

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). Proces de recanalisation des tubes collecteurs rénaux pendant le developpement embryonnaire humaine. LXVI Congr. Ass. Anat. Libro de actas pag. 58. Barcelona.

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