

INFLUENCIA DEL ENDODERMO EN LA DIFERENCIACION DE LAS CELULAS PRECARDIACAS EN AGREGACION

INFLUENCE OF ENDODERM IN THE DIFFERENTIATION OF PRECARDIAC CELLS IN AGGREGATION

*Por C. García
M. Arias
J.M. Villar*

Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

SUMMARY

A study of the ultrastructural characteristics of chick embryo cardiogenic cells in aggregation, to analyse the differentiation capacity of precardiac mesoderm in absence of endoderm, is made. The results obtained show that the cardiac differentiation processes can start in absence of endoderm. Nevertheless, the differentiation degree of cardiomyoblasts does not reach the expected level of organization and myofibrillar complexity.

RESUMEN

Se realiza un estudio de las características ultraestructurales de las células cardiogénicas de embrión de pollo en agregación, con el propósito de analizar la capacidad de diferenciación del mesodermo precardiaco en ausencia de endodermo.

Los resultados obtenidos demuestran que los procesos de diferenciación cardíaca pueden iniciarse en ausencia de endodermo. Sin embargo, el grado de diferenciación de los mioblastos cardíacos no alcanzan el nivel esperado de organización y complejidad miofibrilar.

* Departamento de Biología Celular y Anatomía. Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
An. Fac. Vet. León. 1987, 33, 15-24

INTRODUCCION

Es conocido que los procesos de agregación «in vitro» de células disociadas en suspensión^{16, 17}, evolucionan y hacen posible el estudio detallado de los contactos celulares, sorting out, organización morfogénica de las células en sistemas multicelulares y cooperación celular en la organización y diferenciación de los tejidos^{8, 19, 24, 28}.

Los procesos implicados en la diferenciación cardiaca, han sido considerados por varios autores en distintos trabajos de revisión^{4, 10, 15, 21}, sin embargo, algunos aspectos ofrecen resultados contradictorios. En la diferenciación de las células cardiogénicas, el endodermo parece jugar un importante papel para el desarrollo normal del corazón de embrión de pollo, considerando algunos autores^{6, 12, 20, 21} necesaria la interacción mesodermo-endodermo, para que se inicie y complete dicho proceso.

Sin embargo^{3, 14, 22}, no consideran indispensable la influencia del endodermo para que se inicie la diferenciación cardiaca, demostrando que el mesodermo precardiaco es capaz de autodiferenciarse, si bien, un soporte epitelial favorece la histogénesis. Estudios recientes² muestran la capacidad de diferenciación del mesodermo precardiaco, cuando se cultivan explantes de embrión de pollo en ausencia de endodermo.

El propósito de este trabajo, es analizar la influencia que ejerce el endodermo en la diferenciación de cardiomiocitos sometidos a procesos de disociación y agregación celular. Así mismo, se pretende realizar un estudio secuencial del grado de organización estructural de estas células precardiacas, cuando se cultivan en presencia y ausencia de endodermo.

MATERIAL Y METODOS

Métodos de cultivo

Se utilizan embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) de estadio 5⁹, procediéndose a la recogida de fragmentos correspondientes a las áreas cardiogénicas mediante microdissección. El ectomesodermo y el endodermo se aíslan por la acción enzimática de la colagenasa (0,03% en solución Tirode a 37,5°C, 70-80 min.)¹¹ (Fig. 1 y 2). Los tejidos se separan con un fina aguja de tungsteno, se lavan tres veces con una mezcla de suero y Tirode para la inactivación del enzima y finalmente con solución Tirode.

a) Cultivo en medio líquido

Una vez separado el ectomesodermo, se disocian las células^{18, 25} mediante un pipeteado suave y se cultivan en medio líquido de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0,06 ml de Tc-glutamina, 100 U.I. de penicilina y 100 microgramos de streptomicina por ml de medio. Los cultivos son incubados en agitador orbital (70 r.p.m.) a 37,5°C durante 24 horas.

Se cultivan, además, fragmentos tridérmicos correspondientes a las áreas cardiogénicas, utilizados como controles.

b) Cultivo en medio sólido

Los agregados obtenidos se someten a un segundo cultivo en medio semisólido²⁷, 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 5-6 días a 37,5°C.

Microscopía electrónica

Los agregados obtenidos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato (0,1N) durante 1 hora a 4°C. Después de una serie de tres lavados en el mismo tampón, las muestras se posfijaron con O_3 O_4 al 1% en tampón fosfato (0,1 M) durante 1 hora a 4°C, se deshidrataron mediante series sucesivas de etanol y óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon 812. Los cortes semifinos destinados a microscopía óptica se realizaron con espesores de 0,5-1 μ m, óptimas para la tinción con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos se contrastaron siguiendo la técnica de doble tinción (Acetato de uranilo y Citrato de plomo), y examinaron en un microscopio JEOL 10 CX, operando a 60 kv.

RESULTADOS Y DISCUSION

A. Cultivos de agregados de áreas cardiogénicas previa eliminación del endodermo.

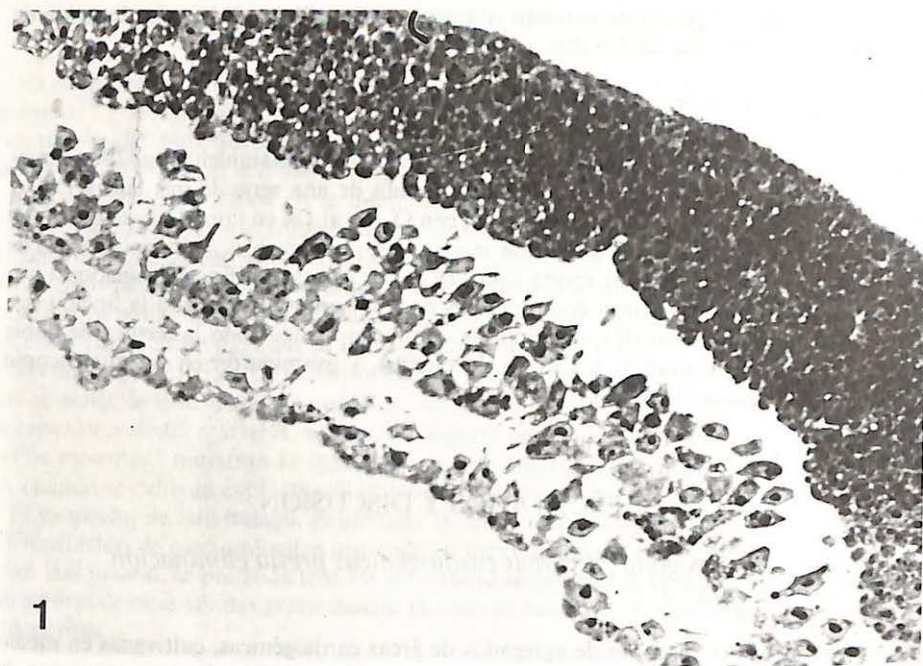
El análisis al microscopio de agregados de áreas cardiogénicas, cultivadas en medio sólido durante 2-3 días, nos permitió observar la diferenciación de una zona capaz de contraerse rítmicamente, alcanzando una frecuencia de 80-90 1/m. Sin embargo, hemos de hacer notas que ocasionalmente en algún cultivo las vesículas formadas no se contraían. Alrededor de dichas vesículas aparece un tejido formado por células cardiacas. En cultivos de agregados de cardiomiocitos, Arias y Villar¹ observan que la presencia de la línea Z no es determinante (como sucede en el desarrollo normal) del comienzo de la función contractil en la diferenciación de mioblastos «in vitro».

En cultivos semejantes, aunque partiendo de estadios más avanzados 7, 8 y 9 de Hamburger y Hamilton⁹, Wiens y Spooner²⁶, observan contracciones a las 18-24 horas de cultivo independientemente del estadio inicial de desarrollo del explante. El hecho de que en nuestros cultivos las contracciones comiencen más tarde, puede deberse a que en el estadio 5, del que partimos, las células están todavía indiferenciadas en el aspecto estructural o morfológico.

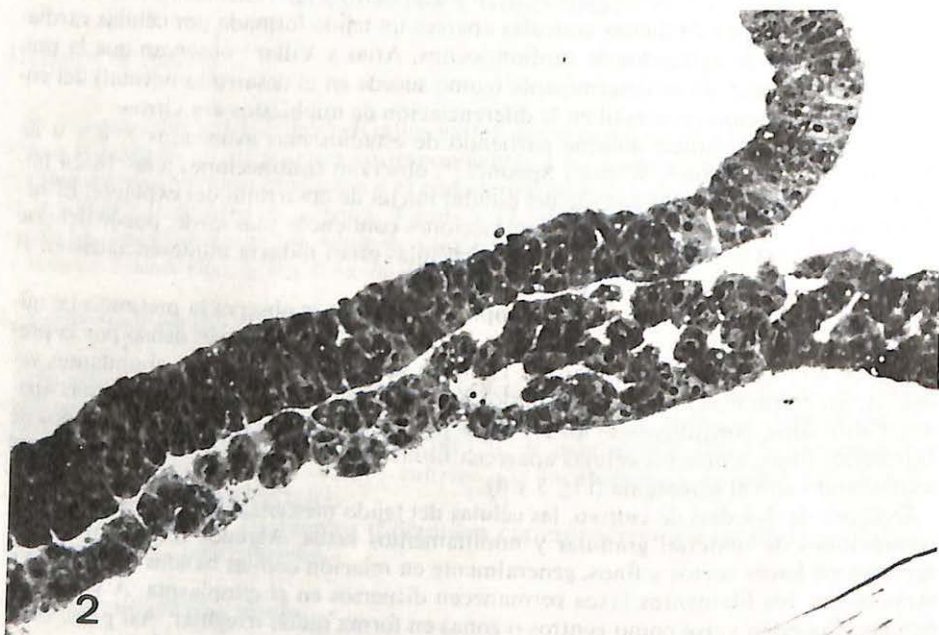
En este tiempo de cultivo, al microscopio electrónico, se observa la presencia de núcleos de formas variadas y desplazadas en la célula. Su citoplasma es denso por la presencia de abundantes polirribosomas. También se observan grandes y abundantes vesículas, así como mitocondrias y gránulos de glucógeno dispersos. Los ribosomas aparecen alineados, constituyendo los primeros protomiofilamentos y pequeños grupos de filamentos finos. Entre las células aparecen fibras de colágeno dispersas, en ocasiones contactando con el sarcolema (Fig. 3 y 4).

Después de 3-4 días de cultivo, las células del tejido mesoblástico contienen ya concentraciones de material granular y miofilamentos laxos. Algunos miofilamentos se agrupan en haces cortos y finos, generalmente en relación con las bandas Z (fig. 5). En otras zonas, los filamentos laxos permanecen dispersos en el citoplasma. A veces, las bandas Z pueden verse como centros o zonas en forma radial irregular. Así pues, estas miofibrillas dispersas por el citoplasma, no tienen orientación preferencial.

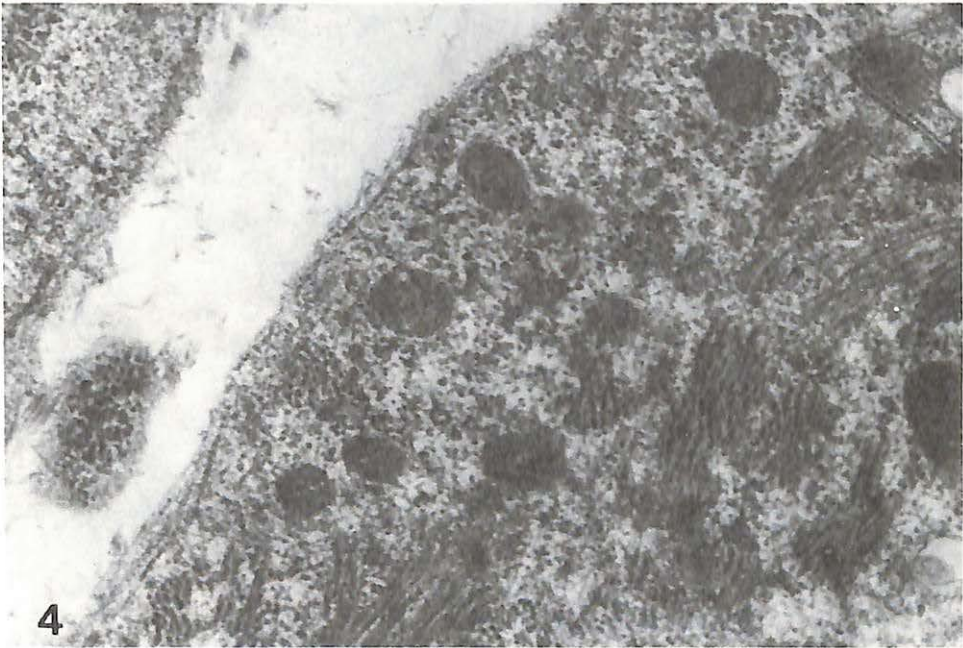
Se observan también en el citoplasma abundantes ribosomas libres. Las mitocondrias son muy numerosas y permanecen dispersas, así como los gránulos de glucóge-

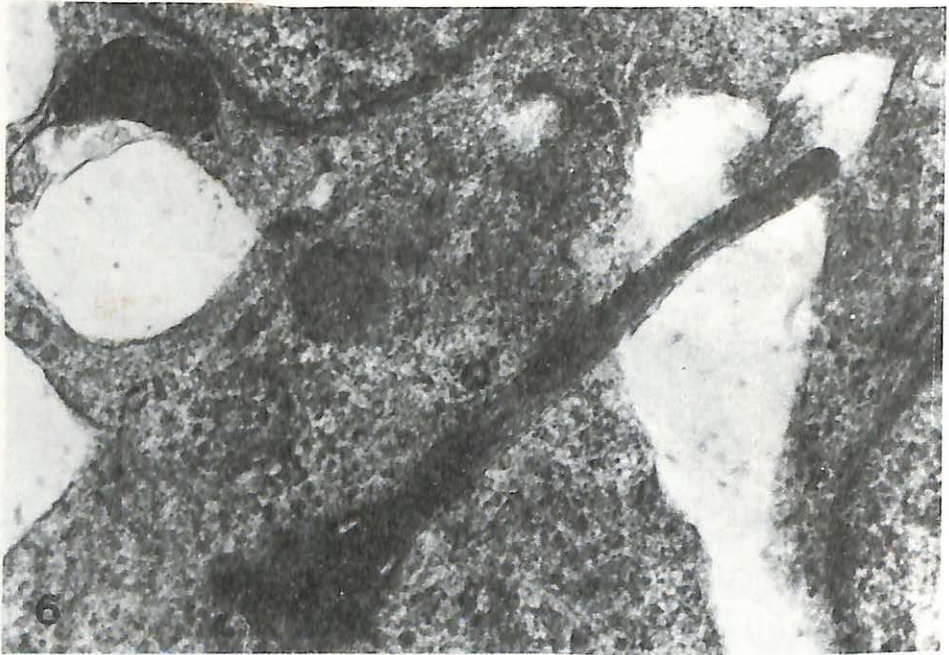
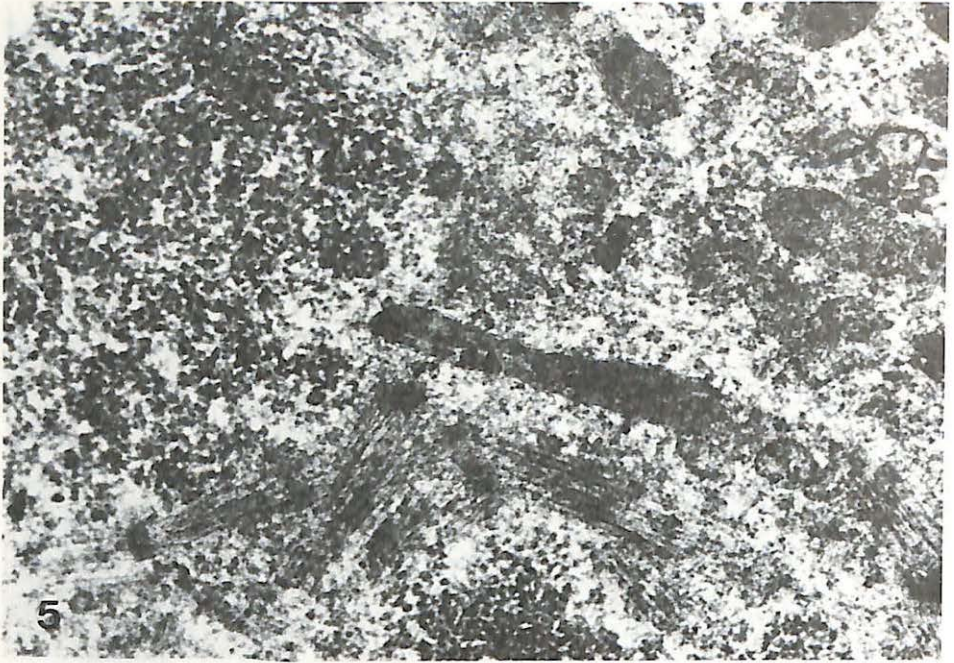


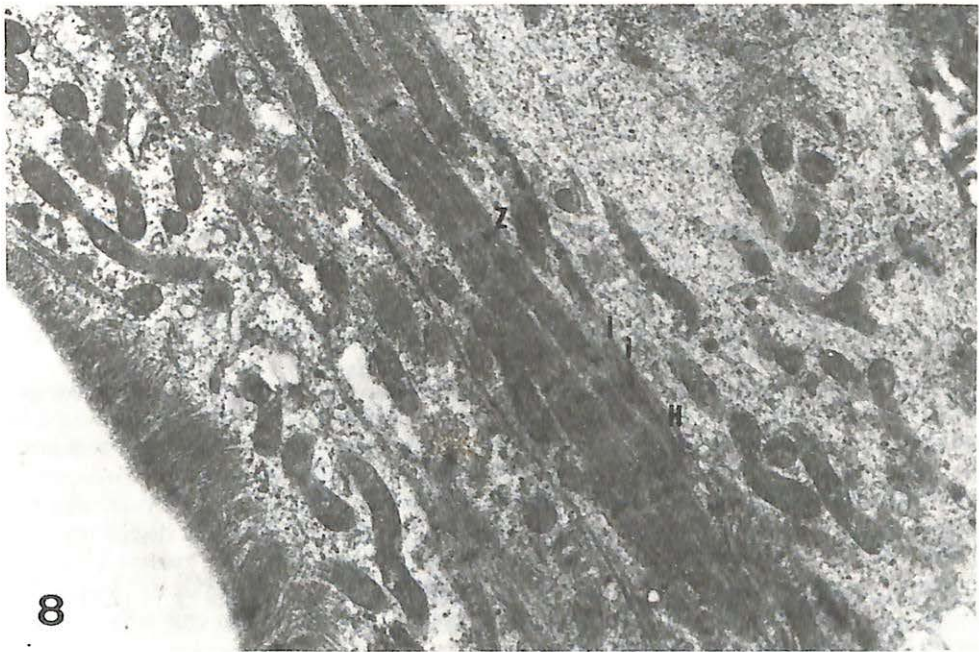
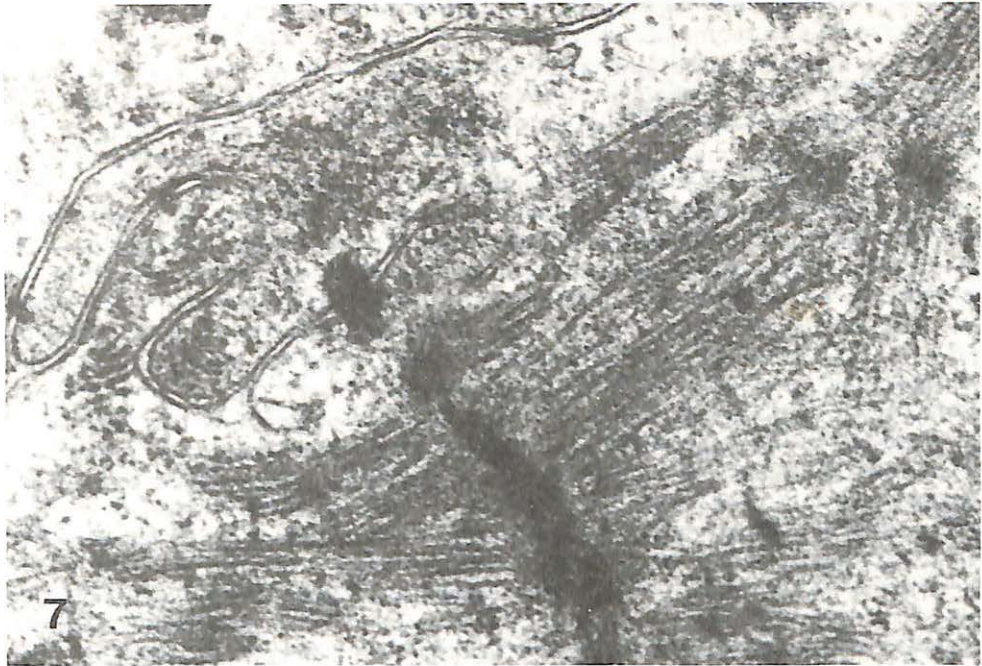
1



2







no. El retículo endoplásmico así como el aparato de Golgi aparecen en regiones pobres en miofilamentos, muy poco desarrollados.

Las cisternas subsarcomerales, como hecho característico de las células musculares cardíacas^{7, 19} también se observan en estos agregados después de 3 días de cultivo.

Algunas células en estas primeras fases de la diferenciación, poseen membranas que limitan estructuras semejantes a sacos conteniendo restos de miofibrillas, mitocondrias y otros orgánulos celulares no identificados. Estos productos parecen ser lisosomas. Se observan también cilios, con centriolos paralelos al eje (Fig. 6), característicos de las células cardíacas en diferenciación¹⁵. Así mismo, es notable la presencia de discos intercalares con desmosomas unidos en el material de estas uniones (Fig. 7). Es de destacar que los desmosomas aparecen con mayor frecuencia a lo largo de la línea de los discos intercalares. Según Nag¹⁹ el gran número de contactos intercelulares en las primeras fases de la agregación representa presumiblemente los lugares de baja resistencia para el acoplamiento eléctrico de estas células.

En algunas células se observan miofibrillas largas, al lado de los núcleos. Sin embargo, los miofilamentos que los forman aparecen adelgazados y muy poco numerosos, con aspecto de haber sufrido una involución. En estas mismas células se observan también gran número de partículas de glucógeno, ribosomas libres y polisomas. Aparecen algunas partículas de glucógeno muy denso a los electrones, mientras que otros no lo están tanto con el mismo proceso de tinción.

A los 5-6 días de cultivo se encuentran células con grandes núcleos que ocupan su mayor parte, si bien, siguen existiendo todavía amplios espacios intercelulares. El citoplasma contiene miofibrillas, a menudo flexuosas, con bandas Z, en general no muy gruesas. No se observa gradiente de diferenciación con respecto a las características citadas para los 4 días de cultivo. El número de miofibrillas con disposición paralela en el citoplasma, sigue siendo muy bajo y no mantienen la misma orientación en las células vecinas, a menos que estén ancladas a un disco intercalar.

El aparato de Golgi, está en general muy desarrollado y frecuentemente circundado de vesículas, de dimensiones variables. Las mitocondrias son también numerosas y dispersas por el citoplasma, presentando a menudo una matriz densa. Se observa, asimismo, abundancia de polirribosomas y gránulos de glucógeno agrupados frecuentemente alrededor de gotas de lípidos.

B. Cultivo de agregados de áreas cardiogénicas tridérmicas, utilizados como controles.

En los cultivos controles se observó que las células cardíacas presentaban mayor grado de diferenciación que los cultivos sin endodermo.

A los 3-4 días de cultivo se observaron mioblastos con numerosas miofibrillas, generalmente alineadas. A los 5 días de cultivo, es de destacar la mayor tendencia a la ordenación longitudinal de los miofilamentos, interrumpidos a intervalos regulares por varias bandas Z, constituyendo ya miofibrillas alineadas en una sola dirección y con varios sarcómeros. Asimismo, se pueden observar bandas A, líneas I y, en algunos casos, incluso la formación de bandas H (Fig. 8). Se observan también discos intercalares caracterizados por ofrecer una imagen ondulante e implicar anchas áreas de membranas celulares, a diferencia de lo observado en las fases iniciales de diferenciación, en que dichas formaciones afectaban a pequeños tramos de membrana y su aspecto era totalmente recto y uniforme.

A la vista de los resultados obtenidos, parece evidente que en ausencia de endodermo, puede iniciarse la diferenciación cardíaca, como demuestra el hecho de haber ob-

servado células con las características propias de los mioblastos cardiacos en los cultivos sin endodermo. En este sentido, Le Douarin¹⁴ señala que, la influencia del área cardiaca, no es específica de esta hoja, ya que toda hoja epitelial (ectodérmica o endodérmica) e incluso un film de colágeno que sustituya a dicho soporte epitelial, es capaz de orientar la diferenciación del mesodermo precardiaco hacia la formación de un tubo cardiaco.

Por otra parte hay que tener en cuenta que los cultivos controles presentan un grado de diferenciación mayor que los cultivos sin endodermo, caracterizado por la presencia de numerosas miofibrillas alineadas en una sola dirección y con varios sarcómeros.

Estos hechos coinciden con los trabajos de Arias, García y Villar², los cuales analizando cultivos de explantes observan cierto grado de diferenciación del mesodermo precardiaco, en ausencia de endodermo.

Sin embargo, es de destacar, que a pesar de la diferenciación estructural de las células cardiacas, no se observa en los agregados la formación de tubos cardiacos típicos. Esto indica que la obtención de las características estructurales del tejido cardiaco no está ligada a la organización morfológica, ya que sin producirse la formación de un tubo cardiaco, las células mesodérmicas precardiacas, son capaces de adquirir una diferenciación estructural típica de los cardiomiocitos. Estos hechos, pueden estar relacionados con la ausencia de endodermo en estos cultivos, que impediría a las células mesodérmicas realizar la emigración desde las áreas laterales. Algunos autores^{5, 13, 26} consideran necesaria la presencia del endodermo para la normal migración de las células precardiacas.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos determinar que los procesos de diferenciación cardiaca analizados en agregados de áreas cardiogénicas, pueden iniciarse en ausencia de endodermo. Sin embargo, el grado de diferenciación alcanzado, corresponde a estadios precoces del desarrollo. Ello, nos permite concluir que la hoja endodérmica es indispensable para que se complete la histogénesis cardiaca, existiendo por tanto una influencia positiva de esta hoja blastodérmica sobre la organización estructural de los cardiomiocitos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ARIAS, M. y VILLAR, J.M. (1987). Correlation between the structural and functional differentiation of chick embryo cardiomyocytes in cellular aggregates. *Acta Anat.*, 128, 129-133.
- 2) ARIAS, M., GARCIA, C. y VILLAR, J.M. (1987). Ultrastructural analysis of chick embryo blastodermis explanted in vitro in absence of endoderm. *Acta Anat.*, 128, 27-32.
- 3) CHACKO, S.K. y ROSENQUIST, G.C. (1974). Emergence of cardiac muscle cells from precardiaco mesoderm. *J. Cell. Biol.*, 63, 5.
- 4) DE HAAN, R.L. (1963). Migration patterns of the precardiaco mesoderm in the early chick embryo. *Exp. Cell. Res.*, 29, 544-560.
- 5) DE HAAN, R.L. (1965). Morphogenesis of the vertebrate heart. In: *Organogenesis*. (De Haan, R.L. and Ursprung, H., eds.), 377-419. Holt Rinehart and Winston. New York.
- 6) EBERT, J.D. (1969). *Desarrollo. Sistemas que interactúan en el desarrollo*. Compañía Editorial Continental. España, 84-101.
- 7) FAUCETT, D.W. y Mc NUTT, N.S. (1969). The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J. Cell. Biol.*, 42, 1-45.
- 8) GARBER, B.; KILLAR, E. y MOSCONA, A.A. (1968). Aggregation «in vitro» of dissociated cells. III. Effect of stage of differentiation of cells on feather development in hybrid aggregates of embryonic mouse and chick skin cells. *J. Exp. Zool.*, 168, 455-472.
- 9) HAMBURGER, V. y HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88, 49-92.

- 10) ICARDO, J.M. (1984). The growing heart: an anatomical perspective. In: Growth of the heart in health and disease, ed. Radovan zak. Raven Press. New York, 41-79.
- 11) ISHIZUYA, A. (1983). Electron microscopical study of self-differentiation potency in the chick embryonic endoderm cultured «in vitro». *Wilhelm Roux's Arch Dev. Biol. Med.*, 10 463-472.
- 12) JIMENEZ COLLADO, J. Y PUCHADES ORTS, A. (1977). Experimental analysis of cardiac regulation in the chick embryo. *Acta Anat.*, 98 62-70.
- 13) LINASK, K.K. y LASH, J.W. (1986). Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev. Biol.*, 114 87-101.
- 14) LE DOUARIN, M.G. (1974). Analyse experimentale des premier stades du developement cardiaque chez les vertébrés supérieurs. *Ann. Biol.*, XIII, 43-50.
- 15) MANASEK, F.J. (1968). Embryonic development of the heart. I. A ligh and electron microscopic stude of myocardial development in the early chick embryo. *J. Morph.*, 125. 329-366.
- 16) MOSCONA, A.A. (1961). Rotation mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interactions «in vitro». *Expl. Cells Res.*, 22. 455-475.
- 17) MOSCONA, A.A. (1973). Cell aggregation. In: *Cell byology in medicine*. Ed. by E.E. Bittar John Wiley and Sons, Inc. New York, 871-910.
- 18) MURILLO-FERROL, N.L.; CLIMENT-PERIS, S. y GOTZENS-GARCIA, V.J. (1978). Secuencia de diferenciación de diversas poblaciones celulares durante las primeras fases del desarrollo. *Actas del X Congreso de la Sociedad Anatómica Española*. Zaragoza.
- 19) NAG, A.C. (1979). Reconstruction of mammalian herat tissue from embryonic heart cell suspension with reference to the aggregation of adult heart cells. *Cytobios*, 23. 199-223.
- 20) ORTS LLORCA, F. (1963). Influence of the endoderm on heart differentiation during the early stages of development of the chick embryo. *Roux's Archiv. Fur Entwicklungsmechanik*, 154. 533-551.
- 21) ORTS LLORCA, F. (1964). Les facteurs determinants de la morphogénèse et la differenciation cardiaque. *Bull. Ass. Anat. Paris*, 49. 4-126.
- 22) RENAUD, D. y LE DOUARIN, G. (1968). Influence de l'environnement issulaire et des conditions de culture sur l'évolution du mesoderm precardiaque de l'embryon de poulet. *C.R. Acad. 5C. Paris*, 276. 431-434.
- 23) SANDERS, E.J. (1986). Mesoderm migration in the early chick embryo. *Dev. Biol.*, Vol. 2. Ed. Leon W. Browder, 449-480.
- 24) STEINBER, M.S. (1963). Reconstruction of tessue by dissociated cells. *Science*, 141. 401-408.
- 25) VILLAR, J.M. (1975). Comportamiento de las células precursoras del corazón disociadas y cultivadas «in vitro». Construcción experimental del tejido cardiaco. *An. Fac. Vet. Zaragoza*, 10. 19-58.
- 26) WIENS, D. y SPOONER, B.S. (1983). Cardiac myogenesis: byosynthetic changes in actin iso-types during heart development. *J. Cell. Biol.*, 91. 351a.
- 27) WOLFF, E. y HAFFEN, K. (1952). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires «in vitro». *Texas Rep. Biol. Med.*, 10. 463-472.
- 28) ZACCHEI, A.M. y GARAVITA, S. (1972). The ultrastructure of chick embryo cardiac myoblasts reaggregated in long term cultures. *J. Embryol. exp. Morph.*, 28. 575-589.