

ESTUDIO MORFOLOGICO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LAS CELULAS NEUROECTODERMICAS DE EMBRION DE POLLO EN CULTIVO DURANTE LA NEURULACION

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

INTRODUCCION

El neuroectodermo, que conforma las bases morfológicas del sistema nervioso central (SNC), ha sido objeto de numerosos estudios desde distintos puntos de vista. Mediante microscopía electrónica de transmisión se han estudiado estas células en diversos estadios de la neurulación del embrión de pollo^{2, 23, 24, 26}. También se han analizado las características morfológicas de estas y otras células embrionarias mediante microscopía electrónica de barrido^{9, 27}. No obstante, la observación de las células embrionarias «in situ» plantea una serie de dificultades y limitaciones que impiden la apreciación de ciertos detalles acerca de las protrusiones y morfología celular, lo cual se ha superado mediante la aplicación de las técnicas de cultivos celulares. Utilizando estas técnicas y la observación mediante microscopía electrónica de barrido se han realizado numerosos estudios sobre las células ectodérmicas embrionarias, pero la mayoría de ellos se han llevado a cabo en anfibios. Así, LEBLANC y BRICK¹⁹ observan cómo las células neuroectodérmicas de blástula y gástrula de *Rana pipiens* muestran en cultivo distintas características de expansión, número y tipo de proyecciones según el estadio considerado. Asimismo, observan en gástrula media y tardía dos poblaciones celulares en cultivo, una de las cuales no presenta una variación de sus características con respecto a las células de estadios anteriores mientras que en la otra se observa una considerable reducción del número de filopodios, manifestándose además una polarización con respecto a su morfología y lugares de adhesión. JUMAH y STANISSTREET¹⁴ también realizan una descripción de las células ectodérmicas de anfibios en cultivo, las cuales se presentan inicial-

(1) Cátedra de Anatomía

(2) Servicio de Microscopía Electrónica

(3) Cátedra de Fisiología

mente esféricas y con delgados filopodios, y a medida que avanza el cultivo se polarizan y emiten pseudópodos.

En embrión de pollo se han realizado muy pocos estudios morfológicos sobre las células de esta hoja embrionaria en cultivo. BELLAIRS *et al*² observan que las células ectodérmicas presentan una mayor adhesión al sustrato que las neurales, y que las células disociadas se adhieren mejor que las hojas intactas. Estas células poseen las características típicas de la mayoría de los tipos epiteliales en cultivo, aunque exhiben algunas características propias y ciertas variaciones en el comportamiento dependientes del estadio. No obstante, estas observaciones las realizan dichos autores utilizando microscopía óptica, cuyo poder de resolución no es suficiente para satisfacer un exhaustivo análisis morfológico. Mediante microscopía electrónica de barrido hemos realizado previamente una primera aproximación al estudio de las características morfológicas de las células neuroectodérmicas del estadio 8, con especial atención a las proyecciones celulares y al comportamiento social de las células en los agregados³.

Si se realiza un estudio morfométrico comparando células neuroectodérmicas procedentes de un mismo área pero de diferentes estadios de desarrollo, cultivadas bajo idénticas condiciones experimentales, las diferencias observadas tendrán su origen en las distintas propiedades de las células en el embrión, que estarán determinadas por el estadio de procedencia. Así, en el presente trabajo hemos analizado las características más importantes que muestran las células neuroectodérmicas embrionarias en cultivo, procedentes de distintos estadios durante el proceso de la neurulación, mediante un método morfométrico que permite analizar la evolución morfológica que muestran estas células^{4,5}.

MATERIAL Y METODOS

a) *Cultivos celulares*

Se utilizaron embriones de pollo de los estadios 6, 8, 10 y 12 (según HAMBURGER y HAMILTON¹¹). Para cada uno de los estadios se realizaron cuatro experiencias diferentes, en cada una de las cuales se procedió a la recogida de los embriones, que se introdujeron en una solución salina de Moscona libre de iones Ca^{++} y Mg^{++21} , en donde se recortaron las áreas presuntivas del SNC, evitando la recogida de células de la cresta neural así como del ectodermo no neural. Estas áreas se localizan en la región prenatal en el estadio 6 y presomítica en el 8, 10 y 12. Las áreas seleccionadas se introdujeron en una solución estéril de tripsina (Difco 1:250) (2 % de tripsina y 0,3 % de carboximetilcelulosa en solución libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}) durante 15 minutos a 37°C. La adición de carboximetilcelulosa previene el posible daño que se infiere a la membrana celular durante la exposición de las células a la tripsina⁸. Posteriormente los fragmentos se sometieron a varios lavados en solución de Moscona estéril. A continuación se recogió el neuroectodermo de dichas áreas, separándolo del mesodermo mediante pipeteado, y se trató 15 minutos a 37,5°C con una segunda solución estéril de tripsina (0,5 % de tripsina y 0,3 % de carboximetilcelulosa en solución de Moscona). Los fragmentos de neuroectodermo se lavaron repetidas veces y se pipetearon enérgicamente hasta la disociación total²⁵. La densidad celular se analiza en una cámara de Burker, determinando así la siembra que debe realizarse para conseguir una concentración final de 10^6 células/ml.

Los cultivos celulares se realizaron sobre cubreobjetos de plástico THERMANOX en tubos Leighton con 1 ml de medio de Eagle modificado (TC minimal medium Eagle, 10 % de suero fetal bovino, 6 % de TC glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ gr/ml de estreptomycin). En cada una de las experiencias de cada estadio se obtienen cuatro cultivos, dos de los cuales se mantienen durante 12 horas y los otros dos durante 24 horas; de esta forma se obtuvieron un total de 64 cultivos.

b) *Microscopia Electrónica de Barrido*

Todos los cultivos celulares se fijaron con glutaraldehído al 2 % en tampón Sorensen (pH 7.4 y 300 mOs) durante 1 hora, a 37,5°C con el fin de evitar alteraciones morfológicas provocadas por un brusco cambio de temperatura. La postfijación se realizó con tórax de osmio al 1 % en el mismo tampón durante 1 hora a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo en grados sucesivos de etanol, después de la cual se transfirieron a isoamylacetato. Se desecaron por el método del punto crítico en un desecador CPD 010 (BALZERS), después de lo cual todos los cubreobjetos fueron fragmentados en cuatro partes iguales. La técnica de desecación puede provocar retracción celular, por lo que se ha extremado al máximo la estandarización de la misma, de modo que cualquier variación en la morfología celular inducida por los procedimientos técnicos sea aplicable a todas las células analizadas, permitiendo la comparación de dicha morfología. Los fragmentos montados sobre portamuestras de microscopia electrónica de barrido se cubrieron con una capa de oro-paladio y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 35C a 20 Kv.

c) *Método de caracterización morfológica*

Para la caracterización morfológica de las células neuroectodérmicas en cultivo, se han definido una serie de parámetros basados en trabajos previos en este sentido ^{7, 19}. Todos los parámetros se han analizado directamente sobre la pantalla del SEM ya que si se estudian a partir de microfotografías se pueden estar falseando ciertos datos como morfología celular, dimensiones, etc. Merced a la movilidad de la muestra que permite esta microscopia se evitaron dichos problemas.

La zona de crecimiento celular de cada fragmento del cubreobjetos es observada al SEM a 40 aumentos, superponiendo en la pantalla una rejilla dividida en 252 áreas iguales. De estas áreas se seleccionaron 10 mediante tabla digital al azar y se examinan todas las células que se encuentran dentro de esas áreas así como las que contactan con su borde superior y derecho. Así, el número de células examinadas oscila de 50 a 80 para cada cultivo.

Para la caracterización morfológica se analizaron en cada célula los siguientes parámetros:

– *Forma aparente*: En este parámetro se consideraran tres posibles tipos celulares dependiendo de su mayor o menor aplanamiento o esfericidad, definidos en base a las descripciones previas realizadas por HARRISON y ALLEN ¹².

1.–Células aplanadas: Con una relación axial aproximada mayor de 5 a 1, considerando 5 el diámetro menor y 1 el eje celular perpendicular al sustrato.

2.-Células semiaplanadas: Con una relación axial comprendida entre 5/1 y 4/1.5.

3.-Células esféricas: Aquellas cuya relación axial se encuentra aproximadamente entre 4/1.5 y 4/4.

- *Morfología superficial*: Para cada célula se estudia la morfología de su superficie atendiendo a la mayor o menor presencia, o ausencia, de «blebs» y protrusiones celulares. Según este criterio se han clasificado las células neuroectodérmicas en primer lugar en dos subpoblaciones: *protrusivas* (con abundante actividad protrusiva en su superficie) y *lisas* (desprovistas de dicha actividad). A partir de esta primera clasificación, que sirve de base para el resto de los parámetros, se han clasificado las células de cada subpoblación según la mayor o menor actividad superficial:

Superficie prácticamente lisa: *

Superficie con pocas ampollas o protrusiones: **

Presencia de gran cantidad de «blebs», protrusiones, etc., en la superficie celular: ***

- *Diámetros celulares*: Indica, en micrómetros, el diámetro medio mayor y menor medido en cada tipo celular. Una vez obtenido el diámetro mayor de la célula se halla el menor como la longitud mínima de la célula que pasa por el punto medio del diámetro mayor. Ambos diámetros se expresan como valores medios de toda la población celular analizada junto con la respectiva desviación estandar.

RESULTADOS

En todos los cultivos de células neuroectodérmicas se apreciaron dos subpoblaciones celulares bien diferenciadas: protrusivas y lisas. En general las células protrusivas (Fig. 1) se caracterizan por presentar una superficie morfológicamente muy activa, con abundantes protrusiones y ampollas, mientras que las lisas (Fig. 2) se manifiestan con una superficie celular carente de dichas protrusiones.

Estas dos subpoblaciones se presentaron en todos los estadios considerados, tanto a las 12 como a las 24 horas de cultivo, por lo que se adoptan como un primer sistema de clasificación para analizar a partir de él el resto de las características morfológicas. Los resultados observados en cada estadio están resumidos en la tabla 1.

- *Estadio 6*: A las 12 horas de cultivo se observó que la mitad de las células pertenecían a cada subpoblación, con un ligero incremento de las protrusivas en los cultivos de 24 horas. Ambos tipos celulares tienden hacia la esfericidad, pero evidentemente las células protrusivas presentan un porcentaje mayoritario de células morfológicamente muy activas, es decir, con abundantes protrusiones (***) (Fig. 1); porcentaje que disminuye ligeramente a las 24 horas de cultivo, observándose un incremento de células protrusivas con una actividad intermedia (**) (Fig. 3). La subpoblación de células lisas está compuesta en su totalidad por células con un aspecto que se corresponde a la denominación de referencia, excepto un pequeño porcentaje de células que presentan algunas ampollas en los cultivos de 24 horas. A las 12 horas esta subpoblación presenta las únicas células semiaplanadas observadas en ella (Fig. 4).

En cuanto a los diámetros celulares se observa que en las células protrusivas son ligeramente superiores a los observados en las lisas. Además, la menor diferencia entre diá-

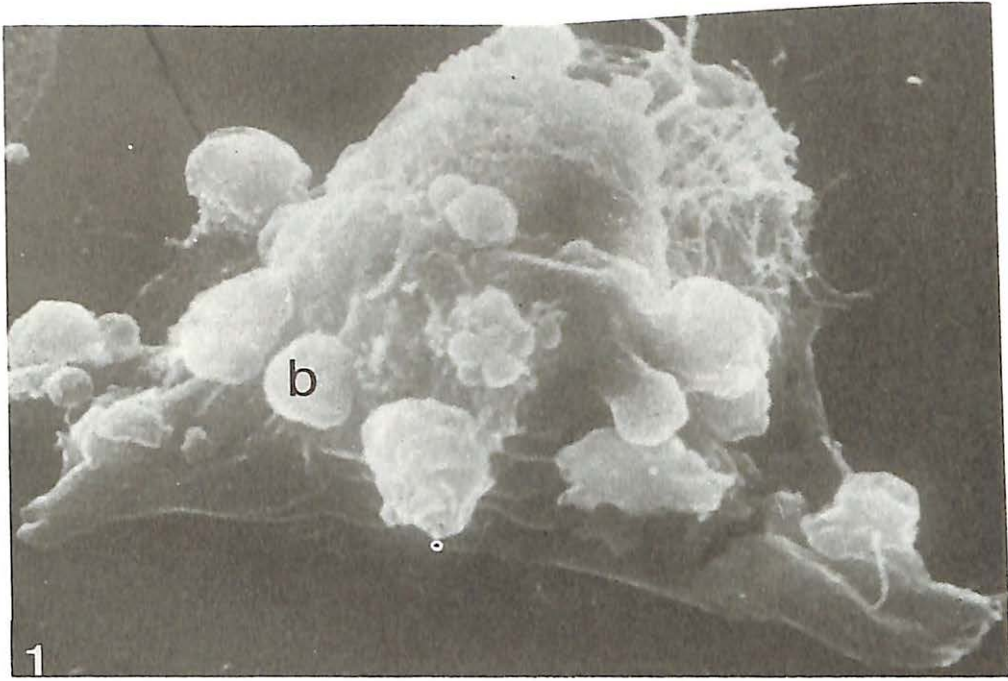


Fig. 1.- Célula protrusiva, esférica, con numerosos «blebs» (b) en su superficie (***) observada a las 12 horas de cultivo. 10560 x.

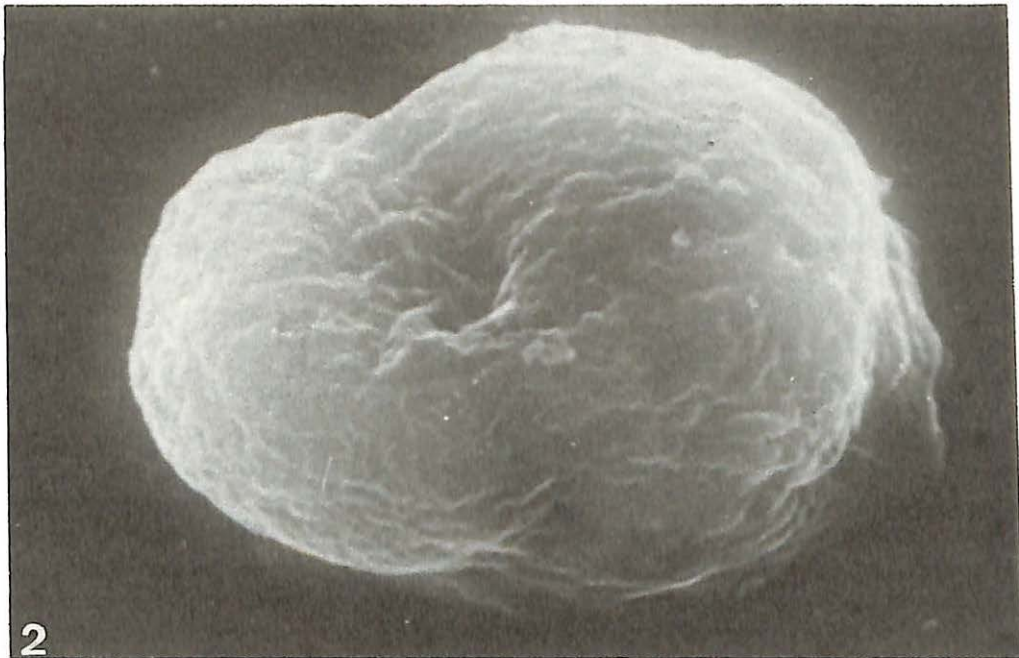


Fig. 2.- Célula lisa, esférica, desprovista de todo tipo de actividad vesicular en su superficie (*), después de 24 horas de cultivo. 11440 x.

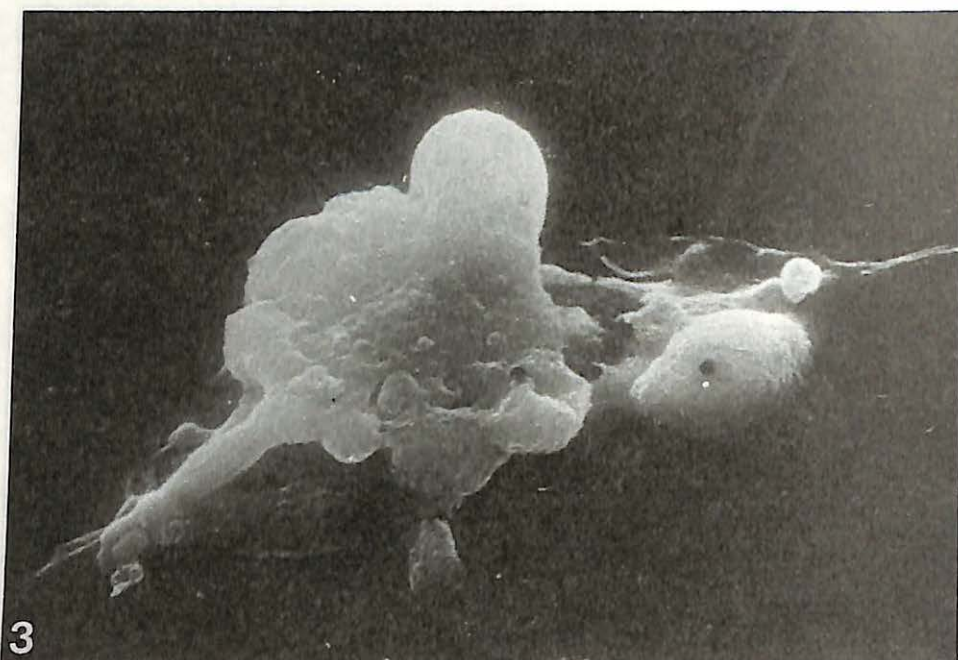


Fig. 3.- Célula protrusiva semiplanada con una actividad protrusiva intermedia (***) a las 24 horas de cultivo. 6200 x.

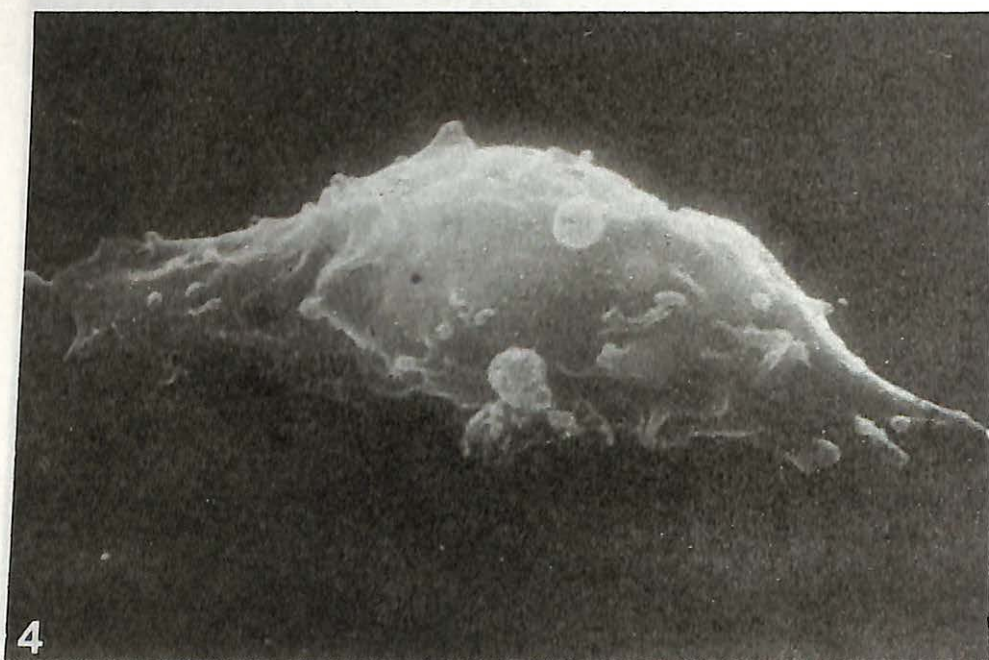


Fig. 4.- Célula lisa semiplanada del estadio 6 a las 12 horas de cultivo. 9900 x.

metros que presentan las células lisas indica una mayor esfericidad, tanto en los cultivos de 12 como en los de 24 horas, si bien en estos últimos se observa un aumento generalizado de los diámetros.

– *Estadio 8:* A las 24 horas de cultivo el porcentaje de células de cada subpoblación era similar, con un ligero predominio de las protrusivas. Sin embargo a las 12 horas se observó un considerable predominio de las células protrusivas sobre las lisas (3:1).

La tendencia a la esfericidad es muy marcada en todos los casos salvo en un 26 % de las protrusivas a las 12 horas, las cuales aparecen semiaplanadas sobre el sustrato.

La morfología superficial de las células de cada subpoblación se corresponde con su denominación, aunque en ambas subpoblaciones se podían encontrar algunas células con morfología intermedia (protrusivas con pocas protrusiones o lisas pero con la presencia de algunas ampollas).

Los diámetros celulares son muy similares a los observados en el estadio 6, siendo mayores en las células protrusivas que en las lisas y en los cultivos de 24 horas que en los de 12 horas.

– *Estadio 10:* En el primer período de cultivo (12 horas) el predominio corresponde a las células lisas, diferencia que se acentúa más en los cultivos de 24 horas, en los que por cada célula protrusiva aparecen dos lisas. La tendencia a la esfericidad sigue siendo muy marcada, excepto en un pequeño porcentaje de células protrusivas ligeramente semiaplanadas.

La morfología superficial de las células es muy similar a la observada en el estadio anterior, al igual que los diámetros mayor y menor, los cuales también se incrementan ligeramente a las 24 horas.

– *Estadio 12:* Tanto a las 12 como a las 24 horas de cultivo se observó una proporción aproximada 2:1 de células lisas y protrusivas respectivamente.

La totalidad de las células lisas se presentaban esféricas, mientras que en ambos períodos de cultivo aparecían porcentajes ligeramente inferiores al 10 % de células protrusivas semiaplanadas. Pocas variaciones se presentaron en cuanto a la morfología superficial respecto a los anteriores estadios, apareciendo unos porcentajes considerables de células protrusivas de actividad intermedia.

Los diámetros celulares presentan valores similares a los observados en estadios anteriores.

DISCUSION

En todos los cultivos de células neuroectodérmicas se apreciaron dos subpoblaciones bien diferenciadas por la morfología de superficie, células protrusivas y células lisas, denominadas así atendiendo a la característica más notoria de la superficie celular. Aunque las células lisas se caracterizaban por presentar una superficie celular con una escasa o, más frecuentemente, nula actividad protrusiva, el otro tipo de células sí presentan proyecciones celulares tales como filopodios, lamelipodios y/o pseudópodos^{3,22}. En cuanto a las células protrusivas, no debemos descartar la posibilidad de que alguna de

TABLA I

Características morfológicas de las células neuroectodérmicas de los cuatro estadios considerados. Las subpoblaciones celulares protrusivas y lisas se indican mediante una P y una L respectivamente. Los diámetros celulares se presentan como valores medios, en micrómetros y con la respectiva desviación estandar (d.e.). El resto de las características están representadas en valores porcentuales

Estadio	6						8						10						12							
	12		24		40		60		80		100		120		140		160		180		200		240		300	
	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L
Horas de cultivo	12		24		40		60		80		100		120		140		160		180		200		240		300	
Subpoblación celular	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L
Porcentaje celular	50	50	60	40	40	76	24	24	55	45	40	60	31	69	39	61	35	65								
Forma aparente																										
Células aplanadas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Células semiaplanadas	13	15	4	-	26	-	-	-	-	10	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	9	100	
Células esféricas	87	89	96	100	74	100	100	100	100	90	100	100	100	100	92	100	100	91	100							
Morfología superficial																										
*	100	-	-	95	-	96	-	98	-	100	-	100	-	100	-	97	-	100								
**	7	-	14	5	11	4	22	2	25	-	24	3	36	-												
***	93	-	86	-	89	-	78	-	75	-	76	-	64	-												
Diámetros celulares(D)																										
D mayor (µm)	11.2	7.6	14.5	10.9	11.6	8.7	12.1	10.6	10.3	8.1	13.7	10.6	10.9	8.0	12.2	10.4										
(d.e.)	(2.7)	(1.4)	(3.1)	(3.3)	(2.5)	(1.3)	(2.3)	(3.4)	(2.3)	(1.3)	(3.9)	(2.8)	(2.4)	(1.0)	(2.3)	(2.2)										
D menor (µm)	8.6	6.1	10.3	8.9	8.6	6.7	9.2	8.6	7.4	7.1	9.3	8.8	7.9	6.8	8.8	8.0										
(d.e.)	(2.0)	(1.1)	(2.0)	(2.8)	(1.9)	(1.0)	(2.0)	(2.8)	(1.8)	(1.0)	(2.2)	(2.0)	(1.6)	(0.9)	(1.9)	(2.0)										

ellas puedan ser fagocitos, ya que durante la neurulación existen importantes áreas de muerte celular y las células neuroectodérmicas pueden comportarse como fagocitos no profesionales.

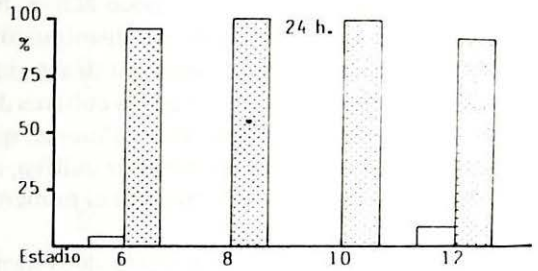
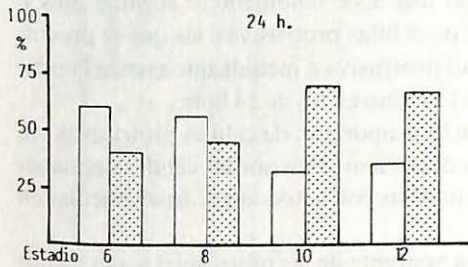
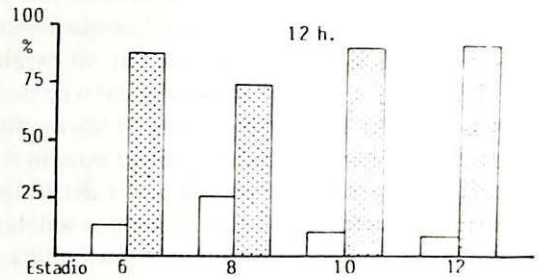
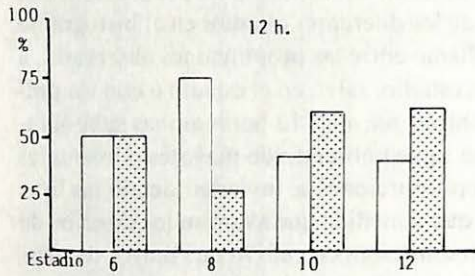
Desde un punto de vista evolutivo se puede apreciar cómo varían las proporciones de células de cada una de las dos subpoblaciones de los diferentes estadios en el histograma 1. Así, se puede comprobar que hay un paralelismo entre las proporciones observadas a las 12 horas y a las 24 horas de cultivo en cada estadio, salvo en el estadio 6 con un predominio de las protrusivas a las 24 horas, mientras que a las 12 horas ambas subpoblaciones presentan en un 50 %. En el estadio 8 se siguen observando mayores porcentajes de células protrusivas, pero a partir del 10 las proporciones se invierten siendo las lisas las predominantes. Así pues podemos señalar que a medida que avanzan los estadios de la neurulación las células neuroectodérmicas manifiestan en cultivo una mayor tendencia a presentar una superficie poco activa, más lisa. Este fenómeno se acentúa más si consideramos que además de esa disminución de células protrusivas, las que se presentan como tales también disminuyen su actividad protrusiva a medida que avanza la neurulación (histograma 4) tanto en los cultivos de 12 como en los de 24 horas.

Por otra parte se observó, generalmente, que la proporción de células protrusivas era menor a las 24 que a las 12 horas de cultivo, es decir, a medida que las células permanecen más horas en cultivo disminuye el número de ellas con actividad de tipo vesicular en su superficie.

No se apreció una clara variación de la forma aparente de las protrusivas y aún menos en cuanto a la de las lisas (histograma 2 y 3), las cuales prácticamente en todos los casos considerados se presentan tendiendo a la esfericidad. Esta forma aparente concuerda con las observaciones realizadas por otros autores^{14, 19, 28} sobre células ectodérmicas y neuroectodérmicas de anfibios, las cuales aparecen en cultivo con una forma esférica. Una de las características principales de las células epiteliales aisladas es que tienden a redondearse y perder la orientación, no extendiéndose sobre el sustrato y sufriendo una vigorosa vesiculación^{2, 20, 31}. Estos hechos se manifiestan claramente en las células neuroectodérmicas aquí estudiadas que aparecen redondeadas, no verificándose en ellas un proceso de expansión sobre el sustrato.

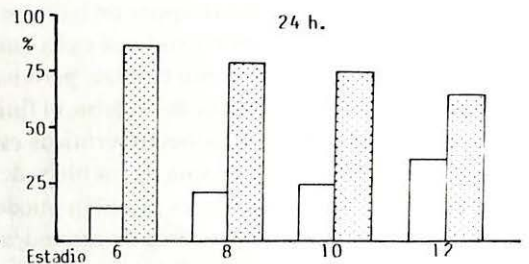
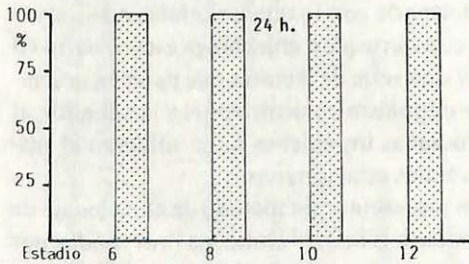
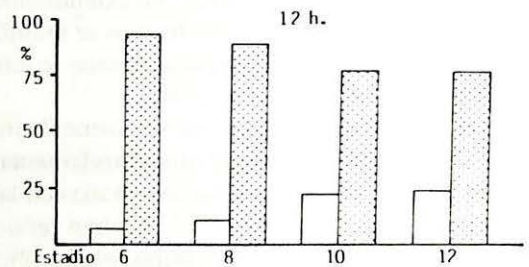
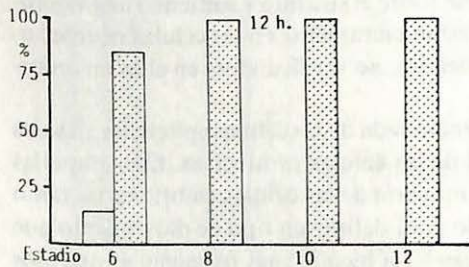
Otra de las características anteriormente mencionada de las células epiteliales aisladas es la vesiculación, característica fundamental de las células protrusivas. Esas ampollas celulares o «blebs» han sido observadas en la mayoría de las células embrionarias tanto «in vivo» como «in vitro»^{5, 17, 30} y han servido para definir un tipo de movimiento que presentan ciertos tipos de células: el «blebbing»³², si bien lo más frecuente es que esos «blebs» se retraigan poco después de haberse formado con lo que las células no se mueven. No se conoce con exactitud qué es lo que convierte a un «blebbing» estacionario en uno que provoca movimiento celular, pero hay una serie de factores que parecen cruciales, como son la persistencia del «bleb», el flujo citoplásmico dentro de él y la adhesión al sustrato. En las células neuroectodérmicas estudiadas los «blebs» no se adhieren al sustrato, característica ésta propia de los blebs de células estacionarias²⁹.

Estas estructuras vesiculares también pueden representar un método de almacenaje de membrana¹, tanto ante procesos de redondeamiento celular¹⁰ como los provocados por inducciones experimentales (tripsinización), como ante procesos de rápida división celular¹⁵, lo cual parece tener más consistencia en nuestro caso, ya que estas células procedentes de embriones en las primeras fases de desarrollo muestran una gran capacidad



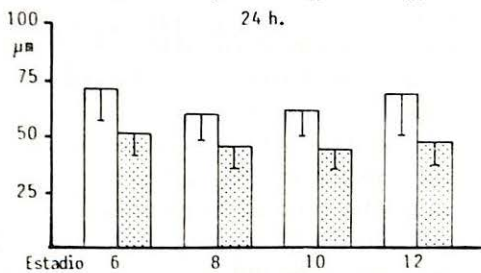
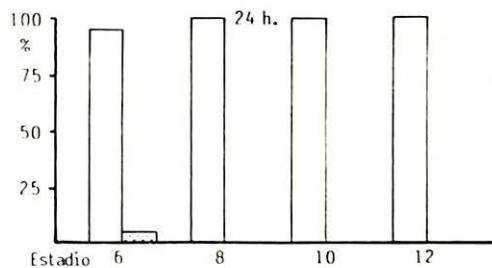
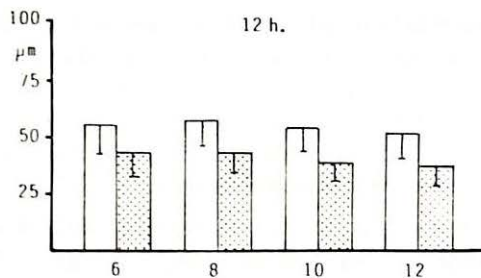
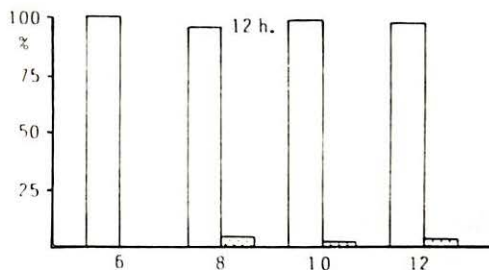
Histograma nº 1.- Proporciones de células de cada subpoblación, protrusivas y lisas, presentes en los cultivos de células neuroectodérmicas. □ = Protrusivas, ▨ = Lisas.

Histograma nº 2.- Porcentajes de tipos de forma aparente presentes en las células neuroectodérmicas protrusivas. □ = Semiaplanadas, ▨ = Esfericas.



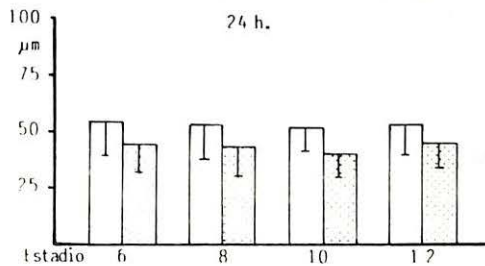
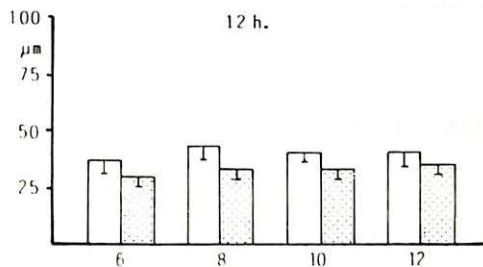
Histograma nº 3.- Porcentajes de tipos de forma aparente presentes en las células neuroectodérmicas lisas. □ = Semiaplanadas, ▨ = Esfericas.

Histograma nº 4.- Porcentajes de tipos de morfología superficial presentes en las células neuroectodérmicas protrusivas. □ = **, ▨ = ***.



Histograma nº 5.- Porcentajes de tipos de morfología superficial presentes en las células neuroectodérmicas lisas.
 □ - * ; ▨ - **.

Histograma nº 6.- Diámetros mayor y menor de las células neuroectodérmicas protrusivas. La barra vertical representa la desviación estandar. □ - Diámetro mayor, ▨ - Diámetro menor.



Histograma nº 7.- Diámetros mayor y menor de las células neuroectodérmicas lisas. La barra vertical representa la desviación estandar. □ - Diámetro mayor, ▨ - Diámetro menor.

proliferativa¹⁸. No obstante, hay que tener en cuenta que los componentes de la matriz extracelular han sido objeto de una especial atención como factores que puedan ejercer influencias directas sobre la actividad de la superficie celular. En este sentido la presencia de la lámina basal parece jugar un papel importante en la estabilización de la superficie celular ya que la extracción de esta lámina¹⁶ o la pérdida del contacto de las células con dicha capa por la disociación¹³ provoca la aparición de «blebs». En cualquier caso tanto para la formación de estas vesículas¹⁶, como para la adquisición y/o mantenimiento de la forma celular de las células embrionarias⁶, es el citoesqueleto el elemento que juega un papel fundamental.

Por otra parte es necesario destacar la evolución que sufre la presencia de «blebs» así como la de las propias células protrusivas a medida que éstas proceden de estadios más avanzados, la cual debe estar relacionada con los movimientos morfogenéticos que ocurren en el embrión, al igual que lo relacionan LE BLANC y BRICK¹⁹ en las células ectodérmicas de anfibio en cultivo. En este sentido hemos observado cómo a medida que la neurulación avanza se produce en los correspondientes cultivos una disminución tanto del número de células protrusivas (histograma 1) como de la actividad protrusiva dentro de esta subpoblación (histograma 4).

Las células protrusivas presentaban siempre valores más altos tanto del diámetro mayor como del menor que las células lisas (histograma 6 y 7). Además, por regla general, se observó que ambos diámetros experimentaban en ambas subpoblaciones un aumento en los cultivos de 24 horas con respecto a los de 12. La diferencia entre los diámetros celulares en ambas subpoblaciones a favor de las protrusivas se explica en virtud de que las propias vesiculaciones provocan este aumento de los diámetros. En los cultivos de 24 horas esta diferencia disminuye ya que aunque los diámetros aumentan en ambas subpoblaciones, en las protrusivas este aumento no se acentúa tanto debido a que a la par hay una reducción de la actividad protrusiva de su superficie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a don José M.^a Maniega por su asistencia técnica y colaboración tanto en la realización de los cultivos celulares como en la microscopía electrónica de barrido.

RESUMEN

Se analizan mediante microscopía electrónica de barrido algunas de las características morfológicas que presentan las células neuroectodérmicas de pollo en cultivo y su evolución durante la neurulación. Las células se clasifican en protrusivas y lisas y para cada una de estas subpoblaciones se estudian la actividad protrusiva de su superficie, su forma

y los diámetros. A medida que avanza la neurulación las células muestran en cultivo una menor actividad protrusiva (disminuye tanto el porcentaje de células protrusivas como la actividad de su superficie). Los diámetros celulares permanecen muy constantes y son mayores en las protrusivas que en las lisas, y a las 24 horas que a las 12 horas de cultivo. A los «blebs» presentes en las células protrusivas se les atribuye una función de reserva de membrana.

A MORPHOLOGICAL STUDY BY MEANS OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF CHICK EMBRYO NEUROECTODERM CELLS IN VITRO DURING NEURULATION

SUMMARY

Some morphological characteristics of chick neuroectoderm cells in culture and their evolution during neurulation have been analysed by means of scanning electron microscopy. Cells are classified as protrusive and featureless. The protrusive activity of cellular surface, shape and cell diameters are studied for each subpopulation. The cells show in culture a minor protrusive activity (it decreases both protrusive cell percentage and surface activity) as the neurulation proceeds. Diameters are major in protrusive cells than in featureless cells as well as in cultures of 24 h than in 12 h. Cellular diameters remain very constant at all stages. A function of membrane reserve is attributed to the blebs that are present in protrusive cells.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ARIAS, M.; CHAMORRO, C. A.; GARCIA, C.; RAMOS, J.; FERNANDEZ, J. G. y VILLAR, J. M. (1984).- Características de la superficie celular en reagregados de ectoblasto neurogénico de embrión de pollo. *An. Fac. Vet. León*, 30: 51-60.
- 2) BELLAIRS, R.; SANDERS, R. J. y PORTCH, P. A. (1978).- In vitro studies on the development of neural and ectodermal cells from young chick embryos. *Zoon*, 6:39-50.
- 3) CHAMORRO, C. A.; PAZ, P.; FERNANDEZ, J. G.; FERNANDEZ, M. y VILLAR, J. (1984).- Estudio de las células neuroectodérmicas de embrión de pollo en cultivo en monocapa: características morfológicas y fijación al sustrato. *An. Fac. Vet. León*, 30: 27-39.
- 4) CHAMORRO, C. A.; FERNANDEZ, J. G.; PAZ, P. y VILLAR, J. M. (1985).- A method for morphological characterization of cultured cells. Features of mesoderm cells «in vitro». Abstracts of the first Congress of the Spanish Society for Cell Biology. R.B.C.: 158.
- 5) CHAMORRO, C. A. (1985).- La membrana celular y su papel morfogénico 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, Universidad de León.
- 6) CHAMORRO, C. A.; PAZ, P.; FERNANDEZ, J. G. y VILLAR, J. M. (1986).- Effects of cytochalasin B on cell to cell adhesion and cellular shape of chick embryo mesoderm cells «in vitro» *J. Anat.*, 147:201-205.

- 7) CHAMORRO, C. A.; PAZ, P.; FERNANDEZ, J. G.; FERNANDEZ, M. y VILLAR, J. M. (1986).— A morphological study of the chick embryo head mesoderm cells in culture. *Acta Embryol. Morphol. Exper. n.s.* (en prensa).
- 8) COLE, R. J. (1971).— Preparation of primary cell cultures from preimplantation embryos. En: DANIEL, J. C. (ed.). *Methods in mammalian embryology*. W. H. FREEMAN and Co., San Francisco, pp. 551-521.
- 9) ENGLAND, M. (1981).— Applications of the SEM to the analysis of morphogenetic events. *J. Microsc.*, 123: 133-146.
- 10) ERICKSON, C. A.; TRINKAUS, J. P. (1976).— Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.*, 99: 375-384.
- 11) HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. (1951).— A series of normal stages in the development of the chick embryos. *J. Morph.*, 88: 49-92.
- 12) HARRISON, C. J. y ALLEN, T. D. (1979).— Cell surface morphology after trypsinization depends on initial cell shape. *Differentiation*, 15: 61-66.
- 13) HAY, E. D. (1977).— Interaction between the cell surface and extracellular matrix in corneal development. En: LASH, J. W. and BURGER, M. M. (eds.). *Cell and tissue interactions*, Raven Press, New York, pp: 115-137.
- 14) JUMAH, H. y STANISSTREET, M. (1982).— The effect of calcium ion perturbation on the morphology of cells isolated from early embryos of *Xenopus laevis*. *Acta Embryol. Morphol. Exper. n.s.*, 3: 155-171.
- 15) KLIKA, E. y JELINEK R. (1971).— «Glas-bell-like» formations as modified cellular junctions in the developing neural tube and ectoderm of the chick embryo. *Folia Morph. (Praha)*, 19: 137-146.
- 16) KOMAZAKI, S. (1982).— Morphological changes of the inner surface of the blastocoelic wall before and during gastrulation in the newt, *Cynops pyrogaster*. *Develop. Growth Differ.*, 24: 491-499.
- 17) KUWANA, T. y FUJIMOTO, T., (1984).— Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the embryonic chick blood «in vitro». *Anat. Rec.*, 209: 337-343.
- 18) LANGMAN, J.; GUERRANT, R. L. y FREEMAN, B. G. (1966).— Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *J. Comp. Neurol.*, 127: 359-412.
- 19) LEBLANC, J. y BRICK, I. (1981).— Morphologic aspects of adhesion and spreading behaviour of amphibian blastula and gastrula cells. *J. Emb. exp. Morph.*, 61: 145-163.
- 20) MIDDLETON, C. A. (1976).— Contact-induced spreading is a new phenomenon depending on cell-cell contact. *Nature*, 259: 311-313.
- 21) MOSCONA A. (1961): Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells. *Exp. Cell Res.*, 22: 455-475.
- 22) PAZ, P.; CHAMORRO, C.; FERNANDEZ, J. G.; FERNANDEZ, M. y VILLAR, J. M. (1984).— Adhesive and locomotive behaviour of chick embryo cells (stage 12) grown on plastic substratum. *Actas del Congreso Ibérico de Microscopía Electrónica*: 89.
- 23) PAZ, P.; ZAPATA, A.; FERNANDEZ, J. G.; CHAMORRO, C. A. y VILLAR, J. M. (1985).— Evidence of non-early ultrastructural regionalization in the neural epithelium of the chick by stereological methods. *Acta Anat.* 124: 227-233.
- 24) PAZ, P.; FERNANDEZ, M.; CHAMORRO, C. A.; FERNANDEZ, J. G. y VILLAR, J. M. (1986).— A stereological study of the early ultrastructural differentiation of chick embryo neuroepithelial cells during neurulation. *Acta Anat. (en prensa)*.
- 25) RUTISHAUSER, V.; THIERY, J. P.; BLACKENBURY, R. y EDELMAN, G. M. (1978).— Adhesion among neural cells of the chick embryos. III. Relationships of the surface molecule CAM to cell adhesion and the development of histotypic patterns. *J. Cell Biol.*, 79: 371-381.
- 26) SCHOENWOLF, G. C. (1982).— On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system. En: *Scanning Electron Microscopy*. II TRI. Chicago, pp: 289-308.
- 27) SOLURSH, M. y REVEL, J. P. (1978).— A scanning electron microscope study of cell shape and appendages in the primitive streak region of the rat and chick embryo. *Differentiation*, 11: 185-190.
- 28) STANISSTREET, M. y JUMAH, H. (1982).— The effects of colchicine, vinblastine and cytochalasin B on the scanning electron microscopical appearance and aggregation of cells isolated from *Xenopus* early embryos. *Acta Embryol. Morph. Exper. n.s.*, 3: 3-13.
- 29) TRINKAUS, J. P. (1973 a).— Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages. *Develop. Biol.*, 30: 68-103.
- 30) TRINKAUS, J. P. (1973 b).— *Modes of locomotion «in vitro»*. Ciba Found. Symp. on Locomotion of tissue cells, 14 (new series), pp: 233-249.
- 31) TRINKAUS, J. P. (1976).— On the mechanism of metazoan cell movements. En POSTE, G. y NICOLSON, G. L.: *The cell surface in animal embryogenesis and development. Cell surface reviews.*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, Vol. 1: 225-239.
- 32) TRINKAUS, J. P. y ERICKSON, C. A. (1983).— Protrusive activity, mode and rate of locomotion, and pattern of adhesion of *Fundulus* deep cells during gastrulation. *J. Exp. Zool.*, 228: 41-70.