

BIBLIOGRAFIA

- 1) BARG, C., KRAELING, R., RAMPACEK, G., FONDA, E. y KISER, T. (1982). Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hydrocortisone. *J. Reprod. Fert.*, 64: 85-92.
- 2) CUTTLER, L., EGLI, C. A. y GRUMBACH, M. M. (1985). Hormone ontogeny in the ovine fetus. XVIII. The effect of an opioid antagonist on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 116: 1.997-2.002.
- 3) DE SOUZA, E. P. y VAN BLOOM, C. R., (1985). Differential plasma b-endorphin, b-lipotropin, and adrenocorticotropin responses to stress in rats. *Endocrinology* 116: 1.577-86.
- 4) DORRINGTON, J. H., MOON, Y. S. y ARMSTRONG, D. T. (1975). Estradiol-17b biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 114: 268-273.
- 5) DU RUISSEAU, P., TACHE, T., BRAZEAN, P. y COLLU, R. (1978). *Neuroendocrinology* 27: 257-271.
- 6) FONDA, E. S., RAMPACEK, G. y KRAELING, R. E. (1984). The effect of adrenocorticotropin or hydrocortisone on serum luteinizing hormone concentrations after adrenalectomy and/or ovariectomy in the prepuberal gilt. *Endocrinology* 114: 268-273.
- 7) FRAIOLI, F., MORETTI, C. y FORTUNIO, G. (1979). Physical exercise stimulates marked concomitant release of b-endorphin and adrenocorticotropin hormone (ACTH) in peripheral blood in man. *Experientia* 36: 987-992.
- 8) KNIEWALD, Z., ZANISI, M. y MARTINI, L. (1971). Studies on the biosynthesis of testosterone in the rat. *Acta Endocrinol* 68: 614-622.
- 9) LESCOAT, G., LESCOAT, D. y GARNIER, D. H. (1982). Influence of adrenalectomy on maturation of gonadotrophin function in the male rat. *J. Endocrinol* 95: 1-6.
- 10) LI, P. S. y WAGNER, W. C. (1983). *Biol. of Reprod.* 29: 11-24 (citado por MOBERG, G. P. in: Adrenal-pituitary interaction. Effects of reproduction. Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A. I. Vol. IV Urbana, 1984).
- 11) MATTERI, R. L. y MOBERG, G. P. (1982). Effect of cortisol or adrenocorticotropin hormone on release of luteinizing hormone induced by luteinizing hormone releasing hormone in the dairy heifer. *J. Endocrinol* 92: 141-146.
- 12) MCFARLAND, L. A. y MANN, D. R. (1977). The inhibitory effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats. *Biol. of Reprod.* 16: 306-314.
- 13) MOBERG, G. P. (1976). Effects of environment and management stress on reproduction in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 59: 1.618-1.624.
- 14) MOBERG, G. P. y STOBEL, D. P. (1980). The effect of cortisol on ovulation in the dairy cow. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A. I. Madrid* (Abstracts 103).
- 15) MOBERG, G. P. (1984). Adrenal-pituitary interaction: Effect of reproduction. *10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A. I. Vol. IV. Urbana (USA)*.
- 16) RAMALEY, J. A. (1976). The role of corticosterone rhythmicity in puberty. *Biol. of Reprod.* 14: 151-156.
- 17) RAMALEY, J. A. (1976). The role of adrenal rhythmicity in puberty: effects of intermittent steroid replacement. *Biol. of Reprod.* 15: 396-401.
- 18) RINGSTROM, S. J. y SCHWARTZ, N. B. (1984). Examination of prolactin and pituitary-adrenal axis components as intervening variables in the adrenalectomy-induced inhibition of gonadotropin response to castration. *Endocrinology* 114: 880-887.
- 19) SCHWARTZ, N. B. y JUSTO, S. N. (1977). Acute change in serum gonadotropins and steroids following orchidectomy in the rat: role of the adrenal gland. *Endocrinology* 110: 1.550-1.556.
- 20) SIRINATHSINGHII, D. J. and MARTINE, L. (1984). Effects of bromocriptine and naloxone on plasma levels of PRL, LH and FSH during suckling in the female rat: responses to gonadotrophin releasing hormone. *J. Endocrinol* 100: 175-182.
- 21) SMITH, E. R., JOHSON, J., WEICK, R. F., LEVINE, S. y DAVIDSON, J. M. (1971). Inhibition of the reproductive system in immature rats by intracerebral implantation of cortisol. *Neuroendocrinology* 8: 94-98.
- 22) STOBEL, D. P. y MOBERG, G. P. (1982). Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 65: 1.016-1.024.
- 23) SUTER, D. E. y SCHWARTZ, N. B. (1985). Effects of Glucocorticoid on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 117: 855-859.
- 24) WEISZ, J. y GUNSALUS, P. (1973). Estrogen levels in immature female rats: true or spurious ovarian or adrenal? *Endocrinology* 93: 1.057-1.065.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS MESODERMICAS PRECARDIACAS, DE EMBRION DE POLLO, CULTIVADAS EN MONOCAPA

Por M. Arias (1)
C. García (1)
M. Fernández (1)
J. M. Villar (1)

INTRODUCCION

Es conocido el importante papel que la superficie celular juega en los procesos morfogenéticos^{25,7,13}. Las distintas proyecciones de superficie relacionan a las células entre sí^{1,15} así como con su sustrato^{8,13,17}.

El microscopio electrónico de barrido proporciona una información rápida y detallada sobre la arquitectura superficial, siendo de particular interés cuando se trata de comprender los complejos movimientos celulares y los cambios de forma que ocurren en el transcurso del desarrollo de los tejidos¹⁹.

Son numerosos los trabajos sobre estudios morfológicos de células mesodérmicas embrionarias, tanto «in vitro» como «in vivo»^{2,6,7,21,22,3,14}. Sin embargo, son muy escasos los estudios referentes a estadios precoces del desarrollo, particularmente en lo que se refiere al comportamiento y morfología de células mesodérmicas precardiacas, cultivadas «in vitro». Las técnicas de cultivos celulares tienen un gran interés, aplicadas al estudio de estos procesos, ya que es de esperar que las propiedades de las células «in vitro» estén en correspondencia con las propiedades de estas mismas células «in vivo».

El propósito de este trabajo es realizar un estudio mediante microscopía electrónica de barrido de las células mesodérmicas precardiacas en cultivo, con el fin de analizar su conducta adhesiva, de extensión y locomoción «in vitro».

MATERIAL Y METODOS

Se realizan cultivos en monocapa de células mesodérmicas correspondientes a las áreas cardiogénicas de embrión de pollo de estadio 5¹⁰. Con este propósito, se recogen los fragmentos correspondientes²⁶ y se someten a la acción enzimática de la Colage-

(1) Dpto. de Biología Celular y Anatomía

nasa (0,03% en solución Tirode a 37°C, 70–80 minutos)¹¹. A continuación se separa el mesodermo con la ayuda de una microaguja bajo lupa estereoscópica. Los segmentos obtenidos se lavan con una mezcla de suero fetal bovino, inactivado por calor y Tirode, para inactivar el enzima. Posteriormente se disocian las células por pipeteado suave.

Las células así aisladas se cultivan sobre soportes de plástico, en tubos Leighton con 1 ml de medio de Eagle, al cual se le adiciona un 10% de suero fetal bovino, inactivado por calor, 60% de TC Glutatamina al 5% 100 UI/ml de penicilina y 100 ugr/ml de estreptomina. El tiempo de cultivo fue de 24 horas a 37°C.

Los cultivos obtenidos se fijan en glutaraldehído al 1% en tampón Sorensen (0,1 M y pH 7,4) a 37°C durante 1 hora. La postfijación se realiza en 0,04 al 1% con el mismo tampón durante 1 hora y a temperatura ambiente. Las muestras se deshidratan mediante series sucesivas de etanol; se pasan a isoamiloacetato y se desecan por el método del punto crítico en un desecador CPD 0,10 (BALCERS), recubriéndolas a continuación con una capa de oro-palacdio para ser examinadas al microscopio electrónico de barrido JEOL 35 C a 20 Kv.

RESULTADOS

Las células mesodérmicas de las áreas cardiogénicas, cultivadas en monocapa durante 24 horas, muestran al microscopio electrónico de barrido la presencia de dos grupos celulares bien diferenciados y con formas muy variadas.

Un primer grupo muestra células de forma esférica y de superficie protrusiva debido a la abundancia de proyecciones globulares o blebs. (Fig 1). Representa el 60% de las células mesodérmicas observadas. Las dimensiones medias de estas células oscilan entre las 8–10 um de diámetro mayor y 7–9 um de longitud. Su anchura es menor de 2 um.

Los filopodios que aparecen tanto en el borde celular como en el borde de los lamelipodios son mucho más escasos, observándose solamente en el 20% de las células y con un promedio de 1,5 por célula. Son prolongaciones cortas, con una longitud de 1–2 um como máximo.

Un segundo grupo, que representa el 40% de las células observadas, muestra células de morfología superficial lisa, con escasas protrusiones en su superficie. Son células aplanadas y elongadas en un sentido o en varias direcciones por los distintos procesos citoplasmáticos que presentan, algunos de los cuales son muy manifiestos. (Fig. 2 y 3).

Dentro de este segundo grupo, se han observado células, con formas diferentes, bien fusiformes o bipolares, con lamelipodios en sus extremos contactando directamente con el sustrato, (Fig. 2) bien estrelladas o multipolares, cuyos procesos citoplasmáticos se localizan en toda la periferia celular. (Fig. 3).

El 90% de las células muestran lamelipodios, con una media de 2,5 por célula. Su longitud está comprendida entre 1 y 3 um. El borde externo de estas proyecciones presenta numerosas ramificaciones, semejantes a pequeños filopodios, que las unen al sustrato. Sin embargo, es de destacar que un 40% de las células, bipolares principalmente, muestran lamelipodios con forma de «abanico» de bordes lisos y sin ramificaciones. En estos casos la anchura de los lamelipodios supera las 4 um.

Los filopodios, sin embargo, son escasos en este grupo de células mesodérmicas. Sólo se observan en el 20% de las células y no alcanzan más de 2 um de longitud.

En algunas zonas de los cultivos se observa también la presencia de agregados formados por la adhesión y multiplicación de las células previamente disociadas (Fig. 4). Estos agregados presentan un tamaño medio de 300–500 um de diámetro mayor, sien-

do su forma esférica o ligeramente ovalada y sus bordes irregulares. Las células mesodérmicas que forman parte de estos agregados presentan escasas prolongaciones de superficie. Únicamente se aprecian blebs en algunos grupos celulares.

DISCUSION

El mesodermo precardiaco reducido a una población de células aisladas y cultivadas en monocapa muestra, en nuestras condiciones experimentales, la presencia a nivel morfológico de dos subpoblaciones celulares: una de células con forma esférica y superficie irregular, de 8–10 um de diámetro aproximadamente, que representa el 60% de las células y otra de células aplanadas que representa el 40% restante. Estos dos tipos celulares son descritos también por otros autores^{23,16}, en cultivos de células cardíacas en agregación y en estadios más avanzados.

La morfogénesis cardíaca, en el embrión de pollo, comienza con una emigración de las células, correspondientes a las áreas precardiacas, que sucede durante un breve intervalo de tiempo. Estos movimientos morfogenéticos comienzan en el estadio 6 y su duración es de aproximadamente 6–7 horas. Durante este proceso las células migratorias se alargan, presentando el eje longitudinal paralelo a la dirección del movimiento¹⁴.

Teniendo en cuenta estos hechos, las células aplanadas, presentes en nuestros cultivos, podrían interpretarse como células precardiacas en migración, dada la correspondencia de su forma, típicamente migratorias, y dado que la migración comenzaría poco tiempo después de iniciado el cultivo de estas células, puesto que partimos del estadio 5. Ello estaría en concordancia con los estudios realizados sobre el mesodermo precardiaco «in vivo»¹⁴. El movimiento de las células precardiacas durante el estadio 5, se podría describir como «caótico»⁵; posteriormente, a partir del estadio 6, este movimiento se hace direccional⁴ y las células son principalmente bipolares para adaptarse a este tipo de movimiento. En nuestros resultados, la mayoría de las células aplanadas y, por tanto, presuntamente migratorias, son células bipolares.

Por otra parte, es ampliamente aceptado que la conducta de las células embrionarias en cultivo, es reflejo de su comportamiento «in vivo»¹³.

Sin embargo, la mayor parte de los autores que estudian la morfología de las células cardíacas en cultivo^{12,18,16} sugieren que las células aplanadas son generalmente de carácter no muscular, si bien, hay que tener en cuenta que estos autores trabajan con células embrionarias de avanzada edad. Por ello, nos inclinamos a pensar que, en nuestro caso, esta población celular represente principalmente células precardiacas en migración, ya que las células utilizadas en nuestros cultivos proceden de un estadio previo a la migración y la mayoría de las células de esta subpoblación presenta morfología bipolar. No descartamos, sin embargo, la posibilidad de que parte de estas células aplanadas sean también de naturaleza no muscular.

Las células esféricas, que representan el 60% en nuestros cultivos, pueden considerarse en general como células musculares cardíacas. Mediante cultivos en rotación de células cardíacas de embrión de pollo de 7 días²⁴, obtienen dos poblaciones celulares diferentes; una de células esféricas, dispuestas en el centro del agregado, que clasifican como miocitos cardíacos y otra, de células extremadamente aplanadas que se disponen en la periferia del agregado y son de naturaleza no muscular. Las células esféricas se consideran principalmente de naturaleza cardíaca por su contenido en miofibrillas, así como por otras características ultraestructurales^{9,23}.

Por otra parte, las células esféricas observadas en el presente trabajo presentan las

mismas dimensiones y características de superficie, que las descritas por los autores anteriormente citados. Asimismo, el alto porcentaje de células esféricas observadas reafirma la idea de que se trate de células musculares cardíacas, ya que su procedencia se limitó a las áreas cardiogénicas.

Estos hechos sugieren que las células esféricas representan principalmente miocitos cardíacos, mientras que las células aplanadas podrían representar, bien células precardiáticas en período de migración, bien células de naturaleza no muscular.

RESUMEN

Se realiza un estudio, mediante microscopía electrónica de barrido, de las características morfológicas más importantes que presentan las células cardiogénicas de embrión de pollo de estadio 5.

Nuestros resultados demuestran la presencia de dos grupos celulares claramente diferenciados. En cada uno de ellos se estudia el aspecto de la superficie celular, así como las proyecciones más características que muestran las células. Los resultados son interpretados en relación con el proceso migratorio que sufren las células precardiáticas y con los diferentes tipos celulares implicados en la cardiogénesis.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CHICK EMBRYO PRECARDIAC MESODERMIC CELLS CULTURED IN MONOLAYER

SUMMARY

A study is made, by means of scanning electron microscopy, of the most important morphological characteristics that cardiogenic cells of stage 5 chick embryo show.

Our results demonstrate the presence of two cellular groups clearly differentiated. The appearance of the cellular surface as well as the most characteristic projections shown by the cells are studied in both. The results are interpreted in connection with the migratory process suffered by the precardiatic cells and with different cellular types involved in cardiogenesis.

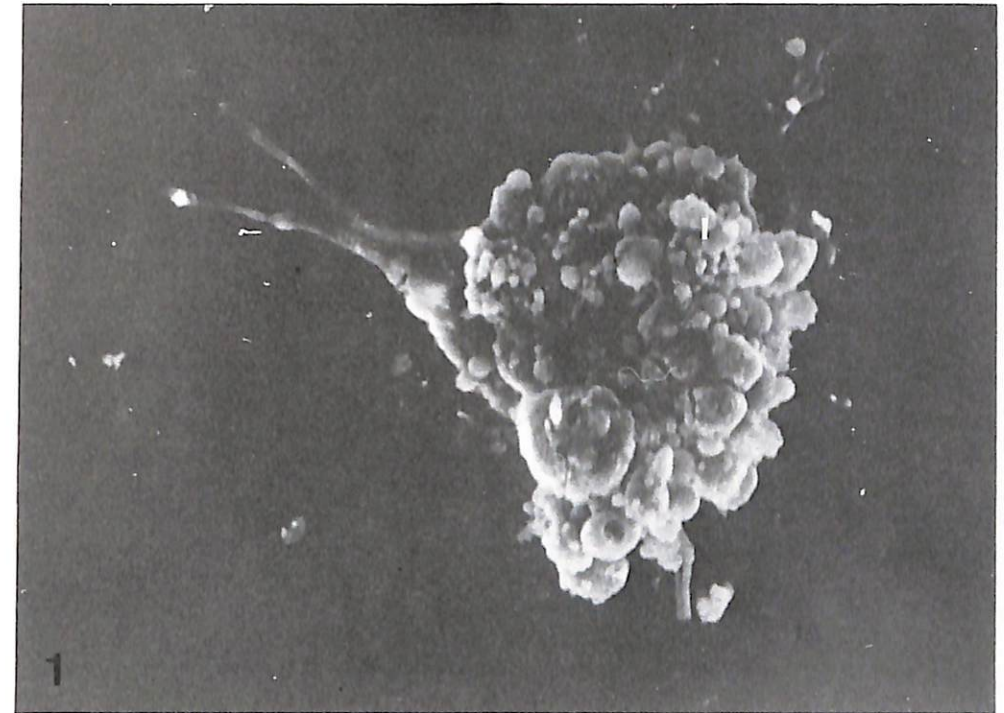


Fig. 1.- Célula de forma esférica con superficie protrusiva mostrando un lamelipodio en su borde celular. 5.000 X

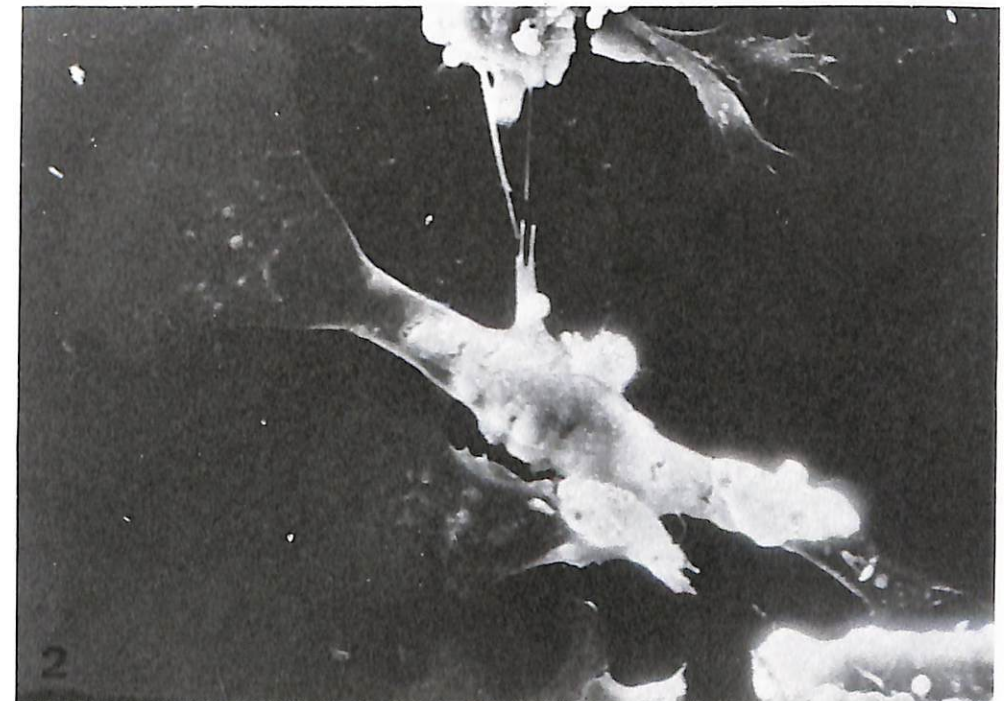


Fig. 2.- Célula aplanada bipolar con lamelipodios en sus extremos. 4.500 X

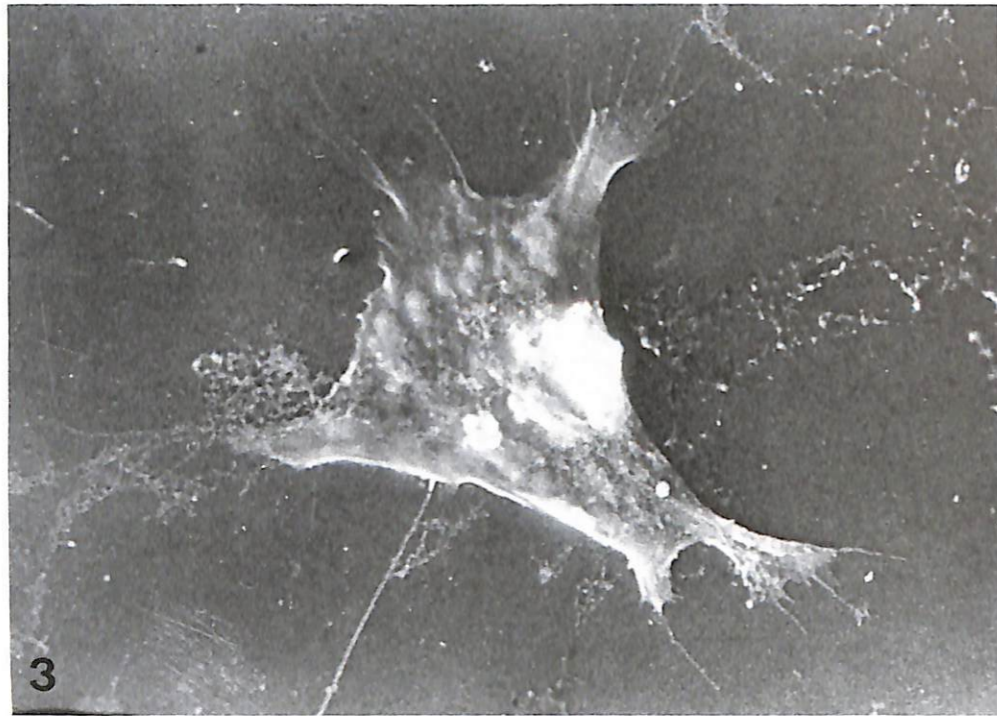


Fig. 3.- Célula aplanada multipolar con diferentes proyecciones en su borde celular. 4.500 X

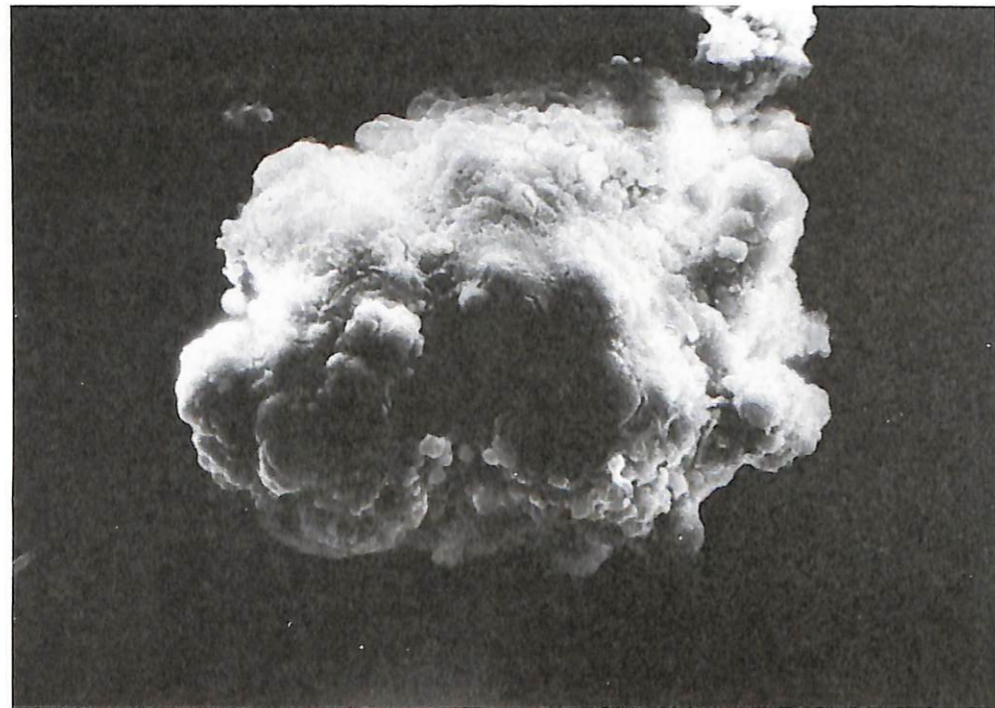


Fig. 4.- Agregado de células mesodérmicas precardiacas observado en estos cultivos. 700 X

BIBLIOGRAFIA

- 1) BELLAIRS, R., CURTIS, A. S. G. y SANDERS, E. J. (1980). Cell adhesiveness and embryonic differentiation. *J. Embryol. exp. Morph.* 46: 207-213.
- 2) BELLAIRS, R., SANDERS, E. J. y PORTH, P. A. (1980). Behavioural properties of chick somitic mesoderm and lateral plate when explanted in vitro. *J. Embryol. exp. Morph.* 56: 41-58.
- 3) CHAMORRO, C. (1985). La membrana celular y su papel morfogenético en el embrión de pollo en neurulación. Análisis morfométrico de las diferentes proyecciones de la membrana celular y otras características morfológicas de las células neuroectodérmicas y mesodérmicas en cultivo y su evolución durante el desarrollo. *Tesis doctoral* Fac. Vet. León.
- 4) DE HAAN, R. L. (1963). Migration patterns of the precardiac mesoderm in the early chick embryo. *Exp. Cell Res.* 29: 544-560.
- 5) DE HAAN, R. L. (1964). Cell interactions and oriented movements during development. *J. Exp. Zool.* 157: 127-138.
- 6) DE-VOY, D., ENGLAND, M. A. y WAKELY, I. (1979). The effect of cytochalasin B on chick mesoderm cells as studied by scanning electron microscopy. *Anat. Embryol.* 158: 63-73.
- 7) EBENDAL, T. (1976). Migratory mesoblast cells in the young chick embryo examined by scanning electron microscopy. *Zoon.* 4: 101-108.
- 8) ENGLAND, M. A., y WAKELY, J. (1977). Scanning electron microscopy of the development of the mesoderm layer in chick embryos. *Anat. Embryol.* 150: 291-300.
- 9) FISCHMAN, D. A., y MOSCONA, A. A. (1971). Reconstruction of heart tissue from suspensions of embryonic myocardial cells: Ultrastructural studies on dispersed and reaggregated cells. En *Cardiac hypertrophy*. Ed. N. R. Alpert Academic Press, New York: 125-139.
- 10) HAMBURGER, V., y HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92.
- 11) ISHIZUYA, A. (1983). Electron microscopical study of selfdifferentiation potency in the chick embryonic endoderm cultured «in vitro». *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 192: 171-178.
- 12) KASTEN, F. H. (1972). Rat myocardial cells «in vitro»: mitosis and differentiated properties. *In Vitro.* 8: 128-149.
- 13) LE BLANC, I., y BRICK, I. (1981). Morphologic aspects of adhesion and spreading behaviour of amphibian blastula and gastrula cells. *J. Embryol. exp. Morph.* 61: 145-163.
- 14) LINASK, K. K. y LASH, J. W. (1986). Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev. Biol.* 114: 87-101.
- 15) MATSUDA, M., (1980). Cell surface properties of amphibian embryonic cells. *J. Embryol. exp. Morph.* 60: 163-171.
- 16) NAG, A. C. (1979). Reconstruction of mammalian heart tissue from embryonic heart cell suspension with reference to the aggregation of adult heart cells. *Cytobios.* 23: 199-223.
- 17) OSTER, G. F., MURRAY, J. D. y HARRIS, A. K. (1983). Mechanical aspects of mesenchymal morphogenesis. *J. Embryol. exp. Morph.* 78: 83-125.
- 18) POLINGER, I. S. (1973). Identification of cardiac myocytes «in vivo» and «in vitro» by the presence of glycogen and myofibrils. *Exp. Cell Res.* 76: 243-252.
- 19) PORTCH, P. A., y BARSON, A. J. (1974). Scanning electron microscopy of neurulation in the chick. *J. Anat.* 117: 341-350.
- 20) RAWLES, M. E. (1943). The heart forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.* 16: 22-44.
- 21) SANDERS, E. J. (1980). The effect of fibronectin and substratum attached material on the spreading of chick embryo mesoderm cells in vitro. *J. Cell Sci.* 44: 225-242.
- 22) SANDERS, E. J. (1984). Substratum attachment of embryonic mesoderm cells in culture. *In vitro.* 20: 521-527.
- 23) SHIMADA, Y., MOSCONA, A. A. y FISCHMAN, D. A. (1974). Scanning electron microscopy of cell aggregation: cardiac and mixed retina-cardiac cell suspensions. *Dev. Biol.* 36: 428-446.
- 24) SHIMADA, Y., y FISCHMAN, D. A. (1975). Cardiac cell aggregation by scanning electron microscopy. En *Developmental and physiological correlates of cardiac muscle*. Ed. M. Lieberman y T. Sano Raven Press, New York: 81-101.
- 25) TRELSTAD, R. L., HAY, E-D. y REVEL, J. P. (1967). Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 16: 78-106.