

SUPERVIVENCIA NEURONAL Y DESARROLLO DE AXONES,  
EN PRESENCIA DE MEDIO GLIO-CONDICIONADO, DE GANGLIOS  
CILIARES DISOCIADOS DE EMBRION DE POLLO.

(NEURONAL SURVIVAL AND AXON DEVELOPMENT IN THE PRESENCE OF GLIAL  
CONDITIONED MEDIUM OF CHICK EMBRYO DISSOCIATED CILIARY GANGLIA).

por

M. BUSTOS RUIZ y F. J. ALCAIN TEJADA

Departamento de biología. Facultad de veterinaria, Universidad de Córdoba. España.

Palabras clave: GANGLIOS CILIARES. NEURONAS. CULTIVO DE TEJIDOS.  
EMBRION DE POLLO. MEDIO CONDICIONADO.

*S u m m a r y .*

*The neuron survival in cultures of dissociated ciliary ganglia, on different harvests of glial conditioned media (GCM) was researched. Also were employed two substrata: collagen and polyornithine type IC.*

*Conditioning basal medium (F12 + 10 p. 100 fetal calf serum) is made with cellular cultures growing in monolayer non neuronal cells of ciliary ganglion.*

*The differences between GCM and heart conditioned-medium (HCM) for neuron survival and axon development in vitro, on different substrata are discussed. It is concluded that collagen substratum plus GCM is better than other conditions.*

*R e s u m e n .*

*Se estudia la supervivencia de las neuronas en cultivo de ganglio ciliar disociado, en presencia de diferentes cosechas de medio glio-condicionado (MGC) y en distintos substratos: colágeno y poliornitina tipo IC.*

*El acondicionamiento del medio basal (F12 + 10 p. 100 de suero fetal bovino) se realizó mediante cultivos celulares, haciendo crecer en mono-capa las propias células no neuronales del ganglio ciliar.*

*Se discute y compara la eficacia del MGC y del MCC (medio cardio-condicionado), para la supervivencia neuronal y el desarrollo axonal in vitro, en los dos substratos, y se concluye que los substratos de colágeno junto a la adición del MGC, son más favorables en ambos sentidos.*

La supervivencia de las neuronas en cultivos celulares y la posterior emisión de axones *in vitro*, precisa de la presencia en esos cultivos de factores inductores (factor de crecimiento nervioso, medios condicionados) de diferente naturaleza, según la procedencia y la naturaleza de la neurona.

En algunos casos esos factores no son totalmente imprescindibles, como ocurre con las neuronas simpáticas de los ganglios espinales y los ganglios de la raíz dorsal de embrión de pollo (Ludueña<sup>10</sup> y Letourneau<sup>9</sup>), aunque la adición de NGF a los cultivos estimula notablemente los procesos de diferenciación neuronal *in vitro*, y el número de neuronas supervivientes. Helfand y col.<sup>8</sup> establecieron la no equivalencia entre el NGF y el medio cardio-condicionado (MCC) para los cultivos de neuronas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales de embriones de pollo.

Como ya indicábamos en un trabajo anterior (Bustos y col.<sup>3</sup>) las neuronas del ganglio ciliar de embrión de pollo necesitan para sobrevivir la presencia de medio condicionado en el cultivo. Así mismo la naturaleza del substrato empleado en los cultivos celulares de ganglio ciliar disociado influye directamente en el desarrollo y emisión de las neuritas.

El medio condicionado usualmente empleado para este fin ha sido el MCC, en cultivos cuyos substratos eran colágeno y polímeros sintéticos del tipo de la poliornitina y polilisina.

Anteriormente habíamos establecido (Alcaín y col.<sup>2</sup>) que los ganglios ciliares, cultivados *in toto*, no precisan de la adición de MCC para la supervivencia de las neuronas y el desarrollo axonal, y concluimos que eran las células de glía las que soportaban esa supervivencia y desarrollo.

En este sentido Ebendal y Jacobson<sup>6,7</sup> investigaron la influencia que ejercían diferentes explantos (corazón, colon, hígado, piel, etc.) sobre distintos tipos de ganglios de embrión de pollo, entre ellos el ganglio ciliar y observaron cómo sin que hubiese contacto entre ganglio y explantos, se producía por parte de éstos una serie de factores que se difundían en el medio promoviendo el desarrollo de los axones de los ganglios enteros cultivados.

Recientemente, Adler y Varon<sup>1</sup> han estudiado lo que denominan "factores neutróficos colinérgicos", que aplican a los factores presentes en los MCC y MMC (medio musculo-condicionado) y extracto de embrión de pollo, que posibilitan la supervivencia de las neuronas en cultivo de ganglio ciliar. Así mismo han detectado la presencia de esos factores en los tejidos intraoculares dianas de las neuronas del ganglio ciliar.

Nosotros creemos que unas células íntimamente ligadas a la estructuración de este ganglio, como son las células de glía propias, serían una de las fuentes más importantes y específicas en cuanto a la elaboración de esos factores inductores o neurotróficos, factores que por otro lado aún no han sido aislados.

De otra parte y de acuerdo con Varon<sup>11</sup> pensamos que las células de glía desempeñan un papel fundamental en la diferenciación de la neurona, y que no es necesaria la presencia de aquéllas, en los cultivos, sino la existencia en ella de los influjos químicos que posibilitan esa diferenciación, con lo cual se pueden obtener cultivos puros de neuronas creciendo en un ambiente estable y lo más similar posible a cuando crecen en el ganglio *in toto*.

### *Material y métodos.*

*Obtención del MGC.* Se parte de placas de cultivo de 35 mm de diámetro (D<sub>35</sub> Corning) revestidas de colágeno. En cada una se inoculaban 277.500 células procedentes de la disociación de ganglios ciliares de embriones de pollo con 8 días de incubación (fases 32-33, de Freeman y Vince). Los procedimientos de extracción y disociación de los ganglios ciliares fueron reseñados por Bustos y col.<sup>3</sup>.

Durante las primeras 48 horas de incubación las células crecieron en presencia de medio cardio-condicionado y posteriormente, en F12 modificado, de Spooner, suplementado con 10 p. 100 de suero fetal bovino (F12S10). Los cambios de medio se efectuaron cada 48 horas, hasta el momento en que la monocapa de células de glía en las D<sub>35</sub> era confluyente. En este momento se procedía a subcultivar las células utilizando consecutivamente frascos de cultivo, Corning, de 25 y 150 cm<sup>2</sup>, hasta obtener la confluencia o preconfluencia en estos últimos frascos; momento en el que se obtenían las diferentes cosechas de MGC, que se centrifugaban a 350 g durante 2 minutos, para eliminar los detritos, y se almacenaban a 4° C hasta el momento del uso.

Una vez lograda la preconfluencia en el Corning de 150 cm<sup>2</sup> obteníamos la 1.<sup>a</sup> cosecha (MGC 1); la segunda cosecha (MGC 2) se obtuvo a las 72 horas de la primera (previo cambio de medio a las 48 horas), cuando la monocapa glial era confluyente; y la tercera cosecha (MGC 3), después de 24 horas más de incubación. La cuarta y quinta cosechas (MGC 4 y 5) se recogieron después de un subcultivo más, con una diferencia entre ambas de 48 horas de incubación.

*Cultivos de ganglios ciliares disociados.* Los ganglios se disociaban en MGC (1...5) y la suspensión celular se inoculaba a razón de 50.00 células (neuronas y no neuronas) por D<sub>35</sub>.

Las placas habían sido previamente revestidas de colágeno, unas; y de poliornitina, otras. El colágeno fue obtenido de cola de rata, según Bornstein, y la poliornitina empleada fue de Sigma (Tipo IC). Los recuentos se hacían diariamente, hasta el sexto día, y los cambios de medio (MGC1...5), cada 48 horas.

Todas las incubaciones de los cultivos se realizaron en un incubador Heraeus, a 37° C, y en atmósfera húmeda de 5 p. 100 de CO<sub>2</sub> y 95 p. 100 de aire.

### *Resultados y discusión.*

En las curvas de supervivencia neuronal, representadas en las figuras 1 y 2, hemos asignado el valor 100 a las neuronas que sobreviven después de las primeras 24 horas de cultivo.

La eficacia de los MGC depende, en primer lugar, de la densidad de la monocapa de células no neuronales, de tal forma que las cosechas obtenidas a partir de monocapas preconfluentes (MGC 1, 2 y 3, fig. 1) permiten, en general, mayor supervivencia de las neuronas, además de mantener durante más tiempo de cultivo esa supervivencia.

Las cosechas MGC 4 y 5 (fig. 1), que fueron obtenidas de monocapas que no alcanzaban la preconfluencia, se muestran menos eficaces en los sentidos anteriormente enunciados.

Nuestras observaciones, de los cultivos sobre colágeno, en presencia de MGC, coinciden con las efectuadas por Helfand y col.<sup>8</sup> y Bustos y col.<sup>3</sup> respecto a la densidad celular, para cosechas de medio cardio-condicionado (MCC).

La diferencia más notable entre el MGC y el MCC se establece en cuanto al desarrollo y complejidad de la red de axones que las neuronas muestran en el cultivo. Así, el entramado axonal promovido por el MGC (fig. 3; e, f, g y h) es mucho más manifiesto que el originado por el MCC.

Cuando el substrato empleado es colágeno, se observa en los cultivos, al cabo de 72 horas, una tendencia de las neuronas a congregarse hacia el centro de la placa D<sub>35</sub>, bien por las fuerzas que se ejercen sobre el menisco del medio de cultivo, bien por el empuje del soma neuronal al crecer y desarrollarse los axones o por ambos motivos. Creemos que la causa de eso es que al cabo de dicho período de tiempo se observan alzas en la supervivencia, cuando la tendencia inicial de la curva era a la baja respecto a la supervivencia. Además, al ser esta zona central aquella en la que más proliferan las células no neuronales, las neuronas tienden a esta agregación en dicha zona (fig. 3, e, f y h) para adoptar una conformación lo más similar posible a la que poseen en el ganglio sin disociar. Este efecto también parece ser que se promueve más activamente cuando se utiliza MGC, que cuando se emplea MCC (Bustos y col. pendiente de publicación).

La poliornitina tipo IC, como substrato de cultivo, no ofrece diferencias entre el MCC y el MGC, ya que las neuronas, bajo estas condiciones, adoptan una morfología idéntica, es decir, soma ovalado muy refringente y con escaso o nulo desarrollo del axon (fig. 3, c, d), por lo que estas células no se contabilizaron como neuronas diferenciadas en cultivo en los recuentos; además, como se observa en la fig. 2,

las pocas neuronas que sobreviven y que emiten una corta neurita disminuyen rápidamente a los 3 días de cultivo.

El aspecto de nuestros cultivos sobre colágeno y poliornitina difiere totalmente de los obtenidos por Adler y Varon<sup>1,11</sup>, ya que éstos empleando MCC y extracto de embrión de pollo, encuentran el mayor desarrollo de la red de axones y supervivencia sobre substratos de poliornitina, y sobre colágeno ofrecen el aspecto que nosotros mostramos sobre poliornitina, en presencia de MGC.

Una posible explicación a tal fenómeno pudiera estar en la diferencia de pesos moleculares de los polímeros sintéticos empleados en ambos casos, para el revestimiento de las placas de cultivo, pues, como se sabe (Collins<sup>5</sup>) estos polímeros ligan los factores inductores y no es necesaria la presencia continua del medio condicionado en el cultivo. Naturalmente, la (s) proteína (s) propia (s) que actúa (n) como factor inductor, en cada uno de estos medios, también parece ser que habrá (n) de ser distinta (s), dependiendo del origen de las células que condicionan el medio, del complejo sérico utilizado como suplemento del medio basal y de la fase exacta del desarrollo embrionario.

Por esto, pensamos que el aislamiento y purificación de estos factores inductores se habrá de efectuar para cada uno de los diversos medios condicionados hasta ahora empleados, y para otros que en un futuro se utilicen, al igual que se hizo para el NGF, toda vez que Helfand y col.<sup>8</sup> han demostrado la no equivalencia entre estos componentes.

#### *Bibliografía.*

1. Adler, R. and S. Varon. *Brain Research*. 188, 437-448 (1980).
2. Alcaín Tejada, F. J. y M. Bustos Ruiz. *Trab. Inst. Cajal*. 70, 36-49 (1978).
3. Bustos Ruiz, M., F. J. Alcaín Tejada, F. Niño Larrú y D. Jordano Barea. *Arch. zootec.*, 28, 271-284 (1979).
4. Bustos Ruiz, M., F. J. Alcaín Tejada y F. Padilla Alvarez. Pendiente de publicación en *Trab. Inst. Cajal*.
5. Collins, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 5210-5213 (1978).
6. Ebendal, T. *Develop. Biol.* 72, 276-290 (1979).
7. Ebendal, T. and C. O. Jacobson. *Exp. Cell. Res.* 105 379-387 (1977).
8. Helfand, S. L., G. A. Smith and Wessell. *Develop. Biol.* 50 541-547 (1976).
9. Letourneau, P. C. *Develop. Biol.* 44 77-91 (1975).
10. Ludueña, M. A. *Develop. Biol.* 33 268-284 (1973).
11. Varon, S., M. Manthorpe and R. Adler. *Brain. Research*. 173, 29-45 (1979).
12. Varon, S., and Saier. *Exper. Neurol.* 48 135-162 (1975).

BUSTOS RUIZ Y ALCAIN TEJADA: CULTIVO DE NEURONAS EN MGC.

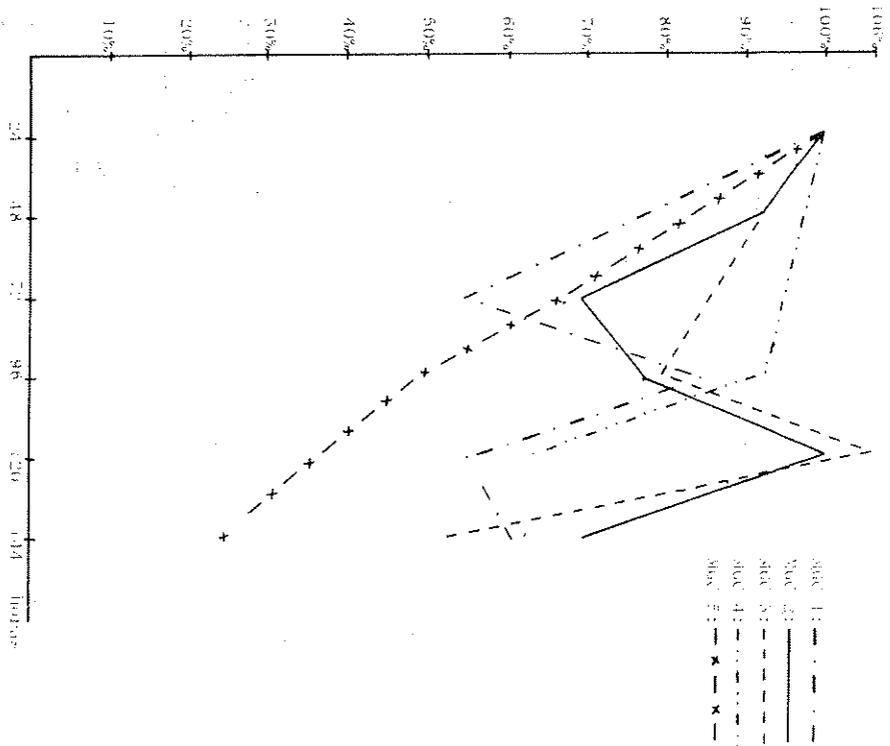


FIG. 1. Curvas de supervivencia neuronal de cultivos de ganglio ciliar dissociado en presencia de diferentes cosechas de medio glio-condicionado (MGC1...5).

Substrato de cultivo: colágeno reconstituido de cola de rata.

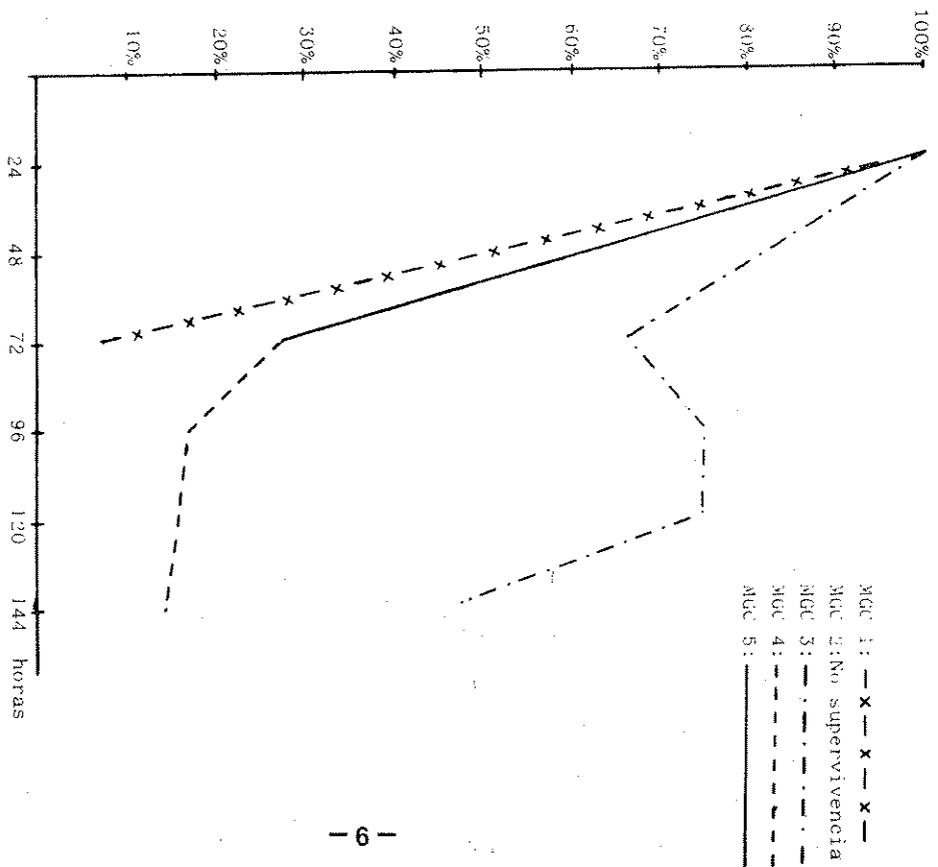
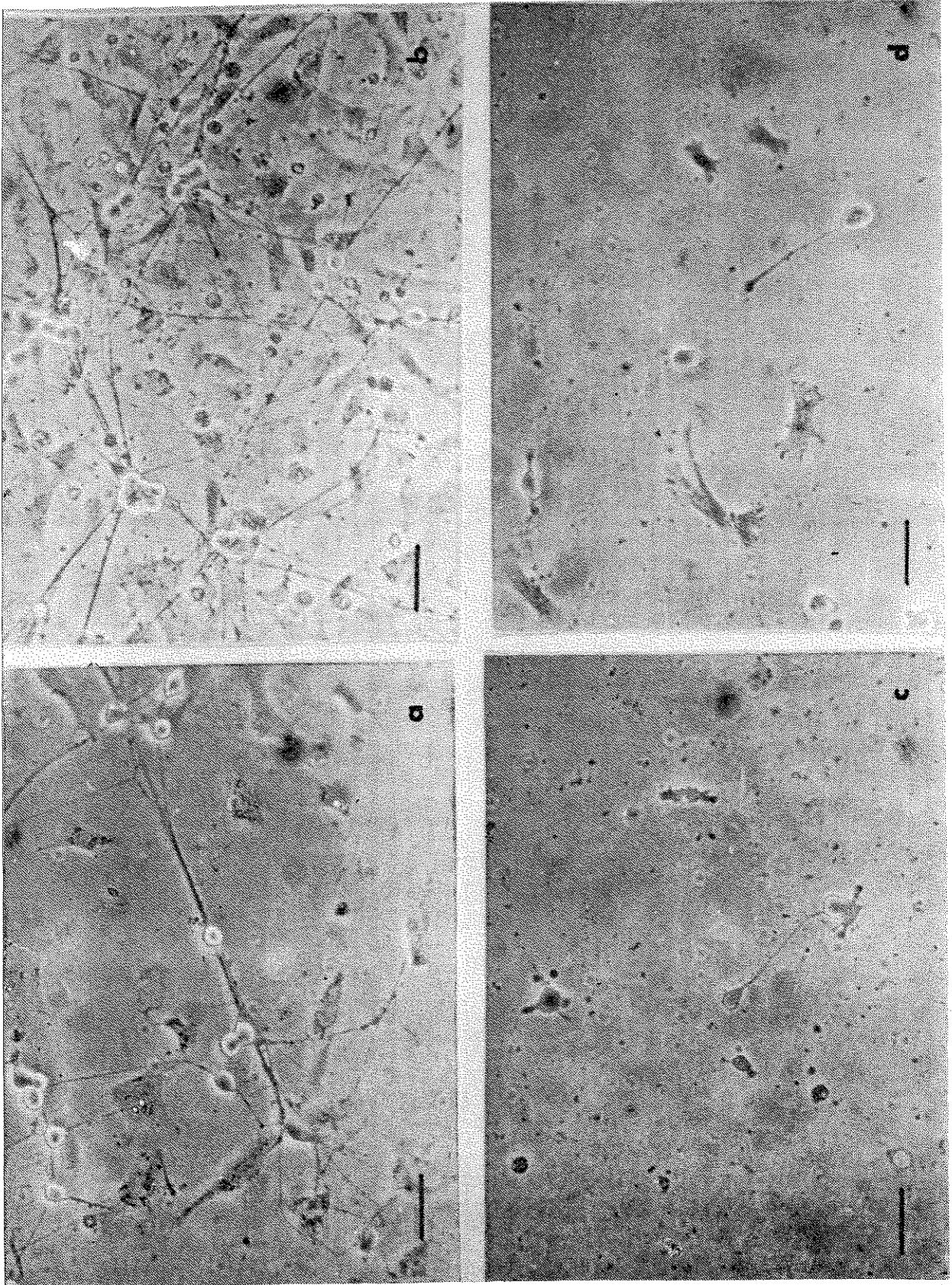
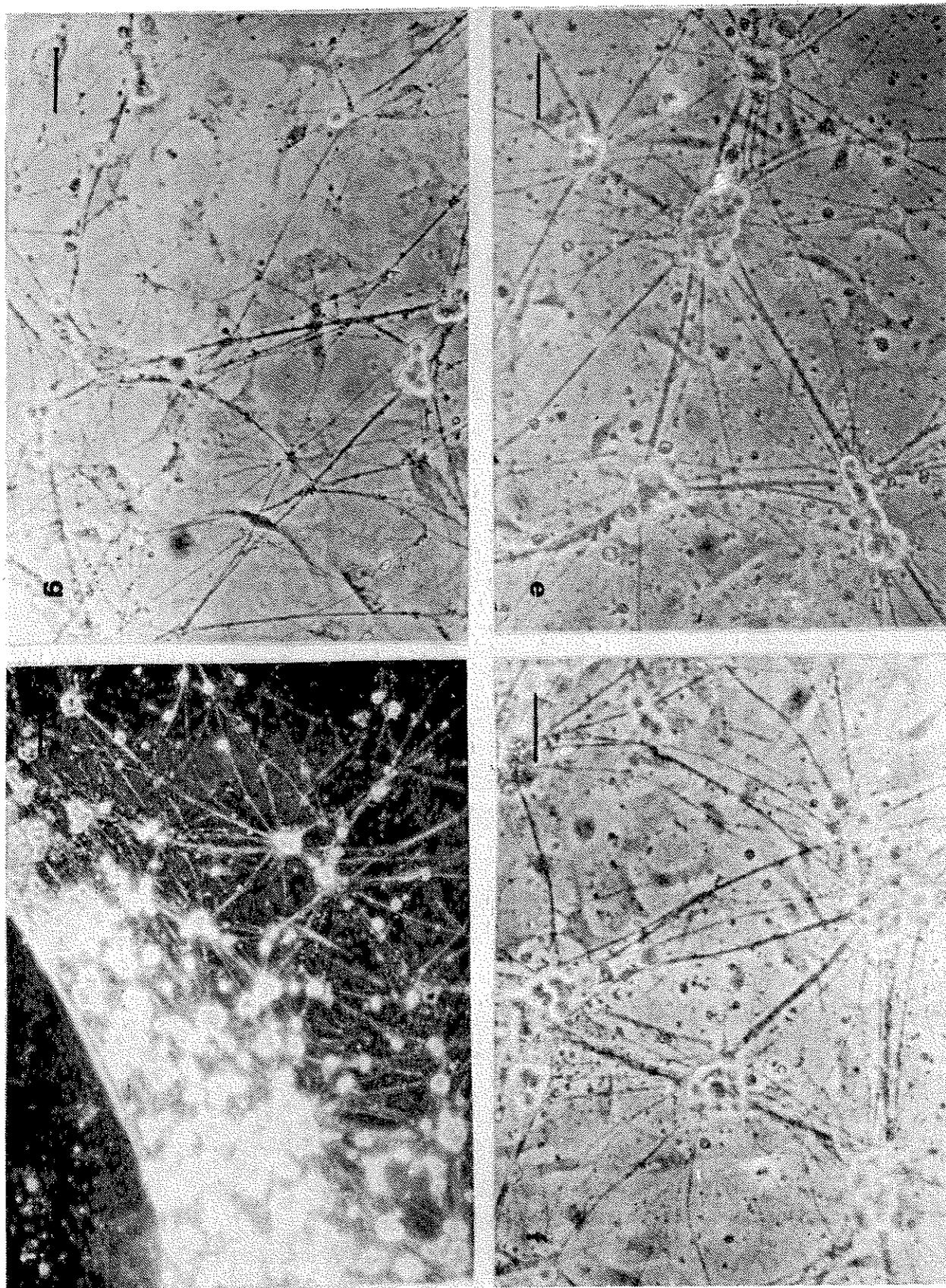


FIG. 2. Curvas de supervivencia neuronal de cultivos de ganglio ciliar dissociado en presencia de diferentes cosechas de medio glio-condicionado (MGC1...5).

Substrato de cultivo: poliovirus tipo 1C.





*Iconografía.*

FIG. 3. Diferentes aspectos de los cultivos de ganglios ciliares disociados en medio glio-condicionado (MGC). Las neuronas son las células esféricas y piriformes de gran refringencia.

a y b; Cultivos de 3 días sobre sustrato de colágeno (a = zona periférica de la placa D<sub>35</sub>, b = zona central), c y d: cultivos de 3 días sobre poliornitina; e y f: cultivos de 3 y 5 días respectivamente sobre colágeno. (Obsérvese el aumento en la reagregación neuronal); g: cultivo de 3 días sobre colágeno; h: cultivo de 5 días sobre colágeno.

a y b: MGC 1; c y d, e y f: MGC 3; g y h: MGC 4.

a, b, c, d, e, f, g 10 x 10 contraste de fases oscuro. h 40 x 10 campo brillante.  
Barra calibración: a, b, c, d, g = 50 nm    h = 100 nm