

Mantenimiento y regeneración de la cresta apical del esbozo de miembro de pollo, cultivada *in vitro**

Maintenance and regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick limb bud, cultured *in vitro*

O. GOICOECHEA, E. MOLINARI, B. JORQUERA

Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia
(Recibido para publicación el 14 de noviembre de 1975)

GOICOECHEA, O.; MOLINARI, E.; JORQUERA, B. Mantenimiento y regeneración de la cresta apical del esbozo de miembro de pollo, cultivada *in vitro*. (Maintenance and regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick limb bud, cultured *in vitro*). Arch. Biol. Med. Exper. 11:92-96, 1978.

Extracts of chick limb buds have shown the ability to maintain the apical ectodermal ridge of the limb bud, and to regenerate it when involution has occurred in a non limb mesoderm extract; this regeneration took place only in the primitive region of the ridge.

APICAL RIDGE REGENERATION LIMBS CHICK EMBRYO

Diversos trabajos (1-6) muestran que, durante la morfogénesis del miembro, la cresta apical epiblastica tendría una influencia inductora en la determinación próximo-distal continua de los diferentes segmentos del miembro. La cresta sería inducida primeramente por el mesoblasto subyacente durante una etapa precoz del desarrollo, y ella se mantendría ulteriormente a causa de la presencia de un "factor de mantenimiento" de la cresta, que existiría en el mesoblasto del miembro, y se repartiría asimétricamente y se transmitiría en el sentido próximo-distal.

Por otra parte, Amprino y sus colaboradores (7-9) afirman que la formación del engrosamiento apical del ectodermo, su mantenimiento y las modificaciones graduales de su configuración, dependerían del crecimiento diferencial del ectodermo en relación con el mesodermo subyacente. Se produciría un deslizamiento próximo-distal de la capa ectodérmica del miembro, a consecuencia del cual se formaría un engrosamiento del ectodermo sobre el borde libre, donde se reúnen las dos caras opuestas del esbozo. De esta manera la presencia de la cresta no dependería de la acción inductora y de manteni-

miento generada por factores mesodérmicos presentes en el esbozo de miembro.

En relación con este problema, realizamos experimentos para responder a las siguientes interrogantes:

¿Existe en extractos de miembro algún factor capaz de mantener la cresta una vez que ella está diferenciada, o de regenerarla luego que ella ha involucionado?

¿Hay en el ectodermo del miembro sólo una zona competente para la formación de la cresta?

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron embriones de pollos Leghorn híbridos. Los estados de desarrollo se precisaron según la tabla de Hamburger y Hamilton (10). Se cultivaron epiblastos de esbozos de patas, en estado 21, en los medios A y B durante tiempos diferentes.

OBTENCIÓN DE LOS EPIBLASTOS

Se sometieron esbozos de patas seccionadas a nivel de la base, a la acción de tripsina Merck 20.000 U/g, durante 20 minutos a 40°C.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS A Y B

Estos extractos se obtuvieron respectivamente de esbozos de miembro y de segmentos de la región dorsocaudal seccionados de embriones en estados 19-20, 21-22, 23-24. Los ex-

*Proyecto de Investigación C-3, de Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

tractos se preparan por maceración, dilución en solución de Tyrode (1:2) y centrifugación durante 20 minutos a 10.000 rpm.

OBSERVACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL MESOBLASTO DEL MIEMBRO PARA MANTENER Y REGENERAR LA CRESTA

Para este fin se cultivaron calotas epiblasticas (Estado 21), en tres series experimentales diferentes (tabla 1):

- En el medio A, durante 4, 8, 12, 16, 20 y 24 hrs.
- En el medio B, durante 4, 8, 12, 16, 20 y 24 hrs.
- Primeramente en el medio B, durante 8 y 12 hrs., luego en el medio A durante 8 y 12 hrs.

En cada una de estas series se cultivaron 6 epiblastos,

que se fijaron en solución de Bouin acético y se cortaron en series ($5 \mu\text{m}$) y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

Además 10 epiblastos cultivados en condiciones similares a la serie c se reasociaron con el segmento mesoblástico distal del esbozo de pata estado 21. Esta recombinación se injertó sobre embriones huéspedes del mismo estado.

ESTUDIO DE LA COMPETENCIA TERRITORIAL DEL EPIBLASTO DEL MIEMBRO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LA CRESTA

De una serie de 15 calotas epiblasticas desprovistas de su cresta mediante incisión quirúrgica, 10 se cultivaron durante 16 horas en el medio A y las otras se fijaron de inmediato con el objeto de verificar histológicamente la precisión del corte.



- Borde marginal de esbozo de pata estado 21, con su cresta epiblastica (320 \times).
- Epiblasto de esbozo de pata estado 21, disociado de su componente mesoblástico (320 \times).
- Epiblasto de esbozo de pata estado 21, cultivado en estrato de miembro (21-22) durante 12 horas (320 \times).
- Epiblasto de esbozo de pata estado 21, cultivado en extracto de región dorso-caudal (21-22), durante 8 horas (320 \times).
- Epiblasto de esbozo de pata estado 21, cultivado con recambio del medio a las 12 horas (320 \times).
- Embrión con pata obtenida luego de la reasociación entre el segmento mesoblástico distal del esbozo de miembro y el epiblasto con la cresta reconstituida.

RESULTADOS

Cultivos en extracto de miembro (tabla 1, serie a)

En todos los tratamientos, la presencia de la cresta fue constante y sin diferencias con respecto al medio ni al tiempo de incubación. El engrosamiento apical tenía 10 estratos nucleares y una altura total de $49 \mu\text{m}$, mientras que el resto del epiblasto tenía 5 estratos nucleares y una altura total de $19 \mu\text{m}$. El aspecto histológico de las células fue normal, salvo algunos elementos picnóticos en el borde de la incisión.

Cultivos en extracto de región dorso-caudal (tabla 1, serie b)

En todos los cultivos la uniformidad del número de capas celulares en toda la extensión del

epiblasto, incluyendo el borde apical, indica la involución de la cresta. La calota epiblastica presenta regularmente 5 estratos nucleares con una altura total de $19 \mu\text{m}$. El aspecto normal de las células, en las zonas donde estaba la cresta, muestra que no es posible afirmar que hay un proceso degenerativo de la cresta, sino más bien un aplanamiento de esta región.

Cultivos con recambio del medio (tabla 1, serie c)

La recuperación de la cresta fue uniforme en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. La altura y el número de las capas celulares fueron iguales a aquellas de calotas epiblasticas mantenidas en cultivo con extractos de miembro.

Esta cresta reconstituida aparece como fun-

TABLA I

Serie a

Cultivo en el medio A

Estados del medio	Tiempos de cultivo					
	4	8	12	16	20	24
19-20	+++	+++	+++	-++	+++	+++
	+++	+ - +	+++	+++	+++	+++
21-22	+++	+++	+++	+++	+++	-++
	+ - +	+++	+ - +	+++	+++	+++
23-24	+++	-++	-++	+++	+++	+++
	-++	+++	+++	-++	-++	+++

Serie b

Cultivos en el medio B

Estados del medio

Tiempos de cultivo

Estados del medio	Tiempos de cultivo					
	4	8	12	16	20	24
19-20	---	---	---	---	---	---
21-22	---	---	---	---	---	---
23-24	---	---	---	---	---	---

Serie c

Cultivos con cambio de medio

Estados del medio

Medio B 8 h

Medio B 12 h

medio A 8 h

medio A 12 h

19-20	+++	+++
	+++	+++
21-22	+++	+++
	+++	+ - +

+ Presencia de la cresta de Saunders.

- Ausencia de la cresta de Saunders.

cional, puesto que reasociada al mesoblasto del miembro del estado 21, desprovisto de su cubierta original, produjo la diferenciación de estructuras distales en 6 casos de las 10 reasociaciones injertadas.

Ablación quirúrgica de la cresta de Saunders

Las calotas epiblasticas privadas del borde apical y cultivadas en medio A, no mostraron neoformación de la cresta.

Testigo de miembro completo (estado 21)

El epiblasto asociado normalmente al mesoblasto, presentaba a nivel de la cresta bien localizada, 6 estratos nucleares de una altura total de 25 μm y en los costados dorsal y ventral, una altura de 3 estratos nucleares de 5 μm .

Testigo de calota epiblastica (estado 21) disociada del mesoblasto

Se observaron cambios morfológicos acentuados en relación al epiblasto del miembro completo, a saber: la cresta se desplazaba fuera de los límites del borde apical de la calota, disminuyendo progresivamente su espesor hacia los costados dorsal y ventral. El espesor máximo localizado en el borde libre de la calota tenía 11 estratos nucleares de 49 μm de altura total. Las regiones de los costados dorsal y ventral, más alejadas de la cresta, tenían estratos nucleares y una altura total de 20 μm .

DISCUSION

Las condiciones de cultivo *in vitro* a que se sometieron los epiblastos, permiten observar las modificaciones de la cresta de Saunders en una

calota ectodérmica desprovista de substrato mesodérmico.

La calota ectodérmica del miembro permaneció viable en los dos medios, por lo menos 24 horas. Sin embargo, la cresta mostró una sensibilidad diferente, pues en el extracto de la región dorso-caudal involucionó invariablemente, mientras que bajo la influencia del extracto de esbozo de miembro se regeneró y persistió.

La formación y persistencia de la cresta no dependería del hecho que las células epiteliales se aglomeren a nivel del borde libre por un crecimiento de superficie y un deslizamiento próximo-distal sobre el mesénquima subyacente, puesto que la cresta se regenera y subsiste en un medio líquido privado de organización celular, lo que indica más bien que depende de factores mesodérmicos presentes en el esbozo del miembro.

Nuestros resultados concuerdan en parte con los obtenidos por Searls y Zwilling (11), quienes demostraron que los epiblastos de miembro cultivados en presencia de fragmentos mesodérmicos mantienen o regeneran la cresta. El hecho que en nuestros cultivos en extracto de miembro no se observara involución temporal de la cresta, podría explicarse suponiendo que la concentración del factor de mantenimiento es constante desde el comienzo del cultivo, mientras que en los cultivos de calotas que poseen en su interior fragmentos de mesodermo de miembro, la concentración óptima del factor de mantenimiento se alcanzaría sólo después de 20 horas.

En las experiencias de ablación de la cresta no se detectó formación de cresta a nivel de las zonas adyacentes a la incisión, lo que sugiere que sólo el borde apical de la calota epiblastica, posee la capacidad de regenerar una nueva cresta. Un relieve marginal, a veces muy aparente, corresponde a la coalescencia de los bordes del corte y no debe ser interpretado como un proceso proliferativo generador de una verdadera cresta.

Los testigos mostraron que la conformación del epitelio del miembro asociado normalmente al substrato mesodérmico era diferente a aquella de las calotas disociadas. En este último caso, hubo un aumento de capas celulares del epiblasto tanto a nivel de la cresta como a nivel de las caras dorsal y ventral de la calota, lo que ha sido utilizada para evaluar las modificaciones

producidas en las calotas epiblasticas cultivadas en los diferentes medios.

De acuerdo con nuestros resultados, se puede responder de la siguiente manera a las dos interrogantes propuestas:

En el extracto del esbozo de miembro existiría un factor capaz de mantener la cresta sin modificaciones evidentes, por lo menos durante 24 horas; y de regenerarla luego que la cresta ha involucionado previamente en un extracto ajeno al miembro.

La regeneración de la cresta se produciría solamente en el mismo lugar que ocupaba primitivamente.

SUMMARY

The hypothesis presented by Saunders, Zwilling and Hampé, which states that the apical ectodermal ridge of the limb bud exerts an active inductive influence for the continuous distal determination of the different segments of the member, and the dependence of this structure to the underlying mesoderm; led us to perform an experimental research in order to answer the following questions: is there a factor in limb extracts able to maintain or regenerate the ectodermal ridge? or, is there in the ectoderms a definite zone where the ectodermal ridge can be formed?

For this purpose limb buds ectoderms (stage 21) were cultivated in the following experimental series:

- a) Culture in members extract, obtained from chick embryos stage 19 to 24, during 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours.
- b) Culture in dorsal and tail extract obtained from chick embryos stage 19 to 24, during 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours.
- c) Culture for 8 and 12 hours in dorsal and tail extract, and afterwards passed for the same period of time to the member extract.
- d) Culture in members extract, prior surgical elimination of the apical ridge.

The ridge disappeared in the limb buds ectoderms cultivated in dorsal and tail extracts and it continued with slight variations in cultivations in member extract. In the limb buds ectoderms with a medium interchange, the apical ridge flattened at the beginning, but after 8 hours of

cultivation in member extract, it regenerated again. In cultivated limb buds ectoderms with a previous surgical cutting of the ridge, a neofor-
 mation of the ridge, was not found.

These results support that the maintenance of the apical ridge is based upon mesodermic factors which are present in the member extract. Moreover these factors have the capacity to regenerate a new ridge in the same place were the first one was placed. They show also that the limb bud ectoderm has only one definite area in wich a ridge can be formed.

REFERENCIAS

1. SAUNDERS, J.W., Jr., *Anat. Rec.*, 125:567-568, 1949.
2. SAUNDERS, J.W., Jr., GASSELING, M.T., *Develop. Biol.* 7:64-78, 1963.
3. ZWILLING, E., *J. Exptl. Zool.* 132:173-187, 1956.
4. ZWILLING, E., *J. Exptl. Zool.* 132:241-253, 1956.
5. ZWILLING, E., *Advanc. Morphogenesis* 7:301-330, 1961.
6. HAMPE, A., *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl.*, 48:345-478, 1959.
7. AMPRINO, A., *Bull. Soc. Zool. France* 91:274-294, 1966.
8. AMPRINO, R.M., CAMOSSO, M., *Roux Arch.* 152: 509-541, 1958.
9. AMPRINO, R., AMBROSI, G., *Arch. Biol. (Bruxelles)* 84:35-86, 1973.
10. HAMBURGER, V., HAMILTON, H., *J. Morphol* 88:49-92, 1951.
11. SEARLS, R. L., ZWILLING, E. *Develop. Biol.* 9:38-55, 1964.