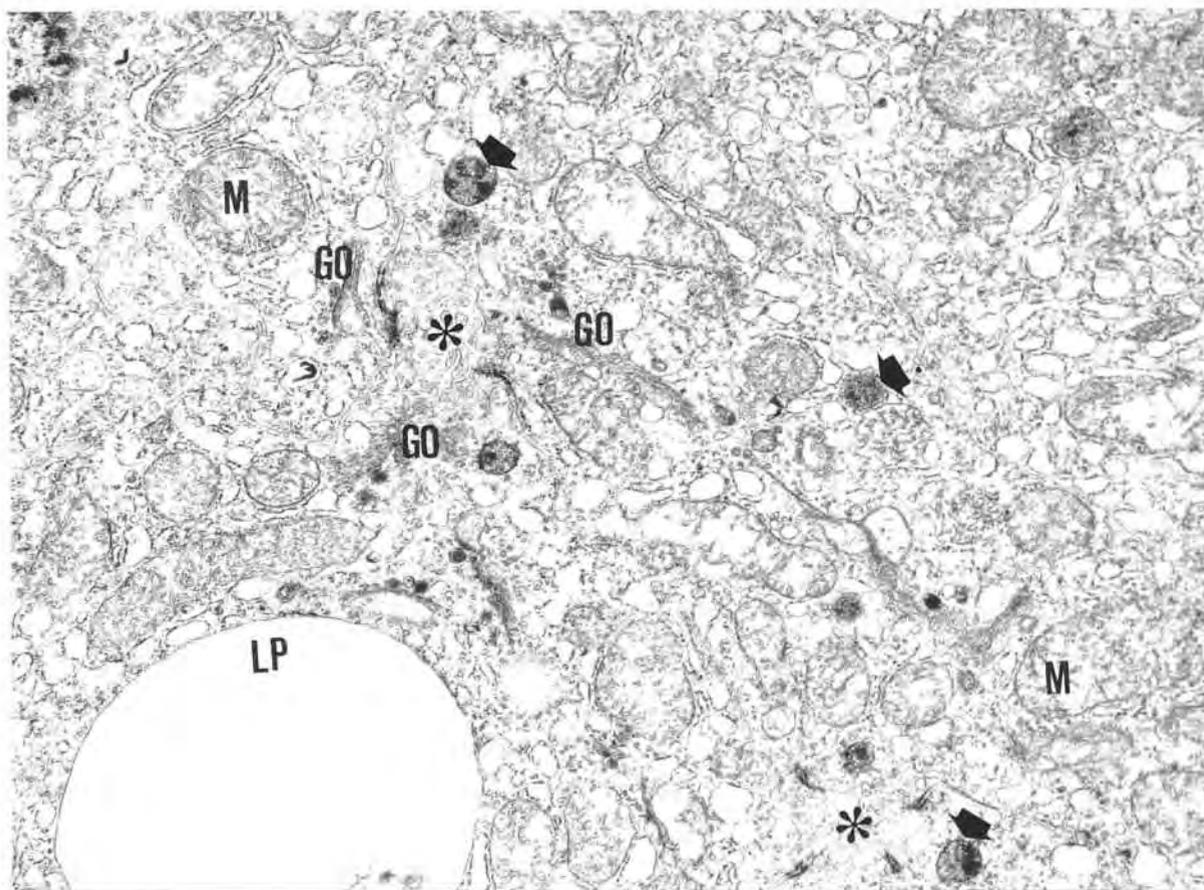


Figura 74: ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 17.000. Mitocondrias (M), inclusiones lipídicas (LP), complejos de Golgi (GO) con cuerpos multivesiculares (puntas de flecha) y canalículos biliares (asteriscos).

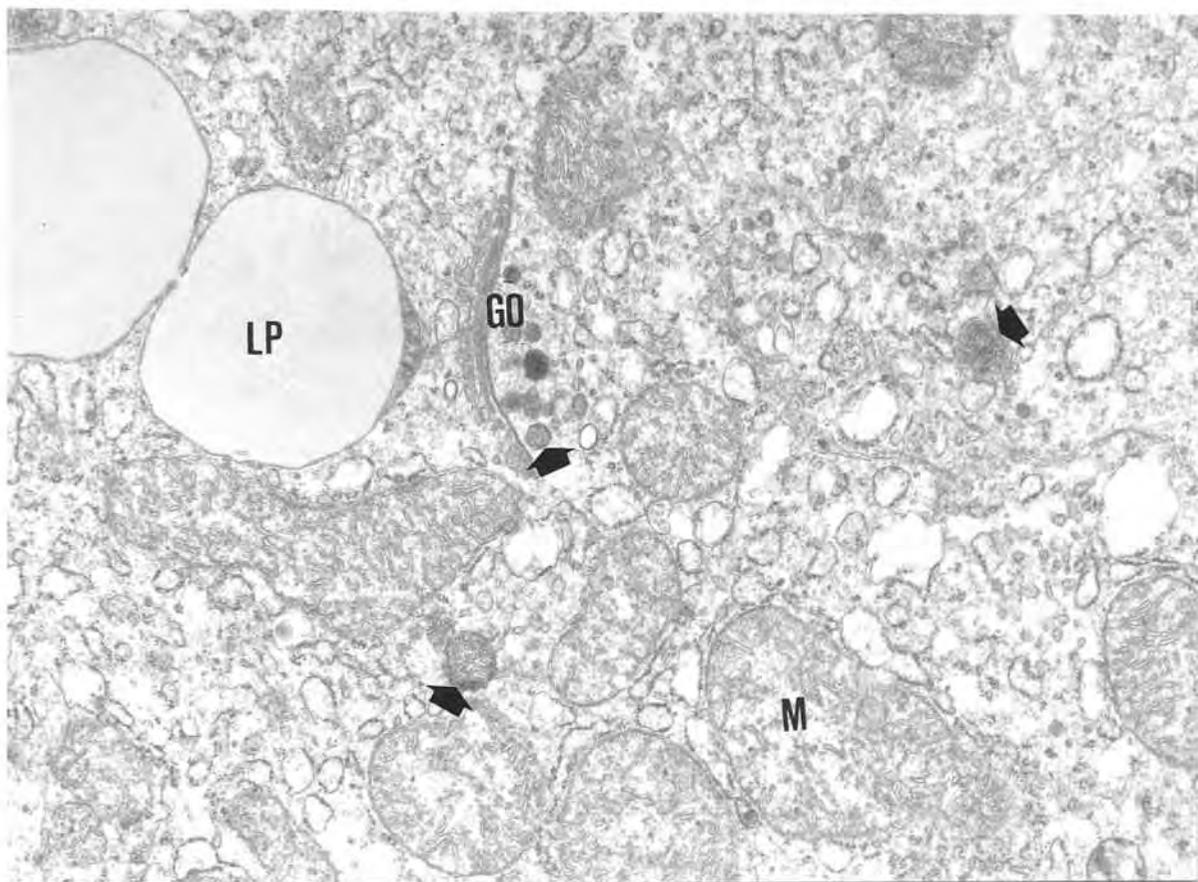


Figura 75 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 25.000. Mitocondrias (M), inclusiones lipídicas (LP), complejo de Golgi (GO) con cuerpos multivesiculares (puntas de flecha). Abundante retículo endoplasmático granular entre los demás orgánulos.

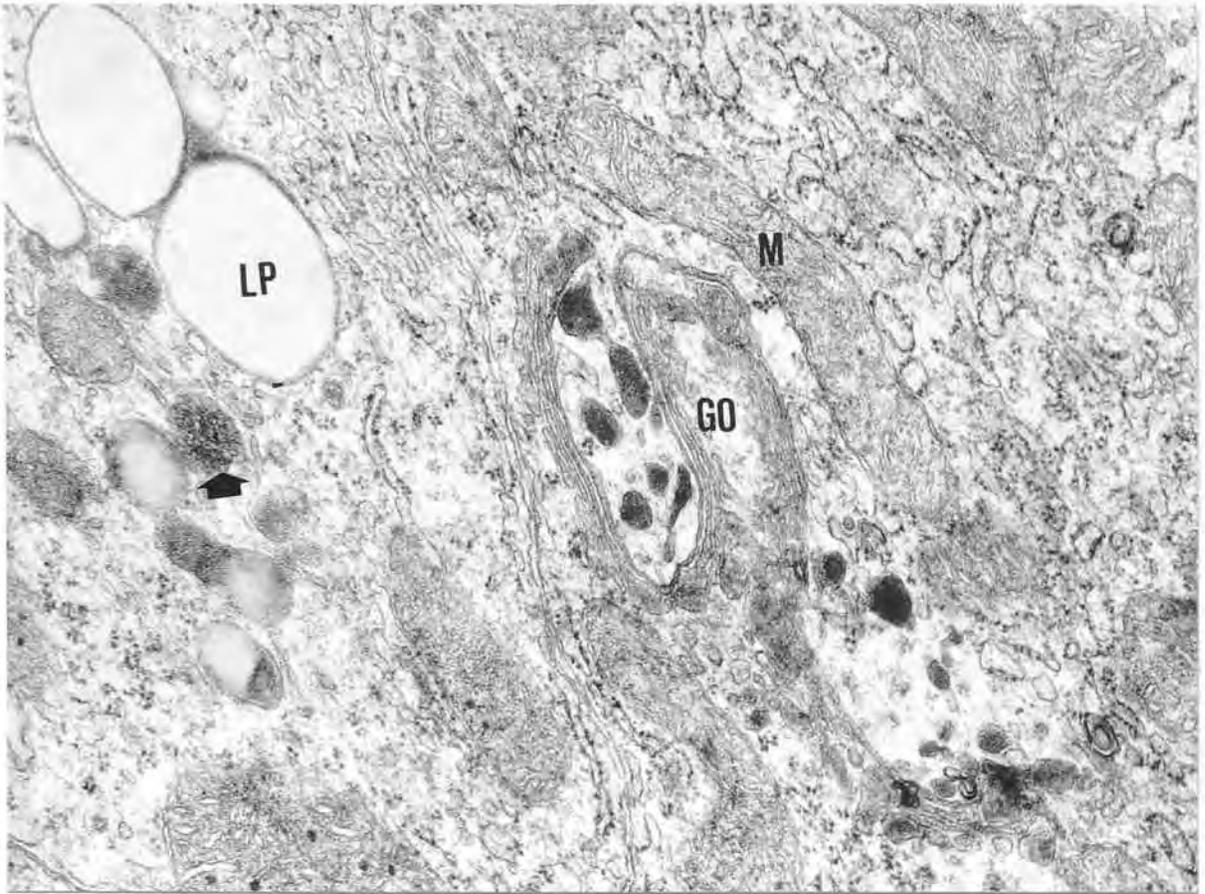


Figura 76 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 44.000. Mitocondrias (M), inclusiones lipídicas (LP), complejo de Golgi (GO) con cuerpos multivesiculares (puntas de flecha), abundante retículo endoplasmático granular.

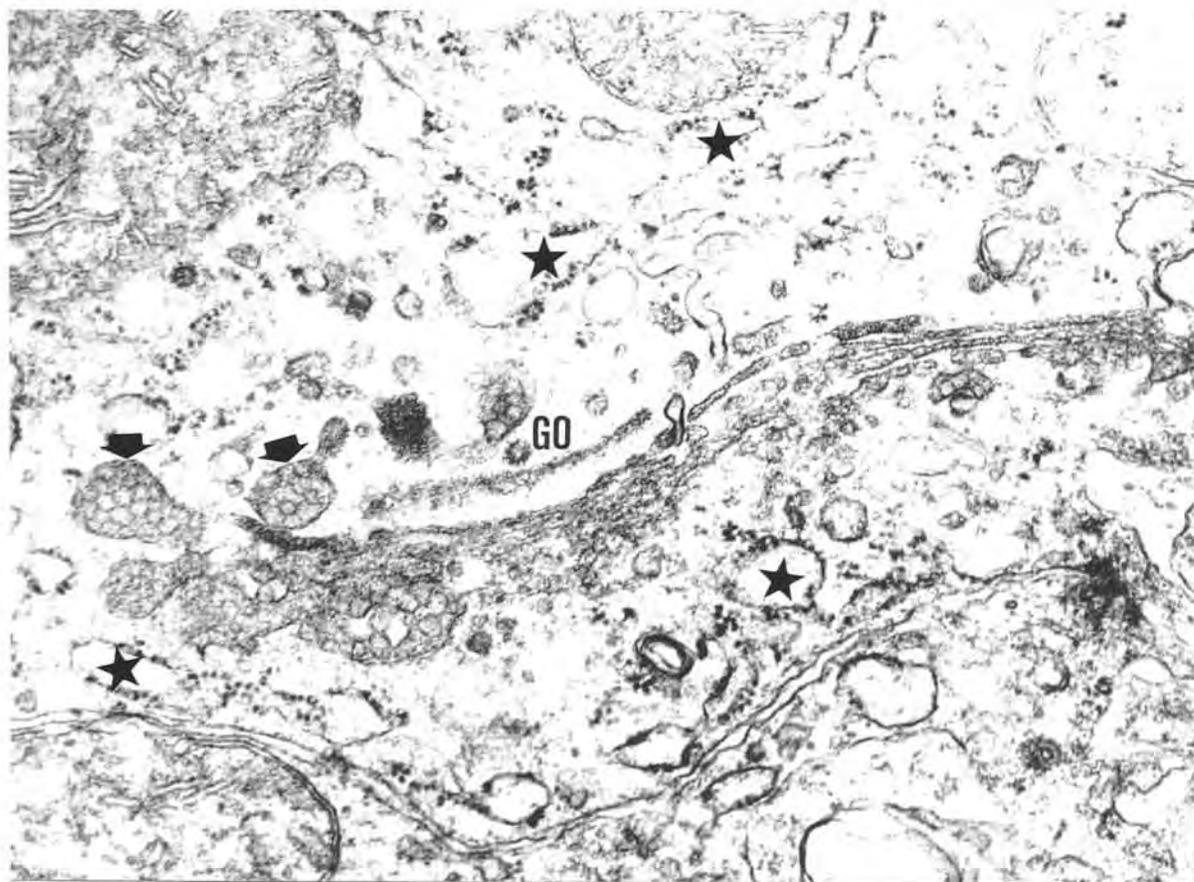


Figura 77 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 20 días. Aumento aproximado 61.000. Complejo de Golgi (GO) con cuerpos multivesiculares (puntas de flecha). Retículo endoplasmático granular (estrellas).

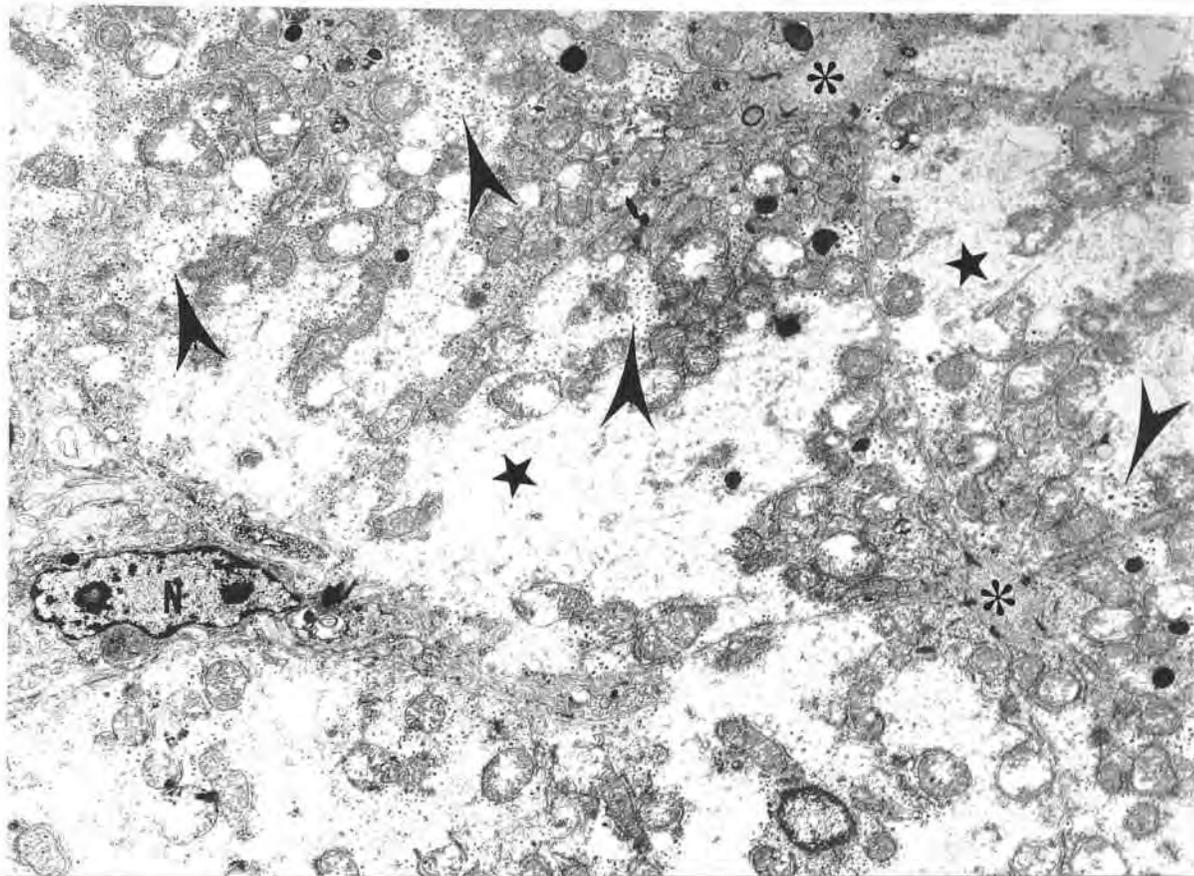


Figura 78 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 5.000. Núcleo (N). Canalículos biliares (asteriscos). Entre las mitocondrias rodeadas por cisternas del retículo endoplasmático granular se observan áreas con depósitos de glucógeno en forma de partículas alfa (puntas de flecha), aunque en algunas regiones han sido casi totalmente extraídos (estrellas).

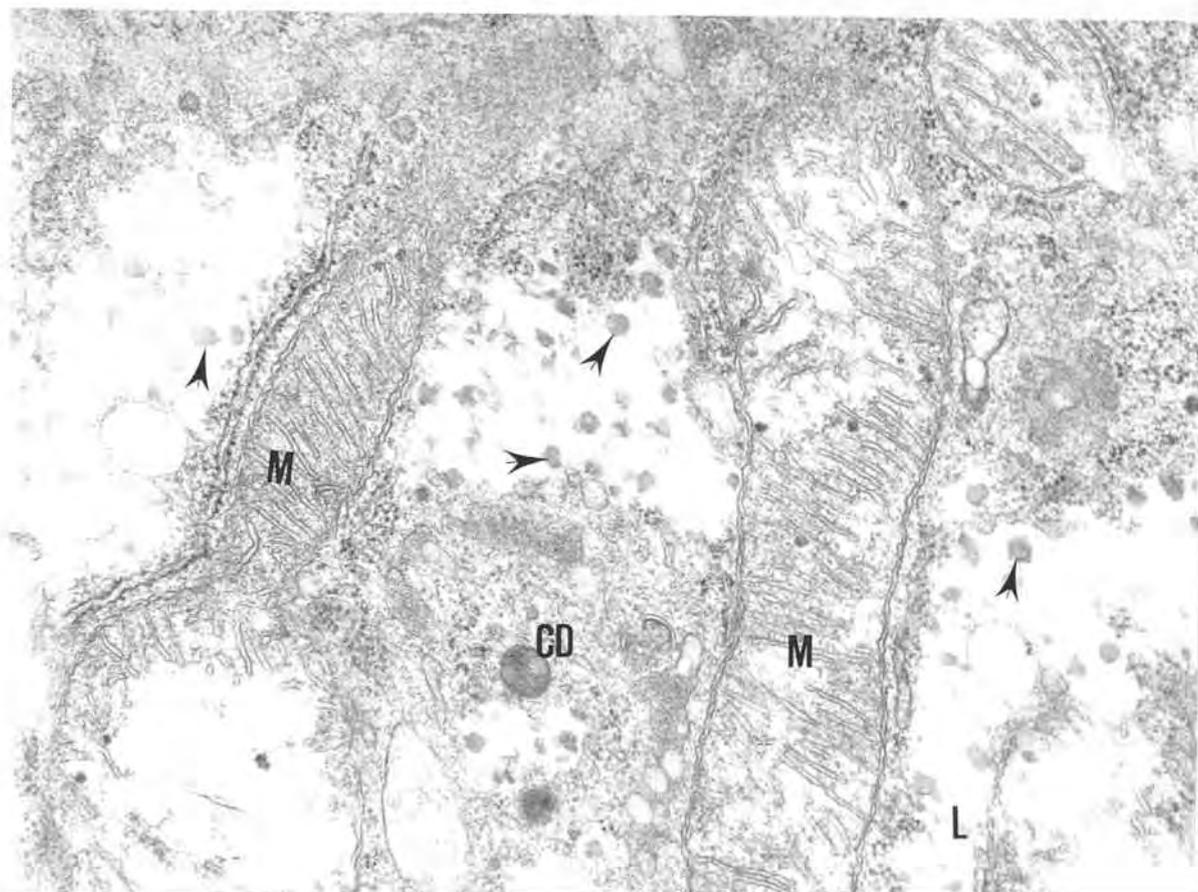


Figura 79 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 47.000. Mitochondrias rodeadas de retículo endoplasmático granular (M). Partículas alfa de glucógeno poco contrastadas debido probablemente a la extracción del polisacárido durante la preparación del material (puntas de flecha). Cuerpo denso (CD).

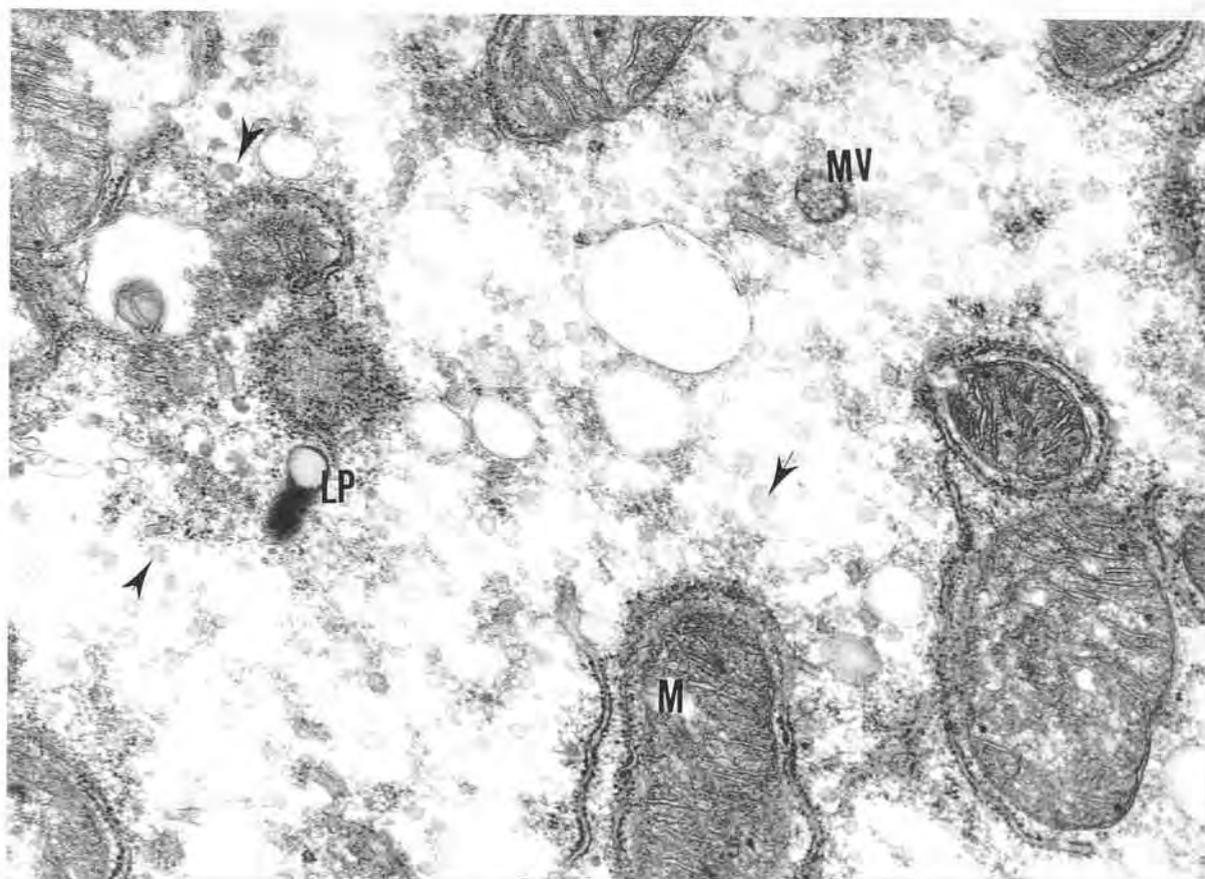


Figura 80 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 31.000. Mitochondrias rodeadas de retículo endoplasmático granular (M). Partículas alfa de glucógeno poco contrastadas debido probablemente a la extracción del polisacárido durante la preparación del material (puntas de flecha). Inclusión lipídica (LP). Cuerpo multivesicular (MV).

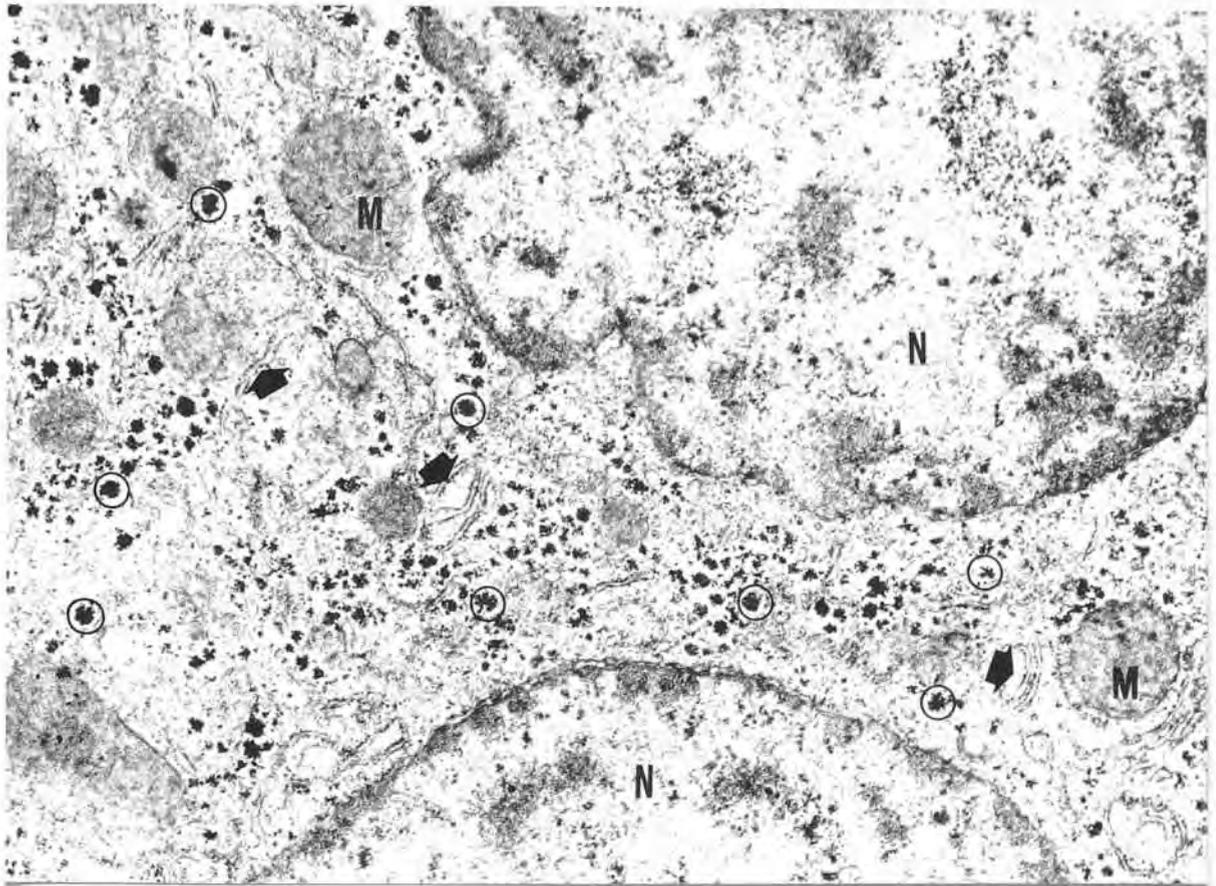


Figura 81 : ME de hepatocito de rata adulta preparado en las mismas condiciones que el hígado de pollo. Aumento aproximado 24.000. Núcleos (N) de dos hepatocitos. Mitocondrias (M). Abundantes depósitos de glucógeno en forma de partículas alfa (círculos). Retículo endoplasmático granular (puntas de flecha). Esta fotografía sirve de control comparativo para los depósitos de glucógeno (véase texto).

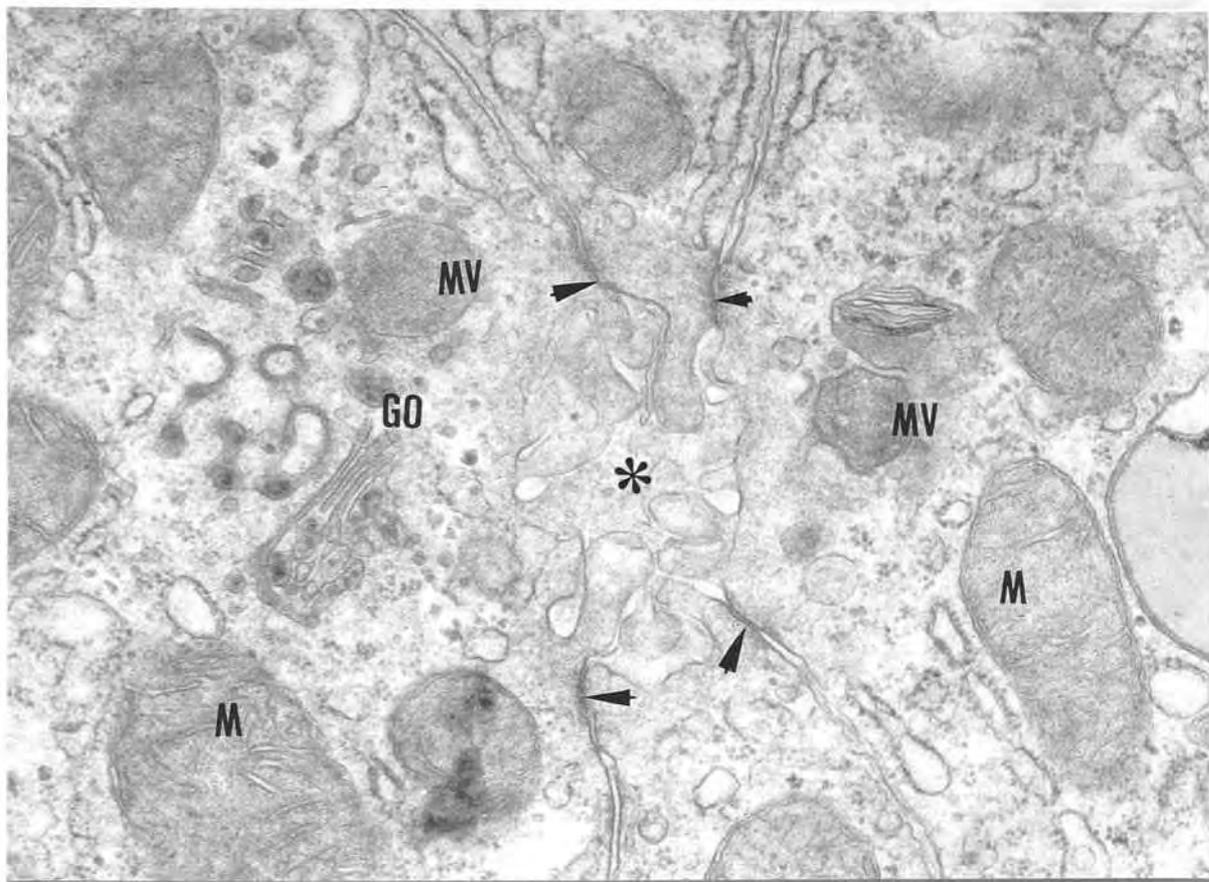


Figura 82 : ME de hepatocito de embrión de pollo de 15 días. Aumento aproximado 40.000. Canalículo biliar (asterisco) limitado por cuatro hepatocitos unidos por complejos de unión (puntas de flecha). Obsérvense las microvellosidades en el polo apical de los hepatocitos. Complejo de Golgi (GO) y cuerpos multivesiculares (MV). Mitochondrias (M).

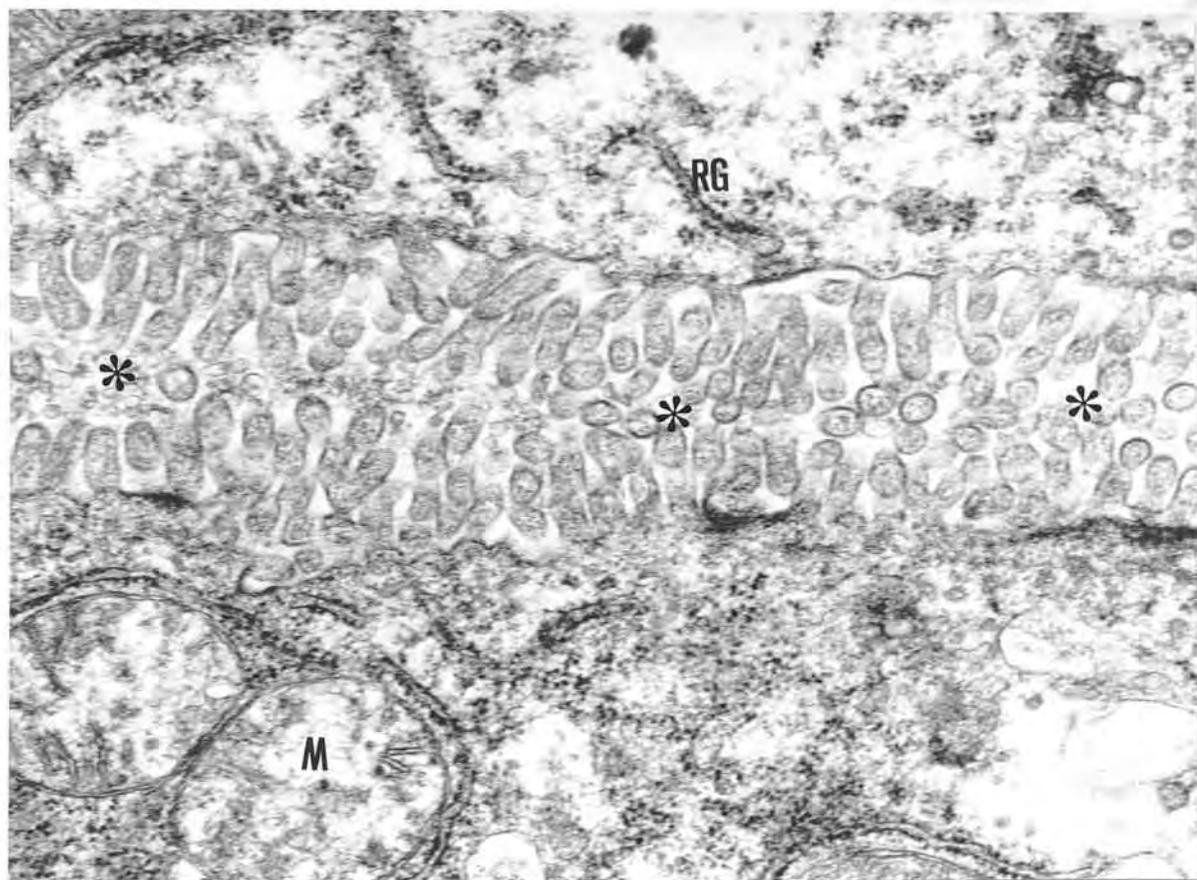


Figura 83 : ME de hepatocito de pollo de 1 mes después de la eclosión. Aumento aproximado 52.000. Canaliculo biliar a lo ancho de la fotografía (asteriscos) con abundantes microvellosidades en la luz. Mitochondrias (M) y cisternas del retículo endoplasmático granular (RG).

5. Discusión

5.1. Generalidades.

En la introducción y en la revisión sobre reproducción celular que preceden a la parte experimental de esta tesis, hemos señalado los principales problemas que plantea el ciclo celular en sí mismo y en relación a la diferenciación celular y al desarrollo. Los trabajos comentados pueden dar una idea de la complejidad de este campo de investigación, de la diversidad de aproximaciones experimentales posibles y de los principales esquemas conceptuales que han surgido para tratar de explicar el control del ciclo celular y el de la proliferación y crecimiento en sistemas pluricelulares.

La revisión realizada, si bien necesariamente poco detallada en muchos aspectos, persigue una cierta amplitud de visión, al tratar de problemas y especialmente de aproximaciones muy distantes. La ignorancia recíproca entre grupos de investigadores que trabajan en los mismos problemas pero utilizando sistemas o metodologías alejados es bastante frecuente. A título de ejemplo, cabe destacar que en la revisión de trabajos sobre modelos estocásticos del ciclo celular no hemos encontrado referencias cruzadas entre el grupo de los simuladores por ordenador de curvas de frecuencia de mitosis marcadas (Barret 1966, Brockwell, Trucco y Fry 1972, Takahashi 1968 etc.) y el grupo del modelo de probabilidad de transición (Burns y Tannock 1970, Smith y Martin 1973 etc.).

La existencia de estas barreras a la información deriva de la dificultad de comprender metodologías o aproximaciones muy diferentes de las propias y también de la complejidad de los sistemas biológicos que hace incómodo estudiar trabajos sobre un sistema distinto del nuestro y que conocemos escasamente.

Obviamente, la superación de esta clase de barreras es imprescindible para la identificación y comprensión de los mecanismos básicos de la reproducción celular, probablemente comunes a diferentes sistemas en sus aspectos fundamentales. Con este criterio de amplitud in mente hemos realizado la revisión bibliográfica y la discusión de nuestros resultados experimentales.

Hemos estudiado la reproducción y la diferenciación estructural hepatocelulares en el embrión de pollo aplicando distintos métodos :

I- Determinación de la cantidad de DNA en el hígado de embriones de diferentes edades y también en el corazón y en el encéfalo, construcción de las correspondientes curvas de crecimiento y estudio de los crecimientos relativos.

II- Medida de la constante de proliferación en el parénquima hepático de embriones de 10 y 14 días por el método del bloqueo mitótico y cálculo de la duración de la mitosis (MT).

III- Medida del índice mitótico en el parénquima hepático de embriones de 5 a 20 días y cálculo de las respectivas constantes de proliferación y duraciones medias del ciclo celular utilizando el valor de MT obtenido en II.

IV- Medida del incremento porcentual por hora de la incorporación de la incorporación de timidina tritiada en el hígado de embriones de 10 y de 14 días.

V- Medida de la coincidencia mitótica en el parénquima hepático de embriones de 10 y 14 días y comparación con el valor de la misma calculado a partir del modelo de probabilidad de transición.

VI- Medida de la fracción de volumen hepático correspondiente al parénquima en embriones de diferentes edades a partir de la relación de áreas de sección (microscopía óptica) y correlación de este parámetro con la duración media del ciclo celular de los hepatocitos obtenida en III.

VII- Cálculo del volumen nuclear medio de los hepatocitos de embriones de distintas edades a partir de la medida de las áreas de sección nuclear y cálculo del volumen celular correspondiente a partir de la relación de volúmenes núcleo/célula determinada por la relación de las áreas de sección (microscopía electrónica).

VIII- Medida de la fracción de volumen hepatocelular correspondiente a

núcleo, nucléolo, mitocondrias e inclusiones lipídicas a partir de las respectivas relaciones de área de sección (microscopía electrónica).

IX- Estudio cualitativo de las diferentes estructuras celulares en el hepatocito de embrión de pollo de diferentes edades (microscopía electrónica).

Los resultados de las partes I, II, III y IV pueden ser comparados ya que de una u otra forma miden la actividad proliferativa en el hígado embrionario. Estos resultados y los de la parte VI son discutidos en relación a los modelos de crecimiento a nivel supracelular.

El método de la coincidencia mitótica (V) permite ensayar la aplicabilidad del modelo de probabilidad de transición a nuestro material. Los resultados obtenidos en esta parte junto con el estudio del crecimiento del hepatocito (parte VII) se discuten en relación a los modelos determinísticos y probabilísticos del ciclo celular.

Finalmente, el estudio ultraestructural cuantitativo y cualitativo del hepatocito durante el desarrollo (partes VIII y IX) permite sugerir relaciones entre la actividad proliferativa y determinadas funciones celulares cuyo substrato morfológico se modifica durante la diferenciación.

En consecuencia, dividimos la discusión en tres apartados :

- Proliferación celular y modelos de crecimiento.
- Sincronía de células hermanas, crecimiento celular y modelos del ciclo celular.
- Ultraestructura celular y actividad proliferativa.

5.2. Proliferación celular y modelos de crecimiento.

La medición de la cantidad de DNA/órgano en hígado, corazón y encéfalo de embriones de pollo entre los días 8 y 18 del desarrollo ha permitido construir curvas de crecimiento que, dada la naturaleza del parámetro, indican el aumento del número de células en cada órgano.

La representación semilogarítmica de las curvas de crecimiento es casi lineal para el encéfalo y ligeramente curvada en el caso del corazón y del hígado, indicando una variación nula o muy pequeña de la velocidad específica de crecimiento en el primer caso y una disminución moderada en los otros dos. En efecto, dividiendo el período de estudio en dos partes : 1ª del día 9 al 14 y 2ª del día 14 al 18, la disminución de la velocidad específica de la primera a la segunda parte es para el hígado de aproximadamente un 37 %, para el corazón un 25 % y para el encéfalo solamente un 5 %.

La velocidad específica de crecimiento media durante todo el período es de 0,0126/h para el hígado, de 0,0127/h para el corazón y de 0,0064/h para el encéfalo, que corresponden a períodos de duplicación de la población celular (DT) de 55,01 h, 54,58 h y 108,30 h respectivamente. Admitiendo que se trata de poblaciones expansivas (Leblond 1972), aunque en el caso del hígado existe un pequeño componente de recambio debido a la producción de células de la sangre en los capilares sinusoides, estos períodos de duplicación pueden suponerse equivalentes a la duración media del ciclo celular (GT) en cada órgano. El valor de DT o GT correspondiente al hígado puede compararse con el obtenido por los métodos citocinéticos aplicados al parénquima hepático.

El estudio del crecimiento relativo (Huxley 1924 y 1932 y Needham y Lerner 1940) de los tres órganos comparados entre sí mediante curvas bilogarítmicas para el contenido de DNA : hígado-corazón, hígado-encéfalo y corazón-encéfalo. La primera relación es prácticamente lineal durante todo el período de estudio, lo cual significa que la constante alométrica del hígado con respecto al corazón no se modifica o lo hace



muy poco. En cambio, en las otras dos relaciones no es posible ajustar los puntos con una sola recta sino que es necesario utilizar dos : una entre los días 9 y 14 y otra entre los días 14 y 18, es decir, existe una discontinuidad que indica una modificación de las constantes alométricas del hígado y del corazón con respecto al encéfalo.

Calculando las constantes alométricas como la relación entre las velocidades específicas de crecimiento de los pares de órganos considerados, en el caso del par hígado-corazón se halla un valor medio para todo el período de 0,9873, es decir, ambos órganos crecen a un ritmo parecido. Realizando el cálculo por separado para los intervalos día 9 a 14 y día 14 a 18, la constante alométrica disminuye únicamente un 12 % aproximadamente.

La constante alométrica media durante todo el período para el par hígado-encéfalo es de 1,9643 y para el par corazón-encéfalo de 1,9896, sin embargo, al calcular por separado los dos intervalos se obtienen valores claramente diferentes, existiendo en el primer caso una disminución entre el primer y segundo intervalos del 33 % y en el segundo caso del 21 %. Esta variación tiene lugar de forma relativamente brusca alrededor del día 14 del desarrollo, ya que los puntos correspondientes a cada uno de los intervalos (antes y después del día 14) se ajustan bien a sendas rectas, existiendo entre una y otra diferencia de pendiente.

Estos resultados pueden discutirse en relación al modelo de crecimiento de Tanner (1963), según el cual el crecimiento del organismo viene controlado por un contador localizado en el sistema nervioso central (SNC) que manda señales estimulantes a los órganos y, a su vez, recibe señales inhibitorias de uno o más órganos en cantidad proporcional al tamaño de los mismos. Las señales inhibitorias ocupan receptores del contador y la señal estimulante es función de la diferencia entre el número total de receptores y el número de receptores ocupados. El crecimiento del SNC va por delante del de los demás órganos y, según el modelo, el número de receptores del contador aumentaría con la edad hasta estabilizarse,

marcando a cada edad el tamaño adecuado del organismo.

Parece lógico que si el SNC marca la pauta de crecimiento de los demás órganos, la disminución de la velocidad específica de crecimiento de cada órgano que tiene lugar durante el desarrollo debería ser equiproporcional con respecto a la disminución de la del SNC. Por tanto, la modificación de la constante alométrica del hígado y del corazón con respecto al encéfalo observada alrededor del día 14 del desarrollo significa, a nuestro modo de ver, que la regulación del crecimiento de estos órganos no puede ser completamente explicada por un mecanismo tan sencillo como el propuesto por Tanner.

Es indudable que el SNC tiene un papel importante en el control del crecimiento de los animales vertebrados a través del sistema : Hipófisis (hormona de crecimiento) - Hígado (somatomedinas) (Clemmons y Van Wyk 1981, Binoux, Lassarre y Hardouin 1982, Rothstein et al. 1980 y Schoenle et al. 1982), demostrada asimismo en el caso del embrión de pollo, aunque de forma indirecta mediante experimentos de hipofisectomía por decapitación parcial (Betz 1970, Thommes, Hajek y McWhinnie 1973 y Yeh, Kwo-Yih y Moog Florence 1975 a). Además, el mantenimiento de relaciones alométricas constantes durante largos períodos de tiempo para diversos pares de órganos u órgano-organismo en los animales después del nacimiento (Huxley 1924 y 1932, Needham y Lerner 1940 y Brody 1945) indican la existencia de un factor integrador del crecimiento de los diversos órganos como el supuesto en el modelo de Tanner.

Sin embargo, el modelo de Tanner, aunque resulta válido en sus líneas generales , nos parece incompleto al ignorar los mecanismos de control específicos del crecimiento de cada órgano o tipo celular, las relaciones directas entre órganos y los procesos de diferenciación.

Los mecanismos de autorregulación del crecimiento específicos de órgano, puestos de manifiesto por la especificidad de las reacciones regenerativas, y también las interacciones entre órganos mediante hormonas y factores de crecimiento deben tenerse en cuenta en cualquier modelo que intente explicar la regulación del crecimiento de organismos pluricelulares.

La aplicación del método del bloqueo mitótico al embrión de pollo ha permitido medir la constante de proliferación (PK) en el parénquima hepático a los 10 días y a los 14 días del desarrollo. En un estudio previo sobre la dosificación de los bloqueantes mitóticos, hemos encontrado que la colchicina resulta excesivamente tóxica en nuestro material. La vinblastina se ha utilizado a la dosis de 10 microgramos por huevo, que consigue un bloqueo completo de las metafases sin efectos tóxicos manifiestos en el embrión de 14 días y con ligeras manifestaciones de toxicidad en el de 10 días.

A partir de la constante de proliferación (PK) puede calcularse la duración media del ciclo celular de la población (GT). Algunos autores, por ejemplo Brugal (1971), miden la duración del ciclo celular por la distancia entre dos puntos homólogos de las porciones ascendentes de la primera y segunda ondas de la curva de frecuencia de mitosis marcadas (FLM), lo cual es en realidad una medida del GT de la fracción más rápida de la población y no el valor medio de todos los ciclos celulares (Smith y Martin 1973). Después comparan el índice mitótico de la población (MI) con el que puede calcularse a partir de la relación entre la duración de la mitosis y la del ciclo (MT/GT) y de la discrepancia entre el valor observado y el calculado obtienen la fracción de crecimiento o índice de proliferación (PI) de la población, esto es, la proporción de células que se reproducen y cuyo ciclo es igual al GT medido, mientras que $1-PI$ es la proporción de células supuestamente fuera del ciclo de reproducción. Esta interpretación no parece adecuada si se tiene en cuenta la gran variabilidad de GT intrapoblación que hace necesaria la sustitución del simple valor de GT por una determinada distribución de probabilidad de GT en las simulaciones de curvas FLM (Barret 1966, Brockwell, Trucco y Fry 1972). Por tanto, a menos de que existan evidencias a partir de la morfología celular o de la distribución de las mitosis en el tejido que permitan identificar células claramente no proliferantes, resulta más apropiado admitir que todas las células son proliferantes

($PI = 1$) y que existe una distribución de probabilidad de GT más o menos amplia.

El valor de GT que se obtiene a partir de la constante de proliferación (PK) medida por el método del bloqueo y acumulación mitóticos corresponde a un valor global o promedio de la población. No existiendo evidencias de células no proliferantes en el parénquima hepático del embrión de pollo, suponemos que el valor de GT calculado a partir de PK en cada edad es realmente el valor medio de los ciclos de toda la población.

En el embrión de 10 días la PK determinada por el método del bloqueo mitótico ha sido de 0,0127/h que corresponde a un GT medio de 54,72 h. A partir del índice mitótico basal (MI) y de GT se obtiene una duración de la mitosis (MT) igual a 52 minutos.

En el embrión de 14 días, la PK medida es 0,0125/h, GT igual a 55,45 horas y MT igual a 50 minutos.

La diferencia entre los dos valores de MT obtenidos no es significativa, lo cual concuerda con la invariancia de MT demostrada para diversos tipos celulares en diferentes condiciones en las que se modifica GT. Ya que los embriones de 14 días tratados con vinblastina parecían totalmente libres de efectos tóxicos, mientras que en algunos embriones de 10 días sí se observaban signos de toxicidad, creemos que el valor de MT igual a 50 minutos determinado en los embriones de 14 días es más fiable.

La constante de proliferación del parénquima hepático en el embrión de 14 días (0,0125/h) resulta muy parecida a la constante de crecimiento (DNA/hígado) media del intervalo comprendido entre los días 9 y 18 : 0,0126/h y, por consiguiente, lo mismo ocurre entre la duración media del ciclo celular (GT) del hepatocito de 14 días (55,45 h) y el período de duplicación (DT) promedio del mismo intervalo (55,01 h).

La coincidencia en los valores de dichos parámetros se explica porque el hígado embrionario, aunque tenga un pequeño componente de recambio debido a la producción y exportación de células de la sangre, es una población esencialmente expansiva y es razonable suponer que el DT del crecimiento del órgano sea aproximadamente igual al GT medio del parénquima

que es el componente mayoritario. Además, el embrión de 14 días está situado aproximadamente en el centro del intervalo de la curva de crecimiento (del día 9 al 18) y es lógico que la duración del ciclo celular en el embrión de esta edad coincida con el GT o DT promedio del intervalo ya que la variación de GT durante el mismo, aunque no es propiamente lineal, es tan pequeña que la variación de pendiente de GT (t) es casi inapreciable.

A partir de los índices mitóticos basales del parénquima hepático en embriones de 5 a 20 días y tomando la duración de la mitosis (MT) como 50 minutos, según resulta de la determinación en el embrión de 14 días y supuesta invariante (de hecho lo es con seguridad entre el día 10 y el 14), se han calculado las constantes de proliferación y las correspondientes duraciones medias del ciclo celular para las distintas edades. El valor de PK pasa de 0,0425/h correspondiente a un GT medio de 16,3 h en el embrión de 5 días a un valor de 0,0096/h que corresponde a un GT medio de 72,2 h en el embrión de 20 días.

La variación de GT durante el período estudiado no es lineal y tiene dos fases claramente diferenciables : Del día 5 al 8 la variación es muy rápida, mientras que entre los días 10 y 20 la variación es bastante lenta. Ello concuerda con el crecimiento en peso del órgano según Schmalhausen (1926) y también con nuestra curva de crecimiento DNA/órgano entre los días 9 y 18. Además, entre ambas fases hay indudablemente una discontinuidad : La representación semilogarítmica de la relación de GT (edad del embrión) es lineal y de escasa pendiente entre los días 10 y 20, indicando una variación exponencial de GT de baja constante. En cambio, durante el primer intervalo (días 5 a 8) la representación semilogarítmica no queda rectificadas, por tanto, la variación de GT durante este período no es lineal ni exponencial simple, sino que sigue una función más compleja. En consecuencia, la ecuación de crecimiento de Gompertz (véase Defares, Sneddon y Wise 1973 y Steel 1977), que comporta un alargamiento exponencial de GT, podría describir nuestro sistema a partir del día 9 ó 10 pero no antes.

Goedbloed (1972, 1974, 1975, 1976 y 1977), a partir de sus estudios morfométricos sobre el crecimiento global y de los diferentes órganos en rata y ratón durante los períodos fetal y postnatal, propone un modelo de crecimiento según el cual las constantes específicas de crecimiento de los diversos órganos se mantienen invariantes durante intervalos de varios días dando lugar a períodos de crecimiento puramente exponencial y saltando bruscamente a valores inferiores de forma simultánea.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la proliferación celular en el parénquima hepático del embrión de pollo no concuerdan con el modelo de Goedbloed, a menos que los períodos de invariancia de la constante de proliferación fueran inferiores a un día - entre los días 5 y 8 - ó a tres días - entre los días 10 y 20 -. Sin embargo, dadas las limitaciones de precisión en la determinación de las constantes de proliferación a causa de la variabilidad del material, de los errores de medida y, principalmente, de que la duración del ciclo celular es de aproximadamente un día en los hepatocitos del embrión de 6 días, de algo más de 2 días en los del embrión de 10 días y de unos tres días en los del embrión de 20, carece de sentido intentar averiguar si existen períodos de invariancia de la constante de proliferación inferiores a 1 día - entre los días 5 a 8 - ó inferiores a 3 días a partir del día 10.

Un aspecto del modelo de Goedbloed que sí creemos aplicable a nuestro material es el de la existencia de discontinuidades en el proceso de crecimiento. Diversos autores (véase Balinsky 1978 y Steel 1977) han intentado hallar funciones matemáticas que pudieran describir curvas de crecimiento enteras. Aunque este objetivo ha sido alcanzado de forma aproximada por varias expresiones, la descripción exacta de los procesos de crecimiento no puede hacerse de forma tan sencilla ya que los procesos de diferenciación representan cambios cuánticos en las propiedades celulares que, en sí mismas y a través de nuevas interacciones celulares, convierten el desarrollo en un proceso claramente discontinuo.

El modelo de Weiss y Kavanau (1957) y Kavanau (1960) para la autorregulación del crecimiento, por medio de inhibidores específicos producidos

por las propias células sobre las cuales actúan, supone que los inhibidores se diluyen en los espacios extracelulares y que la cantidad de inhibidor es función del número de células productoras. La proliferación celular dependería negativamente de la concentración de inhibidor. El modelo hace la predicción de que el volumen de dilución del inhibidor disminuye relativamente a lo largo del desarrollo, determinando junto con el aumento del número de células el aumento progresivo de la concentración del inhibidor.

El hígado de embrión de pollo posee al principio amplios espacios extracelulares - vasculares - entre el parénquima, durante el desarrollo estos espacios se van reduciendo. Tomando en consideración el modelo de Weiss y Kavanau, nos pareció interesante medir el proceso de densificación del órgano y estudiar su relación con la actividad proliferativa. Aunque el volumen de dilución del inhibidor no se limitaría al espacio extracelular del órgano, es razonable admitir que el espacio extracelular relativo del órgano condicione directamente la concentración in situ de factores producidos por sus propias células. Utilizando un sencillo procedimiento morfométrico hemos medido la fracción de volumen hepático correspondiente al parénquima (FP) - el resto está ocupado por los espacios vasculares - en embriones de diferentes edades entre el día 5 y el 20 del desarrollo. En el embrión de 5 días el parénquima ocupa aproximadamente un 68 % del volumen del hígado, mientras que en el de 20 días ocupa alrededor del 96 %.

La duración media del ciclo celular (GT) en el parénquima hepático del embrión de pollo se halla correlacionada positivamente con la fracción del órgano ocupada por el parénquima o, lo que es lo mismo, la constante de proliferación con la fracción de volumen correspondiente al espacio extracelular. Los puntos GT,FP correspondientes a diferentes edades embrionarias se agrupan alrededor de una recta con un coeficiente de correlación de 0,96, en concordancia con lo que puede esperarse según el citado modelo.

Weiss y Kavanau (1957) consiguieron describir aceptablemente el

crecimiento global del embrión de pollo a partir de su modelo, el cual resulta también adecuado en el caso del crecimiento regenerativo del hígado de rata después de una hepatectomía parcial (Kavanau 1960). Aunque las evidencias experimentales sobre los factores de regulación del crecimiento y concretamente de la regeneración hepática apuntan a un control polifactorial que comprende factores estimulantes e inhibidores (Leffert et al. 1979), el esquema básico del modelo de Weiss y Kavanau sigue teniendo validez.

La originalidad del modelo se basa en el diseño de un sistema de retroalimentación negativa que controla específicamente el crecimiento de cada órgano. El hecho de que la señal responsable del control sea un único factor inhibidor específico para cada órgano como propone el modelo o más bien una combinación específica de factores estimulantes e inhibidores no altera las posibilidades explicativas del modelo.

En efecto, si se acepta la hipótesis de que la reproducción hepatocelular requiere una serie de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento tal como sugieren los estudios de Leffert et al. (1979), la señal inhibitoria, necesariamente proporcional al número de hepatocitos, que constituye el elemento de retroalimentación negativa del modelo estaría constituida por el sistema de internalización y degradación de los factores estimulantes que poseen las propias células. El consumo de factores hepatotróficos, proporcional al número de células, condicionaría el nivel de estos factores en la sangre hepática y por consiguiente la actividad proliferativa de los hepatocitos.

Caben también en este esquema factores inhibidores difusibles como los supuestos en el modelo y que han sido identificados por varios autores (Leffert et al. 1979, Nadal 1979 y Verly 1976). Ya que tanto los factores inhibidores como la mayor parte de los estimulantes (insulina, glucagón y EGF) son polipéptidos que se unen a receptores específicos de la membrana, podría suponerse que los factores inhibidores actúen bloqueando competitivamente los receptores de los factores estimulantes.

Sea cual sea el mecanismo preciso de regulación de la proliferación

hepatocelular, la disminución del volumen extracelular relativo del hígado, que hemos hallado estrechamente correlacionada con la disminución de la actividad proliferativa, encaja bien en el esquema general propuesto ya que determinaría un aumento de concentración en la sangre hepática de los factores inhibidores producidos in situ y una disminución relativa del aporte de factores hepatotróficos de origen extrahepático.

Una caracterización más precisa del ciclo de reproducción celular en el parénquima hepático hubiera sido posible si la técnica de la frecuencia de mitosis marcadas (FLM) pudiera aplicarse al embrión de pollo in situ. Esto no parece factible tratándose de un sistema "cerrado" y al requerir la técnica de la FLM que las células queden expuestas durante un tiempo muy corto al trazador radiactivo (pulsación).

Hemos realizado, sin embargo, experimentos de incorporación continua de timidina tritiada durante una hora al DNA hepático en embriones de 10 y 14 días y comparamos el incremento porcentual de actividad específica. Como cabía esperar dicho parámetro es mayor en el embrión de 10 días (37,93 %) que en el de 14 días (27,34 %), siendo la relación entre ambos incrementos de 1,3507. Esta relación puede compararse con la que existe entre las respectivas constantes de proliferación (0,0132/h para el embrión de 10 días y 0,0126/h para el de 14 días) que es igual a 1,0476. Ya que los resultados de la incorporación de timidina tritiada están expresados en forma relativa a la cantidad de DNA y corregidos para la concentración del precursor en la fracción soluble, la diferencia entre ambas relaciones solo puede atribuirse a una utilización más eficiente del precursor por parte del embrión de 10 días, lo cual sugiere una actividad timidinkinasa mayor o bien un contenido menor de timidilato (por mayor consumo) que determinaría una menor dilución isotópica. Este tipo de modificaciones han sido descritas en cultivos de células de mamífero tratadas con dibutiril-cAMP por diversos autores (Prescott 1976).

5.3. Sincronía de células hermanas, crecimiento celular y modelos del ciclo celular.

Hemos estudiado la sincronía de células hermanas en el parénquima hepático de embriones de 10 y 14 días y medido el tamaño o volumen celular medio de los hepatocitos entre los 6 y 20 días del desarrollo. Ambos estudios son relevantes con respecto a la organización del ciclo celular y serán discutidos conjuntamente y en relación a los principales modelos del mismo.

Existen básicamente dos concepciones fundamentales sobre la estructura del ciclo celular, una determinística y otra estocástica.

La concepción determinística, en su forma más generalmente aceptada, supone que la progresión a través de puntos críticos del ciclo celular, como la iniciación de la duplicación cromosómica o de la división celular, se realiza como consecuencia de algo que ocurre invariablemente cuando la célula en su crecimiento alcanza un determinado tamaño. Este modelo ha encontrado un sólido apoyo experimental en las levaduras y otros microorganismos (Hartwell y Unger 1977 y Yanishevsky y Stein 1981), mientras que la aplicabilidad a las células de mamífero es más discutida ya que los estudios sobre tamaño celular y duración del ciclo en dichas células han dado resultados contradictorios (Yanishevsky y Stein 1981).

La concepción estocástica, en su forma más general, admite que el ciclo celular no es un proceso continuo sino que la célula a lo largo del mismo debe realizar un número determinado de saltos o transiciones entre compartimentos, sin que exista un tiempo de residencia fijo para cada compartimento sino simplemente una cierta probabilidad de abandonarlo para pasar al siguiente (Takahashi 1966 y 1968). Esta clase de modelos se originaron para dar cuenta de la gran variabilidad observada en la duración del ciclo y especialmente del intervalo G_1 en células de mamífero.

Un caso especial dentro de esta concepción del ciclo es el modelo de probabilidad de transición (Burns y Tannock 1970, Smith y Martin 1973 y 1974) que divide el ciclo celular en dos partes : la fase B que

comprende los intervalos S, G₂, M y parte de G₁ y en la que la célula progresa de manera uniforme y un estado A en el que la célula cae algo después de la división celular y en el que reside por un tiempo indeterminado hasta realizar la transición a la fase B. La transición del estado A a la fase B se realizaría según una cinética de primer orden, es decir, con una probabilidad constante. Una versión más reciente de este modelo (Brooks, Bennett y Smith 1980) ha sido propuesta para explicar la respuesta de los cultivos celulares quiescentes a la estimulación por el suero o factores de crecimiento y admite la existencia de dos transiciones de probabilidad y una fase determinística.

Un aspecto fundamental y común a las dos versiones del modelo de probabilidad de transición es que la variabilidad de duración del ciclo entre células hermanas depende únicamente de una transición que se realiza con probabilidad constante y, por tanto, se distribuye exponencialmente (curvas Beta exponenciales).

El método de la coincidencia mitótica, ideado y aplicado por nosotros al parénquima hepático del embrión de pollo, permite medir el grado de sincronía de las células hermanas, es decir, estudiar su variabilidad en la progresión por el ciclo celular. Para este fin y hasta donde llega nuestro conocimiento, el método de la coincidencia mitótica es el único aplicable de forma general a tejidos sólidos. Solamente en casos muy especiales, como en la blástula de anfibio (Signoret 1977) es posible seguir in situ los ciclos de las diferentes células de la misma forma que se hace en los cultivos celulares en monocapa y medir la duración de los mismos.

Definimos coincidencia mitótica (M_{co}) como la probabilidad de que una célula adyacente a una célula mitótica dada se encuentre también en mitosis. Este parámetro puede medirse por la proporción de mitosis asociadas en pares en la sección histológica y puede calcularse a partir de la expresión :

$$M_{co} = N_v \cdot (1-s) \cdot MI + N_v \cdot s \cdot SP_{co} (MT)$$

Donde N_y es el número medio de células vecinas o adyacentes a cualquier célula en la sección histológica, s es la probabilidad de que una célula sea la hermana de una célula adyacente (calculada como 1 dividido por el número de células adyacentes a una célula en el tejido tridimensional), MI es el índice mitótico y $SP_{co}(MT)$ es la fracción de pares de hermanas que coinciden en la mitosis en el momento de la observación. Si la observación se realiza después de un tiempo de bloqueo mitótico (MBT), MI se convierte en $MI(MBT)$ y $SP_{co}(MT)$ en $SP_{co}(MBT)$.

El factor $SP_{co}(MT)$ puede calcularse como la integral definida entre 0 y MT del producto de dos funciones de probabilidad:

$$SP_{co}(MT) = \int_0^{MT} SP_{co}(t) \cdot SP_D(t) \cdot dt$$

Donde $SP_{co}(t)$ es la probabilidad de coincidencia en función del desfase y $SP_D(t)$ es la distribución de probabilidad de desfases entre células hermanas que debe ser supuesta de acuerdo con un determinado modelo del ciclo celular.

La expresión de $SP_{co}(MT)$ que se obtiene a partir del modelo de probabilidad de transición (Smith y Martin 1973), esto es, admitiendo una distribución exponencial de desfases entre hermanas es:

$$SP_{co}(MT) = 1 - \frac{1 - e^{-k \cdot MT}}{k \cdot MT}$$

Donde k es la constante de velocidad de la transición que puede determinarse a partir de la constante de proliferación (PK) y de la duración de la fase determinística del ciclo (T_B) de acuerdo con Smith y Martin (1973). MT se convierte en MBT en condiciones de bloqueo mitótico.

La expresión

$$SP_{co}(t) = 1 - e^{-k \cdot t}$$

donde t puede ser MT o MBT de Domingo et al. (1978) debe ser considerada

únicamente como una primera aproximación ya que no tiene en cuenta la gradación en la probabilidad de coincidencia en función del desfase, considerándola siempre igual a la unidad para desfases inferiores a MT o MBT y cero para desfases superiores. Sin embargo, con nuestros datos, el utilizar una u otra expresión no modifica demasiado el valor de la coincidencia mitótica calculado.

Hemos medido Mco en el parénquima hepático de embrión de pollo de 10 y de 14 días después de un bloqueo mitótico de 4,5 y 6 horas respectivamente. El valor obtenido puede compararse con el calculado a partir del modelo de probabilidad de transición, previa determinación de Nv , s , MI (MBT), PK y T_B . No disponiendo de una curva de frecuencia de mitosis marcadas (FLM) de nuestro material, hemos tomado T_B igual al valor de GT en el embrión de 5 días. La duración media del ciclo en el hepatocito del embrión de esta edad es de 16,3 horas, que es del orden de los valores de T_B medidos por Smith y Martin (1973) en cultivos de células de mamífero.

En el embrión de 14 días la correspondencia entre el valor de Mco medido y el calculado es muy buena, habiendo obtenido para ambos la misma proporción de coincidencia - 24 % - tras 6 horas de bloqueo. En el embrión de 10 días los valores de Mco calculado y medido no son exactamente iguales - 16 % y 18 % respectivamente - pero la diferencia entre ambos es insignificante en relación al error de medida, en el embrión de 10 días el tiempo de bloqueo mitótico fué de 4,5 h.

Aunque como es lógico, la determinación de un sólo punto en la curva Beta no permite conocer su forma y, por tanto, no puede pretenderse que nuestros resultados prueben completamente la validez del modelo de probabilidad de transición, es indudable que la rápida pérdida de sincronía de los pares de células hermanas observada en los hepatocitos de embrión de pollo a través de la coincidencia mitótica queda explicada cualitativa y cuantitativamente por dicho modelo.

Ya que entre células hermanas no puede suponerse que existan diferencias microambientales importantes, la pérdida de sincronía entre

hermanas puede ser debida únicamente a una diferencia de tamaño o composición celular como consecuencia de una división imprecisa del citoplasma de la célula madre o bien a una interrupción del ciclo como el supuesto por el modelo de probabilidad de transición.

A partir de la medida de las áreas de sección nuclear en las preparaciones para microscopía electrónica de nuestro material hemos determinado el volumen nuclear medio de los hepatocitos en varias edades del embrión. Utilizando la relación de volúmenes núcleo/célula medida asimismo en las secciones, ha sido posible calcular el volumen celular medio en diferentes edades una vez conocido el volumen nuclear correspondiente.

El volumen del hepatocito de embrión de pollo no es constante sino que va aumentando durante el desarrollo. A los 6 días, el volumen celular es de aproximadamente 327 micras³ y a los 20 días alcanza unas 820 micras³. Este aumento de tamaño depende en cierta medida de la acumulación de inclusiones lipídicas de origen vitelino (ver más adelante), sin embargo, en su mayor parte es debido al crecimiento de los diversos elementos estructurales sintetizados y ensamblados en la propia célula.

Resulta interesante considerar que entre los días 6 y 20 del desarrollo el volumen medio del hepatocito se multiplica por 2,5 y la duración media del ciclo celular también aumenta - pasa de 24 h a 72 h - es decir, se multiplica por 3.

Diversos autores (véase Mitchison 1974) consideran que el ciclo celular se compone de dos secuencias paralelas : El ciclo de crecimiento y el ciclo del DNA-división o ciclo cromosómico. La existencia de mecanismos de acoplamiento entre ambos ciclos mantendría el tamaño celular dentro de unos límites determinados. Este supuesto es el punto de partida de los modelos determinísticos de control por el tamaño del ciclo celular (Fantes y Nurse 1981, Yanishevsky y Stein 1981) :

En cada ciclo, la célula pasa por un tamaño crítico que, de alguna forma, determina el desencadenamiento de un paso decisivo en el ciclo cromosómico. Un caso bien conocido, por ejemplo, es el de la levadura Saccharomyces cerevisiae, donde el paso por un punto de G₁ conocido como

"start" controlado por el gen cdc 28 y paso previo necesario para la iniciación de la síntesis de DNA, se produce únicamente cuando la célula alcanza determinado tamaño y si el cultivo se mantiene en condiciones nutritivas pobres que dificultan el crecimiento celular, el ciclo se prolonga a expensas de la parte del G_1 que precede al "start" (Yanishevsky y Stein 1981).

Es probable que mecanismos parecidos se encuentren en el ciclo de las células de mamífero aunque enmascaradas en parte. Nurse (1980) sugiere que los modelos determinísticos de control por el tamaño celular, adecuados a levaduras y otros microorganismos, y los modelos probabilísticos adecuados a las células de mamífero no son incompatibles : En efecto, el componente probabilístico (distribución exponencial de GT) ha sido también comprobado en levaduras y el que las células de mamífero presentan una relación entre tamaño al principio del ciclo y duración del mismo ha sido comprobado en algún caso (Killander y Zetenberg 1965 a y b). Según Nurse, existirían dos elementos de control uno ligado al tamaño celular y otro relacionado directamente con el ciclo cromosómico y de carácter probabilístico en todas las células, pero su importancia relativa en el control sería distinta en los diferentes tipos celulares o condiciones ambientales. En las levaduras el factor limitante de la reproducción sería el crecimiento celular y por esto el elemento de tamaño aparecería como el mecanismo regulador, mientras que en las células de mamífero el factor limitante y por tanto regulador sería el elemento probabilístico del ciclo cromosómico que enmascararía en muchos casos la relación de dependencia entre la progresión del ciclo cromosómico y el crecimiento celular.

El aumento de volumen del hepatocito embrionario podría ser una consecuencia del alargamiento del ciclo celular o, más precisamente, del ciclo cromosómico. En efecto, podríamos admitir que los factores hepatocelulares regulan la proliferación hepatocelular a través del ciclo cromosómico, controlando la constante de transición del estado A a la fase B, determinando a lo largo del desarrollo una disminución progresiva de

la misma y aumentando, por consiguiente, la duración media del ciclo cromosómico. El tamaño celular sería simplemente una consecuencia del tamaño inicial, del ritmo de crecimiento durante el ciclo cromosómico y de la duración del mismo, de modo que al alargarse éste se alcanzaría un tamaño medio mayor.

La posibilidad de un mecanismo de conexión entre el ciclo cromosómico y el ciclo de crecimiento, en el sentido de que la iniciación de la síntesis de DNA no pudiera realizarse a menos que la célula hubiera adquirido un tamaño crítico determinado, quedaría enmascarada porque el tamaño del hepatocito, al alargarse el ciclo cromosómico per se, quedaría permanentemente o casi permanentemente por encima del valor crítico. Esta situación podría darse en determinadas condiciones en los cultivos de células de mamíferos, explicando por qué los resultados de los estudios sobre relación entre tamaño celular y duración del ciclo resultan contradictorios en dichas células.

El tamaño celular máximo dependería de las constantes anabólicas y catabólicas y de factores de geometría celular (condiciones del recambio molecular) en la forma descrita por la expresión de von Bertalanffy (1949) para el crecimiento de organismos, existiendo un tamaño para el cual la cantidad de biosíntesis iguala a la de biodegradación. El término de biodegradación de la ecuación debería incluir, además de la degradación propiamente dicha, la pérdida de materia por exportación que es de gran importancia en células secretoras como el hepatocito maduro. El estado estacionario puede alcanzarse porque la biosíntesis es proporcional a la superficie de intercambio de nutrientes mientras que la degradación lo es a la masa biodegradable o volumen.

Parece lógico suponer que las poblaciones celulares quiescentes (G_0) y que, sin embargo, disponen en abundancia de nutrientes que utilizan en la biosíntesis necesaria para el recambio molecular y la secreción, como, por ejemplo, los hepatocitos del animal adulto, se encuentren en la situación de tamaño celular máximo para el tipo celular ya que su crecimiento no está interrumpido por ciclos de división. Durante el desarrollo

embrionario el hepatocito iría aproximándose a este estado a medida que disminuye la frecuencia de su ciclo cromosómico.

No es, por tanto, probable que el tamaño celular sea el mecanismo fundamental en el control de la reproducción en el hepatocito de embrión de pollo, ya que su tamaño estaría durante todo o al menos una parte de G_1 por encima del tamaño crítico, siendo la frecuencia del ciclo cromosómico el factor limitante de la reproducción.

El hecho de que la curva de crecimiento celular durante el ciclo de reproducción no sea del mismo tipo en todas las clases de célula sino que se hayan encontrado diversas formas de crecimiento : acelerados, lineales y desacelerados (Prescott 1976) podría explicarse por la distinta situación del intervalo de tamaño de cada ciclo celular en relación a la curva total de crecimiento posible de las células que puede suponerse sigmoide. El crecimiento sería acelerado en intervalos de la parte inicial de la curva, casi lineal en la región intermedia y desacelerado en la parte final.

Sobre la base física de la transición que origina la variabilidad de la duración del ciclo celular según los modelos de probabilidad de transición se han emitido varias hipótesis :

Smith y Martin (1973) sugieren que la transición del estado A a la fase B dependería de que un determinado factor de iniciación sobrepasara un umbral de concentración. La concentración del iniciador estaría regulada por varios circuitos de retroalimentación enlazados produciéndose oscilaciones irregulares (ruido) de la misma, la probabilidad de transición dependería de la diferencia entre el umbral y la concentración media y de la amplitud de las oscilaciones.

En realidad para dar cuenta de la variabilidad del estado A (tiempo de permanencia en el mismo) bastaría con admitir que el iniciador se encuentra en las células extremadamente diluido y que una de las pocas moléculas existentes desencadenará el proceso cuando colisione y se una con el receptor apropiado. Números de moléculas por célula muy pequeños han sido descritos para proteínas reguladoras de la expresión genética

en las bacterias, así, por ejemplo, la proteína represora del operón lactosa de *E. coli* se encuentra solamente presente en la célula en un número de copias comprendido entre 10 y 20 (Watson 1976).

Brooks, Bennett y Smith (1980) proponen una nueva versión del modelo con dos transiciones de probabilidad constante que da cuenta de la variabilidad de T_B entre células no hermanas y explica detalladamente las respuestas cinéticas de los cultivos celulares quiescentes a la estimulación por el suero o factores de crecimiento. Según estos autores, las células quiescentes se encuentran en el estado Q y una vez estimuladas realizan la transición a una fase L según una constante de velocidad K_Q . Al terminar la fase L, las células entran en un estado A del que salen mediante una transición de constante K_A para iniciar la duplicación del DNA y la división celular, además al salir del estado A, las células vuelven a entrar en el estado Q y así sucesivamente. Si K_Q es suficientemente alta, la mayor parte de las células realizarán la transición de Q a L antes de dividirse, de modo que las células hermanas estarán en el mismo punto de la fase L en el momento de su nacimiento y entrarán simultáneamente en el estado A, por ello, la variabilidad entre células hermanas dependerá únicamente de una transición (de A a Q y S-G₂-M) distribuyéndose sus diferencias de GT exponencialmente, mientras que la variabilidad entre células no hermanas dependería de dos transiciones y por esto no es exactamente exponencial (curvatura de la parte inicial de las curvas alfa).

Los autores comparan el modelo de dos transiciones con el ciclo centriolar e identifican hipotéticamente la salida del estado Q con el inicio de la duplicación del centriolo, la fase L con la maduración del mismo y la salida del estado A con la separación de los centriolos hijos.

Sea cual fuere la base física precisa del mecanismo de la o las transiciones, parece necesario admitir que se trata de una interacción entre dos moléculas o estructuras supramoleculares de las que existe un número muy pequeño en la célula. Si un único iniciador tuviera que unirse a un receptor la probabilidad de la transición dependería del número de

moléculas de iniciador y admitiendo que basta que una de las moléculas del iniciador se una al receptor único para desencadenar el proceso, la cinética de la transición de las células sería de primer orden ya que la probabilidad de la transición se mantiene constante durante el tiempo de espera (Fantes y Nurse 1981).

Las poblaciones celulares son espontáneamente asincrónicas y una vez sincronizadas pierden rápidamente la sincronía si no persiste el factor de sincronización (Prescott 1976). El modelo de probabilidad de transición explica esta pérdida de sincronía por una o dos interrupciones en el ciclo, con lo cual la sincronía se pierde bruscamente en el primer ciclo, es decir, a nivel de las células hermanas. La distribución exponencial de diferencias de GT entre hermanas encontrada en cultivos celulares (Minor y Smith 1974 y Shields 1978) es el fundamento experimental más importante del modelo. Hasta ahora no existía ningún procedimiento para averiguar la variabilidad del ciclo celular entre hermanas in vivo. Mediante el método de la coincidencia mitótica hemos demostrado que en el parénquima hepático de embrión de pollo, la variabilidad de GT entre hermanas corresponde muy aproximadamente a la que cabe esperar según el modelo de probabilidad de transición.

En relación al tamaño molecular de los posibles factores iniciadores de la transición, el hecho de que las células vecinas en un tejido sólido como el parénquima hepático, unidas por uniones en hendidura (Gilula 1974) que como es sabido permiten la difusión libre entre células de iones y pequeñas moléculas (Pm inferior a 1.000 daltons) : Sheridan (1974) Y Loewenstein (1975), no se encuentren sincronizadas en su ciclo de reproducción descartaría a iones y pequeñas moléculas como los factores reguladores limitantes del ciclo.

Hemos observado complejos de unión entre los hepatocitos de embrión de pollo, pero no los hemos estudiado con suficiente detalle para asegurar que contienen uniones en hendidura, aunque es probable que así sea. En este caso, nuestros resultados con el método de la coincidencia mitótica permitirían suponer que o los factores de bajo peso molecular

no actúan como elementos reguladores limitantes de la transición en los hepatocitos de embrión de pollo o bien que las comunicaciones intercelulares directas permanecen temporal o permanentemente cerradas.

Whitfield et al. (1976 y 1979) han observado que durante el proceso de activación de los hepatocitos quiescentes de rata adulta por la hepatectomía parcial, se produce una onda positiva de concentración de cAMP hacia las 12 horas después de la hepatectomía y que resulta necesaria para el desencadenamiento de la síntesis de DNA que tiene lugar poco después. Dan pruebas indirectas de que el ión calcio interviene también en el proceso de activación y proponen un sistema de control positivo basado en el cAMP y el Calcio para la iniciación de la síntesis de DNA en los hepatocitos.

Obviamente, nuestros resultados sobre la pérdida de sincronía de las células hermanas y también la falta de sincronía de las células vecinas en general no presuponen nada sobre si determinados iones o nucleótidos resultan necesarios para la iniciación de la síntesis de DNA, simplemente indican que en los hepatocitos embrionarios proliferantes, que es un sistema diferente del de los hepatocitos quiescentes estimulados, el factor limitante de la transición es probablemente una molécula relativamente grande y con un número pequeño de unidades por célula, mas que un ión inorgánico o un nucleótido cíclico con un número elevado de unidades por célula y capaz de difundir entre células vecinas determinando su sincronización.

La importancia de la pérdida de sincronía de las células hermanas no tiene un interés meramente teórico, sino que presenta un aspecto práctico en relación a la terapéutica antineoplásica. La estrategia de la utilización de la radio y quimioterapia se basa en explotar las diferencias de sensibilidad al tratamiento entre las células neoplásicas y las normales. Ello depende no solamente de las diferencias de tipo bioquímico en sí mismas, sino también de las características de sus ciclos celulares respectivos. En efecto, si se aplican dos agentes citotóxicos por separado con un determinado intervalo entre ambos, siendo el primero un bloqueante

con efectos más o menos sincronizadores, el tiempo de espera adecuado para la aplicación del segundo agente depende de la situación en el ciclo de las células neoplásicas de la fase más sensible, evitando por el contrario la fase sensible en el ciclo de las poblaciones de células normales más críticas como las de la médula ósea-hematopoyética. La rápida pérdida de sincronía que se produce bruscamente en la primera generación, es decir, en las células hermanas, ha de producir necesariamente un solapamiento de las dos poblaciones y es probablemente responsable, en parte, de que las esperanzas puestas en la citocinética como base racional para el diseño de protocolos terapéuticos no hayan sido completamente satisfechas.

Otro aspecto del problema, en estrecha relación con el modelo de probabilidad de transición, consiste en la relativa insensibilidad al tratamiento de las células en estado G_0 que siempre existen en los tumores (Perry 1977). Según el modelo de probabilidad de transición el estado G_0 no es más que un estado A de constante de transición muy baja, de modo que la existencia de una mayor o menor proporción de células fuera del ciclo y, por tanto, resistentes al tratamiento, sería inevitable debido a la estructura interrumpida del ciclo celular.

5.4. Ultraestructura celular y actividad proliferativa.

Hemos realizado un estudio ultraestructural cualitativo y cuantitativo del hepatocito de embrión de pollo entre los días 6 y 20 del desarrollo. Dentro de las limitaciones de una interpretación funcional de datos estructurales, la comparación de los resultados de la microscopía electrónica con los del estudio de la proliferación celular permiten sugerir determinados cambios funcionales en el proceso de la diferenciación celular del parénquima hepático.

Además del crecimiento, ya comentado, del hepatocito durante el desarrollo, hemos observado modificaciones relativas y absolutas del volumen de diversos compartimentos estructurales de la célula.

El núcleo del hepatocito en el embrión de 6 días ocupa aproximadamente un 20 % del volumen celular, mientras el del embrión de 20 días únicamente representa el 5 % del mismo. Esta reducción es debida mayormente al crecimiento del citoplasma, existe, sin embargo, una cierta reducción del volumen nuclear medio a partir del día 10 (73 micras³) hasta el día 20 (41 micras³). Esta disminución del volumen nuclear es debida probablemente al alargamiento del ciclo celular durante el desarrollo, en efecto, si se tiene en cuenta que se mide el tamaño promedio del núcleo y que durante el ciclo celular el volumen nuclear se dobla durante la fase S, la prolongación del ciclo, que se hace a expensas de G₁ (estado A según el modelo de probabilidad de transición), ha de determinar una disminución del volumen nuclear medio al bajar la proporción de células con núcleos grandes (S y G₂).

La cromatina se encuentra en todas las edades muy relajada (eucromatina) como corresponde a una célula metabólicamente muy activa y con pequeñas regiones de cromatina densa (heterocromatina) junto al nucléolo y a la envoltura nuclear. En algunas telofases hemos podido observar diferencias en el grado de condensación de la cromatina entre los dos núcleos hijos y aunque no se ha realizado un estudio sistemático y cabría explicar esta observación por diferencias en el plano de sección relativo de cada núcleo, resulta sugestiva la idea de que las imágenes indican realmente un desfase en el proceso de desplegamiento de la cromatina. Sería necesario hacer un estudio sistemático de las telofases

para llegar a una conclusión definitiva. Sin embargo, la hipótesis es atractiva en relación a los resultados obtenidos sobre sincronía de células hermanas y al modelo de probabilidad de transición.

La relación de volúmenes nucléolo/célula disminuye entre los días 6 y 20 del desarrollo del 3 al 0,4 %. Ello es debido al crecimiento citoplasmático y también a una notable reducción del volumen nucleolar que pasa de 10 a 3 micras³ aproximadamente en el mismo período. Se observan además cambios en la estructura del orgánulo que indican una disminución de su actividad. A medida que aumenta la edad del embrión, el nucléolo "promedio" va perdiendo la estructura de nucleolonemas típica de los primeros días y aparecen imágenes nucleolares con grandes ojales o áreas claras e incluso formas anulares que, según Busch y Smetana (1970), se observan en casos de inhibición de la síntesis de rRNA por la actinomicina D y también en animales seniles. Es posible, por tanto, interpretar estas imágenes nucleolares con grandes áreas claras como correspondientes a nucléolos poco activos, vacíos de partículas por falta de producción.

La imagen descrita corresponde al nucléolo "promedio" pero en cada edad se observan imágenes de todas las clases, lo cual sugiere que podría tratarse de modificaciones cíclicas relacionadas con el ciclo de reproducción y que la imagen "promedio" dependería de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo.

La importancia de la activación de los genes ribosómicos, es decir, de la función nucleolar, en los procesos de estimulación reproductiva de células quiescentes ha sido demostrada por diversos autores tanto en microorganismos como en células de mamífero *in vitro* e *in vivo* (Baseraga 1981) y concretamente, el antígeno T del virus SV-40, que es la proteína responsable de la estimulación de la síntesis de DNA en las células infectadas por el virus, reactiva los genes ribosómicos del genoma del ratón en las células híbridas hombre-ratón en las que los genes rRNA del ratón se encuentran reprimidos (Soprano et al. 1979).

Darzynkiewicz et al. (1980 a y b) utilizando la citofluorometría de

flujo, han medido simultáneamente el contenido de DNA y de RNA y la condensación de la cromatina en células individuales de poblaciones de poblaciones proliferantes y quiescentes. Basándose en el contenido de RNA, han podido identificar dos subcompartimentos en G_1 (G_{1A} y G_{1B}). Después de la mitosis las células entran en el G_{1A} de bajo contenido en RNA desde el cual no pueden pasar directamente a la fase S, sino que el contenido celular de RNA debe aumentar hasta determinado nivel para iniciar la síntesis de DNA, las células con un contenido de RNA por encima de este nivel y que todavía no han iniciado la fase S constituyen el subcompartimento G_{1B} . Además la condensación de la cromatina en el compartimento G_{1A} es mayor que en G_{1B} . Las células quiescentes presentan un menor contenido de RNA y mayor densidad de la cromatina que las del compartimento G_{1A} . La transición de G_{1A} a G_{1B} se realiza con cinética de primer orden.

Los resultados de Darzynkiewicz et al. tienen un doble interés: Por un lado apoyan el modelo de probabilidad de transición y por otro indican que la activación de la síntesis de RNA y esencialmente del rRNA que constituye la mayor parte del RNA celular tiene lugar no solamente en la activación de las poblaciones celulares quiescentes sino también en cada ciclo de las células en proliferación activa.

Teniendo en cuenta todos estos trabajos, nuestras observaciones sobre la estructura del nucléolo del hepatocito embrionario pueden ser razonablemente interpretadas en el sentido de una disminución de la proporción de nucléolos activos al aumentar la edad del embrión y prolongarse la permanencia en el intervalo G_1 (estado A o subcompartimento G_{1A}) del ciclo ya que durante el mismo la actividad nucleolar sería menor. La diversidad de imágenes nucleolares en cada edad (formas activas e inactivas) podría también ser explicada por la variación cíclica en la actividad de los genes ribosómicos.

Cooper (1979) desarrolla un modelo (el modelo continuo) que intenta unificar el ciclo celular de eucariotas y procariotas. La principal hipótesis del modelo consiste en admitir que no existen funciones específicas de G_1 , siendo este intervalo simplemente el resultado de una

diferencia entre el ciclo de crecimiento y la duración de S más G_2 . De manera que el intervalo G_1 puede encogerse hasta desaparecer si la velocidad de crecimiento aumenta hasta conseguir completar el ciclo en un tiempo igual a S más G_2 . Según Cooper, la preparación para la iniciación de la síntesis de DNA tiene lugar de forma continua y se desencadena cada vez que se acumula suficiente cantidad de factor (es) de iniciación, mientras que el proceso S- G_2 -división celular no forma parte del ciclo de iniciación, de modo que "la división celular es el final de un proceso y el principio de nada". Una predicción del modelo es que todas las funciones que en determinadas condiciones se observan en G_1 en condiciones de crecimiento más rápido quedarán superpuestas con S o G_2 .

Tanto el modelo de probabilidad de transición como el modelo continuo de Cooper vacían de contenido funcional o de programa específico el intervalo G_1 . Sin embargo, en el caso del modelo de probabilidad de transición, el G_1 conserva su entidad al venir definido esencialmente por un estado estacionario al que las células van a parar después de la división y del que salen con una determinada probabilidad para iniciar la preparación, probablemente corta, para la síntesis de DNA.

Los resultados de Darzynkiewicz et al. (1980 a y b), antes comentados, indican una relación entre el ciclo de condensación-relajación de la cromatina y la transición del G_1 de bajo contenido de RNA al G_1 de alto contenido en RNA, indispensable para la iniciación de la fase S. El modelo continuo de Cooper no tiene en cuenta el ciclo de condensación-relajación de la cromatina que es exclusivo de los eucariotas, ignorándolo en aras de la unificación. A nuestro modo de ver, aunque la mayor parte de cambios moleculares en G_1 no sean específicos del intervalo, no es posible prescindir completamente del mismo y considerar la división celular como un punto final ya que la relajación de la cromatina entre la mitosis y la fase S no es solamente un paso necesario sino, probablemente, un proceso controlable del que podría depender la frecuencia del ciclo celular.

El citoplasma del hepatocito embrionario sufre también notables modificaciones a lo largo del desarrollo. El crecimiento global del mismo se refleja en el crecimiento celular que ya hemos considerado, sin embargo, el crecimiento del citoplasma no tiene lugar de manera uniforme para todos sus componentes.

La fracción de volumen correspondiente a las mitocondrias es prácticamente igual en el embrión de 6 días que en el de 20, pero es algo mayor en el de 15 días. Este resultado concuerda con el trabajo de Warshaw (1972) que observa a esta edad un máximo de la actividad específica de enzimas mitocondriales que intervienen en la activación de los ácidos grasos y sugiere que podría ser debido a un aumento en el número de mitocondrias. Nuestros resultados confirman esta hipótesis aunque no podemos precisar la importancia relativa del número y del tamaño de las mitocondrias en la variación de la fracción de volumen.

Las inclusiones lipídicas crecen más rápidamente que el resto de citoplasma, de modo que su proporción de volumen celular pasa de un 1,2 % en el embrión de 10 días al 7,6 % en el de 20 días. Además su estructura es distinta a lo largo del desarrollo : Inicialmente presentan un pequeño centro de poca electrodensidad y una corteza muy electrodensa que rodea asimétricamente al centro claro. A medida que aumenta la edad del embrión aumenta el tamaño de las inclusiones a expensas de la parte central clara, mientras que la corteza disminuye de espesor. Teniendo en cuenta que al principio se componen principalmente de fosfolípidos y que a partir del día 11 empieza a acumularse colesterol (Romanoff 1960), sería posible interpretar estas estructuras suponiendo que la corteza contiene fosfolípidos que son muy osmiofílicos y la parte central colesterol y grasas neutras, aunque habría que encontrar alguna razón que explicase por qué no se mezclan. Otra alternativa es que la parte densa tenga composición proteica conteniendo enzimas para la degradación de los lípidos de la parte central, es decir, se trataría de un lipo-lisosoma que suministraría ácidos grasos libres para el consumo mitocondrial. Téngase en cuenta que los ácidos grasos son el combustible fundamental en

el embrión de las aves (Warshaw 1972).

También se han observado imágenes de constricción de las inclusiones (fusiones o escisiones) que sugieren la existencia de un transporte de gotas lipídicas dentro de vesículas membranosas a semejanza del descrito por Palay y Karlin (1959) en el epitelio intestinal.

El conjunto de las mitocondrias y las inclusiones lipídicas constituye solamente el 18 % del volumen del citoplasma hepatocelular en el embrión de 10 días y el 24 % en el de 20 días. El resto del volumen corresponde al retículo endoplasmático, aparato de Golgi y derivados y al hialoplasma conteniendo polisomas y depósitos de glucógeno. Todos estos componentes no han sido estudiados cuantitativamente por separado pero la simple observación de las fotografías permite estudiar las principales modificaciones a lo largo del desarrollo.

El retículo endoplasmático granular es al principio escaso y la mayor parte de los ribosomas aparecen como polisomas libres en el hialoplasma. En los hepatocitos de 6 y 8 días del desarrollo, las cisternas del retículo endoplasmático granular se encuentran únicamente rodeando a las mitocondrias y posteriormente se distribuyen también en los espacios intermitocondriales.

El aparato de Golgi con sus cisternas, cuerpos densos y cuerpos multivesiculares se observa en todas las edades en el polo biliar del hepatocito. Su tamaño es probablemente mayor hacia el final del desarrollo ya que entonces sus elementos aparecen más frecuentemente en las secciones.

El desarrollo del retículo endoplasmático granular y del complejo de Golgi convierte el hepatocito inmaduro que destina probablemente la casi totalidad de las proteínas sintetizadas a su propio crecimiento y reproducción en una célula secretora de proteínas que se reproduce cada vez con menor frecuencia. La desviación de la síntesis proteica en el sentido de un aumento de la proporción de ribosomas dedicados a la elaboración de proteínas de secreción, evidenciado por el aumento absoluto y relativo del retículo endoplasmático granular, debería tenerse en cuenta

en la aplicación de la ecuación del balance metabólico (von Bertalanffy 1949) al crecimiento celular, como un incremento en el término negativo.

El retículo endoplasmático liso constituye agrupaciones de vesículas entre las cuales pueden observarse depósitos de glucógeno en forma de rosetas o partículas alfa. En nuestras condiciones de preparación, el glucógeno del hepatocito de pollo es extraído en parte por lo que no es posible una valoración absoluta de los depósitos. Sin embargo, es interesante constatar que es precisamente en los embriones de 12 días donde mejor y aparentemente en mayor cantidad se observan los depósitos del polisacárido, concordando con los resultados de Houssaint y Le Douarin (1974) que encuentran un máximo de actividad glucógeno sintetasa en el hígado de embrión de pollo de esta edad.

Nuestros resultados sobre la reproducción y la diferenciación estructural del hepatocito plantean el conocido pero no resuelto problema de la relación inversa entre la actividad proliferativa y el grado de diferenciación. Tsanev (1975) propone un modelo para explicar la relación entre la diferenciación celular y la actividad proliferativa aplicado al caso de la regeneración hepática. Esencialmente, el modelo supone que las proteínas necesarias para la síntesis de DNA y la división celular están controladas por un grupo de "operones mitóticos", mientras que las proteínas responsables de funciones celulares muy especializadas lo estarían por los "operones funcionales" existiendo entre ambos grupos un mecanismo de interacciones recíprocas por represores con diferentes puntos sensibles a los factores reguladores del ambiente extracelular. Estos factores desviarían el sistema en uno u otro sentido, es decir, hacia la proliferación o hacia la diferenciación.

El modelo propuesto por Tsanev permite explicar la reversibilidad de la diferenciación hepatocelular que se manifiesta en la regeneración hepática y en los hepatomas por cambios estructurales regresivos y especialmente por la síntesis de proteínas fetales concomitantemente al aumento de la actividad proliferativa. Explica también el por qué factores aparentemente diversos pueden desviar el comportamiento del hepatocito

adulto diferenciado hacia el comportamiento proliferativo y parcialmente desdiferenciado al admitir que el sistema de interacciones puede ser afectado en muchos puntos, conduciendo en cualquier caso a la disminución de los represores mitóticos y a la correspondiente desrepresión de los operones homónimos.

La investigación de las relaciones precisas entre recambio molecular, crecimiento y estructura celulares y ciclo cromosómico, con métodos bioquímicos, citológicos y citocinéticos aplicados a un determinado tipo de célula en diferentes estados, por ejemplo el hepatocito embrionario y postnatal, en la regeneración hepática, en los hepatomas y en diversas condiciones de cultivo ha de ir llenando los espacios de la ignorancia y los conceptos generales con los datos concretos necesarios para pasar de las hipótesis y sugerencias aisladas a una teoría más amplia de la relación entre la reproducción y la diferenciación celulares.

6. Conclusiones

1ª) De la medición de la cantidad de DNA/órgano en hígado, corazón y encéfalo de embrión de pollo entre los días 9 y 18 del desarrollo han resultado las velocidades específicas de crecimiento medias para todo el período estudiado siguientes : 0,0126/h para el hígado, 0,0127/h para el corazón y 0,0064/h para el encéfalo, que corresponden a períodos de duplicación de la población de 55,01, 54,58 y 108,30 horas respectivamente.

2ª) La velocidad específica de crecimiento no es, sin embargo, constante en todo el período estudiado sino que va disminuyendo. Si se compara la velocidad específica media de la primera mitad del período (días 9 a 14) con la de la segunda (días 14 a 18), se observa una disminución de aproximadamente un 37 % para el hígado, un 25 % para el corazón y solamente un 5 % para el encéfalo.

3ª) Del estudio del crecimiento relativo de los tres órganos mediante relaciones bilogarítmicas y cuantificado por las correspondientes relaciones de crecimiento diferencial o constantes alométricas (relaciones entre las velocidades específicas de crecimiento) resulta lo siguiente: La relación entre el crecimiento del hígado y el del corazón varía muy poco, mientras que las del hígado y del corazón con respecto al encéfalo muestran una discontinuidad a nivel del día 14, manteniéndose, sin embargo, relativamente invariantes antes y después de este día. La constante alométrica del hígado con respecto al encéfalo media de todo el período es de 1,9643 pero existe una disminución entre la primera y segunda mitad del mismo de aproximadamente un 33 %. La constante correspondiente del corazón con respecto al encéfalo es de 1,9896 y con una disminución del 21 %.

4ª) La modificación descrita de las constantes de crecimiento diferencial del hígado y del corazón con respecto al encéfalo está en desacuerdo con la invariancia que, a nuestro parecer, cabría esperar del modelo

de crecimiento de Tanner (1963). Aunque es indudable el papel del SNC - a través de la hipófisis y la hormona de crecimiento - como regulador central y, en este sentido, creemos válido el esquema básico de dicho modelo, los mecanismos de autorregulación específicos de órgano, las interacciones entre órganos por medio de hormonas y factores de crecimiento y la diferenciación no pueden ser ignorados en un modelo de crecimiento del organismo pluricelular.

5^a) Del ensayo de la colchicina y de la vinblastina en el embrión de pollo, administradas con el objeto de medir la actividad proliferativa por el método del bloqueo mitótico ha resultado que la colchicina no puede ser utilizada en nuestro material por su excesiva toxicidad o, más exactamente, por la baja relación entre el efecto bloqueante con respecto a los efectos tóxicos generales, en cambio, la vinblastina a la dosis de 10 microgramos por huevo bloquea prácticamente la totalidad de las mitosis en embriones de 10 y de 14 días, sin efectos tóxicos manifiestos en el de 14 días y con efectos leves en algunos embriones de 10 días.

6^a) Hemos medido las constantes de proliferación del parénquima hepático de embrión de pollo de 10 y de 14 días por el método del bloqueo mitótico con vinblastina, coincidiendo prácticamente la de 14 días ($0,0125/h$) con la constante de crecimiento media del período de 9 a 18 días calculada a partir de la curva DNA/hígado (t).

7^a) La duración de la mitosis calculada en embriones de 10 y 14 días a partir de las respectivas constantes de proliferación e índices mitóticos basales ha sido de 52 y 50 minutos respectivamente. No siendo significativa esta diferencia y considerando que la duración de la mitosis para un determinado tipo de célula es generalmente la misma con independencia de la actividad proliferativa, hemos tomado el valor obtenido con el embrión de 14 días (50 minutos) como el propio del hepatocito de pollo, a causa de la completa ausencia de toxicidad en los

embriones de esta edad.

8^a) Las constantes de proliferación y las respectivas duraciones medias del ciclo celular de los hepatocitos de embriones de 5 a 20 días de edad han sido calculadas a partir de la duración de la mitosis y de los índices mitóticos basales correspondientes a cada edad. La constante de proliferación disminuye de 0,0425/h en el embrión de 5 días a 0,0096/h en el embrión de 20 días y la duración media del ciclo celular pasa en el mismo período de 16,3 a 72,2 horas.

9^a) La variación de la duración media del ciclo celular de los hepatocitos entre los días 5 y 20 del desarrollo no es lineal y tiene dos fases claramente diferenciables : Entre los días 5 y 8 la variación es muy rápida y no sigue una función exponencial simple, entre los días 10 y 20 la variación es lenta y aproximadamente exponencial.

10^a) La proporción de espacios vasculares en el hígado embrionario disminuye durante el desarrollo, de modo que la fracción de volumen del órgano ocupada por los hepatocitos pasa de un 68 % en el embrión de 5 días a un 96 % en el embrión de 20 días. Además existe una correlación lineal positiva entre la duración media del ciclo celular y la fracción del hígado correspondiente al parénquima con un coeficiente de correlación de 0,96, o lo que es lo mismo, entre la constante de proliferación y el volumen relativo del espacio extracelular, en concordancia con la predicción al respecto del modelo de Weiss y Kavanau (1957) en el sentido de una disminución del volumen de dilución del inhibidor durante el desarrollo.

11^a) El desarrollo del método de la coincidencia mitótica ha permitido por primera vez medir la pérdida de sincronía de células hermanas en su primer ciclo en un tejido sólido, lo cual ofrece la posibilidad de poner a prueba in vivo la distribución exponencial de diferencias de duración

del ciclo entre células hermanas que predice el modelo de probabilidad de transición (Smith y Martin 1973 y 1974 y Brooks, Bennett y Smith 1980). Hasta el presente esto podía hacerse únicamente en los cultivos celulares midiendo individualmente la duración de los ciclos celulares.

12^a) Definimos coincidencia mitótica (M_{co}) como la probabilidad de que una célula adyacente a una célula mitótica dada se halle también en mitosis. Este parámetro puede medirse en las preparaciones histológicas por la proporción de mitosis asociadas en pares y, además, calcularse mediante la expresión

$$M_{co} = N_v \cdot (1-s) \cdot MI + N_v \cdot s \cdot SP_{co}(MT)$$

donde N_v es el número de células vecinas a una célula en la sección, s la probabilidad de que una célula vecina sea la hermana, MI el índice mitótico y $SP_{co}(MT)$ la fracción de pares de hermanas que coinciden en la mitosis de duración igual a MT en el momento de la observación.

$SP_{co}(MT)$ puede calcularse como

$$SP_{co}(MT) = \int_0^{MT} SP_{co}(t) \cdot SP_D(t) \cdot dt$$

donde la función $SP_{co}(t)$ es la probabilidad de coincidencia en función del desfase y $SP_D(t)$ es la distribución de probabilidad de desfases entre células hermanas que debe ser supuesta de acuerdo con un determinado modelo del ciclo celular.

La expresión final para $SP_{co}(MT)$ que resulta a partir del modelo de probabilidad de transición es

$$SP_{co}(MT) = 1 - \frac{1 - e^{-k \cdot MT}}{k \cdot MT}$$

donde k es la constante de transición y MT se substituye por MBT en condiciones de bloqueo.

13ª) La medida de la coincidencia mitótica en embriones de 10 y 14 días después de un bloqueo mitótico de 4,5 y 6 horas respectivamente y los valores correspondientes calculados a partir del modelo de probabilidad de transición se corresponden exactamente en el embrión de 14 días (24 %) y muy aproximadamente en el de 10 días (valor medido 18 % y valor calculado 16 %, diferencia no significativa).

Aunque la determinación de un solo punto de la distribución de diferencias de tiempos intermitóticos entre células hermanas no permite, evidentemente, conocer su forma, es indudable que la rápida pérdida de sincronía de células hermanas observada a través de la coincidencia mitótica puede ser explicada cualitativa y cuantitativamente por el modelo de probabilidad de transición.

14ª) El haber demostrado la aplicabilidad del modelo de probabilidad de transición in vivo y, en todo caso, la gran variabilidad de la duración del ciclo entre células hermanas en el parénquima hepático de embrión de pollo invalida las críticas al modelo de probabilidad de transición en el sentido de que los desfases entre las células hermanas serían un artefacto in vitro debido a la relativa variabilidad e inestabilidad del cariotipo en las células de las líneas establecidas.

15ª) El volumen medio del hepatocito embrionario no es constante sino que aumenta durante el desarrollo pasando de aproximadamente 327 micras³ en el embrión de 6 días a 820 micras³ en el embrión de 20 días. Aunque en cierta medida este aumento depende de la acumulación de inclusiones lipídicas probablemente de origen vitelino, el crecimiento es debido en su mayor parte al incremento de los diversos componentes citoplasmáticos sintetizados y ensamblados en la propia célula.

16ª) Ya que concomitantemente al aumento de tamaño celular se produce un alargamiento de la duración media del ciclo de reproducción, es posible suponer que el crecimiento del hepatocito durante el desarrollo

es simplemente una consecuencia del alargamiento de su ciclo celular. Esto significa admitir que el control de la reproducción del hepatocito se realiza directamente sobre el ciclo cromosómico mediante la regulación de la frecuencia o probabilidad de iniciación de la síntesis de DNA y duplicación cromosómica, modificándose secundariamente el tamaño celular.

17^a) Aunque la relación de dependencia del ciclo cromosómico con respecto al ciclo de crecimiento existe seguramente en todas las células, asegurando un tamaño celular mínimo, nuestros resultados permiten sugerir que dicha relación podría quedar enmascarada si, debido a un control exterior sobre el ciclo cromosómico, éste se alargara lo suficiente para que la célula creciera hasta permanecer durante todo o la mayor parte de su ciclo por encima del tamaño celular crítico. En las células quiescentes pero que disponen de nutrientes en abundancia, como por ejemplo el hepatocito del animal adulto, el tamaño celular sería el máximo posible para el tipo celular de acuerdo con el balance metabólico.

18^a) La falta de sincronía observada en el ciclo de reproducción de células hermanas y, en general, de células vecinas en el parénquima hepático del embrión de pollo, donde probablemente existen uniones en hendidura que como es sabido permiten la libre difusión entre las células de iones y pequeñas moléculas, permite suponer que el factor o factores limitantes de la iniciación de la reproducción cromosómica sería una molécula relativamente grande incapaz de atravesar las comunicaciones y con un número muy pequeño de unidades por célula. Esto no está en contradicción con el probable papel regulador de iones inorgánicos y nucleótidos cíclicos en los procesos de activación proliferativa de poblaciones quiescentes o incluso como elementos necesarios para la iniciación de la síntesis de DNA de células en proliferación continua.

19^a) La relación de volúmenes núcleo/célula en el hepatocito embrionario

disminuye desde un 20 % en el embrión de 6 días a un 5 % en el de 20 días. Ello es debido principalmente al crecimiento del citoplasma y también en cierta medida a la reducción del volumen nuclear medio que se observa a partir del día 10. Aunque la reducción del volumen nuclear medio podría depender de modificaciones en el grado de condensación de la cromatina, hay que tener en cuenta que el alargamiento del ciclo celular que se produce durante el desarrollo ha de determinar una disminución de la proporción de núcleos "grandes" (núcleos S y G₂) ya que la prolongación del ciclo se hace fundamentalmente a expensas de G₁.

20a) La cromatina interfásica se encuentra bastante relajada en todas las edades como corresponde a células metabólicamente muy activas. En algunas telofases se han observado diferencias en el grado de condensación de la cromatina entre los núcleos hijos y aunque esto podría ser debido a diferencias en el plano de sección relativo de los núcleos, resulta sugestiva la idea de que las imágenes indiquen realmente un desfase en el proceso de desplegamiento de la cromatina después de la mitosis. Un estudio sistemático de las telofases sería necesario para llegar a una conclusión definitiva.

21a) La relación de volúmenes nucléolo/célula y el volumen absoluto del nucléolo disminuyen considerablemente durante el desarrollo. En el embrión de 6 días el núcleo tiene un tamaño de 10 micras³ y ocupa el 3 % del volumen celular, mientras que en el de 20 días alcanza solo unas 3 micras³ y ocupa el 0,4 % del volumen celular. La estructura del nucléolo "promedio" varía durante el desarrollo pasando de formas con nucleolonemas a nucléolos con grandes áreas claras e incluso formas anulares que como es sabido (Busch y Smetana 1970) corresponden a formas inactivas. Tanto la disminución de tamaño como los cambios estructurales indican una disminución de la actividad nucleolar durante el desarrollo. El hecho de que a cada edad puedan observarse las diferentes formas aunque en distinta proporción permite suponer que corresponden a distintas

fases del ciclo celular y que la imagen "promedio" dependería de la proporción de células en las diferentes fases.

Estos resultados concuerdan con las evidencias de una activación de los genes ribosómicos en poblaciones quiescentes estimuladas (Baserga 1981) y con el aumento del contenido celular de RNA en la transición entre los subcompartimentos A y B del intervalo G_1 descrito por Darzynkiewicz et al. (1980 a y b).

22^a) La fracción de volumen celular correspondiente a las mitocondrias se mantiene sin grandes modificaciones a lo largo del desarrollo, es decir, crece aproximadamente al mismo ritmo que el citoplasma. Existe, sin embargo, un máximo en el embrión de 15 días que coincide con un pico de actividad específica de enzimas mitocondriales descrito por Warshaw (1972).

23^a) Las inclusiones lipídicas aumentan de tamaño entre los días 10 y 20 y su fracción de volumen pasa del 1,2 % del volumen celular al 7,6 %. Se trata de vesículas de membrana que contienen, en los primeros días, una corteza muy electrodensa, gruesa y asimétricamente dispuesta alrededor de una parte central clara. El crecimiento de las inclusiones se hace a expensas de la parte central clara, mientras que la corteza disminuye progresivamente de espesor.

También hemos observado imágenes de fusión o escisión de las inclusiones que sugieren la existencia de un transporte de gotas lipídicas mediante un sistema de vesículas semejante al descrito por Palay y Karlin (1959) en el epitelio intestinal.

24^a) El conjunto de mitocondrias e inclusiones lipídicas corresponde a un 18 % del volumen del citoplasma en el embrión de 10 días y a un 24 % en el de 20 días, correspondiendo al resto de estructuras citoplasmáticas el 82 % y el 76 % del volumen respectivamente.

Aunque no hemos realizado un estudio morfométrico por separado del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi es evidente su aumento

absoluto y relativo durante el desarrollo. En los primeros días la mayoría de los ribosomas se encuentran libres y progresivamente va aumentando la proporción de ribosomas unidos al retículo endoplasmático. Funcionalmente, estos cambios significan que el hepatocito inmaduro, que se reproduce con mayor frecuencia, destina la mayoría de sus ribosomas a sintetizar proteínas intracelulares y que la diferenciación de la célula comporta, junto con la disminución en la frecuencia de reproducción, un aumento de la proporción de ribosomas dedicados a la síntesis de proteínas de secreción.

25ª) Hemos revisado los principales métodos, problemas e hipótesis relativas a la reproducción celular y a su relación con el crecimiento y la diferenciación de los organismos pluricelulares y sobre esta base teórica hemos discutido nuestros resultados experimentales en el embrión de pollo.

La disminución de la actividad proliferativa en el parénquima hepático del embrión de pollo y la relación entre los crecimientos del hígado y el corazón con respecto al encéfalo no pueden ser descritas mediante expresiones únicas válidas para todo el desarrollo, la existencia de discontinuidades resulta probablemente de cambios cuánticos entre estados de diferenciación.

La rápida pérdida de sincronía en el ciclo de células hermanas, cualitativa y cuantitativamente predecible por el modelo de probabilidad de transición, junto con el aumento del volumen celular medio del hepatocito a lo largo del desarrollo nos inclinan a pensar que el control de la proliferación se realiza directamente sobre un ciclo cromosómico discontinuo y que, en nuestro sistema, el crecimiento celular en cada ciclo no es el factor limitante de la frecuencia del mismo.

Finalmente, nuestras observaciones sobre el volumen y estructura del nucléolo indican una disminución de la actividad de los genes ribosómicos a lo largo del desarrollo paralelamente a la de la proliferación celular, coincidiendo con los resultados de otros autores en diferentes

sistemas in vitro e in vivo. En realidad, como señala Baserga (1981) no es sorprendente el que los genes ribosómicos sean los blancos de los factores estimulantes del crecimiento y reproducción celulares ya que la cantidad de ribosomas condiciona la cantidad de síntesis proteica y las células deben doblar su tamaño antes de una nueva división. En este sentido, los genes ribosómicos podrían identificarse hasta cierto punto con los "operones mitóticos" cuya actividad contrapone Tsanev (1975) a los "operones funcionales" en su modelo para explicar la relación inversa entre proliferación y diferenciación celulares.

7. Bibliografía

- Adamson E.D., Deller M.J. y Warshaw J.B. Functional EGF receptors are present on mouse embryo tissues. *Nature* 291, 656-659, 1981.
- Aherne W.A., Camplejohn R.S. y Wright N.A. An introduction to cell population kinetics. Edward Arnold, 1977.
- Allison A.C. The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis. *Locomotion of tissue cells*, Ciba Symp. 14, 109, 1973 (citado por De Robertis, Sáez y de Robertis 1977).
- Andrew W. An electron microscope study of age changes in the liver of mouse. *Am. J. Anat.* 110, 1-18, 1962.
- Balhorn R., Chalkley R. y Granner D. *Biochemistry* 11, 1094, 1972 (citado por Bradbury 1975).
- Balhorn R., Riecke O. y Chalkley R. *Biochemistry* 10, 3952, 1971 (citado por Bradbury 1975).
- Balinsky B.I. *Introducción a la Embriología*. Omega 1965 y 1978.
- Barranco, Haenelt y Bolton. Cell cycle time determinations based on liquid scintillation counting of ^3H -thymidine labeled mitotic cells. *Cell Tissue Kinet.* 10, 335-340, 1977.
- Barret J.C. A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. *J. Nat. Cancer Inst.* 37, 443-450, 1966.
- Baril E. Baril B., Elford H. y Luftig R.B. DNA polymerases as a possible multi-enzyme complex for DNA biosynthesis in eukaryotes. *Mechanism and Regulation of DNA Replication*, Kolber y Kohiyama (eds), 275-292, Plenum Press 1974.
- Baserga R. The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division : A review. *Cancer Research* 25, 581-595, 1965.
- Baserga R. *Multiplication and division in mammalian cells*. Marcel Dekker 1976.
- Baserga R. (ed). *Tissue growth factors*. Springer-Verlag 1981.
- Baserga R. Introduction to cell growth : Growth in size and DNA replication. *Tissue growth factors*, Baserga (ed), 1-12, Springer-Verlag 1981.

- Baserga R. y Malamud D. Autoradiography, techniques and application. Harper and Row 1969.
- Beaupain D. y Dieterlen-Lievre F. Etude immunocytologique de la différenciation du pancréas endocrine chez l'embryon de poulet II. En prensa (citado por Houssaint y Le Douarin 1974).
- Begg D. y Ellis G.W. J. Cell Biol. 63, 18 a, 1974 (citado por Inoué y Kiehart 1978).
- Bertalanffy L. von. Problems of organic growth. Nature 163, 156-158, 1949
- Bertalanffy F.D. Tritiated thymidine versus colchicine technique in the study of cell population cytodynamics. Lab. Inv. 13, 871-886, 1964.
- Betz T.W. The developmental endocrinology of spleen in chick embryos : I. The pars distalis. J. Embryol. Exp. Morph. 24, 357-365, 1970
- Binoux M. Lassarre C. y Hardouin N. Somatomedin production by rat liver in organ culture : III. Studies on the release of insulin-like growth factor and its carrier protein measures by radioligand assays. Effects of growth hormone, insuline and cortisol. Acta Endocrinologia 99, 422-430, 1982.
- Blundell T.L. y Humbel R.E. Hormone families : Pancreatic hormones and homologo growth factors. Nature 287, 781-787, 1980
- Bollum F.J. y Chang L.M.S. Eukaryotic DNA polymerases. Mechanism and Regulation of DNA Replication (Kolber y Kohiyama eds) 253-274. Plenum Press 1974.
- Bostock C.J. y Prescott D.M. Shift in bouyant density of DNA during the synthetid period and its relation to euchromatin in mammalian cells. J. Molec. Biol. 60, 151-162, 1971.
- Bouck G.B. y Green P.M. In vivo uptake and binding of the mitotic inhibitors colchicine and isopropyl-N-phenyl carbamate. J. Cell Biol. 63, 33 a, 1974.
- Bradbury E.M. Histones, Chromatin structure and control of cell division. Current Topics in Developmental Biology 9, 1-13, Academic Press 1975.
- Bradbury E.M. Inglis R.J., Matthews H.R. y Sarnier N. Eur. J. Biochem. 33, 131, 1973 (citado por Bradbury 1975).

- Bradshaw R.A. y Niall H.D. Insulin-related growth factors. *TIBS* 3, 274-278, 1978.
- Braun R. y Wili H. Time sequence of DNA replication in Physarum. *Biochim. Biophys. Acta* 174, 246-252, 1969.
- Breindl M. y Gallwitz D. Identification of histone messenger RNA from HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* 32,381-391, 1973.
- Brockwell P.J., Trucco E. y Fry R.J.M. The determination of cell-cycle parameters from measurements of the fraction of labeled mitoses. *Bull. Math. Biophys.* 34, 1-12, 1972.
- Brody S. Bioenergetics and growth. Hafner Press 1945 y 1974 (reimpresión).
- Bronk B.V. On radioactive labeling of proliferating cells : The graph of labeled mitoses. *J. Theoret. Biol.* 22, 468-492, 1969.
- Brooks R.F. The kinetics of serum induced initiation of DNA synthesis in BHK 21/c13 cells, and the influence of exogenous adenosine. *J. Cell Physiol.* 86, 369-378, 1975.
- Brooks R.F., Bennett D.C. y Smith J.A. Mammalian cell cycles need two random transitions. *Cell* 19, 493-504, 1980.
- Bröyn T. Kinetics of cell proliferation and cell loss in the peripheral an central parts of Walker tumors growing in rats and nude mice. *Virchows Arch. B.* 18, 181-191, 1975.
- Boldingh W.H. y Laurence E.B. Extraction, purification and preliminary characterization of epidermal chalone : A tissue specific mitotic inhibitor obtained from vertebrate skin. *Europ. J. Biochem.* 5,191-198, 1968.
- Brugal G. Relations entre la prolifération et la différenciation cellulaires : étude autoradiographique chez les embryons et jeunes larves de *Pleurodeles waltlii* Michah. *Develop. Biol.* 24, 301-321, 1971.
- Brugal G. y Pelmont J. Présence, dans l'intestin du Triton adulte *Pleurodeles waltlii* michah, de deux facteurs antimitotiques naturels (chalones) actifs sur la prolifération cellulaire de l'intestin embryonnaire. *C.R. Acad.Sci. Paris* 278, 2831-2834, 1974.
- Bucher N.L.R. y Malt R.A. Regeneration of liver and kidney. Little, Brown and Co. 1971.

- Bucher N.L.R., Patel U. y Cohen S. Hormonal factors and liver growth. Adv. Enzyme Regul. 16, 205-213, 1978.
- Büchner F. (ed) Handbuch der Allgemeine Pathologie. Entwicklung. Wachstum I. Springer-Verlag 1955.
- Büchner F. (ed) Handbuch der Allgemeine Pathologie. Entwicklung. Wachstum II. Regeneration. Hyperplasie. Cancerisierung. Springer-Verlag 1969.
- Buck D.N. et al. Initiation and completion of mitosis in HeLa cells in the absence of protein synthesis. Currents in Modern Biology 1, 9-13, 1967.
- Bullough W.S. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol. Rev. 37, 307-342, 1962.
- Bullough W.S. y Deol J.U.R. Chalone control of mitotic activity in eccrine sweat glands. Br. J. Derm. 86, 586-592, 1972.
- Bullough W.S. y Laurence E.B. The control of epidermal mitotic activity in the mouse. Proc. Roy. Soc. B. 151, 517-536, 1960.
- Bullough W.S. y Laurence E.B. The study of mammalian epidermal mitosis in vitro. A critical analysis of technique. Exp. Cell Res. 24, 289-297, 1961.
- Bullough W.S. y Rytömaa T. Mitotic homeostasis. Nature 205, 573-578, 1965.
- Burns F.J. y Tannock I.F. On the existence of a G_0 -phase in the cell cycle. Cell Tissue Kinet. 3, 321-334, 1970.
- Burstin S.J. et al. A temperature -sensitive cell cycle mutant of the BHK cell line. J. Cell Physiol. 84, 397-408, 1974.
- Busch H. y Smetana K. The Nucleolus. Academic Press 1970.
- Cairns J. J. Mol. Biol. 15, 372-373, 1966 (citado por Hand y Tamm 1974).
- Callan H.G. Replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes. Proc. R. Soc. London, Ser. B 181, 19-41, 1972.
- Cameron I.L. Cell proliferation and renewal in the mammalian body. Cellular and molecular renewal in the mammalian body (Cameron y Thrasher eds) 45-85, Academic Press 1971.
- Cameron I.L. y Thrasher J.D. (Eds). Cellular and Molecular Renewal in the mammalian body. Academic Press 1971.
- Carpenter G. Epidermal growth factor. Tissue Growth Factors (Baserga ed) 89-132, Springer-Verlag 1981.

- Cattaneo S.M., Quastler H. y Sherman F.G. Proliferative cycle in the growing hair follicle of the mouse. *Nature* 190, 923-924, 1961.
- Churchill J.R. y Studzinsky. *J. Cell Physiol.* 75, 297, 1970 (citado por Mitchison 1974).
- Clarkson B. y Baserga R. (Eds). Control of proliferation in animal cells. Cold Spring Harbor Laboratory 1974.
- Clemmons D.R. y van Wyk J.J. Somatomedin : Physiological control and effects on cell proliferation. *Tissue Growth Factors* (Baserga ed) 161-208, Springer-Verlag 1981.
- Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296, 613-620, 1982.
- Comings D.E. y Kakeda T. DNA replication and nuclear membrane. *J. Molec. Biol.* 75, 609-618, 1968.
- Comings D.E. y Okada T.A. Is the nuclear membrane involved in DNA replication ? Mechanisms and Regulation of DNA replication (Kolber y Kohiyama eds) 321-326, Plenum Press 1974.
- Cooper S. A unifying model for the G_1 period in prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 280, 17-19, 1979.
- Crick F. Diffusion in Embryogenesis. *Nature* 225, 420-422, 1970.
- Datta P. Membrane-derived inhibitory factors. *Tissue Growth Factors* (Baserga ed) 301-312, 1981.
- David C.N. y Campbell R.D. Cell cycle and development of *Hydra attenuata* I. Epithelial cells. *J. Cell Sci.* 11,557-568, 1972.
- Davidson J.N. y Leslie I. A new approach in the Biochemistry of growth and development. *Nature* 165, 49-53, 1950.
- Defares J.G., Sneddon I.N. y Wise M.E. An Introduction to the Mathematics of Medicine and Biology. North-Holland 1973.
- D'Ercole J. y Unerwood L.E. Ontogeny of somatomedin during development in mouse. Serum concentrations, molecular forms, binding proteins and tissue receptors. *Develop. Biol.* 79, 33-45, 1980.
- De Maerteler V. y Galand P. Some properties of a " G_0 " model of the cell cycle. I. Investigation on the possible existence of natural constraints on the theoretical model in steady state - conditions. *Cell Tissue Kinet.* 8, 11-22, 1975.

- De Maertelaer V. y Galand P. Some properties of a "G₀" - model of the cell cycle. II. Natural constraints on the theoretical model in exponential growth conditions. *Cell Tissue Kinet.* 10, 35-42, 1977.
- De Nechaud B. y Uriel J. Antigènes cellulaires transitoires du foie de rat. I. Sécrétion et synthèse des protéines sériques au cours du développement et de la régénération hépatiques. *Int. J. Cancer* 8, 71-80, 1971
- De Robertis E.D.P., Sáez F.A. y De Robertis E.M.F. *Biología Celular.* El Ateneo 1977.
- De Robertis E.D.P. y De Robertis E.M.F. *Biología Celular y Molecular.* El Ateneo 1981.
- Dienstmann S.R. y Holtzer H. Myogenesis : A cell lineage interpretation. *Cell Cycle and Cell Differentiation* (Reinert y Holtzer eds) 1-26, Springer-Verlag 1975.
- Dieterlen-Lievre F. y Beaupain D. Étude immunocytologique de la différenciation du pancréas endocrine chez l'embryon de poulet. I. Ilots à insuline. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22, 62-70, 1974.
- Doida Y. y Okada S. Radiation induced mitotic delay in cultured mammalian cells (L 517 84). *Radiat. Res.* 38, 513-529, 1969.
- Du Praw E.J. *Cell and Molecular Biology.* Academic Press 1968.
- Darzynkiewicz Z., Sharpless T., Staiano-Coco L. y Melamed M.R. Subcompartments of the G₁ phase of cell cycle detected by flow cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6696-6699, 1980 a.
- Darzynkiewicz Z. Traganos F. y Melamed M.R. New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1, 98-108, 1980 b.
- Domingo J. et al. Mitotic coincidence of chick embryo hepatocytes in vivo and the transition probability model of the cell cycle. *Nature* 273, 50-52, 1978.
- Dustin P. JR. Sur le mécanisme d'action de la colchicine et des poisons du fuseau. *Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncológica*, 69-78, Sandoz, Madrid 1964.
- Dworsky P. y Schasechter M. The attachment of the bacterial chromosome to the cell membrane. *Mechanism and Regulation of DNA replication* (Kolber y Kohiyama eds.) 63-70, Plenum Press 1974.

- Edwards J.L. et al. Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 273-281, 1960.
- Earp H.S. y O'Keefe E.J. Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 67, 1580-1583, 1981.
- Ehmann U.K. et al. Perturbations in cell cycle progression from radioactive DNA precursors. *Nature* 258, 633-636, 1975.
- Eigsti O.J., Dustin P. JR. y Gay-Winn N. On the discovery of the action of colchicine on mitosis in 1889. *Science* 110, 692, 1949 (citado por Dustin 1964).
- Elgin S.C.R. y Weintraub H. Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 725-774, 1975.
- Elgjo K. Epidermal chalone and cAMP : An in vivo study. *J. Invest. Dermatol.* 64, 14-18, 1975.
- Elgjo K. y Edgehill W. Epidermal growth inhibitors (chalones) in dermis and serum. *Virchows Arch. B.* 13, 14-23, 1973.
- Enemar A., Falck B. y Hakanson R. Observations on the appearance of Norepinephrine in the sympathetic nervous system of the chick embryo. *Dev. Biol.* 11, 268-283, 1965.
- Enesco M. y Leblond C.P. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J. Embriol. Exp. Morphol.* 10, 530-562, 1962.
- Epifanova O.I., Abuladze M.K. y Zosimovskaya A.I. Effects of low concentrations of actinomycin D on the initiation of DNA synthesis in rapidly proliferating and stimulated cell cultures. *Exp. Cell Res.* 92, 23-30, 1975.
- Fabens A.J. Properties and fitting of the von Bertalanffy growth curve. *Growth* 29, 265-289, 1965.
- Fantes A. y Nurse P. Division timing : controls, models and mechanisms. *The Cell Cycle* (John ed.) 11-33, Cambridge Univ. Press 1981.
- Floros J., Ashihara T. y Baserga R. Characterization of ts 13 cells a temperature-sensitive mutant of the G₁ phase of the cell cycle. *Cell Biol. Internat. Rep.* 2, 259-269, 1978.

- Folkman J. y Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J. Exp. Med.* 138, 745-753, 1973.
- Folkman J. y Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-349, 1978.
- Forer A. Possible roles of microtubules and actin-like filaments during cell-division. *Cell Cycle Controls* (Padilla, Cameron y Zimmerman eds) 319-336, Academic Press 1974.
- Fox T.O. y Pardee A.B. Animal cells : Noncorrelation of length of G_1 phase with size after mitosis. *Science* 167, 80-82, 1970.
- Franke W.W., Deumling B., Zentgraf H., Falk H. y Rae P.M.M. Nuclear membranes from mammalian liver IV. Characterization of membrane-attached DNA. *Exp. Cell Res.* 81, 365-392, 1973.
- Frankfurt O.S. Epidermal chalone, effect on cell cycle and on development of hyperplasia 64, 140-144, 1971.
- Fujita. Kinetics of cellular proliferation. *Exp. Cell Res.* 28, 52-60, 1962
- Gabe M. *Histological Techniques.* Masson y Springer-Verlag 1976.
- Gautshi J.R. y Kern R.M. DNA replication in mammalian cells in the presence of cycloheximide. *Exp. Cell Res.* 80, 15-26, 1973.
- Gefter M.L. DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 45-78, 1975.
- Gelbard A.S. et al. *Biochem. Biophys. Acta* 182, 564, 1969 (citado por Mitchison 1974).
- Gelfant S. A new theory on the mechanism of cell division. *Symp. Int. Soc. Cell Biol.* 2, 229-259, 1963.
- Gelfant S. Temperature - induced cell proliferation in mouse ear epidermis in vivo. *Exp. Cell Res.* 90, 458-461, 1975.
- Gilula N.B. Junctions between cells. *Cell Communication* (Cox ed) 1-29, Wiley 1974.
- Goedbloed J.F. The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. I. The embryonic and early growth of the whole embryo. A model with exponential growth and sudden changes in growth rate. *Acta Anat.* 82, 305-336, 1972.

- Goedbloed J.F. The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. II. The growth of the whole animal during the first 24 days after birth in two inbred mouse strains (CPB-S and DBA/2). *Acta Anat.* 87, 209-247, 1974.
- Goedbloed J.F. The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. III. Growth of the whole animal in the puberty, adult and senescence phases in two inbred mouse strains (CPB-S and BBA/2). Exponential growth, sudden changes in the growth rate, and a model for the regulation of the mitotic rate. *Acta Anat.* 91, 1-56, 1975.
- Goedbloed J.F. Embryonic and postnatal growth of rat and mouse. IV. Prenatal growth of organs and tissues : age determination and general growth pattern. *Acta Anat.* 95, 8-83, 1976.
- Goedbloed J.F. Embryonic and postnatal growth of rat and mouse. V. Prenatal growth of organs and tissues, general principles : allometric growth, absence of growth and genetic regulation of the growth process. *Acta Anat.* 98, 162-182, 1977.
- Gray J.W. Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 642-650, 1974.
- Gray J.W. Cell cycle analysis of perturbed cell populations : computer simulation of sequential DNA distributions. *Cell Tissue Kinet.* 9, 499-516, 1976.
- Gray et al. Rapid cell cycle analysis by measurements of the radioactivity per cell in a narrow window in S phase (RCSI). *Cell Tissue Kinet.* 10, 97-109, 1977.
- Greengard O. The developmental formation of enzymes in rat liver. *Biochemical Actions of Hormones* 1, 53-87, Academic Press 1970.
- Greulich R.C., Cameron I.L. y Thrsher J.D. Stimulation of mitosis in adult mice by administration of thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 473, 1961 (citado por Bertalanffy 1964).
- Grundmann E. *Citología General. Introducción a la Morfología funcional de la célula.* Labor 1967.
- Gurdon J.B. Nuclear transplantation and cyclic reprogramming of gene expression. *Cell Cycle and Cell Differentiation* (Reinert y Holtzer eds) 123-131, Springer-Verlag 1975.

- Gurley L. R. , Walters R.A. y Tobey R.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 744, 1973 (citado por Bradbury 1975).
- Gurr E. Biological staining methods. Searle Diagnostic 1973.
- Hahn G.M. State vector description of the proliferation of mammalian cells in tissue culture. I. Exponential culture. Biophys. J. 6, 275-290, 1966.
- Hahn G.M. A formalism describing the kinetics of some mammalian cell populations. Math. Biosci. 6, 295-305, 1970.
- Haigler H.T. y Cohen S. Epidermal growth factor interactions with cellular receptors. TIBS 4, 132-134, 1979.
- Hamperl H. Tratado de Patología general y anatomía patológica. Labor 1967.
- Hanaoka F. y Yamada M. Localization of the replication point of mammalian cell DNA at the membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 643-653, 1971.
- Hand R. y Tamm R. DNA replication: Initiation and rate of chain growth in mammalian cells. Cell cycle controls (Padilla, Cameron y Zimmerman eds) 273-288, 1974.
- Hanson N.R. Observación y explicación : Guía de la Filosofía de la ciencia. Patrones de descubrimiento, investigación de las bases conceptuales de la Ciencia. Alanza Editorial 1977.
- Harrison P.R. y Conkie D. The cell cycle dependence of red blood cell differentiation in Friend cells. Fortschritte der Zoologie 26, 197-205, 1981.
- Hartwell L.H. y Unger M.W. Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. J. Cell Biol. 75, 422-435, 1977.
- Hartwell L.H. et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast : a model. Science 183, 46-51.
- Harvey R.J. Measurement of cell volumes by electric sensing zone instrumentation. Methods in Cell Biology (Prescott ed) 3, 1-24, Academic press 1968.
- Haschemeyer A. Kinetics of protein synthesis in higher organisms in vivo. TIBS 1, 133-136, 1976.

- Hayat M.A. Principles and Techniques of Electron Microscopy - Biological applications - (vol 1). Van Nostrand Reinhold 1970.
- Heidemann S. R. Sander G. y Kirschner M.W. Cell 10, 337-350, 1977 (citado por Lloyd 1979 a).
- Hess B. Oscillatory reactions. TIBS 2, 193-195, 1977.
- Holter H. The cartesian diver. General Cytochemical Methods II (Danielli ed) 93-129, Academic Press 1961.
- Hornbruch A. y Wolpert L. Cell division in the early growth and morphogenesis of the chick limb. Nature 226, 764-766, 1970.
- Houck J.C. (ed). Chalcones. North-Holland 1976.
- Houssaint E. y Le Douarin N.M. Mise en évidence de glycogène et d'une activité de la glycogène synthétase dans l'ébauche hépatique aux stades précoces du développement embryonnaire chez le poulet. J. Embryol. Exp. Morph. 32, 637-650, 1974.
- Howard A. y Pelc S.R. Nuclear incorporation of P-32 as demonstrated by autoradiographs. Exp. Cell Res. 2, 178-187, 1951 a.
- Howard A. y Pelc S.R. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. Nature 167, 599-600, 1951 b.
- Howard A. y Pelc S.R. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, Suppl. 6, 261-273, 1953.
- Howell S.H. An analysis of cell cycle controls in temperature sensitive mutants of Chlamydomonas reinhardi. Cell Cycle Controls (Padilla, Cameron y Zimmerman eds) 235-249, 1974.
- Huberman J.A. DNA replication, the nuclear membrane and Okazaki fragments in eukaryotic organisms. Mechanism and regulation of DNA replication (Kolber y Kohiyama eds) 299-320, 1974.
- Huberman J.A. y Riggs A.D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 599, 1966 (citado por Hand y Tamm 1974).
- Huberman J.A. y Riggs A.D. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. J. Molec. Biol. 32, 327-241, 1968.
- Huxley J.S. Constant differential growth-ratios and their significance. Nature 114, 895-896, 1924.

Huxley J.S. Problems of relative growth. Methuen 1932.

Inoué S. Biophysical Science (Oncley ed) 402, Wiley 1959 (citado por Mazia 1961).

Inoué S. y Kiehart D.P. In vivo analysis of mitotic spindle dynamics. Cell Reproduction (Dirksen, Prescott y Fox eds) 433-444, Academic Press 1978.

Iversen O.H. A homeostatic mechanism regulating the cell number in epidermis. Its relation to experimental skin carcinogenesis. Proc. 1st Congr. Int. Cybernetic. Med. Gianni, Naples 1960 (citado por Iversen 1976).

Iversen O.H. History of chalones. Chalones (Houck ed) 37-69, North-Holland 1976.

Iversen O.H. The chalones. Tissue Growth Factors (Baserga ed) 491-550, Springer-Verlag 1981.

Iversen O.H., Bhangoo K.S. y Hansen K. Control of epidermal cell renewal in the bat web. Virchows Arch. B 16, 157-179, 1974.

Jacob F., Brenner S. y Cozin F. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348, 1963 (citado por Dworsky y Schaechter 1974).

James T.W. A cell cycle nomogram : graphs of mathematical relationships allow estimates of the timing of cycle events in eukaryotic cells. Cell Cycle Controls (Padilla, Cameron y Zimmerman eds) 31-42, Academic press 1974.

Jansson B. Mathematical models in cell cycle kinetics. Proceedings of the IFIP-TC4 Working Conference on Mathematical Models in Biology and Medicine. Varna, Sept. 1972, 21-34, North-Holland 1974.

Jiménez de Asua L., O'Farrell M.K., Clingan D. y Rudland P.S. Temporal sequence of hormonal interactions during the preproliferative phase of quiescent cultured 3T3 fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 3845-3849, 1977.

Johnson H.A. Some problems associated with the histological study of cell proliferation kinetics. Cytologia 26, 32-41, 1961.

Johnson R.T. y Rao P.N. Mammalian cell fusion : Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature 226, 717-722, 1970.

- Johnson R.T., Rao P.N. y Hughes D.S. Mammalian cell fusion III. A HeLa cell inducer of premature chromosome condensation active in cells from a variety of animal species. *J. Cell Physiol.* 76, 151-158, 1970.
- Johnston G.C., Pringle J.R. y Hartwell L.H. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 105, 79-98, 1977.
- Kavanau J.L. A model of growth and growth control in mathematical terms II. Compensatory organ growth in the adult. *Physiol.* 46, 16-58-1673.
- Kendall D. On the role of variable generation time in the development of a stochastic birth process. *Biometrika* 35, 316-330, 1948.
- Kiefer J. A model of feedback - controlled cell populations. *J. Theor. biol.* 18, 263-279, 1968.
- Killander D. y Zettemberg A. Quantitative cytochemical studies on interphase growth. I. Determination of DNA, RNA and mass content of age determined mouse fibroblasts in vitro and intercellular variation in generation time. *Exp. Cell Res.* 38, 272-284, 1965 a.
- Killander D. y Zettemberg A. A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* 40, 12-20, 1965 b.
- Kinoshita S. y Yazaki I. *Exp. Cell Res.* 47, 449, 1967 (citado por Rebhun 1977).
- Klevecz R.R. *J. Cell Biol.* 43, 207, 1969 (citado por Mitchison 1974).
- Kornberg R.D. *Science* 184, 868, 1974, (citado por Bradbury 1975).
- Koschel K.W., Radley J.M. y Hodgson G.S. The analysis of cell kinetics using cohort fraction labeled mitosis (COFLM) curves. *J. Theor. Biol.* 64, 355-361, 1977.
- Krüger P. Zur Mathematik des tierischen Wachstums II. Vergleich einiger Wachstumsfunktionen. *Helgoländer Wiss. Meeresunters.* 25, 509-550, 1973.
- Kubitschek H.E. Counting and sizing micro-organisms with the coulter counter. *Methods in Microbiology* 1, 592-610 (Robbins y Ribbons eds), Academic Press 1969.
- Lajtha L.G. On the concept of the cell cycle. *J. Cell Comp. Physiol.* 62, 143-145, 1963.

- Lark K.G., Consigli R. y Toliver A. J. *Molec. Biol.* 58, 873, 1971 (citado por Hand y Tamm 1974).
- Le Bouton A.V. Growth, mitosis and morphogenesis of the simple liver acinus in neonatal rats. *Dev. Biol.* 41, 22-30, 1974.
- Le Bouton A.V. y Marchand R. Changes in the distribution of thymidine 3-H labeled cells in the growing liver acinus of neonatal rats. *Dev. Biol.* 23, 524-533, 1970.
- Leblond C.P. Growth and Renewal. Regulation of Organ and Tissue Growth (Goss ed) 13-40, Academic press 1972.
- Leffert H.L. y Koch K.S. Control of animal cell proliferation. Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in culture (Rothblat y Cristofalo eds) 225-294, Academic Press 1977.
- Leffert H.L., Koch K.S., Moran T. y Rubalcava B. Hormone control of rat liver regeneration. *Gastroenterology* 76, 1470-1482, 1979.
- Lehninger A.L. Bioquímica, Omega 1972 y 1979.
- Leroy F., Bogaert C. y Van Hoeck J. DNA replication and accelerated chain growth in oestrogen-stimulated uterine cells. *Nature* 258, 259-260, 1975.
- Lee L.S. Transition - probability theory of cell proliferation and biochemical to the kinematics of the cell cycle. *Mathematical Biosci.* 34, 11-130, 1977.
- Lettré H. Mitose und Spindelgifte. Symposium sobre mitosis e inhididores en la quimioterapia oncológica, 61-68, Sandoz, Madrid 1964.
- Lima-de-Faria A. Dna replication and gene amplification in heterochromatin. *Handbook of Molecular Cytology* (Lima-de-Faria ed) 278-325, North-Holland 1969.
- Lindberg L.G. y Vorwerk Ph.D. Estimation of volumes of ellipsoid bodies in conglomerates through random plane sections. *Lab. Inv.* 27, 384-386, 1972.
- Lloyd C. The shapely cell's cycle. *TIBS* 4, 187-189, 1979 a.
- Lloyd C. Primitive model for cell cycle control. *Nature* 280, 631-632, 1979 b.
- Loewenstein W.R. Cellular communications by permeable membrane junctions. *Cell Membranes* (Weissmann y Claiborne eds) 105-114, HP Pub. Co. 1975.

- Margolis R.L. A possible microtubule dependent mechanism for mitosis. Cell Reproduction (Dirksen, Prescott y Fox eds) 445-456, Academic P. 1978.
- Margolis R.L. y Wilson L. Cell 13, 1-8, 1978 (citado por Margolis, Wilson y Kiefer 1978).
- Margolis R.L., Wilson L. y Kiefer B.I. Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour. Nature 272, 450-452, 1978.
- Mason T.L. y Hooper A.B. The intracellular location of glutamate dehydrogenase in chick embryo liver during development. Dev. Biol. 20, 472-478, 1969.
- Masters M. y Donachie W.D. Nature 209, 476, 1966 (citado por Mitchison 1974).
- Matthews H.R. Communication to the IV European Cell Cycle Workshop at Rütthubelbad, Bern 1978.
- Mazia D. Mitosis and the physiology of cell division. The Cell (Brachet y Mirsky eds.) 3, 77-412, Academic Press 1961 a.
- Mazia D. Biological structure and function (Godwin y Lindberg eds.) Academic Press 1961b (citado por Mazia 1961 a)
- Mazia D. y Dan K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 826, 1952 (citado por Mazia 1961 a).
- Mazia D., Petzelt C.H., Williams R.O. y Meza I. Exp. Cell Res. 70, 325, 1972 (citado por Rebhun 1977).
- McIntosh J.R., Hepler P.K. y van Wie D.G. Nature 224, 659, 1969 (citado por Rebhun 1977 y por Inoué y Kiehart 1978).
- Mc Whinnie y Thomes R.C. The influence of "hypophysectomy" on bone growth and alkaline phosphatase activity in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 29, 515-527, 1973.
- Mendelsohn M.L. y Takahashi M. A critical evaluation of the fraction of labeled mitoses method as applied to the analysis of tumor and other cell cycles. The Cell Cycle and Cancer (Baserga ed.) 55-96, Dekker 1971.
- Messier B. y Leblond C.P. Cell division and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine- H^3 into male rats and mice. Amer. J. Anat. 106, 247, 1960 (citado por Leblond 1972).

- Minor P.D. y Smith J.A. Explanation of degree of correlation of sibling generation times in animal cells. *Nature* 248, 241-243, 1974.
- Minot C.S. The problem of age, growth and death, London 1908 (citado por Balinsky 1965 y 1978).
- Mirsky A.E. y Ris H. Variable and constant components of chromosomes. *Nature* 163 (666-667), 1949.
- Mitchison J.M. The Biology of the cell cycle. Cambridge Univ. Press 1971.
- Mitchison J.M. Sequences, Pathways and Timers in the cell cycle. *Cell Cycle Controls* (Padill, Cameron y Zimmerman eds) 125-142, Academic P.1974.
- Mizunó N.S., Stoops C.E. y Sinha A.A. DNA synthesis associated with the inner membrane of the nuclear envelope. *Nature New Biol.* 229, 22-24, 1971.
- Moore E.C. y Hurlbert R.B. Regulation of mammalian desoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 241, 4802-4809, 1966.
- Mueller G.C. y Kajiwara K. Actinomycin D and p-fluorophenylalanine, inhibitors of nuclear replication in He La cells. *Biochem. Biophys. Acta* 119, 557-565, 1966.
- Nadal G. Control of liver growth by inhibitors (chalcones). *Arch. Toxicol. Suppl.* 2, 131-142, 1979.
- Naha P.M., Meyer A.L. y Hewitt K. Mapping of the G₁ phase of a mammalian cell cycle. *Nature* 258, 49-53, 1975.
- Needham J. Heterogony and the chemical ground-plan of animal growth. *Nature* 130, 845-846, 1932.
- Needham J. Chemical heterogony and the ground-plan of animal growth. *Biol. Rev.* 130, 79-109.
- Needham J. y Lerner I.M. Terminology of Relative Growth-Rates. *Nature* 146, 618, 1940.
- Nilsen-Hamilton M., Wahl L.M. y Martin G.R. Fibroblast growth factor causes an early increase in phosphorylation of a membrane protein in quiescent 3T3 cells. *Nature* 279, 444-446, 1979.
- Nome O. Tissue specificity of the epidermal chalcones. *Virchows Arch. B* 19, 1-25, 1975.

- Nurse P. Cell cycle - both deterministic and probabilistic. *Nature* 286, 9-10, 1980.
- Nurse P. y Fantes P. Transition probability and cell cycle initiation in yeast. *Nature* 267, 647, 1977.
- Odartchenko N. et al. Evaluation of mitotic time in vivo, using tritiated thymidine as a cell marker : Successive labeling with time of separate mitotic phases. *Exp. Cell Res.* 35, 402-411, 1964.
- Othmer H.G. Temporal oscillations in chemically-reacting systems. The 1976 Proceedings on Cybernetics and Society, AESS Newsletter 21-26, March 1977.
- Palay S.L. y Karlin L.J. An electron microscope study of the intestinal villus : II. The pathway of fat absorption. *J. Biochem. Biophys. Cytol.* 5, 373-383, 1959.
- Pastan I.H., Johnson G.S. y Anderson W.B. Role of cyclic nucleotides in growth control. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 491-522, 1975.
- Pernice B. Sulla cariocinesi delle cellule epiteliali e dell'endotelio dei vasi della mucosa dello stomaco e dell'intestino, nello studio della gastroenterite sperimentale (nell'avvelenamento per colchico) *Sicilia Med.* 1, 265-279, 1889 (citato per Dustin 1964).
- Perry S. Cancer therapy and cell kinetics : state of the art. *Growth Kinetics and Biochemical regulation of Normal and malignant cells.* (Drewinko y Humphrey eds) 759-765, Williams-Wilkins Co. 1977.
- Pledger W.J., Stiles C.D., Antoniades H.N. y Scher C.D. An ordered sequence of events is required before Balb/c3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 2839-2843, 1978.
- Possnerova V. y Smetana K. The morphology of nucleoli of lymphocytes in peripheral human blood after short time cultivation in vitro. *Folia Morphol* 14, 240-244, 1966.
- Post J. y Hoffman J. Changes in the replication times and patterns of the liver cell during the life of the rat. *Exp. Cell Res.* 36, 111-123, 1964.
- Post J. y Hoffman J. Further studies on the replication of rat liver cells in vivo. *Exp. Cell Res.* 40, 333-339, 1965.

- Prescott D.M. Cellular sites of RNA synthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 3, 33-57, 1964.
- Prescott D.M. *Reproduction of eukaryotic cells.* Academic Press 1976.
- Pringle J.R. The use of conditional lethal cell cycle mutants for temporal and functional sequence mapping of cell cycle events. *J. Cell Physiol.* 95, 393-405.
- Puck T.T. y Steffen J. Life cycle analysis of mammalian cells . I. A method for localizing metabolic events within the cell cycle, and its application to the action of colcemide and sublethal doses of X-irradiation. *Biophysical J.* 3, 378-397, 1963.
- Quastler H. y Sherman F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* 17, 420-438, 1959.
- Rao P.N. y Johnson R.T. Mammalian cell fusion : Studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225, 159-164, 1970.
- Rash et al. *J. Ultrastruct. Res.* 29, 470, 1966 (citado por Lloyd 1979 b).
- Rebhun L.I. Cyclic nucleotides, calcium and cell division. *International Rev. Cytol.* 49, 1-54 (Bourne, Danielli y Jeon eds.) Academic press 1977.
- Rhodin J.A.G. *Histology.* Oxford University Press, 1974.
- Richman R.A., Claus T.H., Pilkis S.J. y Friedman D.L. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 3589-3593, 1976.
- Rickinson A.B. The effects of low concentration of actinomycin D on the progress of cells through the cycle. *Cell Tissue Kinet.* 3, 335-347, 1970.
- Riley P.A. Heuristic model of mitotic autoregulation in cell populations. *Nature* 223, 1382-1383, 1969.
- Riley P.A. Mitotic autoregulation : a Reply. *Nature* 226, 548, 1970.
- Robbins E., Jentsch G. y Micali A. *J. Cell Biol.* 36, 329-339, 1968.
- Robertson T.B. On the normal rate of growth of an individual and its biochemical significance. *Roux Arch.* 25, 571-614, 1908 (citado por Balinsky 1965).
- Romanoff A. *The avian embryo - structural and functional development.* Macmillan 1960.

- Roscoe D.H. et al. DNA synthesis and mitosis in a temperature sensitive Chinese hamster cell line. *J. Cell Physiol.* 82, 333-338, 1973.
- Rothstein H. van Wyk J.J, Hayden J.H, Gordon S.R y Weinseider A.R. An in vivo study with somatomedin C : restoration of cycle traverse G_0/G_1 blocked cells of hypophysectomized animals. *Science* 208, 410-412. 1980
- Rubin H. y Fodge D. Interrelationship of glycolysis, sugar transport and the initiation of DNA synthesis in chick embryo cells. Control of proliferation in animal cells (Clarkson y Baserga eds) 801-816, 1974.
- Rudland P.S. y Jiménez de Asua L. Action of growth factors in the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 560, 91-133, 1979.
- Ryter A. *Bacteriol. Rev.* 32, 39-57, 1960 (citado por Dworsky y Schaechter 1974).
- Saetren H.A. A principle of auto-regulation of growth. Production of organ-specific mitose-inhibitors in kidney and liver. *Exp. Cell Res.* 11, 229-232, 1956.
- Sachs L. Regulation of membrane changes, differentiation and malignancy in carcinogenesis. *Harvey Lect.* 68, 1-35, 1974.
- Sakai H. Induction of chromosome motion in the isolated mitotic apparatus as a function of microtubules. *Cell Reproduction* (Dirksen, Prescott y Fox. 1978).
- Sakai H. et als. *Devl. Growth and Different.* 18, 211-219, 1976 (citado por Margolis, Wilson y Kiefer 1978).
- Salmon W.D. y Daughaday W.H. A hormonally controlles serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro, *J. Lab. Clin. med.* 49, 825-836, 1957.
- Schmalhausen I. Studien über Wachstum und Differenzierung - III Die Embryonale Wachstumskurve des Hühnchens. *Arch. Entwickl. Mech. Org.* 108, 322-389, 1926.
- Schmalhausen I. Beiträge zur quantitativen Analyse der Formbildung. I. Ueber Gesetzmässigkeiten des embryonalen Wachstums. *Roux Arch.* 109, 455-512, 1927.

- Schmalhausen I. Ueber Wachstumsformeln und Wachstumstheorien. Biol. Zbl. 50, 292-307, 1930.
- Schneider W.C. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology (Colowick y Kaplan eds) III, 680-684, 1957.
- Schneyer C.A. Regulation of salivary gland size. Regulation of organ and tissue growth (Goss ed) 211-232, Academic Press 1972.
- Schoenle E. Zapf J. Humbel R.E. y Froesch E.R. Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. Nature 296, 252-253, 1982.
- Sheridan J.D. Electrical coupling of cells and cell communication. Cell Communication (Cox ed.) 31-42, Wiley 1974.
- Shields R. Transition probability and the origin of variation in the cell cycle. Nature 267, 704-707, 1977.
- Shields R. Further evidence for a random transition in the cell cycle. Nature 273, 755-758, 1978.
- Shilo B., Shilo V. y Simchen G. Cell cycle initiation in yeast follows first order kinetics. Nature 264, 767-770.
- Shilo B., Shilo V., y Simchen G. Transition probability and cell cycle initiation in yeast (reply), Nature 267, 648-649, 1977.
- Shymko R.M. y Glass L. Cellular and geometric control of tissue growth and mitotic instability. J. Theor. Biol. 63, 355-374, 1976.
- Sigel B. Extracellular regulation of liver regeneration. Regulation of organ and tissue growth (Goss ed) 271-282, 1972.
- Signoret J. La cinétique cellulaire au cours de la segmentation du germe d'Axolote : Proposition d'un modèle statistique. J. Embryol. Exp. Morph. 42, 5-14, 1977.
- Sisken J.E. y Morasca L. Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. J. Cell Biol. 25, 179-189, 1965.
- Smetana K y Potmesil M. Ring-shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 92, 62-69, 1968.
- Smith J.C. Growth factors and pattern formation. J. Embryol. Exp. Morph. 65 (suppl.) 187-207, 1981.

Smith C.L. y Dendy P.P. Relation between mitotic index , duration of mitosis, generation time and fraction of dividing cells in a cell population Nature 193, 555-556, 1962.

Smith J.A. y Martin L. Do cells cycle ?. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1263-1267, 1973.

Smith J.A. y Martin L. Regulation of cell proliferation. Cell Cycle Controls (Padilla, Cameron y Zimmerman eds) 43-60, Academic Press 1974.

Smith J.C., Singh J.P., Lillquist J.S. , Goon D.S. y Stiles C.D. Growth factors adherent to cell substrate are mitogenically active. Nature 296, 154-156, 1982.

Soprano K.J., Dev V.G., Croce C.M. y Baserga R. Reactivation of silent rRNA genes by Simian virus 40 in human- mouse hybrid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3885-3889, 1979.

Steel G.G. The measurement of the intermitotic period. The cell cycle in development and differentiation (Balls y Billet eds) 13-30, Cambridge Univ. Press 1973.

Steel G.G. Growth kinetics of tumours. Clarendon Press 1977.

Stein G., Park W., Thrall C., Mans R. y Stein J. Regulation of cell cycle stage-specific transcription of histone genes from chromatin by non-histone chromosomal proteins. Nature 257, 764-767, 1975.

Takahashi M. Theoretical basis for cell cycle analysis I. Labeled mitosis wave method. J. Theor. Biol. 13, 202-211, 1966.

Takahashi M. Theoretical basis for cell cycle analysis II. Further studies on labeled mitosis wave method. J. Theor. Biol. 18, 195-209, 1968.

Tanner J.M. Regulation of growth in size in mammals. Nature 199, 845-850, 1963.

Taylor E.W. Macromolecular assembly inhibitors and their action on the cell cycle. Drugs and the cell cycle (Zimmerman, Padilla y Cameron eds) 11-24, Academic Press 1973.

Taylor G.R. La ciencia de la vida, historia gráfica de la Biología. Labor 1964.

Terrada M.L. y López Piñero J.M. La citología y la histología. Historia universal de la Medicina vol. VI, Salvat 1974.

- Thames A.D. y White R.A. State vector analysis of the cell cycle I. Parametrization and fits to labeled mitoses data. *J. Theor. Biol.* 67, 733-756, 1977.
- Thomas D.B. The kinetics of cell production. *The cell in medical science* vol. 2 (Beck y Lloyd eds.) 201-248, Academic Press 1974.
- Thommes R.C., Hajek A.S. y McWhinnie. The influence of "hypophysectomy" by means of surgical decapitation on skeletal growth in the developing chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 29, 503-513, 1973.
- Timourian H., Clothier G. y Watchmaker G. *Exp. Cell Res.* 75, 296, 1972 (citado por Rebhun 1977).
- Tobey R.A., Petersen D.F. y Andersen E.C. Biochemistry of G₂ and mitosis. *The cell cycle and cancer* (Baserga ed.) 309-354, Dekker 1971.
- Tsanev R. Cell cycle and liver function. *Cell cycle and cell differentiation* (Reinert y Holtzer eds) 197-248, Springer-Verlag 1975.
- Tsanev R. y Russev G. Distribution of newly synthesized histones during DNA replication. *Eur. J. Biochem.* 43, 257-263, 1974.
- Tucker, Pardee y Fujiwara *Cell* 17, 527, 1979 (citado por Lloyd 1979b).
- Tutton P.J.M. The influence of serotonin on crypt cell proliferation in the jejunum of rat. *Virchows Arch. B* 16, 79-87, 1974.
- Van Wijk R., Wicks W.D., Bevens M.M. y Van Rijn J. Rapid arrest of DNA synthesis by N⁶, O² - dibutiryl cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate in cultured hepatoma cells. *Cancer Res.* 33, 1331-1338, 1973.
- Vendrely C. Cytophotometry and histochemistry of cell cycle. *The cell cycle and Cancer* (Baserga ed) 227-268, Dekker 1971.
- Vendrely R. y Vendrely C. La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales. *Experientia* 5, 327-329.
- Verly W.G. The control of liver growth. *Chalones* (Houck ed.) 401-428, North)holland 1976.
- Verly W.G., Deschamps Y., Pushpathadam J. y Desrosiers M. The hepatic chalone, I. Assay method for the hormone and purification of rabbit liver chalone. *Can. J. Biochem.* 49, 1376-1383, 1971.

- Virchow R. Cellular-Pathologie, Arch. Path. Anat. 8, 3-39, 1855.
- Walker P.M.B. The mitotic index and the interphase processes. J. Exp. Biol. 31, 8-15, 1954.
- Walker P.M.B. y Richards B.M. Quantitative microscopical techniques for single cells. The Cell (Brachet y Mirsky eds) vol 1, 91-138, 1959.
- Warshaw J.B. Cellular energy metabolism during fetal development. IV. Fatty acid activation, acyltransfer and fatty acid oxidation during development of the chick and rat. Dev. Biol. 28, 537-544, 1972.
- Watson J.D. Molecular Biology of the gene. Benjamin 1976.
- Watts C. y Gain K.R. Glycogen metabolism in the liver of the developing rat. Biochem. J. 160, 263-270, 1976.
- Weibel Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int. Rev. Cytol. 26, 235-302, 1969.
- Weibel E.R. y Bolender R.P. Stereological techniques for electron microscopic morphometry. Principles and Techniques of electron microscopy, Biological applications vol. 3 (Hayat ed) 239-310, VanNostrand-Reinhold 1973.
- Weintraub H. A possible role for histone in the synthesis of DNA. Nature 240, 449-453, 1972.
- Weintraub H. DNA replication and the construction of the chromosome. Mechanism and Regulation of DNA replication (Kolber y Kohiyama eds) 327-338, Plenum Press 1974.
- Weintraub H. The organization of red cell differentiation. Cell cycle and Cell Differentiation (Reinert y Holtzer eds) 27-42, Springer-Verlag 1975.
- Weisenberg R.C. Science 177, 1104, 1972 (citado por de Robertis, Sáez y de Robertis 1977).
- Weiss P. y Kavanau J.L. A model of growth and growth control in mathematical terms. J. Gen. Physiol. 41, 1-47, 1957.
- Wheals A.E. Transition probability and cell cycle in yeast. Nature 267, 647, 1977.
- Wheldon T.E., Gray W.M., Kirk J. y Orr J.S. Mitotic autoregulation of populations of normal and malignant cells. Nature 226, 547, 1970.

- Whitfield J.F., Boynton A.L., MacManus J.P., Rixton R.H., Walker P.R. y Armato U. The positive regulation of cell proliferation by a calcium - cyclic AMP control couplet. Cyclic nucleotides and the regulation of cell growth (Abou-Sabé ed) 97-130, Dowden 1976.
- Whitfield J.F. , Boynton A.L., MacManus J.P., Sikorska M. y Tsang B.K. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Molec. Cellular Biochem. 27, 155-179, 1979.
- Williams J.P.G. The embryo specific action of stathmokinetic agents. The cell cycle in development and differentiation (Balls y Billet eds) 331-336, Cambridge Univ. Press. 1973.
- Wilson D.B. Chronological changes in the cell cycle of chick neuroepithelial cells. J. Embryol. Exp. Morph. 29, 745-751, 1973.
- Wimber D.E. Methods of studying cell proliferation with emphasis on DNA labels. Cell Proliferation (Lamerton y Fry eds) Blackwell 1963.
- Wise G.E. y Prescott D.M. Initiation and continuation of DNA replication are not associated with the nuclear envelope in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 714-717, 1973.
- Wolfe S.L. Biology of the Cell. Wadsworth 1972.
- Yanishevsky R.M. y Stein G.H. Regulation of the Cell Cycle in Eukaryotic cells. Int. Rev. Cytol. 69, 223-259, 1981.
- Yeh, Kwo-Yih y Moog Florence. Development of the small intestine in the hypophysectomized rat. I. Growth, histology and activity of alkaline phosphatase, maltase and sucrase. Dev. Biol. 47, 156-172, 1975 a .
- Yeh, Kwo-Yih y Moog Florence. Development of the small intestine in the hypophysectomized rat. II. Influence of cortisone, thyroxine, growth hormone and prolactin. Dev. Biol. 47, 173-184, 1975 b.
- Yen A. y Pardee A.B. Location of 3T3 cell cycle arrests induced by low serum and isoleucine deprivation. J. Cell Biol. 75, 2a, 1977.
- Zaccheo D. y Grossi C.E. Immunochemical investigation on the origin of serum albumin in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 18, 289-298, 1967.
- Zeuthen E. The cartesian diver balance. General Cytochemical Methods II (Danielli ed) 61-91, Academic Press 1961.