

NOTA SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE CELULAS RETINIANAS DE EMBRIONES DE POLLO, EN CULTIVOS *IN VITRO*.

(CONTRIBUTION TO BEHAVIOR OF CHICK EMBRIO RETINA-CELLS, ON
CULTURES *IN VITRO*).

por

M. BUSTOS RUIZ, A. LOPEZ RUIZ, F. ALCAIN TEJADA y F. PADILLA ALVAREZ*

Los estudios existentes sobre la estructura de la retina, así como las relaciones establecidas entre sus componentes celulares, son diversos y abarcan a muchas especies animales. También se han realizado algunos trabajos muy completos sobre el desarrollo embrionario del ojo, si bien la duda se plantea, en cuanto a la retina se refiere, sobre el momento exacto en que los elementos celulares retinianos se diferencian específicamente. En la mayoría de dichos estudios se han empleado secciones de retina, para el microscopio óptico o electrónico y cultivos *in vitro* de explantos retinianos, pero pocos son los autores que utilizan cultivos celulares de retina disociada.

Por otro lado, hay un hueco en lo que al estudio del desarrollo embrionario de la retina de pollo se refiere, que es el período correspondiente al 8.º día de incubación. Las referencias respecto a diferenciación y proliferación celular llegan hasta el 7.º día y normalmente pasan al noveno, prestando poca atención a los hechos acaecidos en mitad de este período.

Nosotros creemos que es en el 8.º día de incubación cuando se producen ciertos cambios fundamentales en la organización tisular de la retina del pollo, sobre todo en lo que se refiere a la estabilización del número y tipos neuronales.

Naturalmente que el comportamiento de los componentes celulares de retina es distinto en el ojo *in situ*, en explantos cultivados *in vitro* y en cultivos de células disociadas; no obstante este último método es el que aporta más fiabilidad para la determinación de la potencialidad de proliferación celular, así como una más fácil accesibilidad a los diferentes tipos estructurales.

* Departamento de biología. Sección de biología aplicada. C. S. I. C. Facultad de veterinaria Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 15-12-78.

Es cierto que la morfología celular suele variar notablemente cuando las células son cultivadas desconectadas unas de otras, o al menos cuando la organización tisular exacta desaparece, sin embargo esta exigencia de supervivencia fuera de su entorno habitual es la que suele aportar un mejor conocimiento sobre los tropismos intercelulares y sobre la potencialidad de diferenciación y/o desdiferenciación celular, y en especial de los distintos tipos neuronales que son los principales objetivos de este trabajo.

Entre otros, existen dos trabajos, en lo que a desarrollo e histología de la retina se refiere, que consideramos de gran interés a pesar de su antigüedad y que son los publicados por Weyse y Burgess (1906), y Dorris (1918).

Los primeros estudian la histogénesis de la retina en embriones de pollo desde la fase de 56 horas hasta el final de la incubación. En este amplio estudio obtienen 33 conclusiones, de las que entresacamos la que se refiere a las tres etapas bien definidas, por vez primera, de los momentos o períodos de multiplicación celular, reajuste y diferenciación; no obstante el 8.º día de incubación lo hacen coincidir justamente entre el período de multiplicación y el de reajuste, sin significar de manera clara cuáles son los fenómenos celulares acaecidos en ese momento.

Dorris es quizás el primero que trabaja sobre la diferenciación de los componentes oculares *in vitro*. Cultiva explantos de retina sobre plasma y extracto embrionario y con embriones de 1 a 7 días de incubación. Los cultivos se mantuvieron hasta 18 días y realizó en ellos observaciones importantes, concluyendo que la diferenciación de los componentes celulares retinianos *in vitro*, se produce de una forma similar a como lo hacen *in vivo*, si bien hace notar algunas diferencias, como la degeneración de las células ganglionares en cultivo, que no vuelven a diferenciarse de nuevo como tales hasta el 7.º día; en general, indica que si bien al principio del cultivo todos los componentes celulares de la retina se desdiferencian, durante los sucesivos días van adoptando las funciones y formas características estableciéndose finalmente, para las células retinianas en cultivo, el mismo ritmo de diferenciación que en el embrión.

En 1962, Cohen publicó un extenso trabajo sobre la organización de las células retinianas en los vertebrados, haciendo especial referencia a los receptores y al epitelio pigmentario. Este estudio tiene su mayor interés en que es una puesta al día de los conocimientos y trabajos realizados hasta el momento sobre la organización de la retina en distintas especies, si bien sólo cita la paloma doméstica entre las aves.

Mountford (1963) realizó un estudio microscópico-electrónico de lo que denomina *orgánulos filamentosos*, que aparecen en las sinapsis entre los receptores y las células bipolares de la retina de cobayas albinos, estableciendo la aparición de los tres tipos de sinapsis dadas por Sjostrand (1953): alfa, beta y paranuclear. La diferencia entre estos tipos de sinapsis es de tipo estructural y estas diferencias se esta-

blecen o guardan correlación con la cantidad y disposición de estructuras fibrosas que en ellas se encuentran.

Más recientemente, el interés sobre la retina se centra en componentes específicos de ésta. Así, Meller y Gless (1964) determinan, mediante el empleo del microscopio electrónico, algunos aspectos de la diferenciación de las células neuróglícas de Müller, la maduración en el tiempo y las sucesivas modificaciones estructurales de este tipo de células, y concluyen que las células de Müller poseen un alto efecto en la arquitectura íntegra de la retina, formando las membranas limitantes y separando los complejos sinápticos de los receptores y las células bipolares.

Los estudios sobre cultivos celulares de retina disociada parecen ser que prestan especial atención a las células pigmentadas. Eguchi y Okada (1973), trabajando con embriones de pollo de 8'5 días, aíslan clones celulares de la capa pigmentaria de la retina y observan que inicialmente estas células, en cultivo, retenían la capacidad para formar pigmento; después de una serie de pases, generalmente muchas células perdían los gránulos pigmentarios y se diferenciaban en estructuras análogas a cristalinos.

En 1974, Newsonme *et al.* estudiaron el efecto del AMP cíclico y de fracciones Sephadex de extracto de embrión de pollo, sobre el epitelio pigmentado de retina en cultivo de tejidos, y observaron que las células que crecen en F12 exclusivamente o en medio con fracciones de extracto de embrión de pollo de bajo peso molecular, forman unas capas epiteliales compactas, mientras que las que crecen en esas mismas fracciones de alto peso molecular tienen apariencia de fibrocitos y forman monocapas pobremente organizadas.

Rutishauser *et al.* (1975) investigaron los mecanismos de adhesión entre células de retina y células de cerebro en el mismo cultivo y observaron que el número y tipos de uniones varían con la edad en el desarrollo. Estudiaron las relaciones entre células nerviosas e incluso localizaron dos proteínas de la membrana celular responsables de estas uniones. Sin embargo no indicaron exactamente qué tipos celulares se unen o no en cultivos de células disociadas.

Es en 1975 cuando se comienza a prestar una mayor atención a los componentes neuronales de la retina disociada en cultivos celulares. Araki y Okada son los autores que más trabajan en este campo. En 1977 realizan un estudio sobre diferenciación del cristalino y de las células pigmentarias a partir de células neuronales retinianas, utilizando embriones de 3'5 días de edad. Mantienen los cultivos hasta 30 días y observan que el neuroepitelio no diferenciado de 3'5 días puede diferenciarse posteriormente en los cultivos, en componentes neuronales, cristalinos o en células pigmentarias.

Material y métodos.

Aislamiento de la retina.

Para nuestro trabajo hemos empleado embriones de pollo de 8 días de incubación (fases 30-35; New, 1966), que eran colocados en solución de Hank estéril, libre de Ca y Mg, y decapitados. Posteriormente se procedía a la enucleación de los ojos, previa liberación de las membranas meníngeas y conjuntivas. Una vez liberado el ojo se procedía a la separación de la coroides y de la retina neural, procurando que ésta no llevase ninguna traza de epitelio pigmentario.

Los trozos de retina eran lavados en solución de Hank libre de Ca y Mg, e incubados en ella durante 10 minutos a 37° C.

Todas estas operaciones se realizaban asépticamente bajo lupa binocular.

Obtención de la suspensión celular.

Después de decantar la solución de Hank se procedía a la tripsinización del tejido mediante la utilización de bacto-tripsina (Difco) al 0,25 p. 100 en solución de Hank, libre de Ca y Mg, a pH 7,51. Esta operación se realizaba en un baño giratorio a 37° C durante 20 minutos. A continuación se hacían tres lavados con F12 (Ham, 1965) modificado por adición de doble cantidad de aminoácidos y piruvato sódico, procediéndose a la disociación del tejido en este mismo medio. La suspensión celular se obtenía en F12, modificado y suplementado con 10 p. 100 de suero fetal bovino en unos casos y en otros se empleaba MCC (medio cardio-condicionado) obtenido por nosotros según la técnica de Ludueña (1973), modificada por Jordano (no publicada).

Cultivos celulares.

Los cultivos primarios de células disociadas se hacían en placas Corning de 35 mm de diámetro, previamente colagenizadas.

Se usaron tres densidades de siembra: 3×10^6 células/placa, 4×10^5 células/placa y 2×10^5 células/placa.

En unas placas se añadían 3 ml de MCC y en otras, 3 ml de F12 modificado, suplementado con 10 p. 100 de suero fetal bovino (ambos medios a pH 7,7).

Los cultivos se mantenían durante un máximo de 7 días a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5 p. 100, haciéndose cambios de los mismos medios cada 48 horas.

A partir de las 48 horas de incubación y a intervalos que variaban entre 24 y 72 horas, se fijaban los cultivos para su estudio al fotomicroscopio, bien mediante contraste de fases, bien utilizando distintas tinciones histológicas: método de Kluver-Barrera, hematoxilina-eosina y método de Pischinger.

Resultados y discusión.

Cuando la densidad de siembra es alta, es decir superior a 5×10^5 células/placa, y se emplea MCC como medio de cultivo, a las 72 horas de incubación se forma una monocapa confluyente o subconfluyente, que dificulta notablemente la observación e identificación de los distintos componentes retinianos (Lámina I, Figs. 1 y 2).

En su gran mayoría, creemos que el mayor aumento en la población celular corresponde a las células de Müller, que una vez adheridas al sustrato adoptan una conformación poligonal y contactan entre sí mediante filopodios (Lámina I, fig. 8) de tal forma que ellas mismas llegan a formar una red sobre la que los componentes neuronales pueden crecer con más facilidad (Lámina I, figs. 5 y 6). Según esto, estamos de acuerdo con Meller y Glees (1965) en que a los 8 días de edad de los embriones aún no se ha producido la diferenciación total de las células de Müller, ya que la forma de estos componentes no es la característica, y su función de separación de las células nerviosas aún no se ha puesto totalmente de manifiesto. Sin embargo, como a partir del 8.º y hasta el 10.º día de edad se produce en el embrión el denominado período de reajuste, y por otro lado es sabido que muchos tejidos prosiguen su diferenciación cuando se cultivan *in vitro*, hemos observado que en el momento en que la densidad de siembra se reduce a 2×10^5 células/placa, durante las primeras 48 horas de cultivo, aparecen células de Müller con una morfología más parecida a la que poseen al final de la diferenciación total (Lámina I, fig. 12).

Aunque al inocular las placas con la suspensión celular ésta era homogénea, después de 7 días de cultivo se observa un cierto grado de reorganización celular, que en una primera fase suele ser por afinidad entre tipos celulares (Lámina I, figs. 5 y 6). Con posterioridad los cultivos adoptan una configuración de nivel superior, originando islotes de células bipolares, rodeadas por una red compacta de células de Müller (Lámina I, fig. 4).

Estas observaciones coinciden con las efectuadas por Rutishauser *et al.* (1975), ya que como anteriormente se ha expuesto, las uniones y reagrupamientos celulares varían y se configuran con la edad durante el desarrollo.

Cuando las células de retina se cultivan en F12 modificado y suplementado con suero, se observa que a las 24 horas de cultivo aparece gran cantidad de grumos celulares, constituidos generalmente por acúmulos de 6 a 10 células bipolares, y que ocasionalmente pueden ser de mayor tamaño (Lámina II, fig. 3), en las que no se suele observar crecimiento de axones o dendritas hasta transcurridos 3 ó 4 días de cultivo es decir, cuando la neuroglia ha proliferado, o cuando estos grumos asientan en una zona en que las células de Müller proliferan más. En este sentido hemos observado una gran diferencia cuando los cultivos se efectúan en MCC, ya que en este caso estos grupos de células bipolares desarrollan una complicada red de axones a las 24 horas de cultivo (Lámina I, fig. 7); posteriormente, este creci-

miento axónico origina la paulatina desaparición de los acúmulos (Lámina II, fig. 9).

Si el cultivo tiene suficientes días de incubación, la neuroglia llegará a ocupar toda la superficie de la placa, sin embargo, durante bastante tiempo, antes de la total preponderancia de las células de Müller, se mantendrá el reagrupamiento zonal por afinidades morfo-funcionales (Lámina II, fig. 12).

Al igual que ocurre en los cultivos *in vitro* e *in toto* de los ganglios ciliares y simpáticos, cultivados por nosotros (trabajos no publicados), las células neuróglícas, en los primeros días de cultivo, adoptan configuraciones diferentes. Se ven zona, en los cultivos de retina disociada, en donde las células de Müller ofrecen una disposición alargada, y aparecen como paquetes celulares que toman una dirección similar a las líneas de fuerza de un campo electromagnético (Lámina I, fig. 5, flecha). Esta disposición peculiar no aparece siempre y, por lo que hemos podido observar en nuestros cultivos de células retinianas, se sitúan en zonas de transición o separación, donde crecen células bipolares y células de Müller con organización en monocapa confluyente o subconfluyente.

Dada la similitud de estas células con la adoptada por la glía de los ganglios antes mencionados, en cultivo de embriones de pollo y con la disposición de los microtúbulos intercentriolares de los aparatos mitóticos de células en división, nos inclinamos a adoptar la hipótesis de que estas disposiciones son el efecto, a veces, y la causa, otras, que determinan la dirección que han de adoptar en su emigración y/o crecimiento.

Los receptores, conos y bastones, comienzan a diferenciarse entre los 7 y 8 días de edad de los embriones, aunque según Weyse y Burgess (1906), no es sino hasta los 10 días de edad cuando adoptan ya su típica forma.

En cultivos celulares, efectivamente, hasta los dos días de cultivo (10 días si se contabilizan los 8 días de edad de los embriones), no hemos encontrado estructuras más o menos similares a la de los receptores. También aparecen en este caso zonas de crecimiento celular, constituídas casi exclusivamente por estos tipos celulares (Lámina I, figs. 9, 10 y 11; Lámina II, figs. 1 y 2). En los bastones en cultivo la elongación es mayor que si estuviese en su posición natural en el animal intacto, y en ambos extremos se observa la presencia de lamelipodios que ayudan a la célula a adherirse al substrato.

Los conos sí presentan desde el principio una configuración más característica, con el extremo proximal más ancho que el distal. Son receptores los que preferentemente establecen más sinápsis con las células ganglionares (Lámina I, fig. 8, flecha), ya que los bastones suelen aparecer más independizados o solamente relacionándose entre sí.

A veces, puede confundirse con la de un cono ciertas formas que presentan las células de Müller. Esta configuración corresponde a una célula triangular (Lámina I, fig. 12) y con escasa refringencia cuando se observa con contraste de fases; por el contrario, los conos, cuando se emplea esta técnica de iluminación microscópica, siempre presentan una alta refringencia, además de menor tamaño.

Respecto a los componentes neuronales de la retina, hemos observado la preponderancia de las células bipolares, sobre las células ganglionares. Esto no es de extrañar, pues de acuerdo con Araki y Okada (1977), son estas células bipolares las que aún entre los 7 y 8 días de edad del embrión poseen una alta capacidad de reproducción (forman la capa germinativa e incluso nosotros pensamos que a partir de algunas de estas células bipolares indiferenciadas se formarán las células ganglionares).

Las células bipolares, cuando se cultivan en MCC, ofrecen una mayor intercomunicación axónica que cuando se ponen en F12 modificado y con suero (Lámina I, fig. 7).

La hipótesis anteriormente expresada, de que se podrían originar las células ganglionares a partir de algunas bipolares, se apoya en las progresivas modificaciones que van apareciendo en estas últimas conforme avanza el período de mantenimiento en cultivo. Como se puede observar en las figuras 7 y 8 de la Lámina III, aparece en primer lugar una célula que originariamente era bipolar, convertida en tripolar; del mismo modo creemos que pueden aparecer más dendritas y axones cortos que la transformen en una célula multipolar. Además, como se puede observar en dichas figuras, las afinidades tintoriales (Kluver-Barrera) son similares.

De acuerdo con Dorris (1938), al igual que en cultivos explantados de retina, en cultivos de células disociadas, las ganglionares degeneran y terminan desapareciendo casi totalmente a los 4 días de cultivo, si bien hemos observado que aún a los 7 días de cultivo persisten ciertas zonas aisladas y bien delimitadas en las que se localizan neuronas ganglionares (Lámina II, fig. 5, flecha), aunque presentan una forma atípica, cuya característica predominante es la presencia de un citoplasma con abundantes grumos de Nissl (Lámina II, fig. 6).

También hemos observado estos signos de degeneración neuronal en algunas células bipolares (Lámina II, fig. 10), con la aparición de corpúsculos tigroides en algunas de ellas, sobre todo a partir del 5.º día de cultivo; no obstante, se mantiene la forma ovoide, y por supuesto, es mínimo el número en las que aparece tal modificación.

Ocasionalmente hemos visto, con contraste de fases, células muy refringentes con abundantes y finas expansiones citoplasmáticas cortas, que podrían semejarse a células ganglionares, pero podría tratarse de otro tipo celular en mitosis, y esas finas prolongaciones podrían ser filopodios, por lo que no hemos intentado clasificar este tipo estructural (Lámina II, fig. 11).

Resumen.

En el presente trabajo hemos estudiado algunas diferencias que aparecen en cultivos celulares de retina de embriones de pollo, de 8 días de incubación (fases 30-35), según se utilice MCC (medio cardio-condicionado) o F12 (Ham) modificado y suplementado con suero fetal bovino. Se describen aspectos dinámicos y estructurales que acontecen en los distintos componentes celulares durante una semana de cultivo *in vitro*, y también se analizan las diferencias entre cultivos, según la densidad de siembra.

Summary.

In the present study, we have researched some differences between retina-cell cultures of chick embryos 8 days old (stages 30-35) using MCC (heart conditions medium) or modified F12 (Ham) medium supplemented with fetal calf serum.

It describes dynamics and structural aspects that occur in different cell components through one week of culture *in vitro*. Also it reviews the differences between cultures according the seeding density in the inoculate.

Agradecimientos.

Agradecemos al profesor D. Juan García Martín la colaboración prestada en la obtención del material iconográfico.

Bibliografía.

- Araki, M. y T. S. Okada, 1977.—Differentiation of lens and pigment cells in cultures of neuronal retinal cells of early chick embryos. *Developmental Biology*, 60: 278-286.
- Cohen, A. I., 1963.—Vertebrate retinal cells and their organization. *Biol. Rev.*, 38: 427-429.
- Dorris, F., 1938.—Differentiation of chick eye, *in vitro*. *Journ. Exp. Zool.*, 78: 385-415.
- Greep, R. O. y L. Weis, 1975.—Histología. Editorial El Ateneo, S. A. Barcelona.
- Meller, K. y P. Glees, 1965.—The differentiation of neuroglia. Müller-cells in the retina of chick. *Z. Zellforsch.*, 66: 321-332.
- Mountford, S., 1964.—Filamentous organelles in receptor-bipolar synapses of the retina. *J. Ultrastruct. Res.*, 10: 207-216.

- New, D. A. T., 1966.—The culture of vertebrate embryos. Academic Press. London.
- Rutishanser, U. *et al.*, 1976.—Mechanism of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73: 577-581.
- Toyoda, J. y K. Tonosaki, 1978.—Effect of polarisation of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina. *Nature*, 27: 399-400.
- Weyse, A. W. y W. S. Burges, 1906.—Histogenesis of the retina. *American Naturalist*, 40: 611-637.

Iconografía.

Lámina I.

- Figuras 1 y 2. Monocapa confluyente de células de Müller. Contraste de fases brillante. x 100.
- Figuras 3 y 4. Reorganización morfo-funcional de los elementos celulares (cp = células bipolares). Kluver-Barrera. x 40.
- Figuras 5 y 6. Distribución zonal de las células de Müller (cM) y bipolares. Kluver-Barrera. x 50.
- Figuras 7 y 8. Zona de crecimiento de células bipolares (medio de cultivo MCC). Zona con abundantes células de Müller y sinapsis entre éstas y cono (flecha). (fi = filopodios). Pischinger. x 200.
- Figura 9. Receptores retinianos. Cultivo de 24 horas. Hematoxilinosina. x 100.
- Figuras 10, 11 y 12. Conos y bastones (c = cono; b = bastón). Célula de Müller estableciendo sinapsis con acúmulos de bipolares. Contraste de fases brillante. x 200.

Lámina II.

- Figuras 1 y 2. Bastón y cono estableciendo sinapsis con célula de Müller. Cultivos en F12 (Ham) modificado y suplementado con suero fetal bovino. Contraste de fases brillante. x 200.
- Figuras 3 y 4. Grumo de gran tamaño de células bipolares. Grupos de tamaño normal (6-10 células) (flecha). Contraste de fases brillante. x 200.
- Figuras 5 y 6. Cultivo de 7 días en MCC. Núcleo central de células ganglionares. Neurona ganglionar aumentada, con abundantes grumos de Nissl. Kluver-Barrera. Fig. 5, 40. Fig. 6 x 400.
- Figuras 7 y 8. Neuronas. Posible formación de neurona ganglionar (figura 8) a partir de neurona tripolar (figura 7). Pischinger. x 1.000.
- Figuras 9 y 10. Detalle de una red axónica de células bipolares. Degeneración por cromatolisis de una célula bipolar. Kluver-Barrera. Fig. 9. x 400.
Figura 10, x 1.000.
- Figuras 11 y 12. Célula no identificada con abundantes expansiones filopódicas. Aspecto general de la glía en cultivos de 7 días. Contraste de fases brillante. x 100.



