

ESTUDIO DE LAS CELULAS NEUROECTODERMICAS DE EMBRION DE POLLO EN CULTIVO EN MONOCAPA: CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FIJACION AL SUSTRATO

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

INTRODUCCION

Las técnicas de cultivos celulares han sido ampliamente utilizadas para investigar el comportamiento sobre el sustrato y las características morfológicas de las células embrionarias. Dichas técnicas son de especial interés, ya que se puede decir que las propiedades de las células «in vitro» están en correspondencia con las propiedades de estas mismas células «in vivo»¹⁵ y su capacidad de movimiento y expansión en cultivo es de esperar que refleje su comportamiento de extensión y adhesión «in situ»¹⁶ y por ende en los movimientos morfogenéticos²⁵.

Las células neuroepiteliales del embrión de pollo, destinadas a invaginarse durante la neurulación, poseen pocas microvellosidades pero abundantes proyecciones globulares («blebs») y vesículas. Dichas células también presentan largos puentes citoplasmáticos cuyo número descende a medida que avanzan los estadios⁵. En el estadio 8 (según HAMBURGER y HAMILTON)¹² las células de la placa neural, observadas al microscopio electrónico de barrido, presentan pequeñas microvellosidades que forman un anillo alrededor del borde de la célula, observándose también proyecciones globulares en la superficie de la misma, más numerosas en la región de la placa neural que en el epiblasto lateral³.

Las células embrionarias cuando son disociadas y cultivadas adquieren movilidad y pueden formar reagregados²⁴, observándose un cambio en sus atributos morfológicos del primer al segundo caso que permiten conocer el comportamiento de estas

(1) Departamento de Anatomía y Embriología. Facultad de Veterinaria. León.

(2) Servicio de Microscopía Electrónica. Universidad de León.

(3) Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. León.

In. Fac. Vet. León, 1981, 30, 27-39.

células «in vitro» tanto individual como socialmente, y así correlacionarlo con su conducta «in vivo». En este sentido, el microscopio electrónico de barrido proporciona una imagen tridimensional y de gran resolución que permite la observación de las proyecciones celulares para su estudio y cuantificación, y referirlo a la conducta adhesiva, de extensión y locomoción de las células aisladas y reagregadas. En relación con ello existe un gran número de trabajos sobre células mesodérmicas embrionarias, tanto «in vitro» como «in vivo»^{9, 8, 4, 20, 21}, así como sobre células ectodérmicas de anfibios^{24, 25, 15, 16}.

El objeto de este trabajo es hacer un estudio, aplicando el microscopio electrónico de barrido, de las células neuroectodérmicas de embrión de pollo en cultivo, analizando el comportamiento adhesivo de extensión y locomoción de las células aisladas y en reagregados.

MATERIAL Y METODOS

Utilizamos blastodiscos de embrión de pollo del estadio 8 obtenidos de huevos fértiles de gallina (raza Hubbard), incubados a 37,5° C y 80 % de humedad. Una vez recogidos los embriones se llevaron a una solución de Tyrode libre de iones Ca^{++} y Mg^{++17} . Se recortaron las áreas neurales presuntivas, evitando la recogida del epiblasto así como de las células de la cresta neural, y se introdujeron en «salieres» de vidrio con una solución estéril de tripsina (Difco 1:250) (2 % de tripsina y 0,3 % de carboximetilcelulosa en solución buffer de Tyrode libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}) donde se incubaron 15 minutos a 37,5° C. Posteriormente los fragmentos seleccionados se sometieron a varios lavados en solución de Moscona estéril. A continuación recogimos el neuroectodermo de dichas áreas, separándolo del mesodermo mediante pipeteado, y se trató durante 15 minutos a 37,5° C con una solución estéril de tripsina (0,5 % de tripsina y 0,3 % de carboximetilcelulosa en solución buffer de Tyrode libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}). Posteriormente los fragmentos de neuroectodermo se lavaron repetidas veces en solución de Tyrode y se pipetearon hasta la disociación total, realizándose una comprobación así como contaje celular en una cámara Burker.

Los cultivos celulares se realizaron sobre cubres de plástico THERMANOX en tubos Leighton con 1 ml de medio Eagle modificado (TC minimal medium Eagle, 10 % de suero fetal bovino, 6 % de TC glutamina, 100 U.I./ml de penicilina, 100 $\mu\text{gr}/\text{ml}$ de estreptomycin) a una concentración final de 10^6 células/ml, durante 24 horas.

Los cultivos así obtenidos se fijaron con glutaraldehído al 1 % en tampón Sorensen (0,1 M y pH 7,4) a 37,5° C (con el fin de evitar un brusco cambio de temperatura) durante 1 hora, y se postfijaron con tetróxido de osmio (1 %) durante el mismo tiempo a temperatura ambiente. Se deshidrataron en grados sucesivos de etanol y se transfirieron a isoamilacetato, desecándolos por el método del punto crítico en un desecador CPD 010 (Balzers). Los cultivos montados sobre portamuestras de microscopía electrónica de barrido, se recubrieron con una capa de

oro-paladio y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 35C a 20 kV.

Se realizaron cuatro cultivos y cada uno de ellos es dividido en tres partes iguales para su observación al SEM. En cada fragmento se examinaron de 20 a 60 células de todas las áreas del sustrato, siguiendo las indicaciones de LEBLANC y BRICK¹⁶, en cada una de las cuales se analizan, cuantitativa y cualitativamente, su morfología, así como las proyecciones celulares.

RESULTADOS

Los cultivos de células neuroectodérmicas observados al microscopio electrónico de barrido (SEM) presentan dos poblaciones de células bien diferenciadas: una (población I) representada por células de aspecto rugoso, con manifiestas prolongaciones celulares, abundantes proyecciones globulares («blebs») y que representa el 54% de las células neuroectodérmicas (fig. 1). La otra población (II) está formada por células de morfología superficial lisa, sin apenas especializaciones en su superficie, y representan el 44% de las células muestreadas (fig. 2). En ambos casos las células aparecen con una forma esferoide, menos pronunciada en las células de la población I, las cuales presentan unas dimensiones medias de $11,68 \mu (\pm 1,4 \mu)$ de diámetro mayor y $8,87 \mu (\pm 1,0 \mu)$ de diámetro menor, mientras que en la población II estas dimensiones eran $10,31 \mu (\pm 1,1 \mu)$ y $8,37 \mu (\pm 0,9 \mu)$ respectivamente.

En la población I (fig. 3) el 40% de las células presentan filopodios, un promedio de 2,75 por célula. De ellos el 40% miden menos de 1μ de longitud, el 25,5% de 1 a 3μ , y el 34,5% más de 3μ . En la población II el 20% de las células presentan filopodios, con un promedio de 2,25 por célula, de los cuales el 62,2% miden menos de 1μ de longitud, el 35,6% de 1 a 3μ y el 2,2% más de 3μ (fig. 6).

En ambas poblaciones se observan pseudópodos en el 10% de las células (fig. 4). La longitud media es, generalmente, superior a 3μ y la anchura está comprendida entre 2 y 4μ . La presencia de un solo pseudópodo en cada célula es la observación más frecuente.

En cuanto a los lamelipodios, presentes solamente en el borde celular, están en el 56,2% de las células de la población I, en las cuales se observa 1,5 lamelipodios por célula. En el 71,5% de ellos la longitud está comprendida entre 1 y 3μ y en el resto es de menos de 1μ . La mitad de los lamelipodios presenta una anchura menor de 2μ , y la otra mitad se distribuye entre 2 y 4μ y más de 4μ de ancho. En la población II, el 62,06% de las células presentan lamelipodios, con una media de 1,5 por célula. Los lamelipodios de 1 a 3μ de longitud son el 56%, y el 44% restante son de menos de 1μ de largo. La anchura de los lamelipodios en esta población es de 2 a 4μ en el 51,8% de los mismos. El porcentaje restante se reparte entre longitudes de menos de 2μ (22,2%) y de más de 4μ (26%) (figs. 5 y 7).

La adhesión y multiplicación de las células dio lugar a la formación, en las zonas centrales de los cubres, a un promedio de 5,3 reagregados de forma irregular en cada cultivo (fig. 8), originados a partir de las células neuroectodérmicas anterior-

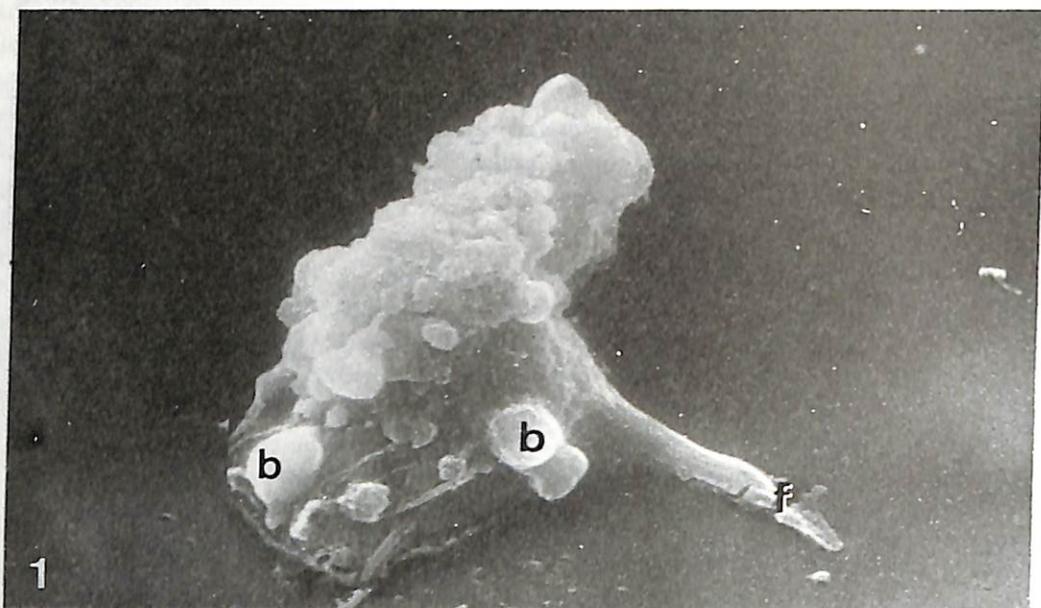


Figura 1.—Célula con abundantes proyecciones globulares (b) y filopodios (f) perteneciente a la población celular I. 5.000 X.

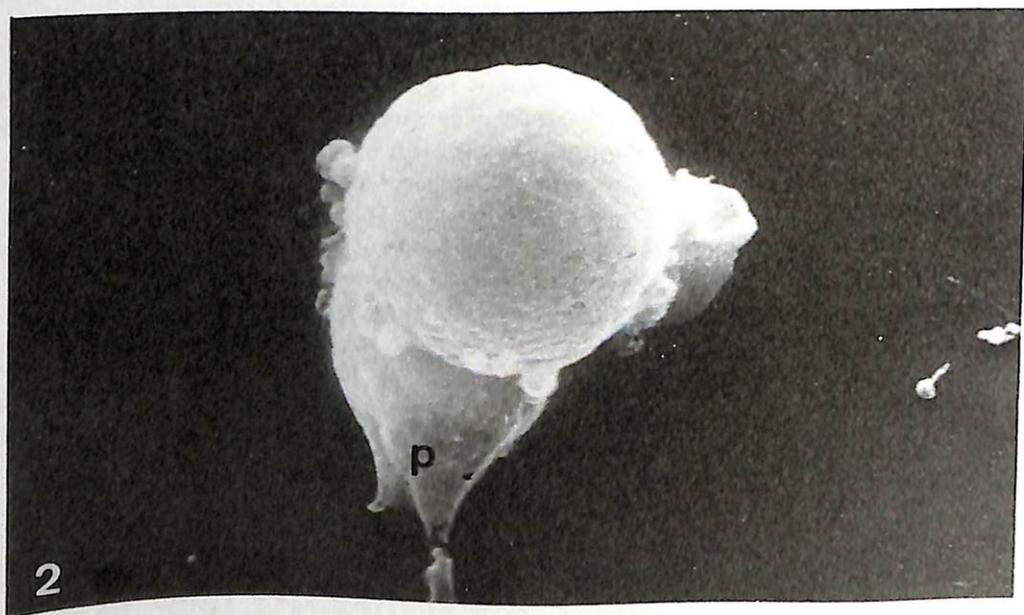


Figura 2.—Célula de morfología superficial lisa (Población II) que presenta un grueso pseudópodo (p). 5.000 X.

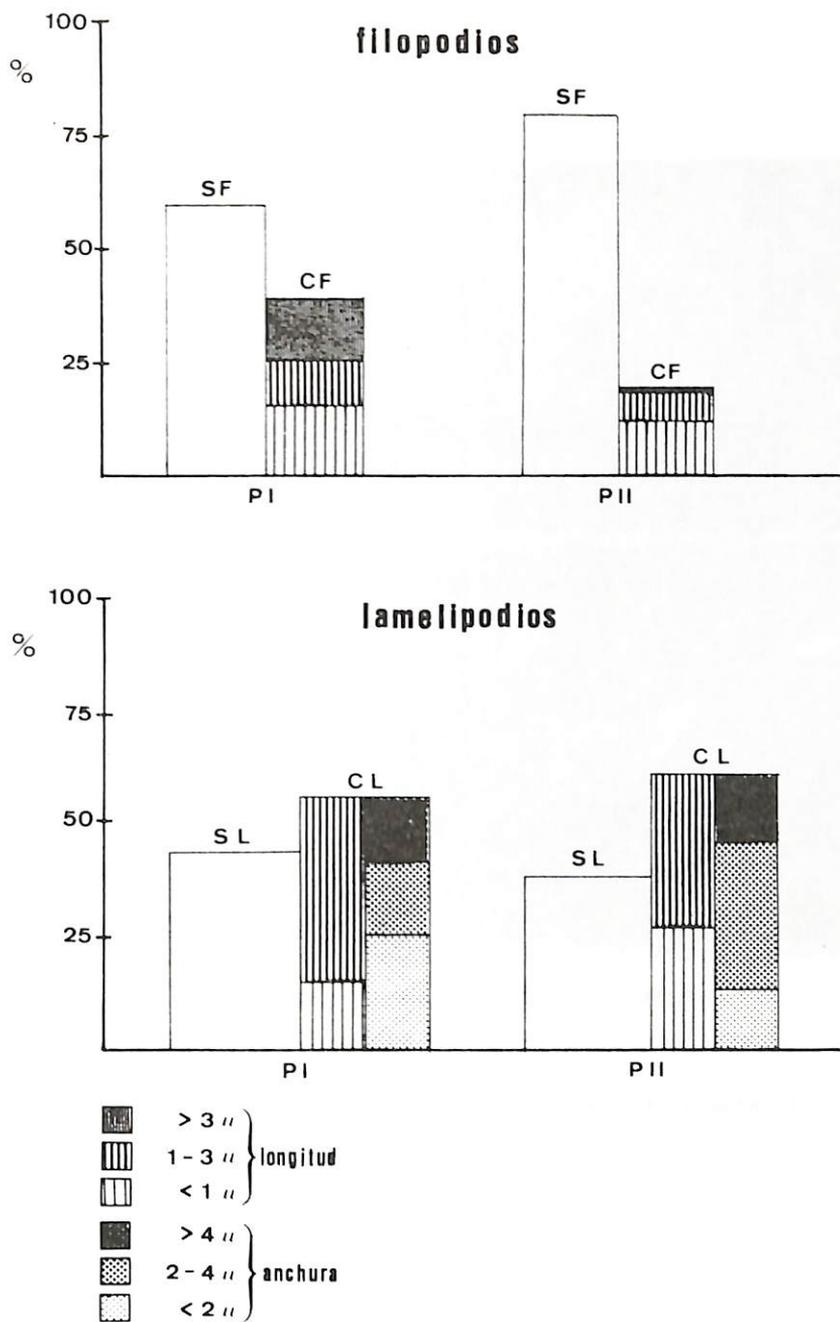


Figura 3.—Histograma en el que se presentan las proporciones de filopodios y lamelipodios en las células de ambas poblaciones (P I y P II). SF: Porcentaje de células sin filopodios. CF: Porcentaje de células con filopodios. SL: Porcentaje de células sin lamelipodios. CL: Porcentaje de células con lamelipodios. En las columnas CF y CL se indica el porcentaje de longitud y/o anchura de los filopodios y lamelipodios.

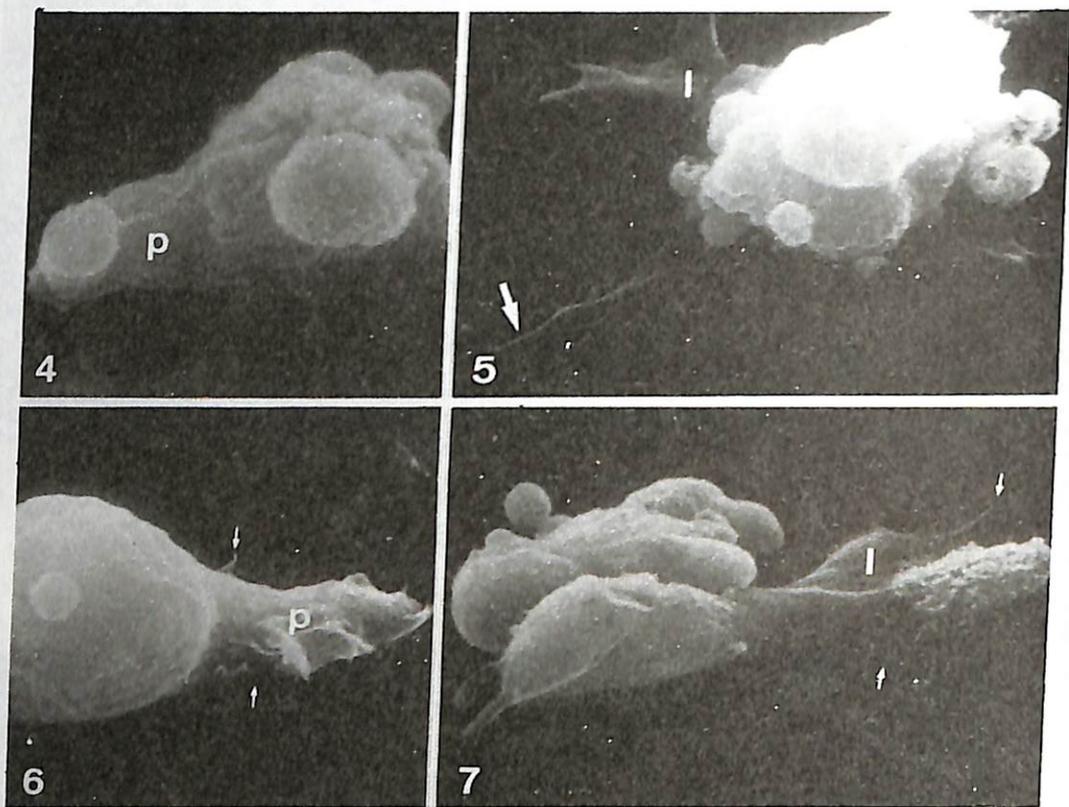


Figura 4.—Célula con un gran pseudópodo (p). 7.000 X.

Figura 5.—Célula con abundante actividad protrusiva en su superficie. Se observa un filopodio ramificado (flecha), así como un lamelipodio (l). 6.000 X.

Figura 6.—Célula de la población II que presenta además de un pseudópodo (p) finos y cortos filopodios (flechas). 6.000 X.

Figura 7.—Célula perteneciente a la población celular I con abundantes filopodios (flechas) y un lamelipodio (l). 6.000 X.



Figura 8.—Vista general de un reagrado de células neuroectodérmicas. 800 X.

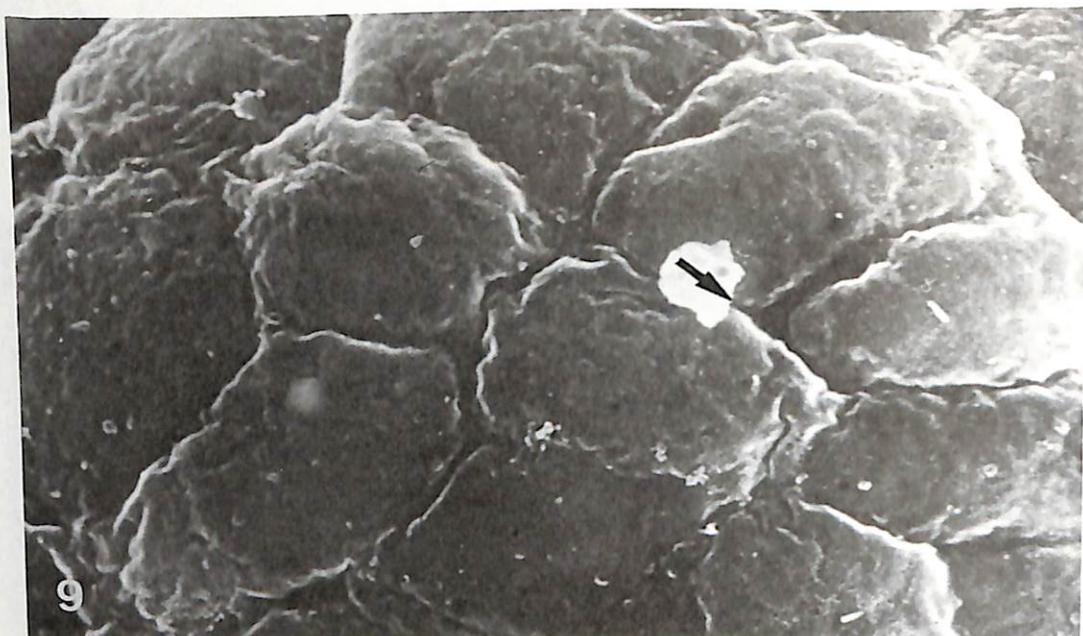


Figura 9.—Detalle de la superficie de un agregado de células neuroectodérmicas. Nótese los bordes celulares (flechas) que limitan superficies celulares sin ninguna protrusión. 4.500 X.

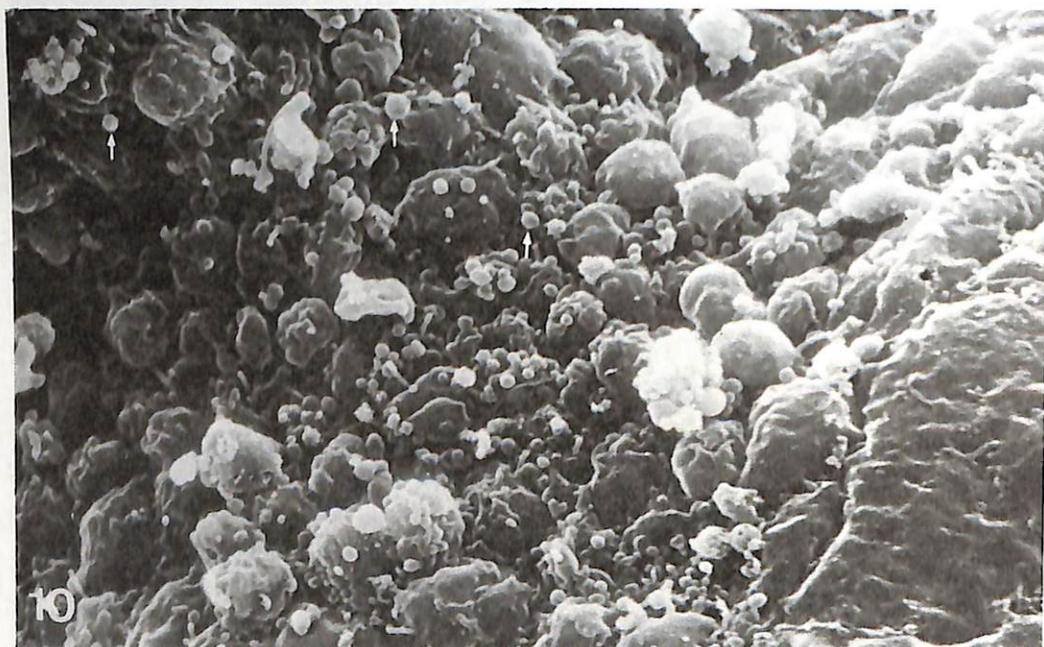


Figura 10.—Superficie de un agregado de células neuroectodérmicas en el que se aprecian abundantes «blebs» en la superficie celular (flechas). 6.300 X.

mente descritas. Dichos reagregados presentan una forma irregular y sus dimensiones oscilan entre las 400 y las 700 μ . Las células neuroectodérmicas, en estos reagregados tridimensionales, pierden las características anteriormente citadas, tales como filopodios, lamelipodios, etc., y solamente en algunas zonas de los reagregados se aprecian grupos celulares con abundantes proyecciones globulares en su superficie (fig. 10). Las células pierden su aspecto esférico y, en las superficies lisas de los reagregados (fig. 9) se aprecian los límites celulares.

DISCUSION

El cultivo de las células neuroectodérmicas de embrión de pollo nos permite analizar su comportamiento adhesivo, de expansión, fijación al sustrato y de reagregación, y valorarlo mediante el SEM. De esta forma se pueden analizar y cuantificar las distintas especializaciones de la membrana celular de acuerdo con el papel propuesto para éstas en la adhesión y extensión⁷ y motilidad^{11, 6}, ya que las células solamente pueden adherirse, extenderse y moverse, utilizando «in vitro» un apropiado sistema de especializaciones, que pueden reflejar el comportamiento adhesivo y de extensión «in vivo»¹⁰.

Las células estudiadas presentan en cultivo bidimensional dos poblaciones bien diferenciadas: células con morfología prácticamente esférica sin proyecciones celulares, y células con abundantes proyecciones globulares en su superficie, de forma semejante a las ya descritas por STANISSTREET y JUMAH²⁵ en cultivos celulares de ectodermo de anfibios. «In vivo» las células de la placa neural presentan abundantes proyecciones en comparación con las del epiblasto³.

La presencia de pseudópodos en ambas poblaciones celulares concuerda con las observaciones de JOHNSON¹⁴ y STANISSTREET y SMITH²⁴ sobre este mismo tipo de células «in vitro». Estas mismas proyecciones celulares se han observado también en células migratorias «in vivo», en las cuales se ha comprobado el papel de los pseudópodos en la migración celular¹⁸. El escaso número de pseudópodos, así como la baja proporción de células que los presentan, hace suponer un pobre papel para esta estructura en la motilidad de las células neuroectodérmicas.

La presencia de filopodios en ambas poblaciones celulares no debe de ser atribuida, en este caso, a la formación de los mismos en el medio de disociación como una respuesta celular al mismo, tal y como señalan algunos autores para células ectodérmicas de anfibios, ya que estas proyecciones celulares permanecen a las 24 horas de cultivo. Los filopodios, observados también en células migratorias mesodérmicas, pueden representar un mecanismo de invaginación de estas células en el proceso morfogenético de la región neural¹⁹.

Aunque no está excesivamente claro el papel que juegan los filopodios en la adhesión y extensión celular, ALBRECHT-BUEHLER² ha presentado la evidencia de que estas estructuras pueden cumplir una función «exploradora» del sustrato. Por su parte, TRINKAUS y ERICKSON²⁹ admiten un posible papel en la locomoción celular, usando la adhesión de los filopodios como anclaje para estabilizar el avance del borde

celular conductor. En cualquier caso el comportamiento migratorio de estas células es escaso, y el posible movimiento ocurriría por «blebbings»²⁹ en la población I. En la población II, que se presenta sin «blebs», aparece un bajo porcentaje de células con filopodios, por lo cual parece más factible atribuir a los filopodios una función «exploradora» del sustrato en ambos casos.

TRINKAUS y LENTZ²⁸ correlacionan el incremento de proyecciones celulares, y TRINKAUS²⁶ de filopodios, con movimientos morfogenéticos, habiéndose observado «blebs» sobre las superficies celulares «in vivo» como un mecanismo previo de locomoción, lo que proporcionaría a la población I una mayor capacidad de locomoción que a la II. En este mismo sentido, en los labios del canal neural del embrión de pollo se localizan células que emiten largas prolongaciones, algunas de las cuales mueren y son fagocitadas²³. Quizás estas células estén relacionadas con las de la población I observadas en nuestros resultados, las cuales muestran un comportamiento más activo que las de la población II en cuanto a proyecciones celulares.

La presencia de células muy poco aplanadas sobre el sustrato y que se encuentran fuertemente adheridas al mismo por su base corrobora las observaciones de que el ectodermo es mucho más adhesivo que el mesodermo⁴, y ya que la disminución de la adhesividad ha sido correlacionada con el incremento en la motilidad celular¹⁰ cabe suponer para las células neuroectodérmicas una pobre capacidad de motilidad, en concordancia también con su dotación de filopodios y lamelipodios. El comportamiento celular individual parece jugar un importante papel en la morfogénesis, y se deduce de los trabajos de LEBLANC y BRICK¹⁶ que las células aisladas poseen un comportamiento autónomo y unas expresiones morfológicas consecuentes con los distintos movimientos morfogenéticos «in vivo». Estos mismos autores sugieren que las células neuroectodérmicas que presentan abundantes proyecciones celulares (población I en nuestro caso) pueden participar en la formación del tubo neural; y los, ya clásicos, hallazgos de HOLFRETER¹³ sobre células de la placa neural, sugieren para éstas una forma alargada que conservan en cultivo. En nuestros resultados son las células de la población I las que aparecen muy ligeramente alargadas y algo más aplanadas.

Por otra parte la realización de un estudio detallado de las especializaciones celulares llevado a cabo en este trabajo, proporciona una información más completa para este tipo celular, apreciándose, en la población I que además de presentar mayor número de células con filopodios, éstos son de mayor entidad (longitud) en general, que los de la población II, lo cual sigue confirmando para las células de la población I un papel locomotor más activo que para las de la II²⁹.

Los lamelipodios aparecen con mayor frecuencia en las células del tipo II, pero de escasa longitud y anchura intermedia, generalmente, ya que éstos por regla general aparecen como finas láminas que se prolongan a poca distancia desde el borde de la célula y circundándola.

Por otra parte no se observa una gran variación en los tamaños celulares de uno y otro tipo celular, que oscila alrededor de las 10 μ de diámetro mayor y de 8 μ para el menor.

TRINKAUS²⁷ señala que las células epiteliales en cultivo no cambian su posición

relativa respecto a otras, debido a los efectos de la inhibición por contacto de la locomoción. Dado que no se ha observado que estas células utilicen las superficies celulares como sustrato para la locomoción, el mecanismo por el cual se produce esta superposición de células, que conduce al reagregado, podría ser un mecanismo de «underlapping» entre las células individuales²¹, que se ve acompañado del cese de la actividad protrusiva de las células, tal y como señala ABERCROMBIE¹. Así, se observa cómo el contacto celular, en la mayoría de los casos, provoca un cese en la actividad protrusiva de la célula, en concordancia con lo hallado por otros autores para células epiteliales, que sugieren para este fenómeno una importante fuerza de guía para los movimientos celulares morfogenéticos^{1, 26, 29}.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia mediante la microscopía electrónica de barrido las características morfológicas más importantes de las células neuroectodérmicas de embrión de pollo en cultivo. Nuestros resultados demuestran la presencia de dos poblaciones celulares bien diferenciadas: una población (P I) con una alta actividad protrusiva en su superficie y otra (P II) con un aspecto celular prácticamente liso. En ambos tipos celulares se estudian la proporción de células que presentan filopodios, lamelipodios y pseudópodos, valorándose morfométricamente estas proyecciones. Los resultados se discuten en virtud del papel propuesto para dichas proyecciones en la adhesión y locomoción celular en cultivo, comparándolo con las propiedades de estas células «in ovo».

A STUDY OF CHICK EMBRYO NEUROECTODERM CELLS IN MONOLAYER CULTURE: MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND FIXATION ON SUBSTRATE

SUMMARY

In this work the more important morphologic features of chick embryo neuroectoderm cells in culture have been analysed by scanning electron microscopy. Our results show two cellular populations well differentiated: the P I population, which has a high protrusive activity on cellular surface, and the P II one formed by practically featureless cells. In both populations the cellular proportion with filopodia, lamellipodia and pseudopodia is studied and the morphometric analysis of these projections are realised. The results are discussed in view of role proposed for these projections in cellular adhesion and locomotion in culture comparing with the properties of these cells «in ovo».

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABERCROMBIE, M. (1970).—Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro*, **6**, 128-142.
- 2) ALBRECHT-BUEHLER, G. (1976).—Filopodia of spreading 3T3 cells. Do they have a substrate-exploring function? *J. Cell Biol.*, **69**, 275-286.
- 3) BANCROFT, M., y BELLAIRS, R. (1974).—The onset of differentiation in epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). *Cell Tissue Res.*, **155**, 399-418.
- 4) BELLAIRS, R.; SANDERS, E. J., y PORTCH, P. A. (1980).—Behavioural properties of chick somitic mesoderm and lateral plate when explanted in vitro. *J. Embryol. exp. Morph.*, **56**, 41-58.
- 5) BUCK, R. C.; OHARA, P. T., y DANIELS, W. H. (1976).—Intercellular bridges of chick blastoderm studied by scanning and transmission electron microscopy. *Experientia*, **32(1)**, 505-507.
- 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) CURTIS, A. S. G. (1964).—The mechanism of adhesion of cell to glass. A study by interference microscopy. *J. Cell Biol.*, **20**, 199-215.
- 8) DE-VOY, K.; 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.
- 9) EBENDAL, T. (1976).—Migratory mesoblast cells in the young chick embryo examined by scanning electron microscopy. *Zoon*, **4**, 101-108.
- 10) GAIL, M. H., y BOONE, C. W. (1972).—Cell-substrate adhesivity. A determinant of cell motility. *Expl. Cell Res.*, **70**, 33-40.
- 11) GUSTAFSON, T., y WOLPERT, L. (1961).—Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo. Directed movement of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. *Expl. Cell Res.*, **21**, 64-79.
- 12) HAMBURGER, V., y HAMILTON, H. L. (1951).—A series of normal stages in the development of the chick embryos. *J. Morph.*, **88**, 49-92.
- 13) HOLFRETER, J. (1948).—Significance of the cell membrane in embryonic processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **49**, 709-760.
- 14) JOHNSON, K. E. (1976).—Circus movements and blebbing locomotion in dissociated embryonic cells of an amphibian, *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.*, **22**, 575-583.
- 15) 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.*, **3(3)**, 155-171.
- 16) LEBLANC, J., y BRICK, I. (1981).—Morphologic aspects of adhesion and spreading behaviour of amphibian blastula and gastrula cells. *J. Embryol. exp. Morph.*, **61**, 145-163.
- 17) MOSCONA, A. (1961).—Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells. *Exp. Cell Res.*, **22**, 455-475.
- 18) NAKATSUJI, N. (1974).—Studies on the gastrulation of amphibian embryos: pseudopodia in the gastrula of *Bufo bufo japonicus* and their significance to gastrulation. *J. Embryol. exp. Morph.*, **32**, 795-804.
- 19) NAKATSUJI, N. (1976).—Studies of the gastrulation of amphibian embryos: ultrastructure of the migrating cells of anurans. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **180**, 229-240.
- 20) 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.
- 21) SANDERS, E. J., y PRASAD, S. (1979).—Observation of cultured embryonic epithelial cells in side view. *J. Cell Sci.*, **38**, 305-314.
- 22) SANDERS, E. J., y PRASAD, S. (1983).—The culture of chick embryo mesoderm cells in hydrated collagen gels. *J. Exp. Zool.*, **226**, 81-92.
- 23) SCHOENWOLF, G. C. (1982).—On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system. En: *Scanning Electron Microscopy, II*, Chicago, 289-308.
- 24) STANISSTREET, M., y SMITH, J. L. (1978).—Scanning electron microscopy of aggregates of cells from normal embryos and lithium-induced exogastrulae of *Xenopus laevis*. *Acta Embryol. Morphol. Exper.*, **1**, 1-12.
- 25) STANISSTREET, M. 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. Morphol. Exper.*, **3(1)**, 3-13.
- 26) TRINKAUS, J. P. (1973).—Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages. *Dev. Biol.*, **30**, 68-103.

- 27) 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, 1976, Vol. 1, 225-239.
- 28) TRINKAUS, J. P., y LENIZ, T. L. (1967).—Surface specializations of *Fundulus* cells and their relation to cell movements during gastrulation. *J. Cell Biol.*, **32**, 139-153.
- 29) 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.