

INFLUENCIA DE DISTINTOS MEDIOS CARDIO-CONDICIONADOS SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR DE EMBRION DE POLLO.

(INFLUENCE OF DIFFERENT HEART-CONDITIONED MEDIA ON CELL CULTURES OF CHICK EMBRYO CILIARY GANGLIA)

por

M. BUSTOS RUIZ, F. J. ALCAIN TEJADA, F. NIÑO LARRU Y D. JORDANO BAREA*

Introducción.

Los medios condicionados (MC) y los factores de crecimiento nervioso (NGF) se vienen empleando en los últimos años en los cultivos *in vitro* de células nerviosas, como ingredientes que promueven la emisión del axón neuronal y favorecen posteriormente su crecimiento y la supervivencia de las neuronas en cultivo, durante períodos de 3 semanas o más.

Entre otros autores, Helfand, Letourneau y Collins (1976; 1975; 1978) han trabajado en el aislamiento de los factores inductores (FI) presentes en diversos medios condicionados, lo que facilitaría, una vez caracterizados y purificados, el empleo de medios de cultivo más específicos para el crecimiento y supervivencia de las neuronas cultivadas.

También se ha observado que la naturaleza del sustrato sobre el que se desarrollan los cultivos de células nerviosas tiene gran importancia en cuanto al número de neuronas con prolongaciones (Letourneau, 1975), aunque parece ser que el sustrato no sólo aumenta la adherencia, sino que retiene y liga, en algunos casos, parte de los FI, como sucede con la poliornitina (Collins, 1978).

Los MC que normalmente se utilizan son: el medio cardio-condicionado (MCC) (Ludueña, 1973), el medio glio-condicionado (MGC) (Varon y Oger, 1974), y los medios músculo-condicionados (MMC) (Fischbach, 1972). Todos ellos se obtienen a partir de una monocapa preconfluyente o confluyente de células embrionarias cardíacas, gliales o musculares, respectivamente, obtenida en un cultivo celular primario.

Usualmente no se suelen obtener más de dos cosechas de MC por cultivo primario, lo que obliga a realizar un nuevo cultivo cada vez que se desee trabajar con MC.

* Departamento de biología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. (España).

Recibido para publicación el 29-9-1979.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

Uno de los objetivos de este trabajo es la comprobación de la capacidad de las células embrionarias en cultivo para producir más de dos cosechas de MCC. También hemos intentado dilucidar, en primera aproximación, si los subcultivos de la monocapa de células cardíacas mantienen la potencialidad de seguir produciendo un MCC que posibilite altos niveles de supervivencia y crecimiento neuronal.

La ramificación de las neuritas se desarrolla notablemente en presencia de MCC según los patrones conocidos (Bray, 1973; Strassmann y Wessells, 1973), y aunque en el presente trabajo no se ha prestado especial atención a este aspecto, creemos que la edad de los cultivos cardíacos tiene gran influencia sobre la aparición de un mayor número de prolongaciones por neurona.

En la purificación y en la concentración de los MC se han empleado usualmente métodos de ultrafiltración y diálisis (Helfand *et al.* 1976; Collins, 1978). En algunos casos hemos podido detectar cierta retención por parte de las placas ultrafiltrantes, porque en los MCC ultrafiltrados la capacidad inductora de la emisión de neuritas desaparecía casi totalmente.

También hemos estudiado durante períodos de hasta 12 días, en cultivos continuos de corazones disociados de embriones de pollo de 8 días de incubación, la capacidad de dichos cultivos para producir un MCC que presenta una eficacia más o menos elevada, según la edad de las células subcultivadas, disminuyendo en determinados momentos la densidad celular de la monocapa cardíaca.

Material y métodos.

Preparación del cultivo primario cardíaco. Se extraían 14 corazones de embrión de pollo de 8 días de incubación (fases 31-32; Hamburger y Hamilton, 1951) y después de haberlos desgarrado se depositaban en solución salina de Hank, libre de Ca y Mg, y se incubaban durante 10 minutos a 37° C. Posteriormente se tripsinizaban en bacto-tripsina (Difco) al 0,25 por 100, en solución salina de Hank libre de Ca y Mg, durante 20 minutos en un baño oscilante, a 37° C. A continuación se hacían tres lavados consecutivos con F12 modificado (Spooner, 1970). En el último baño se procedía a la disociación, haciendo pasar los corazones repetidas veces (ca. 40) a través de una pipeta de 5 ml, para obtener una suspensión celular homogénea. Dos baños más en F12 modificado son convenientes para eliminar los restos de tripsina. Las células disociadas se obtenían centrifugándolas a 350 g durante 2 minutos. Los sobrenadantes quedaban siempre transparentes.

Finalmente, las células eran suspendidas en 4 ml de F12 modificado y suplementado con 10 por 100 (v/v) de suero fetal bovino (Difco) inactivado (F12S10). Luego se inoculaba un frasco de cultivo de tejidos (Corning) de 25 cm² que contenía

15 ml de F12S10, con una suspensión de 10^7 células. Los cultivos se incubaban a 37° C, en atmosfera húmeda y 5 p. 100 de CO_2 . Esta concentración gaseosa se obtenía abriendo el fluidómetro de la estufa de cultivo hasta un punto tal que una solución de bicarbonato de sodio 3.7×10^{-2} M se mantenía a un pH de 7,8. El incubador era de la marca Masterline (modelo 3185/3282) y carecía de carbostato. Después de 24 horas de incubación se decantaba el medio y se añadían 15 ml de F12S10 nuevo.

Obtención de los MCC. Al cabo de 4 días más de incubación se obtenía la primera cosecha de MCC que se ultrafiltraba mediante un filtro de Millipore de 0,22 micras de diámetro y se diluía en F12S10 nuevo, a una concentración de 1:1 (MCC 1).

A la monocapa confluyente se le volvían a añadir 15 ml de F12S10 nuevo y se incubaba durante 24 horas más. En este momento se obtenía la segunda cosecha de MCC, que también se ultrafiltraba en las mismas condiciones que la anterior y ya no se diluía (MCC 2).

Como el cultivo aparecía estratificado se procedió a subcultivar las células cardíacas en la forma que a continuación se indica: una vez decantado el MCC 2, se lavaba el cultivo con solución salina de DeHaan, luego se tripsinizaba añadiendo 15 ml de bacto-tripsina (Difco), durante 10 minutos a 37° C. Posteriormente se despegaban y dispersaban las células con una pipeta Pasteur. La suspensión celular así obtenida se centrifugaba a 350 g durante 2 minutos y se lavaba dos veces con F12. Finalmente, eran resuspendidas en 4 ml de F12S10 con 3×10^6 células en un frasco de plástico para cultivo de tejidos de 25 cm^2 (Corning) que contenía 15 ml de F12S10 fresco. A este frasco procedente de subcultivo se le denominaba frasco *S* y se incubaba a 37° C.

Al frasco antiguo, en el que habían quedado células adheridas, se le añadían 15 ml de F12S10 nuevo, se mantenía en incubación y se le denominaba frasco *R* (reserva).

A las 48 horas de incubación la monocapa del frasco *R* era dictiocítica, y la del frasco *S* preconfluyente. Se obtenían, en este momento, dos cosechas más de MCC: una del frasco *R* (MCC 3) y otra del frasco *S* (MCC 7). Ambos MCC se ultrafiltraban a través de un filtro Millipore de 0,2 micras de diámetro de poro.

Luego se añadían a cada frasco 15 ml de F12S10 nuevo y se continuaba la incubación durante 24 horas más; momento en que se obtenían otras dos cosechas: el MCC4 del frasco *R* y el MCC8 del frasco *S*. Ambos se centrifugan durante 5 minutos a 350 g. Se repetía el proceso anterior y se obtenían, respectivamente, el MCC5 y el MCC9, que también se centrifugaban en las mismas condiciones.

Por último, los MCC6 y MCC10 se obtenían al cabo de 48 horas más de incubación en F12S10, después de centrifugar.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

A todos los MCC se les ajustaba el pH entre 7,3-7,5 con CHIN y se mantenían en refrigeración a 4° C hasta el momento de usarlos.

Las monocapas, tanto en el frasco *R* como en el *S*, fueron evolucionando gradualmente desde dispersas a estratificadas, después de 6 días de cultivo continuado.

Extracción de los ganglios ciliares. Los embriones de pollo de 8 días de incubación eran decapitados y las cabezas se colocaban en una placa de Petri con solución salina de Hank. Con una pinza en la mano izquierda se clava parcialmente en el centro de la masa encefálica, para sujetar y fijar la cabeza. Con otra pinza en la mano derecha se rasgan las meninges a nivel de uno de los ojos, traccionando la conjuntiva y dejando limpia y al descubierto la esclerótica, procurando no romperla. Luego, con la pinza de la mano izquierda suavemente apoyada en la órbita del ojo, se tracciona éste con la pinza de la mano derecha hasta visualizar el músculo recto dorsal que se secciona con esta misma pinza. Posteriormente la pinza izquierda se introduce unos milímetros en la órbita y la derecha también, pero a nivel del ojo, procurando que el nervio óptico quede entre las dos bocas de esta última pinza. Se efectúa un movimiento de tracción continuo y lento y se enuclea el ojo de tal forma que en un momento determinado se observa el ganglio ciliar suspendido solamente por los nervios oftálmico y coroideos entre la órbita y el ojo parcialmente enucleado. Se sigue la tracción lentamente, y así podrá observarse si el ganglio ciliar queda en la cuenca ocular, en el ojo o en otra posición. De esta forma la obtención del ganglio es casi siempre segura y se gana tiempo al no tener que extraer toda la masa encefálica. Además, la visualización continua del ganglio aumenta las posibilidades de éxito cuando no queda en el ojo, cerca del muñón del nervio óptico. Con el otro ojo se procederá de la misma forma.

Con esta nueva técnica se pueden extraer de 40 a 50 ganglios en una hora, con un alto rendimiento de ganglios por número de cabezas empleadas (eficacia del 80 por 100).

Los ganglios ciliares así obtenidos se transfieren a una placa de Petri de plástico, de 35 mm de diámetro (Corning, D₃₅), con solución salina de Hank, y se seccionan los nervios oftálmico y coroideos.

Preparación de los cultivos de ganglios ciliares disociados. Los ganglios ciliares se disociaron siguiendo la técnica de Collins (1978) con la variante de que la disociación se hacía en MCC. Las D₃₅ estaban revestidas con colágeno obtenido según Bornstein (1958), y cada placa se inoculaba con $3,5 \times 10^4$ células en 2 ml de los distintos MCC (1.....10) (véase lo dicho anteriormente). La incubación se hacía a 37° C en las mismas condiciones que para los cultivos cardíacos. El medio de cultivo (MCC) era renovado cada 48 horas y los recuentos de neuronas con prolongaciones, células no neuronales y células redondas se hacían diariamente.

Las observaciones, fotomicrografías y recuentos se llevaron a cabo en un microscopio invertido Nikon, con contraste de fases y equipado de incubador de aire seco.

Todas las operaciones tuvieron lugar asépticamente, con material y reactivos estériles.

Resultados y discusión.

Capacidad inductora de los MCC. La monocapa obtenida del cultivo primario cardíaco evolucionaba progresivamente desde dispersa a confluyente durante los cinco días de incubación. Al cambiar el medio, y manteniendo 24 horas más la incubación de la monocapa confluyente, se producía la estratificación en algunas zonas del cultivo celular. El comienzo de la estratificación era la señal que nos indicaba el momento de subcultivar las células cardíacas. Los subcultivos evolucionaban más rápidamente y lograban la formación de la monocapa confluyente en 3 días de incubación para los frascos *S*, y en 4 días, para los frascos *R*. Las diferencias en la proliferación celular cardíaca entre los cultivos primarios y los subcultivos puede ser debida a la mayor mortandad celular durante el proceso de obtención de la suspensión celular de los cultivos primarios, que es más largo y complejo que el de los subcultivos. También pensamos que las células cardíacas, en el momento de ser subcultivadas, están más adaptadas a las condiciones *in vitro* que cuando se disocian de corazones enteros, por lo que la mortandad celular también se vería incrementada en este último caso, y la adaptación a las condiciones de cultivo se encuentra más dificultada para los cultivos primarios que para los subcultivos.

La diferencia en la proliferación entre los frascos *S* y los *R* puede deberse a que en los primeros la densidad celular del inóculo se calculaba de forma exacta, según las condiciones patrón de cultivo (3×10^6 células/frasco), mientras que en los frascos *R* las células que permanecían adheridas eran las que habían resistido el tratamiento con tripsina, por lo que la densidad celular era notablemente inferior a la de los frascos *R*. De acuerdo con DeHaan (1967), creemos que sólo del 20-30 p. 100 de las células cardíacas sembradas sobreviven y se adhieren. Coincidimos con él en reconocer que también tiene gran influencia sobre la supervivencia el procedimiento empleado en la obtención del cultivo primario, así como las pequeñas variaciones del pH durante la incubación; variaciones que en la mayoría de los casos no son detectables. Por todo esto nuestros resultados difieren de los de Helfand (1976), quien obtiene la monocapa confluyente de cultivos primarios a los 3 días de incubación, y se aproximan más en este sentido a los de Collins (1978). No obstante, los resultados conseguidos por nosotros concuerdan plenamente con los autores anteriormente citados, en lo que se refiere a índice de proliferación de nuestros subcultivos.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

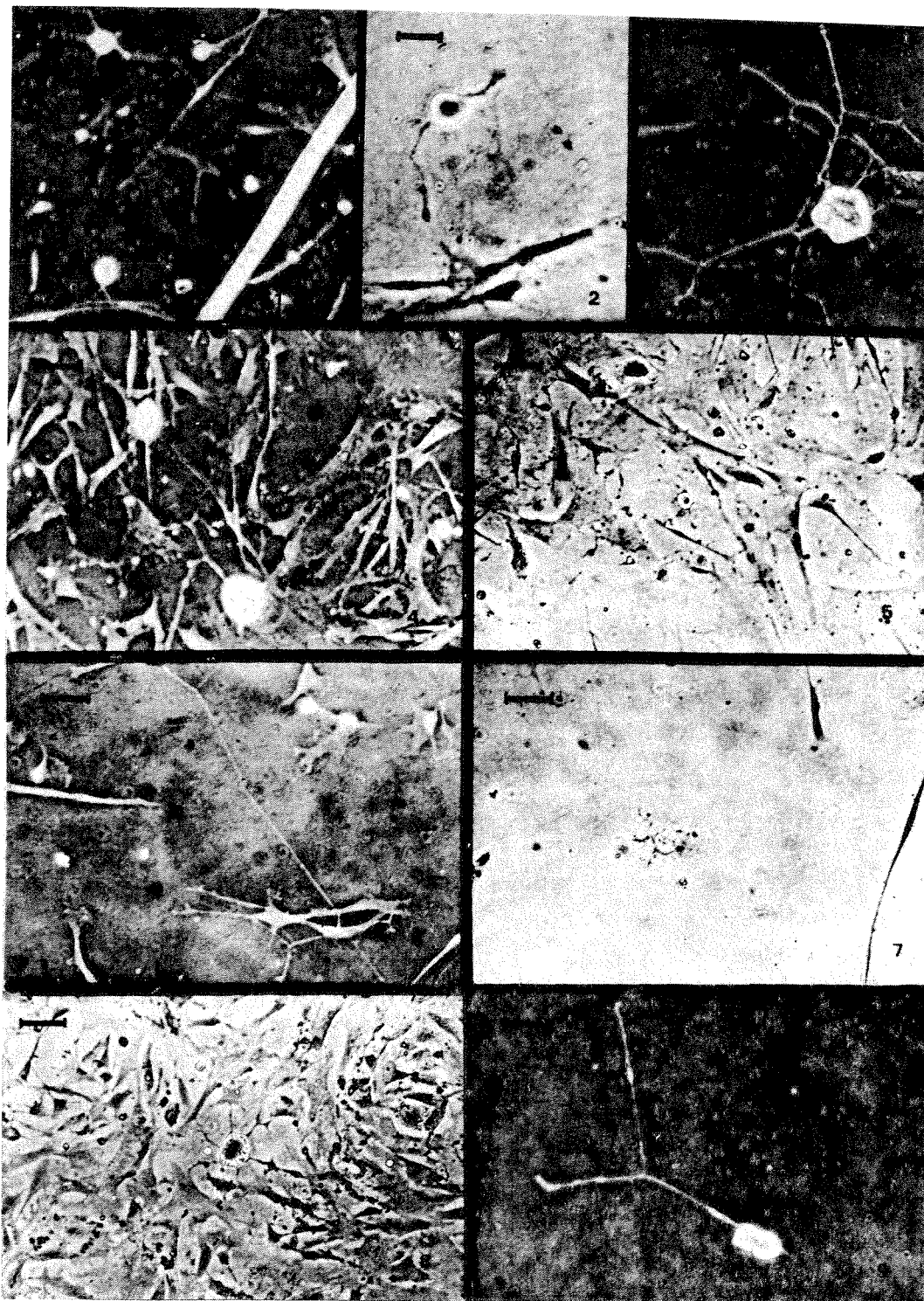
Helfand *et al.* (1978) indican que la actividad y potencialidad del MCC, respecto a la regeneración del axón de la neurona, quedan retenidas en los filtros Amicon PM-50.

Collins (1978) utiliza diferentes títulos de dilución del MCC y posteriormente ultrafiltraba los MCC, diluidos en F12S10, a través de ultrafiltros de 0,2 micras de diámetro y concluye que la dilución del MCC retrasa la regeneración de los axones *in vitro*.

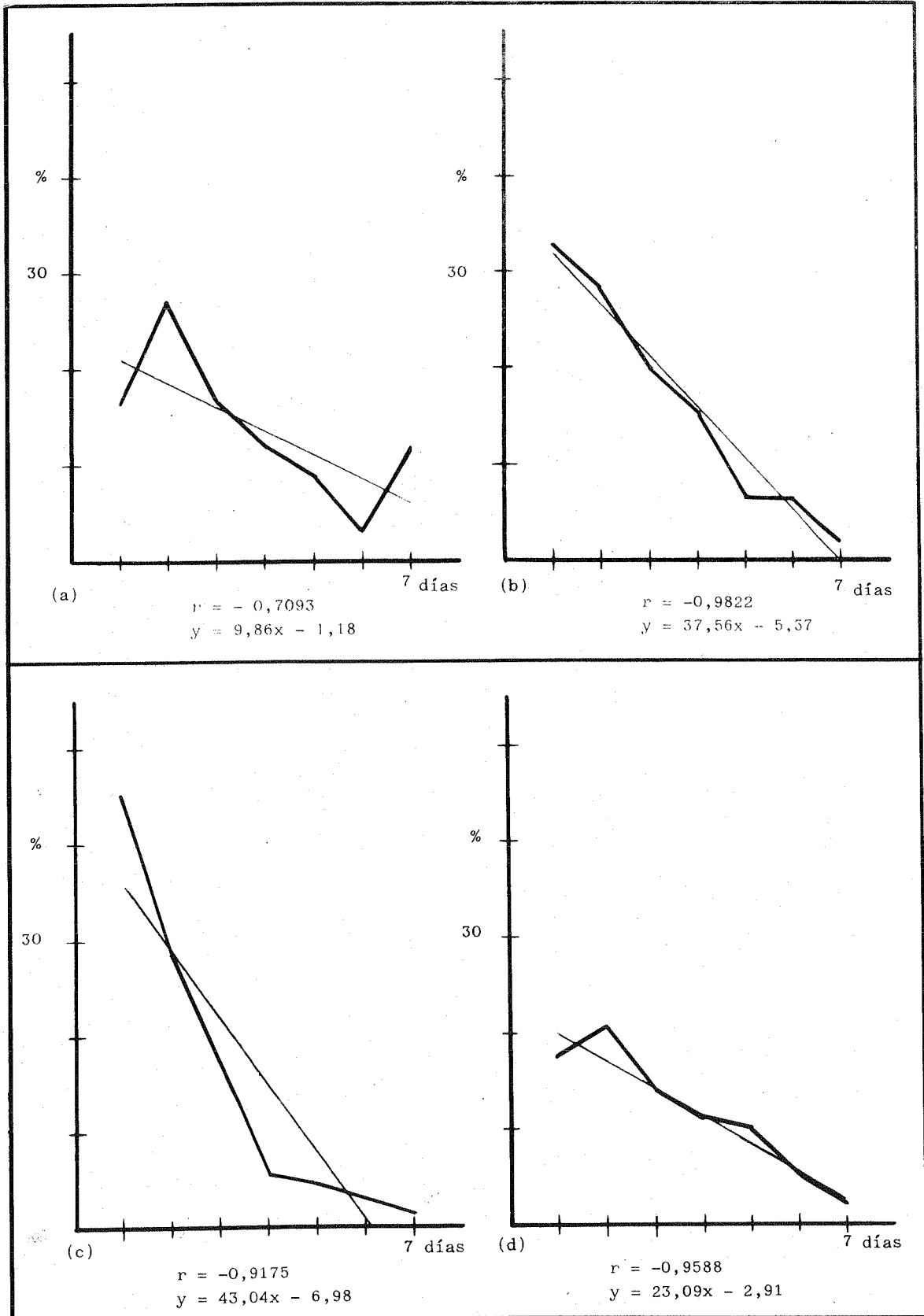
En nuestros experimentos, hemos comprobado que la dilución del MCC, junto a la ultrafiltración, anula prácticamente la capacidad de este medio para la regeneración axonal, ya que en las placas sembradas con MCC1 y MCC2 no se observan neuronas sobrevivientes.

Otro tanto puede decirse para el MCC3, si bien este medio no fue diluido pero sí ultrafiltrado. Pero de la influencia que ejercía el MCC3 sobre los cultivos de neuronas disociadas obtuvimos una conclusión adicional. Este medio se obtenía de una monocapa dictiocítica de un frasco R, después de 48 horas de incubación, y una vez añadido a las placas con neuronas, prácticamente no poseía ningún efecto favorable, por lo que creemos que la densidad celular de la monocapa cardíaca puede tener una gran influencia sobre la elaboración de suficiente cantidad de factor inductor (FI), de un FI de alta potencialidad, o quizás puede influir en ambos sentidos. Por lo tanto, un MCC que proceda de una monocapa dispersa o dictiocítica no posee capacidad inductora de la elongación axónica, ni para el mantenimiento de la supervivencia de las neuronas *in vitro*. Además el MCC de una monocapa que progresivamente ha evolucionado de dispersa a confluyente, sin cambiar el medio (F12S10) durante 4 ó 5 días, posee cierta capacidad para el mantenimiento y regeneración de las neuronas, pero esta capacidad es muy efímera, ya que son muy pocas las neuronas que comienzan a emitir axones, y las pocas que lo hacen los retraen y mueren a las 6-8 horas de cultivo. También es posible que durante todo este tiempo (4-5 días) las células cardíacas empobrezcan el F12S10 y descarguen en este medio tal cantidad de catabolitos que incluso se puede perjudicar la proliferación de la glía y demás células no neuronales.

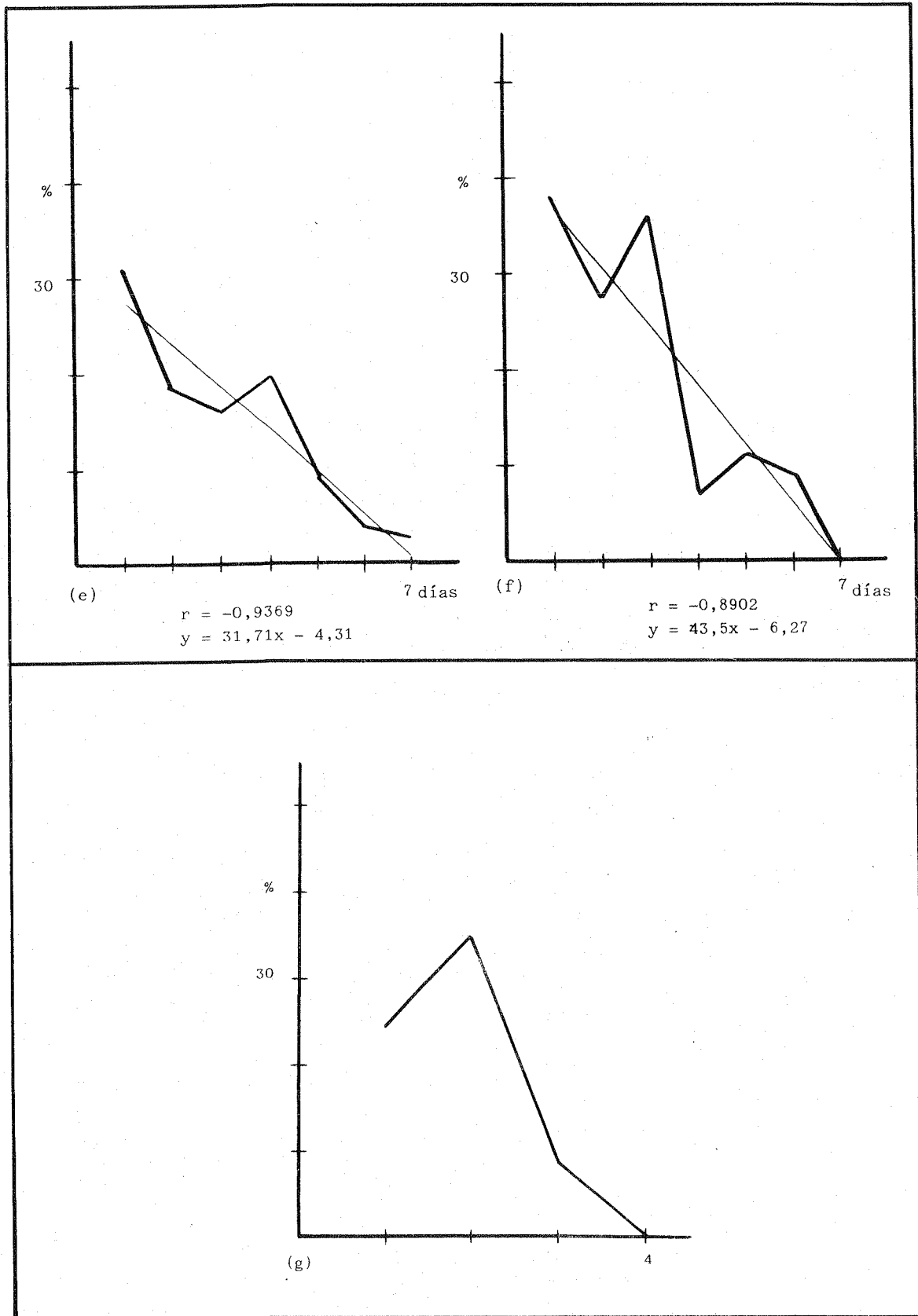
Otra de las condiciones para extraer un MCC rico es no dejar el mismo medio a las células cardíacas durante más de 48 horas, siempre que en este tiempo no se haya producido una monocapa confluyente. Es decir, cuando la monocapa es aún dictiocítica a las 48 horas de incubación, aunque a los 3 días sea preconfluyente y a los 4 días llegue a ser confluyente, si no se ha renovado el medio, el MCC cosechado no es aprovechable para el mantenimiento en cultivo de las neuronas ciliares disociadas. Esto puede aplicarse tanto a los cultivos primarios como a los subcultivos.



BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR



BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR



Iconografía.

Figura 1.—Neurona multipolar de 9 días de cultivo en MCC6. Contraste de fases brillante. 100 aumentos.

Figura 2.—Neurona bipolar de 10 días de cultivo en MCC10. Contraste de fases oscuro. 200 aumentos.

Figura 3.—Grumo neuronal con abundante ramificación de los axones. Cultivo de 48 horas en MCC6. Contraste de fases brillante. 200 aumentos.

Figura 4.—Neuronas de gran tamaño. Cultivo de 9 días en MCC6. Contraste de fases brillante. 100 aumentos.

Figura 5.—Aspecto general de un cultivo a los 13 días en MCC6. Contraste de fases brillante. 100 aumentos.

Figura 6.—Gran desarrollo de un axón en un cultivo de 9 días en MCC5. Contraste de fases brillante. 100 aumentos.

Figura 7.—Neurona de 13 días en cultivo en MCC5. Nótese la retracción de los axones y la aún aparente multipolaridad. Contraste de fases oscuro. 100 aumentos.

Figura 8.—Neurona multipolar en cultivo de 17 días en MCC6. La proliferación de la glía y las numerosas sinapsis mantienen la supervivencia neuronal. Contraste de fases oscuro. 100 aumentos.

Figura 9.—Neurona con bifurcación axonal. Cultivo de 48 horas en MCC5. Contraste de fases brillante. 200 aumentos.

—Escala: 100 micras, en las figuras 1, 4, 5, 6, 7 y 8; 50 micras en las figuras 2, 3 y 9.

Figura 10.—Porcentajes de neuronas que han regenerado axones en función del tiempo y que han crecido en diferentes MCC: a) MCC4; b) MCC5; c) MCC6; d) MCC8; e) MCC9; f) MCC10; g) MCC7.

r = Coeficiente de correlación.

línea gruesa = curva experimental.

línea fina = línea recta de tendencia.

Por todo lo anteriormente expuesto, creemos que la centrifugación de los MCC, como técnica de eliminación de los detritus celulares, es mucho más eficaz que la ultrafiltración, si bien este último método por sí solo, sin dilución y con la condición de preconfluencia a las 48 horas, sólo disminuye la capacidad diferenciadora del MCC, sin anularla ni hacerla efímera, como puede verse en el gráfico correspondiente al MCC7 (fig. 10g) que se obtuvo en las condiciones antes expuestas.

Cuando las células cardíacas han producido una monocapa preconfluente en 48 horas de incubación, cambiando el medio de cultivo cada 24 horas, las cosechas obtenidas tienen capacidad diferenciadora y son muy eficaces para la supervivencia y regeneración neuronal, al menos durante 7 días.

Comprobamos que la potencialidad para la producción de FI por la células cardíacas, tanto las procedentes de un cultivo primario como las subcultivadas, se conserva hasta los 12 días de cultivo (continuo y/o subcultivo). También sospechamos que estas células se podrían subcultivar durante períodos de tiempo más prolongados y seguirían manteniendo su capacidad inductora neuronal, y aún la técnica de congelación y mantenimiento en nitrógeno líquido podría aportar un gran ahorro de tiempo y de material en la consecución de una línea celular cardíaca óptima para la elaboración de un MCC de alto potencial, con la ventaja de que se eliminaría la variabilidad entre incubaciones (para la obtención de embriones).

Supervivencia neuronal in vitro en los distintos MCC. Las neuronas sobrevivían en cultivo al menos durante 15 días, cuando crecían en MCC (4, 5, 6, 8, 9, 10), y los axones al crecer adoptaban distinto desarrollo y configuración, dependiendo del MCC empleado. Los recuentos y cálculos estadísticos se realizaron durante los 7 primeros días de cultivo, ya que el número de neuronas por placa, después de este período, se comprobó que era reducidísimo. Se observaba que en las primeras 48 horas la evolución morfológica de las neuronas en los cultivos con los diferentes MCC, presentaba una estrecha relación con el porcentaje de neuronas que crecían en MCC (4, 5 y 6) procedentes de células cardíacas de frascos *R* y las neuronas que crecían en MCC (8, 9 y 10) de los frascos *S* (ver figura 10: a, b, c, d, e y f).

Parece que posteriormente decrece la relación entre los porcentajes de las neuronas cultivadas en los diferentes MCC, en las distintas placas.

Realizando un análisis de varianza sobre los datos obtenidos (MCC 4, 5, 6, 8, 9, 10) observamos que no había diferencia significativa entre los distintos MCC empleados en los cultivos neuronales para el 95 p. 100 de los casos. Los coeficientes de correlación obtenidos indican que las curvas experimentales se ajustan a las curvas teóricas.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

Por lo que se refiere a la supervivencia neuronal de los cultivos, observamos que pasados los primeros días, los MCC procedentes de células cardíacas mantenidas durante 12 días en cultivo continuo (frasco *R*) o subcultivados durante 6 días (frasco *S*), poseen una mayor capacidad de mantenimiento.

En general, los porcentajes de neuronas regeneradas en nuestros cultivos eran más bajos que los obtenidos por otros autores (Helfand *et al.* 1976; Collins, 1978; Letourneau, 1975, entre otros), si bien nuestros datos se refieren a neuronas presentes en los cultivos y no a las neuronas sembradas inicialmente.

De acuerdo con Ludueña *et al.* (1976) vimos que entre los 4 y los 6 días se produce en general un marcado descenso en el número de neuronas que sobreviven en los cultivos.

Nishi y Berg (1977 y 1979) consiguieron supervivencias de hasta 6 semanas, en neuronas de ganglios ciliares disociados, cuando cultivaban con células musculares esqueléticas. Creemos que esta mayor permanencia neuronal se debe a que al estar presentes de manera continua las células que elaboran el MCC, los factores inductores se renuevan también de forma constante. Además, las neuronas encuentran más tempranamente sus células diana, con lo que tanto la adherencia como las posibles interacciones se facilitan.

Aunque el substrato que empleábamos para el crecimiento neuronal fue colágeno, una vez que en las placas de cultivo había proliferado la glía, las neuronas supervivientes desarrollaban más aún sus axones y eran capaces de permanecer durante más días en cultivo. Esta observación coincide con la de Letourneau (1975), Oger *et al.* (1974) y Varon (1974).

Comparando nuestros datos con los obtenidos por los autores que siembran las neuronas sobre poliornitina y polilisina (Ludueña, 1973; Collins, 1978; Helfand *et al.*, 1976 y Letourneau, 1975, entre otros), observábamos que los substratos collagenizados son bastante menos eficaces para la supervivencia y regeneraciones neuronales, y probablemente se deba a la menor adherencia que presta el colágeno frente a los demás substratos citados.

Morfología neuronal. Las neuronas en cultivo presentaban, en ciertos casos, diferente morfología, influenciadas por el MCC en que vivieron (véase lo dicho anteriormente). Estas diferencias se relacionaban, además, con el tiempo de permanencia en cultivo. De acuerdo con Nishi y Berg (1977), el diámetro medio del soma neuronal aumenta desde los dos días de cultivo hasta las dos semanas, si bien observamos que en este momento el diámetro medio era de 45 micras, con tamaños que van desde 30 hasta 90 micras.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

Landmesser y Pilar (1974) establecieron que, *in situ*, a las dos semanas es cuando mejor se identifican las dos poblaciones neuronales constituyentes del ganglio ciliar. Nosotros hemos visto que a partir de los 7 días se facilita la identificación de ambas poblaciones y medimos poblaciones neuronales de 32 y 50 micras de media, aunque preponderaba la población de las neuronas de mayor tamaño (Figs. 1, 2 y 4).

En las placas en las que las células no neuronales presentaban abundante proliferación, el desarrollo de los axones se potenciaba y presentaba unas ramificaciones más complejas (figs. 6 y 8). Aunque en los primeros días de cultivo las neuronas eran bipolares (fig. 9), conforme transcurre el tiempo algunas se transformaban en tripolares y hasta en multipolares, pero en este último caso sólo uno o dos de los axones presentaban longitudes mayores que tres veces el tamaño del soma neuronal (figs. 1, 5 y 8). Esta última observación coincide con la de Letourneau (1975) en cultivos de células ganglionares lumbo-sacras.

Normalmente las neuronas que no estaban en contacto con glía presentaban axones más cortos y más gruesos (fig. 2) que las neuronas que establecen sinapsis con otras células, en cuyo caso los axones son más largos, finos y muy ramificados (fig. 6).

Resumen.

Hemos estudiado la influencia de diferentes medios cardiocondicionados (MCC) obtenidos de cultivos primarios y subcultivos de monocapas de células cardíacas de embriones de pollo de 8 días (fases 31-32), sobre cultivos de neuronas disociadas de ganglio ciliar.

Se han determinado las condiciones que han de reunir las distintas cosechas de MCC, para el mantenimiento eficaz de las neuronas en cultivo.

La ultrafiltración y la obtención de cosechas de MCC a partir de monocapas no preconfluentes al menos a las 48 horas de cultivo y/o subcultivo, no son eficaces para la supervivencia neuronal.

También hemos observado ciertas variaciones en la forma y desarrollo de las neuronas *in vitro*, dependiendo de los MCC empleados en su mantenimiento.

Se concluye que la técnica de subcultivar las células cardíacas aporta mayor facilidad y rapidez en la obtención de MCC y que dicha técnica elimina la variabilidad entre incubaciones, con lo que se obtienen resultados más uniformes que cuando se emplean sólo cultivos cardíacos primarios.

S u m m a r y .

The influence of different heart-conditioned media (HCM) from heart cell monolayers from 8 days-old chick embryos (stages 31-32), on cultures of dissociated ciliary neurons has been investigated. Primary cultures and subcultures of heart cells were used for HCM attainment.

The conditions that must reunite the different HCM harvests for effective maintenance of neurons cultures have been determined.

Ultrafiltrated HCM and the HCM harvested from monolayers non-preconfluent at 48 hours in primary culture or subculture were not effective for neuronal survival.

Also described are certain changes in the shape and development of neurons *in vitro* caused by the HCM employed in its sustenance.

Heart-cell subculture methods give greater facility and rapidity to obtainment of HCM and remove variability among incubations, in this manner the results being more uniform than when primary heart cultures are always employed.

A g r a d e c i m i e n t o s .

Agradecemos al profesor D. Juan García Martín la colaboración prestada en la obtención de fotomicrografías.

B i b l i o g r a f í a .

- Bornstein, M. B., 1958.—Reconstituted rat-tail collagen used as a substrate for tissue cultures on coverlips in Maximov slides and roller tubes. *Lab. Invest.* 7:134-137.
- Bray, D., 1973.—Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *Journ. Cell. Biol.*, 56: 702-712.
- Collins, F., 1978.—Axon initiation by ciliary neurons in culture. *Develop. Biol.*, 65: 50-57.
- 1978.—Induction of neurite outgrowth by a conditioned medium factor bound to the culture substratum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 5210-5213.
- Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliot and K. M. Jones, 1974.—Data for biochemical research. Oxford University Press. London.
- DeHaan, R. L., 1967.—Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Develop. Biol.*, 16: 216-249.

BUSTOS *et al.*: INFLUENCIA DE MCC SOBRE CULTIVOS CELULARES DE GANGLIO CILIAR

- Ebendal, T. and C. O. Jacobson, 1977.--Tissue explants effecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. *Exp. Cell. Res.*, 105: 379-387.
- Fischbach, G. D., 1972.--Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Develop. Biol.*, 28: 407-429.
- Freeman, B. M. and M. A. Vince, 1974.--Development of the avian embryo. Chapman and Hall Ltd. London.
- Helfand, S. L., G. A. Smith and N. K. Wessells, 1976.--Survival and development in culture of dissociated parasympathetic neurons from ciliary ganglia. *Develop. Biol.*, 50: 541-547.
- R. J. Riopelle and N. K. Wessells, 1978.--Non equivalence of conditioned medium and nerve growth factor for symphathetic, parasympathetic, and sensory neurons. *Exp. Cell. Res.*, 113: 39-45.
- Landmesser, L. and G. Pilar, 1974.--Synapse formation during embryogenesis on ganglion cells lacking a periphery. *Journ. Physiol.*, 24: 715-736.
- Letourneau, P. C., 1975.--Possible roles for cell to substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Develop. Biol.*, 44: 92-101.
- Ludueña, M. A., 1973.--Cell locomotion nerve elongation and microfilaments. *Develop. Biol.*, 30: 427-440.
- 1973.--Nerve cell differentiation *in vitro*. *Develop. Biol.*, 33: 268-284.
- 1973.--The growth of spinal ganglion neurons in serum-free medium. *Develop. Biol.*, 33: 470-476.
- Marwitt, R., G. Pilar and J. N. Weokly, 1971.--Characterization of two ganglion cell population in avian ciliary ganglia. *Brain Res.*, 25: 317-334.
- Nishi, R. and D. K. Berg, 1977.--Dissociated ciliary ganglion neurons *in vitro*: Survival and synapse formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 5171-5175.
- Varon, S., 1975.--Nerve growth factor and its mode of action. *Exp. Neurol.*, 48: 75-92.