

CARACTERISTICAS DE LA SUPERFICIE CELULAR EN REAGREGADOS DE ECTOBLASTO NEUROGENICO DE EMBRION DE POLLO

*Por M. Arias
C. Chamorro
C. García
J. Ramos
J. G. Fernández
J. M. Villar*

INTRODUCCION

La microscopía electrónica de barrido (SEM) constituye una valiosa técnica para el estudio de los cambios que se producen en la superficie celular durante la morfogénesis^{28, 1, 13, 8, 26} y en las células embrionarias cuando se cultivan «in vitro»^{9, 25}. El SEM permite asimismo el análisis de las interacciones de la superficie celular con un mínimo de distorsión celular¹⁶, evitando, en los estudios morfológicos, el problema de muestreo que presenta el microscopio electrónico de transmisión (TEM), y revelando características de la superficie celular, no detectables de otro modo, así como la composición de pequeñas poblaciones celulares.

Son numerosos los estudios de morfología celular realizados por esta técnica en el neuroectodermo de embrión de pollo, bien en blastodiscos completos^{7, 3, 12, 15, 19} o en cultivos monocapa de células disociadas^{2, 4, 5}. Sin embargo, existe una relativa falta de estudios en reagregados de células ectodérmicas, de embrión de pollo, con esta técnica.

Los resultados obtenidos^{22, 23}, analizando reagregados de células cardiacas al SEM indican que éste es un valioso instrumento en el estudio de la agregación celular homo y heterotípica. Debido a que en los reagregados la diferenciación celular continúa hasta estadios avanzados, estas recombinaciones celulares proporcionan importantes sistemas de cultivo para consideraciones de adhesión intercelular y comportamiento celular cooperativo, que frecuentemente no pueden ser estudiadas

en cultivos en monocapa y que sin embargo, son esenciales para la diferenciación celular típica^{14, 20, 21, 18}.

En el presente trabajo el microscopio electrónico de barrido ha sido utilizado para estudiar el comportamiento social de las células neurogénicas, atendiendo a los siguientes puntos: 1) proyecciones características de la superficie celular tales como microvillis, filopodios, lamelipodios, etc.; 2) características topográficas de las células neurales embrionarias, que permitan distinguirlas de otras células o de otros tipos de tejido; 3) cambios morfológicos asociados con los movimientos celulares.

MATERIAL Y METODOS

METODO DE CULTIVO

Se utilizaron embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) de estadio 5¹⁰, procediéndose mediante microdissección a la recogida del territorio neurogénico correspondiente a la placa neural^{25, 17}. La separación del componente ectodérmico de los fragmentos y su posterior disociación se realizó mediante la acción combinada de un tratamiento enzimático con tripsina durante 12-15 minutos a 38° C (Tripsina Difco 1:250 al 0,5% con un 3% de carboximetilcelulosa), seguido de un proceso mecánico por pipeteado.

a) Cultivo en medio líquido

Las células neuroectodérmicas se cultivaron en el medio de Eagle suplementado con 10% de suero equino y 0,06 ml de glutamina, al cual se le adicionan 100 U.I. de penicilina y 100 µg de estreptomycin por ml de medio. La suspensión celular se preparó sembrando $5-6 \times 10^5$ células por ml de medio y los cultivos fueron incubados en un agitador orbital (70 r.p.m.) a 37° C durante 24 horas.

b) Cultivo en medio sólido

Los agregados obtenidos se sometieron a un segundo cultivo en medio semisólido de WOLFF y HAFEN³², consistente en 7 partes de solución Bacto-Agar al 1% en líquido de Gey, 3 partes de solución Tirode y 3 partes de extracto embrionario de pollo de 9 días. La duración de este segundo cultivo fue de 3 días.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Los agregados obtenidos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato (0,1 M) durante 1 hora a 4° C. Después de una serie de tres lavados en el mismo tampón, las muestras se posfijaron con O₅O₄ al 1% en tampón fosfato (0,1 M) durante 1 hora a 4° C y se deshidrataron mediante series sucesivas de etanol. Posteriormente, los agregados se sumergieron en isoamiloacetato y se desecaron por

el método del punto crítico en un CPD 010 (Balzers), recubriéndose seguidamente con una capa de oro-paladio en un ION-SPUTTER (JFC-1100). La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35C a 20 Kv.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los agregados obtenidos se observaron al microscopio electrónico de barrido, con objeto de estudiar sus características morfológicas (forma, dimensiones, proyecciones celulares) así como las de las células que los componen (filopodios, lamelipodios, microvillis, proyecciones globulares o «blebs», puentes intercitoplasmáticos).

Nuestros resultados demuestran la formación de agregados con un tamaño medio aproximado de 350-400 μ de diámetro mayor y 240-300 μ de diámetro menor (fig. 1), de contorno circular o ligeramente ovalado, siendo la mayoría de ellos fundamentalmente aplanados.

El análisis de las características celulares se realiza en los agregados por la superficie que no ha estado en contacto con el sustrato sólido, observándose que estas células presentan una gran actividad protrusiva en su superficie celular, originando una amplia gama de proyecciones celulares.

En este sentido, hay que tener en cuenta que en el agregado existen poblaciones celulares que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular, lo cual juntamente con las condiciones de cultivo²¹, influye en la presencia de ciertas protrusiones en la superficie de las células.

Las células presentan un diámetro mayor de 9,8 μ ($\pm 1,4 \mu$), mostrando en su superficie abundantes microvillis, con un promedio de $3,1 \pm 1,2/\mu^2$ (fig. 2). Los filopodios son también muy numerosos, presentando una anchura que oscila entre 0,16 μ y 0,79 μ . Su longitud puede superar las 10 μ . Asimismo, se han observado en nuestros resultados la presencia de proyecciones globulares, en la superficie de un gran número de células con un diámetro aproximado de 1,5 μ . Por el contrario, los lamelipodios son escasos en estos agregados, si bien, las células más superficiales pueden utilizar a las inferiores como sustrato para su movimiento merced a la emisión de filopodios y proyecciones globulares²¹. También se aprecian algunos puentes intercitoplasmáticos conectando células en el agregado (fig. 3).

Los filopodios observados en las células «in vitro» creemos que pueden corresponderse con las proyecciones celulares observadas en las células ectodérmicas del blastodisco¹³ y se les puede atribuir una función de motilidad³¹.

La presencia y el incremento de «blebs» y filopodios en las células, ha sido correlacionado con los movimientos morfogénicos³⁰. La existencia de una gran cantidad de estas proyecciones en la mayoría de las células que integran los agregados analizados por nosotros, induce a pensar que el reconocimiento y la reordenación de las células neuroectodérmicas en los agregados, podrían estar relacionados con las microextensiones descritas, mediante las cuales las células realizarían el fenómeno de «sorting-out».

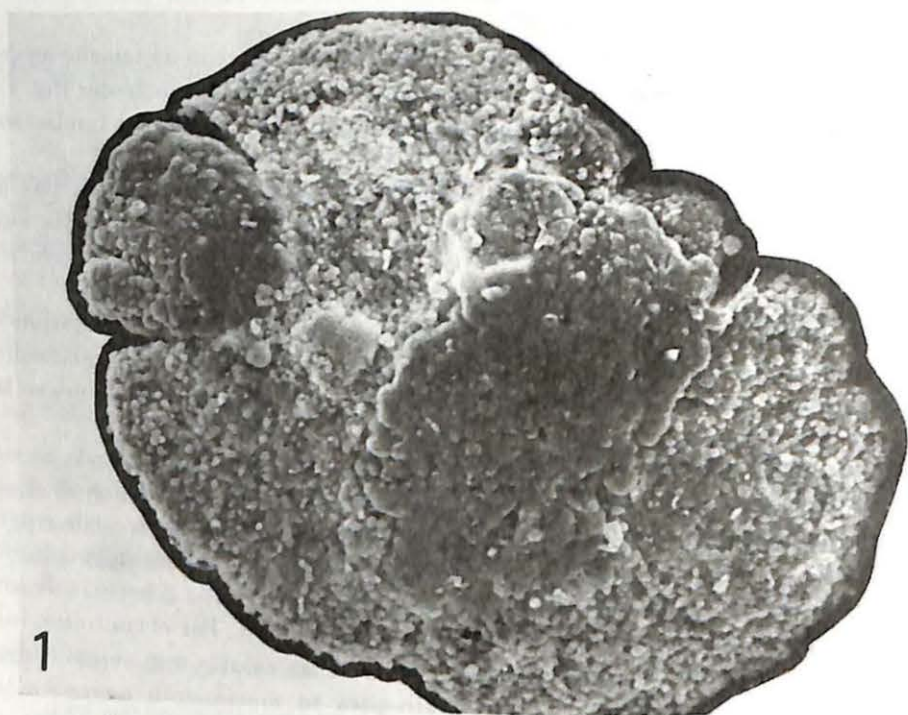


Figura 1.—Aspecto general de un reagrado de células neuroectodérmicas. 250 x.

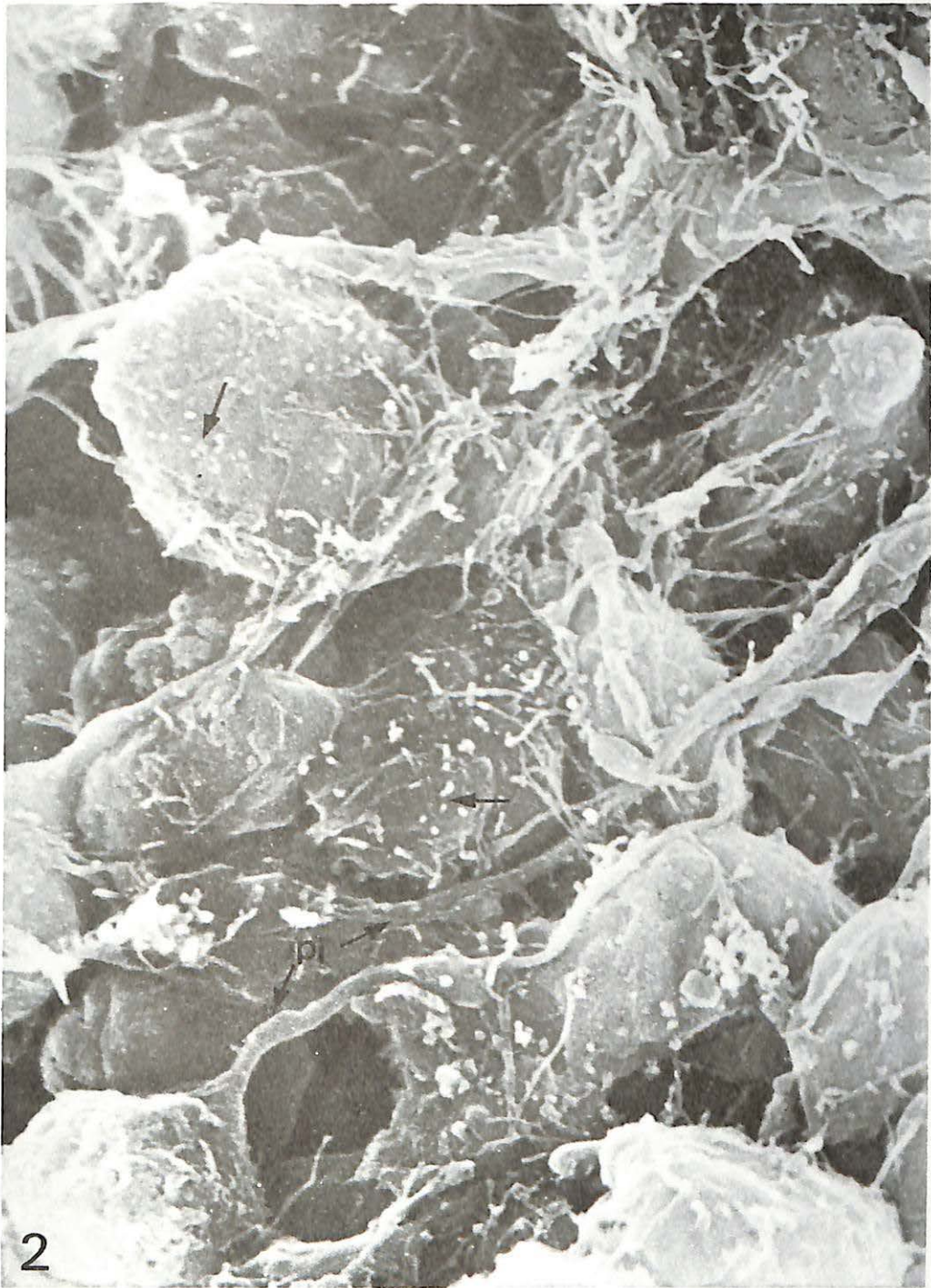


Figura 2.—Se observan microvillis (flechas) y puentes intercelulares (pi).

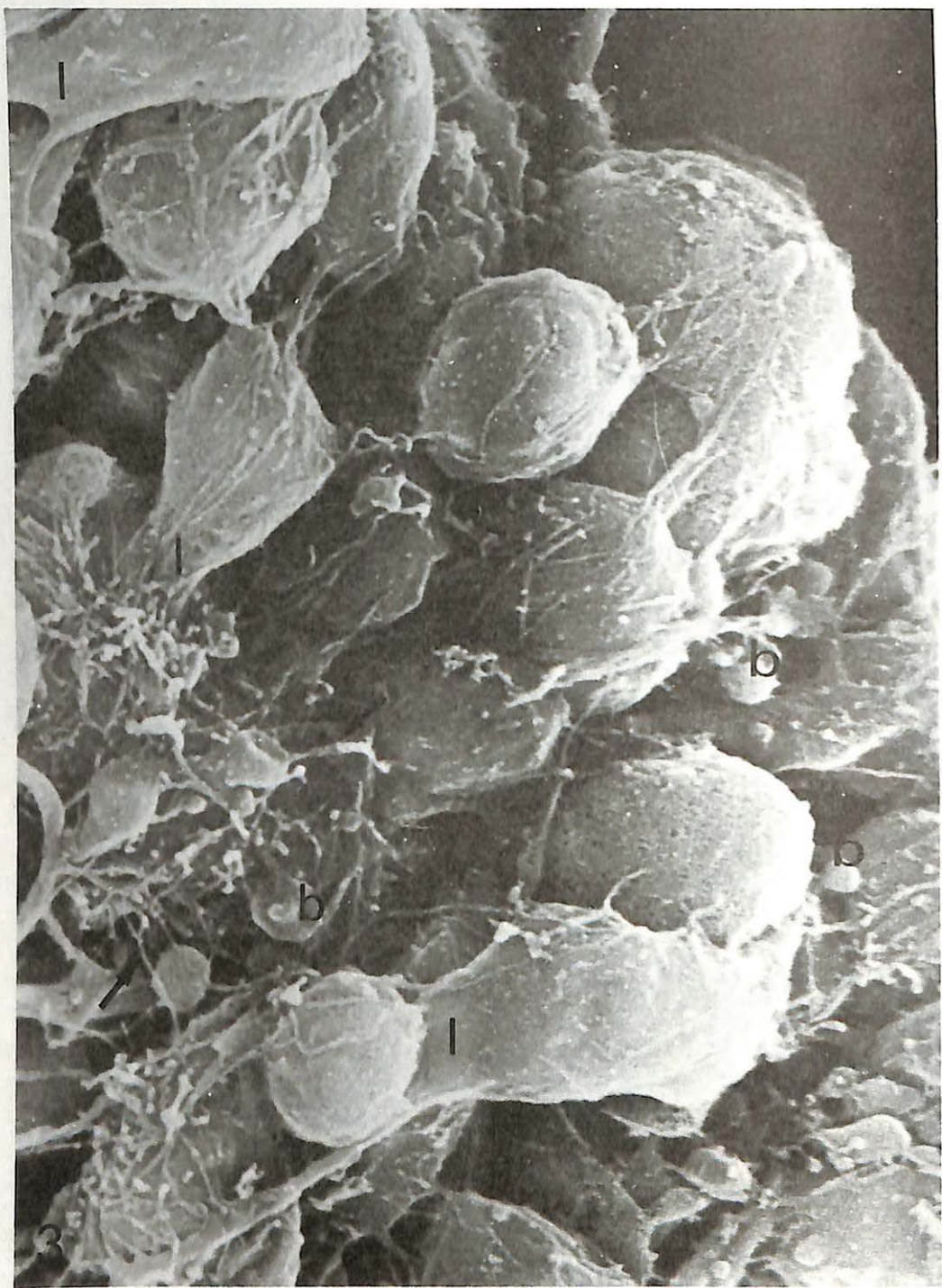


Figura 3.—Nótese la presencia de blebs (b). Filopodios (flechas). Lamelipodios (l).

En agregados de células cardíacas²⁴, se describe también la presencia de largas proyecciones citoplasmáticas de tipo microvilli. Sin embargo, éstas no parecen ser esenciales en la agregación celular cardíaca, ya que algunas células pueden aparentemente unirse sin estas microextensiones.

Los abundantes microvillis y «blebs», encontrados en la superficie de las células, pueden también representar una reserva de membrana¹¹ ante procesos de rápida división celular, lo cual, parece lógico en estos procesos de agregación a partir de células procedentes de embriones en las primeras fases del desarrollo, ya que dichas células muestran una gran actividad proliferativa, relacionada con su capacidad de diferenciación. Estas proyecciones les permitirían lograr una recuperación lo más rápida posible de su superficie celular después de los procesos de división.

El hecho de haber encontrado un escaso número de lamelipodios en las células, permite sugerir que la importancia de los mismos es mínima en estos procesos de agregación celular, en los cuales el papel predominante corresponde a los filopodios.

Por otra parte, la gran cohesividad que presentan estas células está en concordancia con lo ya descrito por otros autores para este mismo tipo celular, en embriones de distintas especies^{28, 6}.

RESUMEN

Se realiza un estudio mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) de las características morfológicas que presentan los reagregados de células neurogénicas de embrión de pollo de estadio 5.

Los resultados obtenidos demuestran la existencia en la superficie del reagregado de numerosas proyecciones celulares, que son interpretadas en relación con movimientos morfogénicos y fenómenos de agregación celular.

CHARACTERISTICS OF CELLULAR SURFACE IN NEUROGENIC ECTODERM REAGGREGATES FROM CHICK EMBRYO

SUMMARY

A study was made by scanning electron microscopy of the morphologic characteristics that neurogenic cells reaggregates from stage 5 chick embryo show.

The results obtained show the existence in the reaggregate surface of numerous cellular projections. They are interpreted in relation to morphogenetic movements and cellular aggregation process.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BANCROFT, M., y BELLAIRS, R. (1975).—The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). *Cell. Tiss. Res.*, **155**, 399-418.
- 2) BANCROFT, M., y BELLAIRS, R. (1976).—The development of the notochord in the chick embryo, studied by scanning and transmission electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, **35**, 383-401.
- 3) BELLAIRS, R. (1959).—The development of the nervous system in chick embryos studied by electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, **7**, 94-115.
- 4) BELLAIRS, R.; SANDERS, E. J., y PORTCH, P. A. (1978).—«In vitro studies on the development of neural and ectodermal cells from young chick embryos». *Zoom*, **6**, 39-50.
- 5) BELLAIRS, R.; SANDERS, R. J., y PORTCH, P. A. (1980).—Behavioural properties of chick somitic mesoderm and lateral plate when explanted «in vitro». *J. Embryol. exp. Morph.*, **56**, 1-22.
- 6) BRICK, I.; SCHAEFFER, B. E.; SCHAEFFER, H. E., y GENARO, J. F. Jr. (1974).—Electrokinetic properties and morphologic characteristics of amphibian gastrula cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **238**, 399-407.
- 7) DUNCAN, D. (1957).—Electron microscope study of the embryonic neural tube and notochord. *Texas Rep. Biol. Med.*, **15**, 367-377.
- 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) ENGLAND, M. A., y WAKELY, J. (1978).—Evidence for changes in cell shape from a 2-dimensional to a 3-dimensional substrate. *Experientia*, **35**, 664-665.
- 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) KLIKA, E., y JELINEK, R. (1971).—«Glass-bell-like» formations as modified cellular junctions in the developing neural tube and ectoderm of the chick embryo. *Folia Morphol. (Praha)*, **19**, 137-146.
- 12) MESSIER, P. (1969).—Effects of B-mercaptoethanol on the fine structure of the neural plate cells of the chick embryo. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **21**, 309-329.
- 13) MONROY, A.; BACCETTI, B., y DENIS-DONINI, S. (1976).—Morphological changes in the surface of the egg of *Xenopus laevis* in the course of development. III. Scanning electron microscopy of gastrulation. *Dev. Biol.*, **49**, 250-259.
- 14) MORRIS, J. E., y MOSCONA, A. A. (1971).—The induction of glutamine synthetase in cell aggregates of embryonic neural retina: correlations with differentiation and multicellular organization. *Dev. Biol.*, **25**, 420-444.
- 15) PORTCH, P. A., y BARSON, A. J. (1974).—Scanning electron microscopy of neurulation in the chick. *J. Anat.*, **117**, 341-350.
- 16) PORTER, K. R.; PRESCOTT, D., y FRYE, F. (1973).—Changes in surface morphology of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *J. Cell. Biol.*, **57**, 815-836.
- 17) RAO, B. R. (1968).—The appearance and extension of neural differentiation tendencies in the neuroectoderm of the early chick embryo. *Wilhelm Roux' Archiv.*, **160**, 187-236.
- 18) SACHS, H. G.; Mc DONALD, T. F., y DE HAAN, R. L. (1973).—Tetrodotoxin sensitivity of cultured embryonic heart cells depends on cell interactions. *J. Cell. Biol.*, **56**, 255-258.
- 19) SCHOENWOLF, G. C., y DELONGO, J. (1980).—Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *The Am. J. of Anat.*, **158**, 43-63.
- 20) SEEDS, N. W. (1971).—Biochemical differentiation in reaggregating brain cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 1858-1861.
- 21) SEEDS, N. W., y GILMAN, A. G. (1971).—Norepinephrine stimulated increase in cyclic AMP levels in developing mouse brain cell culture. *Science*, **174**, 292.
- 22) SCHOR, A. M.; SCHOR, S. L., y ALLEN, T. D. (1983).—Effects of culture conditions on the proliferation, morphology and migration of bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Sci.*, **62**, 267-285.
- 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. Biology*, **36**, 428-446.
- 24) SHIMADA, Y., y FISCHMAN, A. (1975).—Cardiac cell aggregation by scanning electron microscopy. En: *Developmental and physiological correlates of cardiac muscle*. M. Lieberman y T. Sano, Raven Press, New York, 81-100.
- 25) SPRATT, N. T. (1952).—Localization of the prospective neural plate in the early chick blastoderm. *J. Exptl. Zool.*, **120**, 109-130.
- 26) STANISSTREET, M., y SMITH, J. L. (1978).—Scanning electron microscopy of cells isolated from amphibian early embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **48**, 215-223.

- 27) STANISSIBELI, M.; WAKELY, J. y ENGLAND, M. A. (1980).—Scanning electron microscopy of wound healing in *Xenopus* and chicken embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **59**, 341-353.
- 28) STEINBERG, M. S. (1970).—Does differential adhesion govern self assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J. exp. Zool.*, **173**, 395-434.
- 29) TARIN, D. (1971).—Scanning electron microscopical studies of the embryonic surface during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J. Anat.*, **109**, 535-548.
- 30) TRINKAUS, J. P., y LENIZ, T. I. (1967).—Surface especializations of *Fundulus* cells and their relation to cell movements during gastrulation. *J. Cell Biol.*, **32**, 139-153.
- 31) 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.
- 32) WOLFE, E., y HAEFFEN, K. (1952).—Sur une methode de culture d'organes embryonnaires «in vitro». *Texas Rep. Biol. Med.*, **10**, 463-472.