

Efecto de los estrógenos y de otras sustancias químicas sobre la miogenesis de músculo estriado *in vitro*

J. R. Vázquez de Prada

Departamento de Bioquímica y Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad. Valladolid

(Recibido el 26 de octubre de 1971)

J. R. VAZQUEZ DE PRADA. *The Effect of the Estrogens and Other Chemical Agents on Myogenesis of Striated Muscle in vitro. R. esp. Fisiol.*, 28, 85-90. 1972.

It has been studied the effect of different chemicals on heart muscle cells from chicken embryos cultured in Eagle's medium with 10 % Fetal Bovine serum.

The cultures incubated with estrogens showed very poor growth and the cells look damaged.

Potassium chloride added to the medium to give 800 mg/l as final concentration improved the growth, but not the cells differentiation. The cultures to which was incorporated the potassium enriched medium get an optimum growth 24 hours before that controls, at least. Highest concentrations of potassium chloride don't gave best results.

Se sabe que el tejido muscular cultivado *in vitro* tiene numerosos requerimientos nutritivos (7). Uno de los necesarios, y también para muchos otros tipos celulares, es el suero. Durante el curso de unos estudios sobre el papel de los estrógenos en la síntesis de mioglobina, llegó a ser interesante determinar el efecto de estas y otras hormonas sobre el crecimiento y la diferenciación de cultivos de tejido muscular estriado. Luego, y con el mismo propósito, el trabajo se extendió a distintas clases de sustancias químicas que, de alguna manera, están relacionadas con la normal función o con la estructura del propio tejido muscular.

Material y métodos

PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS. Uno o dos corazones de embriones de pollo de 18 días de edad eran colocados en una pequeña placa de Petri y perfundidos con solución salina-glucosada de Earle (desprovista de calcio y magnesio). Después de tres lavados sucesivos en solución de Earle, se añadían 5 ml de una solución enzimática. Esta solución se componía de tripsina (Worthington) al 1 % en solución de Earle (sin calcio y magnesio). El o los corazones, en la solución enzimática, eran triturados con una hoja de afeitar estéril y colocados a 38° durante 30 a 45 minu-

tos. En este período, la suspensión de células era succionada muy suavemente varias veces con una pipeta tipo Pasteur de amplio orificio capilar para ayudar a la disociación de las masas celulares sin dañarlas. Unos minutos antes de dar por finalizada esta etapa, se añadía una diminuta cantidad de varidasa en polvo, que convertía a la suspensión de células muy gelatinosa en una suspensión manejable. Esta suspensión formada por células y pequeños agregados celulares era transferida a un tubo cónico de centrífuga de unos 15 ml después de haber puesto en la suspensión 0,5 ml de una solución de inhibidor de tripsina al 10 %. El volumen final de la suspensión se llevaba a 10 ml con solución salina-glucosada de Earle (sin calcio y magnesio). Al cabo de 5 minutos, los agregados de células han sedimentado y el sobrenadante es pasado a otro tubo y usado como *inoculum*. La suspensión final contenía células musculares abundantes, algunas células rojas y algunos fragmentos o *globus* de células.

Un *inoculum* de 0,05 ml de la suspensión final (con 3 a 5×10^5 células) se añadían a un vial (18 \times 60 mm) conteniendo 1 ml de medio de crecimiento y un cubre redondo de vidrio (*cover slip*) de 16 mm de diámetro. El vial fue cubierto con una ligera cápsula de aluminio.

Los viales se incubaban en una estufa de cultivos, 37° y atmósfera de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂. El primer examen del cultivo se hacía a las 24 horas en un microscopio Zeiss de contraste de fase. Al mismo tiempo, se renovaba el medio de crecimiento de todos los viales, añadiendo uno recién preparado. Inmediatamente se efectuaba la adición de los distintos compuestos químicos. Un mínimo de 8 viales eran utilizados para una misma dosis de un determinado compuesto en cada experimento. Cada 24 horas y sucesivamente, dos viales controles y dos de cada compuesto investigado eran examinados microscópicamente. Cada cultivo era estudiado por un período de una semana, con

un mínimo de cien viales (diez como controles y el resto experimentales).

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO. Solución de EAGLE (2), con antibióticos (estreptomocina, 0,05 ml %; penicilina, 0,25 ml %, y micostatina, 0,25 ml %). A este medio, llamado medio completo de Eagle, se añadían, finalmente, glutamina (1 %); suero fetal bovino (10 %), y rojo fenol como indicador (0,5-0,6 ml de una solución al 1 %).

COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN SALINA-GLUCOSADA DE EAGLE. En mg/l: ClNa (6.800); ClK (400); glucosa (1.000); Cl₂Ca (200); CO₃HNa (2.200); PO₄H₂Na·H₂O (140); SO₄Mg·7H₂O (200), y rojo fenol (10).

En la tabla I se señalan los compuestos químicos utilizados y sus concentraciones respectivas.

Resultados

EFFECTO DEL POTASIO. Los primeros cultivos se hicieron en medio completo de Eagle, el cual contiene una concentración de cloruro de potasio de 400 mg/l de solución. En estas condiciones, las células alcanzaban un buen grado de desarrollo hacia el cuarto día, apareciendo ya las preparaciones en sus tres cuartas partes cubiertas de células. Sólo en las primeras 24 horas fue posible ver movimientos contráctiles aislados a algunas células de cada preparación. Sin embargo, tal actividad era la imperceptible a las 48 horas, aunque las células presentaron un aspecto sano a lo largo de todo el cultivo, el cual duraba unos 7 días.

Estriaciones en las células se empezaban a hacer visibles de una forma esporádica entre las 60-72 horas, eran más numerosas al día siguiente, coincidiendo con el momento de buen crecimiento de las células, para empezar ya a disminuir posteriormente, siendo prácticamente imposible distinguirlas hacia el 6.º-7.º día del cultivo. En el mejor cultivo, de cien

Tabla I. *Relación de los compuestos químicos añadidos a los cultivos de células musculares cardíacas de embriones de pollo.*

Las sustancias eran incorporadas al cultivo después de las primeras veinticuatro horas de incubación y previa renovación del medio de crecimiento. Una cantidad equivalente del disolvente empleado en cada caso fue añadida a los controles.

Producto	Concentración	Cantidad (λ) añadida a cada vial	Producto	Concentración	Cantidad (λ) añadida a cada vial
Cl,Ca	20 mg/ml H ₂ O	10 y 20	Fenilalanina	4 mg/2 ml	10
ClK	40 mg/ml	10 y 20	Acido aspártico	10 mg/2 ml	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	20 mg/ml	10 y 20	Asparagina	8 mg/2 ml	10
Citrato sódico	10 mg/ml	10 y 20	Prolina	8 mg/2 ml	10
Piruvato sódico	10 mg/ml	10 y 20	Cisteína	10 mg/2 ml	10
β-hidroxi-butírico	10 mg/5 ml	10 y 20	Espermina	2 mg/2 ml	10
Acetona	1 g/10 ml	10	Acido caproico	10 λ/2 ml	10
Glicerol	1 ml/10 ml	10	Acido valérico	10 λ/2 ml	10
Acetato sódico	1 g/10 ml	10	Acido málico	20 mg/5 ml	10 y 20
Butirato sódico	50 μg/10 λ	10 y 20	Adrenalina	2 mg/2 ml	10, 5 y 2
Acido cetobutírico	5 mg/ml	10	Noradrenalina	2 mg/2 ml	10, 5 y 2
β-hidroximetilglutárico	50 μg/10 λ	10 y 20	Acido oleico	5 λ/ml alcohol	1 y 2
Creatina	20 μg/10 λ	10 y 20	Acido linoleico	5 λ/ml	1 y 2
Colina-HCl	8 mg/2 ml	10	Acido linolénico	5 λ/ml	1 y 2
Acetilcolina-HCl	5 mg/2 ml	10	α-pregnanolona	2,5 mg/ml	1 y 2
Carnitina	4 mg/2 ml	10	Testosterona	5 mg/ml	1 y 2
Carnosina	4 mg/2 ml	10	Progesterona	2 mg/4 ml	10, 2 y 1
Inositol	40 μg/10 λ	10 y 20	Estradiol	5 mg/ml	2
Metionina	10 mg/ml	10	Dietilestilbestrol	5 mg/ml	2
Treonina	10 mg/ml	10	Hidro cortisona	5 mg/ml	2
Leucina	8 mg/2 ml	10	Tiroxina	1 mg/ml	5 y 2
Anserina	4 mg/2 ml	10	Vitamina A	5 mg/ml	1 y 2
Alanina	10 mg/2 ml	10	Vitamina D	5 mg/ml	1 y 2
Triptófano	4 mg/2 ml	10			

células examinadas, sólo de veinte a treinta exhibieron estriaciones visibles microscópicamente, el resto de las células eran indiferenciadas.

La adición de una cantidad extra de cloruro de potasio (400 μg/ml de medio de incubación de Eagle) mejoró muy notablemente los cultivos. El ritmo de crecimiento era más rápido que el de los controles, de manera que la densidad celular que presentaban las preparaciones de estos últimos era también mostrada por aquéllas procedentes de células tratadas con una cantidad extra de potasio

en un tiempo más corto, que oscilaba entre las 48-72 horas de cultivo. En estas células, las estriaciones se hicieron visibles más pronto, aunque el porcentaje de células diferenciadas no cambió, ni tampoco hubo modificaciones en su actividad contráctil.

Al aumentar la concentración de cloruro de potasio en el medio de Eagle hasta 800 μg/ml, el resultado fue igual al obtenido con la mitad de concentración.

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS. A las 24 horas de su adición, los cultivos presen-

taban un pobre aspecto, con escaso número de células y vacuolas en algunas de ellas, con pocas y pequeñas granulaciones mitocondriales. En el 6.º-7.º día, todavía aparecían zonas en las preparaciones sin células y otras solamente con una capa de ellas, cuando en las no tratadas, el cultivo tenía varias capas. En este tiempo, más del cincuenta por ciento de las células se observaron con numerosas vacuolas.

Todos los estrógenos ensayados tuvieron el mismo efecto, mientras que el propilenglicol o el alcohol absoluto (empleados en la preparación de las soluciones hormonales) *per se* no dieron lugar a modificación alguna.

EFECTO DE OTRAS SUSTANCIAS QUÍMICAS.

Del resto de hormonas utilizadas en nuestros experimentos, la hidrocortisona actuó de una forma casi igual a la de los estrógenos, pero con una inhibición del crecimiento menos intensa.

Ni la tiroxina ni la adrenalina mostraron influencia sobre los cultivos. Igual sucedió con el resto de las sustancias químicas.

EFECTO DE LA SOLUCIÓN ENZIMÁTICA.

Una solución enzimática de tripsina al 2,5 % dio un tiempo de disociación del tejido cardíaco embrionario suficiente como para producir una serie de lesiones irreversibles en las células, pues los cultivos no sobrevivieron las 48 horas.

El enzima colagenasa al 0,5 % o la hialuronidasa a la misma concentración inhibieron el crecimiento de aquellos cultivos preparados con tejido disociado por dichos enzimas.

La inhibición no desapareció con el cambio del medio de cultivo viejo por medio fresco.

La tripsina al 1 % dio más pobres resultados que la mezcla de tripsina con tripsina inhibidor al 10 %.

INFLUENCIA DE LA EDAD DE LOS EMBRIONES. Los cultivos de embriones de pollo

de 8 y 12 días tuvieron, en un principio, un crecimiento más lento que los cultivos de tejido cardíaco de embriones de 18 días, aunque luego mostraron signos de recuperación. Otro hecho a señalar fue que los tejidos más jóvenes necesitaron más tiempo para ser disociados por la solución enzimática que los de más edad.

INFLUENCIA DEL PROPIO TEJIDO MUSCULAR EMBRIONARIO. Los cultivos de tejido muscular de las patas de los embriones o de la molleja de patos adultos (una semana de edad) crecieron muy pobremente, en comparación con cultivos de tejido cardíaco de embriones de pollo de 18 días de edad.

INFLUENCIA DEL COLÁGENO. En una serie de experimentos se trató de saber si el colágeno, de alguna forma, podría ayudar al crecimiento o la diferenciación de los cultivos.

Para ello y antes de la inoculación, los viales eran preparados de acuerdo con la siguiente técnica (4): El fondo de los viales es cubierto con una solución estéril de colágeno. Entonces y resbalando por la pared, se echa una gota de NH_4OH concentrado. Después de 10 minutos, se lavan varias veces con agua destilada para dejarles, finalmente, secar. Luego se añadía el *inoculum* de la suspensión de células, continuando según el procedimiento ya descrito (ver Material y métodos).

La solución de colágeno se hacía disolviendo 6 mg de esta sustancia en 10 ml de ácido acético 0,05 N con agitación durante una hora a temperatura ambiente. La solución estaba ya dispuesta para su uso después de una homogenización de 3-5 minutos.

Los resultados conseguidos con este proceder no fueron concluyentes, pues la proporción de células diferenciadas siguió siendo la misma que en los cultivos normales, aunque las granulaciones mitocondriales eran bastante más abundantes.

Discusión

La introducción de una cantidad extra de cloruro de potasio en el medio de cultivo de Eagle hace que las células musculares cardíacas de embriones de pollo de 18 días de edad crezcan mejor y más rápidamente que en las incubadas en Eagle solamente. El óptimo crecimiento de tales cultivos se obtenía 24 horas antes, como mínimo, que en los controles. Esta respuesta positiva se lograba cuando la concentración de potasio en el medio de nutrición era el doble de la que tiene normalmente. Con una concentración triple, el resultado era el mismo. El efecto parece ser específico, pues ni el calcio ni el magnesio tuvieron una respuesta semejante.

Sería posible que el potasio facilitara o incrementara el paso de algún nutriente especial al interior de la célula, acaso a través de la activación de alguna molécula transportadora. Pudiera ser también que las células en presencia de una cierta concentración de este ion se adhirieran menos fácilmente, circunstancia ésta que favorece la proliferación celular (9). El otro hecho de que la proporción de células diferenciadas, con estriaciones, no aumente cuando el crecimiento ha mejorado se debe, seguramente, a que ambos procesos son, al parecer, incompatibles (8).

La desdiferenciación, que se observó en todos los cultivos hacia el 6.^o-7.^o día, se explicaría por el empobrecimiento del medio en algún micronutriente esencial o por la acumulación de algún metabolito celular perjudicial, sin descartar otras causas (6).

En el animal completo, el músculo estriado quema grasas como fuente de sus necesidades energéticas, mientras que el liso usa azúcares con los mismos fines. También el ácido hidroxibutírico, formado en el hígado por reducción del acetil-CoA, pasa a la sangre para llegar al músculo cardíaco, donde es metabolizado. *In vivo*, al menos, estos hechos parecen

indicar alguna clase de dependencia y, sin embargo, en nuestros experimentos *in vitro*, no fue posible ver ningún efecto con ese tipo de sustancias. Algo similar sucedió en los experimentos con distintos aminoácidos y vitaminas. Ni el enriquecimiento del medio en aminoácidos, esenciales o no esenciales, ni la adición de vitaminas mejoró en algo el crecimiento o la diferenciación. Es probable, entonces, que las células musculares cardíacas las puedan ya sintetizar en cantidad suficiente para no necesitar de su aporte externo, o que el propio suero fetal bovino, empleado en los cultivos, las contenga (5).

Finalmente, los estrógenos inhibieron el crecimiento de las células, dando lugar además, a otras alteraciones como aparición de vacuolas en el citoplasma. No se conoce la acción de los esteroides sexuales en otros tejidos, *in vitro*, pero se sabe que la hidrocortisona favorece el crecimiento y estimula la diferenciación del cartílago (3), al igual que hace la tiroxina en colonias de células pigmentadas de retina (1). Para FELL, estas hormonas en estos sistemas actuarían estabilizando la membrana lisosomal. En el músculo estriado, y teniendo en cuenta las alteraciones observadas, los estrógenos producirían una mayor fragilidad de dicha membrana, con la consiguiente lisis de tales partículas y los correspondientes efectos nocivos para las células.

Resumen

Se ha estudiado el efecto de distintas sustancias químicas sobre cultivos de células musculares cardíacas de embriones de pollo.

El cloruro de potasio añadido al medio de nutrición de Eagle a una concentración final de 800 mg/l, mejoró el crecimiento, sin cambiar la proporción de células diferenciadas. Los cultivos así tratados alcanzan la máxima densidad celular 24 horas, como mínimo, antes que los controles. Concentraciones más altas de potasio dieron el mismo resultado.

Los cultivos incubados con estrógenos mostraron un crecimiento muy pobre con células de aspecto dañado.

Bibliografía

1. CAHN, R. D. y CAHN, M. B.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **55**, 106, 1966.
2. EAGLE, H.: *Science*, **122**, 501, 1955.
3. FELL, H. B.: Comunicación personal, 1967.
4. GRANICK, S.: Datos no publicados.
5. HARRIS, M.: En «Cell Culture and Somatic Variation». Holt, Rinchart & Winston. New York, 1964.
6. KONIGSBERG, I. R.: *Exptl. Cell. Res.*, **21**, 414, 1960.
7. KONIGSBERG, I. R.: *Science*, **140**, 1273, 1963.
8. STOCKDALE, F. E. y HOLTZER, H.: *Exptl. Cell. Res.*, **24**, 508, 1961.
9. STOCKER, M. G. P. y RUBIN, H.: *Nature*, **215**, 171, 1967.