

**DIFERENCIACION FUNCIONAL DE CARDIOMIOCITOS
DE EMBRION DE POLLO, EN AGREGADOS CELULARES.
INFLUENCIA DEL SUPLEMENTO SERICO**

*Por M. Arias
J. M. Villar y
C. García*

INTRODUCCION

Es un hecho demostrado que las células disociadas de tubos cardiacos ya diferenciados y funcionales, cultivadas en medios adecuados, son capaces de reagregarse formando conglomerados musculares que laten rítmicamente^{2, 13, 18, 10, 11, 26}).

Asimismo, sabemos²⁹, que las células del entomesoblasto de las áreas cardiogénicas de embrión de pollo son capaces, aisladas unas de otras y cultivadas, de adquirir la propiedad de contraerse rítmicamente, partiendo del estadio 4 y 5¹² en el que todavía no han manifestado signos de diferenciación.

La composición del medio parece influir sobre el comportamiento y mantenimiento de la contractilidad de células cardiacas de embrión de pollo en cultivo. Así¹, utilizando el medio de cultivo de Eagle, suplementado con suero fetal y/o extracto embrionario, se comprueba que, cuando este medio no se dializa, aumenta el número total de células Pas positivas (miocitos). En el estudio de la influencia de los medios de cultivo sobre los clones miogénicos de embrión de pollo, se ha podido observar²⁸, que enriqueciendo el medio con suero fetal bovino, se incrementa la capacidad proliferativa de las células.

Estudiando la acción de distintos medios condicionados, sobre la actividad contráctil de células cardiacas disociadas y cultivadas «in vitro»⁹, observan que algún factor intrínseco del medio relacionado con su composición puede actuar como represor de las contracciones de estas células.

En este trabajo pretendemos estudiar la acción de dos sueros (equino y fetal bovino), utilizados como factores de enriquecimiento del medio de cultivo, sobre la diferenciación funcional (contracciones) que son capaces de adquirir las célu-

las cardíacas cultivadas «in vitro», cuando proceden de estadios previos a la diferenciación.

MATERIAL Y METODOS

METODOS DE CULTIVO

Se realizan cultivos «in vitro» de células entomesoblásticas procedentes de las áreas cardiogénicas de embrión de pollo de estadio 5¹². La recogida de las áreas cardiogénicas se realiza dando dos cortes transversales paralelos, uno a nivel del final de la prolongación cefálica y otro 0,4-0,5 mm por detrás del módulo de Hensen, basándonos en la localización de dichas áreas^{6, 22, 23}. A continuación se procede a la extracción del entomesoblasto, para lo cual se utiliza tripsina Difco 1:250 al 2 % en una solución salina libre de cationes bivalentes, a la que se añade carboximetilcelulosa al 0,3 %, con el fin de proteger las membranas celulares³. El tratamiento se realiza a 37° C durante 12-15 minutos. A continuación se lavan los fragmentos en solución libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ y se procede a aspirar e impulsar cada uno de ellos a través de una pipeta de calibre ligeramente inferior al tamaño de los mismos. Tras varios ciclos, el ectoblasto se separa limpiamente del entomesoblasto.

a) Cultivo en medio líquido

Una vez realizada la separación celular mediante pipeteado enérgico²⁵, se cultivan en el medio de Eagle, suplementado en unos cultivos con el 10 % de suero equino y en otros con la misma cantidad de suero fetal bovino. En ambos casos el medio se complementa con 0,06 ml de glutamina, 100 U.I. de penicilina y 100 mg de estreptomina por ml de medio. La suspensión se prepara sembrando $5-6 \times 10^5$ células por ml. Los cultivos son 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 semi-sólido³⁰, consistente en siete partes de solución de Bacto-Agar al 1 % en líquido de GEY, tres partes de solución Tirode y tres partes de extracto embrionario de pollo de nueve días. La duración del cultivo puede prolongarse hasta siete días.

c) Eliminación de las proteínas del medio de cultivo

Como método de comprobación, eliminamos las proteínas presentes en el medio de cultivo⁸, mediante filtración con membrana de AMICON UM 05, que retiene las de peso molecular superior a 500.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Los agregados celulares se incluyeron en una matriz de bacto-agar al 2 %, para facilitar su manejo durante el procesado posterior⁷. Las piezas se someten a una primera fijación durante 30 minutos a 4° C con glutaraldehído al 2° en 0.1M buffer fosfato pH 7.4, y a una postfijación con tetróxido de osmio al 1 % en fosfato buffer durante 1 hora a 4° C. Después de la deshidratación con alcoholes y óxidos de propileno, las piezas se incluyeron en Epon 812¹⁶. Los cortes semifinos destinados a microscopía óptica (MO) se realizaron con espesores de 0.5-1 μ m, óptimos para la tinción con azul de toluidina¹. Los cortes ultrafinos correspondientes se contrastaron siguiendo la técnica de doble tinción (acetato de uranilo y citrato de plomo)⁷, examinados en un microscopio electrónico JEOL 100 CK operando a 60 Kv.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experiencias con suero equino

Las colonias obtenidas, a partir del entomesoblasto cardiogénico, en el medio líquido de Eagle suplementado con un suero equino y sometidas a un cultivo posterior en medio sólido diferenciaron amplias vesículas, detectables ya en los agregados formados en el medio líquido. En algunos casos prácticamente todo el reagregado era una vesícula provista de un pequeño pedículo. Algunas de estas vesículas se fijaron a las 24 horas de cultivo para su posterior estudio al M.O. y M.E., observándose que estaban limitadas por un endotelio nítido.

Transportadas al medio sólido, se formaron colonias grandes (1-1,5 mm de diámetro), con vesículas aparentes, preferentemente en la periferia de los reagregados (fig. 1), que comenzaron a contraerse en algunos casos a los dos días de cultivo, llegando a alcanzar diferenciación funcional 18 reagregados de un total de 30 (60 %) a los 3-4 días de cultivo.

Con la intención de comprobar si la ausencia de diferenciación funcional, observada en algunos reagregados, puede ser debida a alteraciones estructurales producidas en las células durante el proceso de cultivo (problemas de nutrición en el medio, hipoxia celular, etc...), se realizaron estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica.

En todos los casos se observó diferenciación de tejido cardíaco, sin encontrar diferencias entre las colonias que se contraían en el medio sólido y las que no lo hacían (figs. 2 y 3).

A los cuatro días de cultivo en dicho medio, las características más frecuentemente observadas en las células cardíacas diferenciadas en dichos reagregados fueron: gran cantidad de miofilamentos unidos de forma desordenada en diversas

direcciones, confluyendo generalmente hacia un esbozo de banda Z. que presenta forma redondeada (fig. 4). Otras veces se encuentran ordenados formando haces que se unen longitudinalmente por varias bandas Z. constituyendo así miofibrillas alineadas en una sola dirección. Es de destacar también la presencia de abundantes gránulos de glucógeno, bien dispuestos entre las miofibrillas, bien formando acúmulos característicos alrededor de gotas de lípidos (figs. 5 y 6).

Las células establecían contactos íntimos, destacando la presencia de numerosos desmosomas. Se apreciaron también en zonas de contacto intercelular discos intercalares complejos, hacia los cuales confluían haces de miofilamentos procedentes de mioblastos adyacentes.

Estas mismas características son descritas por diversos autores como típicas de las células cardiacas en diferenciación, tanto en el desarrollo «in ovo»^{15, 17, 20, 24}, como «in vitro»^{5, 21, 27, 31}.

En el mismo reagregado se observaron mioblastos en distintos grados de diferenciación, como ocurre también en el desarrollo normal¹⁸, lo cual indica que la diferenciación de estas células es un proceso continuo. Los mioblastos más jóvenes se caracterizaban por la ausencia de organización miofibrilar, presentando grupos de miofilamentos adoptando formas muy variadas (dispuestos en paralelo, cruzándose, etc.), pero sin organización aparente (fig. 7).

De todo lo anteriormente expuesto podemos deducir que la ausencia de diferenciación funcional encontrada en algunos cultivos no puede ser debida a una mayor o menor gradación en la diferenciación morfológica, o a fenómenos de degeneración celular, como demuestra el estudio al M.E. de los mismos, no habiéndose encontrado diferencias desde el punto de vista estructural entre los reagregados contractiles y los que no manifestaron contracciones.

Ciertos componentes del suero⁸ (posiblemente la porción gamma-globulina) pueden tener un efecto depresivo sobre la actividad contráctil de células cardiacas de embriones de 7 días cultivadas «in vitro». Por ello, pensamos que en nuestro caso la inhibición funcional observada en algunos reagregados se deba a algún factor extrínseco a las células, relacionado con el suero empleado para enriquecer el medio.

Experiencia con suero bovino

Las colonias obtenidas en el segundo tipo de cultivos, en los que se introdujo una única variante consistente en enriquecer el medio con suero fetal bovino, mostraron algunas diferencias desde el punto de vista morfológico y funcional en relación a anteriores datos. Los reagregados obtenidos tanto en el medio líquido como en el sólido, presentaban un aspecto totalmente compacto y macizo (fig. 8). En ningún caso se observaron contracciones, ni tampoco vesículas, a diferencia de lo que habíamos observado en el primer tipo de cultivos, pues estas últimas existían incluso en aquellos reagregados que no presentaban contracciones.

El estudio al M.E. demostró la diferenciación de tejido cardiaco con sus características propias, ya citadas anteriormente, en todos los reagregados.

Experiencia con suero bovino sin macromoléculas

Los resultados obtenidos fueron similares, desde el punto de vista funcional, a los descritos en el segundo tipo de cultivos ya que en ningún caso las colonias del medio sólido presentaron contracciones.

El estudio estructural de estos reagregados permitió observar mioblastos en avanzado grado de diferenciación, que establecían estrechos contactos, con numerosos desmosomas y discos intercalares. En el citoplasma celular destacaban miofibrillas intercalares. En el citoplasma celular destacaban miofibrillas largas orientadas en una sola dirección y bordeando periféricamente a los núcleos. En algunas ocasiones estaban interrumpidos a intervalos regulares por hasta 10 y 12 bandas Z. A ambos lados de esta última, llamaba la atención claramente la presencia de un disco I. Las mitocondrias (con crestas muy aparentes) y los gránulos de glucógeno eran muy abundantes.



Figura 1.—Reagregado de células entomesoblasticas procedentes de las áreas cardíacas cultivadas durante un día en medio líquido y cuatro días en medio sólido. Se aprecian vesículas muy notables en la periferia del reagregado. Diámetro aproximado: 1.5 mm.

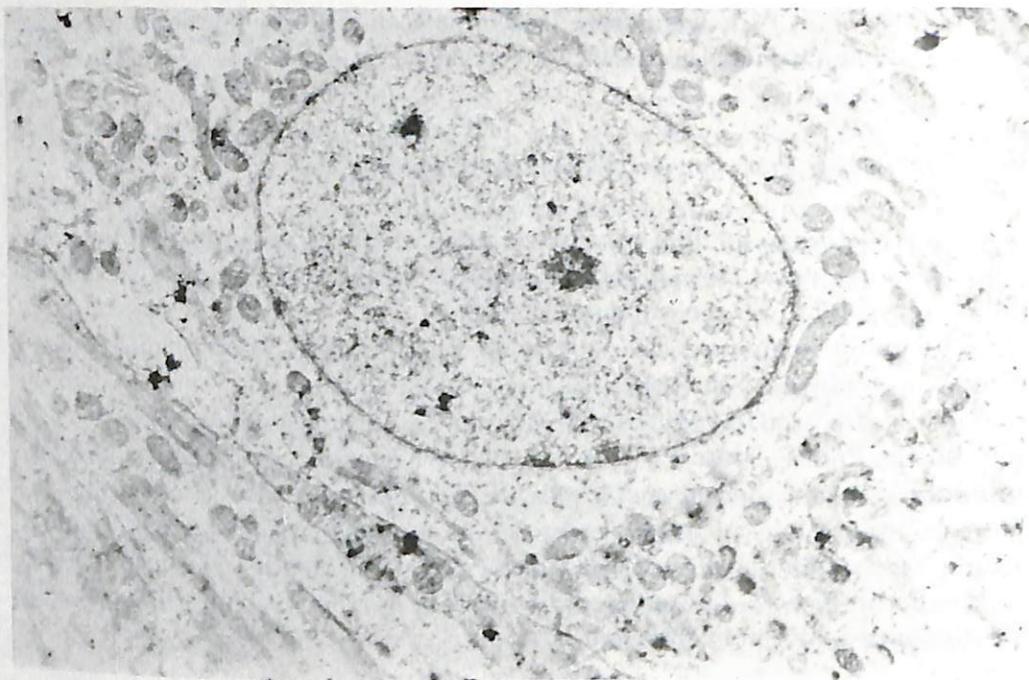


Figura 2.—Micrografía de un cardiomiocito con una estructura típica, diferenciada en una colonia que había manifestado contracciones a los tres tipos de cultivo en medio sólido. 7.600 X.

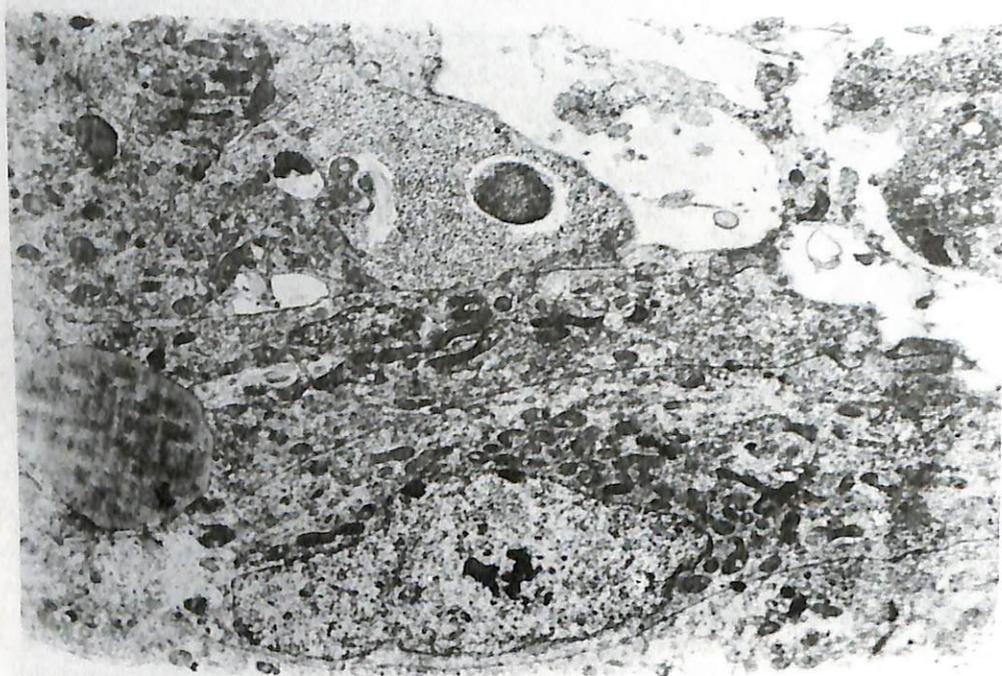


Figura 3.—Panorámica del tejido cardíaco diferenciado en un reagregado que no había manifestado contracciones. 5.500 X.

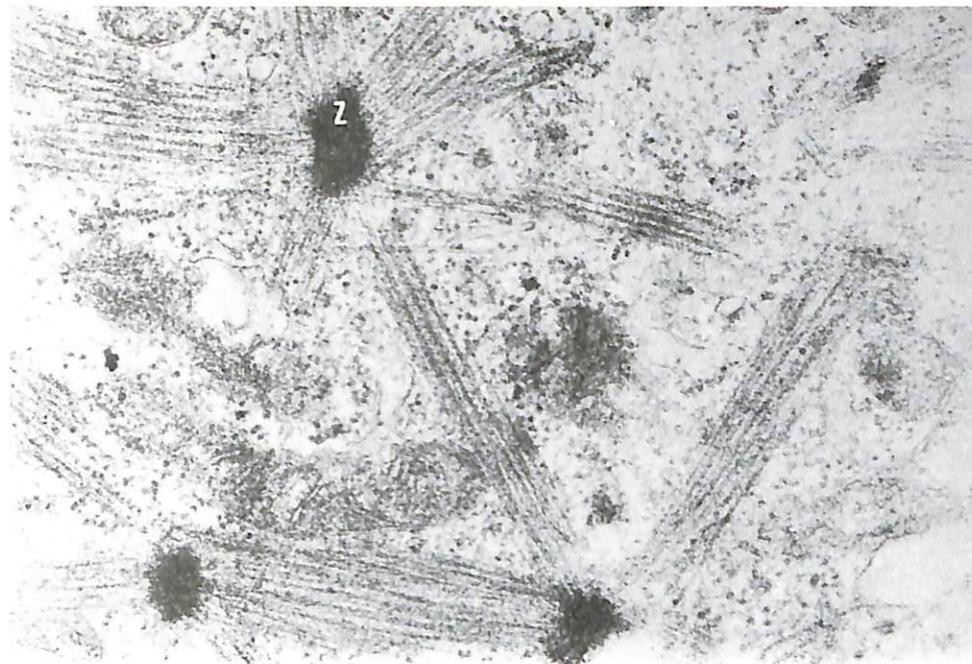


Figura 4.—Detalle de miofilamentos confluyendo hacia un esbozo de banda Z. 36.000 X.

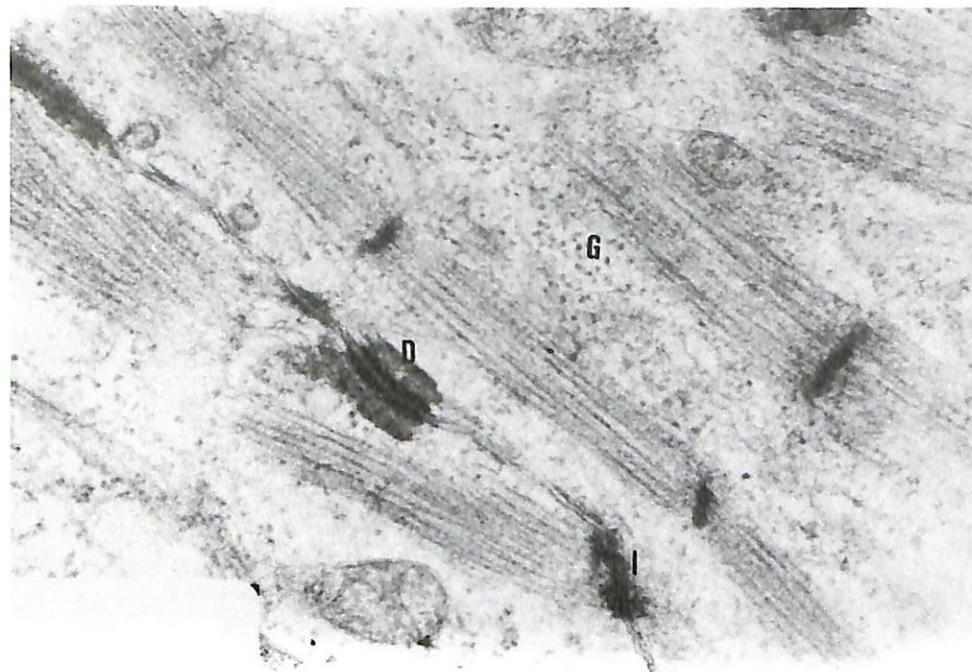


Figura 5.—Micrografía de miofibrillas con varios sarcómeros. Nótese la presencia de gránulos de glucógeno (G) entre las miofibrillas. Se aprecia también un desmosoma (D) y un futuro disco intercalar (I). 30.000 X.

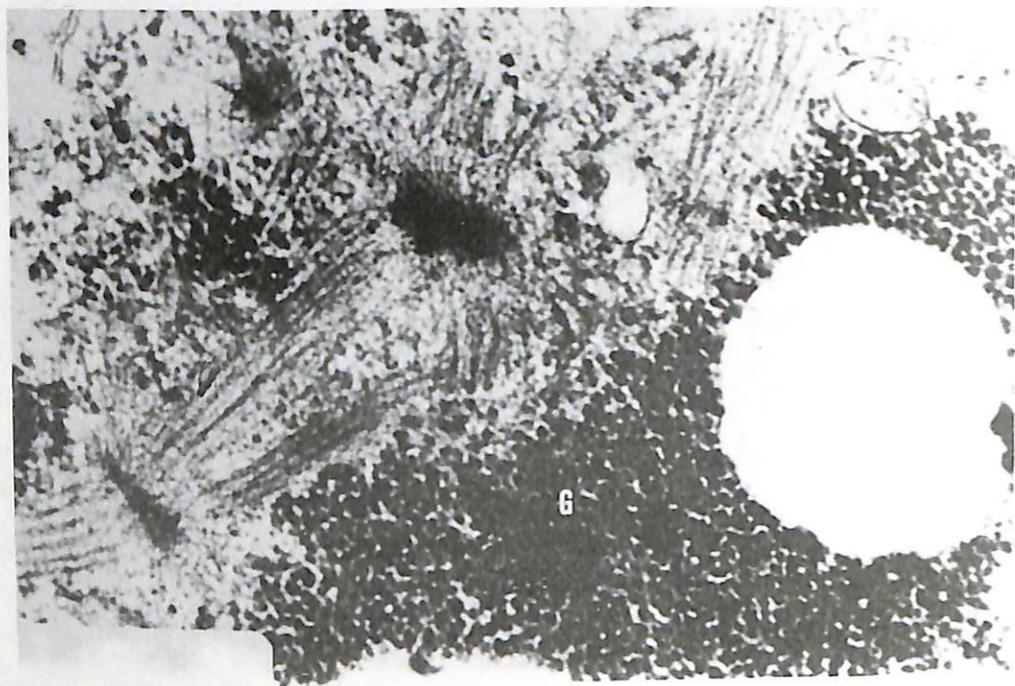


Figura 6.—Detalle de acúmulos de gránulos de glucógeno (G) dispuestos alrededor de gotas de lípidos. 39,600 X.

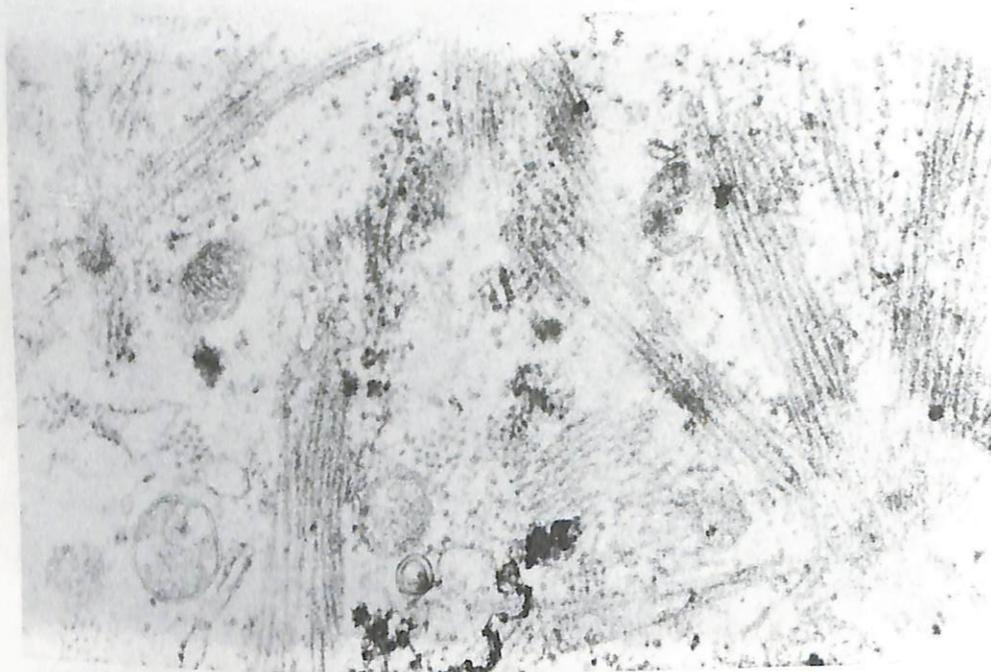


Figura 7.—Miofilamentos escasamente organizados, diferenciados en un mioblasto joven. 32,000 X.



Figura 8.—Reagregado de células cardíacas; no se aprecian formaciones vesiculares. Diámetro aproximado: 1 mm.

Los resultados negativos indican que no es un factor protético el responsable de la ausencia de contracciones. Sin embargo, los niveles de diferenciación estructural alcanzados, más altos que los obtenidos en los anteriores cultivos, nos hacen pensar que la ausencia de proteínas del medio líquido favorece la diferenciación estructural del tejido cardíaco. Estos datos coinciden con los de JONES y col.¹³, que alcanzan también altos niveles de diferenciación morfológica cuando cultivan células cardíacas ventriculares en un medio en el que bajan la concentración del suero del 10 % al 0.1 %.

A la vista de los hechos anteriormente expuestos podemos concluir que la adición de suero fetal bovino al medio de cultivo inhibe la expresión de la contractilidad de los reagregados de células cardíacas cultivadas «in vitro». Este mismo efecto se manifiesta al añadir suero equino, pero con menor intensidad, pues al menos algunos reagregados se contraen.

RESUMEN

Se estudia la diferencia de dos sueros (equino y fetal bovino) utilizados como factores de enriquecimiento del medio de cultivo, sobre el comportamiento fun-

cional de células cardiacas procedentes de embriones de pollo de estadio 5 de H.H., disociadas y cultivadas «in vitro».

Los resultados obtenidos, comprobados mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, demuestran que la ausencia de diferenciación funcional en todos los reagregados procedentes de un medio al que se había adicionado suero fetal bovino está relacionada con la presencia de dicho suero en el medio de cultivo.

FUNTIONAL DIFFERENTIATION OF CHICK EMBRYO CARDIOMYOCYTE INCELLULAR AGREGATED. THE INFLUENCE OF SERUM SUPPLEMENT

SUMMARY

The effects of equine and fetal bovine serum as enrichment factors in the culture medium were studied with special attention to their influence on the functional behaviour of cultured cardiogenic cells obtained, from stage-5 chick embryos.

The results, which were controlled by light and electron microscopic techniques, evidenced an effective absence of funtional differentiation of all the aggregates cultured in the presence of fetal bovine serum.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BOGENMANN, E.; WYSS, C., y EPPENBERGER, H. (1976).—Influence of medium composition on the behaviour of chicken heart cells in culture. *Experientia*, **32**: 786.
- 2) CAVANAUGH, M. W. (1955).—Pulsation, migration and division in dissociated chick embryo heart cells «in vitro». *J. Exp. Zool.* **128**: 573-589.
- 3) COLE, R. J. (1971).—Preparation of primary cell cultures from preimplantation embryos. En: *Methods in Mammalian Embryology* J. C. Daniel, Jr. editor, W. Freeman and Co. San Francisco, pp. 511-521.
- 4) COVEÑAS, R.; RIÑERO, J.; AGUIRRE, J. A.; AJON, J., y LÓPEZ CAMPOS, J. L. (1982).—Aplicación de las técnicas histoquímicas y convencionales a los cortes semifinos. *Morfol. Norm. Patol. Secc. A.* **6**: 209-217.
- 5) DALEN, H.; SCHEIE, P.; MYKLEBUST, R., y SAETERSDAL, T. (1983).—An ultrastructural study cryofractured myocardial cells with special attention to the relationship between mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *J. Microsc.* **131**: 35-46.
- 6) DE HAAN, R. L. (1968).—Emergence of and function in embryonic heart. *Dev. Biol. Suppl.*, **2**: 208-250.
- 7) GLAUERT, A. N. (1975).—Fixation, Dehydration and Embedding of Biological specimens. Ed. A. M. Glauert. North Holland. Amsterdam. 130-148.
- 8) GORDON, H. P., y BRICE, M. C. (1974).—Intrinsic factors influencing the maintenance of contractile embryonic heart cells in vitro. I. The heart muscle conditioned medium effect. *Expt. Cell Res.*, **85**: 303-310.
- 9) GORDON, H. P., y BRICE, M. C. (1974).—Intrinsic factors influencing the maintenance of contractile embryonic heart cells in vitro. II. Biochemical analysis of heart muscle conditioned medium. *Expt. Cell Res.*, **85**: 311-318.
- 10) HALLE, W.; WOLLENBERGER, A. (1968).—The differentiation of heart cells in a chemically medium. *Z. Zellforsch.*, **87** (2): 292-314.

- 11) HALLE, W., y WOLLENBERGER, A. (1970).—Differentiation and behaviour of isolated embryonic and neonatal heart cells in a chemically defined medium. *Amer. J. Cardiol.*, **25**: 292-299.
- 12) HAMBURGER, V., y HAMILTON, H. L. (1951).—A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morph.* **88**: 49-92.
- 13) JONES, J. K.; PAUL, K.; PROSKAUER, C. C.; JONES, R.; LEPESCHKIN, E., y RUSE, S. (1975).—Ultrastructural changes produced in cultured myocardial cells by electric shock. *Fed. Proc.* **34**: 972.
- 14) KEMP, R. B., y JONES, B. M. (1970).—Aggregation and electrophoretic mobility studies on dissociated cells. I. Effects of benzoquinone and tannic acid. *Exp. Cell Res.*, **63** (2-3): 293-300.
- 15) LIM, S. S.; WOODROOFE, M. N., y LEMANSKI, L. F. (1983).—An analysis of contractile proteins in developing chick heart by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, **77**: 1-14.
- 16) LUFT, J. H. (1961).—Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **9**: 409.
- 17) MANASEK, K. J. (1968).—Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopy study of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morphol.* **125**: 329-366.
- 18) MORRIS, E. W. T. (1976).—Observations on the source of embryonic myocardioblasts. *J. Anat.*, **121**: 47-64.
- 19) ORTIZ LLORCA, F., y JIMÉNEZ COLLADO, J. (1968).—Evolución de injertos heterólogos con timidina del área cardiaca del blastodisco de pollo. *Arch. Fac. Med.*, **14**: 395-397.
- 20) ORTIZ LLORCA, F., y GONZÁLEZ SANTANDER, R. (1969).—Estudio electromicroscópico de la primera aparición y desarrollo de los miofilamentos cardiacos (miofibrillogénesis) en el embrión de pollo. *Rev. Española Cardiol.*, **22**: 537-564.
- 21) POLINGER, I. S. (1973).—Identification of cardiac myocytes in ovo and in vitro by the presence of glycogen and myofibrils. *Exptl. Cell Res.*, **76**: 243-252.
- 22) REWEL, S. M. E. (1943).—The heart forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.*, **16**: 22-44.
- 23) ROSENQUIST, G. C. (1970).—Localization and movement of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak. *Dev. Biol.*, **22**: 461-475.
- 24) RUMYANTSEV, P. P. (1977).—Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int. Rev. Cytol.*, **51**: 189-273.
- 25) RUTISHAUER, U.; THIERY, J. P.; BLACKENBURY, R.; EDELMAN, G. M. (1978).—Adhesion among neural cells of the Chick Embryos. III. Relationship of the Surface Molecule CAM to Cell Adhesion and the Development of Histotypic Patterns. *J. Cell Biol.*, **79**: 371-381.
- 26) SACHS, H. G., y DE HAAN, R. L. (1973).—Embryonic myocardial cell aggregated: volumen and pulsation rate. *Dev. Biol.*, **30** (1): 213-240.
- 27) SPERELAKIS, N., y ME LEAN, M. J. (1978).—Electrical properties of cultured heart cells. *Cardiac Adaptation*, **12**: 645-566.
- 28) URGER, I., y TURNER, D. C. (1976).—Influence of culture medium on differentiation in myogenic clones. *Experientia*, **32**: 814.
- 29) VILLAR, J. M.; MURILLO, N. L., y CLIMENT, S. (1976).—Observaciones sobre el comportamiento funcional de las células de las áreas cardiacas disociadas y reagregadas. *An. Facultad Vet. Zaragoza*, **11**: 37-95.
- 30) WOLFF, E., y HAFEN, K. (1952).—Sur une methode de culture d'organes embryonnaires «in vitro». *Texas. Rep. Biol. Med.*, **10**: 463-472.
- 31) ZACCHEI, A. M., y CARAVITA, S. (1972).—Observations on the ultrastructure of chick-embryo cardiac myoblasts re-aggregated in long-term cultures. *J. Embryol. exp. Morph.*, **28**: 571-589.