

2ej
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U. A. C. P. y P. del C. C. H.

**CULTIVO DE CELULAS NERVIOSAS
DE RATON**

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P r e s e n t a :

CESAR EDUARDO GUERRA NAVA

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.

RESUMEN

En presente trabajo se describen las características del crecimiento in vitro de células hipotalámicas y cerebrales de fetos murinos. Este registro de datos citológicos y de curvas de crecimiento se podrán emplear como información preliminar al montaje de cultivos de células nerviosas como modelos in vitro susceptibles al acceso y la manipulación directa del microambiente celular. Entre las observaciones importantes al considerar el cultivo de estas células como modelo de estudio se pueden mencionar las siguientes:

a) Los distintos patrones de comportamiento celular están estrechamente ligados al grado de desarrollo in vivo del tejido usado como fuente de células nerviosas. Así, se observa que la susceptibilidad al proceso de cultivo de células dispersas depende claramente del grado de diferenciación al que han llegado las estructuras empleadas. Ya que el desarrollo fetal del hipotálamo es más temprano que el de estructuras corticales del cerebro, la edad fetal a la que se obtiene el tejido hipotalámico es muy importante en el desarrollo subsecuente in vitro. En cambio, el tejido fetal de corteza cerebral es más refractario al estrés de la manipulación y crecimiento in vitro.

b) Se distinguen dos comportamientos distintos de las células gliales hipotalámicas en función de su edad fetal. Al ser tomadas de hipotálamos donde la maduración neuronal se está iniciando, las células gliales se comportan como precursores inmaduros con gran capacidad proliferativa y menor disposición a la diferenciación morfológica. Si las células gliales se toman de hipotálamos con 2

días más avanzada la maduración neuronal, presentan características de precursores comprometidos, esto es, con menor capacidad proliferativa y mayor disposición a diferenciarse. Particularmente clara fue la diferencia entre estos dos grupos gliales en respuesta al medio condicionado homólogo (e.g. medio condicionado por cultivos del mismo origen). Las células gliales más inmaduras respondían inhibiendo su actividad proliferativa principalmente. En cambio, las células gliales de mayor edad respondían con una mayor diferenciación morfológica.

c) El medio condicionado homólogo aumenta la sobrevivencia y el desarrollo de neuronas cerebrales e hipotalámicas. Muy probablemente las células responsables por este acondicionamiento microambiental son las células astrogliales. La interacción trófica neurono-glial en hipotálamo posiblemente es importante en la expresión de la Hormona Liberadora de Tirotrofina (TRH), si no como una condición instructiva, por lo menos como una condición permisiva.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	1
1.2 ANTECEDENTES.....	3
Cultivo de células: la tecnología.....	3
El desarrollo celular in vitro.....	5
El cultivo celular en la Neurobiología.....	6
1.3 ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	8
Ontogenia de los tipos celulares en el SNC....	10
1.4 ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO IN VITRO.....	12
Inmunocitoquímica y la genealogía nerviosa en el SNC.....	15
Comportamiento de las células nerviosas in vitro.....	21
Esquema genealógico en el SNC.....	23
Aspectos genealógicos en el Sistema Nervioso Periférico (SNP).....	25
1.5 CULTIVO DE CELULAS HIPOTALAMICAS.....	26

2. MATERIALES Y METODOS.....	29
2.1 MEDIO Y CAJAS DE CULTIVO.....	29
2.2 DISECCION.....	29
2.3 DISPERSION Y SIEMBRA.....	30
2.4 EXTRACCION DE CELULAS EN CULTIVO.....	31
2.5 EXTRACCION DE TEJIDOS.....	32
2.6 DETERMINACION DE DNA Y PROTEINA EN CULTIVOS.....	32
2.7 RADIO-INMUNO-ENSAYO (RIE) CONTRA TRH.....	33
3. RESULTADOS.....	35
3.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.....	35
3.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.....	38
3.3 DENSIDADES DE SIEMBRA ALTERNATIVAS:	
MUY ALTA DENSIDAD (400,000 células por cm ²),	
ALTA DENSIDAD (150,000 células por cm ²), y	
BAJA DENSIDAD (50,000 células por cm ²).....	41
3.3.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.....	41
3.3.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.....	42
3.4 MEDIO CONDICINADO HOMOLOGO.....	44
3.4.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14 EN MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.....	45
3.4.2 CELULAS CEREBRALES DE E14 EN MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.....	45

3.5 DHEM CON 20%, 10%, 5% Y 0% DE SUERO BOVINO FETAL.....	46
3.5.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.....	46
3.5.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.....	48
3.6 CELULAS DE E18.....	50
3.7 TRH IN VIVO E IN VITRO.....	54
4. DISCUSION.....	56
4.1 SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO IN VITRO EN RELACION A LA EDAD EMBRIONARIA DE LAS CELULAS NERVIOSAS.....	56
4.2 DIFERENCIACION MORFOLOGICA IN VITRO.....	58
4.3 CRECIMIENTO CELULAR A BAJA DENSIDAD DE SIEMBRA Y EFECTO DE MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.....	60
4.4 EFECTO DEL SUERO BOVINO FETAL (FCS) SOBRE LA DIFERENCIACION MORFOLOGICA IN VITRO.....	62
4.5 EFECTO DEL SUERO BOVINO FETAL (FCS) SOBRE LA PROLIFERACION GLIAL.....	64
4.6 GLIOBLASTOS ONTOGENETICAMENTE DISTINTOS Y SU COMPORTAMIENTO IN VITRO.....	66
4.7 NEUROPEPTIDOS HIPOTALAMICOS: HORMONA LIBERADORA DE HORMONA TIROTROPICA (TRH).....	67

5. CONCLUSION..... 69

***** gráficas y tablas *****

APENDICE I..... 70

APENDICE II..... 74

REFERENCIAS..... 77

1. INTRODUCCION.

1.1 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

En el laboratorio se pretende estudiar los aspectos bioquímicos de la expresión y metabolismo de péptidos neuroactivos en el Sistema Nervioso Central. Particular énfasis se ha puesto en el estudio de la neurosecreción y biosíntesis de dos péptidos hipotalámicos: la Hormona Liberadora de Tirotrófina (TRH) y la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), un tripéptido y un decapeptido, respectivamente. Se ha demostrado que estas hormonas tienen una gran importancia en la función neuroendócrina a través del eje hipotálamo-hipofisiario. En la búsqueda de un modelo donde estudiar la regulación de la biosíntesis, se consideró el desarrollar técnicas de cultivo dadas las múltiples ventajas que estos sistemas *in vitro* ofrecen. En la tesis del Biólogo Jose Luis Redondo (1983), desarrollada en este laboratorio, se describen los primeros esfuerzos en la optimización de un sistema de cultivo primario de células dispersas, obtenidas de hipotálamos embrionarios de ratón. Utilizando Radio-inmuno-ensayos específicos, se monitoreó la expresión peptídica *in vitro*. En adelante solo se hará mención de los resultados sobre TRH, del cual se obtuvo más información. Fue posible detectar niveles altos de TRH (más de 50 pg por hipotálamo equivalente *in vitro*) en células cultivadas hasta por dos semanas, si se frenaba la proliferación celular con citocín-arabinósido. Sin embargo, los valores del tripéptido detectados adolecían de una gran variabilidad. En un grupo grande de cultivos hipotalámicos, aproximadamente un tercio presentó un desarrollo neuronal decepcionante, con gran

INTRODUCCION

pérdida celular. En estos cultivos no se detectó TRH intracelular. En cambio, en los cultivos restantes se logró una sobrevivencia neuronal satisfactoria (por observaciones microscópicas a contraste de fases). En la mitad de este subgrupo se detectaron niveles de TRH intracelular que variaban en un intervalo de 50 a 1000 pg por hipotálamo equivalente in vitro. En la otra mitad no fue posible detectar el péptido. Estos resultados nos instaron a definir condiciones de desarrollo in vitro favorables a las neuronas hipotalámicas en general, y a las neuronas peptidérgicas en particular.

Actualmente, se sabe de la importancia que varios factores celulares y hormonales tienen sobre el desarrollo nervioso. En el Sistema Nervioso Central, las células gliales parecen estar jugando un papel importante en la diferenciación neuronal. No obstante, el sobrecrecimiento glial que se obtiene bajo ciertas condiciones in vitro va en detrimento de la población neuronal; el estado de diferenciación obtenido por la población glial pudiera también repercutir sobre la funcionalidad nerviosa. En el presente trabajo se analiza el desarrollo de ambas poblaciones bajo distintas condiciones de crecimiento. De esta manera, se pretende tener un registro del comportamiento y características de las distintas poblaciones celulares en estos cultivos como un paradigma en el diseño de cultivos particulares encaminados a la solución de problemas específicos. Las variables del crecimiento in vitro que se analizaron son la siguientes:

- i) Crecimiento de células nerviosas tomadas de dos regiones distintas del cerebro: hipotálamo y lóbulos frontales.
- ii) Efecto de la inclusión de un agente antimitótico en el medio sobre el desarrollo celular.

INTRODUCCION

iii) Densidad de siembra: crecimiento a Muy Alta Densidad celular (4×10^{-5} cel/cm²), Alta Densidad celular (1×10^{-5} cel/cm²), y Baja Densidad celular (0.5×10^{-5} cel/cm²).

iv) Crecimiento en presencia de medio condicionado homólogo.

v) Crecimiento en presencia de distintas proporciones de suero en el medio.

vi) Crecimiento de células procedentes de embriones de dos edades fetales distintas.

El desarrollo y crecimiento celular se siguió por observaciones microscópicas a contraste de fases, y por la determinación de las curvas de crecimiento, expresadas como valores totales de ácido desoxirribonucléico (DNA) y proteína. La repercusión que las variables mencionadas pudieran tener sobre el desarrollo neuronal peptidérgico en cultivo se monitoreó por Radio-inmuno-ensayo contra TRH, midiendo el contenido celular del péptido.

Para situar el avance logrado en el estudio de células animales utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, se mencionarán algunos aspectos históricos sobre esta tecnología de reciente florecimiento, especialmente en el área de la neurobiología.

1.2 ANTECEDENTES.

Cultivo de células: la tecnología.

Desde su nacimiento en 1907, cuando Harrison cultivó por primera vez un explante de tubo neural fuera del organismo y sobre un cubreobjetos, el cultivo celular *in vitro* abrió un capítulo nuevo en el acervo de técnicas disponibles para la investigación biológica de células animales. Como en toda nueva técnica, surgió de ésta una proliferación de metodologías tan particulares como los mismos investigadores que las diseñaban, perfilándose así un arte más que una técnica analítica. Frecuentemente, los cultivos consistían de explantes atrapados en coágulos y mantenidos en plasma, entre un

cubreobjetos invertido sobre un portaobjetos con una depresión circular (cámara de Maximow). No fué sino hasta los trabajos de Carrel y cols. (1912) que se propuso una serie de directrices para la aplicación del cultivo celular a la biología experimental, utilizando coágulos, sueros y extractos de tejidos en el mantenimiento y propagación de células de vertebrados. Estos procedimientos sentaron las bases para una amplia gama de investigaciones en los siguientes años (Carrel, 1924). Empero, la técnica desarrollada hasta entonces era demasiado laboriosa, y el uso de medios complejos y de composición indefinida obstaculizaba estudios analíticos.

En la década de los 50s, aparecieron técnicas de cultivo basadas en la siembra de células dispersas. Se definieron así varias técnicas de cultivo con características propias a su desarrollo y aplicación, a saber:

Cultivo de órgano: Un órgano o fragmento de órgano es cultivado conservando la histología original del órgano in vivo.

Cultivo de células: Células dispersadas por vía enzimática, mecánica o química se cultivan como suspensión o sobre un sustrato sólido (e.g. la superficie de vidrio del recipiente). El cultivo puede ser primario o de una línea celular.

Cultivo primario: Las células cultivadas proceden directamente de un organismo, sin ninguna subcultivación in vitro.

Línea Celular: Propagación de células después de la primera subcultivación. La línea celular puede ser continua (e.g. tumoral) o finita (e.g. células somáticas diploides).

Cultivo Histotípico: Reasociación de las células en estructuras tridimensionales reminiscentes de un tejido en particular (también llamado cultivo de tejido).

Dos ramas en la investigación biomédica dieron el principal ímpetu al desarrollo de metodologías de cultivo como una tecnología sofisticada y precisa: la producción de vacunas antivirales y la

comprensión de los procesos neoplásicos. Fué posible producir grandes cantidades de células bajo condiciones controladas para análisis bioquímico. Poco después, en la década de los 60s, técnicas de fusión celular permitieron grandes avances en estudios in vitro de la genética de células somáticas (Sorlieul y Ephrussi, 1961; Littlefield, 1964; Harris y Watkins, 1965). Asimismo, en 1975 esta innovación se utilizó en la producción de hibridomas: linfocitos B transformados por fusión con células tumorales de mieloma (Kohler y Milstein, 1975). El hallazgo dió origen a toda una nueva tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales, con aplicaciones no solo dentro de la Inmunología, rama de estudio donde fué generada, sino además en muchos otros campos. La explosión del uso y aplicación de métodos de cultivo desde entonces llevó a la estandarización de los elementos para el mantenimiento celular in vitro (medios, sueros, antibióticos, etc.) así como del equipo necesario (recipientes de cultivo, incubadoras, campanas de flujo laminar, etc.). Actualmente la meta a alcanzar en lo que concierne a esta metodología es la completa definición química del medio de cultivo para la obtención y mantenimiento tanto de líneas celulares como de células diferenciadas (Barnes y cols., 1984a).

El desarrollo celular in vitro.

La agresión que sufre un tejido diferenciado en el proceso de dispersión repercute dramáticamente en la viabilidad de sus células. Varios eventos selectivos operan para la obtención de alguna población en particular. Comúnmente, sobreviven solo aquellas células con capacidad proliferativa y de adaptación a las condiciones in vitro (tipo fibroblastos; Freshney, 1983). Se ha optado por utilizar

tejidos mas inmaduros (e.g. fetales), ya que estos son mas resistentes al estrés de la manipulacion y siembra. Sin embargo, en muchas ocasiones queda por demostrar el paralelismo entre el desarrollo in vitro e in vivo. Aun en cultivos primarios de células de tejido adulto existen varios "compartimientos" de células correspondientes a los distintos rangos dentro de una genealogía particular. Basicamente se pueden definir tres categorías o tipos celulares dentro de los componentes de cualquier tejido:

Células madre: son capaces de dar origen a varios fenotipos diferenciados; con gran potencial proliferativo.

Células precursoras comprometidas: con potencial proliferativo limitado y relativo a las circunstancias, dan origen a un fenotipo particular bajo condiciones apropiadas ("inducción").

Células diferenciadas maduras: usualmente postmitóticas (sin capacidad proliferativa) y de fenotipo completamente diferenciado.

Es muy comun que las condiciones in vitro seleccionen a los tipos celulares inmaduros dentro de una misma serie genealógica, particularmente en base a sus capacidades proliferativas, como por ejemplo las células precursoras, con la subsiguiente pérdida de los marcadores de diferenciación en el transcurso del cultivo. Sin embargo es posible tener condiciones bajo las cuales se recuperan estas características diferenciadas (para referencias ver Freshney, 1983).

El cultivo celular en la neurobiología.

Ross G. Harrison (1907), a quien se le considera el inventor del cultivo celular, utilizó esta técnica con el único fin de demostrar el origen de las fibras nerviosas, y dar termino a una controversia sobre este asunto. Harrison pudo observar el desarrollo de las neuritas como la elongacion de fibras individuales (axones) hechas de

extensiones protoplásmicas con un extremo distal de mayor tamaño que el diámetro de la fibra, y con múltiples y finas prolongaciones (cono de crecimiento). Esta estructura protoplásmica está en continua extensión y retracción, sugiriendo movimientos ameboides, y es responsable de la extensión y alargamiento de la fibra axónica (Harrison, 1907). Una vez establecido lo anterior, este investigador no se ocupó de explotar las aplicaciones de la explantación in vitro.

Varios años después, Nakai (1956) inicia la siembra in vitro de células dispersadas de tejido nervioso. En trabajos posteriores, la idea detrás de este procedimiento residía en obtener poblaciones aisladas de los distintos tipos celulares (neuronal y glial) para el estudio de sus características biológicas particulares y su posible relevancia en las interacciones entre los diversos tipos. El descubrimiento y aislamiento del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) permitió el desarrollo de cultivos de neuronas del Sistema Nervioso Periférico por tiempos prolongados y aún en ausencia de glía (Varon y Adler, 1980). Sin embargo, el cultivo de neuronas del Sistema Nervioso Central ha tenido menos éxito. Los cultivos mixtos de neuronas centrales y neuroglia dan paso a la gran capacidad proliferativa de ésta última y terminan en poblaciones enriquecidas en astrogliá. Las neuronas, bajo estas condiciones, no sobreviven por más de 10 días en cultivo (Sensenbrenner, 1977). Utilizando estas preparaciones, se ha logrado obtener bastante información sobre la fisiología del astrocito y su importancia en la función nerviosa (Walz y Hertz, 1983). Solo recientemente se empiezan a reconocer factores tróficos para neuronas centrales (Varon y cols., 1984; Muller y cols., 1984), y su caracterización y aislamiento

representará un gran avance en el estudio in vitro del Sistema Nervioso Central.

1.3 ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Durante el desarrollo embrionario en vertebrados, surge del ectodermo primario una zona de la cual se derivará todo el Sistema Nervioso: la placa neural o neuroectodermo. Este epitelio sufre una invaginación a todo lo largo, definiéndose un canal neural y las crestas neurales (Fig. 1.1). La invaginación neuroepitelial procede hasta que los bordes se fusionan formando un tubo neural, del cual se desarrollarán las vesículas del Sistema Nervioso Central (SNC). Las células de las crestas neurales, que a su vez quedaron dorsalmente entre el tubo neural y el ectodermo (Fig. 1.1), migran para dar origen, entre otras cosas, al Sistema Nervioso Periférico (SNP). Una característica importante del epitelio del tubo neural (neuroepitelio) es una clara distinción regional a lo ancho de éste. La zona más cercana al lumen es la zona germinal (e.g. donde se realizan las divisiones celulares). Esta zona, por estar adyacente a lo que luego serán los ventrículos cerebrales y el canal central de la espina dorsal, es llamada zona ventricular. En la parte más superficial está la zona marginal, delimitada por una membrana basal externa, donde se encuentran procesos celulares principalmente. Las células individuales cruzan toda la extensión del neuroepitelio, en contacto con la membrana externa y unidas entre sí en la superficie interna por barras terminales (Fig. 1.2). El ciclo celular en el neuroepitelio recién formado procede de acuerdo al esquema propuesto por Sauer en 1935 (Fig. 1.3). La metafase en la zona ventricular es seguida por una telofase e interfase temprana con desplazamiento del

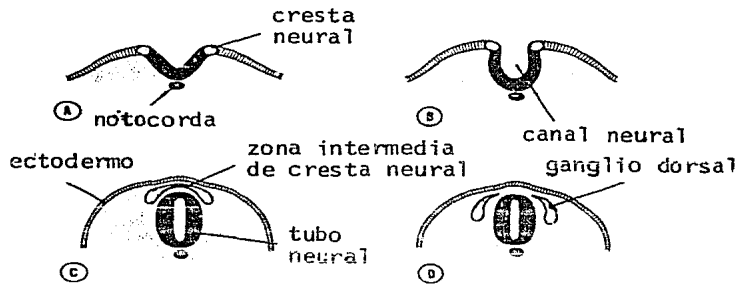


Figura 1.1.- Dibujo esquemático de secciones a través de embriones a varias edades consecutivas, mostrando la formación de las crestas neurales, el canal neural y el tubo neural (tomado de "Medical Embryology" de J. Langman, 1975, pp 319, Williams & Wilkins Co.).

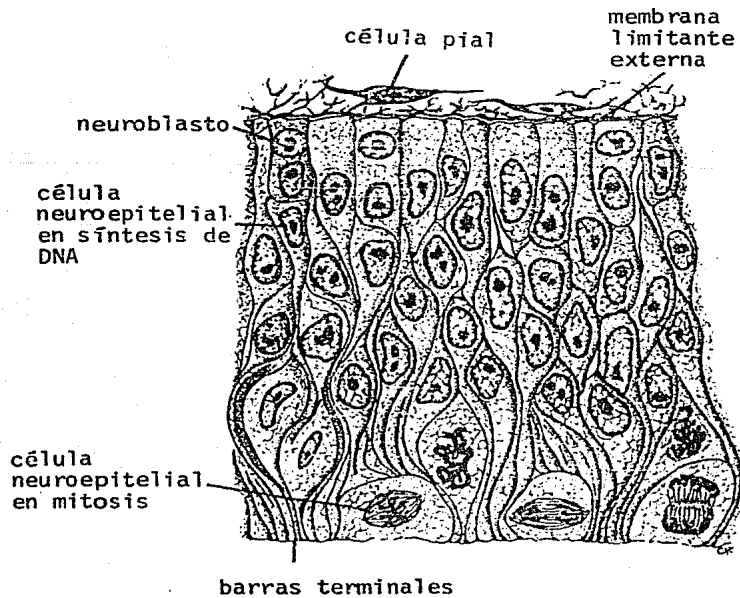


Figura 1.2.- Dibujo de una sección a lo ancho de la pared del tubo neural. La mayor parte de la pared consiste de células neuroepiteliales en mitosis o en síntesis de DNA. En la parte superficial, adyacentes a la membrana limitante externa, se encuentran los neuroblastos en proceso de diferenciación. (tomado de "Medical Embryology" de J. Langman, 1975, pp 324, Williams & Wilkins Co.).

nucleo hacia regiones más superficiales en el neuroepitelio. La interfase tardía y la profase se realizan al mismo tiempo que el núcleo regresa a zonas internas. Al llegar a la zona ventricular, la célula pierde contacto con la superficie externa y se redondea para iniciar un nuevo ciclo celular (Fig. 1.2). El primer tipo celular producido es el neuronal. Los precursores neuronales permanecen sin actividad mitótica en la zona ventricular. Estas células postmitóticas migran fuera de la zona ventricular para formar una zona intermedia o zona del manto. Así, en etapas más avanzadas del desarrollo del SNC, se pueden distinguir tres zonas principales: la zona ventricular, con las células germinales; la zona intermedia o zona del manto, con neuronas jóvenes en migración; y la zona marginal (Fig. 1.4). Asimismo, la neuroglia surge de células que han migrado fuera de la zona ventricular. Sin embargo, el precursor glial (glioblasto) conserva la actividad mitótica, ya sea en la zona intermedia o en los tractos fibrosos y comisuras. En la corteza cerebral, los glioblastos forman una zona de actividad proliferativa adyacente a la zona ventricular, llamada zona subventricular (Fig. 1.4). En todas las regiones del SNC en general, las neuronas son producidas antes que sus células gliales asociadas. Además, la proliferación de la neuroglia está relacionada con la diferenciación y crecimiento de las neuronas. Esta relación es más difícil de observar en regiones con un período extendido de producción neuronal (como la corteza cerebral y el cerebelo). No obstante, aún en estas regiones está claro que las primeras neuronas aparecen siempre antes que las primeras células gliales (para más detalles sobre esta sección ver Jacobson, 1978).

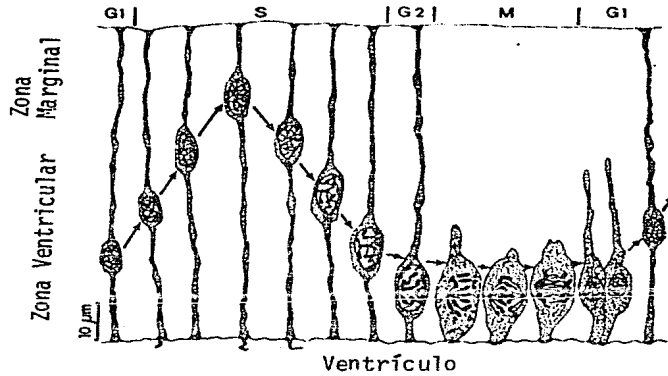


Figura 1.3.- Sección del tubo neural mostrando la migración intermitótica del núcleo de una sola célula neuroepitelial germinal (modificado de Sauer, 1935).

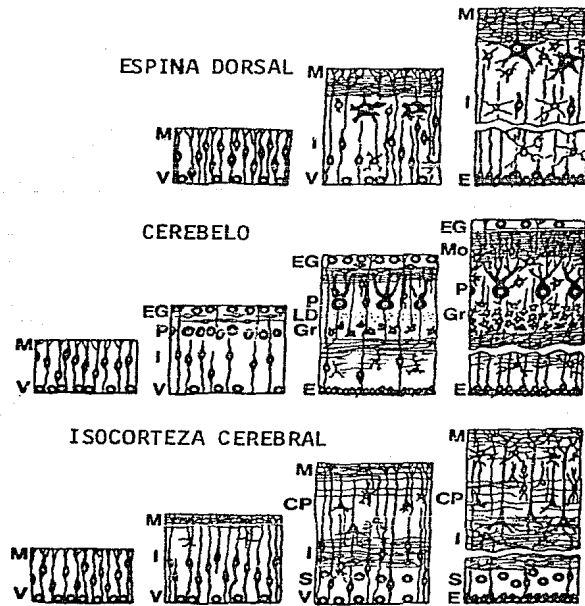


Figura 1.4.- Zonas y capas en el desarrollo de la isocorteza cerebral, la espina dorsal y el cerebelo de mamíferos. Algunas etapas consecutivas en el desarrollo se muestran de izquierda a derecha. CP, placa cortical; E, capa endotelial; EG, capa granular externa; Gr, capa granular; I, zona intermedia; LD, lámina disecans; M, zona marginal; Mo, capa molecular; P, capa de células Purkinje; S, zona subventricular o subependimal; V, zona ventricular o germinal (tomado de Jacobson, 1978).

Ontogenia de los tipos celulares en el SNC.

Dentro de la investigación en la ontogenia del Sistema Nervioso, ha sido posible obtener bastante información sobre la ontogenia de diferentes tipos neuronales en el SNC. Estudios ultraestructurales y de autoradiografía han coadyuvado en forma importante al avance del conocimiento en este campo. Sin embargo, el estudio de la ontogenia neuroglial ha sido complicado por el hecho de que existe un gran retraso entre el momento de origen de las células gliales (e.g. determinación) y el momento en que alcanzan su etapa final de madurez (e.g. diferenciación). Bajo estas circunstancias, la proposición de un esquema genealógico global de los tipos celulares en el SNC ha sido motivo de muchas especulaciones. En muchas especies de mamíferos el tipo neuronal del SNC es originado principalmente en periodos prenatales (con excepción del cerebelo, donde las células granulares continúan siendo mitóticas después del nacimiento) (Jacobson, 1978). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto un patrón de producción glial (Privat y Fulcrand, 1977) con dos periodos distinguibles de proliferación terminal (e.g. última división celular): el primero, de la astrogliá, que es determinada prenatalmente y se extiende a periodos postnatales variables, dependiendo de la región, y el segundo, de la oligodendrogliá, que es preponderante después del nacimiento, y que sugiere la fuerte dependencia entre la maduración de estas células y el desarrollo de vías nerviosas (axones). En ambas poblaciones se pueden observar varias etapas de transición en el proceso de migración y maduración final (para revisión ver Privat y Fulcrand, 1977). Ilustrando lo anterior, en un estudio de incorporación de timidina tritiada durante todo el periodo prenatal de la rata se muestra que en corteza

cerebral 18 semanas después del nacimiento solo 20% de los oligodendrocitos totales incorporaron la marca radioactiva, mientras que más del 50% de astrocitos y el 100% de neuronas resultaron marcados (Haas y cols., 1970).

Por lo tanto, el esquema básico de producción celular en el SNC consta de un periodo inicial de producción neuronal, seguido (con etapas de traslape variables) por periodos de producción glial, dominado primero por la astroglia y posteriormente por la oligodendroglia. Este patrón general sugería una genealogía donde las células ventriculares primero darían origen a los precursores neuronales (neuroblastos) para después cambiar la determinación hacia los precursores gliales (glioblastos). Estos últimos a su vez seguirían una determinación secuencial originando primero a los precursoras de astroglia (astroblastos), y subsecuentemente a los precursores de oligodendroglia (oligodendroblastos). Fujita (1966) había propuesto la existencia de un precursor común del cual se derivaba primero la población neuronal. Una vez terminada la neurogénesis, el precursor sufría un cambio que lo transformaba en glioblasto, para derivar finalmente en célula ependimal. Sin embargo, un estudio combinado de microscopía electrónica y óptica con inmunocitoquímica contra la proteína acídica fibrilar de glía (GFAP), un marcador específico de astroglia, mostró la coexistencia de precursores astrogliales y neuronales durante la neurogénesis (Levitt y cols., 1981), lo cual demostraba una determinación temprana de los precursores astrogliales, y por otra parte que éstos expresaban un marcador de diferenciación antes de la última división celular (Fig. 1.5).

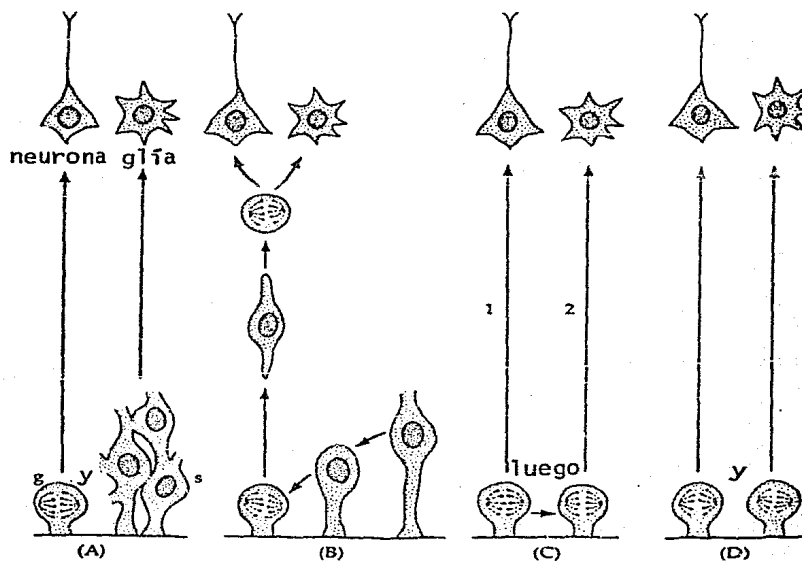


Figura 1.5.- Teorías sobre el origen de los tipos neuronales y gliales. (A) Inicialmente, U. His había propuesto hace alrededor de un siglo que los tipos neuronales y gliales estaban completamente separados; g, célula germinal; s, espongioblastos. (B) La sugerencia de A. Schaper fué que estos dos tipos celulares son originados por un solo precursor, que se divide después de migrar fuera de la zona ventricular. (C) La aplicación de la autoradiografía de timidina tritiada llevó a S. Fujita a concluir que las células con capacidad proliferativa dan origen primero a las neuronas (1) y, posterior a la neurogenesis, a las células gliales (2). (D) La capacidad de demostrar la presencia de la proteína fibrilar ácida de glía, un marcador celular específico de glía, proveyó evidencias para la opinión actual de que los precursores nerviosos y gliales coexisten en la zona ventricular desde etapas muy tempranas en el desarrollo (modificado de Levitt y cols., 1981).

1.4 ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO IN VITRO.

La evidencia histológica discutida anteriormente brinda un esquema sobre la diferenciación del tejido nervioso en el desarrollo normal in vivo. El abordaje directo al estudio del desarrollo de los tipos gliales y neuronales ha sido posible gracias a las técnicas de cultivo. No solo se puede observar directamente la dinámica de la determinación celular, sino que además se pueden aislar y caracterizar las condiciones y estímulos ambientales que controlan estos procesos. Una investigación bibliográfica fué pertinente para definir un marco metodológico y conceptual dentro del cual se pueda estructurar el diseño de modelos de la función nerviosa utilizando cultivos celulares. Esta información se hace más necesaria en cuanto que regularmente los elementos celulares con los cuales se parte para el cultivo in vitro son células relativamente inmaduras (fetales o postnatales). La revisión bibliográfica presentada a continuación no pretende ser exhaustiva, sino que proporcione un bosquejo del avance actual en el área de la neurobiología del desarrollo (para una discusión más amplia, ver la revisión de Jacobson, 1985).

El resultado de cultivar células de tejidos inmaduros dependerá fuertemente de las condiciones in vitro y de la composición celular sobreviviente. Este último punto es de gran relevancia al estudiar el origen de los distintos tipos celulares. Es posible partir de una suspensión celular compuesta por una proporción determinada de tipos celulares, la cual sea alterada en el transcurso del cultivo por las condiciones in vitro, ya sea: i) seleccionando a favor de algún tipo en especial, pero sin modificar las características celulares de éste (condición selectiva), o bien ii) promoviendo la determinación

celular hacia un tipo a partir de sus precursores. (condición instructiva).

Ilustrando el primer caso, se ha observado que al cultivar células embrionarias de tejido nervioso, es de gran importancia la edad del embrión que se utiliza. Cultivos de células dispersas de pollo de 5 a 12 días de gestación producen poblaciones mixtas de neuronas y glía a las dos semanas in vitro. Las neuronas de 14 a 19 días de gestación degeneran durante la primer semana en cultivo, para dar paso a la población glial que ya en la segunda semana es la predominante (Booher y Sensenbrenner, 1972).

Para el segundo caso, es necesario conocer la capacidad de una célula inmadura de seguir una rama genealógica in vitro como se logra in vivo. Fedoroff (1977) ha observado que las células de neocorteza sembradas a muy baja densidad forman colonias discretas con morfologías muy particulares, de las cuales se han identificado 6 tipos de colonias, y por microcinematografía ha sido posible establecer la dinámica del desarrollo e interconversión de los distintos tipos. Esta estrategia da una medida in vitro del potencial proliferativo de los compartimientos celulares en el tejido nervioso. La capacidad de formar colonias disminuye con la edad del tejido (Fedoroff, 1977). De especial interés son tres tipos de colonias, que muy posiblemente representan la respuesta de ciertos precursores celulares al desarrollo in vitro, las colonias A, B y C. A medida que el tejido subventricular utilizado es de mayor edad postnatal, disminuye la frecuencia de colonias A obtenidas in vitro. La ultraestructura de las células de colonias A muestra una gran similitud con la de células subventriculares, lo que apoya la idea de

INTRODUCCION

ONTOGENIA IN VITRO

identificar a las células de colonias A como células subventriculares. Después de dos semanas en cultivo las colonias tipo A dan origen a colonias tipo C. Estas a su vez pueden producir colonias tipo B (Fedoroff, 1980).

Durante la primer semana, las colonias formadas in vitro no cambian su tipo de morfología. Esto hizo posible estimar la proporción de los diferentes tipos celulares en el tejido en desarrollo in vivo, a partir de la frecuencia de las colonias formadas in vitro, respectivamente (Fedoroff, 1980). Los datos sugieren que las células de colonias C representan glioblastos que corresponden a los precursores emigrando fuera de la zona subventricular hacia zonas más superficiales en la neocorteza. La capacidad de inducir una morfología característica de astrocitos al tratar a estas células con un análogo de AMP-cíclico permite suponer que han sido predeterminados como astroblastos antes o durante el periodo inicial de cultivo. Llama especialmente la atención como la secuencia de aparición in vivo de estos tipos celulares se puede reproducir en periodos prolongados in vitro (e.g. más de una semana; Fedoroff, 1980).

Fedoroff (1980) postula una genealogía glial en la neocorteza de roedores y aves donde incluye un rango más en los compartimientos celulares: las células progenitoras, con potencial proliferativo más amplio que el de las células precursoras pero con posibilidades de diferenciación más restringidas que las células madre. En base a lo anterior, la genealogía in vitro e in vivo se puede relacionar como sigue:

Colonias P: células ventriculares (células madre o progenitoras primitivas, posiblemente pluripotentes), obtenidas de embriones muy jóvenes; dan origen a colonias A.

Colonias A: células subventriculares, corresponden a los glioblastos (progenitores gliales); dan origen a colonias C.

Colonias C: células corticales migratorias, corresponden a los astroblastos (precursores comprometidos) y pueden ser transformados a astrocitos diferenciados por tratamiento con dibutiril-AMP-cíclico.

Colonias B: células senescentes, probablemente artefactuales como respuesta a las condiciones in vitro; surgen de colonias C, y representan células en decadencia que no pudieron continuar con la diferenciación terminal.

Un aspecto notable en este trabajo es la ausencia de la rama oligodendroglial, ya que en los resultados mencionados no se pudieron distinguir colonias de células semejantes a oligodendroblastos. No fue posible determinar si las células tipo A tenían la alternativa de generar precursores de oligodendrocitos, o si aún en esta etapa de inmadurez celular la determinación astroglial era ya irreversible. Es posible que las células A en realidad representan células progenitoras o glioblastos con ambas alternativas de diferenciación terminal, pero que sin embargo las condiciones in vitro de alguna manera hayan canalizado la progresión genealógica hacia solo una de las ramas. Por el contrario, existe también la posibilidad de que las células A sean glioblastos predispuestos a la vía astrocítica, y que los glioblastos alternativos no sobrevivan alguna etapa del proceso in vitro (por ejemplo, el pegado al plástico; Fedoroff, 1980).

Immunocitoquímica y la genealogía nerviosa en el SNC.

La optimización de técnicas inmunocitoquímicas desarrolladas en los últimos años para la caracterización de células in vitro ha mostrado ser una herramienta muy poderosa en la identificación específica y directa de varios tipos celulares (para referencias, ver

Raff y cols., 1979). A través del uso de antisueros contra distintos marcadores celulares, ha sido posible delinear una batería de marcadores específicos para las células nerviosas (Raff y cols., 1979). De especial interés para la presente introducción son aquellos que permiten identificar de manera precisa a los distintos tipos de células nerviosas centrales, entre los cuales se pueden mencionar: galactocerebrósido (GC), principal componente glicolípido de la mielina y marcador específico de oligodendrocitos; gangliósidos específicos de neuronas, los cuales actúan como ligandos de la Toxina Tetánica (TT); y finalmente, la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), específica de astrocitos. Los dos primeros son marcadores extracelulares, y el último es intracelular. Se ha visto que en cultivos fetales y neonatales de cerebro de rata, la identificación de diversos tipos celulares in vitro sigue un curso temporal paralelo a su identificación in vivo. Abney y cols. (1981) encontraron que al caracterizar por inmunocitoquímica a las células en cultivos de cerebro de 10 (E10) o de 13 (E13) días de gestación, el intervalo de tiempo que transcurría antes de la primer aparición in vitro de un tipo celular específico reflejaba fielmente el intervalo necesario para su aparición in vivo, en suspensiones celulares del cerebro fetal o neonatal correspondiente. Con esta metodología, se determinaron las fechas de primer aparición durante el desarrollo cerebral in vivo (o con el periodo in vitro correspondiente) de neuronas (TT+, <E11), astrocitos (GFAP+, E15-16), células ependimales (E17-18) y oligodendrocitos (GC+, 2-3 postnatal), entre otros tipos celulares. Los autores sugieren que la determinación hacia los tipos nerviosos estudiados está dada antes de E10 en el cerebro de rata. Las células se diferencian de acuerdo a un reloj

biológico, el cual no se ve afectado por el trasplante in vitro, ni por la dispersión del tejido. Esto indica que dicho reloj puede residir dentro de la misma célula en cuestión o en alguna de sus vecinas, sin necesidad de invocar un mecanismo de información posicional en la diferenciación de las células nerviosas (Abney y cols., 1981). Una característica metodológica importante de estos cultivos es la alta densidad de siembra empleada ($>10^5$ células/cm²), que promueve la rápida reagregación celular (<24 hrs.) y la confluencia no neuronal (4-6 días in vitro).

El retraso de varios días en el desarrollo in vitro de la secuencia genealógica astrogliial con respecto a la secuencia in vivo observada por Fedoroff (1980), probablemente está relacionada con la bajísima densidad de siembra utilizada con el fin de localizar colonias celulares pequeñas. Este paradigma limitaría la interacción celular dentro de la misma colonia y hace muy improbable la interacción con células de otras colonias. No obstante, solo la temporalidad del desarrollo parece estar afectada, no así el orden de la secuencia (Fedoroff, 1980), sugiriendo que, al menos para la rama astrogliial, el reloj biológico reside en la célula nerviosa predeterminada, y si bien el estrés del crecimiento in vitro puede retrasarlo, no lo detiene completamente.

En 1966, Shein estudió la composición celular de cultivos de células dispersas de cerebro fetal humano utilizando técnicas de tinción clásica y microscopía de luz. A pesar de las limitaciones de este procedimiento, sus preparaciones histológicas le permitieron concluir que los cultivos consistían de oligodendrocitos inmaduros (espongioblastos) sobre una alfombra de astrocitos. Esta segregación

de los dos tipos gliales en cultivos primarios de células dispersas paso desapercibida por más de una década. En 1978, McCarthy y de Vellis observaron que cultivos de células cerebrales sembradas a alta densidad estaban compuestos por poblaciones mixtas de oligodendroglía y astrogliá al final de la primer semana. Durante este periodo inicial in vitro se perdía la población neuronal, quedando una población de células pequeñas, oscuras al contraste de fases y con procesos cortos, descansando sobre una alfombra confluyente de células transparentes. Ultraestructuralmente, la primer población se asemejaba a oligodendrocitos inmaduros, y la segunda a astrocitos inmaduros (GFAP+). Estos autores diseñaron un procedimiento para separar las poblaciones gliales en base a su segregación física en cultivo (McCarthy y de Vellis, 1980). Una agitación moderada producía suspensiones de oligodendrocitos, que podían ser subcultivados hasta lograr poblaciones casi puras de oligodendroglía, a juzgar por la morfología y por marcadores enzimáticos específicos. La alfombra de células adheridas a su vez producían cultivos purificados de astrogliá en subcultivaciones posteriores. Un aspecto interesante del comportamiento celular in vitro es que los resultados son óptimos con tejido neonato de rata, de donde es más probable perder la población neuronal (situación similar en aves). Además, es necesario mantener al mínimo la posible contaminación astrogliá en los cultivos de oligodendrocitos, ya que éstos últimos están en notable desventaja frente a los astrocitos en cuanto a capacidad proliferativa. Las células del cerebro neonato de rata aparentemente ya estaban determinadas a ser uno u otro tipo glial: era posible observar el desarrollo independiente de las dos clases morfológicas de células en el periodo inicial del cultivo. Solo si se utilizaba cerebro fetal

eran necesarios de 7 a 10 días antes de poder discriminar la población oligodendroglial de la alfombra astrogliar (McCarthy y de Vellis, 1980).

Unos años después, en una serie de artículos, Raff y cols. presentaron varias piezas de información que van integrando un esquema claro sobre la genealogía en el SNC, particularmente con referencia a la glía. Estos autores utilizaron el antisuero monoclonal A2B5, que está dirigido contra un polisialogangliósido (Eisenbarth y cols., 1979) y el A4, cuyo ligando no ha sido caracterizado aún (Cohen y Selvendran, 1981), ambos antisueros contra marcadores de neuronas centrales. Su intención inicial era de emplearlos para eliminar la población neuronal en cultivos embrionarios y así determinar la dependencia del desarrollo y diferenciación oligodendroglial sobre la presencia de neuronas. Los antisueros no cruzan con oligodendrocitos maduros (Abney y cols., 1983). Lo que se encontró fue que los oligodendrocitos inmaduros (GC+) tienen la capacidad de pegar ambos antisueros, así como la toxina tetánica. Más aún, el precursor GC- es a su vez A2B5+, A4+ y Tf+, marcadores que pierde al proceder con la diferenciación oligodendroglial. La determinación final del precursor embrionario hacia el oligodendrocito es un evento independiente de la presencia neuronal (Abney y cols., 1983). Un hecho de gran interés fue el descubrimiento de que este precursor oligodendroglial A2B5+, A4+, Tf+ es también el precursor de astrocitos fibrosos (Raff y cols., 1983a). Fue posible entonces utilizar estos antisueros para la caracterización de la rama genealógica astrogliar. Esta afortunada circunstancia permitió distinguir tres tipos celulares al cultivar células dispersas de nervio óptico de rata, caracterizándose como

astrocitos tipo 1, astrocitos tipo 2 (ambos GFAP+) y oligodendrocitos (GC+)(Raff y cols., 1983a y b). El nervio óptico de rata ofrece una ventaja especial para el estudio de la gliogénesis, por ser una estructura carente de neuronas y su zona ventricular in vivo mantiene una gran actividad mitótica hasta la segunda semana postnatal, atribuida presumiblemente a oligodendroblastos y astroblastos. Los primeros producen oligodendrocitos a partir del nacimiento, y mantienen una poza activa de precursores en el adulto (Privat y Fulcrand, 1977). Los segundos son determinados desde el día 15 de gestación hasta el día 15 postnatal, requiriéndose alrededor de dos semanas in vivo después de la última división para que el astrocito alcance la madurez, y aun así se ha observado que algunas subpoblaciones retienen la capacidad proliferativa a pesar de su aparente madurez (Privat y Fulcrand, 1977). Utilizando el antisuero A2B5, fue posible identificar a los astrocitos tipo 2 en cultivo (Raff y cols., 1983b). Estos difieren de los astrocitos tipo 1 tanto morfológicamente como por marcadores inmunocitológicos. Los astrocitos tipo 1 tienen apariencia fibroblastoide, gran capacidad proliferativa (estimulable por el factor de crecimiento epidermal o EGF) y no son marcados por el anticuerpo A2B5 (A2B5-). En contraste, los astrocitos tipo 2 extienden múltiples procesos, semejando neuronas u oligodendrocitos, tienen baja capacidad proliferativa (aún en presencia del EGF), y son A2B5+ (Raff y cols., 1983b). Los astrocitos tipo 1 son muy frecuentes en cultivos de materia gris y blanca, en cambio los astrocitos tipo 2 solo son detectados en cantidades importantes en cultivos de materia blanca, por lo que muy probablemente los astrocitos tipo 1 in vitro corresponden a los astrocitos protoplásmicos in vivo, y los tipo 2 a los astrocitos

fibrosos de la materia blanca (Miller y Raff, 1984).

Como se ha dicho, los astrocitos tipo 2 surgen de precursores GFAP-, A2B5+, adquiriendo el marcador astrogliar rápidamente en cultivo (Raff y cols., 1983b). Tratando de definir condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de astrocitos tipo 2, se observó que al utilizar medios libres de suero, se suprimía el crecimiento astrogliar y se estimulaba el oligodendrogliar (Raff y cols., 1983a). El efecto del suero en la estimulación astrocítica es más evidente al utilizar suero bovino fetal (FCS); esta actividad no parece atribuible a lípidos o fibronectina en el suero; no es dializable, y se pierde al hervir el suero (Raff y cols., 1983a). Con una serie de experimentos fué posible demostrar directamente que los astrocitos tipo 2 y los oligodendrocitos del nervio óptico son originados de un precursor común (A2B5+, GFAP-, GC-), distinto del precursor del astrocito tipo 1 (A2B5-, GFAP+), y que la vía de diferenciación terminal que tome el precursor A2B5+ in vitro puede ser determinada por la inclusión u omisión de FCS en el medio de cultivo: la presencia del suero induce la diferenciación astrocítica tipo 2, y en el medio sin suero se promueve la diferenciación oligodendrogliar (Raff y cols., 1983a). Miller y Raff (1984) han mostrado que este precursor parece ser el responsable in vivo de la producción de astrocitos fibrosos (A2B5+, GFAP+) en la materia blanca exclusivamente, lo que implica un precursor alternativo para la producción de astrogliá protoplásmica (A2B5-, GFAP+).

Comportamiento de células nerviosas in vitro.

En un reporte reciente de Walker y cols. (1985) caracterizaron de una manera notablemente clara el desarrollo in vitro de los tipos

gliales mencionados y de las neuronas. Utilizando el método de separación oligodendroglial por agitación (McCarthy y De Vellis, 1980) logran obtener subcultivos mixtos de glía y neuronas de cerebro de rata, casi completamente libres de astrocitos protoplásmicos (3%) y sin problemas de sobrepoblación glial. Lo más sobresaliente de estos cultivos es el comportamiento característico de cada tipo celular una vez subcultivados a baja densidad de siembra. Las suspensiones celulares están compuestas de astrocitos fibrosos (GFAP+, A2B5+), oligodendrocitos (GC+) y neuronas (por detección de la proteína de neurofilamentos, o NF+). A los 5 días in vitro, la mayoría de las células tienen procesos con ramificaciones finas. Algunas células móviles se reasocian en agregados con numerosas extensiones radiales, las cuales ya para los 14 días in vitro forman fascículos que interconectan a los agregados entre sí, como ha sido observado previamente por varios otros autores (para referencias ver Sensenbrenner, 1977). La identificación inmunocitoquímica de los componentes celulares in vitro demostró que las células que no participan en los movimientos migratorios son astrocitos fibrosos. En cambio las células móviles son neuronas y oligodendrocitos. Estos últimos expresan la proteína básica de mielina (MBP) solo en los agregados y sus fascículos, donde también hay formaciones multilamelares de membranas (Walker y cols., 1985). La gran semejanza morfológica entre los astrocitos fibrosos y los oligodendrocitos hace difícil su discriminación por criterios morfológicos únicamente, a menos de que se empleen técnicas de identificación específica. Varias técnicas inmunocitoquímicas han mostrado ser invaluable en esta tarea. De hecho, las suspensiones oligodendrogliales obtenidas con el método de McCarthy y De Vellis (1980), que bajo criterios

morfológicos aparentaban ser de gran pureza al subcultivarlas (98%), por inmunocitoquímica se declararon compuestas por poblaciones mixtas de neuronas (NF+; 42%), astrocitos fibrosos (A2B5+, GFAP+; 18%) y oligodendrocitos (GC+; 31%)(Walker y cols., 1985). En resumen, se puede apreciar que las células nerviosas crecidas in vitro retienen una serie de características muy particulares a su tipo celular, el cual puede ser claramente diferenciado de acuerdo a su comportamiento en cultivo y a marcadores celulares específicos. En la Tabla 1.1 se presentan los cuatro tipos celulares principales del tejido nervioso central, con sus respectivas características de desarrollo in vitro.

Tabla 1.1

TIPO CELULAR	MORFOLOGIA in vitro	CAPACIDAD PROLIFERATIVA in vitro	MARCADORES CELULARES
Astrocito Protoplásmico (tipo 1)	De Fibroblastoide a Epiteliode (dependiendo de la densidad celular); óptica clara a contraste de fases (morfología diferenciada inducible).	Alta	GFAP+
Astrocito Fibroso (tipo 2)	Neuronoide; óptica muy refringente a contraste de fases.	Baja	GFAP+, A2B5+
Oligodendrocito	Neuronoide; óptica muy refringente a contraste de fases.	Baja	GC+, MBP+ (solo en asociación con neuronas)
Neurona	Neuronoide; óptica muy refringente a contraste de fases.	Nula	TT+, NF+

Esquema genealógico en el SNC.

Las observaciones in vitro muestran el origen genealógico común de los astrocitos fibrosos y de los oligodendrocitos (Raff y cols., 1983a). La identificación de este precursor fue posible gracias a que

tiene la capacidad de expresar una serie de gangliósidos que se pensaba eran específicos de neuronas (Raff y cols., 1979; Eisenbarth y cols., 1979; Cohen y Selvendran, 1981), lo que sugiere una relación genealógica cercana entre este precursor y la estirpe neuronal. Esto explica el cierto grado de tinción TT+ en cultivos de materia blanca reportados inicialmente (Raff y cols., 1979). La expresión de solo un gangliósido en los precursores de astrocitos protoplásmicos (A4+, Miller y Raff, 1984) sugiere una divergencia temprana entre éstos y los precursores (hipotéticos) neurono-gliales (e.g. A2B5+, A4+, TT+) a partir de una célula madre común. De acuerdo a datos en rata, esta divergencia en el cerebro se debería llevar a cabo muy tempranamente, antes del E10 (Abney y cols., 1981), produciéndose el primer precursor glial o astroblasto, y un progenitor neurono-glial. Esta célula progenitora a su vez sufriría una segunda divergencia (completa antes de E11), determinándola como precursor neuronal, o bien como célula progenitora oligo-astroglial, ambos A2B5+, A4+, TT+ (Raff y cols., 1983a).

Algunos resultados morfológicos iniciales sugerían que aún cuando la secuencia del desarrollo de algunas células nerviosas in vitro se mantiene fiel a la secuencia in vivo, existe un evidente retraso en la cronología del desarrollo in vitro (Fedoroff, 1980; McCarthy y De Vellis, 1980). Por otra parte, es muy conocida la gran capacidad proliferativa del astroblasto protoplásmico (Sensenbrenner, 1977; McCarthy y De Vellis, 1980; Walker y cols., 1984), cuyo estado de diferenciación in vitro dependerá en gran medida de las condiciones del microambiente en el cultivo (Sensenbrenner, 1977; Lim y cols., 1977; Fedoroff, 1980). Además, aun si la predeterminación nerviosa sigue su curso temporal normal in vitro, la calidad y

condiciones del cultivo afectarán en forma importante el número final de células en cada subpoblación (Abney y cols., 1981). El descubrimiento de que el destino celular del precursor oligo-astroglial puede ser controlado por la simple presencia o ausencia del suplemento sérico en el medio de cultivo (Raff y cols., 1983a) es el primer ejemplo en el SNC de como la manipulación del microambiente in vitro puede determinar la expresión fenotípica a partir de una célula pluripotente. Hasta el momento se desconoce la naturaleza del efector in vivo que promueve la determinación de este precursor hacia uno u otro tipo glial (Raff y cols., 1983a).

Aspectos genealógicos en el Sistema Nervioso Periférico (SNP).

En el estudio del SNP, se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos que rigen la ontogenia de este sistema y representan un ejemplo claro de las capacidades instructivas que puede tener el microambiente sobre la determinación celular (para revisión ver Bronner-Fraser y Cohen, 1980). Las células de la cresta neural son la población de la cual surgen las células del SNP, en forma análoga a las células ventriculares del tubo neural, que darán origen a las células del SNC. Al cultivar células crestales del tronco y seleccionando clonas (e.g. células descendientes de una sola célula madre), se ha demostrado que estas colonias tienen la capacidad de producir por lo menos dos fenotipos distintos: melanocitos y células adrenérgicas, tanto in vitro, bajo condiciones apropiadas de cultivo, como in vivo, al ser introducidas nuevamente al organismo (Bronner-Fraser y Cohen, 1980). En reportes más recientes se describe la manipulación de la rama genealógica simpático-adrenal in vitro, por factores hormonales. Doupe y cols.

(1985a) logran obtener poblaciones puras de células de cresta neural: células de médula adrenal, células pequeñas e intensamente fluorescentes (SIF) y neuronas simpáticas. Estos tres fenotipos diferenciados corresponden bien a los encontrados in vivo, y se obtienen por la presencia de hormonas en el medio de cultivo: los glucocorticoides inducen la diferenciación de las células crestales hacia células de médula adrenal, el NGF las induce hacia neuronas simpáticas, y las células SIF son producidas como la diferenciación intermedia al utilizar ambos factores hormonales (Doupe y cols., 1985a). Más interesante aún es la capacidad de revertir el fenotipo adrenal de células completamente diferenciadas, hacia el fenotipo neuronal cultivando a las células de médula adrenal en ausencia de corticoesteroides y en presencia de NGF. Una observación importante es que las células SIF son la etapa celular intermedia en esta transformación. Las neuronas así producidas se asemejan en todos los aspectos a neuronas simpáticas catecolaminérgicas, pero pueden ser encausadas a su vez hacia el fenotipo neuronal colinérgico por tratamiento con medio condicionado (Doupe y cols., 1985b).

1.5 CULTIVO DE CELULAS HIPOTALAMICAS.

En la literatura, varios sistemas de cultivo celular han sido reportados y propuestos como posibles modelos de neurosecreción de péptidos hipotalámicos (Sachs y cols., 1971; Mckelvy, 1974; Knigge y cols., 1977; Faivre-Bauman y cols., 1980; Vaccaro y cols., 1980; Denizeau y cols., 1981; Jirikowski y cols., 1981; Sang y cols., 1981). Sin duda, el grupo que más ha trabajado en la implementación de un sistema de cultivo de células dispersas de hipotálamo es el de Tixier-Vidal, el cual fue el primero en caracterizar el desarrollo in

vitro de células fetales hipotalámicas (Benda y cols., 1975). A través del análisis ultraestructural, estos investigadores pudieron distinguir cinco tipos celulares después de algunos días de crecimiento in vitro:

a) Astrocitos y Ependimocitos, los cuales forman una alfombra sobre la superficie del plato (también llamadas células basales). De los 9 a los 16 días in vitro los primeros aparecen como astrocitos inmaduros (espongioblastos), pero a tiempos más largos (más de 20 días in vitro) se definen como astrocitos en varias capas estratificadas, junto con colonias de ependimocitos que orientan sus microvellosidades y cilios hacia el medio de cultivo. Entre éstos últimos se pueden observar morfologías reminiscentes de tanacitos (células ependimales características del tercer ventrículo).

b) Células de carácter neuronal, usualmente localizadas por encima de las células descritas previamente y muy refringentes al contraste de fases. Dentro de esta categoría se incluye a:

- las células neuroepiteliales primitivas, que forman agregados sin neuritas y presentan una alta proporción núcleo/citoplasma;

- las neuronas, que frecuentemente son bipolares, y se encuentran en distintos estadios de maduración a juzgar por el diámetro celular;

- y las células neurosecretoras, que son multipolares y más numerosas que las neuronas (Benda y cols., 1975).

Unos años después, se presentan evidencias inmunocitoquímicas que demuestran la presencia de neuronas TRH-érgicas (e.g. productoras de la Hormona Liberadora de Tirotrófina) en estos cultivos hipotalámicos y en cultivos cerebrales (Faivre-Bauman y cols., 1980), donde solo las células con apariencia neuronal pueden resultar

positivas a la tinción inmunoespecífica. En cultivos de hipotálamo, estas neuronas peptidérgicas representan 22-28% del total de neuronas (Faivre-Bauman y cols., 1980). Sin embargo, los niveles detectados de la hormona en las células (menos de 10 pg de TRH por equivalente de hipotálamo in vitro) resultan muy bajos para análisis bioquímico de la biosíntesis. Por lo tanto decidimos ampliar el conocimiento del desarrollo in vitro de células embrionarias hipotalámicas y de los posibles factores que regulan este desarrollo, como se menciona ya en los objetivos.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1 MEDIO Y CAJAS DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado fué la formulación comercial de Dulbecco (DMEM; GIBCO Lab.), complementada con los siguientes aditivos: Glucosa 0.3%, Glutamina 2 mM, Insulina 8 u/100 ml (Sigma), una mezcla comercial 1x de vitaminas (GIBCO Lab.), y antibióticos (Penicilina 100 u/ml, Estreptomina 100 ug/ml y Fungizona .25 ug/ml; GIBCO Lab.). El suplemento de suero bovino fetal (FCS; GIBCO Lab.) regularmente usado fué de 10% (DMEM-FCS), pero esta proporción se podía modificar de acuerdo a los fines del cultivo. La Insulina se preparó en Acido Acético 1 N. Todos los complementos preparados concentrados se congelaron a -20 grados C hasta el momento de uso. El FCS se preparó fresco de un liofilizado mantenido a 4 grados C. El DMEM con todos los suplementos se podía mantener a 4 grados C, y comunmente se usaba con menos de 4 días de preparado. Las cajas de cultivo utilizadas (cajas multipoza con 24 pozas de 16 mm de diámetro, COSTAR; o cajas de petri con 35 mm de diámetro, Falcon) se recubrieron por una noche con Poli-D-lisina en agua (50,000 de peso molecular; Sigma), se enjuagaron dos veces con agua y una vez con DMEM-FCS. Se añadió entonces DMEM-FCS para dejarlo equilibrando en la incubadora por una horas antes de la siembra.

2.2 DISECCION.

Se utilizaron ratones adultos de la cepa CD-1 para las cruza. Un grupo de hembras se apareo con un macho por una noche, y a la mañana siguiente se separó a las hembras que presentaron un tapon

MATERIALES Y METODOS

vaginal. Este día se consideró el día cero de gestación. Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical a la fecha de gestación deseada, y el útero con los fetos se sacó en campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, y se colocó en solución salina amortiguada (PBS) a temperatura ambiente. Los fetos se aislaron rápidamente y se colocaron en PBS sobre hielo, donde permanecieron durante todo el intervalo de disección siguiente. Los cerebros se aislaron del cráneo librándolos de las meninges bajo el microscopio de disección. El hipotálamo se separó cortando anteriormente al nivel del quiasma óptico, lateralmente a lo largo de los surcos laterales, posteriormente incluyendo los cuerpos mamilares, y en profundidad a lo largo del tálamo. Los lóbulos frontales se obtuvieron haciendo un corte coronal anterior al quiasma óptico. Regularmente se disecaron 9-11 hipotálamos y 6-10 pares de lóbulos para un solo cultivo. Las estructuras se colocaron en 1 ml de DNEM-FCS a temperatura ambiente, para su dispersión.

2.3 DISPERSION Y SIEMBRA.

Los fragmentos de tejido se pasaron varias veces (15-20) por una aguja hipodérmica de 1.5 mm de diámetro, se dejaron sedimentar los fragmentos no dispersados por 2 minutos, se recogió el sobrenadante con células dispersas y se restituyó por 1 ml de medio adicional, con lo cual se repitió la operación en los fragmentos restantes, pero esta vez con una aguja de 1.25 mm de diámetro. Se combinaron los dos sobrenadantes en 5 ml finales de DNEM-FCS, y se centrifugó la suspensión celular a 450 g por 10 minutos para lavar las células de fragmentos celulares y posibles contaminantes (ver el Apéndice I). El sobrenadante se descartó y se añadieron 5 ml de DNEM-FCS al sedimento

MATERIALES Y METODOS

celular. Las células se resuspendieron utilizando una pipeta pasteur para dispersar el sedimento. Se tomaron 100 ul de la suspensión final para ténir con una solución isotónica de azul de tripano, y se cuantificó la cantidad de células y la viabilidad en la suspensión celular por la exclusión del colorante. La recuperación final de células por estructura y la viabilidad en las suspensiones obtenidas de tejido a dos edades fetales distintas se muestran en la tabla I. La suspensión ($1-4 \times 10^{-6}$ células/ml) se sembró a la densidad celular requerida sobre cajas de petri o pozas de cultivo previamente recubiertas con poli-lisina, procurando cubrir la superficie del plato homogéneamente con las células sembradas. Los platos de cultivo se llevaron al volumen de medio final con DMEM-FCS (1 ml/poza o 2 ml/caja de petri) y se incubaron en una atmósfera saturada de humedad a 37 grados C con 8%-CO₂, 92%-aire. Se permitieron tres días en DMEM-FCS al iniciar cualquier cultivo, como periodo previo de adaptación antes de algun paradigma experimental distinto (e.g. cambio a DMEM con otra proporción de FCS o DMEM con medio condicionado homólogo). El cambio de medio se efectuó cada tres días, remplazando unicamente la mitad del volumen del medio en el plato por medio fresco (a menos que se indique otra cosa). En los días de cambio fué cuando se efectuaron la mayoría de las observaciones microscópicas a contraste de fases.

2.4 EXTRACCION DE CELULAS EN CULTIVO.

Se decantó el medio de las cajas de cultivo y se enjuagaron dos veces con PBS a temperatura ambiente. Se añadió entonces Acido Acético 1 N en frio y se congeló a -20 grados C hasta el momento de raspar las cajas. Cuando se hubieron acumulado las cajas de un

MATERIALES Y METODOS

cultivo completo, se procedió a rasparlas con un gendarme de goma en Metanol sobre hielo. El extracto Acético/Metanol se dejó por lo menos una noche a -20 grados C en un tubo ependorff, se resuspendió por agitación vigorosa y se separó el precipitado por centrifugación. El sedimento y el sobrenadante se desecaron al vacío por separado y se guardaron a -20 grados C hasta su procesamiento ulterior.

2.5 EXTRACCION DE TEJIDOS.

Los hipotálamos y cerebros extrahipotalámicos se disecaron como fue descrito arriba, de fetos de varias edades y de adultos machos. Se juntó una cantidad conveniente de estructuras en Acido Acético 1 N sobre hielo, y se guardaron con Metanol a -20 grados C. Cuando se tuvieron las estructuras suficientes de varias edades se desintegró el tejido por sonicación, y se dejó una noche a -20 grados C. Se centrifugaron y separaron los sedimentos de proteína; los sobrenadantes se desecaron para someterlos a Radio-inmuno-ensayo.

2.6 DETERMINACION DE DNA Y PROTEINA EN CULTIVOS.

La determinación de DNA (Erwin y cols., 1981) se realizó en los sedimentos desecados de los platos individuales de cultivo (ver el Apendice II), los cuales se resuspendieron en 500 ul de Acido Tricloroacético al 5% y se hidrolizaron por 45 minutos a 80-85 grados C. Triplicados de estándares apropiados de DNA fueron hidrolizados en paralelo. Se separaron los precipitados de proteína en las muestras para procesarlos de acuerdo al método de Lowry (ver adelante). A los sobrenadantes de las muestras y a los estándares se les añadieron 100 ul de una solución fresca de dihidrocloruro del ácido 3.5-diaminobenzoico 200 mg/ml (Sigma) y se incubaron por una hora a

MATERIALES Y METODOS

60 grados C. La reacción se termino con 1 ml de HCl 1 N. Las lecturas de fluorescencia relativa obtenidas a 400 nm de excitación y 520 nm de emision se correlacionaron con niveles de DNA a partir de la curva estandard ajustada. Los estándares de DNA se prepararon disolviendo DNA de timo de ternera (Sigma) en NH₄OH 1 N a 4 grados C por una noche, preparando cantidades adecuadas (de 0.6 a 20 ug) y secándolas a 60 grados C. Los estándares secos podian ser guardados a -20 grados C por varios meses sin pérdida química.

Para la determinación de proteína (Lowry y cols., 1951), el precipitado no hidrolizado de las muestras se resuspendió y se dejó por una noche en 500 ul de NaOH 0.5 N a 4 grados C, junto con estándares frescos de albumina bovina bajo las mismas condiciones. Se tomaron duplicados de 200 ul de cada muestra, y junto con los estándares, se les añadió 900 ul de solución cúprica (Na₂CO₃ al 2%, tartrato de Na-K al 0.02% y CuSO₄ al 0.01%). Después de 10 minutos como mínimo a temperatura ambiente, se añadieron 100 ul del reactivo de Folin 1 N y se dejó desarrollar el color a temperatura ambiente en por lo menos 30 minutos. Con la densidad óptica a 600 nm se obtuvo una curva estándar ajustada y se calculó la concentración proteínica en las muestras (ver el Apéndice II).

2.7 RADIO-INMUNO-ENSAYO (RIE) CONTRA TRH.

Los extractos Acético/Metanol desecados (sobrenadantes) se resuspendieron sobre hielo en solución amortiguadora de fosfatos para RIE (fosfatos 0.05 M, NaCl 0.15 M, albúmina de suero bovina 0.25% a pH final de 7.5). Concentraciones conocidas de TRH y los extractos se mezclaron con el antisuero específico contra TRH (Joseph-Bravo y cols., 1979) a una dilución de 1/40.000 y con [125 I]TRH monoyodado.

MATERIALES Y METODOS

Se permitió que la reacción inmuno-específica llegara al equilibrio a 4 grados C (36-48 hrs.) y se precipitó con Etanol frío. Después de centrifugar, el etanol sobrenadante se descartó. Se contó la radioactividad en el precipitado y se obtuvo una curva ajustada logit con los valores conocidos de TRH. La sensibilidad del RIE regularmente llegaba a los 10 pg de TRH.

3. RESULTADOS.

3.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.

El hipotálamo de 14 días de gestación (E14) proporciona un alto rendimiento de células viables por estructura ($104.7 \pm 5.0 \times 10^{-4}$ células viables por hipotálamo, ver la tabla I). Además, la razón neurona/glia en la siembra es más alta que a edades posteriores. El uso de Poli-D-Lisina como único sustrato ha sido suficiente para la adhesión y crecimiento de células hipotalámicas en cultivo, lo cual ya fue demostrado para el caso de células cerebrales en otros trabajos (Yavin y Yavin, 1974; Pettman y cols., 1979). En pocas horas las células viables se adhieren a la superficie del plato y empiezan a extender prolongaciones, proceso que continúa durante los primeros días *in vitro*. Las neuronas se pueden distinguir por sus prolongaciones finas, cuerpos celulares redondos y refringentes, con un núcleo opaco. A alta densidad de siembra ($10-5$ células por cm^2), gran parte de las neuronas está dispersa en el plato, aunque es frecuente observar grupos de células (de 10 a 50) de donde parten prolongaciones vigorosas (Fig. 1b). Las neuronas tienden a mantenerse dispersas por adhesión y crecimiento directo sobre el sustrato, sin necesidad de que se extienda primero una monocapa no neuronal que sirva de sustrato, como se observa en otros cultivos hipotalámicos reportados (Benda y cols., 1975; Faivre-Bauman y cols., 1980). Es muy común encontrar a las neuronas en asociaciones profusamente interconectadas, con neuritas largas y de alto contraste. Predominan las figuras bipolares entre la población nerviosa. En cambio, la población no neuronal se ve como células

RESULTADOS

aplastadas contra el plato, de apariencia epitelioides, si están muy cercanas entre ellas, o fibroblastoide, a densidades más bajas. Regularmente son transparentes y poligonales, y solo sus prolongaciones citoplásmicas llegan a tener contraste (Fig. 1a).

Después de algunos días como periodo de adaptación a las condiciones in vitro, las células con capacidad proliferativa inician mitosis, logrando expandirse por la superficie no ocupada a partir de colonias que van creciendo en diámetro, usualmente en forma de células poligonales y transparentes.

Al sembrar a alta densidad celular, el proceso de expansión hasta llegar a confluencia dura hasta el principio de la segunda semana, lo cual concuerda con los niveles de DNA, que alcanzan una meseta al noveno día in vitro (9 DIV; Fig. 1). Durante la proliferación de las células epitelioides, las células de apariencia neuronal crecen sobre la monocapa y extienden sus neuritas encima de esta (Fig. 1c). Este periodo de crecimiento logarítmico es crítico cuando se desea emplear algún agente antimitótico. Como se ve en la Figura 1, Citosin-Arabinósido (Cit-Ara) añadido al medio al quinto día in vitro (5 DIV) previene la fase log de la proliferación no-neuronal, preservándose una población importante de "neuronas", junto con células epiteliales sobrevivientes (Fig. 2). Como se puede ver en la curva, la proporción de DNA neuronal en el cultivo es estable en presencia del antimitótico, y representaría menos del 10% del DNA total en cultivos sin restricciones a la proliferación celular. La elongación y ramificación de neuritas no se ve afectada por la Cit-Ara (Fig. 2a). A pesar de los restos celulares, es común observar grupos interconectados entre sí por prolongaciones

RESULTADOS

individuales, cubriendo distancias relativamente grandes sobre la superficie desnuda del plato (Fig. 3). Ha sido posible mantener una población significativa de neuronas con baja proporción de tipos no neuronales hasta por dos semanas en cultivos tratados con el agente antimitótico. La Cit-Ara no tiene ningún efecto sobre cultivos llegando a ó en confluencia (Tabla II). Sin embargo, es necesario un periodo de adaptación al cultivo de por lo menos tres días, ya que el antimitótico aplicado antes de este periodo inicial disminuye considerablemente la eficiencia de siembra.

En cultivos control (sin Cit-Ara) se observan signos de decadencia neuronal durante la segunda semana. Empiezan a aparecer racimos de cuerpos celulares, que por su alto contraste y refractancia semejan cuerpos celulares de neuronas. Sin embargo, no presentan neuritas (Fig. 4a). Las neuronas sobrevivientes aumentan de diámetro tanto su cuerpo celular como sus neuritas principales, tornándose altamente refringentes y de núcleo claro (Fig 4b y c).

La monocapa se engrosa al final de la segunda semana, "engullendo" a las neuronas que hasta ese momento crecían sobre ella (Fig. 5). En este periodo, la óptica del cultivo se empieza a entorpecer, dificultando las observaciones microscópicas. El contraste y la claridad de los contornos celulares se pierde (Fig. 5c). Asimismo, parece disminuir la población de neuronas con el tiempo. Esta pérdida no se refleja en los niveles de DNA total, dada la baja proporción de DNA neuronal (< 10%). El engrosamiento de la monocapa tampoco parece estar acompañado por un aumento en proteína (Fig. 14, H-14).

RESULTADOS

En los últimos días de la segunda semana se llegan a observar colonias de células de cuerpo redondo, pequeño y opaco, con extensiones finas y numerosas hacia todas direcciones. Esta morfología es muy semejante a la de astrocitos maduros. Justamente en partes donde la monocapa se ha elevado sobre la superficie de la monocapa normal es más probable encontrar estas colonias de "astrocitos", algunas veces mezcladas con neuronas sobrevivientes (Fig. 5d). Hacia el final de la segunda semana estas colonias se multiplican, y aumentan de diámetro, junto con el engrosamiento general de la monocapa. No se observan cambios en las curvas de DNA y proteína simultáneos a los cambios morfológicos (Fig. 14, H-14).

3.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.

El rendimiento de células viables a partir de lóbulos frontales de E14 es muy alto ($177.8 \pm 20.7 \times 10^{-4}$ células viables por par de lóbulos, ver la tabla I). Estas células son en su gran mayoría neuroblastos, a juzgar por sus cuerpos celulares redondos, opacos y refringentes.

Como se dijo para los cultivos de hipotálamo, la adhesión y extensión de prolongaciones se realiza durante las primeras horas de iniciado el cultivo a alta densidad celular ($10-5$ cel/cm²). Una particularidad de estas células es que se siembran en forma de grumos o se reagrupan en racimos después de la siembra, durante los primeros días. En consecuencia, al observar el cultivo en este periodo, regularmente se observan agregados de células más compactos que los de hipotálamo.

RESULTADOS

Una red de finísimas prolongaciones entretrajidas entre sí se propaga alrededor de los agregados. En los agregados más grandes es difícil distinguir los contornos de las células individuales. Cuando dos grupos hacen contacto, aumentan de grosor las prolongaciones participantes, y se eliminan las ramificaciones secundarias. Las primeras se unen en haces rectos de neuritas, formandose fascículos entre los grupos (Fig. 6a). Este comportamiento de las células cerebrales in vitro ya ha sido reportado (Yavin y Yavin, 1974; Faivre-Bauman y cols., 1980). Dependiendo de la densidad celular, las neuronas forman grupos más o menos compactos.

Durante la segunda mitad de la primer semana, las células no neuronales empiezan a ocupar la superficie del plato (Fig. 6c). Algunas colonias aisladas empiezan a extenderse sobre las áreas no ocupadas. Otras colonias empiezan a surgir por debajo de los grupos neuronales. Las prolongaciones que antes crecían directamente sobre el plato empiezan a ser desplazadas por la monocapa, y a crecer sobre ella. Al igual que sus homólogos hipotalámicos, estas células no neuronales logran llegar a la confluencia al principio de la segunda semana in vitro. Estos eventos histológicos corresponden a un pico de DNA total entre el sexto y el noveno DIV (Fig. 6).

Concomitante a la expansión de las células no neuronales ("monocapa"), la población neuronal empieza a decaer. Los grupos neuronales pierden sus fascículos, quedando solo prolongaciones individuales, las que luego se pierden a su vez. Algunas neuronas individuales logran mantener sus neuritas principales y aumentan de diámetro sus cuerpos celulares, pero son más bien la excepción. De los grupos solo quedan los racimos de los cuerpos celulares. La

RESULTADOS

degeneración neuronal se refleja claramente en la pérdida celular representada como una caída en el DNA total a partir de la segunda semana (Fig. 6). En contraste con los cultivos hipotalámicos, donde la pérdida neuronal no se registra en la curva del DNA, la caída en la curva de crecimiento de las células cerebrales corresponde a las células en los agregados que decaen masivamente durante este periodo del cultivo. Si se añade el Citosín-Arabinósido al 5 DIV, se elimina apreciablemente a las células no-neuronales. Como se había observado en cultivos hipotalámicos, los eventos de extensión de neuritas e interconexión entre agregados celulares parecen no ser obstaculizados. Sin embargo, la pérdida de la mayor parte de la población nerviosa que se observa durante la segunda semana en cultivos control es inevitable asimismo en cultivos tratados con Cit-Ara (Fig. 6).

En el transcurso de la segunda semana, la monocapa de cultivos control aumenta de grueso, y aparecen los "astrocitos": células de cuerpo celular redondo y pequeño, multipolar, con prolongaciones muy finas y relativamente cortas (en comparación con las neuronas). No se encuentran en colonias circulares, como en hipotálamo, sino uniformemente distribuidas en el interior de la monocapa (Fig. 6b).

Al final de la segunda semana, el panorama en estos cultivos está dominado por la alta densidad de "astrocitos" dentro de una monocapa gruesa, que abarca toda la superficie del plato. Las neuronas han desaparecido, y los grumos paulatinamente se han encogido, hasta terminar como montones de restos celulares sobre la monocapa.

RESULTADOS

3.3 DENSIDADES DE SIEMBRA ALTERNATIVAS: MUY ALTA DENSIDAD (400,000 células por cm^2), ALTA DENSIDAD (150,000 células por cm^2), y BAJA DENSIDAD (50,000 células por cm^2).

3.3.1. CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.

El crecimiento y replicación de las células no neuronales sembradas a Muy Alta Densidad (4×10^5 cel/ cm^2) se inicia inmediatamente. A tal grado es esto, que ya para la mitad de la primer semana la monocapa está alcanzando la confluencia (Fig. 7). La extensión de prolongaciones por parte de células con apariencia neuronal es muy vigorosa, la cual se realiza sobre la monocapa, interconectando células adyacentes o grupos de neuronas. A Baja Densidad de siembra (5×10^4 cel/ cm^2), la cantidad de restos celulares domina el panorama microscópico durante los primeros días. Grandes agregados de partículas amorfas flotan en el medio de cultivo. Sobre la superficie del plato se observa una población celular pobre, compuesta principalmente por células fibroblastoides. Las neuronas solo se encuentran en grupos pequeños (frecuentemente con algunas células poligonales), con prolongaciones ya discernibles y muy ramificadas (Fig. 7c). Como se había mencionado con los cultivos tratados con Cit-Ara, a pesar del bajo valor de DNA total en los cultivos a Baja Densidad, es posible distinguir una población importante de neuronas. Durante la primer semana se empiezan a definir colonias de poligonales que se extienden en todas direcciones.

RESULTADOS

Durante la segunda semana las prolongaciones así como los cuerpos de las neuronas aumentan de diámetro en el interior de la monocapa confluyente. La densidad de ésta obstruye la observación de sus contornos celulares (Fig. 8a y b). Es evidente la decadencia en los cultivos a Muy Alta Densidad celular en esta etapa, como se puede ver en la caída del DNA total a niveles de confluencia no neuronal de los cultivos a Alta Densidad celular (Fig. 8), probablemente debido a muerte neuronal. Solo hasta el final de la segunda semana, en los cultivos a Baja Densidad celular las colonias de no neuronales logran alcanzar la confluencia. La población neuronal se ve dispersa en todo el plato, con prolongaciones largas y bien definidas. A pesar de ser relativamente pocas, el aspecto de sus cuerpos celulares y el grado de interconexión es bueno (Fig. 8c). Persisten grumos de partículas amorfas sobre algunos grupos de células. En la monocapa confluyente, pero todavía poco densa, hay zonas donde las no neuronales con aspecto fibroblastoide tienden a alinearse y extenderse sobre un mismo eje. Con frecuencia, neuronas interconectadas sobre estas zonas tienen sus neuritas extendidas en la misma dirección por distancias considerables (Fig. 8c).

3.3.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.

A Muy Alta Densidad de siembra (4×10^{-5} cel/cm²), la gran mayoría de las células están asociadas en grupos grandes no muy compactos (se distinguen los cuerpos celulares individuales). Una extensa red de prolongaciones se desarrolla en los primeros días, interconectando los grupos sobre una superficie casi completamente cubierta de células no neuronales (Fig. 9a). Al igual que en hipotálamo, a Baja Densidad celular (5×10^{-4} cel/cm²) se presenta una menor eficiencia de

RESULTADOS

siembra (mayor cantidad de partículas amorfas en proporción al total de material sembrado). Sin embargo, la pérdida de células no es tan grande como con tejido hipotalámico. Otra diferencia notable entre las células cerebrales y las hipotalámicas es que mientras éstas estaban muy dispersas y las neuronas en menor número con respecto a los tipos no neuronales, sus extensiones eran vigorosas, largas y muy ramificadas, recorriendo comúnmente distancias considerables hasta la neurona más cercana. En cambio, a pesar de haber gran cantidad de células de aspecto neuronal en estos cultivos, las neuritas que extienden son muy finas y cortas, y solo en las zonas más pobladas mejora el aspecto de las prolongaciones, ramificándose con mayor frecuencia (Fig. 9c).

Para el final de la primer semana, los agregados se han compactado en los cultivos a Muy Alta Densidad celular, siendo difícil distinguir el número de células en ellos. En las zonas de menor densidad las prolongaciones ya se han juntado en haces de neuritas de distintos grosores, cruzando sobre distancias relativamente cortas. En cambio, en las zonas más pobladas hay una gran densidad que obstruye la identificación de los componentes celulares. En cultivos a Baja Densidad celular, el desarrollo en este periodo es decepcionante. Algunas colonias de monocapa (células poligonales) han sobrevivido, y únicamente se ven células de apariencia neuronal en grumos grandes (probablemente sembrados así desde el principio), ya que las células dispersas tienen extensiones muy endebles para ser identificadas.

En la segunda semana, los cultivos a Muy Alta Densidad celular se han definido como "monocapa" densa. Incrustados en ella se

RESULTADOS

distinguen cuerpos celulares opacos, sin neuritas distinguibles (posiblemente "astrocitos"). Entre grupos celulares compactos en la zonas de menor densidad ya no se observan haces de neuritas, solo prolongaciones individuales poco ramificadas. Al igual que cultivos de Alta Densidad celular, la pérdida poblacional es notable a partir del 9 DIV (Fig. 9). No parece haber una recuperacion en la población nerviosa de los cultivos a Baja Densidad celular. Siguen apareciendo restos celulares: las colonias de poligonales y las células fibroblastoides van ocupando la superficie aun disponible en este periodo, que se refleja en la recuperacion de las curvas de crecimiento. Llegan a distinguirse "astrocitos" en la monocapa al final de la segunda semana. Las tres densidades de siembra parecen converger en un nivel de DNA total similar (Fig. 9), lo que probablemente representa el nivel de la población no neuronal despues de que se ha perdido a la población nerviosa.

3.4 MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.

Como un paradigma preliminar para detectar alguna actividad trófica en el medio condicionado (MC) homólogo, se escogió la baja densidad de siembra (50,000 células por cm²), donde se observa que es más probable la pérdida neuronal y mucho más evidente el desarrollo de la sobrepoblacion no neuronal. Se cultiva por 3 días en medio al 10% FCS como periodo previo de adaptación a las condiciones in vitro. Posteriormente, al renovar el medio se hace una mezcla 1:1 de medio condicionado por cultivos confluentes crecidos en paralelo y medio fresco sin suero. La combinación resultante de MC homólogo contendría a lo sumo 5% de FCS.

RESULTADOS

3.4.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14 EN MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.

Dos aspectos resaltan marcadamente al transcurrir la segunda semana de estos cultivos hipotalámicos. Primero, la extensión y densidad de la monocapa es notablemente menor que la de cultivos homólogos control, tanto visto a la observación directa (Fig. 10) como en las curvas de crecimiento (Fig. 16, H-14), donde se observa un 33% de inhibición en el crecimiento al 12 DIV. Al parecer, la población nerviosa es igual o mayor que en los controles, extendiendo neuritas muy largas y de alto contraste (Fig. 11a y c). En segundo lugar, a diferencia de la monocapa confluyente de los cultivos control y a pesar de la baja proporción de células no neuronales, existen colonias de células de aspecto astrocítico. Esta particularidad de los cultivos crecidos con HC homólogo es mucho más aparente cuando se trabaja con tejido hipotalámico de 16 días de gestación (Fig. 11b y d).

3.4.2 CELULAS CEREBRALES DE E14 EN MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.

Los eventos de degeneración nerviosa y extensión de colonias no-neuronales son retrasados con HC homólogo. En estos cultivos, donde la baja densidad de siembra impediría la formación de interconexiones profusas y promovería la expansión no-neuronal, el crecimiento de neuronas aisladas y sus prolongaciones es más notorio que en la situación control (Fig. 12c y d), y se inhibe en un 65% la proliferación celular (Fig. 16, C-14). Además de abatir la proliferación de las células basales, se presenta una diversidad morfológica de las colonias presentes (Fig. 12).

RESULTADOS

3.5 DHEM CON 20%, 10%, 5% Y 0% DE SUERO BOVINO FETAL.

3.5.1 CELULAS HIPOTALAMICAS DE E14.

Se dieron tres días de crecimiento en DHEM-FCS (10% FCS, 100,000 células por cm² aprox.) antes de cambiar al medio modificado en cuestión. Los eventos en el cultivo durante la primer semana con los medios al 20% (M20) o al 5% (M5) son muy similares con lo que se observa en los cultivos con medio normal al 10% (M10) de FCS. La monocapa va llegando a la confluencia durante el transcurso de la primer semana. Las células con apariencia neuronal extienden sus neuritas en los primeros días. La excepción es el medio sin FCS (M0), donde la monocapa evidentemente ha tenido un crecimiento más limitado, a juzgar por el menor número de colonias no neuronales y la curva de crecimiento (Fig. 18, H-14). Es también donde la eficiencia de siembra es más pobre. Ya en M5 la cantidad de partículas amorfas es notablemente mayor que en las otras series (M10 y M20). Otro aspecto interesante es el número de colonias de células epiteliales granulares (Fig. 13a). En M5 y M0 estas colonias son más frecuentes que en las otras series. En proporción, la población neuronal aparentemente permanece indiferente a las variaciones del suero en el medio.

En la segunda semana, las distintas condiciones empiezan a tener efectos notables. En M20, la monocapa confluyente sobrelleva una población menor de neuronas, en comparación con la situación control (M10). En M5, además de el complemento neuronal similar al de M10, empiezan a aparecer con mayor frecuencia y de mayor diámetro las

RESULTADOS

colonias de "astrocitos" en la monocapa confluyente. Este comportamiento a nivel celular es muy interesante, ya que, de acuerdo con las curvas de crecimiento, no parece haber un efecto sobre los niveles de DNA ni de proteína total por las distintas proporciones de FCS en el medio (Fig. 18, H-14), por lo que estos cambios morfológicos se llevaron a cabo sin cambios gruesos en el número total de células o en la expresión proteínica. En M0 los perfiles celulares en las colonias presentes adquieren formas muy variadas, que incluyen morfologías de células epiteliodes, neuronas, "astrocitos", células epiteliales granulares, etc., casi siempre una sola morfología dentro de la misma colonia.

En la segunda mitad de esta semana, la pérdida neuronal es un evento conspicuo en general. Se puede observar que en M20 hay varios conglomerados de células fibroblastoides con sus ejes de simetría orientados coordinadamente (haces fibrosos de células), sobresaliendo del plano de la monocapa cuando son muy grandes (ver por ejemplo la Fig. 13e). La monocapa en sí no es muy gruesa todavía, con cada vez menos neuronas. En su lugar aparecen cuerpos redondos refringentes en racimos de 3 o más, muy similares a los cuerpos celulares nerviosos, pero con neuritas muy finas y cortas, y en ocasiones sin extensiones aparentes (ver por ejemplo la Fig. 4a). M10 presenta numerosas colonias de "astrocitos", regularmente entremezcladas con la población neuronal, que todavía es numerosa. En M5 se observan colonias de "astrocitos" (ver las Figs. 13b y c) tan extendidas en diámetro que ya se empiezan a traslapar los bordes. Los restos celulares siguen presentes en M0; la población nerviosa ha disminuído notablemente, y las sobrevivientes tienen un aspecto muy endeble. La variedad en morfología de las colonias no neuronales domina el

RESULTADOS

panorama microscópico, y la actividad ependimal va en aumento.

A finales de la segunda semana, la monocapa en M20 es bastante densa y transparente, con muchos haces fibrosos de células. No es común encontrar neuronas ni astrocitos. M10 tiene una monocapa densa con inclusiones astrocíticas numerosas. Estas suelen estar agregadas alrededor de neuronas sobrevivientes de diámetro celular relativamente grande y neuritas gruesas. La observación microscópica se dificulta debido al grosor de la monocapa en estas zonas. Hay muchos racimos pequeños de cuerpos refringentes. Llama la atención como la monocapa de M5 se eleva más sobre regiones con "astrocitos" que en el resto del plato (ver por ejemplo la Fig. 7a). Al igual que en M10, en M5 es frecuente encontrar neuronas en estas zonas sobresalientes. Aparentemente la población neuronal en M5 es la más alta de todas las series. Como se mencionó antes, estos patrones morfológicos bajo distintas proporciones de FCS en el medio se llevan a cabo sin cambios significativos en las curvas de crecimiento respectivas (Fig. 18, H-14).

3.5.2 CELULAS CEREBRALES DE E14.

El desarrollo de células cerebrales en cultivo ya ha sido descrito en detalle para las condiciones control M10 (10% de FCS en el medio). Es en la parte final de la primer semana cuando los grupos de células nerviosas pierden sus haces de neuritas primero, y sus prolongaciones individuales después, para quedar como agregados de cuerpos celulares sobre una monocapa en expansión. En los presentes cultivos, el deterioro de dichos agregados está en relación directa a la proporción de suero en el medio. En contraste, M0 contiene todavía una población nerviosa mayoritaria extendiendo su intrincada red de

RESULTADOS

neuritas sobre la superficie. La monocapa es virtualmente inexistente, con muy pocas células fibroblastoides y "astrocitos" dispersos en algunas zonas (Fig. 13d). En el transcurso de la segunda semana se puede observar como el FCS en el medio no afecta significativamente la cantidad total de DNA (Fig. 18, C-14), pero sí es probable que contribuya al engrosamiento de la monocapa en forma proporcional al suero en el medio. Durante esta semana, los agregados celulares disminuyen de tamaño, y aparecen los "astrocitos" incrustados en la monocapa. Lo más interesante se observa en M0, con la persistencia de formaciones reticulares tejidas por las neuritas de los grupos neuronales. Aún es posible encontrar haces de prolongaciones en las regiones con mayor densidad neuronal. Sin embargo, hay pérdida celular a juzgar por los restos celulares, particularmente sobre agregados nerviosos.

En los últimos días de esta semana es posible observar gradientes en cuanto a la degeneración de los agregados otrora neuronales, el grosor de la monocapa y la cantidad de "astrocitos" dentro de ésta. Estos aspectos están en función directa a la proporción de FCS en el medio utilizado. En M20 la monocapa contiene algunas colonias grandes de "astrocitos"; además hay zonas con grandes haces fibrosos de células (Fig. 13e). Los grumos se han convertido en montoncitos de partículas amorfas sobre el resto de las células. M10 presenta un gran número de "astrocitos", que no obstante están regularmente separados entre sí, en el interior de una monocapa muy densa. A pesar de que en M5 la monocapa no sea tan gruesa, la población astrocítica es tan alta o mayor que en M10. Llega a detectarse actividad ependimal en ciertos lugares. Asimismo, persisten algunos grumos celulares ya muy contraídos. La apariencia

RESULTADOS

de MO es decepcionante. La población nerviosa muere, dejando un gran esqueleto de la estructura reticular entre las escasas sobrevivientes no neuronales. En algunos grupos grandes parecen existir neuronas vivas, pero es indudable la decadencia del cultivo, por la gran cantidad de restos celulares flotando en el medio.

3.6 CELULAS DE E16.

El tejido hipotalámico de 16 días de gestación (E16) resulta una fuente pobre de células, ya que además de obtenerse un menor rendimiento ($72.3 \pm 4.7 \times 10^{-4}$ células viables por hipotálamo), la eficiencia de siembra es muy baja, lo que se refleja en grandes conglomerados de restos celulares después de la siembra, y baja proporción de células adheridas a la superficie del plato. En cambio, la dispersión de tejido cerebral (lóbulos frontales) de E16 resulta en rendimientos mayores a los de estructuras de E14 ($236.3 \pm 29.1 \times 10^{-4}$ células viables por par de lóbulos, ver la tabla I), y las eficiencias de siembra son comparables.

Bajo condiciones relativamente estables ($100,000$ células/cm², medio con 10% de FCS), el desarrollo microscópico de cultivos de ambas regiones E16 es semejante en todos los aspectos al de los cultivos homólogos de E14, con excepción del número de neuronas recuperadas del hipotálamo en cultivo, que siempre resulta menor al tomarse las estructuras de mayor edad fetal. El patrón de las curvas de crecimiento de células E16 es muy similar al de las células E14 (comparar la Fig. 14 con la Fig. 15). Las células hipotalámicas E16 llegan a la confluencia en el 9 DIV, y si el cultivo es tratado con Cit-Ara al 5 DIV, es decir, antes de la fase log, se previene la sobrepoblación no-neuronal y se pueden mantener cultivos estables de

RESULTADOS

neuronas hasta por dos semanas (Fig 15, H-16). Las células cerebrales de E16 en cultivo llegan a un pico poblacional al 9 DIV, para caer progresivamente en los siguientes días. A pesar de que la Cit-Ara al 5 DIV previene la fase log, no evita la pérdida neuronal en los días subsiguientes in vitro (Fig. 15, C-16).

De la misma manera, los eventos celulares en cultivos con proporciones distintas de FCS en el medio son muy semejantes entre tejidos correspondientes de edad fetal distinta. Sin embargo, como se puede observar al comparar cuidadosamente las figuras 14 y 15, los niveles de DNA en la confluencia de las células hipotalámicas son ligeramente distintos para las dos edades fetales. Las células E14 logran confluencia a un nivel DNA/poza de 10-12 ug, mientras que las células E16 llegan solo a 8-9 ug en confluencia (ver también la Fig. 16 vs. Fig 17). Es interesante que este tope de las células hipotalámicas de E16 puede ser regulado por las condiciones del cultivo. Observaciones preliminares mostraron que las células hipotalámicas respondían con incrementos poblacionales (e.g. aumento en los niveles de DNA) si los cultivos eran alimentados más frecuentemente en un periodo de dos semanas. Experimentos posteriores mostraron que esta respuesta a la frecuencia de alimentación solo se lograba con cultivos de células de E16. En la figura 20 se muestran los valores de DNA y proteína obtenidos de dos cultivos representativos. Se puede observar como se logra aumentar el nivel de DNA total del 15 DIV solo en células hipotalámicas de E16, si se procura seguir un regimen de alimentación frecuente.

Dado que se pueden descartar los nutrientes intrínsecos al medio como los responsables de este efecto trófico, en base a que es poco

RESULTADOS

probable un metabolismo intermediario esencialmente distinto entre los dos tejidos fetales, el mejor candidato como causante del efecto trófico fue el factor extrínseco al medio: el suero. De acuerdo a este razonamiento, una mayor proporción de FCS en el medio equivaldría a una mayor frecuencia de alimentación (suponiendo que los posibles factores tróficos del suero están a concentraciones limitantes una vez diluidos en el medio de cultivo). Como a los 15 DIV las células hipotalámicas ya han llegado a la meseta de la confluencia, debe ser posible observar un incremento en el nivel de la meseta si se alimentan los cultivos a la misma frecuencia pero con una mayor proporción de FCS en el medio utilizado. Este paradigma no debería de tener efecto sobre la meseta de confluencia de células hipotalámicas de E14. Como se puede observar al comparar las figuras 18 y 19, existe un aumento ligero pero significativo de la meseta alcanzada por las células hipotalámicas de E16 en función de la proporción de FCS en el medio (Fig. 19, H-16). Este no es el caso para las células hipotalámicas de E14 (Fig. 18, H-14), ni para las células cerebrales de las dos edades fetales. Como se había señalado antes, este efecto es independiente de los eventos microscópicos observados en el transcurso del cultivo, y denota una propiedad inherente a las células con capacidad proliferativa del tejido hipotalámico de E16.

Al sembrar a densidades alternativas se obtienen patrones muy similares en las curvas de crecimiento para ambas regiones a las dos edades fetales (comparar las figuras 16 y 17). Las células hipotalámicas de E16 sembradas a Muy Alta Densidad alcanzan confluencia al 6 DIV. Solo a los 12 DIV se denota una pérdida celular, manteniéndose sin embargo un nivel de DNA total cercano a la

RESULTADOS

meseta de confluencia de cultivos a Alta Densidad celular (aprox. a 8 ug de DNA/poza: Fig. 17, H-16). Las células cerebrales de E16 sembradas en Muy Alta Densidad logran un máximo de DNA total al 6 DIV. que, al igual que los cultivos a Alta Densidad, decae subsecuentemente. Se puede observar además como las tres curvas de crecimiento de células cerebrales tienden a convergir a un nivel similar de DNA total (Fig. 17, C-16), probablemente el de la confluencia no-neuronal (como se hizo notar anteriormente para el caso de las células cerebrales de E14; Fig. 16, C-14).

A pesar de la semejanza entre las curvas de crecimiento de células de edades fetales distintas, un evento microscópico distingue al comportamiento in vitro de las células hipotalámicas de E16: en su "monocapa" confluyente aparecen morfologías astrocíticas (Figs. 13b y c) más tempranamente in vitro que en cultivos confluentes de células de E14. Esta diferencia parece estar asociada con el engrosamiento general de la "monocapa", presente también con algunos días de anticipación en los cultivos de células hipotalámicas de mayor edad fetal. La expresión de la morfología astrocítica fue más evidente al cultivar las células hipotalámicas de E16 en presencia de medio condicionado homólogo. Aún cuando no se frena el crecimiento poblacional en forma significativa (Fig. 17, H-16), es notable la gran densidad de "astrocitos" en una monocapa poco densa al cultivar en presencia del medio condicionado homólogo (Fig. 11d) que al cultivar con el medio normal, donde los "astrocitos" forman solo algunas colonias circulares en una monocapa transparente mayoritaria (Fig. 11b). La población neuronal en estos cultivos es escasa, por lo que no fue posible observar algún efecto del medio condicionado sobre el desarrollo de las neuronas hipotalámicas de E16.

3.7 TRH IN VIVO E IN VITRO.

En la tabla III se presentan los valores de TRH obtenidos por RadioInmunoEnsayo (RIE) en hipotálamo y en cerebro extrahipotalámico durante el desarrollo fetal y postnatal del ratón. Asimismo, se determinaron los niveles intracelulares de TRH en cultivos de células hipotalámicas y cerebrales (TRH en el medio de cultivo no pudo ser medido debido a interferencias inespecíficas en el RIE). En cultivos donde se sembraban aprox. 100,000 células por cm², y en número total equivalente a las células recuperadas de un hipotálamo, se podía detectar material radioinmunoensayable. Sin embargo, los niveles medidos tenían una alta variabilidad, sin correlación alguna con el tiempo de desarrollo in vitro de las células o con las condiciones en que eran crecidas. En un experimento, cultivos de células hipotalámicas de E14 dieron valores que variaban en un intervalo de 25 a 140 pg de TRH totales (tabla IV). Lo que dificultaba la interpretación de esta variabilidad era la falta de relación entre el nivel de TRH detectado y el tiempo transcurrido del cultivo, o de si el cultivo había sido tratado o no con el agente antimitótico. Ilustrando lo anterior, en la tabla IV se puede ver como a pesar de que el desarrollo celular general (DNA y proteína) es semejante en las dos cajas de células hipotalámicas con 3 días in vitro, los valores de TRH celular detectados difieren completamente (el tratamiento con Cit-Ara se aplicó al día 5 in vitro). En la tabla V se muestra como sembrando a distintas densidades (1, 1/2 o 1/4 equivalente de hipotálamo aprox. por caja de cultivo), los valores de TRH celular obtenidos no difieren significativamente de acuerdo a las diferencias observadas en los niveles de DNA y proteína. Ensayos posteriores para la detección de TRH en cultivos de células

RESULTADOS

hipotalámicas o cerebrales adolecían siempre de una alta variabilidad, tanto dentro del mismo cultivo como entre cultivos desarrollados independientemente (comparar por ejemplo el intervalo de TRH presentado en la tabla IV con los intervalos de la varianza para TRH en la tabla V). Solo se pueden mencionar algunas observaciones generales sobre ciertos patrones de detección de TRH in vitro (Tabla VI):

a) Es más frecuente detectar TRH en cultivos de células hipotalámicas de E14 que de E16, probablemente debido a la mayor sobrevivencia neuronal en los primeros.

b) Los valores obtenidos de cultivos hipotalámicos en general superan a aquellos obtenidos de cultivos cerebrales.

c) El remplazamiento completo del medio de cultivo en las fechas de alimentación abate los valores detectables de TRH en cultivos hipotalámicos o cerebrales, lo que no sucede si solo se remplaza la mitad del medio de cultivo por medio fresco (es decir, si se deja parte del Medio Condicionado homólogo).

4. DISCUSION.

4.1 SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO IN VITRO EN RELACION A LA EDAD EMBRIONARIA DE LAS CELULAS NERVIOSAS.

Resultados preliminares en cultivos hipotalámicos utilizando tejidos de diferentes edades fetales mostraron una selección de ciertos tipos celulares en el transcurso del cultivo. A edades jóvenes (E 13-14) se obtenían poblaciones celulares mixtas de neuronas y glia; las primeras podían ser mantenidas in vitro de forma estable si se añadía Cit-Ara antes de que las células gliales sobrepoblaran la superficie disponible. Si el tejido era obtenido a edades fetales más cercanas al nacimiento (E 16-18), aún con la adición de Cit-Ara al medio, los cultivos regularmente consistían de monocapas de células gliales con una baja población neuronal creciendo encima de estas. Resultados semejantes se han reportado en otros sistemas de cultivo de tejido nervioso central (Booher y Sensenbrenner, 1972). En los resultados presentados sobre viabilidad de suspensiones celulares y eficiencias de siembra, puede observarse como el estrés de la dispersión mecánica afecta más al tejido hipotalámico de E16 (36% de viabilidad) que al tejido más joven de E14 (65% de viabilidad). Después de 3 días en cultivo, a contraste de fases fue evidente que la proporción neurona/glia a la misma densidad de siembra era más alta de células E14 que de E16, lo que sugiere una vulnerabilidad especial del tipo neuronal en el hipotálamo, a medida que se desarrolla esta estructura prenatalmente.

De acuerdo a datos autoradiográficos in vivo, las últimas divisiones neuronales en el hipotálamo de ratón se realizan alrededor

DISCUSION

del día 13 de gestación (E13, día 14 de preñez, Shimada y Nakamura, 1973). En cambio, la neurogenesis en la neocorteza termina cerca del nacimiento (Angevine y Sidman, 1961). Suponiendo que en el hipotálamo la neurogénesis es seguida por la gliogénesis, como parece ser el caso en la mayoría de las regiones del CNS en mamíferos (Jacobson, 1978), entonces los compartimientos o pozas celulares de los cuales se originarian los glioblastos en el hipotálamo estarían más activos después del día E13, paralelamente a la diferenciación neuronal, como es el caso en la neocorteza, donde la producción glial en etapas postnatales va acompañada de diferenciación neuronal (Jacobson, 1978). Bajo estas consideraciones, se puede explicar que el hipotálamo de E14, recién incorporado su complemento neuronal y en un estado inmaduro de desarrollo, produjo suspensiones celulares de alta viabilidad y con una relación neurona/glia alta. Comparativamente, en el hipotálamo de E16 (día 17 de preñez) las neuronas tendrían ya varios días en proceso de diferenciación (Niimi y cols., 1962), con las pozas gliales más activas mitóticamente. Esto redundaría en una baja viabilidad de las suspensiones celulares (por la mayor vulnerabilidad a la agresión mecánica) y una baja relación neurona/glia. Las diferencias entre el desarrollo de la corteza cerebral a las dos edades fetales utilizadas no parecieron ser tan drásticas como lo fueron para el hipotálamo. La viabilidad de las suspensiones celulares a partir de lóbulos frontales de E14 (81%) solo bajo relativamente poco al utilizar lóbulos frontales de E16 (66%) (tabla I), y el desarrollo in vitro no difería marcadamente entre las células de las dos edades, habiendo inicialmente una alta relación neurona/glia, la cual disminuía a medida que se establecían y expandían las colonias gliales. Los resultados obtenidos

DISCUSION

concuerdan con un esquema de desarrollo nervioso durante el periodo fetal mas temprano en el hipotálamo que en el cerebro extra-hipotalamico del ratón, lo cual ya se ha confirmado por los perfiles ontogeneticos de varios marcadores enzimáticos específicos del sistema nervioso (Puymirat y cols., 1982b).

4.2 DIFERENCIACION MORFOLOGICA IN VITRO.

Debido a que se desconoce en buena medida la importancia de la interacción neurona-glia en la función nerviosa, y en particular en la expresión de péptidos hipotalámicos, decidimos estudiar cultivos donde se permitía la proliferación glial para observar el comportamiento y diferenciación de las células gliales y neuronales in vitro. En estudios preliminares se observó que en la segunda semana de cultivos hipotalámicos, varios eventos microscópicos sugerían una interacción cercana entre las neuronas y las células basales de la monocapa, asociados a notables cambios morfológicos dentro de esta. El hipotálamo es una estructura especialmente ventajosa para el estudio de la diferenciación glial y su posible relevancia en la función nerviosa, ya que es una estructura no mielinizada en el adulto, por lo que es de esperarse una preponderancia astrogliar en cultivos hipotalámicos. En efecto, el estudio ultraestructural de cultivos de células hipotalámicas fetales (Benda y cols., 1975) revela una población de astroglia inmadura como componente principal de la monocapa basal, sobre la cual crecen células endimales (como unico tipo no neuronal adicional), células neuroepiteliales y una población neuronal que incluye neuronas y células neurosecretoras. Dentro de la monocapa confluyente temprana solo se observan astrocitos inmaduros (espongioblastos), pero a

DISCUSION

tiempos más largos in vitro es posible distinguir astrocitos en varias etapas de maduración, situados en capas estratificadas dentro de la "monocapa". A contraste de fases, esta "monocapa" presenta una apariencia pavimentosa y transparente. Una observación interesante es que a pesar de que la población nerviosa se localiza por encima de las células basales, sus procesos se introducen en la monocapa, donde se establecen los contactos sinápticos (Benda y cols., 1975). Nosotros observamos a contraste de fases que al final de la segunda semana en cultivo, la monocapa parecía aumentar de grosor, y frecuentemente las neuronas por encima de ésta parecían quedar en su interior. Este fenómeno posiblemente corresponde a la estratificación de la monocapa ya descrito (Benda y cols., 1975). Llama la atención que el proceso no fué acompañado por un aumento de proteína total en el cultivo. Sin embargo, el procedimiento de análisis de DNA y proteína en la misma muestra abre la posibilidad de que la proteína expresada durante este evento fuese especialmente vulnerable a la hidrólisis ácida del ensayo (ver Materiales y Metodos). La aparición de perfiles astrocíticos dentro de la monocapa gruesa en la etapa final de nuestros cultivos nos pareció interesante, ya que podría representar una diferenciación glial de novo con relevancia en la diferenciación neuronal. Sin embargo, la baja proporción de neuronas en estos cultivos y el engrosamiento general de la monocapa obstaculizaba la observación directa y podría interferir en análisis bioquímicos posteriores. Decidimos probar diferentes condiciones de cultivo sobre esta posible diferenciación glial y sobre el desarrollo neuronal.

DISCUSION

4.3 CRECIMIENTO CELULAR A BAJA DENSIDAD DE SIEMBRA Y EFECTO DE MEDIO CONDICIONADO HOMOLOGO.

Una diferencia muy interesante entre las neuronas cerebrales y las hipotalámicas en cultivo era la capacidad de éstas últimas de crecer en forma dispersa a bajas densidades ($\ll 10^{-5}$ células/cm²). La sobrevivencia neuronal y la formación de estructuras reticulares fue más evidente en los cultivos hipotalámicos que en los cerebrales. En parte, el éxito del crecimiento de neuronas hipotalámicas a tan baja densidad probablemente se debió a la propiedad de la poli-lisina de actuar como un sustrato de crecimiento adecuado. Sin embargo, las células cerebrales necesitan de algún factor adicional para su desarrollo adecuado in vitro. Observaciones preliminares sugerían que al renovar solo la mitad del volumen cada cambio de medio en un cultivo de células hipotalámicas, se obtenían mejorías aparentes en la sobrevivencia de las neuronas y en el aspecto de sus prolongaciones. Así, era probable que el medio condicionado remanente (medio condicionado homólogo) tuviera una capacidad trófica sobre las células hipotalámicas. Para abordar esta pregunta, hicimos uso de medio condicionado (MC) por cultivos homólogos confluentes, y lo aplicamos a cultivos sembrados a baja densidad celular. El MC homólogo aumentó la complejidad de las formaciones reticulares en cultivos hipotalámicos, e incrementó la sobrevivencia y crecimiento neuronal en cultivos cerebrales. Empero, el efecto más dramático fue la inhibición de la proliferación glial, y la inducción de cambios morfológicos en la población celular existente. En este trabajo no se estudio si el efecto del MC hipotalámico es intercambiable con el del

DISCUSIÓN

MC cerebral. La capacidad del MC homólogo de procurar algún factor o factores que promueven el crecimiento neuronal a baja densidad celular sugiere que estos factores neurotróficos son solubles. Varias actividades tróficas relevantes para el desarrollo nervioso han sido descritas en MCs en otros sistemas: actividades promotoras de elongación neurítica (Collins, 1978; Dribin y Barrett, 1982; Henderson y cols., 1981) y de conversión colinérgica (Patterson y Chun, 1977) en neuronas periféricas; promoción de sobrevivencia (Banker, 1980; Varon y cols., 1984; Muller y cols., 1984; Grau-Wagemans y cols., 1984) y de elongación neurítica (Banker, 1980; Muller y cols., 1984) en neuronas centrales. En cuanto a éstas últimas, es interesante hacer notar que algunas actividades además de encontrarse en MCs de tejidos no neuronales (heterólogos), están asociados con factores intrínsecos a las células en cuestión, lo que explica la fuerte correlación entre la sobrevivencia de neuronas cerebrales (Varon y cols., 1984) y cerebelares (Grau-Wagemans y cols., 1984) con la densidad de siembra empleada.

La astrogliia ha mostrado ser una fuente importante de factores tróficos solubles para neuronas centrales (Banker, 1980; Varon y cols., 1984; Muller y cols., 1984; Grau-Wagemans y cols., 1984). En base al carácter astrogliial de la población no neuronal en cultivos hipotalámicos de fetos murinos (Benda y cols., 1975; Puymirat y cols., 1982a) y de la alta proporción de astrogliia en la monocapa basal de cultivos cerebrales de rata neonatal (Sensenbrenner, 1977; McCarthy y de Vellis, 1980; Hansson, 1984; Walker y cols., 1984), el mejor candidato celular que se puede tomar como responsable por la producción de los factores neurotróficos solubles en nuestros MCs homólogos es la astrogliia.

DISCUSION

Por otra parte, resulta muy interesante que los productos vertidos al medio, presumiblemente por la astroglia, no solo contenian factores neurotróficos, sino además posibles factores de diferenciación glial. La inhibición de la proliferación neuronal en cultivos de células hipotalámicas y cerebrales de E14, y la diferenciación morfológica de la astroglia hipotalámica de E16 apoya la interpretación de que estos eventos celulares son provocados por los productos en el MC. Una actividad similar en extractos de cerebro, y su efecto en la diferenciación astrogliar, ha sido descrita en detalle por Lim y cols. (1977). Este autor no registra dicha actividad en el MC astrogliar, aunque sí reporta una diferenciación morfológica espontánea en cultivos confluentes no tratados con el extracto. Más trabajo en la caracterización del MC de nuestros cultivos de células fetales será necesario para la identificación de este posible factor(es) de diferenciación glial, y su separación del componente neurotrófico del MC.

4.4 EFECTO DEL SUERO BOVINO FETAL (FCS) SOBRE LA DIFERENCIACION MORFOLOGICA IN VITRO.

Actualmente, un área de vanguardia en el desarrollo de técnicas de cultivo de células nerviosas, es la definición de medios libres de suero capaces de mantener poblaciones diferenciadas de neuronas y glia, para análisis bioquímico y fisiológico. La presencia de suero (particularmente de FCS) en los medios tradicionalmente empleados, ha sido desplazada por complementos nutritivos y hormonales en la formulación de medios químicamente definidos, para el crecimiento de ciertas células nerviosas (para revisión, ver Barnes y cols., 1984b). A pesar de todo, el FCS sigue siendo un componente necesario por

DISCUSION

algunas de sus propiedades (e.g. proteger a las células durante la dispersión del tejido, o como fuente de factores de adhesión de células nerviosas), además de seguir siendo el complemento de los medios de cultivos más frecuentemente utilizado. De hecho, algunos medios libres de suero son insuficientes para promover el desarrollo celular de cultivos hipotalámicos (Faivre-Bauman y cols., 1981) y cerebrales (Yavin y Yavin, 1980) en forma similar a aquellos cultivos crecidos en medio con el complemento sérico. En nuestros cultivos, la adición de FCS al medio parece tener efecto sobre dos aspectos del desarrollo nervioso in vitro: a) desarrollo y sobrevivencia neuronal, y b) desarrollo y diferenciación glial. En lo que respecta al desarrollo neuronal, la decadencia tanto de las neuronas hipotalámicas como de las cerebrales era promovida por el FCS en el medio. Este efecto detrimental fue evidente en la segunda semana de desarrollo in vitro, cuando las neuronas hipotalámicas dispersas disminuían en número, y los agregados de neuronas cerebrales perdían sus extensiones y se encogían. El medio de cultivo (DMEM) libre de suero y con Insulina como único suplemento hormonal pareció ser suficiente para el desarrollo neuronal durante la primer semana in vitro, como ha sido reportado para cultivos de células dispersas cerebrales (Yavin y Yavin, 1980) y microexplantes cerebelares (Grau-Wagemans y cols., 1984). Empero, en nuestras manos, la Insulina por sí sola no permite el crecimiento neuronal por más de una semana.

El segundo aspecto parece estar estrechamente ligado al primero. La diferenciación morfológica dentro de la monocapa basal hipotalámica y cerebral fue inhibida por el FCS. Esta diferenciación no era acompañada de cambios detectables en la población celular

DISCUSION

total, como lo indicaron las curvas de crecimiento, y concuerda con otros sistemas de diferenciación astrogliar in vitro, donde los dramáticos cambios morfológicos y bioquímicos inducidos por el factor de maduración glial (GMF) no van acompañados de diferencias significativas en los niveles totales de DNA de cultivos no tratados (Lim y cols., 1977). Además fue evidente que la ausencia de suero inhibió la proliferación glial en nuestros cultivos. Esta fuerte dependencia de suero es característica de la proliferación de astrogliar inmadura en cultivo, y ha sido reportada en cultivos cerebrales (Yavin y Yavin, 1980) e hipotalámicos (Puymirat y cols., 1982a).

El hecho de que al final del periodo de cultivo la sobrevivencia neuronal y la diferenciación morfológica glial hayan estado asociadas sugiere que esta última de alguna manera es paralela a la producción de los factores neurotróficos en el MC. Esta idea es apoyada por la frecuente observación de grupos de neuronas sobrevivientes entremezcladas con "astrocitos" diferenciados. Sin embargo, la relación causal entre la diferenciación morfológica y la producción de factores neurotróficos no se puede discernir con los resultados presentados hasta aquí. La posibilidad de que el FCS inhibe ambos aspectos del desarrollo nervioso in vitro en forma indirecta e inespecífica (e.g. por la mayor acumulación de ácido láctico en cultivos con más suero en el medio) no puede ser descartada.

4.5 EFECTO DEL SUERO BOVINO FETAL (FCS) SOBRE LA PROLIFERACION GLIAL.

Nuestros datos indican que las células gliales hipotalámicas de E14 y E16 responden en forma distinta al FCS. Se detectó un

DISCUSIÓN

incremento significativo de la meseta en la confluencia de los glioblastos hipotalámicos E16 en función directa con la proporción de FCS en el medio. Esta estimulación mitótica adicional no era detectable en los glioblastos hipotalámicos de E14 o en los cultivos cerebrales. No obstante, la decadencia neuronal en éstos últimos podría estar obstruyendo la detección de algún efecto dentro de la población glial sobreviviente. La independencia relativa de los glioblastos hipotalámicos más jóvenes por el FCS se reflejaba en el alto nivel poblacional al que se llegan en la confluencia. Como se puede observar por los niveles de DNA en la meseta de las curvas de crecimiento, aun con 20% de FCS la de los glioblastos hipotalámicos de E16 (aprox. 9 ug DNA/poza) no alcanza el intervalo ocupado regularmente por la meseta de los glioblastos E14 (10-12 ug DNA/poza). Esta diferencia no es debida a la ausencia de la población neuronal en los cultivos hipotalámicos E16, ya que en este periodo (segunda semana in vitro), la pérdida neuronal era un evento independiente de la edad original del tejido, y aún en los cultivos con una relación inicial de neurona/glia alta, el DNA neuronal no representaría más del 10% del DNA total al llegar el cultivo a la confluencia.

La inhibición de la proliferación astrogliar en ausencia de FCS ya ha sido mencionada. Es posible entonces, que las células más jóvenes tengan una sensibilidad mayor por los factores mitogénicos en el FCS que las células del tejido más maduro, y que por la tanto, la activación del proceso proliferativo ya estaba saturada en los glioblastos de E14, aun con 5% de FCS en el medio. La aplicación de HC homólogo sobre las células hipotalámicas de las dos edades fetales fué la que produjo resultados más sobresalientes. En las células

DISCUSION

hipotalámicas de E14 inhibió en un 33% el crecimiento glial a los 12 días in vitro, y en las células hipotalámicas de E16 indujo la diferenciación morfológica de la glía presente, sin tener un efecto significativo sobre la cantidad de células totales a los 12 DIV.

4.6 GLIOBLASTOS ONTOGENETICAMENTE DISTINTOS Y SU COMPORTAMIENTO IN VITRO.

La capacidad del MC de inhibir la actividad mitótica de los glioblastos hipotalámicos jóvenes (los cuales mostraban una gran capacidad proliferativa in vitro), y de inducir diferenciación morfológica en los glioblastos más maduros (que a su vez tenían una capacidad proliferativa más restringida y una predisposición más marcada a diferenciarse), sugiere que, bajo nuestras condiciones de cultivo, las células gliales hipotalámicas retienen las características ontogenéticas del tejido original. Es decir, que en el tejido de E14, poco después de la última división neuronal en el hipotálamo, la gliogénesis se desarrollaría a partir de una zona ventricular (o zona ependimal) mitóticamente activa, formada por células progenitoras astrogliales (astroblastos). Estas darían origen a las células precursoras astrogliales con capacidad proliferativa más restringida y determinadas como astrocitos inmaduros, que a su vez abandonarían la zona matriz para integrarse a la zona del manto y diferenciarse en astrocitos dentro de los núcleos hipotalámicos en proceso de maduración. El tejido de E16 representaría así una de las etapas más avanzadas en el desarrollo del hipotálamo prenatal. Esta propiedad de los cultivos astrogliales de reflejar el grado de desarrollo ontogenético en el tejido del que son originarios ya ha sido reportada en cultivos de neocorteza (Fedoroff, 1980). Resultaría

DISCUSION

muy interesante seguir el desarrollo de la subcultivación de cultivos primarios del hipotálamo E14, para determinar si adquieren las características de los cultivos primarios del hipotálamo E16.

4.7 NEUROPEPTIDOS HIPOTALAMICOS: HORMONA LIBERADORA DE HORMONA TIROTROFICA (TRH).

Los valores de TRH detectados por RadioInmunoEnsayo (RIE) en estructuras fetales y neonatales de ratón (Tabla III) no difieren significativamente de lo reportado en la literatura (Faivre-Bauman y cols., 1978). La especificidad del antisuero utilizado en nuestros ensayos ya ha sido demostrada anteriormente (Joseph-Bravo y cols., 1979). No obstante, los niveles de TRH detectables en nuestros cultivos hipotalámicos son mayores que lo reportado en cultivos hipotalámicos crecidos bajo condiciones equiparables (Faivre-Bauman y cols., 1980), donde disminuyen los valores de TRH de 20 pg por hipotálamo in vivo, a 10 pg por equivalente celular de hipotálamo después de 10 días in vitro. Considerando que las células viables recuperadas de una estructura determinada representan tan solo una fracción de la población total de células en dicha estructura in vivo (en especial con respecto a la población neuronal), es muy notable que obtuvieramos valores mayores de 100 pg de TRH en algunos de nuestros cultivos. La identidad de este material radioinmunoensayable como TRH ha sido confirmada caracterizando el extracto celular del cultivo por HPLC, coincidiendo satisfactoriamente el perfil cromatográfico de $[^3H]TRH$ con el perfil del material inmunodetectable (Joseph-Bravo y cols., 1984). Sin embargo, hasta ahora no nos ha sido posible dilucidar los procesos que permiten la expresión del tripeptido por las células en cultivo, ya que la alta variabilidad

DISCUSION

observada en los niveles de TRH intracelular en cultivos hipotalámicos persiste bajo todas las condiciones de crecimiento empleadas.

Varios factores actúan al tratar de rescatar una subpoblación neuronal particular con una serie de características propias de un tejido diferenciado y funcional (e.g. adulto), si se parte de una mezcla de poblaciones provenientes de un tejido inmaduro, tanto histológica como funcionalmente. Como se mencionó en la Introducción, las distintas poblaciones celulares del tejido nervioso tienen susceptibilidades y respuestas particulares al reto del cultivo in vitro. Bajo ciertas condiciones es posible seleccionar el tipo celular de interés. Sin embargo, la población neuronal es también un conjunto de subpoblaciones, cuyas características de funcionalidad nerviosa (tales como la selección del neurotransmisor eferente, y la receptividad a un transmisor aferente) dependerán de parámetros tales como el grado de diferenciación alcanzado previo al pasaje in vitro, su localización en un tejido en desarrollo (con desplazamientos continuos e interacciones celulares dinámicas), la proporción final obtenida in vitro de las subpoblaciones neuronales sobrevivientes, y el microambiente bajo el cual se logren desarrollar. Por lo tanto, es pertinente una reevaluación profunda de las posibles variables importantes en el crecimiento neuronal in vitro, así como del propio material tisular usado como fuente de neuronas peptidérgicas, si se considera al cultivo celular como una opción atractiva para la elaboración de un modelo in vitro de la neurosecreción hipotalámica.

5. CONCLUSION.

Está claro que no se ha llegado aun a las condiciones óptimas para la expresión reproducible y en niveles adecuados de TRH en cultivo celular. Esta incapacidad de sostener la diferenciación y funcionalidad de las neuronas hipotalámicas in vitro nos inclinó a considerar otros aspectos celulares de posible relevancia en el proceso. Actualmente, la interacción trófica de la astroglia con neuronas centrales está siendo estudiada, y su importancia en el desarrollo del CNS va adquiriendo más peso. Nuestros resultados indican que es posible obtener poblaciones presumiblemente astrogliales con comportamientos in vitro distintos, en función de su edad ontogenética. Sera posible estudiar la importancia de la interacción neurona-glia a distintas etapas de diferenciación glial. La capacidad del medio condicionado homólogo de promover la diferenciación morfológica glial y la sobrevivencia neuronal resultan alentadores en la aplicación del cultivo in vitro para la solución de preguntas sobre los mecanismos de la función nerviosa central.

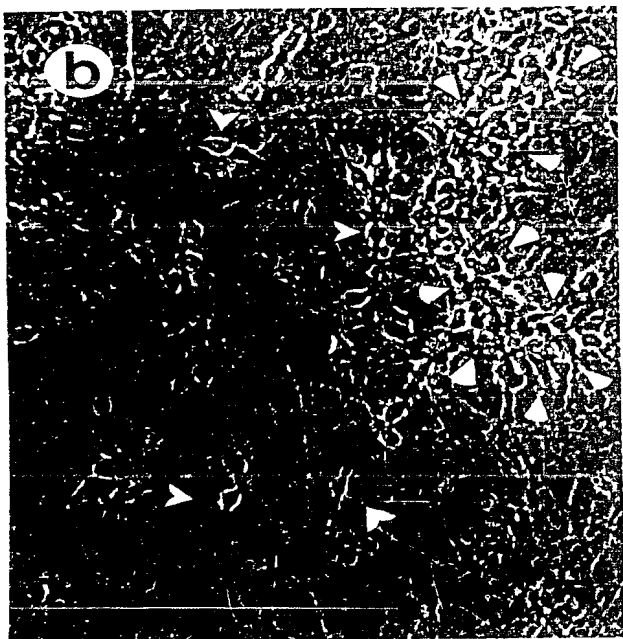
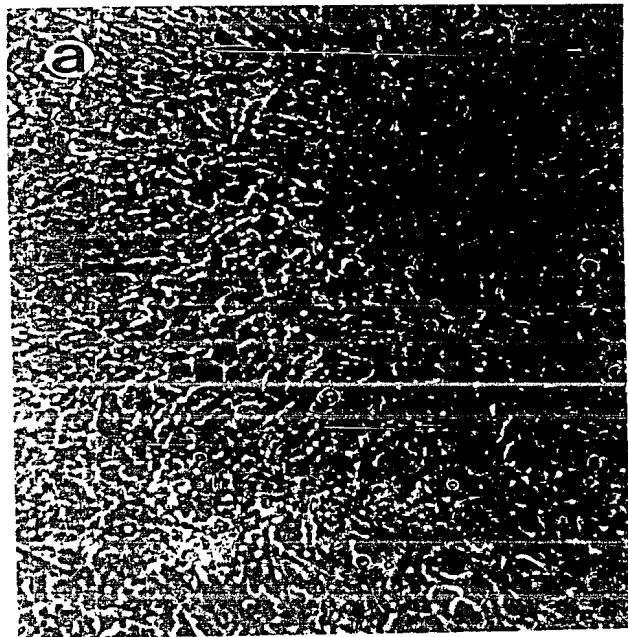
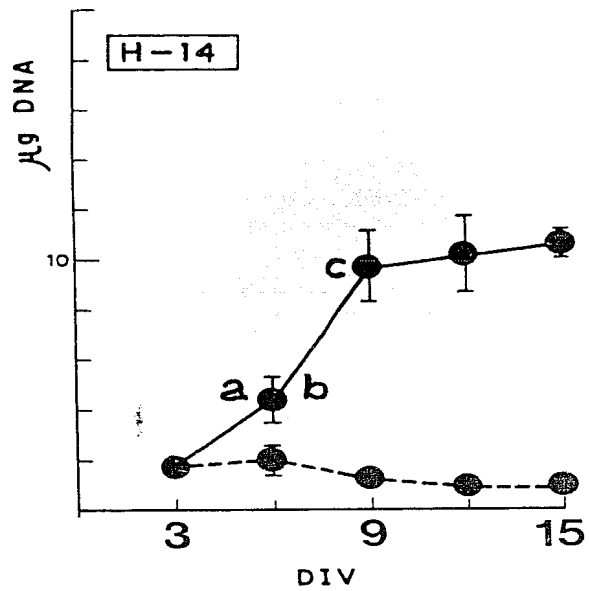


Figura 1.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a alta densidad (1.5×10^{-5} cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. En la curva de crecimiento se señala el día in vitro (DIV) en que fueron tomadas las fotografías. Las curvas representan cultivos sin tratar (línea continua) y tratados con Cit-Ára al 5 DIV (línea punteada).

En "a" se muestran a las células basales formando una monocapa. En "b" se señalan las células de apariencia neuronal, individualmente (cabezas de flecha) o formando agregados (puntas). En "c" se señalan algunas neuronas (flechas) sobre una monocapa confluyente de células basales.

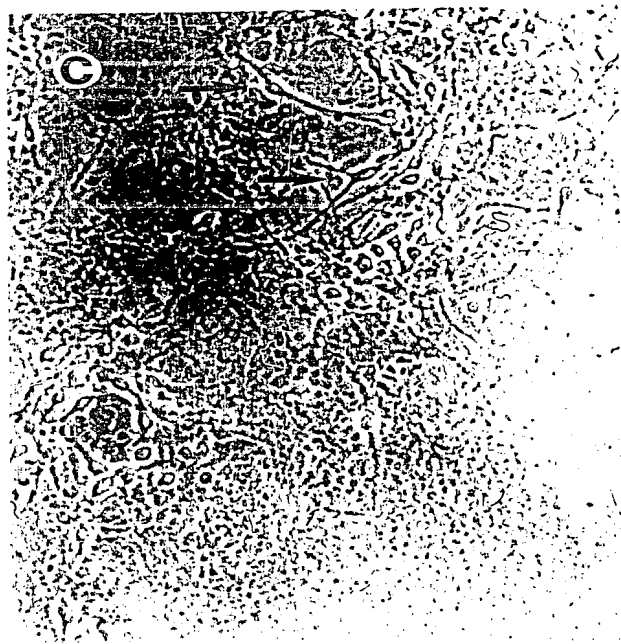
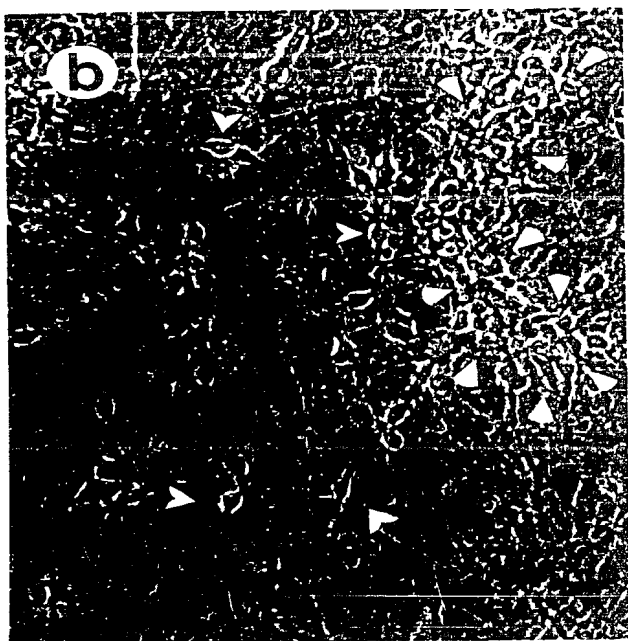
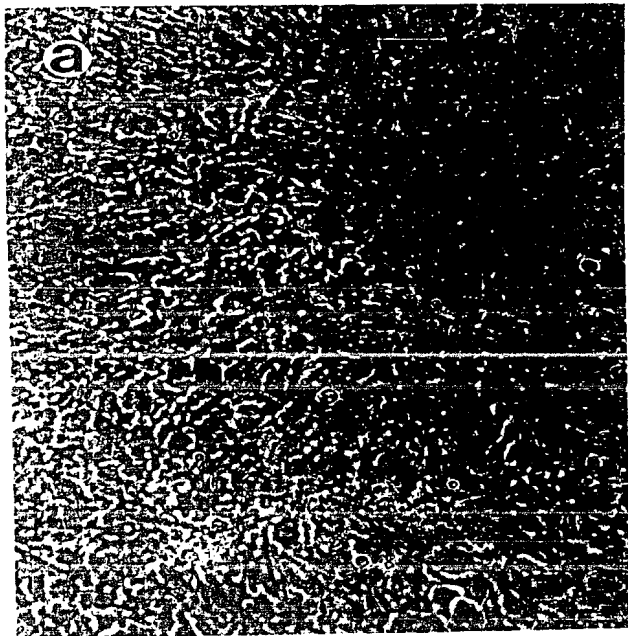
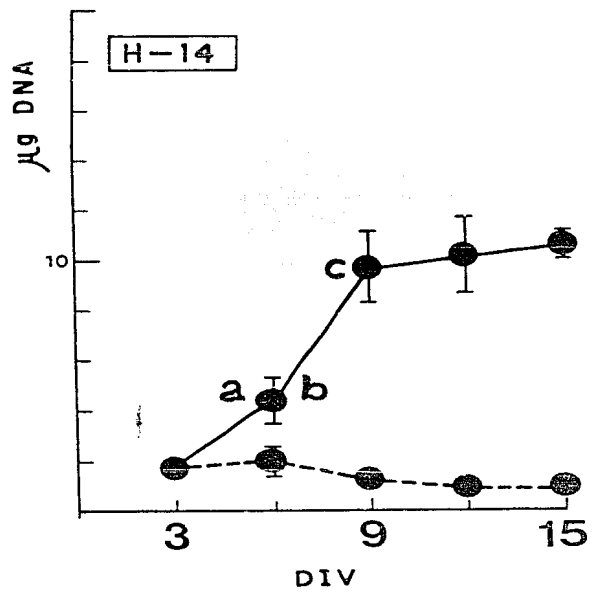


Figura 2.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a alta densidad (10-5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo, y tratadas con Cit-Ara al 5 DIV. Observaciones a contraste de fases (250x a,b y c; 160x d) de células vivas. Fotografías tomadas al 14 DIV.

Las flechas grandes señalan los cuerpos de células con apariencia neuronal. Los pares de flechas chicas señalan sus procesos celulares. En "a" se muestran algunas células con procesos bipolares primarios y múltiples ramificaciones secundarias. En "b" se muestran varias células bipolares. En "c" se muestra una célula de apariencia neurosecretora, con un cuerpo celular mayor al de las bipolares y un proceso primario principal. En "d" se señalan algunas colonias de células epitelioides granulares (puntas).

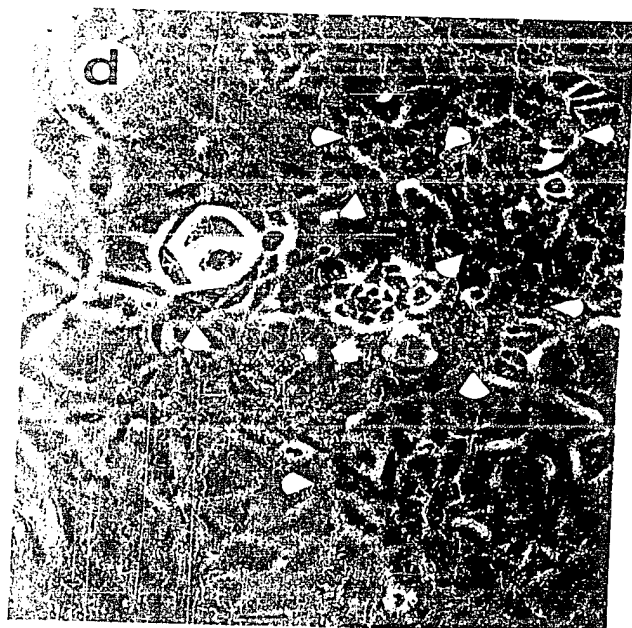
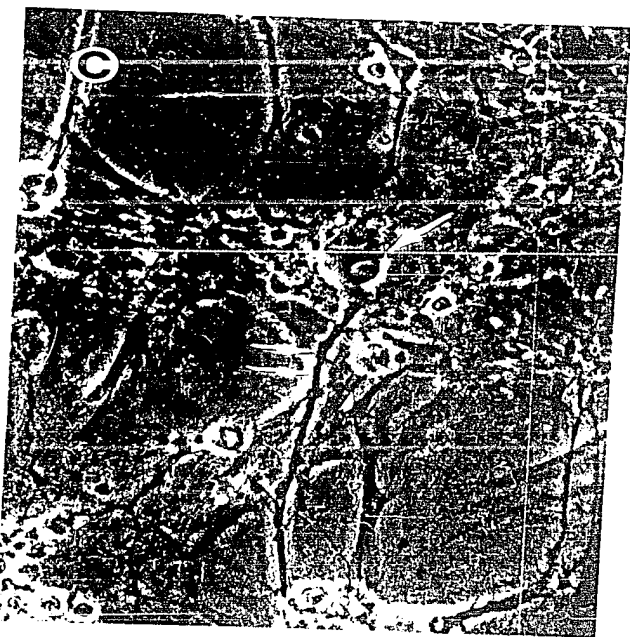
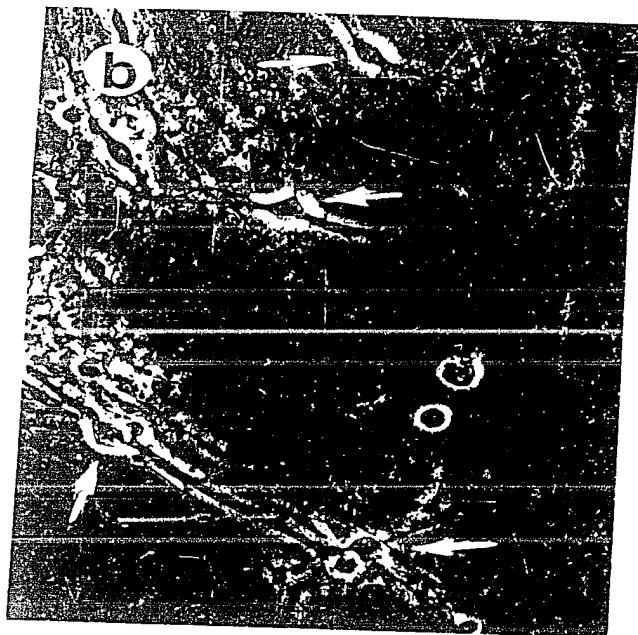
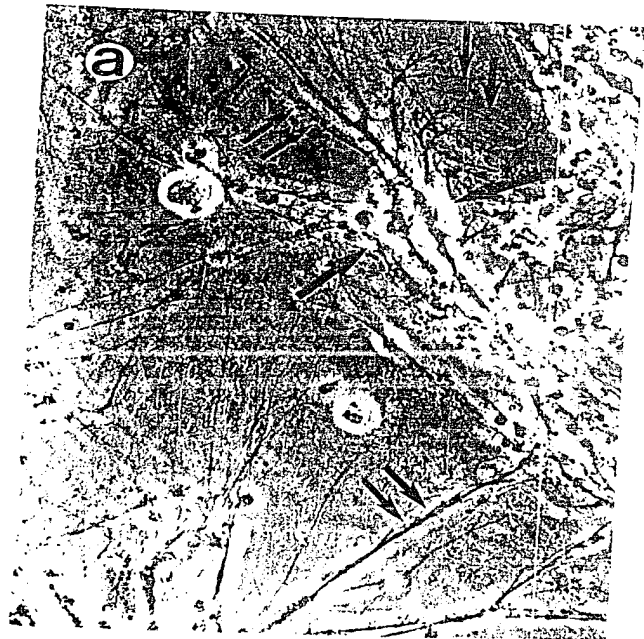


Figura 3.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a alta densidad (10⁻⁵ cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo, y tratadas con Cit-Ara al 5 DIV. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. Fotografías tomadas al 14 DIV.

Tres campos continuos mostrando a una célula de apariencia neuronal (flecha grande) extendiendo una neurita (par de flechas chicas) sobre la superficie libre de células basales, hasta hacer contacto con otra célula neuronal.

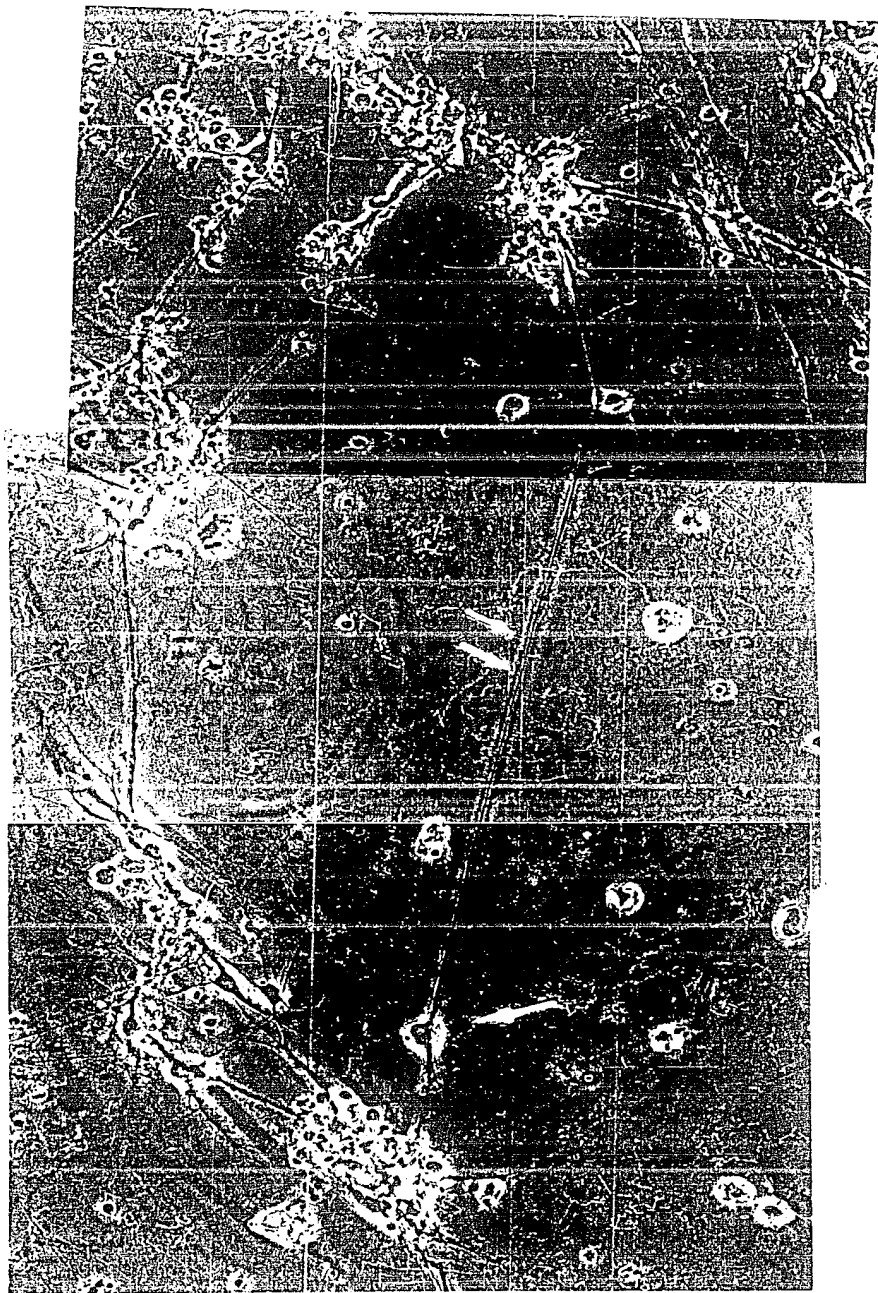


Figura 4.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a alta densidad (10^5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. Fotografías tomadas al 14 DIV de cultivos no tratados con Cit-Ara (marcado sobre la curva de crecimiento por la flecha). Las curvas representan cultivos sin tratar (línea continua) y tratados con Cit-Ara al 5 DIV (línea punteada).

En "a" se muestran los agregados de células con apariencia neuronal pero sin procesos celulares aparentes. En "b" y "c" se muestran algunos grupos de células sobrevivientes con apariencia neuronal y sus procesos principalmente bipolares, creciendo sobre una "monocapa" basal engrosada.

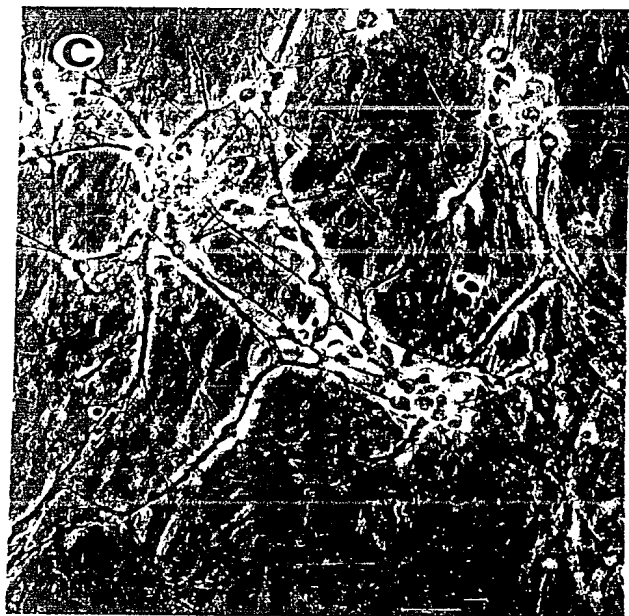
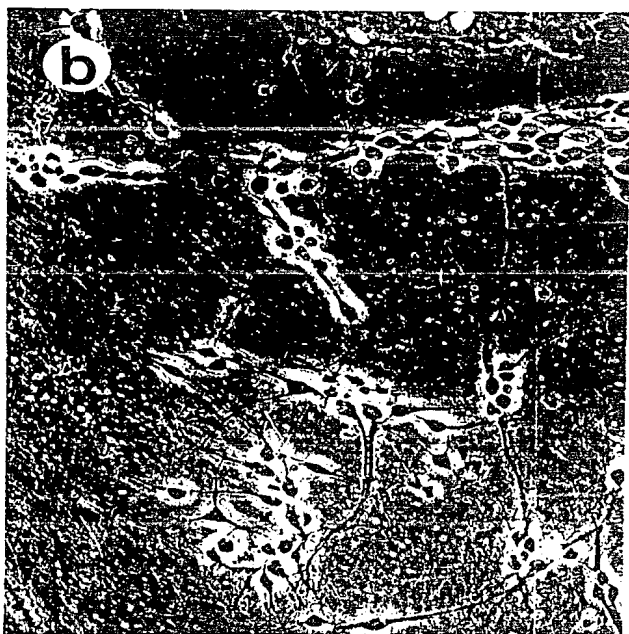
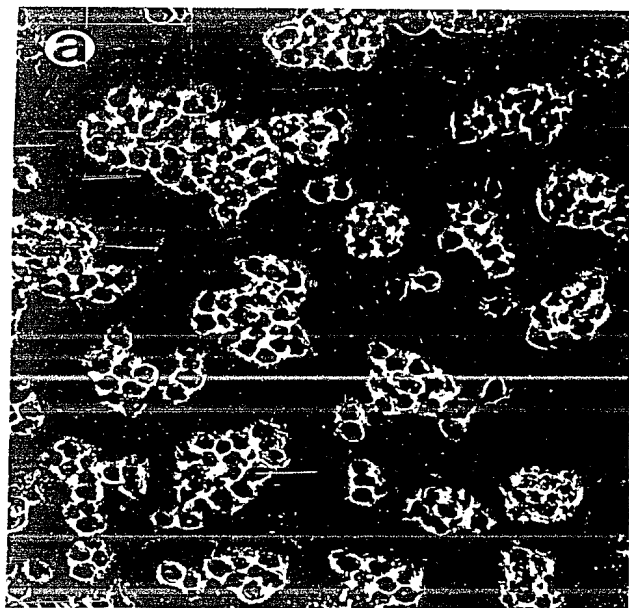
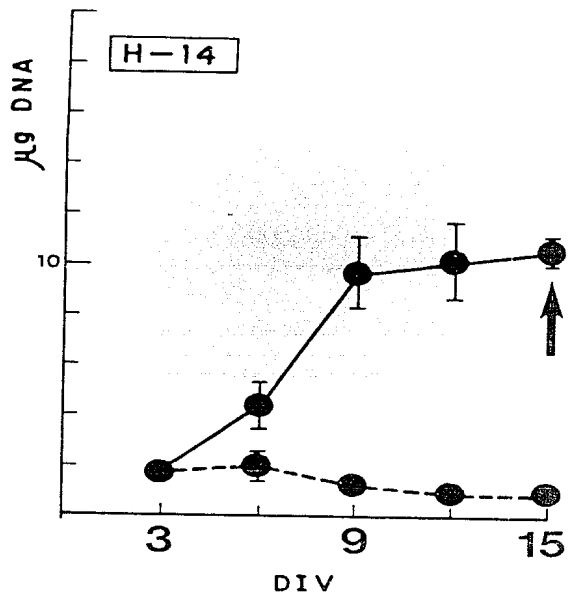


Figura 5.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a alta densidad (10-5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (250x a,b y c; 160x d) de células vivas. Fotografías tomadas al 14-15 DIV.

En "a" y "b" se señalan los cuerpos de células con apariencia neuronal (flechas) dentro de una "monocapa" muy engrosada. Las dos fotos representan el mismo campo pero enfocado en dos planos: superficialmente (a) o del interior (b) de la "monocapa". En "c" se muestra una célula de apariencia neurosecretora en el interior de la "monocapa". En "d" se muestra a la "monocapa" con células de apariencia neuronal (flechas) y astrocítica (puntas de flecha). Las primeras tienen un halo luminoso más intenso y son de mayor diámetro celular que las segundas.

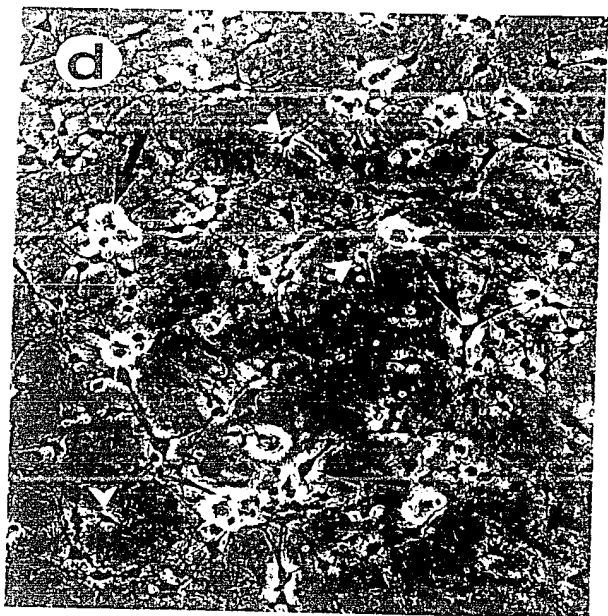
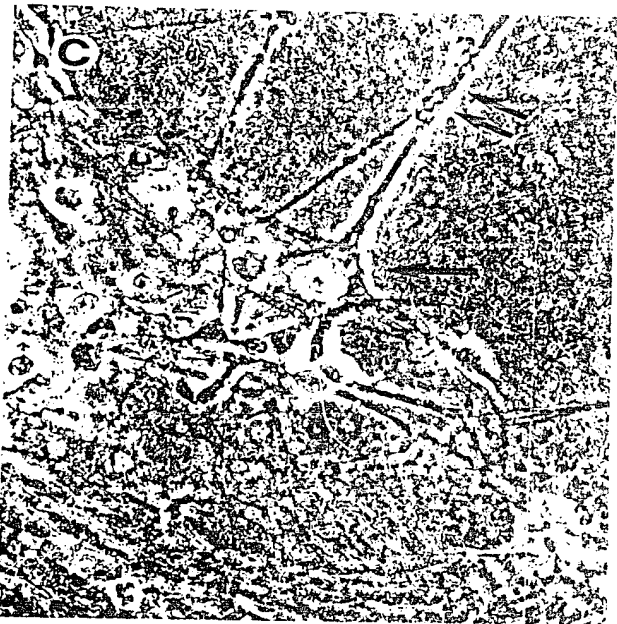
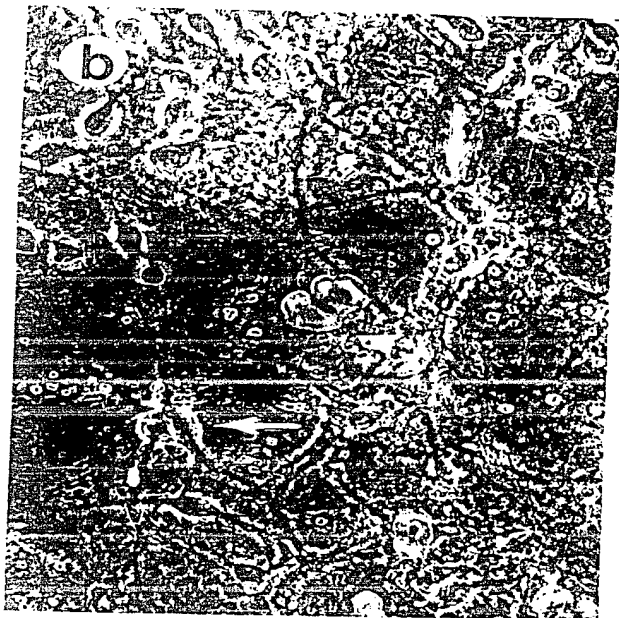
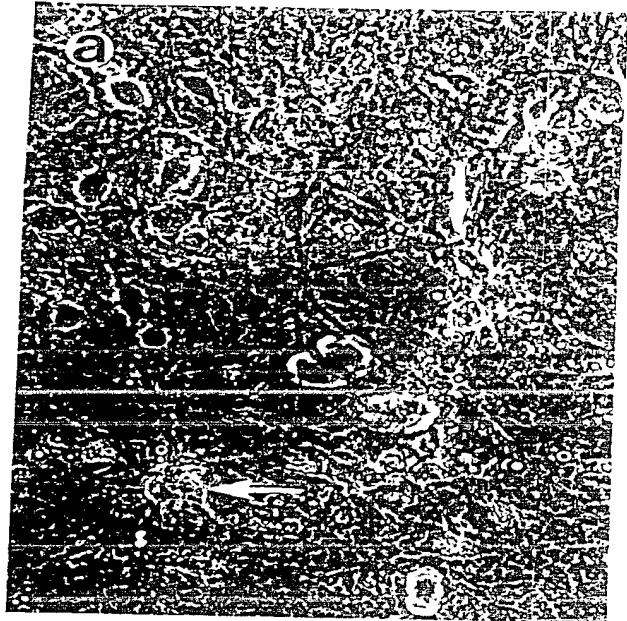


Figura 6.- Células de lóbulos frontales de E14 (a y c) y E16 (b) sembradas a alta densidad (1.5×10^5 cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. Fotografías tomadas al 6-9 DIV (a y c) o al 15 DIV (b). Las curvas representan cultivos sin tratar (línea continua) y tratados con Cit-Ara al 5 DIV (línea punteada).

En "a" se señalan unos racimos de células neuronales (flechas grandes) interconectados por un fascículo de procesos celulares (par de flechas chicas). En "c" se muestran varias células basales de apariencia fibroblastoide (mitad superior del campo) o epitelioides (mitad inferior). En "b" se muestra una monocapa muy desarrollada de células basales con varias células de apariencia astrocítica, las cuales se señalan en el recuadro (puntas de flecha) a mayor aumento (250x).

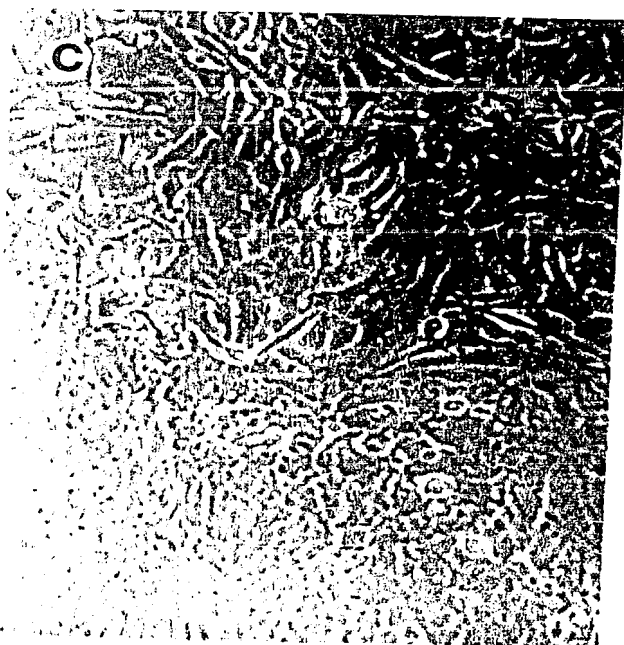
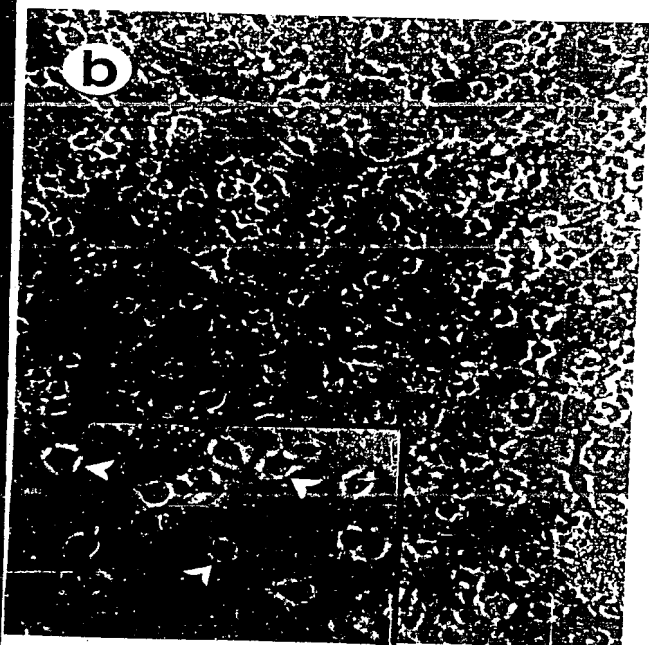
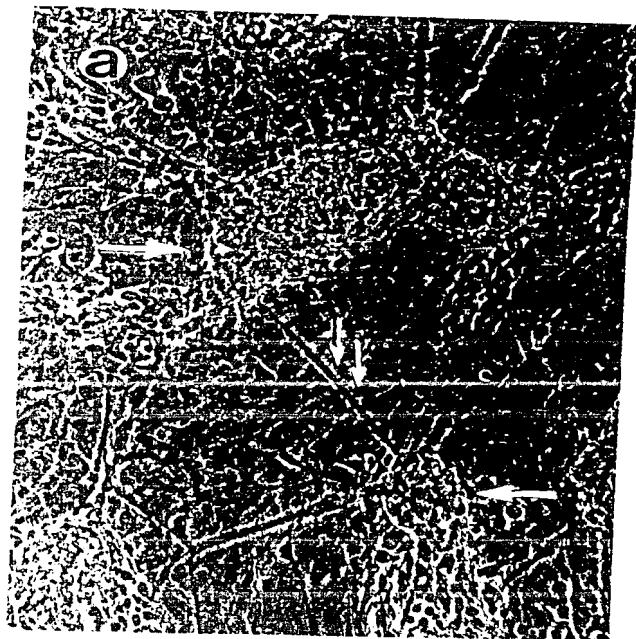
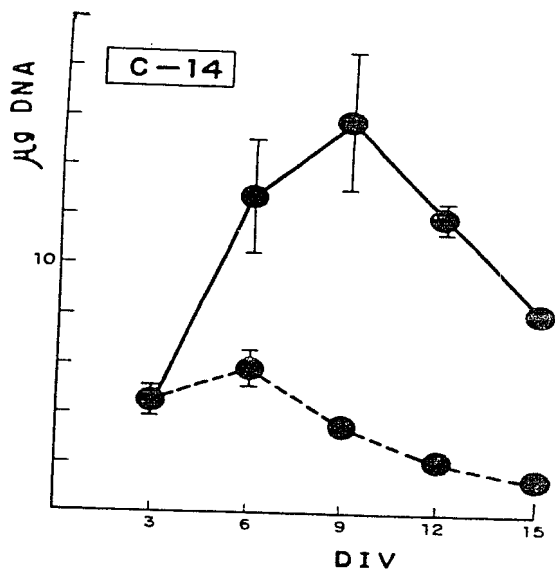


Figura 7 y 8.- Celulas hipotalámicas de E14 sembradas a Muy Alta Densidad (a), Alta Densidad (b) o Baja Densidad (c) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. En las curvas de crecimiento se señala el día in vitro (DIV) en que fueron tomadas la fotografías. Las curvas representan cultivos sembrados a 4×10^{-5} cel/cm² (círculos llenos), 1.5×10^{-5} cel/cm² (círculos semivacios) o 5×10^{-4} cel/cm² (círculos vacíos).

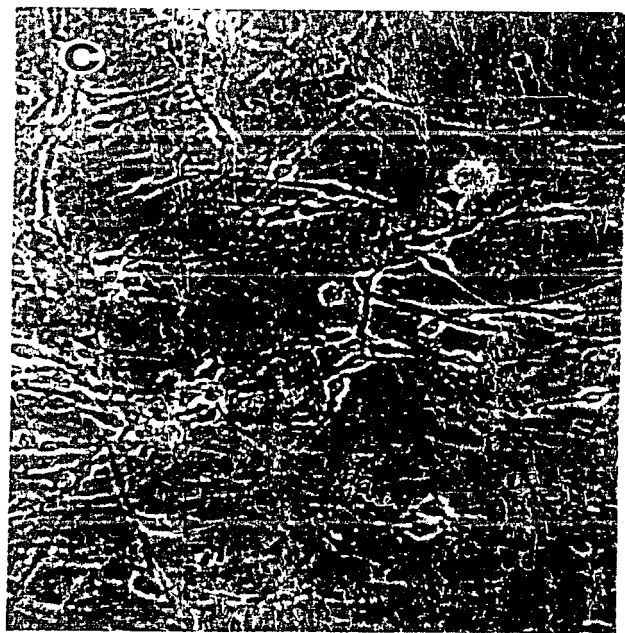
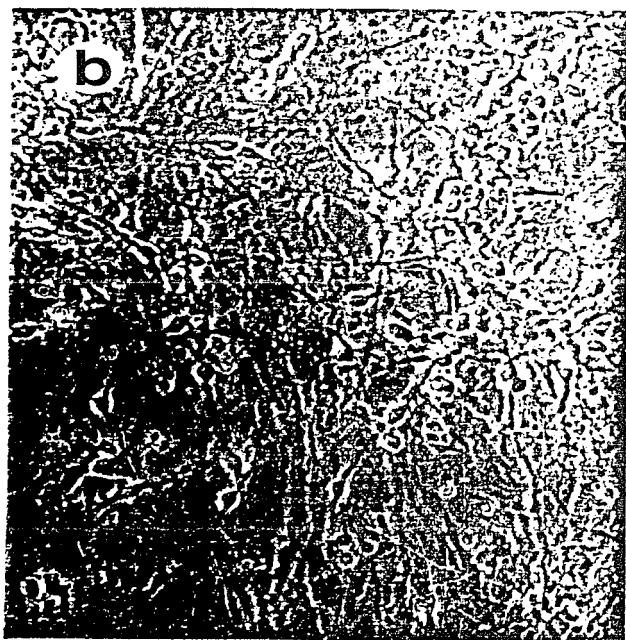
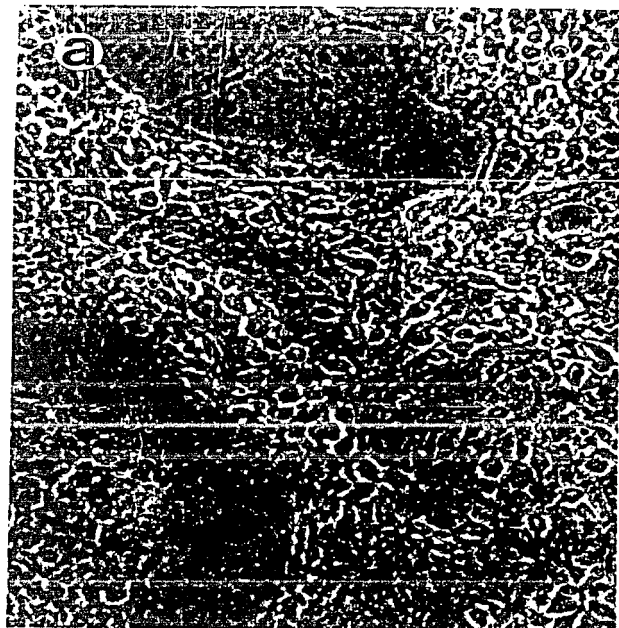
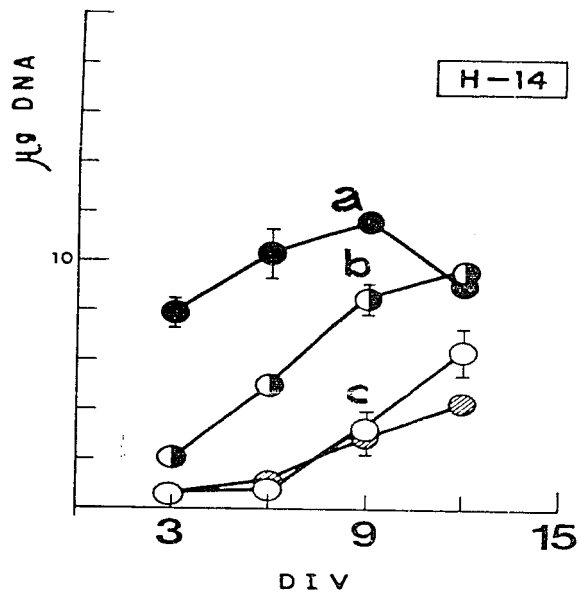


Figura 7 y 8.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a Muy Alta Densidad (a), Alta Densidad (b) o Baja Densidad (c) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. En las curvas de crecimiento se señala el día in vitro (DIV) en que fueron tomadas la fotografías. Las curvas representan cultivos sembrados a 4×10^{-5} cel/cm² (círculos llenos), 1.5×10^{-5} cel/cm² (círculos semivacios) o 5×10^{-4} cel/cm² (círculos vacíos).

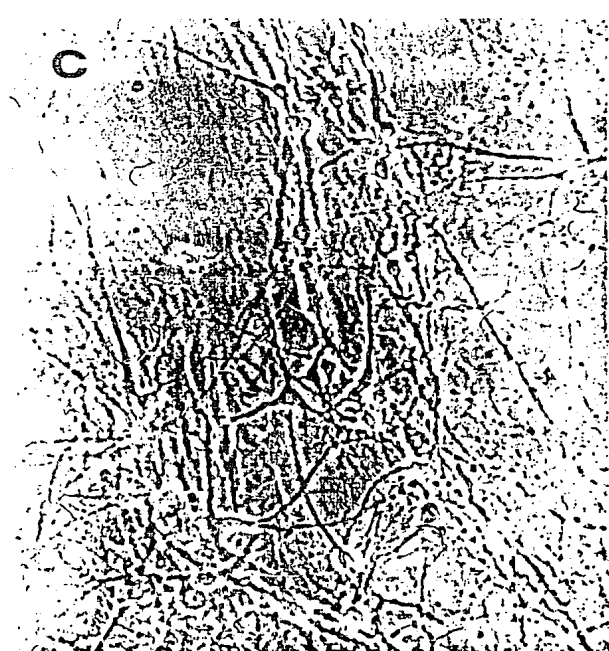
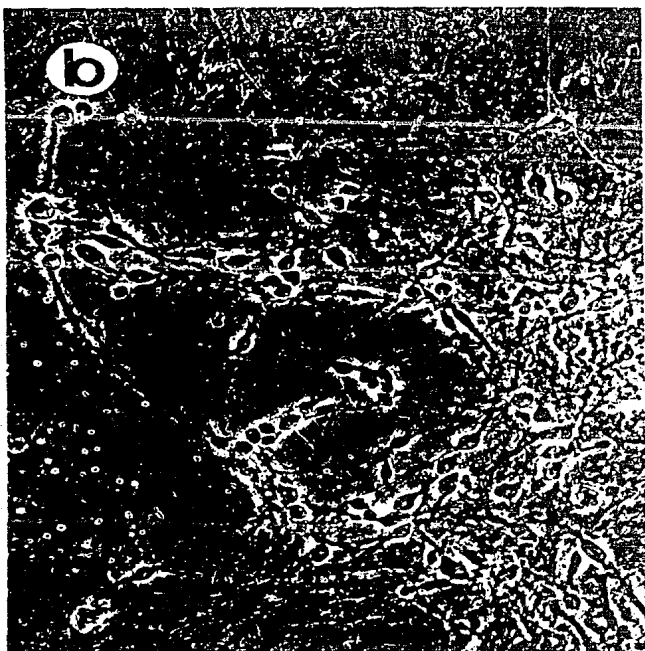
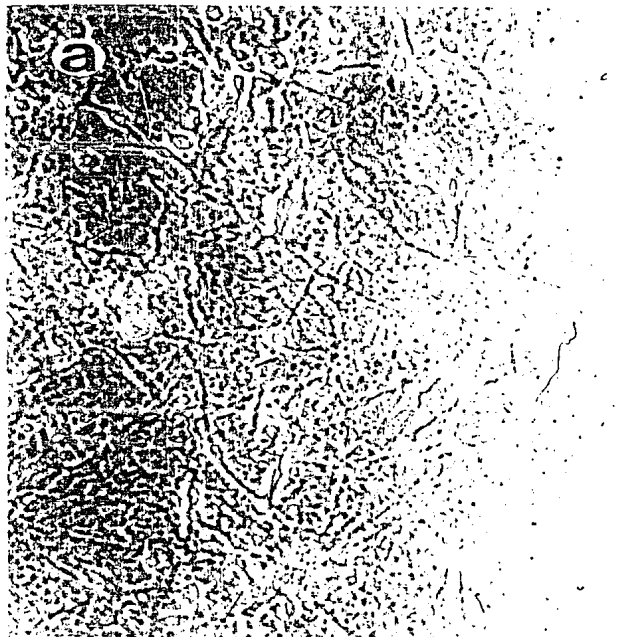
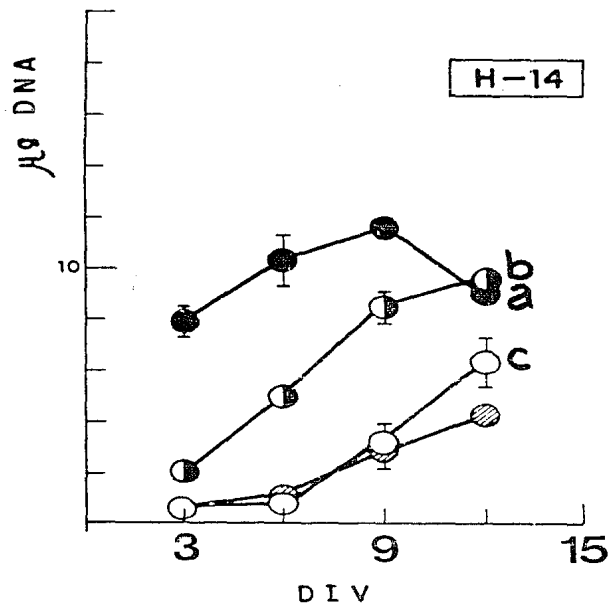


Figura 9.- Células de lóbulos frontales de E14 sembradas a Muy Alta Densidad (a), Alta Densidad (b) o Baja Densidad (c) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. En las curvas de crecimiento se señala el día in vitro (DIV) en que fueron tomadas la fotografías. Las curvas representan cultivos sembrados a 4×10^{-5} cel/cm² (círculos llenos), 1.5×10^{-5} cel/cm² (círculos semivacios) o 5×10^{-4} cel/cm² (círculos vacíos).

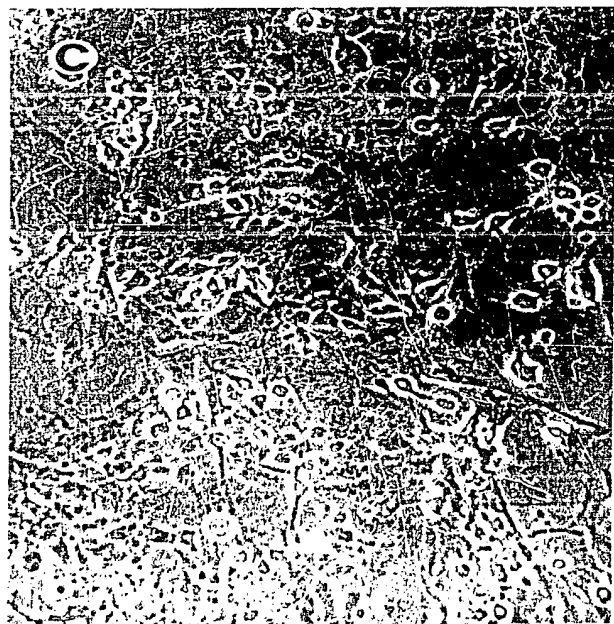
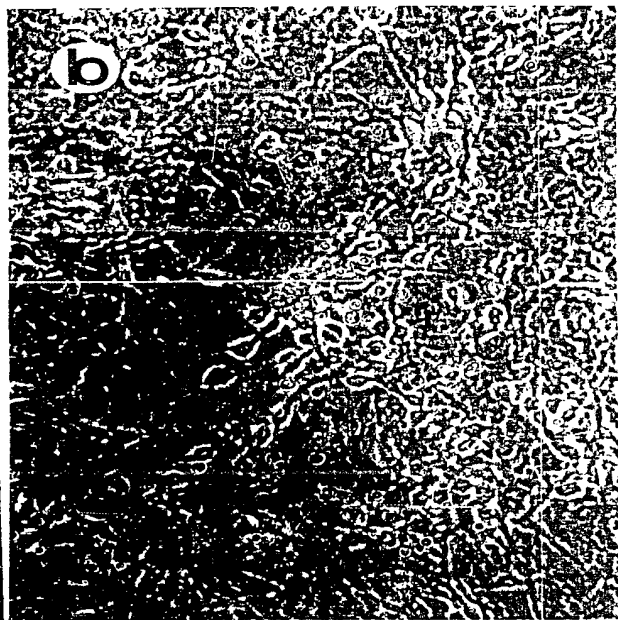
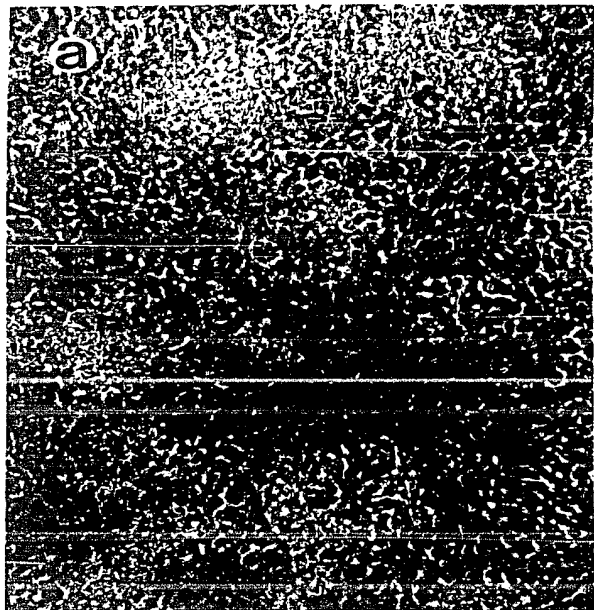
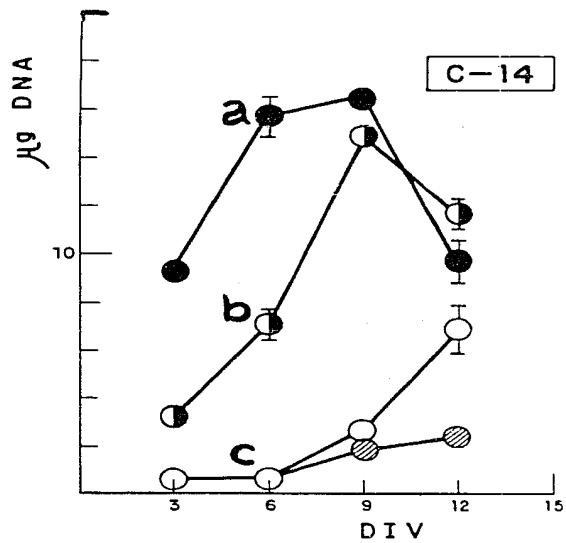


Figura 10.- Células hipotalámicas de E14 sembradas a Baja Densidad (5×10^{-4} cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. Fotografías tomadas al 9 DIV. Se incluyó 1/2 volumen de medio condicionado homólogo a partir del 3 DIV en "c" y "d".

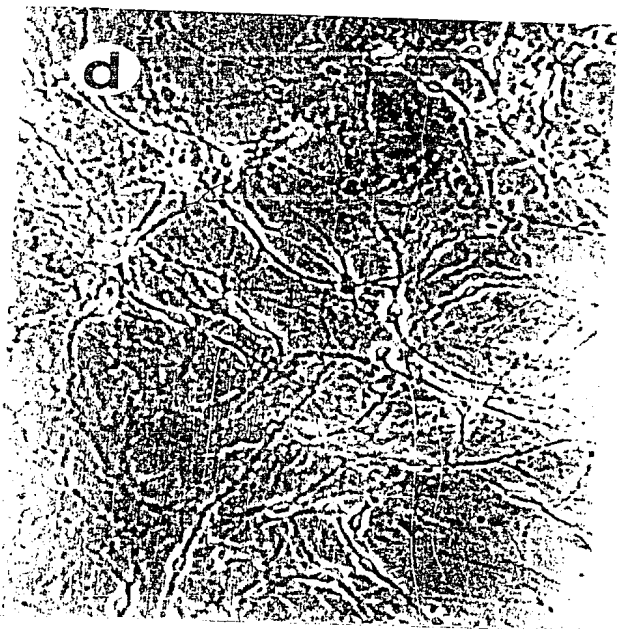
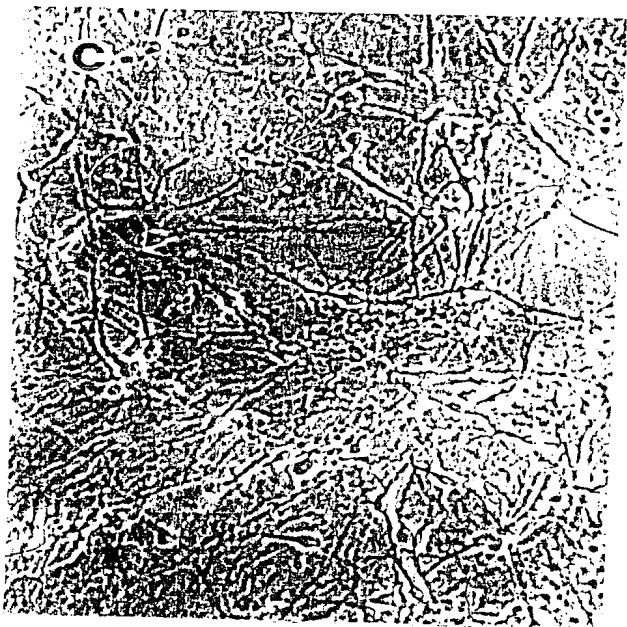
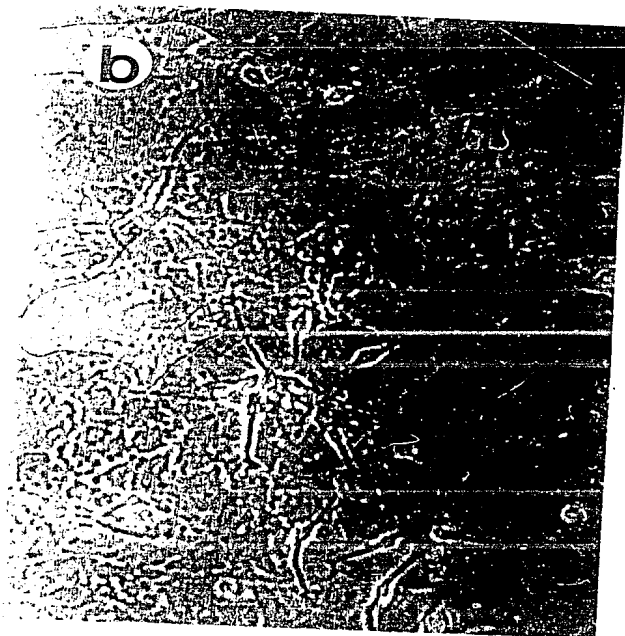
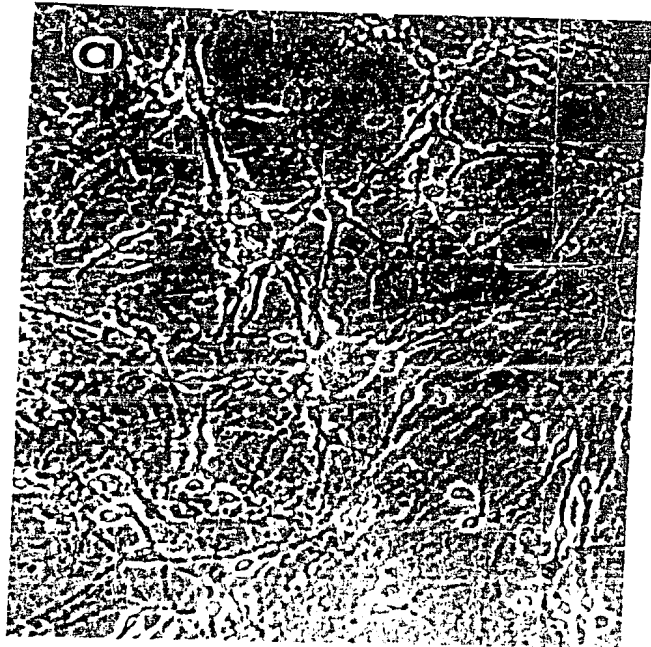


Figura 11.- Células hipotalámicas de E14 (a y c) y E16 (b y d), sembradas a Baja Densidad (5×10^{-4} cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x) de células vivas. Fotografías tomadas al 12 DIV. Se incluyó 1/2 volumen de medio condicionado homólogo a partir del 3 DIV en "c" y "d".

El medio condicionado no pareció afectar el número de células con apariencia neuronal de E14, aunque aparentemente aumentó la extensión y grosor de sus procesos celulares (a vs. c). El medio condicionado indujo un cambio morfológico en las células basales de E16 (b vs. d), aumentando el número de células con apariencia astrocítica.

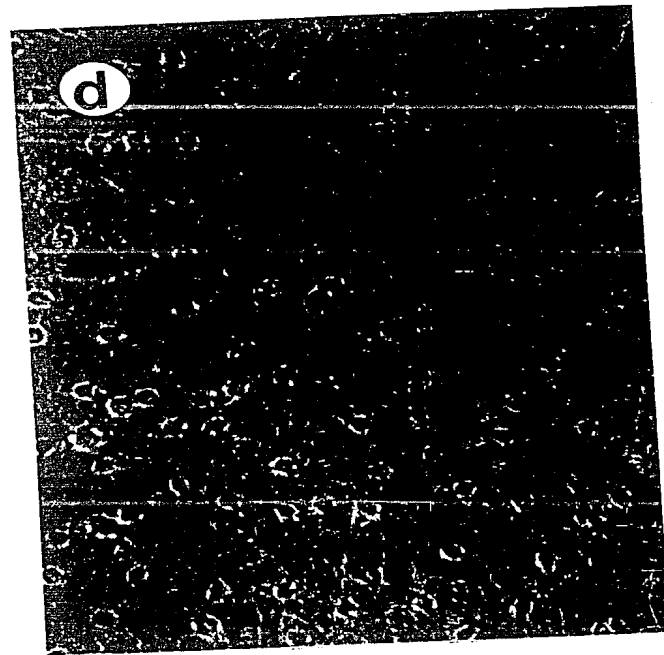
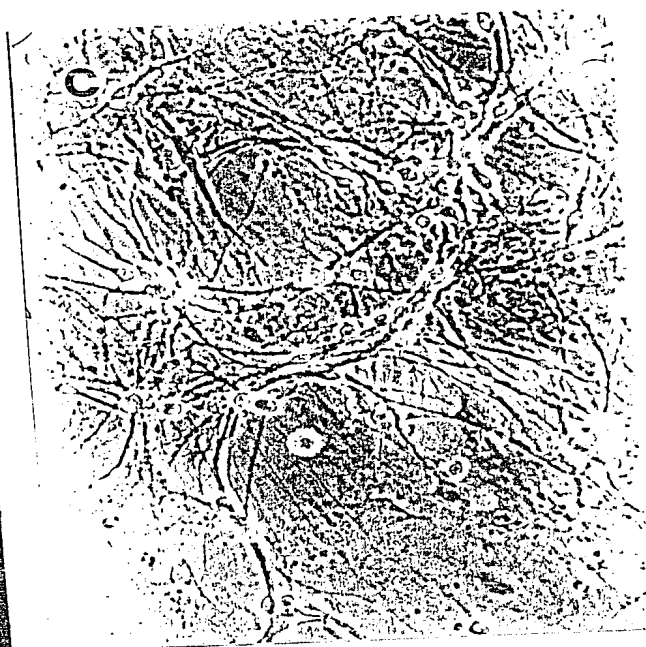
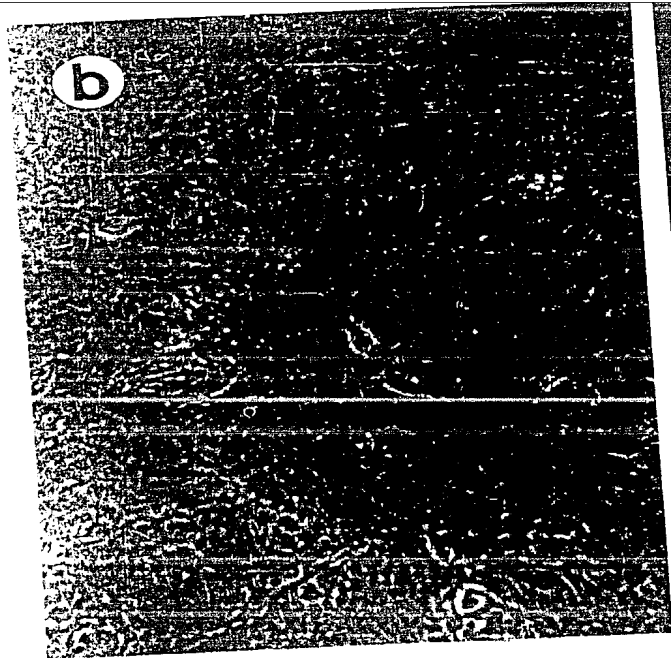
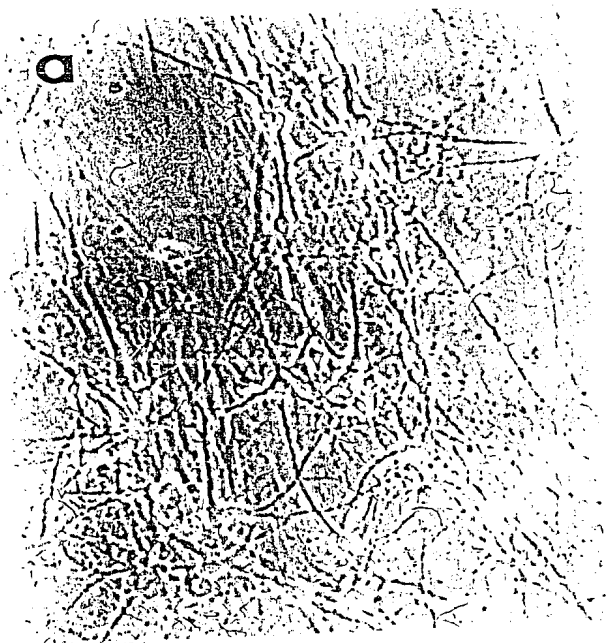


Figura 12.- Células de lóbulos frontales de E14 (a y b) y E16 (c,d,e y f). sembradas a Baja Densidad (5×10^{-4} cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (160x a,b y c; 250x d,e y f) de células vivas. Fotografías tomadas al 9 DIV (a y b) y al 12 DIV (c,d,e y f). Se incluyó 1/2 volumen de medio condicionado homólogo a partir del 3 DIV en "b", "c", "d", "e" y "f".

El medio condicionado indujo un cambio morfológico en las células basales y limitó la extensión de la monocapa (a vs. b); además, parece promover la sobrevivencia y desarrollo de las células de apariencia neuronal (c). En "d", "e" y "f" se muestra la diversidad morfológica de estas células crecidas en medio condicionado: células individuales con apariencia neuronal (flechas grandes) y células basales con apariencia astrocítica (puntas de flecha).

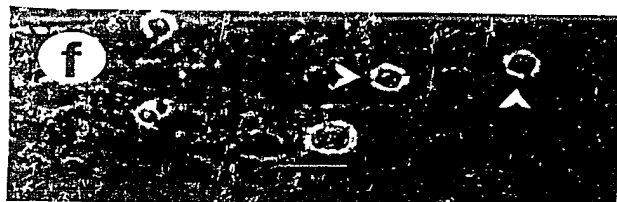
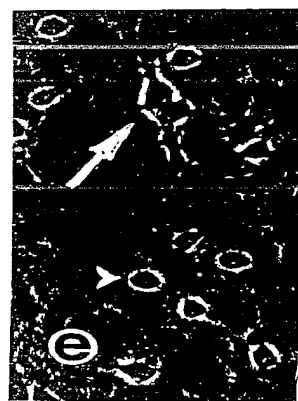
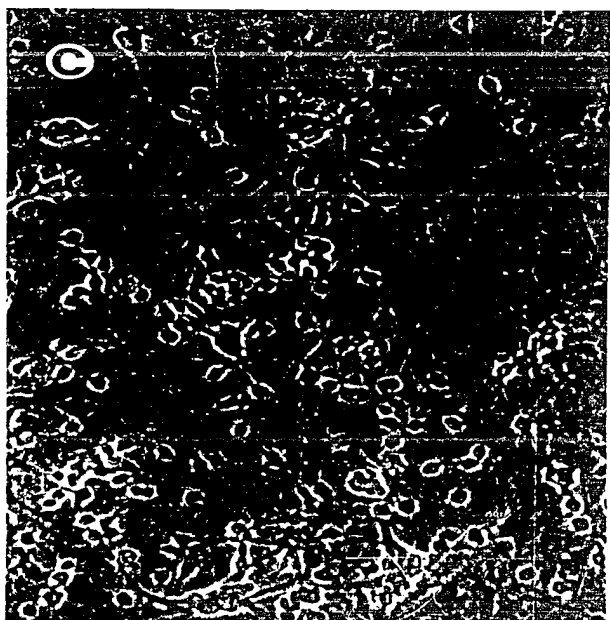
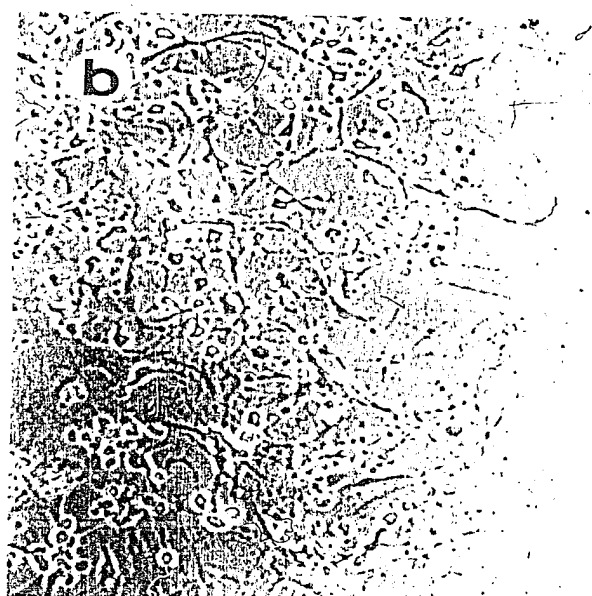
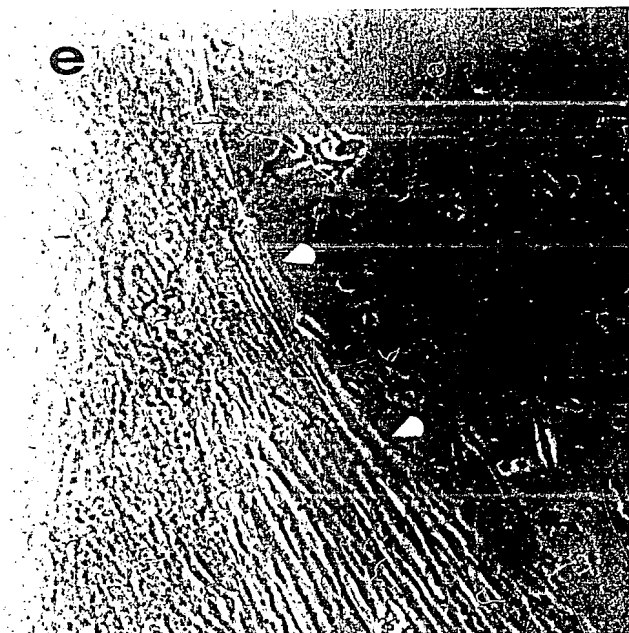
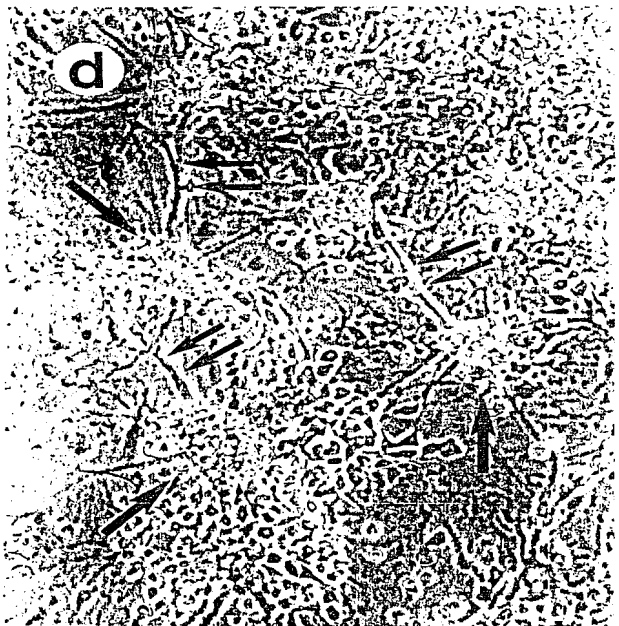
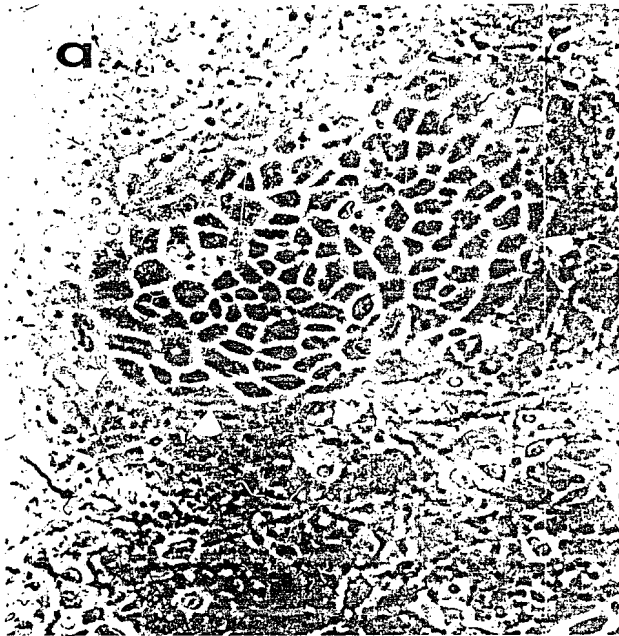


Figura 13.- Células hipotalámicas de E14 (a) y E16 (b y c) y células de lóbulos frontales de E14 (d) y E16 (e), sembradas a alta densidad (10-5 cel/cm²) en pozas de cultivo. Observaciones a contraste de fases (250x a, b y c; 160x d y e) de células vivas. Fotografías tomadas al 6-12 DIV.

Las células hipotalámicas fueron crecidas en DMEM-FCS 5% (a, b y c). En "a" se muestra una colonia de células epitelioides granulares (puntas). En "b" y "c" se señalan varias células de apariencia astrocítica (puntas de flecha).

Las células cerebrales fueron crecidas en DMEM sin suero (d) o con DMEM-FCS 20% (e). En "d" se señalan algunos racimos de células neuronales (flechas grandes) de donde se extienden múltiples procesos (pares de flechas chicas). En "e" se muestra un haz fibroso de células basales despegándose de la superficie del plato (puntas).



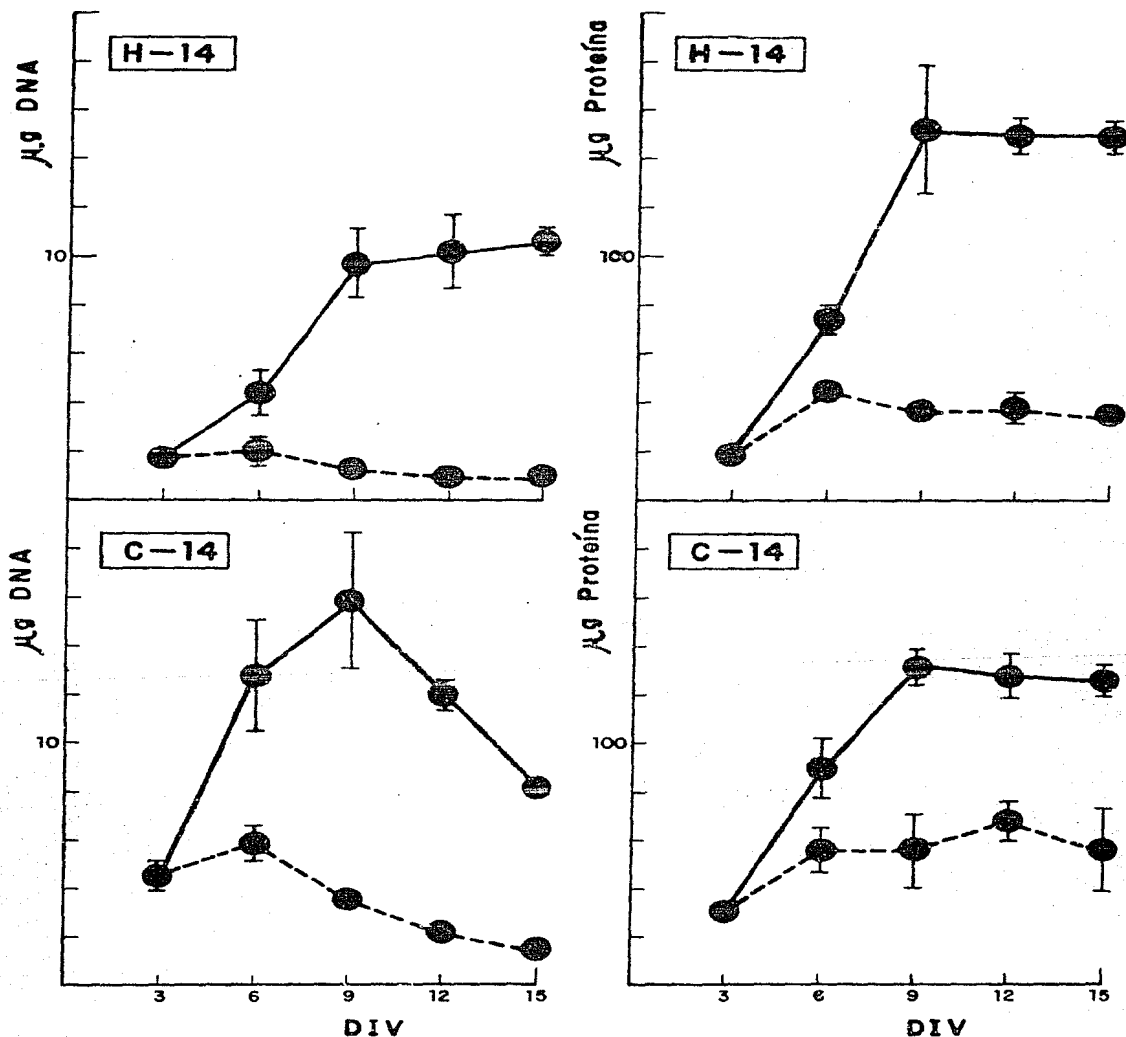


Figura 14.- Cultivos hipotalámicos (H-14) o de lóbulos frontales (C-14) de 14 días de gestación. Se sembraron a alta densidad (10-5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Se crecieron en DNEM-FCS, del cual fue renovado medio volumen cada tres días in vitro (DIV). Línea continua: cultivos a los cuales se les añadió una dosis de Citosin-Arabinósido 10µM al 5 DIV. Los puntos representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio +/- SEM.

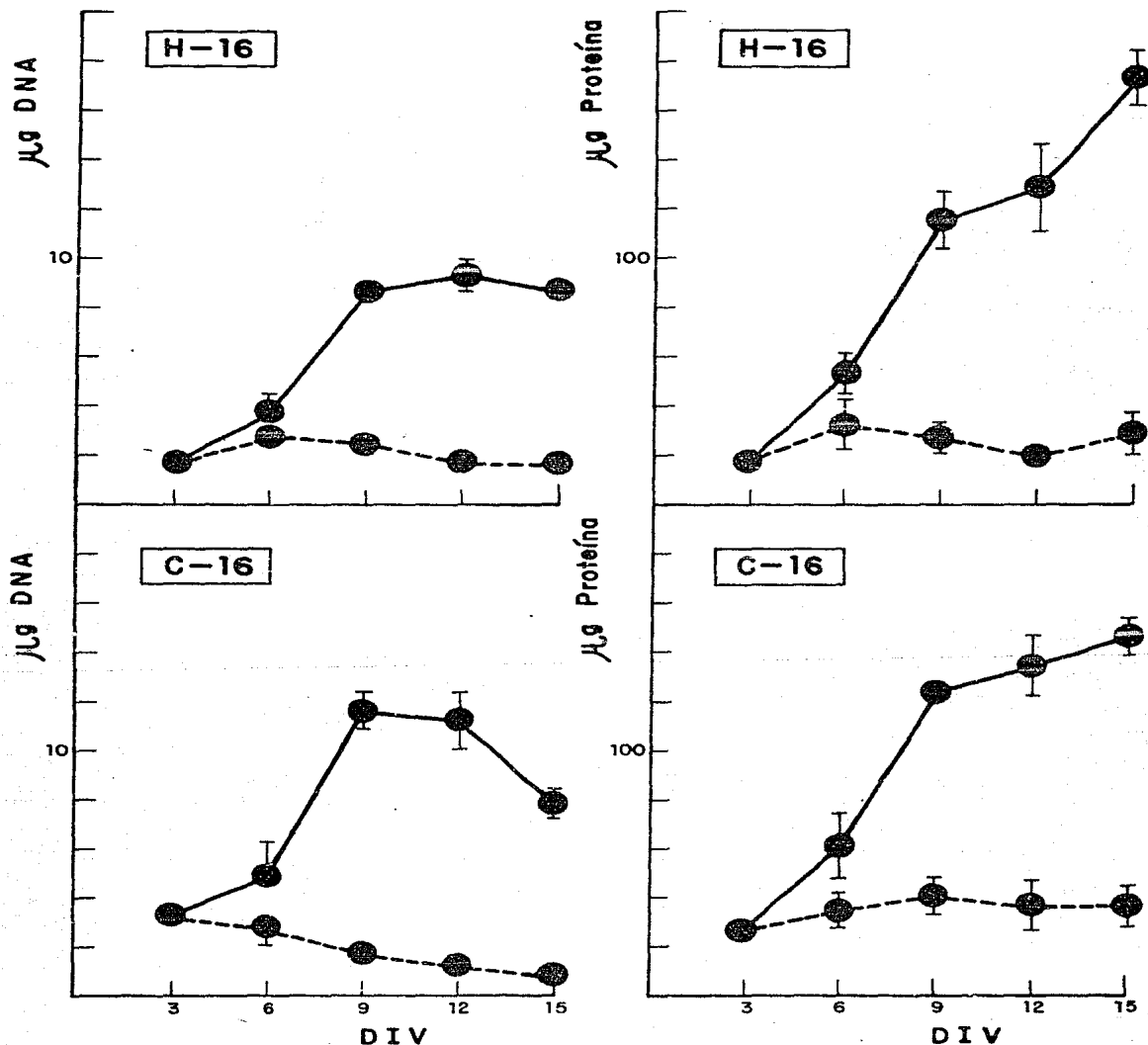


Figura 15.- Cultivos hipotalámicos (H-16) o de lóbulos frontales (C-16) de 16 días de gestación. Se sembraron a alta densidad (10^5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Se crecieron en DMEM-FCS, del cual fue renovado medio volumen cada tres días in vitro (DIV). Línea continua: cultivos control. Línea discontinua: cultivos a los cuales se les añadió una dosis de Citosin-Arabinósido $10\mu\text{M}$ al 5 DIV. Los puntos representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio \pm SEM.

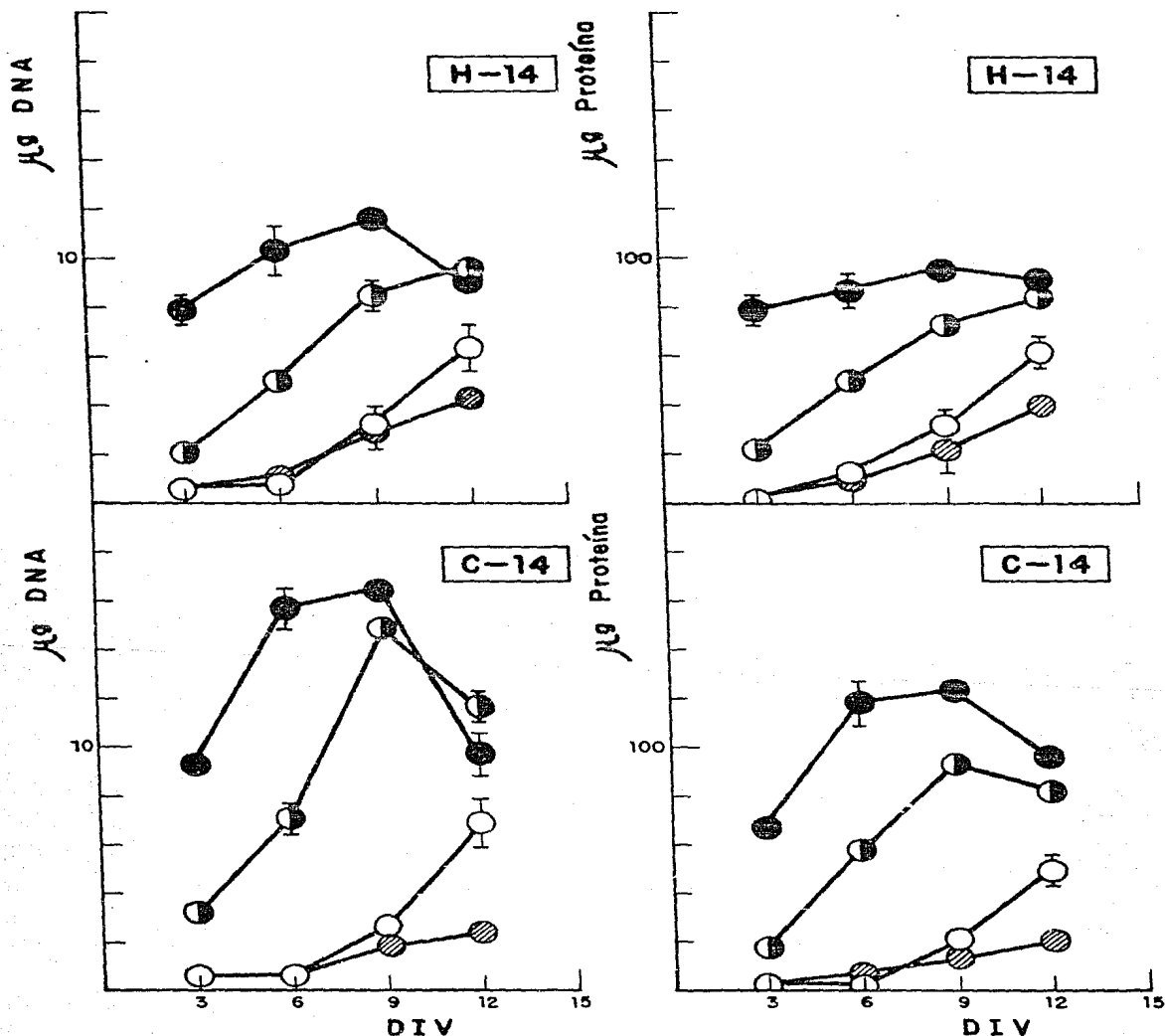


Figura 16.- Cultivos hipotalámicos (H-14) o de lóbulos frontales (C-14) de 14 días de gestación. Se sembraron aproximadamente 400,000 cel/cm² (círculos llenos), 150,000 cel/cm² (círculos semi-vacios) o 50,000 cel/cm² (círculos vacíos y rayados) en pozas de cultivo. Se crecieron en DHEH-FCS, del cual fue renovado medio volumen cada tres días in vitro (DIV). Algunos cultivos (círculos rayados) recibieron medio volumen de DHEH (sin FCS) y medio volumen de HC homólogo a partir de 3 DIV. Los puntos representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio +/- SEM.

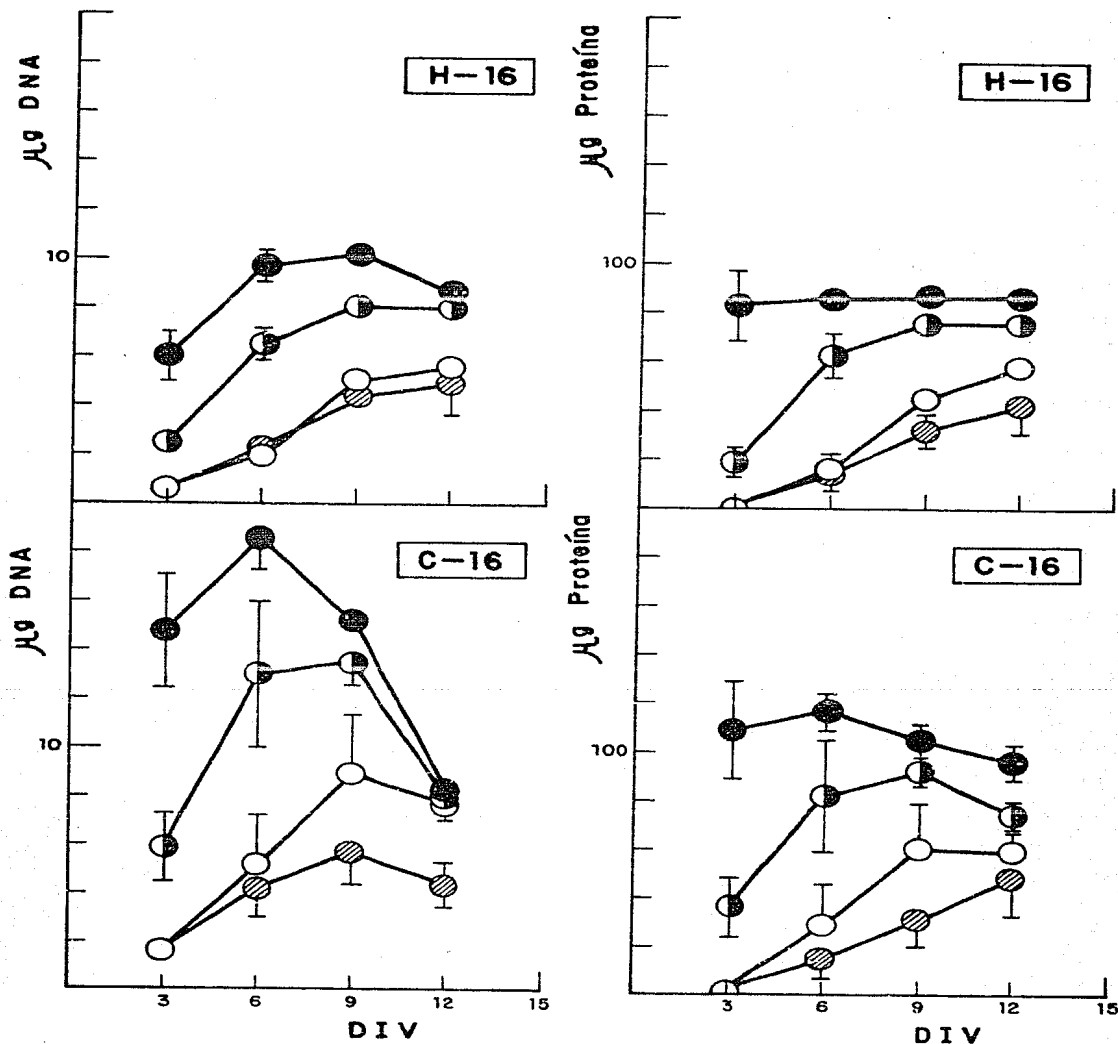


Figura 17.- Cultivos hipotalámicos (H-16) o de lóbulos frontales (C-16) de 16 días de gestación. Se sembraron aproximadamente 400.000 cel/cm² (círculos llenos), 150.000 cel/cm² (círculos semi-vacios) o 50.000 cel/cm² (círculos vacíos y rayados) en pozas de cultivo. Se crecieron en DMEM-FCS, del cual fue renovado medio volumen cada tres días in vitro (DIV). Algunos cultivos (círculos rayados) recibieron medio volumen de DMEM (sin FCS) y medio volumen de MC homólogo a partir de 3 DIV. Los puntos representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio \pm SEM.

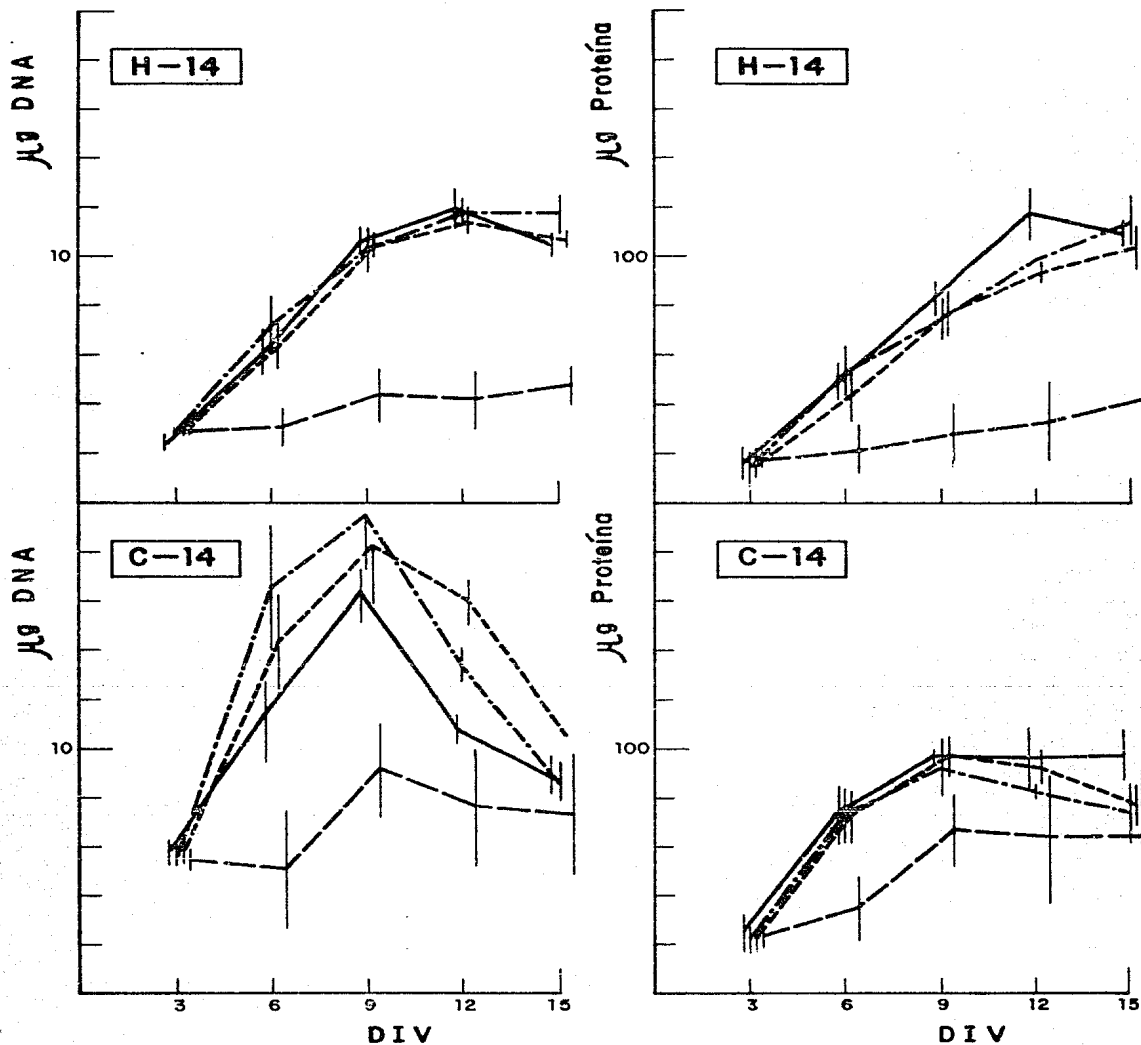


Figura 18.- Cultivos hipotalámicos (H-14) o de lóbulos frontales (C-14) de 14 días de gestación. Se sembraron a alta densidad (10^5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Se crecieron en DMEM-FCS hasta el 3 día in vitro (DIV), cuando se les renovó en adelante todo el medio cada tres DIV por DMEM-20% FCS (línea continua), DMEM-10% FCS (línea discontinua punteada), DMEM-5% FCS (línea discontinua) o DMEM sin FCS (línea interrumpida a intervalos). Los barras representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio \pm SEM.

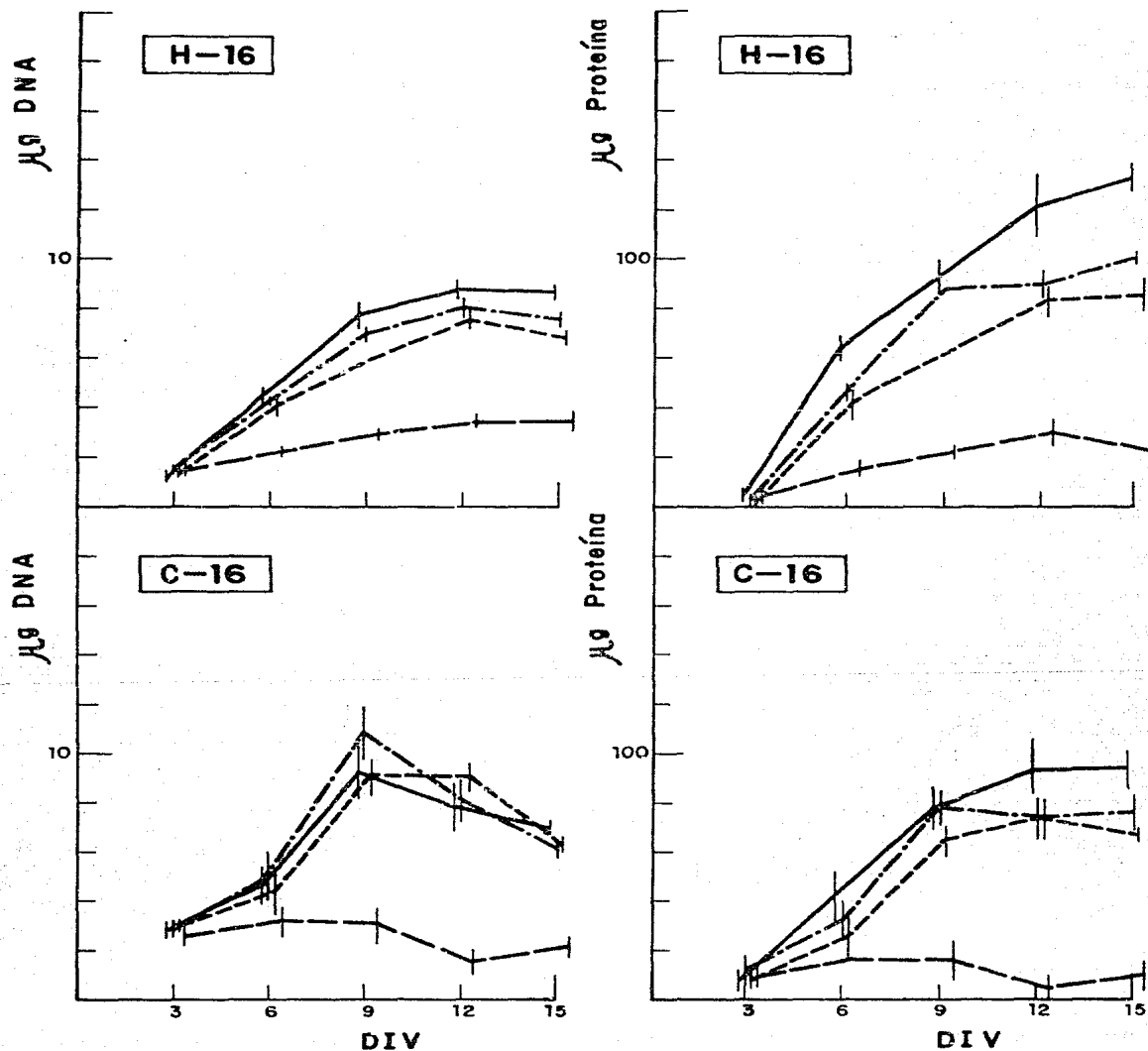


Figura 19.- Cultivos hipotalámicos (H-16) o de lóbulos frontales (C-16) de 16 días de gestación. Se sembraron a alta densidad (10^5 cel/cm² aprox.) en pozas de cultivo. Se crecieron en DMEM-FCS hasta el 3 día in vitro (DIV), cuando se les renovó en adelante todo el medio cada tres DIV por DMEM-20% FCS (línea continua), DMEM-10% FCS (línea discontinua punteada), DMEM-5% FCS (línea discontinua) o DMEM sin FCS (línea interrumpida a intervalos). Los barras representan promedios de 4 pozas pertenecientes a dos cultivos independientes. Promedio \pm SEM.

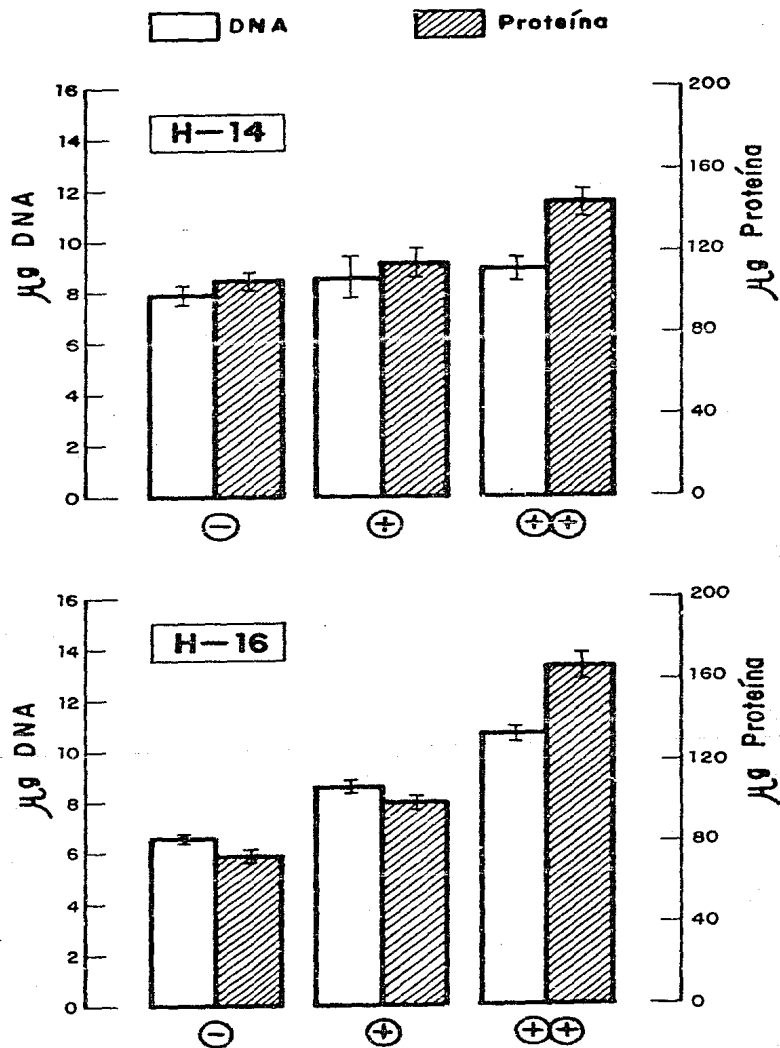


Figura 20.- Cultivos hipotalámicos de 14 días de gestación (H-14) o de 16 días de gestación (H-16). Se sembraron $6-7 \times 10^{-4}$ células/cm² en pozas de cultivo. Se crecieron en DMEM-FCS, el cual no fue renovado hasta el final del cultivo (-), fue renovado medio volumen cada tres días in vitro (+) o fue renovado todo el volumen cada dos días in vitro (++). Todos los cultivos son de 15 días in vitro (DIV). Las barras representan promedios de 5-6 pozas pertenecientes a un cultivo. Promedio \pm SEM.

TABLA I

Edad fetal	HIPOTALAMO		LOBULOS FRONTALES	
	Viabilidad (%)	total de células por hipotálamo x10,000	Viabilidad (%)	total de células por par de lóbulos x10,000
E14	65.0 %	161.0 +/- 10.3	81.2 %	219.0 +/- 25.9
E16	36.4 %	198.3 +/- 10.9	66.3 %	356.3 +/- 57.9

Se diseccionaron 10-12 hipotálamos y 6-10 pares de lóbulos frontales de embriones de 14 (E14) o 16 (E16) días de gestación. Se dispersó el tejido en DMEM-FCS como se describe en Material y Métodos. Las células se lavaron del medio de dispersión, y se resuspendieron de nueva cuenta en DMEM-FCS. Se determinó la viabilidad en las suspensiones celulares finales por exclusión de azul de tripano. Promedio +/- S.E.M. de 6 experimentos.

TABLA II

CULTIVO HIPOTALAMICO	SIEMBRA (10-5 cel/cm ²)	DNA (ug/poza)	proteína (ug/poza)
(-) Cit-Ara	1.9	8.1 +/- 0.5	107.9 +/- 7.8
(+) Cit-Ara al 8 DIV	1.9	7.4 +/- 0.7	120.0 +/- 4.3
(-) Cit-Ara	2.0	8.1 +/- 0.2	119.5 +/- 4.1
(+) Cit-Ara al 5 DIV	2.0	3.3 +/- 0.1	84.0 +/- 5.5
(-) Cit-Ara	0.7	8.6 +/- 0.2	100.9 +/- 2.4
(+) Cit-Ara al 5 DIV	0.7	4.0 +/- 0.5	54.4 +/- 4.0
(-) Cit-Ara	0.3	7.8 +/- 0.3	91.7 +/- 4.2
(+) Cit-Ara al 5 DIV	0.3	1.4 +/- 0.1	12.2 +/- 1.6

Se diseccionaron 10-12 hipotálamos de embriones de 16 días de gestación (E16). Las suspensiones celulares obtenidas se sembraron a las densidades señaladas en pozas de cultivo (16 mm de diam.), y se alimentaron cada tres días cambiando 1/2 volumen del medio de cultivo por medio DMEM-FCS fresco. Los cultivos se procesaron para las determinaciones bioquímicas después de 12-15 días in vitro (DIV). En los cultivos donde se utilizó el antimitótico, se añadió el Citosin-Arabinósido (Cit-Ara) en una sola dosis de 10 uM en el medio el día de cultivo indicado. Los resultados representan tres cultivos independientes. Promedio +/- S.E.M. de n=4-10 pozas.

TABLA III

EDAD	TRH (pg/hipotálamo)	TRH (pg/cerebro)
E14	31.9 +/- 3.0 (6)	40.7 +/- 3.6 (6)
E16	70.3 +/- 6.4 (4)	99.5 (2)
E18	91.2 +/- 1.8 (3)	146.7 (1)
2 días postnatal	80.6 (1)	327.7 (2)
Adulto	6,800 +/- 900 (3)	

Se determinaron los niveles de TRH radioinmunoensayable en el hipotálamo y el cerebro (extra-hipotalámico) de ratones a varias edades fetales, postnatal y en adultos macho. Los valores se expresan como TRH total por estructura. En la mayoría de las edades fetales era necesario juntar varias estructuras. Para la determinación en adulto se realizaron diluciones seriadas, y se sacó el promedio correspondiente a un hipotálamo. Los números entre paréntesis indican la cantidad de puntos ensayados (ver Material y Métodos). Promedio +/- S.E.H.

TABLA IV

CULTIVO HIPOTALAMICO (-) Cit-Ara	DIAS IN VITRO				
	3	6	9	12	15
ug DNA	6.6	14.2	10.5	22.8	22.5
ug proteina	135	240	243	570	694
pg TRH	119	92	111	25	138
(+) Cit-Ara al 5 DIV					
ug DNA	5.5	8.9	7.5	5.1	6.6
ug proteina	128	175	179	211	280
pg TRH	< 10	46	59	92	55

Se disecaron 10 hipotálamos de embriones de 14 días de gestación (E14). La suspensión celular se sembró en 10 cajas de 35 mm de diámetro (10-5 células/cm²). Los cultivos se alimentaron cada tres días cambiando 1/2 volumen del medio de cultivo por DMEM-FCS fresco. Se tomaron las cajas para ser procesadas a los días en cultivo señalados. Una serie se trató con Citosín-Arabinósido (Cit-Ara) al quinto día in vitro (5 DIV), añadiendo una sola dosis 10 uM en el medio. Los resultados son los valores totales por caja de cultivo.

TABLA V

DENSIDAD DE SIEMBRA	ug proteína	ug DNA	pg TRH
2x10 ⁻⁵ cel/cm ²	369.3 +/- 31.6	20.1 +/- 2.6	248.8 +/- 91.1
1x10 ⁻⁵ cel/cm ²	241.0 +/- 19.1	10.1 +/- 1.7	176.0 +/- 39.8
5x10 ⁻⁴ cel/cm ²	128.2 +/- 9.3	4.5 +/- 0.8	165.8 +/- 15.3

Cultivos de células hipotalámicas de 16 días de gestación (E16) se sembraron a la densidad señalada en cajas de 35 mm de diámetro (aprox. 1, 1/2 y 1/4 equivalente de hipotálamo por caja, respectivamente). Los cultivos se alimentaron cada tres días, cambiando 1/2 volumen del medio de cultivo por DHEM-FCS fresco. Se trato con Citosin-Arabinosido (Cil-Ara) al sexto día in vitro (6 DIV), añadiendo una sola dosis 10 uM en el medio. Se tomaron todas las cajas al 15 DIV. Los resultados son Promedio +/- Desviación Estándar de 3 cajas de cultivo.

TABLA VI

TRH intracelular
(pg)

HIPOTALAMO	E14	E16
Densidades de siembra:		
4.0x10 ⁻⁵ cel/cm ²	1353.3	47.0
1.5x10 ⁻⁵ cel/cm ²	61.7	44.9
0.5x10 ⁻⁵ cel/cm ²	56.4	32.3
Porcentage de FCS en el medio:		
20%	15.7	< 10
10%	17.1	< 10
5%	14.4	< 10
0%	14.3	< 10
CEREBRO		
Densidades de siembra:		
4.0x10 ⁻⁵ cel/cm ²	60.0	34.2
1.5x10 ⁻⁵ cel/cm ²	55.5	43.4
0.5x10 ⁻⁵ cel/cm ²	84.4	43.8
Porcentage de FCS en el medio:		
20%	14.5	< 10
10%	12.8	< 10
5%	14.1	< 10
0%	15.6	< 10

Tabla VI.- Cultivos de células hipotalámicas y de lóbulos frontales (cerebro) de 14 (E14) o 16 (E16) días de gestación en pozas de 16 mm de diámetro. Los cultivos fueron sembrados a distintas densidades celulares y se les renovó 1/2 volumen del medio cada tres días; o fueron sembrados a 10-5 cel/cm² y alimentados renovando todo el volumen del medio por medio con distintos porcentajes de FCS cada tres días. Las pozas se tomaron al noveno día in vitro. Los valores de TRH celular son la suma de pozas en duplicado para cada condición de un solo experimento.

APENDICE I

OPTIMIZACION DE LA DISPERSION DEL TEJIDO FETAL.

El sistema de dispersión utilizado originalmente consistía de una dispersión mecánica pasando el tejido por una serie de agujas hipodérmicas de diámetro en orden decreciente (ver la tesis del Biólogo Jose Luis Redondo, 1983). El medio de dispersión consistía de una formulación balanceada de sales (excepto Calcio) con una mezcla mínima de nutrientes esenciales (SHEH; GIBCO Lab.). Para evitar el daño celular excesivo por el estrés mecánico, se incluyó albúmina de suero bovino (BSA: Sigma) al 1% en esta solución. Además, los fetos se mantenían en PBS a temperatura ambiente durante todo el tiempo que duraba la disección (aprox. 1 hr.). Pudimos observar que al prolongar este periodo innecesariamente ($t > 1$ hr.), bajaba drásticamente el rendimiento celular por hipotálamo y la viabilidad del proceso de dispersión (tabla A). Al pasar de una aguja a la siguiente en la serie, el número de células dispersas siempre disminuía. Con las dos primeras agujas se dispersan más células que en pasos subsiguientes. Como se puede ver en la tabla A, es evidente además que en estos dos pasos iniciales es donde se obtienen casi todas las células viables del proceso de dispersión por agujas, presumiblemente por que los fragmentos de tejido no dispersado ya están demasiado dañados por el proceso como para rendir más células viables. En adelante solo se utilizaron las dos primeras agujas de la serie para efectuar la dispersión mecánica. Por otra parte, un consenso parecía estar emergiendo en la literatura del cultivo celular, que adjudicaba al suero bovino fetal (FCS) la capacidad de

proteger a la suspensión celular de la agresión mecánica, y de aumentar la eficiencia de siembra. Al incluir FCS en el medio de dispersión SHEM, vimos que aun cuando la viabilidad de la suspensión no denotaba mejorías significativas, el aumento en la cantidad de células recuperadas por hipotálamo implicaba un aumento importante en la cantidad de células viables disponibles (tabla 4). Al utilizar el medio de cultivo usual (DMEM-FCS) como medio de dispersión, observamos que los resultados no parecían ser distintos con esta nueva modificación; sin embargo, la eficiencia de siembra vista a contraste de fases parecía ser mejor. Al mantener a los fetos en PBS a 4 grados C durante la disección no se afecta el rendimiento del proceso de dispersión, lo que nos permitió relajar el periodo de disección, y adoptar estas dos últimas modificaciones al protocolo final de la dispersión mecánica.

Al tratar de implementar un protocolo de dispersión mecano-enzimática, hicimos uso de un ingenioso paradigma de digestión con tripsina, que evita la exposición prolongada del tejido a la enzima bajo agitación continua (con la consiguiente pérdida celular), como se usa en los protocolos tradicionales de dispersión enzimática. Esta técnica (referida como "tripsina fría"; ver Freshney, 1983) se basa en exponer al tejido por un periodo prolongado (5-8 hrs.) a la solución triptica a 4 grados C (tripsina cruda al 0.25% en DMEM). La idea consiste en saturar pasivamente el tejido con la enzima inactiva (e.g. sin necesidad de agitación). Terminado este periodo, se decanta el exceso de solución de tripsina, se incuban los fragmentos por 20 minutos a 37 grados C (en que se lleva a cabo la digestión), para proceder finalmente a inactivar la actividad enzimática con 1 ml de DMEM-FCS y a dispersar el tejido mecánicamente. Dado que las

proteínas de membrana podrían ser importantes en el reconocimiento inicial de las células en cultivo, decidimos no emplear esta metodología como parte integral de nuestro acervo de técnicas. No obstante, en resultados preliminares utilizando la técnica de la tripsina fría, pudimos observar un 50% de incremento en la cantidad de células recuperadas por hipotálamo de E16, y casi un 200% de aumento en la viabilidad de las células dispersadas (tabla B). Al utilizar el tejido más joven (E14), los efectos fueron más modestos, incrementando la recuperación por hipotálamo en 50%, pero sin cambios significativos en la viabilidad de la dispersión. Asimismo, al emplear esta técnica con lóbulos frontales, el tejido de E16 experimentó un modesto aumento en la viabilidad de las células dispersadas tripticamente, sin cambios importantes en el rendimiento de células por estructura. No se detectaron mejorías en ningún aspecto de la dispersión enzimática de lóbulos frontales de E14 (tabla B). Es probable que el efecto positivo de la tripsinización sobre la dispersión del tejido hipotalámico más desarrollado (E16) refleja la maduración temprana de esta estructura, y por lo tanto, su mayor susceptibilidad a la agresión mecánica de la dispersión. Las estructuras de la corteza cerebral no han alcanzado la madurez a las dos edades fetales probadas. En cambio, la susceptibilidad a la dispersión del hipotálamo en E14 es muy similar a la de sus contrapartes corticales (ver Discusión).

Tabla A

Aguja	Células viables del total de células recuperadas (%)		
	+ BSA 1%	+ FCS 20%	
	t > 1 hr	t ≤ 1 hr	
1.	9.3 +/- 3.3	37.0 +/- 4.5	37.3 +/- 6.2
2.	7.6 +/- 1.4	5.9 +/- 0.6	10.7 +/- 3.0
3.	2.1 +/- 1.0	2.7 +/- 1.6	
4.	0.9 +/- 1.4	2.3 +/- 0.7	
Viabilidad global (%)	20.0 +/- 2.2	48.1 +/- 2.8	48.0 +/- 6.8
Total de cel. recuperadas (x10,000)	141.4 +/- 24.2	170.5 +/- 64.8	282.8 +/- 46.8

9-11 hipotálamos se diseccionaron de fetos de 16 días de gestación (E16). Los hipotálamos se pusieron en 1 ml de solución de dispersión (SMEM) complementada como se indica en la parte superior de las columnas, ya sea con albumina de suero bovino (BSA) al 1%, o con suero bovino fetal (FCS) al 20%. El tejido se dispersó pasando la suspensión por agujas hipodérmicas de varios diámetros: 1.5 mm (1.); 1.25 mm (2.); 1.0 mm (3.); 5/8 mm (4.). La viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripano. "t" indica el tiempo usado en la disección. Estos datos fueron obtenidos antes de lavar las células de la solución de dispersión. Promedio +/- S.D., 2-4 experimentos.

Tabla B

	HIPOTALAMO		LOBULOS FRONTALES	
	Viabilidad (%)	total de células por hipotálamo x 10,000	Viabilidad (%)	total de células por par de lóbulos x 10,000
(Tejido E14):				
sin tripsina	73 %	161.5	85 %	258.5
con tripsina	64 %	246.0	87 %	266.5
(Tejido E16):				
sin tripsina	18 %	163.0	67 %	300.0
con tripsina	53 %	239.0	78 %	296.0

Resultados de un experimento de dispersión en tejidos de 14 (E14) o de 16 (E16) días de gestación, para comparar la dispersión mecánica con la mecano-enzimática (tripsina fría). Se diseccionaron 9-10 hipotálamos o pares de lóbulos frontales de la edad fetal indicada para cada ensayo. La dispersión se realizó en DMEM-FCS. La viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripano. Estos resultados se tomaron antes de realizar el lavado del medio de dispersión.

APENDICE II

OPTIMIZACION DE LA DETERMINACION DE DNA.

El ensayo consiste en una modificación del método de Erwin y cols. (1981). Básicamente, el material precipitable de una extracción ácida de la muestra se hidroliza en ácido tricloro acético al 5 %. Este paso libera aldehidos libres del DNA, y en condiciones apropiadas, deja casi intacta la cantidad de proteína en la muestra, la cual se recupera por precipitación. Las ventajas más evidentes de este procedimiento residen en una alta sensibilidad (hasta 1 ug de DNA) comparado con otros métodos utilizados, y además que la forma de extracción permite recuperar no solo la proteína en la muestra, sino además el extracto ácido. Fue necesario modificar la técnica original para adaptarla a nuestro procedimiento de extracción. Hemos encontrado que la hidrólisis en ácido tricloroacético (TCA), como descrita en Materiales y Métodos, no afectó a estándares de albúmina bovina sujetos a las mismas condiciones. La muestra hidrolizada se enfria y se centrifuga, separando una pastilla de proteína del sobrenadante con los aldehidos libres del DNA. A este sobrenadante se le añade el ácido 3,5-diamino benzoico (DABA), se incuba por una hora a 60 grados C para desarrollar el fluorógeno, y se termina la reacción con HCl 1 N. Estándares por triplicado se hidrolizan en paralelo con las muestras y se les añade directamente el DABA, procediendo como descrito. Las lecturas de fluorescencia se hacen a 400 nm de longitud de onda de excitación, y a 520 nm de emisión. Se grafica fluorescencia relativa contra concentración de DNA de la curva estándar. El Coeficiente de Variabilidad (C.V.) en todos los puntos de la curva estándar regularmente es menor del 5 %.

Dado que para radioinmunoensayos de neuropéptidos se utiliza un extracto de células en metanol, se realizaron extracciones seriadas en TCA/Metanol, y viceversa, para comparar el rendimiento de DNA y proteína en los dos procedimientos. Cultivos de fibroblastos humanos (donación del laboratorio del Dr. Antonio Velázquez, IIBH/UNAH) se rasparon con gendarme de goma en tricloroacético al 5 % y el lizado celular se separó en dos triplicados idénticos. Se enfriaron a 4 grados C por una noche y se centrifugaron. Un triplicado se resuspendió en metanol, y se guardó a -20 grados C por una noche y se centrifugó. Se determinó DNA y proteína en las pastillas de ambos triplicados. En otro cultivo de fibroblastos humanos se procedió a extraer con la secuencia invertida, esto es, primero en metanol y luego un triplicado resuspendido en tricloroacético y precipitado nuevamente. Como se puede ver en la tabla A, es muy parecido el rendimiento del material precipitable por extracción en metanol al de tricloroacético. La diferencia en la variabilidad de las dos secuencias de extracción reside principalmente en que en metanol se producen agregados que sedimentan rápidamente, lo cual dificulta la separación en alícuotas idénticas. Otra observación importante es la diferencia entre los coeficientes proteína/DNA de los dos cultivos de fibroblastos. Creemos que el coeficiente refleja el grado de desarrollo del cultivo.

TABLA A

EXTRACCION	ug DNA	ug proteína	C.V.	prot./DNA
TCA	2.2	274.0	< 5 %	124.5
TCA-Metanol	2.1	230.0	< 5 %	109.5
Metanol	7.5	412.5	> 20%	55.0
Metanol-TCA	11.0	324.5	> 20%	29.5

Algunos datos que apoyan esta afirmación se obtuvieron de cultivos de células de cerebro de ratón (lóbulos frontales). Se puede ver en la tabla B que al extraer dos platos con el mismo grado de desarrollo in vitro por procedimientos diferentes, las cantidades de DNA y proteína detectadas son semejantes.

TABLA B

EXTRACCION	ug DNA	ug proteína	prot./DNA
TCA	9.2	168.0	18.3
Metanol	8.8	95.5	10.8
TCA	2.1	6.5	3.1
Metanol	2.5	8.0	3.2
TCA	7.6	183.5	24.1
Metanol	7.2	119.5	16.6

Sin embargo, existe la posibilidad de que no todas las proteínas celulares compartan la resistencia de la albúmina bovina a la hidrólisis ácida del ensayo. Es posible que el nivel de proteína detectado en realidad represente solo una parte del contenido proteínico total en el cultivo. Por lo tanto, cualquier interpretación basada en los niveles de proteína así medidos deberá ser tomada con precaución, en particular las referentes al coeficiente proteína/DNA.

REFERENCIAS

- Abney, E.R., P.P. Bartlett and M.C. Raff (1981). Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Dev. Biol.* 83:301-310
- Abney, E.R., B.P. Williams and M.C. Raff (1983). Tracing the development of oligodendrocytes from precursor cells using monoclonal antibodies, fluorescence-activated cell sorting and cell culture. *Dev. Biol.* 100:166-171
- Angevine, J.D. and R.L. Sidman (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768
- Banker, G.A. (1980). Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209:809-810
- Barnes, D.W., D.A. Sirbasku and G.H. Sato, Eds. (1984a). Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal cell culture. In "Cell culture methods for molecular and cell biology", Vol. 1, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Barnes, D.W., D.A. Sirbasku and G.H. Sato, Eds. (1984b). Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells. In "Cell culture methods for molecular and cell biology", Vol. 4, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Benda, P., F. De Vitry, R. Picart and A. Tixier-Vidal (1975). Dissociated cell cultures from fetal mouse hypothalamus. Patterns of organization and ultrastructural features. *Exp. Brain Res.* 23:29-47
- Booher, J. and M. Sensenbrenner (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2:97-105
- Bronner-Fraser, M.E. and A.M. Cohen (1980). The neural crest: what can it tell us about cell migration and determination? In "Current topics in developmental biology", A.A. Moscona and A. Monroy, Eds., Vol. 15, pp 1-25, Academic Press, New York.
- Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15:516-528
- Carrel, A. (1924). Tissue culture and cell physiology. *Physiol. Revs.* 4:1-20
- Cohen, J. and S.Y. Selvendran (1981). A neuron-specific cell-surface antigen in the central nervous system not shared by peripheral neurons. *Nature* 291:421-423
- Collins, F. (1978). Induction of neurite outgrowth by a conditioned medium factor bound to the culture substratum. *PNAS* 75:5210-5213

- Denizeau, F., D. Dube, T. Antakly, A. Lemay, A. Parent, G. Pelletier and F. Labrie (1981). Attempts to demonstrate peptide localization and secretion in primary cell cultures of fetal rat hypothalamus. *Neuroendoc.* 32:96-102
- Doupe, A.J., S.C. Landis and P.H. Patterson (1985a). Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* 5:2119-2142
- Doupe, A.J., P.H. Patterson and S.C. Landis (1985b). Small intensely fluorescent (SIF) cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neural crest derivatives. *J. Neurosci.* 5:2143-2160
- Dribin, L.B. and J.N. Barrett (1982). Two components of conditioned medium increase neuritic outgrowth from rat spinal cord explants. *J. Neurosci. Res.* 8:271-280
- Eisenbarth, G.S., F.S. Walsh, and M. Nirenberg (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *PNAS* 76:4913-4917
- Erwin, B.G., C.M. Stoscheck and J.R. Florini (1981). A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. *Anal. Biochem.* 110:291-294
- Faivre-Bauman, A., D. Grouselle, A. Nemeskeri and A. Tixier-Vidal (1978). Ontogenesis of Thyroliberin in the mouse hypothalamus. *Brain Res.* 154:382-387
- Faivre-Bauman, A., A. Nemeskeri, C. Tougard and A. Tixier-Vidal (1980). Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of fetal mouse brain cells. *Ontogenetic Aspects. Brain Res.* 185:289-304
- Fedoroff, S. (1977). Tracing glial cell lineages by colony formation in primary cultures. In "Cell, tissue and organ cultures in neurobiology", S. Fedoroff and L. Hertz, Eds., pp 215-221, Academic Press, New York.
- Fedoroff, S. (1980). Tracing the astrocyte cell lineage in mouse neopallium in vitro and in vivo. In "Tissue culture in neurobiology", E. Giacobini, A. Vernadakis and A. Shahar, Eds., pp 349-372, Raven Press, New York.
- Freshney, R.I. (1983). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Fujita, S. (1966). Application of light and electron microscopic autoradiography to the study of cytogenesis of the forebrain. In "Evolution of the forebrain", R. Hassler and H. Stephan, Eds., pp 180-196, Plenum Press, New York.

- Grau-Wagemans, M., I. Selak, P.P. Lefebvre and G. Moonen (1984). Cerebellar macroneurons in serum-free cultures: evidence for intrinsic neurotrophic and neurotoxic activities. *Develop. Brain Res.* 15:11-19
- Haas, R.J., J. Werner and T.M. Fliedner (1970). Cytokinetics of neonatal brain cell development in rats as studied by the 'Complex 3H-thymidine labelling' method. *J. Anat.* 107:421-437
- Hansson, E. (1984). Cellular composition of a cerebral hemisphere primary culture. *Neurochem. Res.* 9:153-172
- Harris, H. and J.F. Watkins (1965). Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205:640-646
- Harrison, R.G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4:140-143
- Henderson, C.E., M. Huchet and J.P. Changeux (1981). Neurite outgrowth from embryonic chicken spinal neurons is promoted by media conditioned by muscle cells. *PNAS* 78:2625-2629
- Jacobson, M. (1978). *Developmental Neurobiology*, Plenum Press, New York.
- Jacobson, M. (1985). Clonal analysis and cell lineages of the vertebrate central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 8:71-102
- Jirikowski, G., I. Reisert and Ch. Pilgrim (1981). Neuropeptides in dissociated cultures of hypothalamus and septum: quantitation of immunoreactive neurons. *Neurosci.* 6:1953-1960
- Joseph-Bravo, P., J.L. Charli, J.M. Palacios and C. Kordon (1979). Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endoc.* 104:801-806
- Joseph-Bravo, P., J.L. Redondo, M. Theelen, P. De la Torre, C. Guerra and J.L. Charli (1984). TRH and LHRH in primary cell dispersed cultures of rodent hypothalamus. 14th Annual meeting of the Society for Neuroscience.
- Knigge, K.M., G. Hoffman, D.E. Scott and J.R. Sladek, Jr. (1977). Identification of catecholamine and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-containing neurons in primary cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus. *Brain Res.* 120:393-405
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
- Levitt, P., M.L. Cooper and P. Rakic (1981). Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J. Neurosci.* 1:27-39

- Lim, R., D.E. Turrif, S.S. Troy and T. Kato (1977). Differentiation of glioblasts under the influence of glia maturation factor. In "Cell, tissue and organ cultures in neurobiology", S. Fedoroff and L. Hertz, Eds., pp 223-235, Academic Press, New York.
- Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145:709-710
- Lowry, O.H., J.H. Rosenbrough, A.L. Barr and R. Randall (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- McCarthy, K.D. and J. De Vellis (1978). Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 4:15-26
- McCarthy, K.D. and J. De Vellis (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85:890-902
- McKelvy, J.F. (1974). Biochemical neuroendocrinology. I: Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone (TRH) by organ cultures of mammalian hypothalamus. *Brain Res.* 65:489-502
- Miller, R.H. and M.C. Raff (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J. Neurosci.* 4:585-592
- Muller, H.W., S. Backh and W. Seifert (1984). Neurotrophic factor for central neurons. *PNAS* 81:1248-1252
- Nakai, J. (1956). Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Am. J. Anat.* 99:81-103
- Niimi, K., I. Harada, Y. Kusaka and S. Kishi (1962). The ontogenetic development of the diencephalon of the mouse. *Tokushima J. Exp. Med.* 8:203-238
- Patterson, P.H. and L.L.Y. Chun (1977). The induction of acetylcholine synthesis in primary cultures of dissociated rat sympathetic neurons. I. Effects of conditioned medium. *Dev. Biol.* 56:263-280
- Pettman, B., J.C. Louis and M. Sensenbrenner (1979). Morphological and biochemical maturation of neurons cultured in the absence of glial cells. *Nature* 281:378-380
- Privat, A. and J. Fulcrand (1977). Neuroglia- From the subventricular precursor to the mature cell. In "Cell, tissue and organ cultures in neurobiology", S. Fedoroff and L. Hertz, Eds., pp 11-37, Academic Press, New York.

- Puymirat, J., C. Loudes, A. Faivre-Bauman, A. Tixier-Vidal and J.M. Bourne (1982a). Expression of neuronal functions by mouse fetal hypothalamic cells cultured in hormonally defined medium. In "Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation", Vol. 9, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Puymirat, J., A. Faivre-Bauman, B. Bizzini and A. Tixier-Vidal (1982b). Prenatal and postnatal ontogenesis of neurotransmitter-synthetizing enzymes and [125-I]tetanus toxin binding capacity in the mouse hypothalamus. *Develop. Brain Res.* 3:199-206
- Raff, M.C., K.L. Fields, S. Hakomori, R. Mirsky, R.M. Pruss and J. Winter (1979). Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* 174:283-308
- Raff, M.C., R.H. Miller and M. Noble (1983a). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396
- Raff, M.C., E.R. Abney, J. Cohen, R. Lindsay and M. Noble (1983b). Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides and growth characteristics. *J. Neurosci.* 3:1289-1300
- Redondo, J.L. (1983). Cultivo de células dispersas de hipotálamo de ratón. Tesis para la obtención del título en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Sachs, H., R. Goodman, J. Osinchak and J. McKelvy (1971). Supraoptic neurosecretory neurons of the guinea pig in organ culture. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin. *PNAS* 68:2782-2786
- Sang U, H., G.F. Erickson and W.B. Watkins (1981). Long term primary monolayer culture of adult murine magnocellular neurons. *Endoc.* 108:1810-1814
- Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62:377-405
- Sensenbrenner, M. (1977). Dissociated brain cells in primary cultures. In "Cell, tissue and organ cultures in neurobiology", S. Fedoroff and L. Hertz, Eds., pp 191-213, Academic Press, New York.
- Shein, H.M. (1966). Propagation of human fetal spongioblasts and astrocytes in dispersed cell cultures. *Exp. Cell Res.* 40:554-569
- Shimada, M. and T. Nakamura (1973). Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp. Neurol.* 41:163-173
- Sorieul, S. and B. Ephrussi (1961). Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro. *Nature* 190:653-654

- Vaccaro, D.E., S.E. Leeman and A. Messer (1980). Primary cultures of dispersed hypothalamic cells from fetal rats: morphology, electrical activity, and peptide content. *J. Neurobiol.* 11:417-423
- Varon, S. and R. Adler (1980). Nerve growth factors and control of nerve growth. In "Current topics in developmental biology", A.A. Moscona and A. Monroy, Eds., Vol. 16, pp 207-252. Academic Press, New York.
- Varon, S., S.D. Skaper, G. Barbin, I. Selak and M. Manthorpe (1984). Low molecular weight agents support survival of cultured neurons from the central nervous system. *J. Neurosci.* 4:654-658
- Walker, A.G., J.A. Chapman, C.B. Bruce and M.G. Rumsby (1984). Immunocytochemical characterization of cell cultures grown from 1-2 day post-natal rat cerebral tissue. *J. Neuroimmunol.* 7:1-20
- Walker, A.G., J.A. Chapman and M.G. Rumsby (1985). Immunocytochemical demonstration of glial-neuronal interactions and myelinogenesis in subcultures of rat brain cells. *J. Neuroimmunol.* 9:159-177
- Walz, W. and L. Hertz (1983). Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. In "Progress in neurobiology", Vol 20, pp 133-183, Pergamon Press.
- Yavin, E. and Z. Yavin (1974). Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J. Cell Biol.* 62:540-546
- Yavin, Z. and E. Yavin (1980). Survival and maturation of cerebral neurons on poly(L-lysine) surfaces in the absence of serum. *Dev. Biol.* 75:454-459