

03062

lej. 11

APARICION Y PERSISTENCIA DE ALGUNAS
PROPIEDADES ELECTROFISIOLOGICAS DE
LAS CELULAS NERVIOSAS DE EMBRION DE
POLLO EN CULTIVO. Efecto de los cor
ticoides.

Tesis que para obtener
el grado de Maestra en
Ciencias Biomédicas
(Fisiología) presenta:

Sylvia Leticia Verdugo Díaz.

México, D.F.
1986.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó gracias a la colaboración técnica de los laboratorios de Cronobiología, Depto. de Fisiología y de Cultivos de Tejidos, Depto. de Histología, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

La última parte experimental y la realización del manuscrito fueron realizadas con el apoyo de una beca-tesis otorgada por CONACYT.

INDICE .

RESUMEN.....	1
I.- <u>Cultivo de Tejidos</u>	2
II.- <u>Efecto de los corticoides en el sistema nervioso central</u>	5
III.- <u>Propiedades electrofisiológicas en cultivos celulares</u>	14
IV.- <u>Hipótesis de Trabajo</u>	24
MATERIAL Y METODOS	
I.- <u>Cultivo Celular</u>	26
II.- <u>Registros electrofisiológicos</u>	27
III.- <u>Cambios en la concentración de potasio externo</u>	29
IV.- <u>Medidas estructurales</u>	30
V.- <u>Análisis de los datos</u>	30
RESULTADOS	
I.- <u>Propiedades eléctricas pasivas</u>	
1.- Potencial de membrana.....	31
2.- Potencial de membrana y $ K^+ _e$	34
3.- Relaciones corriente-voltaje	38
4.- Resistencia, capacitancia y constante de tiempo.....	46
DISCUSION.....	50
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	65

RESUMEN.

Se ha propuesto que la aplicación de glucocorticoides durante las primeras etapas del desarrollo de las células neurales en cultivo de embrión de pollo, acelera su maduración, lo que se manifiesta con la aparición temprana en estas células de potenciales de membrana similares a los de las células no tratadas de mayor edad. Este trabajo tuvo por objeto analizar el desarrollo de las propiedades eléctricas pasivas en las células neurales en cultivo y la acción de los glucocorticoides sobre ellas, además la relación entre la concentración externa de potasio, $|K^+|_e$ y los valores del potencial de membrana. Se utilizaron cultivos de células nerviosas disociadas de embrión de pollo de 7 días de desarrollo los que se seguían durante 12 días. A algunos de estos cultivos se les aplicaba, a las 24 horas de iniciados una dosis única (2 $\mu\text{g/ml}$) de corticosterona. En el momento del registro se sustituía la solución normal de Hanks (5.4 mM de K^+) por soluciones con diferente $|K^+|$ (2.7, 10.8, 40 y 100 mM). En estas condiciones se determinaban los valores de P_M desde el 3o. hasta el 12o. día. Los resultados más importantes fueron los siguientes: a) El P_M de las células neurales en cultivo aumenta en forma progresiva durante el desarrollo; b) el P_M de las células neurales en cultivo depende de la $|K^+|_e$ de acuerdo con lo que se describe en la ecuación de Goldman; c) durante el desarrollo cambia la relación P_{Na}/P_K ; d) Para una determinada edad, las células pretratadas con corticoides, tienen una relación P_{Na}/P_K menor que la de las células control. Por otra parte se determinaron los valores de la resistencia, la capacitancia y la constante de tiempo de la membrana. Se pudo comprobar que todos estos valores cambian durante el desarrollo y que las células tratadas con corticoides alcanzan los valores finales de estas medidas antes que las células control. Estos resultados sugieren que los corticoides aceleran la diferenciación de las células neurales en cultivo, en particular los procesos involucrados en la aparición de las propiedades eléctricas pasivas estudiadas.

I N T R O D U C C I O N .

I.- Cultivo de Tejidos

Desde que en 1906, Ross Granville Harrison realizó el famoso experimento que la llevó a obtener crecimiento neural in vitro, los avances en esta área han sido impresionantes. Esta investigadora colocó en un medio de cultivo la delgada capa de un corte transversal de médula espinal de rana y después de varios días de mantenerla en condiciones asépticas observó que había habido crecimiento neural en su cultivo (Harrison, 1906 - 1907, 1910, 1912). A partir de entonces una larga lista de autores se ha dedicado a aprender y mejorar lo que más tarde, Alexis Carrel (1914) llamó la técnica de cultivo de tejidos, la cual consiste en la implantación de pequeños fragmentos de tejido y el crecimiento de células a partir de ellos (Parker, 1938; White, 1954).

Otra de las grandes enseñanzas que nos dejó Harrison fue la idea de que es posible lograr cultivos en un medio nutritivo que imite al que tienen las células in vivo. Con esta base, Carrel en 1923, logró conservar por largo tiempo un cultivo de células cardíacas de embrión de pollo de 7 días de desarrollo. Este avance se realizó gracias a que el investigador hizo trasplantes sucesivos de frasco en frasco (que él mismo llamó raza celular) los que mantuvo con extractos de plasma y coágulos de sangre de pollo.

Con el desarrollo de las células L y HeLa en 1940, empezó una nueva era en los cultivos celulares, ya que con estos tipos celulares se logró la obtención de cultivos cuya principal característica es la de permitir la obtención de una población celular a partir de una simple célula, los llamados clones (Fedoroff, 1977).

Es un hecho bien establecido que uno de los principales papeles del suero en el cultivo de tejidos es el de proveer a las células de las hormonas necesarias para su crecimiento, aunque también se ha logrado el crecimiento celular en ausencia de estas sustancias (Evans y

cols., 1956; Takaoka y Katsuta, 1971). Los cultivos así logrados han mostrado alteraciones en el crecimiento (Schubert y cols., 1971), la diferenciación o el funcionamiento in vitro (Peacock y cols., 1973).

Además de las hormonas indispensables para la supervivencia de un cultivo celular, es necesario considerar a los iones y a las diversas sustancias insustituibles para la misma. Así, se sabe que el potasio es un regulador metabólico fundamental en el cultivo de las células nerviosas y cardíacas (DeHaan, 1967, 1970; Scott y Fischer, 1970; Lasher y Zagon, 1971; Scott, 1972); la glucosa es indispensable en el proceso de mielinización neural (Barth y Barth, 1972), etc.

Con base en estos conocimientos se han realizado experimentos in vitro en los que el medio de cultivo carece de suero, el cual fue sustituido por hormonas y otras sustancias necesarias para el crecimiento (Mather y Sato, 1971; Waymonth, 1971; Bloom y Black, 1979) como in sulina, transferina, progesterona, tiroxina, factor de crecimiento neural y factor glial. En estas condiciones se han puesto de manifiesto los distintos papeles que cada uno de ellos juega en los procesos de crecimiento y diferenciación celular.

Hasta hace poco tiempo se tenía la idea de que no se podría lograr la obtención de cultivos de neuronas disociadas, en forma pura. Sin embargo, fue posible obtenerlos a partir de algunos experimentos en los que se puso de manifiesto el papel del factor de crecimiento neural (F.C.N.) en el desarrollo del sistema nervioso central (Varon y Rainborn, 1971; Jaros y cols., 1975; Sensenbrenner y cols., 1979), aun cuando sigue habiendo una seria dificultad en lograr que la sobrevida del cultivo se mantenga en forma pura por más de dos semanas.

En cultivos de células nerviosas del ganglio de la raíz dorsal del embrión de pollo (Roisen y cols., 1972), de cerebro de rata fetal (Shapiro, 1973) y del cerebro de ratón (Hass y cols., 1972), se ha mostrado la formación de neuritas después de un tratamiento con AMP-cíclico, efecto similar al que tiene el tratamiento con F.C.N. De ahí que se proponga que el efecto del F.C.N. está mediado por el AMP-

cíclico (Prasad, 1977), y que éste tenga también una posible participación en la transcripción del crecimiento de neuritas (Greene y cols., 1980).

El sistema nervioso in situ tiene una gran heterogeneidad celular lo que dificulta casi cualquier tipo de estudio. De ahí la importancia que ha tenido el avance de la técnica de cultivo de tejidos in vitro, sobre todo de células neurales (Varon, 1971).

El proceso de diferenciación neural implica diversos pasos que incluyen: la inducción, la migración y la expresión de funciones diferenciadas por parte de la neurona (Prasad, 1977). Para estudiar el proceso de diferenciación, se han utilizado diversas técnicas y tipos celulares que dependen de los aspectos fundamentales que se quiera resaltar. Por ejemplo, el uso de líneas clonales de tumores del sistema nervioso ha servido como modelo de diferenciación de células neurales y gliales (Rosenberg, 1973). Las líneas del neuroblastoma C1300 de ratón muestran muchas características diferenciadas de las neuronas (Amano y cols., 1971; Murphy y cols., 1975; Nelson, 1977) como son, por ejemplo, la aparición de potenciales de acción en respuesta a estímulos despolarizantes (Nelson, 1977), la formación de sinapsis en presencia de células musculares cultivadas (Harris y col., 1971), etc.

Otro proceso importante asociado con la diferenciación neuronal es la sinaptogénesis, la cual puede ocurrir casi en cualquier tipo de cultivo que se emplee; al utilizar explantes intactos de tejidos embrionarios del sistema nervioso central, se tiene un modelo para estudiar las sinapsis con una actividad bioeléctrica reproducible y con una sensibilidad farmacológica característica (Crain, 1976). Los estudios electrofisiológicos de los explantes de cordón nervioso de rata, pollo u hombre, son una clara evidencia de que las células nerviosas en cultivo pueden mantener, in vitro, por meses, no sólo la capacidad de propagación de los impulsos a lo largo de sus neuritas sino también un alto grado de organización funcional semejante al de una red sináptica del sistema nervioso central (Crain y Peterson, 1963, 1964).

La mielinización es otro aspecto que ha sido estudiado de la diferenciación neuronal. Al observar células mutantes de cerebelo de ratones recién nacidos y compararlos con el cerebelo de animales normales, Wolf (1977) propuso un modelo de proceso de mielinización. Miche, Ponde y Mandel (en prensa) no detectaron la presencia de mielina en cultivos de embrión de pollo de 7 días de desarrollo, en tanto que Wood y Bunge (1975) encontraron células de Schwann y células G en el mismo tipo de cultivo. La capacidad de neurosecreción de las células en cultivo se ha puesto de manifiesto por medio de estudios bioquímicos y farmacológicos. Así, la vasopresina fue la primera neurosecreción que se demostró en un cultivo celular (revisión de Pearson, 1977). Más tarde, se comprobó en células nerviosas cultivadas de embrión de pollo la presencia de algunos neurotransmisores como la acetilcolina y las catecolaminas (Sensenbrenner, 1977; Ebel y Miche, 1974), así como la liberación de GABA de las células gliales de cerebro de conejo adulto mantenidas en cultivo (Henn y Hamberger, 1971), etc.

II.- Efecto de los glucocorticoides en el sistema nervioso central.

En 1885 Addison describió las manifestaciones clínicas que acompañan a la insuficiencia adrenocortical. A partir de esa fecha se ha obtenido gran número de evidencias acerca del papel que desempeñan las hormonas suprarrenales en el funcionamiento del organismo. Son notables los avances que se han logrado en el diagnóstico y el tratamiento de problemas relacionados con el hiperfuncionamiento y el hipofuncionamiento de la corteza suprarrenal, aunque esto no significa que se haya llegado a la comprensión de los mecanismos últimos de acción de sus hormonas. Del gran número de hormonas producidas por la corteza suprarrenal, son las glucocorticoides a las que nos referiremos en este trabajo. De ellas, se sabe que incrementan el catabolismo de las proteínas, que influyen en la glucogénesis y en la gluconeogénesis hepática, que producen hiperglicemia e inhiben la secreción de la hormona adreno-corticotrófica (HACT), que favorecen la re

sistencia al estrés, que intervienen en los procesos antiinflamatorios y antialérgicos y que tienen, además, una acción permisiva para la acción de otras hormonas como el glucagon y las catecolaminas.

Los síntomas psicológicos y neurológicos (cambios en la excitabilidad neuronal, cambios en la frecuencia basal del electroencefalograma, etc.) que se presentan en las enfermedades generadas por el exceso o por la deficiencia de glucocorticoides, muestran que hay una estrecha relación entre el funcionamiento del SNC y la concentración de estas hormonas en el organismo. Por tanto es fácil imaginar que estos esteroides desempeñan su papel en el organismo desde el momento en el que se inicia el desarrollo del sistema nervioso.

Para estudiar los mecanismos de acción de los corticoides en el proceso del desarrollo y la diferenciación celular se han utilizado - diversos métodos y objetos de estudios, entre los que se puede citar a: a) las estructuras en desarrollo; b) los organismos neonatos; c) - las células de órganos en cultivo. Los resultados obtenidos dependen de la concentración y de la clase de glucocorticoides utilizadas, del tipo celular y del grado de desarrollo de la estructura en el momento de la aplicación.

a)- Efecto de los glucocorticoides en el desarrollo prenatal.

Es notable el avance que han tenido la prevención y el tratamiento de los pacientes con síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática (SIRI) a partir de la aplicación a mujeres durante las últimas - etapas del embarazo, de dosis terapéuticas de cortisol (Motoyama y - cols., 1971; Liggins y cols., 1972). En diversas especies de mamíferos se ha demostrado que los corticoides provocan la aceleración del desarrollo fetal de los neumocitos II, los que inducen la maduración de los procesos enzimáticos (Kotas y Avery, 1971; Ballard y Ballard, 1972; Liggins y cols., 1972).

Al tratar a mujeres con problemas de fertilidad con dosis altas de cortisol, Reinisch y cols., (1978) observaron que si las pacientes se embarazaban y continuaban con el tratamiento del esteroide, sus -

productos nacían con un peso corporal por debajo del normal. Se ha comprobado que hay una reducción en el contenido de proteínas y lípidos cerebrales de ratas recién nacidas, cuyas madres fueron tratadas con prednisona durante la gestación (Romano y cols., 1977).

b)- Efecto de los glucocorticoides en organismos neonatos.

La aplicación de dosis farmacológicas bajas de glucocorticoides a animales inmaduros puso de manifiesto una inhibición del crecimiento somático (Ingle, 1941; Winter y cols., 1950; Laron y cols., 1968) y un balance nitrogenado negativo (Loeb, 1976).

Los efectos cerebrales que producen los glucocorticoides en los animales neonatos, han mostrado ser sobre todo inhibitorios. Así, Gumbinas (1973) observó que al aplicar estas hormonas a animales neonatos había un deterioro en la mielinización de las neuronas del encéfalo. Cotterrell y cols., (1972) y Howard (1975) analizaron los contenidos de ADN, gangliósidos y cerebrósidos de animales neonatos después de aplicarles corticosterona y comprobaron que todos ellos se encontraban disminuidos. Vernadakis y Woodbury (1962) ya antes había medido estos efectos y observaron que se acompañaban de una disminución en el consumo de oxígeno cerebral. Se ha observado que la administración de glucocorticoides durante el desarrollo del sistema nervioso produce cambios importantes que varían de acuerdo con el grado de diferenciación de los órganos en el momento de la aplicación de la hormona y con el tipo y la dosis de glucocorticoides utilizados (De Vellis y cols., 1978). Abundan los estudios acerca del efecto de la aplicación de dosis relativamente altas de glucocorticoides sobre el desarrollo posnatal del sistema nervioso de rata y ratón. Se ha demostrado que en estas circunstancias se produce disminución del número de células debido a la inhibición de la mitosis (Howard y Granoff, 1968; Cotterrell y cols., 1972). Se altera también el proceso de mielinización y el desarrollo de dendritas cuando se administran corticoides entre el primero y el noveno día de vida postnatal. Sin

embargo, se ha observado el efecto opuesto si la administración se hace a los doce días (Oda y Huttenlocher, 1974). También se ha descrito, como resultado de la administración neonatal de corticoides, la presencia de alteraciones motoras y conductuales (Shapiro, 1968; Salas y Shapiro, 1970; Shapiro, 1971).

Bohn y Lauder (1978) y Bohn y Lauder (1980) observaron que el desarrollo del cerebelo se afecta con la administración neonatal de corticoides. Por otra parte, se ha demostrado que los corticoides aplicados en período neonatal provocan la inducción de enzimas en el sistema nervioso central como es el caso de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ (Huttenlocher y Amemiya, 1978), la tiroxina hidroxilasa (Markey y cols., 1982) y la glicerol fosfato deshidrogenasa (De Vellis y English, 1968). La bomba electrogénica de sodio-potasio también es afectada por los glucocorticoides como lo muestran algunos trabajos en músculo esquelético de rata, en cerebro de ratón adulto, y en cerebro de embrión de pollo in vivo (Clausen, 1980; Stástny, 1971; Sadasivudu y cols., 1977). Los neurotransmisores son afectados por la administración neonatal de glucocorticoides a través de la modificación de la triptofano hidroxilasa (Azmitia y McEwen, 1969; Markey y cols., 1982). La corticosterona y la HACT influyen en la unión de ^3H -GABA al cerebro de ratas jóvenes (Kendall y cols., 1982).

También se ha encontrado que los glucocorticoides provocan algunos efectos electrofisiológicos. Woodbury y cols., (1949) observaron una disminución de la excitabilidad neuronal de ratas, consecutiva a la aplicación de dosis elevadas de corticosterona.

c) - Efecto de los glucocorticoides en órganos y células cultivadas.

Debido a la facilidad de manejo de los cultivos celulares existe un gran número de resultados acerca del papel de los glucocorticoides sobre los procesos de crecimiento y diferenciación celular in vitro. Se ha comprobado que en cultivos de animales neonatos, el número de ramificaciones dendríticas de las neuronas del cerebro aumenta a los

T

pocos días de la aplicación de corticoides, efecto que se revierte más tarde (Oda, 1974). Por otro lado, Gordon (1976) y Farroqui (1977) han encontrado en un cultivo neuroglial, un desarrollo precoz de la prolgaciones celulares de la capa VI del cerebro de rata. Asimismo, las células gliales se han encontrado modificadas por la presencia de estas hormonas, ya que su aplicación a cultivos gliales provoca un aumento - en el número de microfilamentos periféricos (Berliner, 1978) y en el crecimiento somático (Vernadakis, 1971).

La diferenciación es otro proceso que se ve muy afectado por la presencia de esteroides en cultivo de tejidos. En apoyo de esta proposición están los estudios efectuados por Piddington (1967), Moscona y cols., (1967, 1968), en la retina de pollo embrionario in vivo y en tejidos de explantes en cultivo. Es evidente que en todos los efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular subyacen mecanismos bioquímicos más o menos bien establecidos y sobre los cuales se considera que ejercen su acción los distintos tipos de esteroides estudiados.

Así, al igual que en el organismo íntegro, las células de la pituitaria mantenidas en cultivo retienen la capacidad de secretar HACT, respuesta que es bloqueada por los glucocorticoides (Buonassissi y -- cols., 1962; Watanabe y cols., 1972). En fragmentos hipotalámicos in vitro, Jones y cols., (1977) observaron un incremento en la unión de proteínas inducida por la aplicación de esteroides a fragmentos del - hipocampo.

En cultivos de explantes de ganglio simpático cervical se ha comprobado el efecto potenciador de los corticoides sobre la acción del factor de crecimiento neural y la tiroxina hidroxilasa (Phillipson, - 1975; Otten y cols., 1976,1977).

d)- Mecanismos de acción de los glucocorticoides.

Existen dos modelos aceptados en la actualidad sobre el mecanismo de acción de las hormonas esteroides en el SNC (McEwen y cols., - 1978), los cuales se basan en los efectos genómicos o no genómicos -

de estas hormonas sobre los fenómenos pre y postsinápticos. Los efectos no genómicos implican la acción de la hormona sobre la membrana pre o postsináptica donde actúan alterando la permeabilidad de la misma a los neurotransmisores o a sus precursores y el funcionamiento de los receptores específicos a esos neurotransmisores. La acción genómica se propone como aquélla que alteraría la síntesis de proteínas, las cuales después de su transporte axonal o dendrítico participarían en los fenómenos pre o postsinápticos (Figura 1, tomada de Mc Ewen y cols., 1978)

Como se puede inferir de esta proposición, los efectos no son necesariamente excluyentes y pueden operar de manera simultánea aun cuando tengan latencias diferentes. Se considera que los efectos no genómicos son de menor latencia (segundos o minutos que los genómicos (minutos u horas).

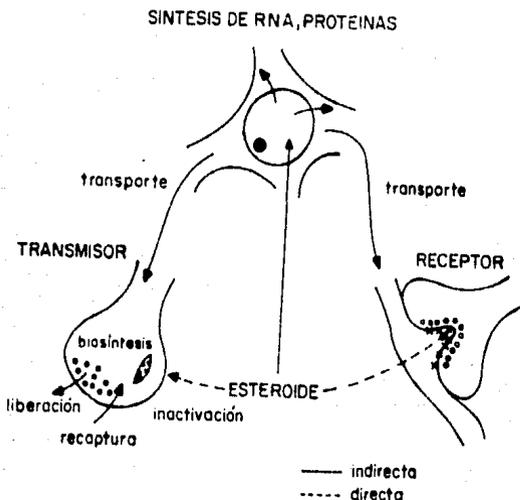


Figura 1 - Efectos genómicos (línea discontinua) y no genómicos (línea continua) de las hormonas esteroides en los eventos pre y postsinápticos (tomada de Mc Ewen y cols. 1978).

Diferentes técnicas experimentales han permitido desarrollar con mayor detalle el modelo genómico. Así, por ejemplo, ha sido posible -infundir a organismos in vivo esteroides marcados en ausencia de este roides endógenos y se les ha localizado en los compartimientos nucleares de las neuronas pero no en la glía. Esto ha facilitado por medio -de autorradiografía, la localización histológica de las células sensibles a estas hormonas (Morrell y cols., 1975). Mediante el uso de la misma técnica se sabe que hay gran número de receptores a los gluco-corticoides (Warembourg, 1975; Mc Ewen y cols., 1978) en el hipocampo, el septum y la amígdala de ratas y que son muy pocas las células sensibles a los esteroides en el hipotálamo, el área preóptica y la pituitaria (Mc Ewen y cols., 1976).

Una acción muy generalizada de los esteroides en todos los siste mas donde han tenido repercusión funcional es como inductores enzimá-ticos específicos (Thompson y Lippman, 1974). El modelo más aceptado actualmente para explicar todos los efectos bioquímicos y fisiológi cos de los glucocorticoides establece que, inicialmente, los esteroi-des se unen a una proteína receptora citoplasmática, el complejo pro-teína-esteroide sufre modificaciones y entra hasta el núcleo celular. Ya en el núcleo, el esteroide, en asociación con el receptor citoplas mático o después de un intercambio con un receptor nuclear, interac-túa con el ADN. El resultado neto de esta interacción es una altera-ción en la velocidad de síntesis de ciertas especies de ARN. La sínte-sis de ARN ribosomal y de transferencia se altera según el tejido, -lo que también sucede con la velocidad de síntesis del ARN mensajero. Estas alteraciones se reflejan en cambios en la velocidad de la sínte-sis de proteínas específicas, que se expresan fenotípicamente en el -tejido tratado. Este mecanismo permite explicar algunas acciones que muestran los esteroides, tales como las que inducen la síntesis de --proteínas en algunos tejidos (pulmón, cerebro, leucocitos, timocitos), la inhibición de la síntesis de estas moléculas en otros o en los mis mos tejidos (músculo estriado, timocitos, fibroblastos, etc.) y las -acciones permisivas sobre algunas hormonas peptídicas y sobre las cate-colaminas en procesos como la lipólisis, la glucogenólisis y la gluco-génesis.

Se ha planteado la posibilidad de que, al igual que sucede con muchas otras hormonas, el mecanismo de acción de los glucocorticoides está mediado por el AMP cíclico (AMPC). Diversos experimentos (Thompson y cols., 1966; Granner y cols., 1968) han mostrado en forma clara que éste no es el caso y que sólo algunos esteroides mantienen cierta interacción con este nucleótido. Así, por ejemplo, la inducción de tiroxina aminotransferasa en cultivo celular de hepatoma de rata (Pitot. y cols., 1964) se produce tanto por la aplicación de glucocorticoides como por el AMPC, pero los mecanismos inductores y las cinéticas implicadas son diferentes (Grossman y cols., 1971). Schwartz (1972) observó que estas dos sustancias inducen la síntesis de arginina en el pulmón de ratas prenatales, pero que su acción nunca fue aditiva.

e) - Acciones enzimáticas de los glucocorticoides en el sistema nervioso central.

La lista de los efectos bioquímicos enzimáticos inducidos por los glucocorticoides sobre el tejido nervioso es muy larga, por lo que sólo se mencionarán algunos de los trabajos fundamentales sobre el particular.

Se ha observado inducción enzimática por los glucocorticoides tanto en estructuras in vivo como in vitro, así como también en cerebros de organismos en desarrollo o adultos. Ardelpanu y cols., (1972) y Balazs y cols., (1972) reportaron la inhibición de la síntesis de ADN inducida por esteroides en cerebros en desarrollo. Otro nucleótido que se ve afectado por la aplicación de hidrocortisona, es el ARN mensajero específico que codifica la síntesis de la enzima glutamina sintetasa en retina de embrión de pollo (Schwartz, 1972). De hecho, con base en estos resultados fueron Schwartz (1971) y Chader y cols., (1972) quienes propusieron el modelo de inducción enzimática presentado en la sección anterior.

En células neurales cultivadas se ha observado que los glucocorticoides aumentan la actividad de la arilsulfatasa (Farroqui, 1977),

T A B L A 1 - EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL CEREBRO DE RATAS ADULTAS.

(Tomada de Mc Ewen y cols., 1979).

E F E C T O	T E J I D O	D O S I S	T I E M P O	R E F E R E N C I A .
1.- Inhibe la liberación de FLC*	Fragmentos hipotalámicos <u>in vitro</u> .	3×10^{-7}	10 min.	Jones y cols., 1977.
2.- Incrementa el nivel cerebral de tiroxina.	Cerebro total <u>in vivo</u> .	20 mg/Kg.	15 min.	Díez y cols., 1977.
3.- Incrementa ATP/O ₂ *	Cerebro total <u>in vivo</u> .	3-5 mg/Kg.	60 min.	Roosevelt y cols., 1973.
4.- Incrementa la actividad unitaria simple.	Hipocampo <u>in vivo</u> .	5 mg/Kg.	30-60 min.	Pfaff y cols., 1971.
5.- Incrementa la unión de proteínas.	Hipocampo <u>in vitro</u> .	10^{-10} M	60 min.	Lee y cols., 1977.
6.- Decece el transporte de GABA.	Hipocampo <u>in vivo</u> .	Implante sólido.	4-7 días	Miller y cols., 1978.
7.- Incrementa la actividad de GPDH*.	Cerebro total, nervio <u>in vivo</u> .	Endógeno.	7-14 días.	De Vellis y English, 1968.
8.- Incrementa la actividad de DBH*.	Hipotálamo <u>in vivo</u> .	100 mg/Kg.	4 hr.	Shen y Ganong, 1976.
9.- Incrementa el recambio de noradrenalina-dopamina.	Cerebro íntegro <u>in vivo</u> .	5-15 mg/Kg.	60 min.	Iwone y cols., 1977.
10.- Decece el recambio de noradrenalina-dopamina.	Cerebro íntegro <u>in vivo</u> .	25 mg/Kg	2 días.	Ruxe y cols., 1970.
11.- Incrementa la actividad de la tiroxina hidroxilasa.	Ganglio cervical superior, <u>in vivo</u> .	3 mg/Kg.	48 hr.	Hanbacier y cols., 1975.

de la glicerofosfato deshidrogenasa (Gail y cols., 1974) y de la sintetasa de ácidos grasos en glía (Volpe, 1976).

Los efectos en cerebros de ratas adultas estan resumidos en la tabla tomada de Mc Ewen y cols. (1979) (Tabla I).

Por último, cabe destacar la influencia de las hormonas esteroideas sobre la actividad de la ATPasa dependiente de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Los primeros resultados sobre esta influencia, se obtuvieron en preparaciones de riñon de rata (Chignell y Titus, 1966; Jorgensen, 1968, 1969; Mani y cols., 1968) y en tejido cerebral de esa misma especie (Gallagher y Glaser, 1968). En embriones de pollo, Stastny (1970) demostró que la administración de hidrocortisona estimula la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ tanto en homogenados del embrión intacto como en los hemisferios cerebrales del mismo, sin provocar ningún efecto sobre la actividad de la ATPasa dependiente de Mg^{++} . El mismo esteroide produce, en el ratón, un incremento de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en el cerebelo, el tallo cerebral y la corteza cerebral, siendo mayor el efecto sobre esta última estructura (sadasivudu y cols., 1977). Los mismos autores observaron que la hidrocortisona incrementa la utilización de gluamato en el cerebro de ratón y que genera un aumento en la actividad de la ATPasa, lo que interpretaron como el resultado del aumento en la estabilidad de la membrana inducido por la hormona.

III.- Propiedades electrofisiológicas en cultivos celulares.

Durante los últimos 30 años ha sido posible registrar la actividad eléctrica de explantes celulares de tejido neural, lo que ha permitido seguir el proceso de maduración de las propiedades eléctricas y de la sinaptogénesis in vitro. Descargas espontáneas y provocadas han sido registradas de explantes de médula espinal, de corteza de animales neonatos, de ganglios simpáticos, de tejidos neuromusculares y de tejidos nerviosos varios (Crain, 1977).

Es sólo en los últimos 10 a 12 años que se han obtenido regis--

E F E C T O	T E J I D O	D O S I S	T I E M P O	R E F E R E N C I A .
12.- Potencia el efecto del FCN sobre la actividad de la <u>tiroxina hidroxilasa</u> .	Ganglio cervical superior, cultivo.	$5 \times 10^{-6} M$	24-48 hr.	Otten y Thoenen, 1976.
13.- Incrementa la actividad de la <u>tiroxina hidroxilasa</u> .	Eminencia media, <u>in vivo</u> .	0.3 mg/Kg/día.	7 días.	Kizer, y cols., 1974.
14.- Induce la <u>PMT</u> *.	Hipotálamo y médula <u>in vivo</u> .	1mg /Kg/día.	7-13 días.	Moore y Phillipson, 1975.
15.- Incrementa los niveles de <u>noradrenalina</u> y <u>dopamina</u> .	Cuerpo carotídeo, <u>in vivo</u> .	1mg /Kg/día.	10 días.	Hellstrom y Koslow, 1976.

A B R E V I A T U R A S : * FLC, factor liberador de corticotropina; ATP/O₂, relación ATP generado por oxígeno usado; GPDI, glicerol fosfato deshidrogenasa; DBI, dopamine β hidroxilasa; PMT, fenil etanolamina N metil transferasa.

tros eléctricos de cultivos de células disociadas, lo que ha significado un avance en el estudio de las propiedades electrofisiológicas, ya que las células de las que se registran se pueden observar directamente, se tiene un mejor control de las condiciones experimentales debido a la "pureza" del cultivo, se puede añadir o quitar sustancias de las que interese conocer su acción, etc. Ha sido con esta clase de cultivos que, por medio de registros intracelulares, se ha llegado a conocer el grado de desarrollo funcional de las neuronas, la influencia que ejercen las células satélites sobre ellas, y la capacidad que tienen para establecer sinapsis en condiciones de cultivo.

Resulta entonces evidente que las células nerviosas que crecen en cultivo proporcionan grandes ventajas para investigar algunos problemas fundamentales en neurobiología. Sin embargo, a pesar de estas ventajas se plantea una pregunta fundamental: ¿qué relación existe entre las neuronas que se desarrollan en medios de cultivo y las neuronas de los organismos vivos?. Es difícil responder en forma adecuada, aun cuando muchos autores han tratado de hacerlo con datos que avalan hechos tan significativos como el que las neuronas en cultivo son capaces de diferenciarse hasta alcanzar un estado funcional comparable al de las células nerviosas de un organismo vivo.

Se considera que las características de esas respuestas eléctricas y su capacidad de establecer sinapsis funcionales con otras neuronas u otros tejidos son iguales que las de las neuronas de los organismos íntegros.

Así entonces, en este estudio se utilizaron las ventajas que ofrecen los cultivos de neuronas embrionarias para analizar la participación de los corticoides en el desarrollo de las propiedades eléctricas de aquéllas.

Los antecedentes a este trabajo más importantes se han obtenido de tres grandes grupos de trabajos: los que se han desarrollado en células musculares cardíacas, los obtenidos en células musculares esqueléticas y los que se han realizado en células nerviosas de diverso tipo.

T

Entre los trabajos realizados con células musculares cardíacas - destacan los de Speralakis y su grupo (1964, 1965, 1968, 1969, 1972, 1978) quienes durante varios años se han dedicado a analizar el desarrollo de las propiedades eléctricas pasivas y activas de células cardíacas de embrión de pollo registradas in situ o in vitro. Las principales observaciones de estos trabajos se pueden resumir diciendo que las células de corazones jóvenes de 2 a 4 días de edad, tienen un potencial de membrana en reposo (PM) bajo (alrededor de los -4 mV) aún cuando la concentración interna de potasio (K^+_i) sea casi tan elevada como la de las células adultas. Esto fue interpretado por los autores en el sentido de que estos bajos valores en el PM de las células jóvenes obedecen a una baja permeabilidad al potasio durante los primeros días, la que va en aumento en paralelo con el desarrollo y la diferenciación celular y en particular con el desarrollo de la actividad de la ATPasa dependiente del sodio y del potasio. Los potenciales de acción registrados de las células cardíacas embrionarias jóvenes tienen una fase de despolarización lenta (10-20 V/s), que depende fundamentalmente del sodio y no se ve afectada por la tetrodotoxina (TTX) estos potenciales de acción son bloqueados por el verapamil pero no por el manganeso, aun cuando este ion bloquea la contracción muscular probablemente por el bloqueo de las corrientes de calcio durante el potencial de acción. Cuando las células tienen 5 días de edad, se comprueba que la velocidad de la fase de despolarización del potencial de acción ha aumentado a 50-80 V/s, empiezan a ser sensibles a la TTX lo que se pone de manifiesto porque su aplicación reduce dicha velocidad a cerca de 20 V/s. Estos hechos fueron interpretados por los autores en el sentido de que durante esta etapa del desarrollo coexisten los canales lentos y rápidos de sodio. Hacia el octavo día, la acción de la TTX suprime por completo los potenciales de acción, o lo que es lo mismo, sólo quedan canales rápidos de sodio. Si los registros se efectuaban de órganos cultivados desde antes de que se llevara a cabo la inervación, no se observaron manifestaciones eléctricas atribuibles a la activación de los canales rápidos, a menos que se les añadiera una fracción obtenida de corazones adultos y enriquecida con -- ARN mensajero; al añadir cicloheximida, se bloqueaba de nuevo la in-

ducción de potenciales de acción, lo que sugiere que el comportamiento eléctrico de la célula depende de la producción de proteínas membranales específicas. Algo semejante fue observado con las células disociadas en cultivo de miocarcio, así como a los cambios de sensibilidad a la aplicación de corrientes despolarizantes y la dependencia iónica de los potenciales de acción que muestran estas mismas células durante su desarrollo.

Por su parte, De Haan (1967, 1970) y De Haan y Fozzard (1975) - encontraron que durante el desarrollo de células embrionarias de músculo cardíaco de pollo, aumenta sus sensibilidad al potasio, ya que mientras que los cultivos de 2 días no muestran diferencias de comportamiento a concentraciones altas de potasio, los de 4 a 7 días empiezan a presentar inhibición ante esta misma situación experimental, - hasta que la acción bloqueadora de potasio se manifiesta plenamente en células de 7 ó más días.

Analizando la ontogénesis de los flujos de sodio y de potasio - en células musculares cardíacas de embrión de pollo, Klein (1960) demostró que en aurículas y ventrículos, el potasio aumenta en forma gradual hasta alcanzar una meseta en el décimo tercer día de desarrollo y disminuye más tarde hasta que llega el momento de la eclosión. El sodio del miocardio es muy elevado durante el segundo día y disminuye bruscamente hacia el séptimo día y lentamente desde este momento hasta la eclosión. En realidad lo que este autor encontró fue que en el desarrollo embrionario se da una serie de cambios complejos e interrelacionados de los flujos de sodio y potasio, lo que se correlaciona en forma directa con la serie de modificaciones enzimáticas y eléctricas que se presentan durante el mismo período.

En células musculares esqueléticas en desarrollo, se ha analizado también un gran número de propiedades eléctricas activas y pasivas. Así, por ejemplo, Boethius y Knutsson (1970) registraron el PM de células musculares de embriones incubados in situ y encontraron - que el PM se incrementa en forma progresiva desde el tercero hasta el décimo noveno día in ovo y desde el primero hasta el quinto día ex o-

vo. Los autores correlacionaron estos cambios con los procesos de diferenciación de miotubo a miocito.

Utilizando líneas clonales de células musculares esqueléticas de rata, Kidokoro (1973, 1975) estudió el desarrollo de las propiedades eléctricas pasivas y activas en mioblastos y en miotubos multinucleados. Encontró que el PM se mantiene dentro de valores relativamente constantes durante el período examinado, pero que los valores de la resistencia y de la capacitancia de la membrana cambiaron ostensiblemente de la etapa de mioblastos a la de miotubos. También propuso que la capacidad para que las respuestas eléctricas muestren una fase de inversión, se adquiere hasta el momento en que se forman los miotubos y que los iones implicados en las corrientes eléctricas generadas son el sodio y el calcio. Kano (1975) sugirió que los mecanismos electrogénicos de los músculos maduran durante el desarrollo y que primero es inducido el mecanismo que genera la meseta y posteriormente el responsable de la espiga del potencial de acción. Spector y Prives (1977) hicieron un trabajo en el que estudiaron el desarrollo de las propiedades electrofisiológicas y bioquímicas durante la diferenciación del músculo esquelético embrionario de pollo en cultivo. Encontraron que la maduración electrofisiológica de la membrana se regula en forma autónoma sin intervención del sistema nervioso y que depende de la biosíntesis coordinada de componentes discretos de la membrana y su organización subsecuente en la membrana del miotubo. Engelhardt y cols., (1980) encontraron que el PM de mioblastos cultivados de embrión de pollo depende en buena medida de la concentración de potasio del medio de cultivo y de la edad de las células. En el mismo tipo de células, Sampson y cols., (1982) y Barnett y cols., (1984) estudiaron los efectos de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo del PM y de la capacidad de generación espontánea de potenciales de acción en cultivos celulares de músculo esquelético de fetos de rata. Los autores propusieron que el PM y la frecuencia de disparo de las células se incrementan a lo largo del desarrollo y por la acción de la tiroxina.

En el último tipo de trabajo considerado en esta parte de la introducción, se incluye gran número de estudios que han pretendido conocer la forma cómo se instalan los procesos responsables de la aparición y persistencia de las propiedades bioeléctricas pasivas y activas de las neuronas en desarrollo. Se han utilizado toda clase de preparaciones: embriones, órganos y tejidos cultivados, células disociadas y líneas celulares en cultivo. En todos los casos se ha puesto de manifiesto una modificación progresiva de los parámetros indicativos de la actividad eléctrica. Así, por ejemplo, en dos revisiones hechas por Crain en 1966 y 1968 se planteó entre otros hechos importantes, - la posibilidad que tienen los explantes de médula espinal embrionaria de organizar redes sinápticas funcionales in vitro, de tal manera que los ganglios de las raíces dorsales se comunican con las neuronas medulares; los axones de éstas, a su vez, se extienden hacia el tejido muscular adyacente y establecen una verdadera transmisión neuromuscular con él. En apoyo del desarrollo de la actividad bioeléctrica en este sistema, están los registros de potenciales sinápticos y potenciales de acción musculares, obtenidos por el autor.

Un proceso similar de diferenciación se lleva a cabo en los cultivos de corteza cerebral de ratones neonatos. La sensibilidad a los fármacos de los cultivos de explantes cerebrales de animales neonatos es comparable a la de los tejidos de animales adultos, hecho que apoya el que los procesos bioeléctricos y en general las propiedades organotípicas de los órganos en cultivo se desarrollan de tal manera - que la utilización de estos modelos experimentales no sólo es adecuada sino sumamente prometedora. Determinaciones de los potenciales de membrana en reposos y de los potenciales de acción hechas también por Crain (1956) en cultivos de ganglios espinales de embriones de pollo, probaron que las células en cultivo retienen, en esencia, las mismas características bioeléctricas de las neuronas de los organismos vivos: los valores de PM alcanzados por las células cultivada fueron de -80 a -95 mV; las espigas registradas tuvieron una duración de 0.2 a 0.4 ms en la fase de ascenso y de 2 a 3 ms en la fase de descenso; la amplitud de la fase de inversión de las espigas fue de 30 a 40 mV; con

frecuencia las espigas se veían precedidas de un prepotencial lento y seguidas de una hiperpolarización también lenta; comprobó el autor la existencia de un período refractario, etc. Dichter y Fischbach (1977), encontraron que los potenciales de acción de las neuronas disociadas y mantenidas en cultivos procedentes de ganglios dorsales de embriones de pollo, dependen en forma importante de las corrientes entrantes de sodio y de calcio al soma activo; de hecho, proponen la participación del ion calcio en la generación de los potenciales de acción ya que las espigas persisten en una solución libre de sodio o a la -- que se añadió TTX y que su amplitud depende de la concentración externa de calcio siendo abolida por la presencia de cobalto extracelular; en apoyo de la participación del sodio en el mismo proceso, encontraron que hay espigas en ausencia de calcio externo y en presencia de cobalto; cuando se elimina al cobalto y se deja al calcio, la amplitud de las espigas es función de la concentración externa de sodio y desaparecen en presencia de TTX. Al registrar los potenciales de acción de las fibras sensoriales encontraron que a diferencia de lo que se observa en los potenciales de la región activa del soma, aquéllos no dependen del calcio y desaparecen por acción de la TTX. Esos hechos fueron interpretados por los autores como la manifestación de que durante ciertas etapas del desarrollo neuronal coexisten dos procesos diferentes en la generación de las espigas, de los cuales sólo uno persiste en el estado adulto, ya que en este estado los potenciales de acción parecen depender básicamente del sodio.

Trabajando en células del tipo Rohn-Beard de la médula espinal de larvas de Xenopus, Baccaglioni y Spitzer (1977) demostraron que la excitabilidad neuronal se desarrolla paulatinamente, como lo prueba el hecho de que es hasta el estadio 18 que las células presentan potenciales de acción, los que no se observan antes de etapa aun cuando se inyecten corrientes despolarizantes. Inicialmente el potencial de acción depende de una corriente de calcio, como se desprende del hecho de que se bloquea por la adición al medio de lantano, cobalto o

manganeso, mientras que no es afectado por la TTX o la eliminación del sodio extracelular. Posteriormente (estadios 25 a 40) el potencial de acción tienen dos componentes, una espiga inicial dependiente del sodio y una meseta, que depende del calcio. En los últimos estadios (40-51), sólo el sodio participa en la generación del potencial de acción. Los mismos autores encontraron que durante el desarrollo neuronal se producen cambios en la resistencia de entrada y en la duración del potencial de acción.

Estudios electrofisiológicos de cultivos de neuronas disociadas de médula espinal y de ganglios dorsales en ratones fetales (Peacock y cols., 1973) y en embriones de pollo (Chalazonitis y cols., 1974; Varon y Rainborn, 1971) han puesto de manifiesto que, paralelamente al desarrollo estructural de las neuronas, se lleva a cabo el desarrollo de sus propiedades bioeléctricas; al estudiar los cultivos procedentes de células de fetos de ratón se encontró que sólo cuando éstas tienen de 11 a 14 días de edad se pueden obtener cultivos viables en los que es posible registrar potenciales de acción espontáneos y provocados y potenciales sinápticos. En los cultivos de células de embrión de pollo, los autores encontraron que la madurez eléctrica de neuronas se alcanza por lo general entre los días 8 y 10 y sólo ocasionalmente desde el tercer día de edad. Se propone que durante el desarrollo neural van apareciendo diferentes zonas electrogénicas que se localizan en distintas porciones celulares y que disparan los procesos membranales responsables de la respuesta celular, según una secuencia bien definida. Con el análisis de registros intracelulares - obtenidos también de neuronas en cultivo de embrión de pollo, se comprobó que las propiedades eléctricas pasivas y activas, tienen características comparables a las de las células adultas.

Por último, en cultivos de líneas celulares neurales como, por ejemplo, las de neuroblastomas humanos, se ha propuesto (Kuramoto y cols., 1981; Nelson y cols., 1971) que los valores de los parámetros bioeléctricos medidos (potencial de membrana, resistencia específica y capacitancia específica de la membrana) son similares a los de las neuronas simpáticas de preparaciones intactas. Al aplicarles a estas

células estímulos eléctricos, se encontró que el 79% de las células clonales es capaz de disparar potenciales de acción en comparación - al 94% de las células no clonales que mostraron esta capacidad; descarga repetitiva de potenciales de acción sólo la tienen el 2% de las células clonales y el 23% de las no clonales. La tetrodotoxina bloquea los potenciales de acción de las células clonales como sucede - con casi todos los tipos de células neuronales maduros; al aplicar - veratridina, se comprobó que se incrementa el influjo de ^{22}Na . Los - estudios morfológicos pusieron de manifiesto que hay una estrecha co rrelacion entre ellos y la capacidad de generación de potenciales de acción de las células de neuroblastomas humanos. De hecho, presentan un fenotipo según el cual se ha podido correlacionar la capacidad de disparo con la formación de procesos celulares y con la síntesis de enzimas relacionadas con el tipo de neurotransmisor que los caracte- rice (Nelson, 1977).

También en células clonales se ha podido estudiar el estableci- miento de sinapsis colinérgicas funcionales. En células de neuroblas- toma se puede encontrar acumulación de acetilcolina así como vesícu- las del tipo que se ha asociado con las terminaciones colinérgicas - (Daniels y Hamprecht, 1974).

Las células de neuroblastoma de ratón (Miyake, 1978) han sido - estudiadas estructural y funcionalmente; de estos estudios deriva una clasificación en la que aparecen 3 estadios bien diferenciados: en el primero de ellos las células no muestran diferenciación evidente y - son capaces de dividirse en forma considerable durante 20 ó más gene- raciones; su potencial de membrana es muy difícil de medir ya que el pequeño tamaño de las células hace que cuando éstas son penetradas el valor de potencial llegue rápidamente a cero; sin embargo, se calcula que tiene un valor cercano a -20 mV; se observa que la membrana tiene una baja permeabilidad al potasio, tienen respuestas pasivas a la a- plicación de corrientes despolarizantes y más aún, pequeñas espigas - suelen aparecer sobrepuestas a la inflexión que genera la aplicación de corriente; estas espigas dependen del calcio como se desprende del

hecho de que persisten en un medio libre de sodio y son bloqueadas en un medio que contiene cobalto. En el segundo estadio de desarrollo, - se comprueba el incremento de todas estas propiedades bioeléctricas - acompañado de un aumento en el tamaño del soma neuronal el cual alcanza las 40 a 60 micras. Hay una disminución en la relación de permeabilidad P_{Na}/P_K , de la membrana. Aparece un componente del potencial de acción insensible al cobalto y susceptible de desaparecer por la tetrodotoxina; la relación entre corriente aplicada y cambios de voltaje - de la membrana, muestran por primera ocasión rectificación. Sólo las células de neuroblastoma de ratón que llegan al tercer estadio de la clasificación (estadio de desarrollo total) muestran potenciales de acción perfectamente conformados y comparables a los de las células - de organismos adultos. Más aún, muestran dos clases de potenciales de acción (Tipos I y II) uno que depende del sodio y otro que depende -- del calcio. Estos dos tipos de potencial de acción también se han observado en células neuronales de cultivos primarios de ganglios dorsales (Tipo I) o de médula espinal (Tipo II) de ratón o de pollo. Sólo cabe añadir que la revisión de Spector (1981) sobre el desarrollo de las propiedades bioeléctricas en líneas clonales, ha puesto de manifiesto que, en términos generales, estas células sufren un proceso de diferenciación estructural y funcional en el que se basa la capacidad que muestran de generar, en forma espontánea o provocada, potenciales de acción semejantes en sus características, a los de cualquier tipo de célula neuronal in situ.

IV.- Hipótesis de Trabajo.

Si las células neurales en cultivo de embrión de pollo se diferencian de manera progresiva estructural y funcionalmente, entonces los parámetros bioeléctricos escogidos para determinar el funcionamiento celular (potencial de membrana, resistencia, capacitancia y - constante de tiempo), cambiarán en forma progresiva, durante las diferentes etapas del desarrollo.

T

Si los glucocorticoides inducen la maduración de las células neurales por medio de la inducción enzimática específica, entonces su aplicación al medio de cultivo de las células neurales en desarrollo acelerará la aparición y favorecerá la persistencia de las propiedades bioeléctricas dependientes de las enzimas inducidas, en comparación con las neuronas control.

Para demostrar la primera hipótesis se realizaron registros mediante electrodos intracelulares, de algunos parámetros eléctricos de las neuronas control de embrión de pollo, a los 3, 6, 9 y 12 días de cultivo. Para someter a prueba la segunda hipótesis se registraron los mismos parámetros en los mismos períodos, de neuronas cultivadas de embrión de pollo a las que previamente se les aplicó una dosis única de corticosterona.

MATERIAL Y METODOS.

I)- Cultivo Celular.

El cultivo celular se obtuvo a partir de células nerviosas disociadas de embriones de pollo de siete días de desarrollo. Los embriones fueron disecados en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar para cultivo de tejidos; con ayuda de una pinza se extrajeron el lóbulo óptico y el telencéfalo, los cuales se colocaron dentro de una caja de petri con solución salina balanceada virtualmente libre de CaCl_2 y de MgCl_2 , lo que ayudó a debilitar las uniones celulares. La liberación de las cubiertas meníngeas se realizó por métodos mecánicos y enzimáticos. Los primeros se llevaron a cabo con la ayuda de un microscopio estereoscópico bajo el cual se extrajo la mayor cantidad posible de tejido. Más tarde, las estructuras restantes fueron colocadas durante 10 minutos, en una solución de tripsina al 0.25% con solución salina balanceada virtualmente libre de calcio y magnesio y a 37°C , a fin de que el proceso de la liberación de las meninges terminara por medios enzimáticos.

El tejido fue lavado con solución Mem Eagle (GIPCO) + 15% de suero bovino fetal (GIPCO) ($\text{pH}=7.4$ y 37°C) y colocado en los tubos de ensaye en una proporción de 0.1 ml de tejido por 1 ml de solución. Se obtuvo la disociación celular por medios mecánicos a través del paso lento y sucesivo por pipetas Pasteur de calibre decreciente, hasta obtener una suspensión celular. La suspensión se cuantificó en una cámara cuentaglóbulos y al mismo tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el método de exclusión del colorante nigrosina.

Con una micropipeta se tomaron 100 μl de la suspensión y se hizo la siembra de las células en cajas de petri de plástico especiales para cultivo. Previamente las cajas fueron recubiertas con poli-L-lisina, para favorecer el crecimiento neural e inhibir el crecimiento glial. Fueron agregados 2.5 ml del medio de cultivo, el cual consistió -

de Eagle Basal Medium (GIPCO) más glucosa al 4% y suero bovino fetal al 15%. La incubación se realizó a 37°C en un ambiente gaseoso compuesto de una mezcla de aire (95%) y de CO₂ (5%) a 1 atmósfera de presión.

Día con día se siguió, con la ayuda de un microscopio invertido, la evolución del cultivo. A 24 horas de iniciado el cultivo, a la mitad de las cajas se les agregó una dosis única de 2 µg/ml de corticosterona (SIGMA) y se continuó con la incubación cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

II)- Registros electrofisiológicos.

Para realizar las determinaciones electrofisiológicas escogidas (potencial de membrana, potenciales electrofónicos) se tomaron muestras del cultivo a partir de las 72 horas. No fue posible hacer determinaciones antes de esa edad debido a que las células todavía son sumamente pequeñas y lábiles lo que hace casi imposible obtener una penetración del microelectrodo sin lesionar la célula.

Las cajas de cultivo se colocaron sobre la platina de un microscopio invertido (American Optical, Biostar) por medio del cual se observó la posición exacta del electrodo (figura 2). El electrodo consistió de una micropipeta de vidrio llena con KCl 3M, punta menor de 0.5 µm y resistencia ohmica de 10 a 20 MΩ, el cual se introdujo a las células con la ayuda de un micromanipulador (Prior). La pipeta se conectó a un circuito formado por un electrómetro capacitivo (WPI, M-701) y un osciloscopio (Tektronix, 513 A), frente al cual se enfocó una cámara quimográfica (Grass, C-4). El electrómetro a su vez se conectó a un estimulador de pulsos cuadrados (Grass, S 4C) y a otro canal del osciloscopio. El arreglo de los aparatos se muestra en la figura 2.

Con este mismo dispositivo se midió el efecto de inyectar a las células cultivadas corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes, ya que la conexión de la micropipeta con el dispositivo permitió utilizar el mismo electrodo para aplicar los pulsos de corriente y registrar la respuesta provocada.

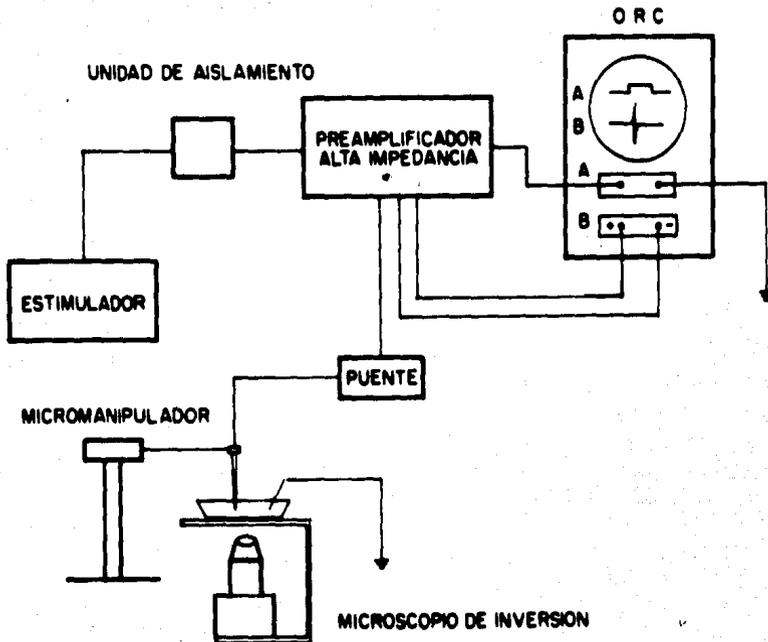


Figura 2.- Dispositivo empleado para medir algunas de las propiedades electrofisiológicas de las células neurales de embrión de pollo en cultivo. ORC-osciloscopio de rayos catódicos.

* Electrómetro capacitivo con paso de corriente.

III)- Cambios en la concentración de potasio externo ($|K^+|_e$).

Para observar el efecto de variar la $|K^+|_e$ sobre el potencial de membrana de las células en cultivo, se utilizaron diversas soluciones de prueba en las que se mantuvieron siempre constantes la osmolaridad y el pH. Los experimentos se iniciaron con las células colocadas en 5 ml de solución balanceada normal de Hanks (Hanks, 1939) con glucosa (5.4 mM de KCl), con pH de 7.2 y a una temperatura de 37°C. En estas condiciones se registraron las correspondientes medidas electrofisiológicas después de lo cual se procedió a cambiar la solución normal por la solución problema, es decir por una solución en la que la $|K^+|_e$ varió desde 1.4 hasta 100 mM de KCl.

Los ajustes de la osmolaridad se hicieron a expensas de cambiar las cantidades de NaCl de la solución (tabla II). En cada solución se midieron los distintos parámetros bioeléctricos.

Soluciones de Hanks	KCl (g/l)	NaCl (g/l)
con 1.4 mM de K^+	0.1	16.23
con 2.7 mM de K^+	0.2	16.17
con 5.4 mM de K^+	0.4	16.0
con 10.8 mM de K^+	0.8	15.69
con 21.6 mM de K^+	2.0	15.26
con 100 mM de K^+	7.4	10.55

Tabla II.- Soluciones de Hanks con diferentes $|K^+|_e$. Todos los demás elementos se mantuvieron iguales con respecto a los de la solución normal, sólo se varió el KCl a expensas de las cantidades correspondientes de NaCl.

IV) - Medidas estructurales.

El desarrollo estructural de las neuronas controles y experimentales en cultivo fue seguido durante los 12 días viables por medio de microfotografías que se tomaron a los 3, 6, 9 y 12 días de edad de las células. Se midió el diámetro del soma a partir del cual se calculó la superficie celular, suponiendo que el cuerpo neuronal tiene la forma de una hemiesfera.

Las determinaciones se hicieron en células normales y con corticoides y los correspondientes promedios fueron utilizados para calcular algunos parámetros bioeléctricos, como son la resistencia de la membrana y la capacitancia específica.

V) - Análisis de los datos.

Debido a la gran variabilidad que hay entre las células, las medidas eléctricas y estructurales fueron sometidas a las pruebas estadísticas de tendencia central habituales (promedios y errores estándar).

El cálculo de la superficie celular se hizo utilizando la expresión: $S = 3\pi r^2$, donde S es la superficie y r el radio.

Al relacionar los valores de PM con la $[K^+]_e$ se observó que el sistema sigue aproximadamente la relación propuesta por Nernst - - - ($PM = 60 \log \frac{[K]_e}{[K]_i}$) en una región de la curva. La aplicación de la ecuación de Goldman ($PM = 60 \log \frac{[K]_e + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na]_e}{[K]_i + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na]_i}$) permitió determinar los posibles cambios de las permeabilidades al sodio y al potasio (P_{Na}/P_K) de las células tratadas o no con corticoides durante el desarrollo.

Los potenciales electrotónicos generados por las neuronas se relacionaron con los valores de las corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes que los provocaron. De la relación intensidad-voltaje - así obtenida, se calculó la resistencia de entrada (R_e). La capacitancia y la constante de tiempo de la membrana se calcularon una vez que se conoció la superficie celular. Todos los cálculos fueron hechos en una computadora (PDP-11).

RESULTADOS.

I)- PROPIEDADES ELECTRICAS PASIVAS.

1- Potencial de membrana.

El potencial de membrana (PM) registrado en las neuronas de embrión de pollo cultivadas, aumenta en forma progresiva durante el desarrollo de las células. Así, hacia el tercer día el valor promedio del PM de las neuronas del grupo control fue de -14.9 ± 5.0 mV (n=40) y alcanza el valor de -76.5 ± 5.0 mV (n=15) el décimo segundo día de cultivo (figura 3). El incremento del PM no es uniforme y la mayor diferencia se presenta entre el tercero y el sexto día ($T' = 10.87$, $p < 0.05$). Para el noveno día de cultivo las células han alcanzado el valor máximo de PM el cual se mantiene sin diferencias apreciables hasta el décimo segundo día ($T' = 0.27$, $p < 0.05$). Esto se manifiesta como una meseta en la curva en la que se relaciona el potencial de membrana (mV) con los días del cultivo (figura 3).

Las neuronas tratadas previamente con corticosterona muestran un comportamiento similar al descrito para las neuronas control. Sin embargo, hay diferencias entre los dos grupos de células, las cuales se manifiestan en un incremento más acelerado del PM en las células tratadas que hace que éstas alcancen, antes que las células del grupo control, los valores finales del PM (figura 3).

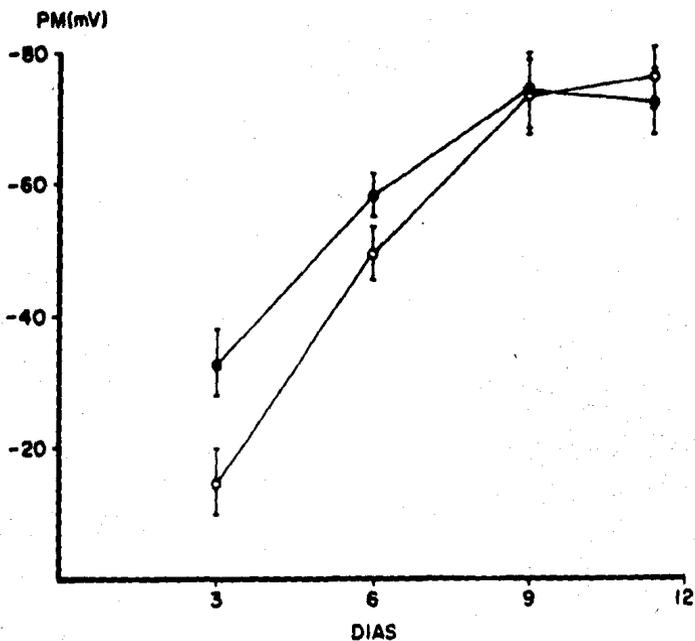


Figura 3.- Cambios en el potencial de membrana durante el desarrollo. En esta gráfica se muestra el cambio de PM (ordenadas) durante los 12 días (abscisas) en los que solían ser viables las células neurales en cultivo colocadas en condiciones control (círculos blancos) y con una aplicación previa de corticosterona (círculos negros). Nótese que el cambio de pendiente más abrupto en el potencial de membrana se presenta, entre el tercero y sexto días de cultivo para ambos grupos neuronales, sólo que durante ese mismo período, los valores alcanzados por las células tratadas son significativamente mayores que en las células control.

La tabla III se construyó con base en los datos de la figura 4. La pendiente (mV/década) se calculó por medio de la regresión simple obtenida a partir de los valores de PM que se obtienen de los valores de $|K^+|_e$ comprendidos entre 10 y 100 mM, se extrapoló el valor de la $|K^+|_i$ que corresponde al punto donde la línea recta intercepta con el eje de la $|K^+|_e$ y se calculó el valor del potencial de equilibrio del potasio (E_K) según la ecuación de Nernst, empleando el valor de la $|K^+|_i$ extrapolada para cada edad y el de una $|K^+|_e = 5.4$ mM. La P_{Na}/P_K se calcula de acuerdo con la ecuación de Goldman.

En la tabla III se observa que los valores de la $|K^+|_i$ y del E_K no cambian marcadamente en las células control durante los 12 días de cultivo pero si se muestra, durante este período, una marcada disminución de la relación P_{Na}/P_K , la cual tiene valores de 0.61 a los 3 días de cultivo y de 0.026 a los 12 días.

CONTROL

EDAD (días)	número de datos	PM (mV)	Pendiente (mV/década)	$ K^+ _i$ extrapolada (mM)	E_K (mV)	P_{Na}/P_K
3	30	-14.9 ± 5.0	-10.74	152.2	-105.1	0.62
6	37	-49.0 ± 4.0	-28.66	136.0	-102.1	0.12
9	26	-73.5 ± 6.5	-56.13	109.4	-96.5	0.026
12	10	-76.5 ± 5.0	-63.66	124.1	-99.7	0.026

Tabla III.- Tabla en la que se resumen los valores del potencial de membrana (PM), la pendiente (mV/década), la concentración interna de potasio $|K^+|_i$ (mM), el potencial de equilibrio del potasio (E_K) y la relación de permeabilidades al sodio y al potasio (P_{Na}/P_K) de células embrionarias en cultivo de 3 a 12 días de edad.

2- Potencial de Membrana y $|K^+|_e$.

Las curvas de la figura 4 muestran los valores de PM (mV) registrados de neuronas control de embrión de pollo colocadas en diferentes concentraciones de potasio, $|K^+|_e$ (mM) y a diferentes edades del cultivo (3, 6, 9 y 12 días).

Las curvas sobrepuestas a los puntos experimentales fueron calculadas por medio de la ecuación de Goldman considerando una relación de permeabilidades para el sodio y el potasio (P_{Na}/P_K) de 0.50, 0.10, 0.03 y 0.02 para los 3, 6, 9 y 12 días respectivamente y una concentración interna de potasio $|K^+|_i$ igual a 150 mM. La línea recta que atraviesa una región de la gráfica corresponde a la relación entre el PM y la $|K^+|_e$ según la ecuación de Nernst y tiene una pendiente igual a -60 mV por década de cambio en $|K^+|_e$. La escala del eje de la $|K^+|_e$, es logarítmica.

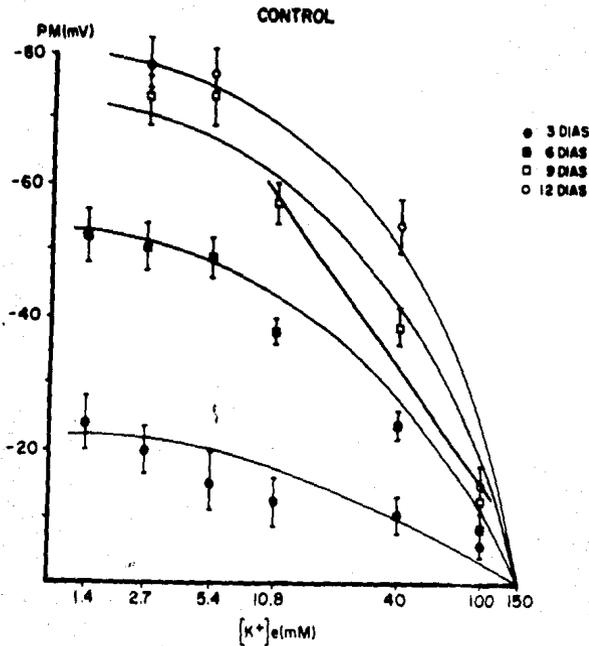


Figura 4.- Relación entre el potencial de membrana (ordenadas) y la concentración externa de potasio $[K^+]_e$ (abscisas) de células neurales de embrión de pollo colocadas en un medio de cultivo control. Las curvas sobrepuestas a los puntos experimentales fueron calculadas por medio de la ecuación de Goldman para cada valor de $[K^+]_e$. Los demás valores fueron: $[K^+]_i = 150 \text{ mM}$; $[Na^+]_i = 30 \text{ mM}$ y $[Na^+]_e = 150 \text{ mM}$. La línea recta que atraviesa una región de la gráfica corresponde a la relación entre el potencial de membrana y la $[K^+]_e$ calculada a partir de la ecuación de Nernst.

La gráfica 5 y la tabla IV corresponden a los datos obtenidos de células tratadas con corticoides y se construyeron de manera similar a como se hizo con la gráfica 4 y la tabla III respectivamente. Los datos muestran que en las neuronas con una aplicación única de hormonas, no existen diferencias notorias durante el desarrollo ni en la $|K^+|_i$ ni en el E_K . Se encontró en cambio, una menor disminución de la relación P_{Na}/P_K durante los doce días de cultivo ya que a los 3 días tuvo un valor de 0.42 y llegó a ser de 0.03 a los 12 días.

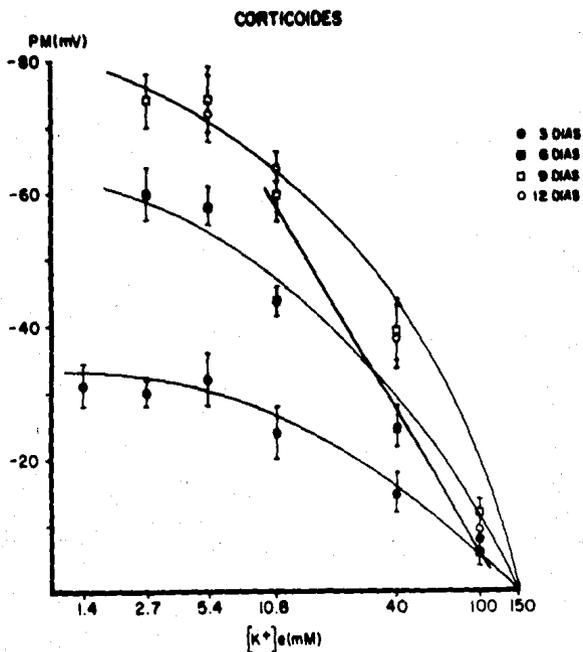


Figura 5.- Las curvas que se muestran en esta figura son comparables en todo a las que se muestran en la figura 4, sólo que corresponden a neuronas que recibieron una dosis única de 2 μ g/ml de corticosterona durante las primeras veinticuatro horas del cultivo. Nótese que a los 6 días, presentan, a bajas concentraciones externas de potasio, valores de PM más próximos al potencial de equilibrio que las células control.

Al comparar las tablas III y IV se ponen de manifiesto los siguientes hechos: a)- las diferencias de valores en el PM, $|K^+|_i$, la pendiente y la P_{Na}/P_K , que muestran las células tratadas con corticoides con respecto a las control, se manifiestan durante la edad de 3 y 6 días; a partir del noveno y hasta el décimo segundo día, los valores de estos parámetros en ambos grupos celulares tienden a igualarse; b)- no hay diferencias significativas durante el desarrollo entre los valores de la E_K ni en las células control ni en las experimentales - ni entre éstos y aquéllos a cualquier edad; c)- la $|K^+|_i$ muestra una tendencia a la reducción más marcada hacia el noveno día en las células control y al sexto día en las experimentales; entre ambos grupos no parece haber diferencias importantes en este parámetro.

CORTICOIDES

EDAD (días)	número de datos	PM (mV)	Pendiente (mV/década)	$ K^+ _i$ extrapolada (mV)	E_K (mV)	P_{Na}/P_K
3	38	-32.8 ± 5.0	-10.43	168.1	-107.6	0.42
6	15	-58.5 ± 8.0	-34.75	116.5	-98.3	0.09
9	10	-74.5 ± 7.5	-47.08	125.5	-100.0	0.03
12	6	-72.6 ± 5.0	-60.98	115.7	-97.9	0.03

Tabla IV.- Tabla en la que se resumen los valores del potencial de membrana (PM), la pendiente (mV/década), la concentración interna de potasio $|K^+|_i$ (mV), el potencial de equilibrio del potasio (E_K) y la relación de permeabilidades al sodio y al potasio (P_{Na}/P_K) de células embrionarias en cultivo de 3 a 12 días de edad, las que previamente tuvieron una aplicación de corticosterona.

3- Relaciones corriente-voltaje.

Las figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11 muestran los datos experimentales obtenidos al medir el cambio del potencial de membrana, es decir, el potencial electrotónico provocado (mV) en las células, por la aplicación de pulsos de corriente de intensidad (nA) despolarizante o hiperpolarizante conocidas a las edades de 3, 6 y 9 días respectivamente para los dos grupos trabajados. Las líneas rectas trazadas sobre los puntos de cada gráfica fueron calculados por medio de una regresión simple empleando los datos experimentales de cada caso.

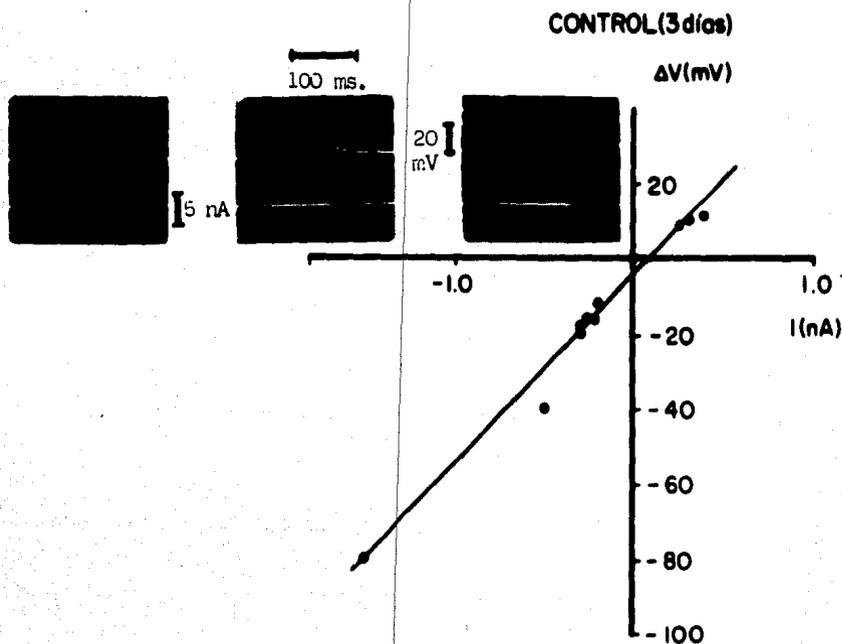


Figura 6.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana provocado en células neurales de embrión de pollo de 3 días de desarrollo colocadas en un medio de cultivo control. Nótese que a cada valor de corriente aplicado corresponde un cambio proporcional en el valor del potencial de membrana, lo que significa que no hubo rectificación anómala.

En la parte superior de la figura 6 se incluye una serie de 3 - fotografías de trazos originales para ejemplificar el tipo de registro que se empleó en el cálculo de los valores de la corriente inyectada. La curva corriente-voltaje (I/V) de esta figura se obtuvo de neuronas control de 3 días de edad y como se puede observar, en el - intervalo de corriente que se utilizó (de -1.5 a 1.0 nA) las células responden a la corriente despolarizante o hipor polarizante en forma - completamente lineal. Algo similar se puede observar con las neuronas control de 6 días de desarrollo (figura 7) en el intervalo de -1.0 a 1.0 nA de corriente aplicada.

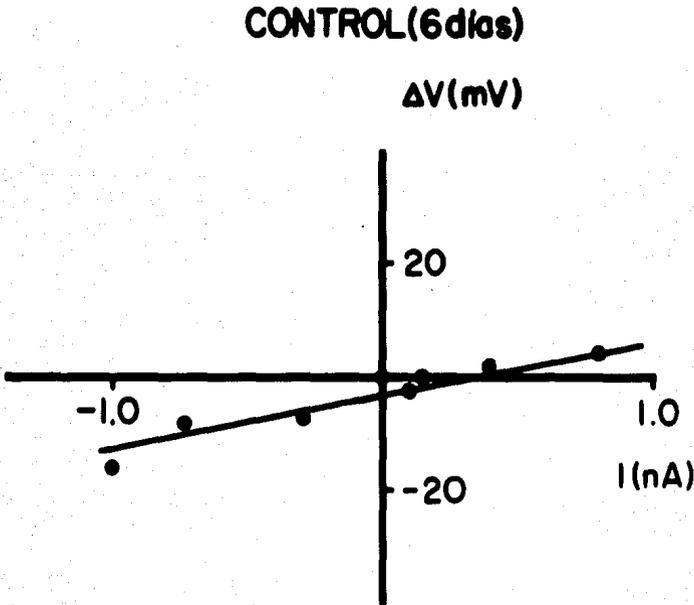


Figura 7.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana -- provocado en células neurales de embrión de pollo de 6 -- días de desarrollo colocadas en un medio de cultivo con -- control. Nótese que al igual que en la figura 6, en estas -- células no se presenta la rectificación anómala.

En el caso de las neuronas control de 9 días de cultivo (figura 8), la relación I/V ya no es tan simple, pues sólo en una región restringida de valores se sigue una relación claramente lineal dentro del intervalo de -1.0 a 1.0 nA de corriente. Al aplicar corrientes hiperpolarizantes de mayor valor, no se mantiene la relación lineal, lo que significa que las células muestran rectificación al paso de la corriente. Cabe señalar que debido a la generación de potenciales propagados espontáneos o provocados, en ningún caso se pudo aplicar corriente despolarizante mayor a 1.0 nA.

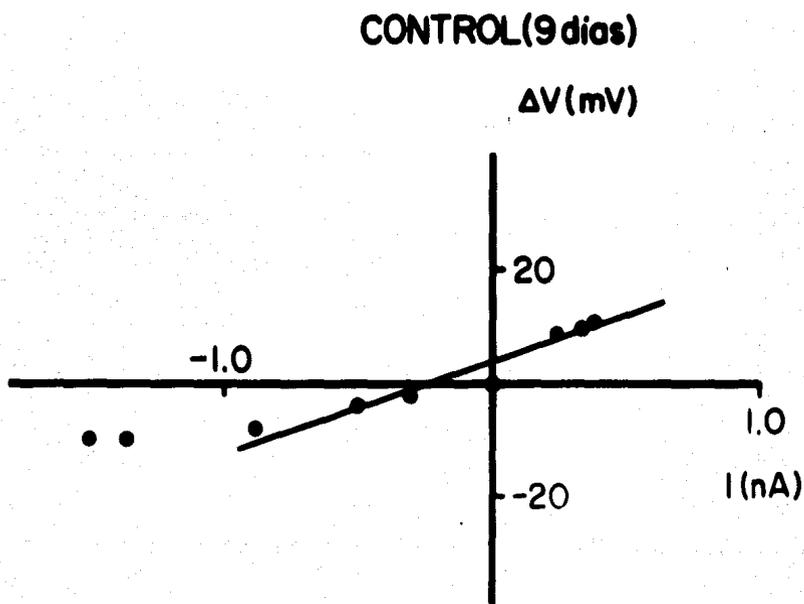


Figura 8.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana -- provocado en células neurales de embrión de pollo de 9 -- días de desarrollo colocadas en un medio de cultivo con -- trol. Se puede comprobar que, a diferencia de lo que su -- cede en las células control de menor edad (figuras 6 y 7) -- estas neuronas no muestran una relación lineal entre la -- corriente aplicada (sobre todo hiperpolarizante) y el vol -- taje generado.

La figura 9 representa la relación I/V de un grupo de neuronas de 3 días de cultivo previamente tratadas con corticosterona. Los datos muestran una relación lineal entre la corriente aplicada y el cambio de potencial provocado en el intervalo de -1.0 a 1.0 nA.

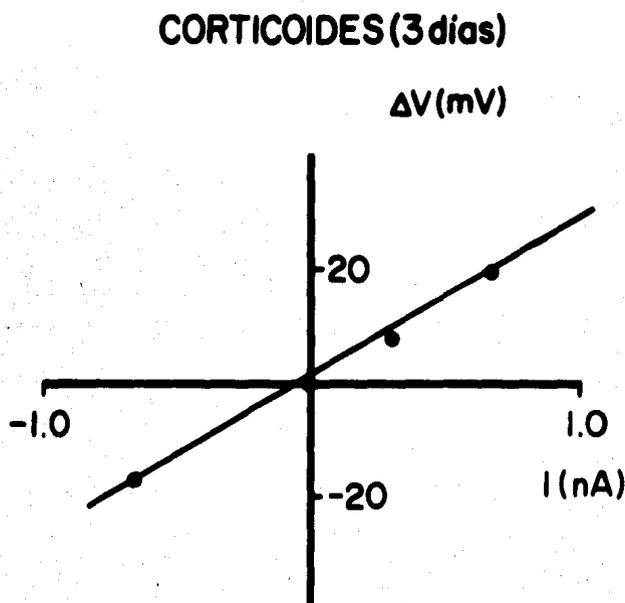


Figura 9.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana provocado en células neurales de embrión de pollo de 3 días de desarrollo que, a las 24 horas, recibieron una dosis única de corticosterona. Nótese la semejanza de comportamiento con las células control de la misma edad (figura 6).

En el caso de las neuronas de 6 días de cultivo previamente tratadas con corticosterona (figura 10), la relación I/V muestra rectificación al paso de corriente, al aplicarles corrientes hiperpolarizantes menores de -1.0 nA. El resto de la gráfica muestra un comportamiento lineal presentando un menor valor de la pendiente calculada para estas células.

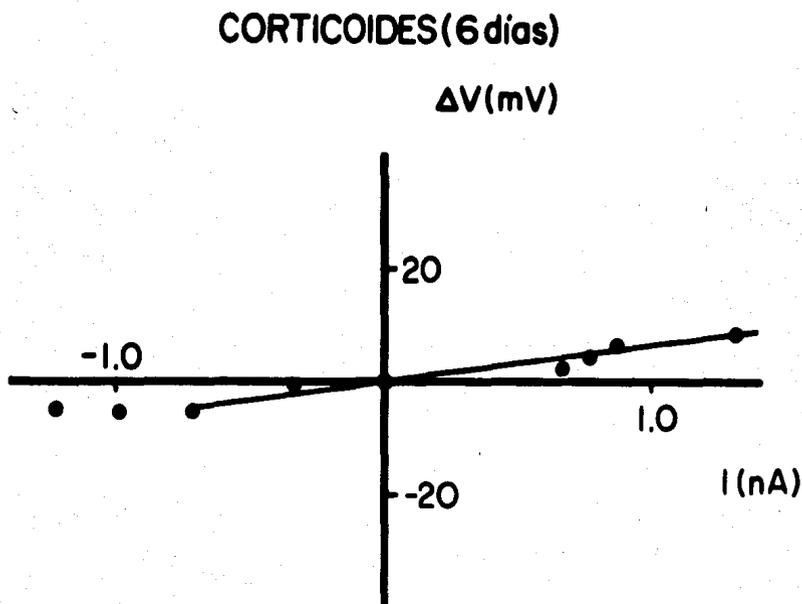


Figura 10.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana -- provocado en células neurales de embrión de pollo de 6 -- días de edad que, a las 24 horas, recibieron una dosis única de corticosterona. Se puede comprobar que, a diferencia de lo que sucede en las células control de la misma edad (figura 7) estas neuronas no muestran una relación lineal entre la corriente aplicada (sobre todo hiperpolarizante) y el voltaje generado, lo que significa que tienen rectificación anómala.

La figura 11 representa la relación I/V de un grupo de neuronas de 9 días de cultivo previamente tratadas con corticosterona. Los datos muestran una relación lineal entre la corriente aplicada y el cambio de potencial provocado para el intervalo explorado.

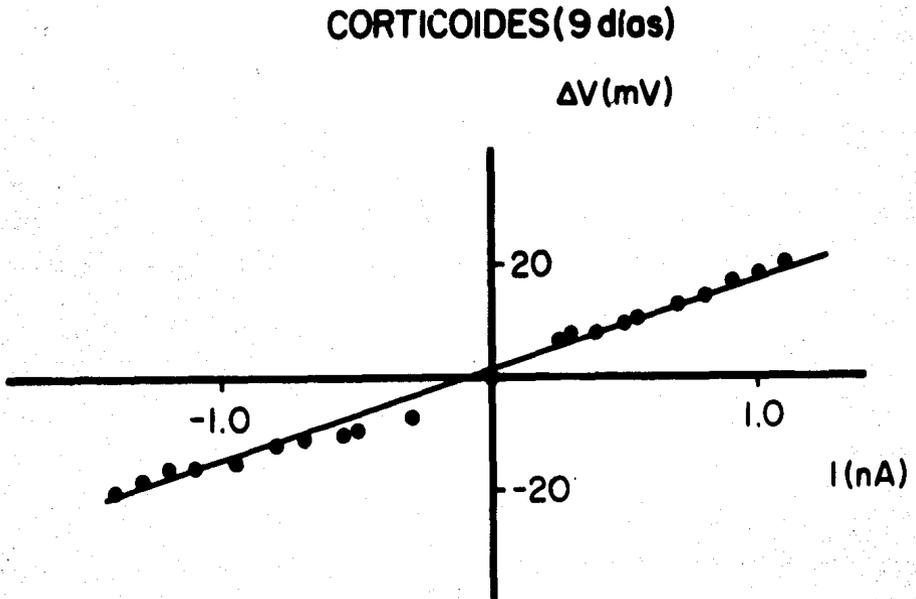


Figura 11.- Relación entre las corrientes despolarizante e hiperpolarizante aplicadas y el cambio de potencial de membrana provocado en células neurales de embrión de pollo de 9 días de desarrollo que, a las 24 horas, recibieron una dosis única de corticosterona.

La relación I/V puso de manifiesto un comportamiento tal de las neuronas en las regiones lineales de las curvas donde claramente se sigue la ley de Ohm. De estas curvas se puede calcular la resistencia de entrada (R_e) de las células, dado que $R_e = V/I$, lo que significa calcular la pendiente de cada curva con su correspondiente desviación. Los datos obtenidos de estos cálculos se muestran en la tabla V para las células control. Hay que hacer notar que durante el desarrollo de las células la R_e se va reduciendo en forma importante desde 51.7 M Ω que tienen las células de 3 días, hasta 10.0 M Ω que es el valor de la R_e a los 6 días, las células de 9 y 12 días tienen a su vez, valores de R_e ligeramente mayores (tabla V).

En lo que respecta a las células con corticoides (tabla VI), se puede comprobar que sus valores de R_e son, a la edad de 3 días, significativamente menores (28.8 M Ω) que los de las células control de la misma edad ($T=9.15$, $p<0.05$) a los 6 días muestran también una brusca reducción de la R_e (6.2 M Ω) y ésta aumenta ligeramente en las células de 9 y 12 días.

Por otra parte, se obtuvieron fotografías de los cultivos de neuronas control y experimentales (figura 12) en las que se incluyó también una escala micrométrica conocida. Esto permitió medir el diámetro celular en cada caso. Se pudo comprobar que, por lo menos al microscopio óptico, no hay diferencias significativas en los tamaños calculados de la superficie del soma celular ($T=0.109$, 1.090 , 0.439 , 0.007 ; $p<0.05$) en ninguno de los casos considerados (que incluyeron las distintas edades de los cultivos). Los datos obtenidos se muestran en las tablas V y VI.



Figura 12.- Micrograffias tomadas de un cultivo control (foto superior) y uno tratado con corticoides (foto inferior), en las que se muestran neuronas de 6 días de edad. Nótese el gran número de prolongaciones que presentan las neuronas durante esta etapa de su desarrollo, además de tener las neuronas tratadas con corticoides, un soma en el que es más evidente la forma de "estrella" que en las control.

4- Resistencia, capacitancia y constante de tiempo.

También en la tabla V se resume una serie de mediciones y cálculos efectuados a fin de caracterizar las propiedades pasivas de las neuronas control durante los 12 días de cultivo.

Las células de 3 días de edad presentaron una gran resistencia específica (R_m) de $735.4 \Omega/\text{cm}^2$. Durante los siguientes días, en particular el sexto día de cultivo, se observó una brusca reducción de la R_m , a pesar de que la superficie celular se mantuvo, como se mencionaba en un párrafo anterior, casi inalterable durante el desarrollo (tabla V).

De los trazos oscilográficos originales se calculó el valor de la constante de tiempo (τ_m) de las células control y experimentales. En la tabla V se incluyen los valores de la τ_m de células control de 3 a 12 días de edad. Estos valores no se modificaron de manera evidente durante el desarrollo; de hecho, a un aumento inicial que se presentó entre los días 3 y 6 del desarrollo, siguió una reducción en los días 9 y 12.

Una vez obtenida la R_m y la τ_m , se pudo calcular la capacitancia de la membrana (C_m). Los valores que tiene este parámetro en las células control, se muestran en la tabla V. De estos datos llaman la atención el gran incremento que presenta la C_m de las células de 6 días ($7.44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) con respecto a las de 3 días ($0.47 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) y los 12 ($2.52 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) días de cultivo, a pesar de que en ningún caso hubo un cambio significativo en la superficie celular.

Los valores de estos mismos parámetros en las células previamente tratadas con corticoides se presentan en la tabla VI. Se puede comprobar que, en las neuronas pretratadas de 3 días, la R_m es alta ($402.4 \Omega/\text{cm}^2$) y que igual a lo que sucede con el grupo control, durante el sexto día de cultivo este valor se reduce en forma importante ($103.63 \Omega/\text{cm}^2$) para volver a incrementarse durante los días 9 (256.0

Ω/cm^2) y 12 (185.5 Ω/cm^2).

La lectura de los valores de τ_m en las células experimentales puso de manifiesto que estas células siguen un desarrollo similar al de las control por lo que se refiere a este parámetro (tabla VI). Esto significa que su cambio más evidente se presenta entre los días tercero y sexto de cultivo y que a partir de este día hay cierta reducción que se mantiene hasta el décimo segundo día.

Por último, debe hacerse notar que la C_m de las células experimentales mostró modificaciones en su curso temporal (tabla VI), comparables a las de las células control ya que de nueva cuenta, el cambio más evidente se presentó entre el tercero y el sexto día cuando pasó de 0.74 a 7.24 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. A partir del sexto día la C_m disminuyó a valores cercanos a los 2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ en los que se sostuvo hasta el décimo segundo día.

Los datos que se presentan en las tablas V y VI se pueden resumir de la siguiente manera; a)- La superficie del soma celular de las neuronas en cultivo control o tratadas con corticoides no se incrementa en forma significativa durante los doce días que suele ser viable un cultivo celular; b)- Las propiedades pasivas de la membrana (R_m , τ_m y C_m) cambian en forma progresiva durante el desarrollo de las células neurales en cultivo estudiado entre el tercero y el décimo segundo día. Los cambios más significativos en esos parámetros se presentan en el tercero y el sexto días; c)- Las células tratadas con corticoides muestran también diferencias en sus valores de R_m , τ_m y C_m durante el desarrollo del cultivo, dándose el cambio más drástico entre el tercero y el sexto día. Al comparar los valores experimentales con los obtenidos en las células control de la misma edad, se comprueba que las células tratadas o tienen valores más acusados en las constantes medidas o alcanzan antes que las células control los valores finales de tales parámetros; d)- Ni en las células control ni en las experimentales se observaron diferencias significativas en los valores de las constantes de la membrana medidas para el noveno y el décimo segundo días.

CONTROL

EDAD DEL CULTIVO (días)	número de células	diámetro celular (μm)	superficie celular ($\times 10^{-7} \text{cm}^2$)	P_M (mV)	P_C (M Ω)	R_{in} (Ωcm^2)	τ_m (mseg)	C_m ($\mu\text{F/cm}^2$)	C (pF)
3	26	23.46 ± 1.27	142.34 ± 14.88	-14.9 ± 5.0	51.7 ± 12.0	735.35 ± 47.67	3.5 ± 0.5	0.47 ± 0.9	0.067 ± 0.002
6	20	22.50 ± 1.54	134.45 ± 16.46	-49.0 ± 4.0	10.0 ± 2.5	134.43 ± 11.13	10.0 ± 0.9	7.44 ± 3.90	1.0 ± 0.19
9	12	25.0 ± 1.86	156.50 ± 24.85	-73.5 ± 6.5	15.9 ± 3.0	254.40 ± 25.73	7.0 ± 0.6	2.75 ± 2.1	0.44 ± 0.15
12	10	24.5 ± 2.05	141.43 ± 25.32	-76.5 ± 5.0	14.0 ± 5.0	198.0 ± 33.2	5.0 ± 0.6	2.52 ± 2.12	0.357 ± 0.132

Tabla V .- Tabla en la que se resumen los principales parámetros eléctricos pasivos: la resistencia de entrada (R_{in}), la resistencia específica (P_M), la constante de tiempo (τ_m), la capacitancia de la membrana (C_m) y la capacitancia (C) de células embrionarias en cultivo de 3 a 12 días de edad.

CORTICOIDES

EDAD DEL CULTIVO (días)	número de células	diámetro celular (μm)	superficie celular ($\times 10^{-2} \text{cm}^2$)	PM (mV)	R_c ($\text{M}\Omega$)	R_m (Ωcm^2)	τ_m (mseg)	C_m ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	C (pF)
3	20	23.25 ±1.58	139.71 ±18.54	-32.8 ±5.0	28.8 ±6.0	402.36 ±30.60	3.0±0.5	±0.74 ±0.9	+0.133 -0.003
6	10	26.0 ±1.96	168.5 ±26.92	-58.5 ±8.9	6.2 ±2.0	103.63 ±15.74	7.5±1.0	7.24 ±2.03	+1.219 ±0.536
9	12	25.0 ±1.58	160.0 ±25.32	-74.5 ±7.5	16.0 ±3.5	256.0 ±31.38	5.0±0.5	+1.95 ±0.94	+0.512 ±0.190
12	10	24.25 ±2.05	154.60 ±26.89	-72.7 ±5.0	12.0 ±4.0	185.5 ±29.35	5.0±0.5	+2.69 ±0.70	+0.416 ±0.179

Tabla VI.- Tabla en la que se resumen los principales parámetros eléctricos pasivos: la resistencia de entrada (R_c), la resistencia específica (R_m), la constante de tiempo (τ_m), la capacitancia de la membrana (C_m) y la capacitancia (C) de células embrionarias en cultivo de 3 a 12 días de edad, las que, previamente fueron tratadas con corticosterona.

DISCUSION

Durante el desarrollo embrionario se lleva a cabo un gran número de cambios en las células neurales. Entre estos cambios los hay de - naturaleza estructural, metabólica, farmacológica, electrofisiológica. Es evidente que estos cambios se interrelacionan entre sí de tal manera que no siempre se puede determinar cuál antecede a cuál. Sin embargo, se ha propuesto que las propiedades eléctricas determinan muchas de las propiedades funcionales características de esta etapa de la vida celular. Más todavía: el conocimiento de cómo se desarrollan en el tiempo las propiedades eléctricas de las neuronas, permite una buena aproximación al estudio de estas mismas propiedades en las neuronas adultas. De esta consideración se desprende la importancia que tuvo la selección adecuada de la preparación biológica, las neuronas embrionarias en cultivo, la cual nos permitió aproximarnos a las condiciones ideales para el estudio de los mecanismos inherentes al desarrollo de las propiedades bioeléctricas de esas células. Así, se pudo comprobar la acción de los corticoides sobre el desarrollo funcional de las neuronas cultivadas y se puso de manifiesto que si bien los corticoides no afectaron en forma evidente el desarrollo estructural de las neuronas observadas con el microscopio óptico (compare las fotografías superior e inferior de la figura 12), sí modificaron de manera importante los parámetros bioeléctricos característicos de las células.

De los resultados que se incluyen en la figura 3 resulta evidente que el potencial de membrana muestra cambios significativos durante los 12 días del cultivo tanto en las células control como en las experimentales y que en éstas últimas se alcanzan antes los valores de PM que en las células control.

Hasta ahora no se ha hecho un estudio sistemático del PM durante el desarrollo de las células neurales. Esta situación es limitante .

ya que el potencial de membrana desempeña un papel determinante durante la diferenciación debido a que regula la excitabilidad celular - - (Spector, 1981). No todos los autores, sin embargo, coinciden con este punto de vista. Algunos piensan que los valores medidos del PM son artefactos experimentales que sólo reflejan el grado de lesión - que ha sufrido la membrana como consecuencia de la implantación del electrodo. En apoyo de esta interpretación están los hallazgos de - Kidokoro (1975) quien midió el PM de células clonales musculares de - pollo y encontró que tiene valores relativamente grandes e invariables durante el desarrollo.

En nuestro caso, las células más jóvenes (3 días), mostraron un pequeño valor de PM lo que se pudiera asociar con el hecho de que el electrodo dañó una gran proporción de la membrana. En las células de mayor edad (12 días), hubo sin embargo, un aumento del PM demasiado - grande para poderlo explicar sólo por las pequeñas diferencias del tamaño del soma celular en estas dos edades (tabla III). Más aún, los valores del PM ascienden bruscamente entre los días 3 y 6, lo que - - coincide con sólo un pequeño incremento que presenta la superficie celular durante el mismo lapso.

Así, coincidimos con la interpretación dada por otros autores - (Boethius y cols., 1970; Crain, 1956, 1966; Kano, 1975; Nelson y cols. 1977; Sperelakis y cols., 1972, 1978) según la cual el aumento progresivo de los valores del PM pone de manifiesto la maduración de algunos mecanismos inherentes a los procesos de diferenciación neuronal.

Entre estos mecanismos destacan por una parte el desarrollo progresivo de la estructura de la membrana que implica entre otros factores, la aparición de proteínas (canales) específicas asociadas con los cambios de permeabilidad a algunos iones, en particular, al potasio. De hecho, nuestros resultados muestran que las células más jóvenes (3 días) tienen un cociente P_{Na}/P_K mayor que las de más edad (12 días), lo que fuertemente sugiere que durante el periodo de 3 a 12 -

días hay un aumento en la permeabilidad al potasio. Otro posible mecanismo asociado con el incremento del PM que se observa en las neuronas es el aumento durante el desarrollo del número de bombas metabólicas, la actividad de las ya existentes o de ambos procesos. En apoyo de esta interpretación, están los trabajos de algunos autores. Klein (1960), por ejemplo, encontró en corazón embrionario de pollo de 2 a 21 días una disminución gradual del sodio intracelular y un aumento simultáneo del potasio intracelular que asoció con una actividad metabólica específica (bomba de Na-K). Por su parte Walz y Herz (1982) encontraron cambios en la sensibilidad a la ouabaina de astrocitos y de neuronas de cultivos primarios. Según los autores estos cambios reflejan una notable modificación en la actividad de la bomba de Na-K y de sus requerimientos iónicos, durante el desarrollo celular, hecho que se ha puesto claramente de manifiesto durante el desarrollo cerebral posnatal in vivo. De ser válida esta interpretación se podría proponer que las diferencias entre los valores de PM que se observan en las células control y en las células tratadas con corticoides, obedecen al hecho de que, durante el proceso de diferenciación neuronal, los corticoides aceleran la actividad de la bomba metabólica o bien incrementan el número de bombas en la membrana.

En apoyo de esta interpretación están los resultados de Romano y cols. (1985) quienes encontraron que, la aplicación de corticosterona a las neuronas en cultivo de embrión de pollo se manifiesta de tal forma que los voltajes del PM alcanzan rápidamente los valores de este parámetro característicos de las células adultas y que al añadir ouabaina a los cultivos, además de la corticosterona, los valores del PM descienden y son semejantes a los de las células control, es decir a las de aquellas células que no han recibido ni corticosterona ni ouabaina. Si sólo se añade ouabaina, los valores del PM quedan siempre significativamente por debajo de los valores del PM de las células control. Estos datos sugieren que los corticoides activan la ATP-asa de sodio y potasio lo que hace que aumenten los valores del PM mien-

tras que la ouabafina deprime la actividad de esta bomba provocando una disminución en el ingreso celular de potasio lo que hace que se reduzcan los valores del PM.

En el mismo sentido se pueden interpretar los resultados de Stáštny (1971) quien encontró que en homogenados de células cerebrales de embrión de pollo, hay un incremento progresivo de la actividad de la ATP-asa dependiente de Na y K. El mismo autor encontró que cuando los embriones habían sido previamente tratados con hidrocortisona, hay un incremento significativo en la actividad de la ATP-asa (Stáštny, 1971). También se sabe que otras hormonas, como la insulina, provocan una hiperpolarización en algunos tipos celulares trabajados "in vitro", mediante la estimulación de la bomba electrogénica de sodio (Clausen, 1980). Por su parte, en el músculo esquelético aislado, las catecolaminas hiperpolarizan las membranas celulares, en parte debido a que las células expuestas en forma prolongada a estas hormonas, incrementan la concentración intracelular de potasio (Clausen, 1980). Sampson y cols. (1982) y Bannett y cols. (1984) al analizar la acción de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 sobre el desarrollo de las características bioeléctricas de los miotubos en cultivos de fetos de rata, encontraron que las células tratadas con estas hormonas muestran mayores valores de PM que las no tratadas. Por su parte Granner y cols. (1968) propusieron que una de las acciones de la T_3 y la T_4 en las células musculares de rata consiste en incrementar el número de bombas de $Na^+ - K^+$ así como la permeabilidad de la membrana al Na y al K.

Efecto de la concentración extracelular de potasio sobre el potencial de membrana.

En la figura 4 se muestra la relación entre el logaritmo de la concentración extracelular de potasio y el potencial de membrana de células de 3, 6, 9 y 12 días de edad. Una vez obtenidos los puntos experimentales para cada valor de $|k^+|_e$, se procedía a calcular la cur

va que mejor se ajustara ellos para lo cual se aplicaba la ecuación de campo constante de Goldman modificada, ya que no se incluyeron los valores de permeabilidad y de concentración del cloruro. Esta ecuación relaciona los valores de PM con los valores de concentraciones interna y externa de los iones presumiblemente relacionados con el PM, en particular el sodio y el potasio, así como con el cociente entre la permeabilidad al sodio y la permeabilidad al potasio (P_{Na}/P_K). Es decir: $PM = 60 \log \frac{|K|_e + \frac{P_{Na}/P_K}{1 + P_{Na}/P_K} |Na|_e}{|K|_i + \frac{P_{Na}/P_K}{1 + P_{Na}/P_K} |Na|_i}$. De esta expresión se conocen o se presuponen los valores de todas las variables excepto el P_{Na}/P_K , el cual se despeja para cada grupo de datos experimentales es decir: $P_{Na}/P_K = \frac{10^{-PM/60} |K|_i - |K|_e}{|Na|_e - 10^{-PM/60} |Na|_i}$, donde la $|Na|_i$ se considera siempre igual a 30 mM, por corresponder al de una aproximación válida para cualquier tipo celular en el que haya un trabajo de la bomba metabólica. La $|Na|_e$ se considera siempre igual a 150 mM, a pesar de que en nuestros experimentos los cambios de potasio externo se hicieron a base de modificar el sodio externo, consideramos que la diferencia de concentración del sodio en cada solución nunca fue demasiado grande. La $|K|_i$ se obtiene de la extrapolación de las curvas obtenidas a cada edad explorada hasta el valor del intercepto con el eje de las X. Esta proposición se basa en la consideración de que el PM debe ser igual a cero cuando la $|K|_i$ es igual a la $|K|_e$. En todos los casos se encontró que este valor es cercano a 150 mM. La $|K|_e$ es el valor de la concentración externa de potasio para el cual se hacen las determinaciones del PM. En nuestros experimentos se hace variar desde 1.4 hasta 100 mM.

En la figura 4 se incluyen las curvas teóricas obtenidas mediante la ecuación de Goldman al considerar de abajo a arriba valores de P_{Na}/P_K iguales a 0.50, 0.10, 0.03 y 0.02, respectivamente. Si, por otra parte, en la relación $|K|_e$ contra PM se muestra el arreglo que siguen los puntos experimentales obtenidos de medir el PM a distintas concentraciones externas de potasio en neuronas de 3, 6, 9 y 12 días,

se comprueba que la curva que mejor se ajusta al comportamiento de las neuronas más jóvenes es la que corresponde al mayor valor del cociente de permeabilidades y que al aumentar la edad de las células el cociente de permeabilidades disminuye en forma progresiva. Utilizando los valores de $|K|_e$ de 10.4 a 100 mM que corresponden a la parte lineal de la curva, se encuentra, al aplicar la ecuación de Nernst, que la pendiente expresada como el cambio de voltaje por década de cambio en la $|K|_e$, es de -10.7 en las células de 3 días y que aumenta en forma progresiva en células de 6 (-28.66), 9 (-56.13) y 12 días (-63.66). Es hasta este último caso que se obtienen un cambio de $\overline{P_M}$ por década de cambio en $|K|_e$ igual al esperado de una célula adulta, según la ecuación de Nernst, es decir, que hasta los 12 días la membrana se comporta como una membrana selectivamente permeable al potasio tal como ha sido reportado en neuronas adultas. Por medio de esta misma expresión se calcula el potencial de equilibrio para el potasio y se encuentra que no varía en forma significativa, durante las distintas edades de la célula (tabla III). Todos estos datos sugieren que durante el desarrollo de la célula, por una parte, está ya trabajando la bomba de Na-K (nótese que la $|K|_i$ no difiere en forma significativa a las distintas edades) y por otra, que el cociente de permeabilidades disminuye durante el desarrollo en forma progresiva. Es probable que esta disminución obedezca a un aumento de la P_K mas que a una disminución de la P_{Na} , como se desprende del hecho de que, al mismo tiempo que disminuye la relación de permeabilidades aumenta la pendiente de la curva que relaciona $\overline{P_M}$ con el logaritmo de $|K|_e$ hasta llegar a dar un valor de -63 mV/década, valor que está muy próximo al valor teórico calculado según la ecuación de Nernst y que sugiere una membrana selectivamente permeable al potasio a grandes concentraciones externas de este ion.

Al graficar los valores de $\overline{P_M}$ obtenidos de células de 3, 6, 9 y 12 días previamente tratadas con corticoides, con respecto a la concentración externa de potasio, se obtuvo la familia de curvas que se muestra en la figura 5. Para calcular las curvas teóricas se siguió

el cambio de potencial de membrana inducido por tal inyección, pone de manifiesto diferencias importantes entre las tres poblaciones neuronales. Las células de 3 días muestran una reducción relativamente grande del potencial de membrana durante la inyección de una corriente despolarizante no mayor de 1×10^{-9} A y un aumento también elevado en el mismo parámetro durante la inyección de una corriente hiperpolarizante no mayor a -1×10^{-9} A. Cambios tan grandes en el PM con corrientes tan pequeñas sólo se pueden producir si la resistencia de entrada de la célula es elevada. En efecto, la pendiente de la curva I-V que se obtuvo a esta edad es muy grande y la resistencia de entrada de las células tiene un valor muy elevado ($R_e = 51.7 \text{ M}\Omega$), como se puede leer en la sexta columna de la tabla V. Por su parte, las células de 6 días mantienen también una relación proporcional con la corriente aplicada (figura 7) de tal manera que reducen su potencial de membrana cuando se les inyecta corriente despolarizante y lo incrementan con corrientes hiperpolarizantes, pero para un valor de corriente dado, el cambio de voltaje inducido es mucho menor que el que se observó en células más jóvenes. Esto implica que la resistencia de entrada de las neuronas disminuye bruscamente entre los 3 y los 6 días de cultivo, ya que la pendiente de la curva I/V de estas últimas se redujo a $10 \text{ M}\Omega$ (tabla V). Al hacer las mismas determinaciones entre corriente inyectada y los cambios de voltaje inducidos en células de 9 días, se puede comprobar que en esta población, si bien es cierto hay un ligero aumento de la resistencia de entrada ($15.9 \text{ M}\Omega$), hay también un aumento en el potencial de membrana generado por la aplicación de corrientes hiperpolarizantes, que no mantiene la relación de proporcionalidad que se observó con la aplicación de corrientes despolarizantes, lo que significa que la R_e se reduce en esta parte de la curva (figura 8). A este fenómeno se le conoce con el nombre de rectificación anómala y ha sido aceptado por un buen número de autores como la manifestación de la presencia de alguna proteína que funciona como canal específico para el potasio. La rectificación anómala sólo la observamos cuando se inyectó corriente hiperpolarizante. No se pudo ex-

plorar la posibilidad de rectificación de las neuronas ante la aplicación de corrientes despolarizantes debido a que con valores de estas ligeramente mayores de 1×10^{-9} A, se induce fácilmente el disparo de potenciales de acción. De hecho se considera que casi todas las células excitables muestran alguna forma de rectificación en determinados valores de potencial de membrana, lo que se puede tomar como índice de un funcionamiento celular adecuado. Bajo este punto de vista, nuestros resultados apoyan el hecho de que las neuronas en cultivo van adquiriendo en este medio y de manera progresiva, las características funcionales que les son propias de acuerdo con la estirpe celular a la que pertenecen.

La aparición durante el desarrollo de canales asociados con la conductancia específica de la membrana a distintos iones ha sido propuesta por varios autores en tejidos nervioso y muscular. Con el empleo de distintos tipos de toxinas específicas, así como registros electrofisiológicos de la actividad celular, se ha mostrado que los cultivos in vitro de células musculares esqueléticas de embrión de pollo, presentan primero, sólo propiedades eléctricas pasivas, más tarde potenciales de acción de sodio sensibles a la acción de calcio y por último, potenciales de acción de sodio sensibles a la acción de la tetrodotoxina (Frelin y cols., 1981; Lombet y col., 1983). Un estudio sobre la ontogénesis de la ATP-asa de sodio y potasio durante el desarrollo del músculo esquelético de pollo, llevó a Vigne y cols. (1982) a proponer que en esta estructura hay un desarrollo progresivo y coordinado entre la cantidad de ATP-asa y el número de canales rápidos de sodio. Algo similar fue encontrado para los canales de calcio en los sistemas muscular cardíaco, muscular esquelético y nervioso de rata, al llevarse a cabo un estudio ontogénico en estas estructuras (Kazazoglou y col., 1983).

En células de líneas clonales de neuroblastoma humanos se observó que hay una estrecha correlación entre el grado de diferenciación estructural y el desarrollo de las propiedades eléctricas pasivas y ac-

tivas de la célula (Kuramoto y cols., 1981). Los autores encontraron que en esta línea clonal hay un aumento progresivo del potencial de membrana. Más aún, en las líneas clonales en las que se observó un mayor grado de diferenciación estructural se presentó una clara rectificación anómala ante la aplicación de corrientes hiperpolarizantes, además de otras características bioeléctricas que apoyan la existencia de canales membranales específicos.

Los datos que se han encontrado en la literatura, al igual que los que se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo experimental apuntan hacia la aparición progresiva durante el desarrollo, aún cuando éste se haya llevado a cabo in vitro, de canales iónicos específicos los cuales son la expresión del grado de diferenciación celular.

Por lo que respecta a la acción de los corticoides sobre el desarrollo de las propiedades bioeléctricas pasivas de las neuronas en cultivo, se pudo constatar que las células tratadas mostraron a los 3 días, una menor resistencia de entrada que las no tratadas (tablas V y VI) y que, desde los 6 días presentaron rectificación anómala (figura 10) ante la aplicación de corrientes hiperpolarizantes. Este hecho se puede interpretar en el sentido de que los corticoides aceleran la aparición de los canales responsables del aumento de la conductancia al potasio, lo que va de acuerdo con el hecho bien establecido de que aumentan la síntesis de proteínas desde épocas muy tempranas del desarrollo celular (Romano y cols., 1985).

Resistencia, capacitancia y constante de tiempo.

La constante de tiempo es una medida que incide directamente en la propiedad de una célula excitable de producir una respuesta a un estímulo con determinada velocidad. Los valores de este parámetro que se obtuvieron de las neuronas en cultivo, reflejan un ligero incremento durante el desarrollo y por la acción de los corticoides, entre los 3 los 6 días del cultivo, lo que pone de manifiesto que, durante

cie ($C_m = C/S$) se observó que, de nueva cuenta, hubo un claro incremento de los valores de la C_m en las células controles y experimentales - de 6 con respecto a las de 3 días, seguido de una ligera reducción hacia los 9 y 12 días. Como la determinación de la C_m incluye la unidad de superficie celular, éstos cambios sólo reflejan el incremento de capacitancia que muestran las neuronas durante los 6 primeros días del cultivo.

CONCLUSIONES

- 1.- Los cultivos de células neurales de embrión de pollo, permiten tener un modelo experimental adecuado para el estudio de los procesos de diferenciación y desarrollo celular durante la ontogenia.
- 2.- El cálculo de la superficie celular basado en la consideración de que la forma de la neurona es la de una hemiesfera, no permite detectar diferencias significativas en este parámetro durante el desarrollo. No obstante, es probable que se produzca un aumento de la superficie celular asociado con la emisión de prolongaciones nerviosas durante las distintas etapas del desarrollo. Con esta base estructural, se podrían explicar mejor algunas características funcionales encontradas.
- 3.- El estudio de algunas propiedades eléctricas de las células neurales en cultivo, puso de manifiesto que:
 - a)- El potencial de membrana aumenta en forma progresiva durante el desarrollo, hasta alcanzar a los 9 días valores muy cercanos a los de las neuronas adultas.
 - b)- Al colocar las neuronas de distintas edades en soluciones de diferente concentración de potasio y medirles el potencial de membrana, se encontró que la relación de permeabilidades P_{Na}/P_K disminuye de manera significativa durante el desarrollo, lo que se puede atribuir a un incremento progresivo de la permeabilidad al potasio.
 - c)- Las propiedades pasivas estudiadas (resistencia, constante de tiempo y capacitancia de la membrana) muestran diferencias importantes durante el desarrollo celular y a la edad de 9 días del cultivo, alcanzan los valores característicos de neuronas adultas. Es hasta esta edad del cultivo que se encontró rectificación anómala.

- 4.- Al añadir una dosis conocida de glucocorticoides a los cultivos de neuronas y analizar las propiedades referentes al potencial de membrana, a la relación P_{Na}^{+}/P_{K}^{+} y a la resistencia de la célula, se comprueba que la corticosterona produce cambios significativos en estos parámetros que sugieren una acción temprana de esta hormona sobre la aparición de las propiedades eléctricas pasivas de las neuronas en desarrollo.
- 5.- Con base en los antecedentes que se encuentran en la literatura y en nuestros propios hallazgos, consideramos que las neuronas en cultivo siguen un proceso de diferenciación y maduración similar al que les es propio en el organismo del que provienen y que los corticoides actúan de múltiples maneras (inducción enzimática, síntesis proteica, actividad electrogénica, etc) en los mecanismos subyacentes a los procesos de maduración y diferenciación celular.

B I B L I O G R A F I A .

- Amano, A., E. Richelson and M. Nirenberg. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. ----- 69:258-263. (1972).
- Ardelpanu, A., A. Strungaru, and N. Sterescu. Aspects du métabolisme -- protéique cerebral des rats nouveaux-nés traités par hydrocortisone. Rev. Roum. Physiol. 9:223 (1972).
- Azmitia, E.C. and B.S. McEwen. Corticosterone regulation of tryptophan hydroxylase in midbrain of the rat. Science. 166:1274-1276 (1974).
- Bacaglioni, P.I. and N.C. Spitzer. Developmental changes in the inward-current of the action potential of Rohan-Beard neurones. J. Physiol, 271:93-117 (1977).
- Balazs, R., and M. Cotterrell. Effects of hormonal state on cell number and functional maturation of the brain. Nature (Lond.) --- 236:348 (1972).
- Ballard, P.L. and R.A. Ballard. Glucocorticoid receptors and the role-- of glucocorticoids in fetal lung development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:2668 (1972).
- Bannett, R.R., S.R. Sampson and A. Shainberg, A. Influence of thyroid-hormone on some electrophysiological properties of developing rat skeletal muscle cells in culture. Brain Research, 294:75-82 (1984).
- Barth, L.G. and L.J. Barth. Sodium and calcium uptake during embryonic-- induction in Rana pipiens. Dev. Biol. 28:18-34 (1972).
- Bloom, E.M. and I.B. Black. Metabolic requirements for differentiation of embryonic sympathetic ganglia cultured in the absence-- of exogenous nerve growth factor. Develop. Biol. 68:568--- 578. (1979).
- Boëthius, J. and E. Knutsson. Resting membrane potential in chick muscle cells during ontogeny. J. Exp. zool, 174:281-286. ---- (1970).
- Bohn, M.C. and J.M. Lauder. The effects of neonatal hydrocortisone on-- rat cerebellar development. An autoradiographic and light-microscopic study. Dev. Neurosc. 1:250-266 (1978).
- Bohn, M.C. and J.M. Lauder. Cerebellar granule cell genesis in hydrocortisone-treated rat. Dev. Neurosc. 3:81-89 (1980).
- Buonassissi, V., O. Sato and A.J. Cohen. Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:1184. (1962).
- Carrell, A. Present condition of a strain of connective tissue twenty-- eight months old. J. Exp. Med. 1-2. (1914).
- Carrel, A. Les cultures pures de cellules en physiologie. Soc. Biol. -- Compst. rend. 89:972-974. (1923).
- Chader, G.J. Hormone effects on the neural retina: Induction of glutamine synthetase by cyclic-3';5'- AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:1102. (1971).

- Chader, G.J. and L. Reif-Lehrer. Hormonal effects on the neural retina: structural requirements for the induction of glutamine synthetase. *Biochem. Biophys Acta*, 264:186. (1972).
- Chalazonitis, A., Ll. A. Greene and M. Nirenberg. Electrophysiological characteristics of chick embryo sympathetic neurons in dissociated cell culture. *Brain. Research*, 68:235-252, (1974).
- Chalazonitis, A. and G.D. Fischbach. Elevated potassium induces morphological differentiation of dorsal root ganglionic neurons in dissociated cell culture. *Developmental Biology*, 78: 173-183. (1980).
- Chignell, C.F. and E. Titus. Effect of adrenal steroids on a Na^+ - and K^+ requiring adenosine triphosphatase from rat kidney. *J. Biol. Chem.*, 241:5083-5089. (1966).
- Clausen, T. The hormonal regulation of active electrogenic Na^+ - K^+ transport in skeletal muscle. In: *Adv. Physiol. Sci. Vol. 3 Physiology of non-excitabile cells* (Ed. J. Salanski). Pergamon Press. Hungary 209-220. (1980).
- Cotterrell, M., R. Balázs and A.L. Johnsen. Effects of corticosteroids on the biochemical maturation of rat brain: postnatal cell formation. *J. Neurochem*, 19:2151-2167. (1972).
- Crain, S.M. Resting and action potentials of cultured chick embryo spinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol*, 104:285-330. (1956).
- Crain, S.M. Development of organotypic bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture. *Int. Rev. Neurobiol*, 9:1-43. (1966).
- Crain, S.M. Development of functional neuromuscular connections between separate explants of fetal mammalian tissues after maturation in culture. *Anat. Rec.*, 160:466-472. (1968).
- Crain, S.M. *Neurophysiologic studies in tissue culture*. Raven Press, New York. (1976).
- Crain, S.M. Synapse formation in neural tissue cultures. *Cell, tissue and organ cultures in neurobiology* (Ed. Fedoroff, S.) New York. 147-190. (1977).
- Crain, S.M. and E.R. Peterson. Bioelectric activity in long-term cultures of spinal cord tissues. *Science* 141:427-429. (1963).
- Crain, S.M. and E.R. Peterson. Complex bioelectric activity in organized tissue cultures of spinal cord (human, rat and chick). *J. Cell. Comp. Physiol.* 64:1-15. (1964).
- Crain, S.M. and M.D. Bornstein. Organotypic bioelectric activity in cultured reaggregates of dissociated rodent brain cells. *Science*, 176:182-184. (1972).

- Daniels, M.P. and B. Hamprecht. The ultrastructure of neuroblastoma glioma somatic cell hybrids. *J. Cell. Biol.* 63:691-699 (1974).
- De Haan, R.L. Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Developmental Biology*, 16:216-249. (1967).
- De Haan, R.L. The potassium-sensitivity of isolated embryonic heart-cells increases with development. *Developmental Biology*, 23:226-240, (1970).
- De Haan, R.L. and H.A. Fozzard. Membrane response to current pulses--in spheroidal aggregates of embryonic heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 65:207-222, (1975).
- De Vellis, J. and D. English. Hormonal control of glycerol-phosphate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* 15:1061-1070, (1968).
- De Vellis, J., J.F. McGinnis, G.A.M. Breen, P. Jeville, K. Bennett and K. McCarthy. Hormone effects on differentiation in neural cultures. In: *Cell tissue and organ cultures in Neurobiology* Acad. Press, Inc., New York. 485-511 (1978)
- Dichter, M.A. and G.D. Fischbach. The action potential of chick dorsal root ganglion neurones maintained in cell culture--*J. Physiol.*, 267:281-298, (1977).
- Ebel, A., R. Massarelli, M. Sensenbrenner and P. Mandel. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in chicken brain hemispheres *in vivo* and in cell culture. *Brain Research*, 76:461-472, (1974).
- Engelhardt, J.K., K. Ishikawa and D.K. Katase. Low potassium is critical for observin developmental increase in muscle resting potential. *Brain Research*, 190:564-568, (1980).
- Evans, VJ., J.C. Bryant, M.C. Fioramonti, W.T. McQuilkin, K.K. Sanford and W.R. Earle. Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro* I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cell. *Cancer Res.* 16:77-86, (1956).
- Fedoroff, S. Primary cultures, cell lines and cell strains: terminology and characteristics. In: *Cell tissue, and organ cultures in Neurobiology* (Ed. S. Fedoroff and L. Herts) Acad. Press, New York 265-286, (1977).
- Frelin, C., A. Lombet, P. Vigne, G. Romey and M. Lazdunski. The appearance of voltage-sensitive Na⁺ channels during the *in vitro* differentiation of embryonic chick skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 256(23):12355-12361 (1981).
- Gail, A.M. and J. De Vellis. Regulation of glycerol phosphate-dehydrogenase by hydrocortisone in dissociated rat cerebral cell cultures. *Develop. Biol.* 41:255-266 (1974).
- Gallagher, B.B. and G.H. Gloser. Seizure threshold, adrenalectomy and sodium-potassium stimulated ATPase in rat brain, *J. Neurochem.* 15:525-528 (1968).

- Granner, D.K., L.R. Chase, G.D. Aurbach, et al. Tyrosine aminotransferase: Enzyme induction independent of adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 162:1018. (1968).
- Greene, L.A., D.E. Burstein and M.M. Black. The priming model for the mechanism of action of nerve growth factor: evidence derived from clonal PC12 pheochromocytoma cells. In: *Tissue Culture in Neurobiology* (Ed. Gracobini, E., A. Vernadakis and A. Shaha) Raven Press, New York 313-320. (1980).
- Grossman, A., A. Boctor, and Y. Masuda. Induction of tyrosine aminotransferase with N6,02-dibutyryl adenosine 3'-5' monophosphate in rat-hepatoma cells grown in culture. *Eur J. Biochem* 24:149. (1971).
- Harris, A.J., S. Heinemann, D. Schubert and H. Tarakis. Thopic interaction between closed tissue culture lines of nerve and muscle. *Nature (Lond.)* 231:296-301. (1971).
- Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 4:140-143. (1906-1907).
- Harrison, R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasm movement. *J. Exper. Zool.* 9:787-846. (1910).
- Harrison, R.G. The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphologic study. *Anat. Rec.*, 6:181-193. (1912).
- Hass, D.C., D.B. Hier, B.G.W. Aranson and M. Young. On a possible relationship of cyclic AMP to the mechanism of action of nerve growth factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140:45-47. (1972)
- Henn, F.A. and A. Hamberger. Gial cell function: Uptake of transmitter substances. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68:2686-2690. (1971).
- Howard, E. and D.M. Granoff. Increased voluntary running and decreased motor coordination in mice after neonatal corticosterone implantation. *Expl. Neurol.* 22:661-673. (1968).
- Huttenlocher, P.R. and I.M. Amemiya. Effects of adrenocortical steroids and adrenocorticotrophic hormone on (Na⁺ - K⁺)-ATPase in immature cerebral cortex. *Pediat. Research.*, 12:104-107. (1978).
- Ingle, D.J. The production of glycosuria in the normal rat by means of 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone. *Endocrinology*, 29:649. (1941).
- Jaros, G.G., G. Moonen, M. Sensenbrenner and P. Mandel. Cultures de cellules dissociées d'hémisphères cérébraux a composante essentiellement neuronale. *C.R. Acad. Sci. Paris série D*280:327-330. (1975).
- Jones, M.T., E.W. Hillhouse, and J.L. Burden. Dynamics and mechanics of corticosteroid feedback at the hypothalamus and anterior pituitary gland. *J. Endocrinal.* 73:405-417. (1977).

- Jorgensen, P.L. Regulation of the (Na⁺-K⁺)-activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney I. The effect of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system. *Biochem. Biophys. Acta (Amst.)*, 151:212-224. (1968).
- Jorgensen, P.L. Regulation of the (Na⁺-K⁺)-activated ATP hydrolyzing enzyme system in rat kidney. II. the effect of aldosterone on the activity in kidneys of adrenalectomized rats. *Biochem. Biophys. Acta (Amst.)* 192:326-334. (1969).
- Jorgensen, P.L. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump protein structure and conformations of the pure (Na⁺-K⁺)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 694:27-68. (1982).
- Kano, M. Development of excitability in embryonic chick skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol*, 86:503-510. (1975).
- Kazasoglou T, A. Schmid, J-P Renavel and M. Lazdunski. Ontogenic appearance of Ca²⁺ channels characterized as binding sites for nifedipine during development of nervous, skeletal and cardiac muscle systems in the rat. *Fed. European Biochem. Soc.* 164(1):75-79. (1983).
- Kendall, D.A., B.S. Mc Ewen and S.J. Enna. The influence on ACTH and corticosterone on ³H-GABA receptor binding in rat brain. *Brain Research*, 236:365-374. (1982).
- Kidokoro, Y. Development of action potentials in a clonal rat skeletal muscle cell line. *Nature New Biology*, 241:158-159. (1973).
- Kidokoro, Y. Developmental changes of membrane electrical properties in a rat skeletal muscle cell line. *J. Physiol. (Lond)*, 244:129-143. (1975).
- Klein, R.L. Ontogenesis of K and Na fluxes in embryonic chick heart. *Am. J. Physiol*, 199:613-618. (1960).
- Kotas, R.V. and M.E. Avery. Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. *J. Appl. Physiol.* 30:358. (1971).
- Kuramoto, T., K. Werrbach-Perez, J.R. Perez-Polo and B. Haber. Membrane properties of a human neuroblastoma II: Effects of differentiation. *J. Neurosci. Research*, 6:441-449. (1981).
- Laron, Z. and A. Pertzalan. The comparable effects of 6-alpha flusoprednisolone, 6-alpha methylprednisolone and hydro cortisone on linear growth of children with congenital adrenal virilism and Addisons disease. *J. Pediatr.* 73:774. (1968).
- Lasher, R.S. and I.S. Zagon. The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated new rat cerebellum. *Brain Research*, 41:482-488. (1972).
- Lee, K.S., A.M. Eten and G.S. Lynch. Corticosterone modification of the synthesis of specific proteins in the central nervous system. *Ann. Meet. Soc. Neurosci. Anaheim*, Abstr. 1120. (1977).
- Liggins, G.C. Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocrinol*, 45:515-523. (1969).

- Liggins, G.A. and R.N.A. Howie. Controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50:515. (1972).
- Loeb, J.N. Corticosteroids and growth. In: *Physiology in medicine*. (Ed. Fishman, A.P.) New England, 295(10):547-552. (1976).
- Lombet, A., T. Kazazoglou, E. Delpont, J-F. Penaud and M. Lazdunski. Ontogenic appearance of Na⁺ channels characterized as high affinity binding sites for tetrodotoxin during development of the rat nervous and skeletal muscle systems. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 110(3):894-901. (1983).
- Manitius, A., K. Bensch and F.H. Epstein. (Na⁺-K⁺)-activated ATPase in kidney cell membranes of normal and methylprednisolone-treated rats. *Biochem. biophys. Acta (Amst)*. 150:563-571. (1968).
- Markey, K.A., A.C. Towels and P.G. Sze. Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in *mons a jocus coeruleus* during postnatal. *Develop. Endocrinal*. Vol. III, No. 5:1519-1523 (1982).
- Mc Ewen, B.S. Steroid receptors in neuroendocrine tissues; topography, subcellular distribution and functional implications. In: *International symposium on Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology*. (Ed. F. Naftolin et al) Amsterdam. 277-304. (1976).
- Mc Ewen, B.S., L.C. Krey and V.N. Luine. Steroid hormone action in the neuroendocrine system: when is the genome involved? In: *The Hypothalamus* (Ed. R.J. Baldessarini and J.B. Martini) Raven, New York, 255-268. (1978).
- Mc Ewen, B.S. and P.G. Davis Parsins. The brain as a target for steroid-hormone action. *Ann. Rev. Neurosci.*, 2:65-112. (1979).
- Miyake, M. The development of action potential mechanism in a mouse neuronal cell line in vitro. *Brain Research*, 143: 349-354. (1978).
- Morrell, J.I., D.B. Kelley and D.W. Pfaff. Sex steroid binding in the brains of vertebrates: studies with light microscopic autoradiography. In: *Brain Endocrine Interactions II. The ventricular system* (Ed. Knigge, K., D.S. Scett and K. Kobavashi). Basel. 230-256. (1975).
- Moscona, A.A., M.H. Moscona and V. Saenz. Enzyme induction in embryonic retina: The role of transcription and translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61:160. (1968).
- Moscona, A.A. and R. Piddington. Enzyme induction by corticosteroids in embryonic cells: Steroid structure and inductive effect. *Science* 158:496. (1967).
- Motoyama, E.K., M.M. Orzalesi and Y. Kikkawa. Effect of cortisol on the maturation of fetal rabbit lungs. *Pediatrics*, 48:547. (1971).
- Murphy, R.A., N.J. Pantazies, B.G.W. Arnason and M. Young. Secretion of a nerve growth factor by mouse neuroblastoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1895-1898. (1975).

- Nelson, P.G., J.H. Peacock, T. Amano and J. Minna. Electrogenesis in mouse neuroblastoma cells in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 77:337-352. (1971).
- Nelson, P.G. and J.H. Peacock. Electrical activity in dissociated cell cultures from fetal mouse cerebellum. *Brain Research*, 61:163-174. (1973).
- Nelson, P.G. Neuronal cell lines. In: *Cell, tissue and organ cultures in-- Neurobiology* (Ed. by S. Fedoroff), New York, 349-365. (1977)
- Oda, M.A.J. and P.R. Huttenlocher. The effect of corticoids on dendrite -- in the rat brain. *J. Biol. Med.*, 3:155-165. (1974).
- Otten, V. and H. Throenen. Effect of glucocorticoids on nerve growth factor enhanced response and reduced time requirement to initiate enzyme induction. *J. Neurochem.*, 29:69. (1977).
- Pappano, A.J. and N. Sperelakis. Spike electrogenesis in cultured heart -- cells. *Am. J. Physiol.*, 217:615-624. (1969).
- Parker, R.C. *Methods of tissue culture*. P.B. Hoeber Inc., New York. (1938)
- Peacock, J.H., P.G. Nelson and M.N. Goldstone. Electrophysiologic study of cultured neurons dissociated from spinal cords and dorsal -- root ganglia of fetal mice. *Develop. Biol.*, 30:137-152. --- (1973).
- Pearson, D. Neurosecretion in cultured systems. In: *Cell, tissue, and organ cultures in Neurobiology* (Ed. S. Fedoroff and L. Hertz)- Acad. Press. New York, 573-588. (1977).
- Phillipson, O.T. and M. Sandler. The effect of hydrocortisone and ACTH on monoamine oxidase and tyrosine hydroxylase in explant cultures of embryonic chick sympathetic ganglia. *Brain Res.*, 90:283. (1975).
- Piddington, R. Hormonal effects on the development of glutamine synthetase in the embryonic chick retina. *Dev. Biol.*, 16:168. (1967).
- Pitot, H.C., C. Peraino, P.A. Morse Jr. et al. Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natl. Cancer Inst. --- Monogr.* 13:229. (1964).
- Pomerat, C.M. and I. Costero. Tissue cultures of cat cerebellum. *Amer. J. Anat.* 99:211-247. (1956).
- Prasad, K.N. Differentiation and growth of neuroblastoma cells and serum--types. *Trans. Am. Soc. Neurochem.* (1977).
- Reinisch, J.M., N.G. Sumon, W.G. Karow and R. Gandelman. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine --- growth. *Science*. 202:436-438. (1978).

- Roisen, F.J., R.A. Morphy, M.E. Pichichero and W.G. Braden. Cyclic adeno-³ sine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science* 175:73-74. (1972).
- Romano, M., V. Gioia and M.V. Bernasconi. Prednisone effects on postnatal brain development of rats following maternal therapy. *Pediat. Research*. 11:1000-1003. (1977).
- Romano, M.C., P.N. Velázquez, M. Bonilla Núñez and B. Fuentes-Pardo. Effect of glucocorticoids on development of the membrane resting potential of chick embryo brain cells in culture. *Int. J. Devl. Neuroscience*, (en prensa). (1985).
- Rosenberg, R.N. Neuronal and glial enzyme studies in cell culture. *in vitro* 8:194-206. (1972).
- Sadasivudu, B., T. Indira Rao and C. Radha. Metabolic effects of hidrocortisone in mouse brain. *Neurochem. Research*, 2:521-532 (1977).
- Salas, M. and S. Shapino. Hormonal influences upon the maturation of the rat brain's responsiveness to sensory stimuli. *Physiol. Behav.* 5:7-12. (1970).
- Sampson, S.R., R.R. Barnett and A. Shainberg. Effects of thyroxine on transmembrane resting potentials of skeletal muscle cells in culture. *J. Neurosci. Research*, 8:595-601. (1982).
- Schubert, D., S. Humphreys, F. de Vitry and F. Jacob. Induced differentiation of a neuroblastoma. *Devel. Biol.*, 25:514-546. (1971).
- Schwartz, A.L. Influence of glucocogon, 6-N,Z'-O-dibutyryl adenosine on the arginine synthetase system in perinatal rat liver. *Biochem. J.*, 126:89. (1972).
- Scott, B.S. Effect of potassium on neuron survival in cultures of dissociated human nervous tissue. *Exp. Neurol.* 30:297-308. (1971).
- Scott, B.S. and K.C. Fischer. Potassium concentration and number of neurons in cultures of dissociated ganglia. *Exp. Neurol.* 27:16-22. (1970).
- Sensenbrenner, M. Dissociated brain cells in pronarg cultures in: *Cell tissue and organ cultures in neurobiology* (Ed. by Fedoroff, S.). New York, 191-213. (1977).
- Sensenbrenner, M., G.G. Jaros, G. Moonen and P. Mandel. Effects of synthetic tripeptide on the differentiation of dissociated cerebral hemisphere nerve cells in culture. *Neurobiology*. 5:207-213. (1975).
- Shapiro, S. Some physiological, biochemical and behavioral consequences of neonatal hormone administration: cortisol and thyroxine, *Gen. Comp. Endocrin.*, 10:214-228. (1968).
- Shapiro, S. Hormonal and environmental influences on rat brain development and behavior. In: *Brain Development and Behavior* (Ed. Sterman and Mc. Ginty). Acad. Press, New York, 307-334. (1971).

- Shapiro, D.L. Morphological and biochemical alterations in foetal rat --- brain cells cultured in the presence of monobutryril cyclic-- AMP. *Nature (Lond.)* 241:203-204. (1973).
- Spector, I. Electrophysiology of clonal nerve cell line. In: Excitable -- cells in tissue culture. (Ed. by P.G. Nelson and M. Lieber -- man), Plenum Press, New York and London, 247-277 (1981).
- Spector, I. and J.M. Prives. Development of electrophysiological and bio -- chemical membrane properties during differentiation of em -- bryonic skeletal muscle in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.-- U.S.A.* 74(11):5166-5170. (1977).
- Sperelakis, N. and D. Lehmkühl. Effect of current of transmembrane poten -- tials in cultured chick heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 47:-- 895-927. (1964).
- Sperelakis, N. and D. Lehmkühl. Ba⁺⁺ and Sr⁺⁺ reversal of the inhibition-- produced by ouabain and local anesthetics of membrane poten -- tials of cultured heart cells. *Exp. Cell. Research*, 49:396-- 410. (1968).
- Sperelakis, N. and A.J. Pappano. Increase in P_{na} and P_k of cultured heart cells produced by veratridine. *J. Gen. Physiol.*, 53:97-114. (1969).
- Sperelakis, N. and K. Shigenobu. Changes in membrane properties of chick embryonic hearts during development. *J. Gen. Physiol.*, 60:-- 430-453. (1972).
- Sperelakis, N. and M.J. Lean. The electrical properties of embryonic chick cardiac cells. In: *Fetal and Newborn Cardiovascular Physiology* (Ed. by Longo and Reneau) Garland Press. Vol. 1:191-235. (1978).
- Stáštny, F. Hydrocortisone as a possible inducer of Na⁺-K⁺-ATPase in the chick embryo cerebral hemispheres. *Brain Research*, 25:397-- 410. (1971).
- Takaoka, T. and H. Katsuta. Long-term cultivation of mammalian cell strains in protein and lipid-free chemically defined synthetic media *Exptl. Cell. Res.*, 67:295-304. (1971).
- Thompson, E.B., G.H. Tomkins and J.C. Curran. Induction of tyrosine -ke -- toglutarate transaminase by steroid hormones in a newly esta -- blished tissue culture cell. line. *Proc. Natl. Acad. Sci. -- U.S.A.* 56:296. (1966).
- Thompson, E.B. and M.E. Lippman. Mechanism of action of glucocorticoids.-- *Metabolism*. 23(2):159-202. (1974).
- Varon, S. The investigations of neural development by experimental *in vitro* techniques. In: *Cellular Aspects of Neural Growth and Diffe -- rentiation*. (Ed. UCLA) Los Angeles. No. 14:223-242. (1971).

- Varon, S. and C. Raiborn. Excitability and conduction in neurons of dissociated ganglionic cell cultures. *Brain Research.*, 30:83-98. (1971).
- Vernadakis, A. Hormonal factors in the proliferation of glial cells in culture. In: *Influence of Hormones on the Nervous System.* (Ed. D.H. Ford) Karger, Basel. 42-55. (1971).
- Vernadakis, A. and D.M. Woodgury. Electrolyte and amino acid changes in -- rat brain during maturation. *Amer. J. Physiol.*, 203:748-752. (1962).
- Vigne, P., C. Frelin and M. Lazdunski. Ontogeny of the (Na⁺, K⁺)-ATPase -- during chick skeletal myogenesis *J. of Biol. Chem.*, 257(10): 5380-5384. (1982).
- Walz, W. and L. Hertz. Ouabain-sensitive and ouabain-resistant net uptake of potassium into astrocytes and neurons in primary cultures. *J. of Neurochem.*, 39(1):70-77. (1982).
- Warembourg, M. Radioautographic study of the rat brain after injection of 1, 2. ³H corticosterone. *Brain. Res.* 89:61-70. (1975).
- Watanabe, H., W.E. Nicholson and D.N. Orth. Regulation of adrenocorticocorticotropin (ACTH) synthesis and secretion by tumor cells in -- culture. *Clin. Res.* 20:38. (1972).
- Waymouth, C. Construction of tissue culture media. In: *Growth, Nutrition-- and Metabolism of Cells in Culture.* (Ed. G.H. Rothblat and-- V.J. Cristofalo) Acad. Press, New York and London, 11-47. -- (1972).
- White, P.C. *The cultivation of animal and plant cells.* Roland Press. Co., New York. 21-29. (1954).
- Winter, C.A., R.H. Silber and H.C. Stoerk. Production of reversible hyperadrenocortinism in rats by prolonged administration of cortisone. *Endocrinology*, 47:60. (1950).
- Wolf, M.L. Cell and organotypic culture studies of neurological mutations affecting structural development. In: *Cell, tissue, and organ Cultures in Neurobiology* (Ed. S. Fedoroff and L. Hertz) Acad. Press, New York 555-572. (1977).
- Wood, P.M. and R.P. Bunge. Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature (Lond.)* 256:662-664. (1975).
- Woodbury, D.M. and V.D. Davenport. Brain and plasma cations and experimental seizures in normal and desoxycorticosterone treated rats *Am. J. Physiol.*, 157:234-240. (1949).