

POLARIDAD DE ORGANULOS EN LAS CELULAS MESODERMICAS CEFALICAS DEL EMBRION DE POLLO DURANTE LA NEURULACION

*Por J. G. Fernández (1)
C. A. Chamorro (3)
P. de Paz (2)
M. Fernández (2)
J. M. Villar (3)*

INTRODUCCION

Durante la neurulación primaria el ectodermo neural sufre un estímulo inductor por parte del mesodermo subyacente que determina la formación de la placa neural. Ambas hojas embrionarias establecen durante el proceso de inducción neural una serie de interrelaciones que constituyen la base de dicho proceso de inducción^{6, 11}. Así por ejemplo, en el embrión de anfibios, una serie de experimentos sobre el proceso de inducción neural²⁴ sugieren que la formación de los ejes craneo-caudal y dorso-ventral del mesodermo son determinados finalmente por interacciones secuenciales y recíprocas entre el propio mesodermo y el ectodermo.

Dentro de los factores extrínsecos que se considera intervienen en la formación del tubo neural se encuentra el llevado a cabo por el mesodermo subyacente a los pliegues neurales^{13, 21}. Referencias más concretas a este punto son las investigaciones de MORRIS y SOLURSH¹⁸, realizadas en el embrión de ratón en estadio de neurulación, en las que se sugiere que el soporte mecánico que supone el incremento de las células mesodérmicas subyacentes al tubo neural y la acumulación alrededor de ellas de una matriz extracelular rica en hialuronatos son componentes esenciales en la morfogénesis de los pliegues neurales.

La participación de las células mesodérmicas en estos procesos morfogénéticos embrionarios implica cambios morfológicos y estructurales en los que según BURGESS y SCHROEDER⁴ está necesariamente involucrada la organización ultraestructural de estas células. De acuerdo con esto, el objetivo del presente trabajo es investigar sobre la existencia de una polaridad de orgánulos en las células mesodérmicas cefálicas del em-

(1) Departamento de Fisiología

(2) Servicio de Microscopía Electrónica

(3) Departamento de Anatomía

brión de pollo durante la neurulación, estableciendo los patrones de distribución de orgánulos en sucesivos estadios de desarrollo. Dichos patrones de distribución pueden relacionarse y discutirse con respecto a los acontecimientos que tienen lugar en el embrión durante el proceso de la neurulación.

MATERIAL Y METODOS

Materiales

Para este trabajo se utilizaron 15 embriones de pollo de cada uno de los estadios de desarrollo 6, 8, 10 y 12¹⁰, en los cuales se recogió la región presuntiva del cerebro medio. En los estadios 6 y 8 esta región fue definida de acuerdo con los criterios de SCHOENWOLF y FRANKS²⁰, mientras que en los estadios 10 y 12 que muestran la regionalización de la región cefálica en tres vesículas, la región del cerebro medio corresponde a la segunda vesícula encefálica: el mesencéfalo.

Microscopía electrónica

Todas las piezas embrionarias recogidas se procesaron para microscopía electrónica de transmisión según el siguiente protocolo. La fijación se realizó en una solución de glutaraldehído al 2 % con rojo rutenio al 0.1 % en tampón cacodilato (pH 7.4) durante 1 hora a 4°C, y la postfijación en tetróxido de osmio al 1 % y rojo rutenio al 0.1 % en tampón cacodilato durante 3 horas a temperatura ambiente. Después del correspondiente lavado en tampón, las muestras se deshidrataron en etanol y posteriormente se transfirieron a una solución de óxido de propileno, para ser finalmente incluidas en resina Epon 812. A partir de los bloques que contenían las piezas, se obtuvieron secciones semifinas (1 μm) que fueron teñidas con azul de toluidina al 0.5 %⁵. Las secciones ultrafinas (interferencia dorada-plateada) se recogieron en rejillas de 200 mallas y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo⁹. Finalmente, las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 100 CX) operando a 60 Kv.

Método de muestreo

El método de muestreo empleado consistió en una selección, mediante tabla digital al azar, de 8 bloques bien orientados en cada estadio. De cada uno de estos bloques se obtuvieron las correspondientes secciones ultrafinas que se recogieron en 3 rejillas de 200 mallas, conteniendo cada una de ellas 5-6 secciones ultrafinas. De este modo se obtiene un grupo de rejillas para cada estadio, de las cuales se seleccionan 12 para su observación en el microscopio electrónico mediante tabla digital al azar. En cada rejilla muestreada se selecciona una sección técnicamente adecuada y se fotografían en cada una de ellas 10 perfiles de células mesodérmicas que contengan núcleo. Así se obtienen 120 perfiles celulares para cada estadio que se analizan en los positivos fotográficos a aumentos finales de 12.000-22.000 x.

Análisis de la distribución de orgánulos

Para estudiar la distribución de orgánulos en las células mesodérmicas se definen en ellas tres zonas siguiendo un criterio de orientación dorso-ventral y tomando como referencia el núcleo. Este criterio de orientación se ha empleado en base al trabajo de BANCROFT y BELLAIRS¹ en el que se señala que las células mesodérmicas del embrión de pollo poseen su eje mayor orientado perpendicularmente a la lámina basal del epiblasto. Así, en los extremos dorsal y ventral del núcleo se trazan dos líneas perpendiculares al eje dorso-ventral del embrión, definiéndose tres zonas: dorsal, media y ventral (ver Fig. n.º 1). Para determinar la dirección de este eje se ha indicado en cada microfotografía la posición relativa del epiblasto (referencia dorsal) y de la notocorda (referencia ventral).

Definidas estas tres zonas de la célula mesodérmica, se cuenta en cada una de ellas el número de perfiles de mitocondrias, cisternas del retículo endoplásmico rugoso, gránulos de vitelo y cuerpos lipídicos. Cuando un perfil se encuentra en el límite de dos zonas se considerará perteneciente a la zona en la que se encuentre la mayor parte de dicho perfil. Estos valores se transforman posteriormente en porcentajes de cada orgánulo en cada zona respecto al total de la célula. En cuanto al aparato de Golgi, en cada célula muestreada se observa en qué zona de la misma se encuentra. De este modo los porcentajes obtenidos expresan la proporción de células que muestran el aparato de Golgi en cada una de las tres zonas de la célula.

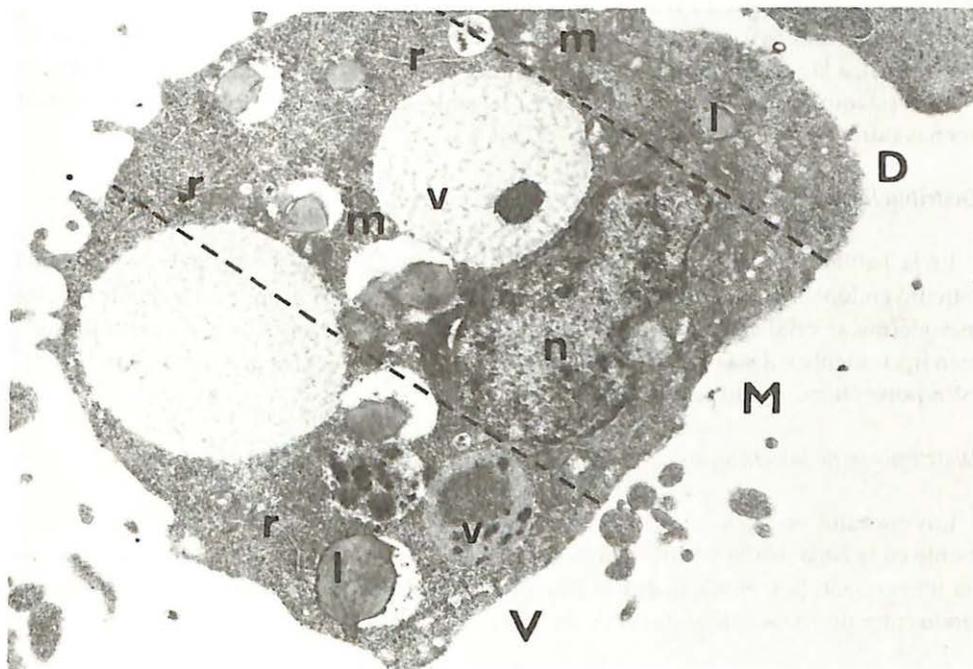


Fig. 1.- Célula mesodérmica del estadio 6 en la que se indican las tres zonas (dorsal -D-, media -M- y ventral -V-) en las que esta célula es dividida para el estudio de la distribución de orgánulos. n: núcleo, m: mitocondrias, r: retículo endoplásmico rugoso, v: gránulos de vitelo, l: cuerpos lipídicos. El complejo de Golgi no aparece en la presente microfotografía. 18.000 x.

Análisis estadístico

Los porcentajes obtenidos en este estudio se trataron estadísticamente para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En primer lugar, para cada orgánulo y estadio, se compararon los porcentajes obtenidos en las tres zonas de la célula. Posteriormente se realizó la comparación estadística de un orgánulo en una zona de la célula entre los cuatro estadios considerados. El test estadístico empleado fue el test de independencia G basado en la distribución de chi-cuadrado²³. A partir de la tabla de frecuencia de las dos poblaciones a comparar se calcula el valor del parámetro estadístico G, el cual se compara con el valor tabular de chi-cuadrado para discernir diferencias significativas a la probabilidad $P < 0.05$.

RESULTADOS

Distribución de las mitocondrias

La distribución de las mitocondrias en las células mesodérmicas cefálicas de los cuatro estadios considerados se recoge en la Tabla n.º 1. Se comprueba en ella que en la zona media de la célula se localiza la mayor parte de las mitocondrias, aunque conforme avanzan los estadios van disminuyendo estos porcentajes (55.11 % en el estadio 6; 39.29 % en el 12), a la vez que aumentan los correspondientes valores en la zona dorsal (18.19 % en el estadio 6; 34.06 % en el 12). Los porcentajes de mitocondrias en la zona ventral apenas sufren variaciones durante estos estadios.

Distribución de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso

En la Tabla n.º 2 se puede observar cómo existe una mayor proporción de cisternas del retículo endoplásmico rugoso en la zona media que en las otras dos zonas de las células mesodérmicas cefálicas. Los porcentajes de cisternas en la zona dorsal aumentan también ligeramente del estadio 6 (18.64 %) al 12 (29.28 %) mientras que en la zona ventral estos porcentajes se mantienen constantes.

Distribución de los gránulos de vitelo

Los gránulos de vitelo de las células mesodérmicas cefálicas se localizan preferentemente en la zona media y ventral de la célula (Tabla n.º 3). En la zona dorsal se encuentra un pequeño porcentaje que se mantiene constante durante los cuatro estadios, oscilando entre un 13.04 % (estadio 12) y un 21.56 % (estadio 8).

Distribución de los cuerpos lipídicos

Los cuerpos lipídicos de las células mesodérmicas cefálicas del estadio 6 se localizan

TABLA 1

Porcentajes de distribución de mitocondrias en las zonas dorsal (D), media (M) y ventral (V) de las células mesodérmicas cefálicas de los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6		8		10		12	
D	18.19	aA	23.12	aAB	27.79	aBC	34.06	abC
M	55.11	bA	58.44	bA	44.70	bB	39.29	bB
V	26.70	cAB	18.44	aA	27.51	aB	26.65	aAB

TABLA 2

Porcentajes de distribución de cisternas de retículo endoplásmico rugoso en las zonas dorsal (D), media (M) y ventral (V) de las células mesodérmicas cefálicas de los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6		8		10		12	
D	18.64	aA	24.79	aAB	25.77	aAB	29.28	aB
M	53.11	bA	51.69	bAB	48.80	bAB	44.55	bB
V	28.25	c	23.52	a	25.43	a	26.17	a

TABLA 3

Porcentajes de distribución de gránulos de vitelo en las zonas dorsal (D), media (M) y ventral (V) de las células mesodérmicas cefálicas de los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6		8		10		12	
D	19.81	a	21.56	a	14.29	a	13.04	a
M	44.34	bA	62.57	bB	42.85	bA	56.52	bB
V	35.85	cAC	15.69	aB	42.86	bA	30.44	cC

TABLA 4

Porcentajes de distribución de cuerpos lipídicos en las zonas dorsal (D), media (M) y ventral (V) de las células mesodérmicas cefálicas de los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6		8		10		12	
D	-		20.31	a	22.73	a	20.00	a
M	100		50.00	bA	27.27	aB	40.00	bC
V	-		29.69	cA	50.00	bB	40.00	bC

TABLA 5

Porcentajes de células mesodérmicas cefálicas que presentan el aparato de Golgi en posición dorsal (D), media (M) y ventral (V) en los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6		8		10		12	
D	12.50	aA	-		35.30	aB	45.45	aC
M	75.00	bA	62.50	aB	11.76	bC	45.46	aD
V	12.50	aA	37.50	bB	52.94	cC	9.09	bA

Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las tres zonas de la célula en cada estadio se indican con las letras a, b, c. Las diferencias significativas en una zona celular entre los cuatro estadios se indican con las letras A, B, C. En ambos casos letras distintas indican que existen diferencias significativas.

en la zona media (Tabla n.º 4). En los otros estadios los porcentajes son muy variables a excepción de los de la zona dorsal que se mantienen entre el 20 % (estadio 12) y el 22.73 % (estadio 10).

Localización del aparato de Golgi

En los estadios 6, 8 y 12 la mayor parte de las células mesodérmicas cefálicas (un 75 %, 62.50 % y 45.46 % respectivamente) presentan el complejo de Golgi en la zona media de la célula. Sin embargo, en el estadio 10 dichas células muestran este orgánulo en la zona ventral (52.49 %) más frecuentemente que en la zona media (11.76 %) y dorsal (35.30 %) (Tabla n.º 5).

DISCUSION

La organización y estructura de las células mesodérmicas está notablemente influenciada por el microambiente celular en el que están inmersas. FISHER y SOLURSH⁷ realizaron una serie de experimentos con células mesodérmicas de distintas regiones embrionarias para comprobar esta influencia del ambiente local sobre la organización de las células mesodérmicas, encontrando que substratos como la lámina basal del epiblasto y del neuroepitelio inciden sobre las características de expansión y sobre la morfología de las células mesodérmicas. Los contactos que estas células establecen con otras hojas embrionarias indudablemente acentúan aún más las variaciones estructurales de las células mesodérmicas. De este modo, se ha señalado que durante los estadios de neurulación craneal en el embrión de pollo el mesodermo cefálico está estrechamente asociado con la notocorda y con el endodermo¹².

En nuestro estudio sobre la polaridad de orgánulos de las células mesodérmicas hemos de tener en cuenta estos hechos que limitan notablemente la interpretación de nuestros resultados. BANCROFT y BELLAIRS¹ han señalado que en el embrión de pollo en neurulación las células mesodérmicas próximas al epiblasto se orientan con su eje mayor perpendicular a la lámina basal del epiblasto, lo cual concuerda con los criterios de polaridad dorso-ventral utilizados en este trabajo. Siguiendo este criterio, en nuestros resultados llama la atención el hecho de que a medida que avanza la neurulación, en la zona dorsal de las células mesodérmicas cefálicas se localizan un mayor número de orgánulos como mitocondrias y cisternas del retículo endoplásmico rugoso (Tablas n.º 1 y 2). Este hecho puede correlacionarse con determinadas circunstancias como pueden ser la producción de fibras de la matriz extracelular durante la neurulación, fibras que unen a las células mesodérmicas entre sí y a éstas con la membrana basal neuroectodérmica¹⁸, o bien con la emigración de estas células que también se relaciona con materiales de la matriz extracelular^{15, 16}.

Cuando observamos la distribución de orgánulos en las células mesodérmicas de cada estadio (Fig. n.º 2), se comprueba cómo en los estadios 6, 8, 10 y 12 existe una notable correlación entre los porcentajes de distribución de mitocondrias y de cisternas del retículo endoplásmico rugoso en las tres zonas de la célula. El hecho de que esta relación se

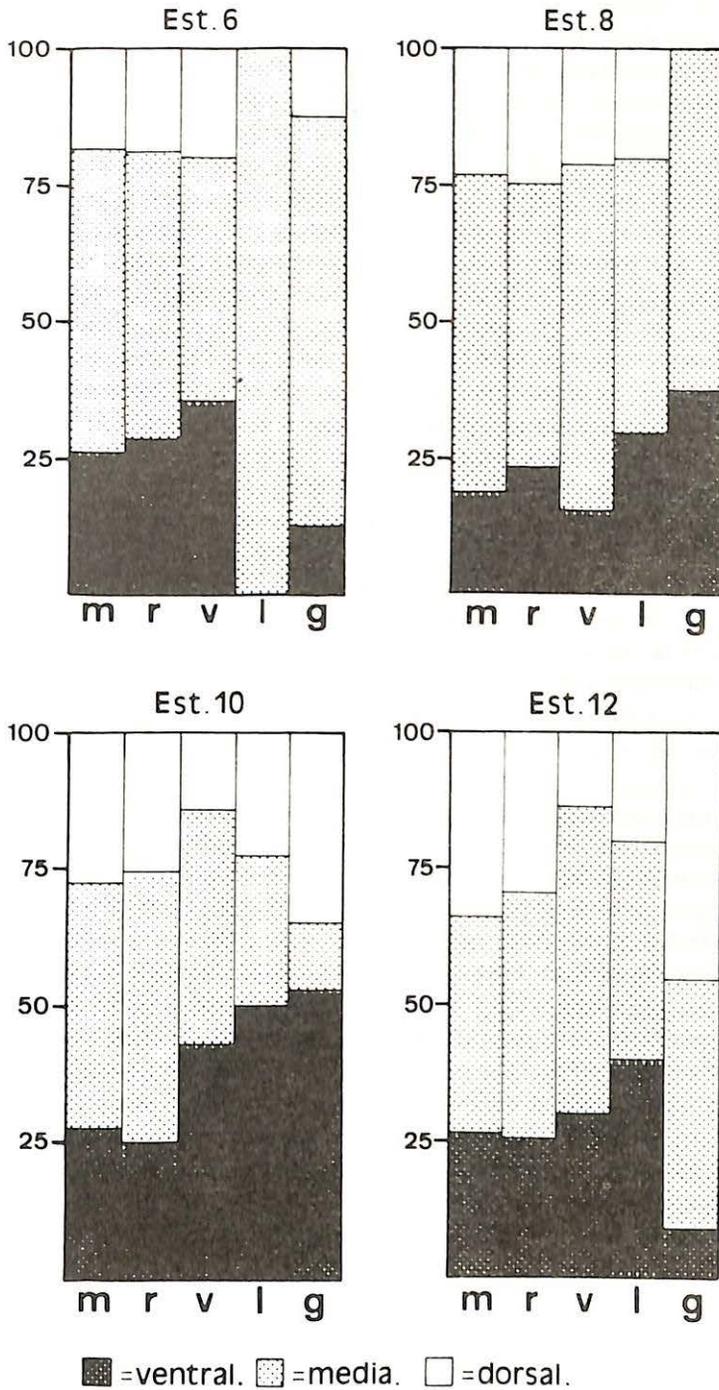


Fig. 2.- Histogramas que muestran la distribución de orgánulos en las zonas dorsal, media y ventral de las células mesodérmicas cefálicas del embrión de pollo de los estadios 6, 8, 10 y 12. m: mitocondrias, r: retículo endoplásmico rugoso, v: gránulos de vitelo, l: cuerpos lipídicos, g: aparato de Golgi.

presente en los cuatro estadios considerados nos hace pensar en una interrelación estable que quizás tenga algún significado en las células mesodérmicas durante la neurulación. En algunos tipos celulares como es el caso de las células endoteliales de *Xenopus laevis*² o en las células del músculo cardíaco²² la relación mitocondrias/retículo endoplásmico rugoso está involucrada en la locomoción de las mitocondrias.

En otras fases del desarrollo embrionario también se ha verificado una interrelación entre ambos orgánulos. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se caracterizan por un gran acúmulo de mitocondrias³ entre las cuales se aprecian un gran número de vesículas que pertenecen al retículo endoplásmico rugoso¹⁷. Recientemente los trabajos de algunos autores^{8, 25} han descrito la íntima relación entre ambos orgánulos durante el desarrollo del epitelio renal e intestinal. En ambos epitelios estos orgánulos se orientan en una dirección apico-basal y la presencia de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso puede influenciar la forma de la mitocondria. Esta analogía entre el desarrollo mitocondrial y la diferenciación del retículo endoplásmico rugoso sugerida por GAFFIERO *et al*⁸ para las células epiteliales renales e intestinales puede ocurrir en las células mesodérmicas cefálicas del embrión de pollo durante la neurulación.

Los histogramas correspondientes a la Fig. n.º 2 nos permiten señalar otro tipo de correlación entre la distribución de los gránulos de vitelo y los cuerpos lipídicos por una parte y la posición del aparato de Golgi en las células mesodérmicas por otra. En los estadios 6, 8 y 12 las inclusiones lipídicas y vitelinas se localizan preferentemente en la zona media de la célula mesodérmica, lo cual se relaciona con el hecho de que en la mayoría de estas células el aparato de Golgi se presenta en la zona media. Por otra parte, en el estadio 10 existe un mayor porcentaje de gránulos vitelinos e inclusiones lipídicas en la zona ventral de la célula, en la misma zona en la que mayoría de las células de este estadio aparece localizado el aparato de Golgi.

Esta relación puede explicarse en términos de la reserva energética y proteica que suponen los cuerpos lipídicos y los gránulos de vitelo respectivamente²⁶. Ambos tipos de inclusiones son utilizadas por las células mesodérmicas durante la neurulación, ya que se ha observado que su densidad de volumen disminuye en estas células en el curso de dicho proceso¹⁹. La utilización de las reservas lipídicas y vitelinas por las células embrionarias requiere, según KAYAHARA¹⁴, la participación de los complejos enzimáticos contenidos en el aparato de Golgi. Así, este autor ha detectado en las células de la notocorda actividad fosfatasa ácida tanto en los gránulos de vitelo como en las cisternas del aparato de Golgi, así como una proximidad manifiesta entre ambos orgánulos. En las células mesodérmicas cefálicas durante la neurulación la interrelación inclusiones lipídicas y vitelinas/aparato de Golgi refleja el proceso de consumo de dichas reservas energéticas y proteicas por parte de estas células en un periodo en el que sufren activos movimientos migratorios.

RESUMEN

Empleando un criterio de polaridad dorso-ventral, las células mesodérmicas cefálicas del embrión de pollo de los estadios 6, 8, 10 y 12 se dividen en tres zonas: dorsal, media y

ventral. En cada una de ellas se obtiene el porcentaje de mitocondrias, cisternas del retículo endoplásmico rugoso, gránulos de vitelo y cuerpos lipídicos, así como los porcentajes de localización del aparato de Golgi en cada zona. Se observa que a medida que avanzan los estadios en la zona dorsal aparecen mayores proporciones de mitocondrias y de cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Ambos orgánulos muestran una correlación en su distribución durante los cuatro estadios, lo cual puede tener algún significado en el desarrollo de las células mesodérmicas, del mismo modo que ocurre en otros procesos del desarrollo embrionario. La distribución de los gránulos de vitelo y los cuerpos lipídicos se relaciona con la localización del aparato de Golgi, lo que parece indicar que la utilización de dichas reservas lipídicas y vitelinas por parte de las células mesodérmicas requiere una estrecha relación entre el aparato de Golgi y las mencionadas inclusiones.

ORGANELLE POLARITY IN THE HEAD MESODERM CELLS OF THE CHICK EMBRYO DURING NEURULATION

SUMMARY

Head mesoderm cells from the chick embryo at stages 6, 8, 10 y 12 were subdivided into three zones: dorsal, median and ventral, following a criterion of dorso-ventral polarity. In each zone the percentages of mitochondria, rough endoplasmic reticulum cisternae, yolk droplets and lipid bodies were obtained, as well as the percentages of Golgi apparatus localization in each zone. In the dorsal zone percentages of mitochondria and rough endoplasmic reticulum cisternae increase as neurulation proceeds. Both organelle show a percentage correlation at the four stages, which seems a result of meaning in the mesoderm cell development, as described for other developmental processes. The yolk and lipid distribution is related to the Golgi apparatus localization, which seems to indicate that the yolk and lipid consumption in the cephalic mesoderm cells requires close relationships between yolk and lipid inclusions and Golgi apparatus.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BANCROFT, M., y BELLAIRS, R. (1975).— Differentiation of the neural plate and tube in the young chick embryos. A study by scanning and transmission electron microscopy. *Anat. Embryol.*, 147: 309-335.
- 2) BEREITER-HAHN, J., y VOTH, M. (1983).— Metabolic control of shape and structure of mitochondria «in situ». *Biol. Cell*, 47: 309-332.
- 3) BILLET, F. S., y ADAM, E. (1976).— The structure of mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. exp. Morph.*, 33: 697-710.
- 4) BURGESS, D. R., y SCHROEDER, T. E. (1979).— The cytoskeleton and the cytomusculature — An overview. En *Methods and achievements in experimental Pathology* (Eds. C. Jasmin y M. Cantin) vol. 8, Karger, Basel, pp. 171-189.
- 5) COVENAS, R.; RIÑERO, J.; AGUIRRE, J. A.; AJON, J., y LOPEZ CAMPOS, J. L. (1982).— Aplicación de las técnicas histoquímicas y convencionales a los cortes semifinos. *Morf. Normal Patol. A*, 6: 209-217.
- 6) ENGLAND, M. A., y COWPER, S. V. (1976).— A transmission and scanning electron microscope study of primary neural induction. *Experientia*, 32: 1578.
- 7) FISHER, M., y SOLURSH, M. (1979).— The influence of local environment on the organization of mesenchyme cells. *J. Embryol. exp. Morph.*, 49: 295-306.
- 8) GAFFIERO, P.; BERGERON, M., y THIERY, G. (1983).— Morphological study of cell organelles during development. II.— The mitochondria of the renal and intestinal epithelium. *Biol. Cell*, 49: 163-168.
- 9) GLAUERT, A. M. (1975).— *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. North-Holland, Amsterdam.
- 10) HAMBURGUER, V., y HAMILTON, H. L. (1951).— A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88: 49-92.
- 11) HARA, K. (1978).— Spemann's organizer in birds. En: *Organizer: a milestone of a half-century from Spemann* (eds. O. Nakamura y S. Toivonen), Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 221.
- 12) HILLMAN, N. W., y HILLMAN, R. (1965).— Chick cephalogenesis. The normal development of the cephalic region of stage 3 through 11 chick embryo. *J. Morph.*, 116: 357-370.
- 13) KARFUNKEL, P. (1974).— The mechanisms of neural tube formation. *Int. Rev. Cytol.* 38: 245-271.
- 14) KAYAHARA, T. (1983).— Acid phosphatase activity in yolk droplets of chick notocordal cells. *Histochem J.* 15: 71-77.
- 15) LASH, J. W.; OSTROVSKY, D.; MITTAL, B., y SANGER, J. W. (1985).— Alpha actinin distribution and extracellular matrix products during somitogenesis and neurulation in the chick embryo. *Cell Motility*, 5: 491-507.
- 16) LINASK, K. K., y LASH, J. W. (1983).— Directional cell migration of precardiac mesoderm cells in the early chick embryo. *J. Cell Biol.*, 97: 319a.
- 17) MARINOS, E., y BILLET, F. S. (1981).— Mitochondrial number, citochrome oxidase activity and succinic dehydrogenase activity in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. exp. Morph.*, 62: 395-409.
- 18) MORRIS, G. M., y SOLURSH, M. (1978).— Regional differences in mesenchymal cell morphology and glycosaminoglycans in early neural-fold stage rat embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, 46: 37-52.
- 19) PAZ, P.; FERNANDEZ, J. G.; CHAMORRO, C.; FERNANDEZ, M. y VILLAR, J. M. (1986).— Stereological analysis of ultrastructural changes of surrounding tissues to neuroectoderm during chick embryo neurulation. *Acta Anat.* 126: 177-182.
- 20) SCHOENWOLF, G. C., y FRANKS, M. V. (1984).— Quantitative analysis of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Develop. Biol.*, 105: 257-272.
- 21) SCHROEDER, T. E. (1970).— Neurulation in *Xenopus laevis*. An analysis and model based upon light and electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, 23: 427-462.
- 22) SEGRETAI, D.; RAMBOURG, A., y CLERMONT, Y. (1981).— Three-dimensional arrangement of mitochondria and endoplasmic reticulum in the heart muscle fibers of the rat. *Anat. Rec.*, 200: 139-151.
- 23) SOKAL, R. R., y ROHLF, F. J. (1969).— *Biometry*. WH Freeman & Co., San Francisco.
- 24) SUZUKI, A. S.; MIFUNE, Y., y KANEDA, T. (1984).— Germ layer interactions in pattern formation of amphibian mesoderm during primary embryonic induction. *Develop. Growth & Differ.*, 26: 81-94.
- 25) THIERY, G.; GAFFIERO, P., y BERGERON, M. (1983).— Three dimensional characteristics of the endoplasmic reticulum in the columnar cells of the rat small intestine. An electron microscopy study in thick sections. *Amer. J. Anat.*, 167: 479-493.
- 26) VERNIER, J. M., y SIRE, M. F. (1977).— Plaquettes vitellines et activité hydrolasique acide au cours du developement embryonnaire de la truite arc-en-ciel. Etude ultrastructural et biochimique. *Biol. Cell*, 29: 99-112.