

Histoembriología del urotelio en el desarrollo prenatal de ratas híbridas (BNxWAG).

C.A.Barastegui, J.Rodríguez-Miralles.

Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. C/.Casanova, 143, BARCELONA 08036.

Abstract

Urothelium has been defined as the typical epithelium which lines the excretory urinary tract and which has its own particular structural and functional characteristics.

From the biological point of view attention is drawn to its cellular stability even though it shows great potentiality for cellular transformation.

Urothelium cells are susceptible to neoplastic transformation when exposed to selective toxic substances such as anilines, nitrosamines, etc. However urothelium carcinoma are hardly affected by chemotherapy because of the small proportion of proliferating tumour populations. These characteristics only confirm the problem involved with urothelium lesions, the difficulty of early diagnosis of neoplasias and, from the therapeutic point of view, the disappointing outlook for treatment of neoplasias.

An electron microscope study was performed, with the intention of analysing the principal characteristics of the rat urothelium in the prenatal period (from days 15 to 19). It was performed on samples of the mesonephric duct, urachus and bladder in male hybrid rats (BNxWAG). In the elderly adult phase these animals characteristically demonstrate tumours of the bladder spontaneously arising in almost 20 % of cases.

Interest was focused on each of the subcellular organs, as well as in the boundary of the epithelium by the basement membrane. These results were compared with those of the adult animal.

Introducción

El urotelio es el epitelio de transición del sistema excretor urinario. El nombre de epitelio de transición se debió a la creencia de que representaba un estado intermedio ("de transición") entre el epitelio plano y el cilíndrico.

En realidad ocupa una posición intermedia entre el epitelio pseudoestratificado y el verdaderamente estratificado. Y a pesar de ello, ha sido objeto de controversia en cuanto a la disposición de sus constituyentes celulares, su comportamiento durante el estado de distensión mecánica, así como en lo que se refiere al tipo de recambio celular y diferenciación.

Cabría definirlo como una variedad del epitelio estratificado cilindrico y mantener la denominación de epitelio de transición, mixto o polimorfo, en cuanto que las células que lo componen experimentan cambios de forma y posición según el estado de distensión o contracción del órgano que revisten.

Pero tal vez sería más definitorio el considerarlo como el epitelio que entra en contacto con la orina, esto es, desde el área cribosa de la papila hasta el cuello vesical, pasando por la vejiga, uretra prostática y conductos prostáticos periuretrales, hasta el pene en el varón o la uretra femenina.

RESUMIENDO: Es el epitelio que existe a lo largo de todas las vías urinarias excretoras.

En este sentido, es un epitelio que está continuamente expuesto a procesos infecciosos, traumáticos y neoplásicos y que puede ser objeto de agresión por sustancias tóxicas selectivas. Así, la mucosa vesical es muy inestable por lo que, expuesta a condiciones adversas, sufre ciertos cambios estructurales siguiendo pautas bien definidas, aunque sin relación muy clara entre la influencia nociva y el tipo de transformación. Estos cambios se caracterizan en un principio por displasia y metaplasia, encuadrables entre las lesiones precancerosas, y más tarde por epiteliomas pre-invasores o carcinomas "in situ".

Además, tengamos en cuenta que las neoplasias de la vejiga urinaria son en su mayoría de origen epitelial, si bien en este órgano pueden existir prácticamente todas las variedades de tumores, lo cual hace imposible que podamos atenernos a una sola teoría que pretenda expli

car el conjunto de hechos determinantes de las neoplasias vesicales.

Por otra parte, si bien las células del urotelio no están alineadas en capas bien establecidas, se acepta una distribución topográfica de dichas células en los mamíferos e incluso en el hombre en tres capas: superficial, intermedia y basal.

Este patrón histotopográfico está muy documentado en la literatura y los estudios morfométricos han confirmado la existencia de un modelo de progresiva citodiferenciación, desde la capa basal a la capa superficial (BATTIFORA y Col. 1974).

En nuestro Laboratorio se pretende establecer patrones de diferenciación del urotelio de la rata en distintos periodos del desarrollo.

Para ello, se han estudiado muestras de urotelio en dos tipos de ratas: Sprague-Dawley, rata blanca habitual de laboratorio y de híbridos obtenidos por cruce entre ratas macho Brown-Norway y ratas hembra Wistar (BNxWAG)F1, que en la etapa adulta presentan una alta incidencia de tumores de uréter y vejiga.

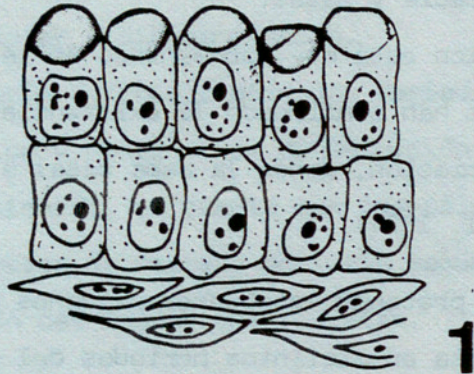
Se pretende con ello analizar las características ultraestructurales que puedan orientar sobre las bases morfológicas del diferente comportamiento tumoral.

Resultados

Siguiendo la sistemática de TRABUCCO (1948) en la descripción histológica del urotelio en el conejo, se pueden distinguir, a lo largo del desarrollo prenatal, varias etapas:

PRIMERA ETAPA. En esta etapa la vejiga urinaria comparte una cavidad común con el intestino (cloaca). En su porción anterolateral desembocan los conductos de Wolff, que todavía están obstruidos. Con respecto a la evolución del epitelio conviene distinguir

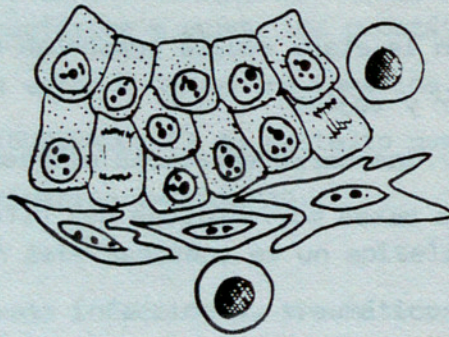
diferentes zonas de implantación de este epitelio:



1

FIG.1. Zona de desembocadura de los conductos mesonéfricos.

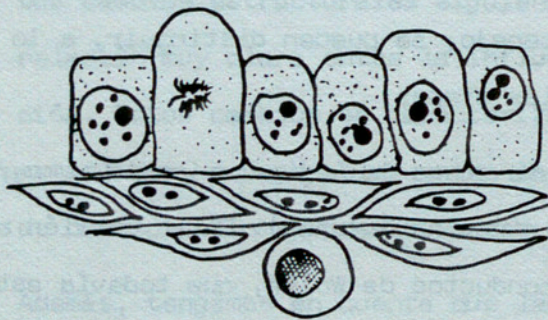
- Células de tipo embrionario
- Mitosis frecuentes
- Buenas uniones intercelulares
- No parece haber membrana basal
- Conglomerado celular desordenado



2

FIG.2. Zona de influencia de los conductos mesonéfricos.

- 2 Filas de células típicas
- No parece haber membrana basal

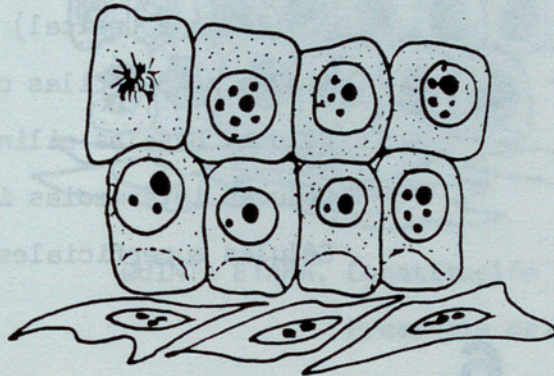


3

FIG. 3. Zona del resto de la cloaca.

- 1 Fila de células entodérmicas
- Células cilíndricas
- Mitosis abundantes
- No parece haber membrana basal
- Núcleo central redondo

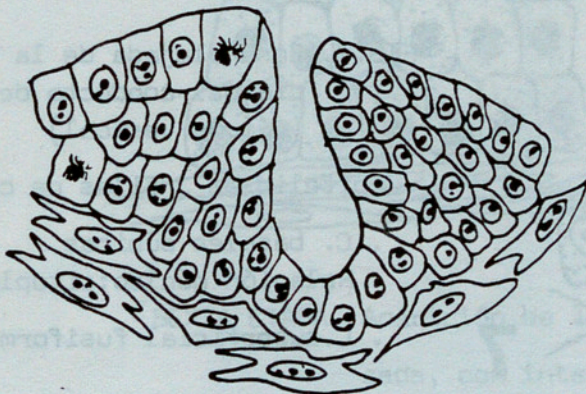
SEGUNDA ETAPA. Los conductos de Wolff muestran una luz patente.



4

FIG.4. Zona alejada de la influencia wolffiana.

- Epitelio netamente entodérmico
- 2 Filas de células
- Células basales grandes
 - . Núcleo apical
 - . Citoplasma granular
 - . Nucleolo evidente
- Células luminales. Mitosis

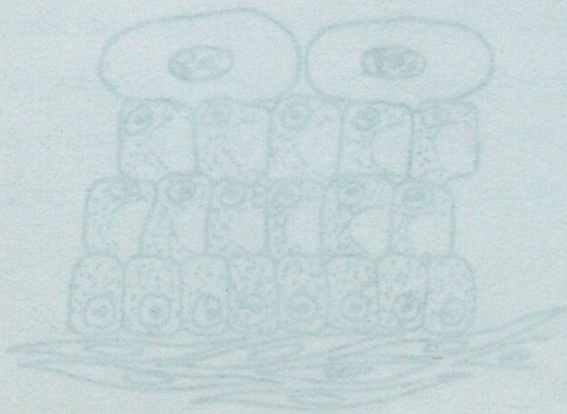


5

FIG.5. Zona de implantación del conducto de Wolff.

- 1 Capa de células diferenciadas
- Núcleo central pequeño
- Nucleolo evidente

Estas células se continúan insensiblemente con las células epiteliales de la zona alantoidea, que está bajo su influencia.

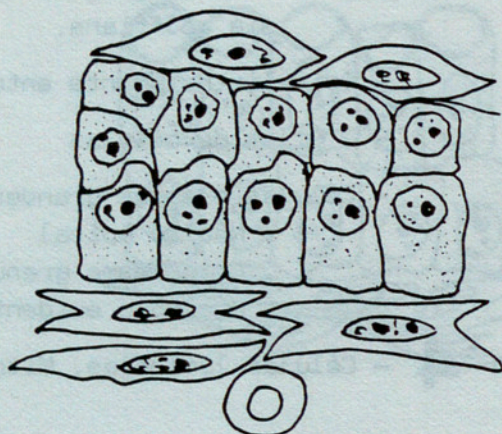


10

FIG.10. C. Interaecio 3-4 hileras

- . Citoplasma claro
- . Núcleo apical
- . C. superficial gigantes

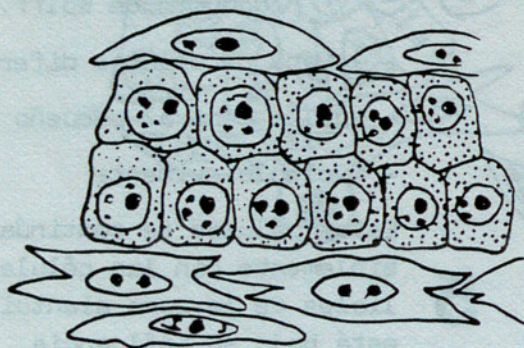
TERCERA ETAPA. En esta etapa tiene lugar la formación definitiva del tabique uro-rectal. La vejiga aún comunica con la alantoides.



6

FIG.6. Zona de influencia del conducto de Wolff. (Trigono vesical)

- Epitelio de 3-4 filas de células
 - . Células basales cilíndricas .
 - . Células intermedias irregulares
 - . Células superficiales fusiformes



7

FIG.7. Zona alejada de la influencia del conducto de Wolff. (Cúpula vesical)

- Epitelio de 3 filas de células
 - . C. basales cúbicas
 - Relación núcleo:citoplasma 1:1
 - . C.superficial fusiforme.

CUARTA ETAPA. Vejiga con paredes epiteliales bien constituidas.

Inicio de formación de la membrana basal.

Se inicia la formación de los haces musculares.

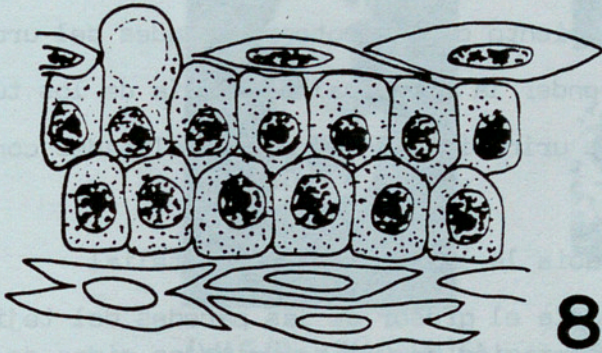


FIG.8. Se distinguen ya las tres capas celulares.

- C. basales. Citoplasma claro
Núcleo centrocélular
- C. intermedias. Pequeñas
- C. superficial voluminosa.

QUINTA ETAPA. Constitución definitiva de la membrana basal.

Presencia de las capas musculares externa y media.

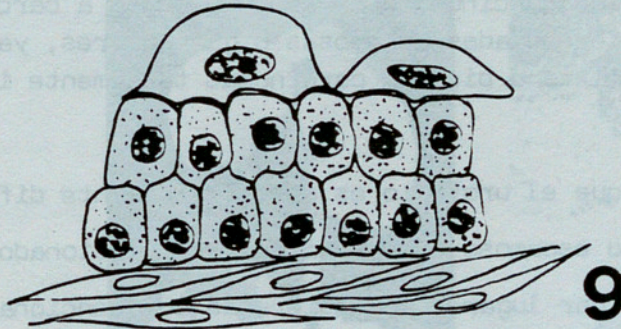


FIG.9. C.basal muy pequeña
Citoplasma fino
Relación núcleo:
citoplasma 1:2
Escasas mitosis

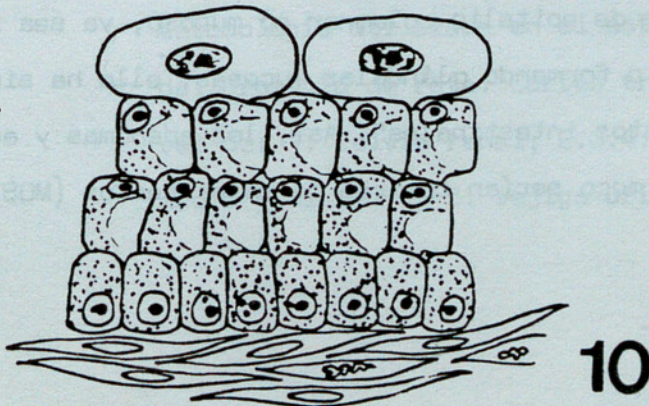
- C. intermedia. 2 hileras
- C. superficiales grandes
Núcleos picnóticos

SEXTA ETAPA. Aparición de la capa submucosa o corion bien organizada, con intensa vascularización.

El epitelio vesical está ya uniformemente unificado.

FIG.10. C.Intermedia 3-4 hileras

- Citoplasma claro
Núcleo apical
- C.superficial gigantes



Discusión

Sólo mediante el conocimiento de las potencialidades del urotelio puede llegarse a comprender la principal patología de los tumores epiteliales de las vías urinarias. Estas potencialidades consisten principalmente en:

- 1.- Proliferación hacia la luz del tejido epitelial
- 2.- Proliferación hacia el grosor de las paredes del tejido epitelial, con formación de los denominados nidos de Brunn
- 3.- Capacidad de cambiar el urotelio normal por un epitelio escamoso, columnar ó cúbico y formar estructuras glandulares, con un contenido mucoso (de aspecto "entérico")
- 4.- Capacidad para formar tumores uroteliales que pueden variar desde células carcinomatosas de transición a carcinomas de células diferenciadas escamosas o glandulares, ya sea en forma pura o mixta o bien en carcinomas totalmente indiferenciados.

Por lo tanto, aunque el urotelio es morfológicamente diferente del cúbico, columnar o escamoso está íntimamente relacionado con ellos de modo que puede dar lugar a cualquiera de los mencionados tipos epiteliales o incluso coexistir con ellos en la misma vejiga.

Todo ello es expresión de la potencialidad del urotelio y un índice del incremento definitivo de la actividad de crecimiento celular. Puesto que la vejiga urinaria deriva principalmente de la cloaca, cuyo epitelio es de tipo columnar mucoso y ocasionalmente se encuentran islotes de epitelio columnar no mucoso, ya sea reemplazando la mucosa o formando glándulas mucosas, ello ha sido interpretado como "restos intestinales". Así, los adenomas y adenocarcinomas con o sin moco serían tumores de tales restos (MOSTOFI, 1945).

Estudio morfológico de la diferenciación "in vitro" de urotelios

V.J. Gotzawa, F. Vilas y A. Tejedor-Mateu

Departament

ria), facult

Abstract

The present

work is

devoted

to the

study

of the

morphology

of the

urothelium

in

vitro

and

its

relation

with

the

in

vitro

and

in

vitro

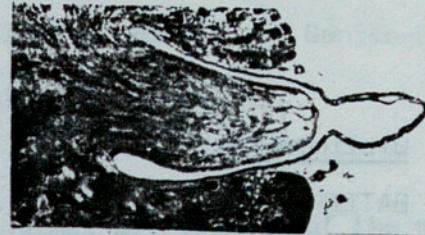
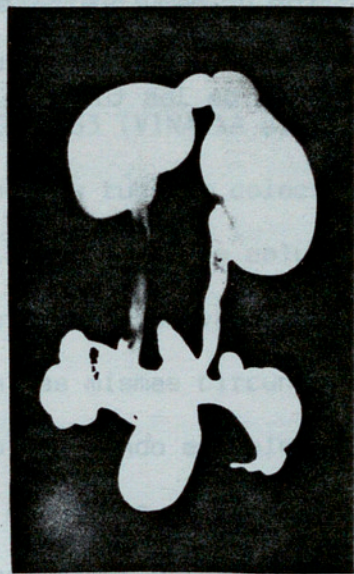
and

in

vitro



(WAG/Rij x BN/BiRij)F₁



1



2



3



4



5

Metodología utilizada en el estudio histológico del urotelio de rata. Cortes transversales a nivel de: 1. Pelvis renal; 2.3.4. Ureter proximal medio y distal; y 5. Vejiga urinaria.

Bibliografía

BATTIFORA, H.; EISENSTEIN, R. y Mc DONALD, J.H. (1964). The human urinary bladder mucosa, an electron microscope study. Invest. Urol. 1:354.

BEGG, R.C. (1930). The urachus, its anatomy, histology and development. J. Anat. 64:170.

BOLHVIS, R.L. (1978). Spontaneous urinary bladder and ureter tumors in the Brown Norway rat. Natl. Cancer Inst. Norog. 49:301-304.

BOORMAN, G.A.; BUREK, J.D. y HOLLANDER, C.R. (1977). Spontaneous urothelial tumors in BN/BI R rats. Am. J. Pathol. 88:251-254.

KHORSHID, M.R. y MOFFAT, D.B. (1974). The epithelia lining the renal pelvis in the rat. J. Anat. 118:561-569.

MELICOW, M.M. (1945). Tumors of the urinary drainage tract: urothelial tumors. J. Urol. 54:186-203.

TRABUCCO, A.E. (1948). Morfogénesis de los tumores de vejiga. Ed. Ateneo. Buenos Aires. pp. 26-60.

Estudio morfológico de la diferenciación "in vitro" del metanefros

V.J. Gotzens, F. Vinaixa y A. Tejedo-Mateu

Departamento de Anatomía Humana (Unidad de Morfología Génito-Urina
ria), Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

Abstract

In this work, we have compared the normal development of the metanephros' collecting tubules of rat embryos with those in "transfilter culture".

We have observed that the tubules are, at first, intrablastemic dense cellular formations that during their development become canalized, at the same time that the epithelial differentiation take place.

Introducción

Diversos estudios morfológicos llevados a cabo en fetos humanos (CELESTINO DA COSTA, 1948; REGNIER y BOUISSOU, 1961 y CORLISS, 1979), han demostrado la existencia de túbulos colectores formados por cordones celulares densos, sin luz aparente.

En 1983 (VINAIXA et al.) determinamos en embriones y fetos humanos que los túbulos colectores proceden de la canalización y diferenciación de cordones celulares densos intrablastémicos. En 1984 (VINAIXA et al.) observamos que en el metanefros de embriones de rata, se dan las mismas circunstancias embriológicas que en el del ser humano, pudiendo establecer, además, dos grandes períodos en la formación de dichas estructuras tubulares en relación a la aparición de las primeras formas nefronogénicas.

Los estudios experimentales hasta ahora llevados a cabo, tampoco han permitido valorar adecuadamente el proceso ontogénico de los túbulos colectores renales.

El estudio de la diferenciación del metanefros mediante técnicas de cultivo "in vitro" fue iniciado por GROBSTEIN (1953, 1955) quien demostró que la interacción inductiva entre diversos tejidos

embrionarios y el blastema metanéfrico del ratón, daba lugar a la formación de estructuras tubulares en dicho mesénquima.

SAXEN et al. (1968) y LOMBARD y GROBSTEIN (1969) demostraron la acción inductora de la yema ureteral sobre el blastema metanéfrico del ratón, pues dicho mesénquima forma estructuras tubulares cuando se combina "in vitro" con la yema ureteral previamente aislada.

En este trabajo, pretendemos estudiar los procesos de diferenciación de las primeras generaciones de ramas del árbol ureteral, antes de la aparición de las primeras nefronas.

Material y Métodos

Hemos estudiado 48 embriones de rata de 11 a 19 días de gestación y realizado 50 cultivos transfiltro de metanefros de embriones de rata de 11 y 12 días de gestación, según la técnica descrita por GROBSTEIN (1953) pero sin utilizar un tejido orgánico como inductor.

Los embriones control fueron fijados en formaldehído neutro al 10%, incluidos en parafina y cortados seriadamente a 10 μ . Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y Azán.

En el estudio experimental, los metanefros se mantuvieron en medio de cultivo (MEM Eagle con sales de Earle y L-Glutamina) adicionando suero equino al 10%, Penicilina G sódica en la dosis de 100 UI/ml y extracto embrionario de pollo.

Los explantes fueron extraídos secuencialmente, en períodos de 24 horas, durante las primeras 96 horas. Se fijaron con glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato 0.2M con pH 7.3 durante 30 minutos y se realizó la post-fijación con tetróxido de Osmio al 1% en tampón cacodilato 0.2M durante 30 minutos. La deshidratación se rea-

lizó con Acetonas y fueron incluidos en Epon.

Se realizaron cortes finos, que se examinaron mediante un microscopio electrónico Philips EM 301. Para microscopía óptica, realizamos cortes seriados de 1 u de los diferentes explantes y se tiñeron con azul de metileno 0.5%.

Resultados

Mediante el estudio de las muestras control, hemos comprobado como existen dos períodos en la formación del arbol ureteral: uno del 11º al 14º día de la gestación durante el cual no se observan formas nefronogénicas y, otro del 14º al 19º día en el que se diferencian las diversas porciones nefronales.

Durante el primer periodo, único por nosotros estudiado en la rata, la ramificación dicotómica del arbol ureteral muestra unas características muy concretas: existe un primer estadio de conglomerado denso, integrado por células indiferenciadas, sin ninguna separación con respecto a las células blastémicas; a continuación, se produce la aparición de la "zona clara", área que permite el aislamiento de lo que será el futuro túbulo del blastema circundante. El inicio de la canalización se demuestra por la aparición en el centro de la "masa interna", debido a fenómenos de lisis, de una hendidura y por la diferenciación de las tres a cuatro capas celulares más periféricas de la "masa interna".

Mediante la utilización de la técnica de cultivo transfiltro, hemos podido valorar los datos anteriormente citados. En los explantes obtenidos a las 24 horas de cultivo, se observan túbulos con un epitelio integrado por siete a diez capas de células indiferenciadas, dispuestas alrededor de una zona central no permeable. Varios hechos resaltan en estos agregados pre-tubulares. A nivel

central, aparece un proceso de muerte celular, gracias al cual aparecerá la luz tubular. Periféricamente, observamos que no existe una membrana basal, sino una malla amorfo-filamentosa que se extiende entre las células blastémicas y las epiteliales. Por otra parte, en la superficie celular basal no existen interdigitaciones ni pliegues de las membranas plasmáticas celulares; por el contrario, en las células superficiales aparecen unos complejos de unión más largos de lo habitual.

En los explantes de 48 a 96 horas, se van a producir los cambios necesarios para la formación del epitelio y luz tubular. El hecho más destacable en este período, es la adquisición de la estructura tubular definitiva debido a la existencia de unos procesos de remodelación basal y luminal.

En los cultivos de 72 horas, cuando aparecen túbulos permeables con un epitelio simple, se produce la diferenciación de las células epiteliales. Mediante MET vemos unas células más electrodensas que otras. Además, aparecen formaciones ciliadas en las células menos electrodensas, lo que nos lleva a considerar la existencia de las denominadas "células claras o ciliadas" y "oscuras o no ciliadas".

Simultáneamente se produce la diferenciación de la membrana basal, pasando por la forma unilaminar discontinua, unilaminar continua y trilaminar típica.

En los explantes de 96 horas, continuamos apreciando la existencia de túbulos indiferenciados junto con la formación de bifurcaciones tubulares y estructuras ampulares.

Discusión

El estudio de los resultados obtenidos mediante nuestras ex

periencias, demuestra que el metanefros del embrión de rata cultivado "in vitro" en ausencia de otra fuente inductora que no sea la yema ureteral (SAXEN, 1970), prosigue su morfogénesis característica.

Basándonos en los trabajos de OSATHANONDH y POTTER (1963), POTTER (1974), EKBLUM et al. (1980) y EKBLUM et al. (1981) llevados a cabo en embriones y fetos humanos y de ratón, creemos que las formaciones tubulares observadas en nuestros explantes son elementos derivados de la yema ureteral y no estructuras que representen esbozos de la porción secretora de los túbulos uriníferos.

La presencia de condensaciones celulares densas intrablastémicas, que con posterioridad se canalizarán diferenciando su epitelio, refuerza las teorías de REGNIER y BOUISSOU (1961) y VINAIXA et al. (1982, 1983) sobre la existencia en fetos humanos de esbozos tubulares formados por cordones densos, sin luz aparente.

Creemos que en cualquier momento de la formación de las diversas generaciones de ramas tubulares, existe una primera fase de conglomerado celular denso pre-tubular seguido de unos cambios morfológicos para la adquisición de la estructura epitelial definitiva.

Por otra parte, la no existencia de una membrana basal alrededor de los agregados pre-tubulares, nos permite estar de acuerdo con SAXEN et al. (1968) para quienes no aparece tal estructura rodeando las células indiferenciadas. Sin embargo, EKBLUM et al. (1980) y EKBLUM et al. (1981) tanto "in vivo" como "in vitro" hallan una glicoproteína (laminin) alrededor de las ocho a diez capas de células indiferenciadas, probable elemento precursor de la membrana basal.

En cuanto a la existencia o no de dos tipos celulares distintos (células claras y oscuras) en el epitelio de los túbulos dife-

renciados, nuestras observaciones no concuerdan con las de MINUTH y KRIZ (1982) para quienes no aparecen elementos parecidos a las células oscuras en cultivos de metanefros. Igualmente, creemos que es difícil mantener las tesis de CLARK (1957) y KOMENDER et al. (1967) de que hasta el 1º o el 15º día post-parto, respectivamente, no aparecen tales tipos celulares.

La evolución tanto de los pliegues de las membranas plasmáticas celulares como de los complejos de unión, creemos tiene una gran importancia a la hora de establecer la morfología definitiva de la pared tubular, produciendo un incremento de la adhesividad celular.

Bibliografía

CELESTINO DA COSTA A. (1948). *Eléments d'embryologie*. Masson. Paris.

CLARK S.L. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 3, 349-360.

CORLISS C.E. (1979). *Embriología Humana de Patten*. El Ateneo. Buenos Aires.

EKBLOM P., ALITALO K., VAHERI A., TIMPL R., SAXEN L. (1980). Induction of a basement membrane glycoprotein in embryonic kidney: possible role of laminin in morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 485-489.

EKBLOM P., MIETTINEN A., VIRTANEN I., WAHLSTROM T., DAWNAY A., SAXEN L. (1981). In vitro segregation of the metanephric nephron. Dev. Biol. 84, 88-95.

GROBSTEIN C. (1953). Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse. Science 118, 52-55.

GROBSTEIN C. (1955). Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. J. Exp. Zool. 130, 319-340.

KOMENDER J., GOSNIAK E., KOZAKIEWICZ R. (1967). Differentiation of dark cells in the renal collecting tubules of rats. Bull. Acad. Pol. Sci. 15, 571-575.

LOMBARD M., GROBSTEIN C. (1969). Activity in various embryonic and postembryonic sources for induction of kidney tubules. Dev. Biol. 19, 41-51.

MINUTH W.W., KRIZ W. (1982). Culturing of renal collecting duct epithelium as globular bodies. Cell. Tissue Res. 224, 335-348.

OSATHANONDH V., POTTER E.L. (1963). Development of the human kidney as shown by microdissection. III. Formation and interrelationship of collecting tubules and nephrons. Arch. Pathol. 76, 290-302.

POTTER E.L. (1974). Anomalías Renales. Pediátrica. Barcelona.

REGNIER C.L., BOUISSOU H. (1961). Etude histologique et electronique de l'embryologie du rein. Arch. Fran. Ped. 18, 65-82.

SAXEN L., KOSKIMIES O., LAHTI A., MIETTINEN H., RAPOLA J., WARTIOVAARA J. (1968). Differentiation of kidney mesenchyme in an experimental model system. Advan. Morphog. 7, 251-293.

SAXEN L. (1970). Failure to demonstrate tubule induction in a heterologous mesenchyme. Dev. Biol. 23, 511-523.

VINAIXA F., TEJEDO A., RUANO D. (1982). Proceso de recanalización de los túbulos colectores durante el desarrollo embrionario. Su importancia clínica. XI Congr. Soc. Anat. Esp. Libro de actas pag. 44 Barcelona.

VINAIXA F. (1983). Proceso de recanalisation des tubes collecteurs rénaux pendant le développement embryonnaire humaine. LXVI Congr. Ass. Anat. Libro de actas pag. 58. Barcelona.

VINAIXA F., GOTZENS V.J., TEJEDO A. (1984). Etude comparative du développement tubulaire renal dans les embryons humains et de rat. LXVII Congr. Ass. Anat. Libro de actas pag. 102. Rennes.