

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL MEDIO CARDIO-CONDICIONADO Y TIPOS DE POLIORNITINA, COMO FACTORES LIMITANTES PARA CULTIVOS DE GANGLIOS CILIARES DISOCIADOS DE EMBRION DE POLLO.

(HEART CONDITIONED MEDIUM STORING TIME AND POLYORNITHINE TYPES, AS LIMITING FACTORS TO CULTURES OF CHICK EMBRYO DISSOCIATED CILIARY GANGLIA).

por

M. Bustos, F.J. Alcaín y D. Jordano

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

Palabras clave: Neuronas. Medio condicionado. Ganglio ciliar. Embrión de pollo. Cultivo de tejidos.

Summary

We have researched the effects of polyornithine (types IC and B) on neuron cultures dissociated from chick ciliary ganglia, incubated for 8 days in heart conditioned medium (HCM). Type IB is better as to axon elongation, and type IC for survival of neurons.

The influence that time exerts on the inductive power of HCM was also studied employing polyornithine and collagen substrata. The results are not conclusive but there is some evidence that storing times longer than 18 days affect negatively the HCM inductive potentiality on cultured neurons.

Resumen

Hemos estudiado los efectos que la poliornitina tipo IC y tipo IB ejercen sobre los cultivos de neuronas de ganglios ciliares disociados, de embriones de pollo de ocho días de incubación, en presencia de medio cardio-condicionado (MCC). El tipo IB favorece la elongación del axón y el tipo IC, la supervivencia neuronal.

También se ha investigado la relación entre el factor tiempo y el

Recibido para publicación el 20-11-1980

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

poder inductor del MCC, en cuanto a elongación de axones y supervivencia de las neuronas en los dos tipos de poliornitina y en substratos de colágeno. Aunque no se han obtenido resultados definitivos, hay indicios de que los períodos de almacenamiento superiores a 18 días afectan negativamente a la capacidad inductora del MCC sobre las neuronas cultivadas.

El presente trabajo constituye el último de una serie de experiencias planteadas en nuestro laboratorio, sobre las condiciones óptimas de cultivo y supervivencia de las neuronas del ganglio ciliar disociado, de embrión de pollo, en distintos substratos.

Anteriormente hemos estudiado aspectos referentes a la obtención de las distintas cosechas de MCC; condiciones de almacenamiento de los medios condicionados; efectos de substratos revestidos de colágeno y polilisina sobre el desarrollo axonal en los cultivos; acción del arabinósido de citosina sobre la microsera de la placa de cultivo, y las posibles incidencias en la evolución del cultivo, dependientes del método de eliminación de detritos (filtración y centrifugación) del medio condicionado (Bustos y col. (1,2)).

En los cultivos in vitro de neuronas se han venido empleando usualmente polímeros sintéticos del tipo de la poliornitina, como substrato de revestimiento, que favorecían la adherencia rápida de la neurona, disminuyendo la posibilidad de muerte por falta de anclaje y adaptación a las condiciones de cultivo (Letourneau (8,9) y Ludueña (10)).

Un aspecto importante a determinar aún, respecto a las condiciones de almacenamiento del MCC, era la posible relación que el factor tiempo podría tener con mayor o menor pérdida del poder inductor de ese medio sobre la supervivencia neuronal y el desarrollo de los axones, debido a que ese poder, como habían indicado anteriormente Helfand y col. (6,7) sólo se conserva durante 15 días después de obtenidas las cosechas de MCC cuando éstas se mantenían por separado.

También hacíamos alusión, en un trabajo anterior, a la influencia que tiene la procedencia del plástico de las placas de cultivo, en sus posibles relaciones químicas con los distintos polímeros utilizados en el revestimiento, debido en gran parte a los diferentes pesos moleculares que esos polímeros poseen, por lo que varía la capacidad de retención de los factores inductores, que según Collins (5) posee la poliornitina, como prueba de la importancia que tiene, al menos para las neuronas del ganglio ciliar cultivadas in vitro, las condiciones de obtención, preparación y manipulación de esos cultivos, con vistas a la obtención de

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

resultados repetibles, ya que puede ocurrir que variaciones mínimas del proceso puedan ocasionar resultados muy dispares.

La obtención del MCC se hizo siguiendo la técnica indicada en un trabajo anterior (Bustos y col. (1)). Nunca dimos por satisfactoria una cosecha que no proviniese de una monocapa preconfluente, al menos, y siempre y cuando esta densidad celular cardíaca hubiese sido lograda en 48 horas de cultivo continuo. El momento de subcultivar la monocapa venía indicado por la estratificación y el despegue de esta monocapa del substrato de plástico del frasco (Corning de 150 cm cuadrados). Las cuatro cosechas conseguidas del cultivo primario y otras tres cosechas más obtenidas después del primer subcultivo, se mezclaron en un solo contenedor, después de comprobar la esterilidad de cada una de ellas.

Entre la preparación del cultivo primario y la obtención de la última cosecha de MCC transcurrieron 12 días.

El medio basal utilizado fue F₁₂ modificado (Sponer) suplementado con 10 p. 100 de suero fetal bovino (F12S10). Antes de utilizar el MCC en los cultivos de ganglios ciliares disociados, partes alícuotas de este medio fueron centrifugadas a 350g, para eliminar restos celulares.

Para la extracción y disociación de los ganglios ciliares se siguió la técnica anteriormente descrita por Bustos y col. (1). Como substratos utilizamos placas Corning de 35 mm de diámetro (D 35), revestidas de colágeno reconstituido de cola de rata, precipitado por una solución salina al 6 p. 100, y D35 revestidas de dos tipos de poliornitina: poly-DL-ornithine HBr type I-B, y poly-DL-ornithine-L- α -HBr type I-C (Sigma).

El medio utilizado para estos cultivos fue MCC; la disociación de los ganglios se llevó a cabo en este medio, centrifugado previamente como antes se indicaba.

Cada D35 se inocula con 50.000 células (neuronas y no neuronas) resuspendidas en 2 ml de MCC. El primer cambio de medio se realizaba a las 24 horas de cultivo; posteriormente y hasta los 6 días, los cambios de medio (MCC), se efectuaban cada 48 horas. Los recuentos se hacían diariamente.

En todos los experimentos se emplearon embriones de pollo de 8 días de incubación (fases 34-35 de Freeman y Vince) y todos los cultivos

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

(cardíacos y neuronales) se incubaron a 37° C, en atmósfera húmeda con 5 p. 100 de CO₂ y 95 p. 100 de aire, en un incubador Heraeus modelo B 5060 EK/CO₂.

Resultados y discusión

Como se observa en las figuras 1, 2 y 3, en las que se expresa la supervivencia neuronal en los cultivos en función del tiempo que permanecieron almacenadas las cosechas, los períodos que van desde los 2 hasta los 23 días de almacenamiento del MCC ejercen cierta influencia respecto al poder inductor que aún conservan. Así, vemos que tanto sobre colágeno como sobre poliornitina tipo IC, las curvas de supervivencia son muy semejantes para el MCC de 16 días; para el MCC de 23 días hay algunas diferencias pero no son significativas. En las placas revestidas con poliornitina también hemos considerado como neuronas las células ovaladas refringentes, aunque no hubiesen emitido neuritas, ya que como es sabido, en este tipo de substrato no se dividen las células neuronales y no es posible la confusión de neuronas y células en mitosis.

Respecto a las curvas de supervivencia neuronal en poliornitina tipo IB, aunque las pendientes son más acusadas, hay que indicar que es mayor el número de neuronas con axones iniciados y con mayor complejidad de entramado que cuando se utiliza el tipo IC. No obstante, en ninguno de nuestros experimentos hemos conseguido sobre poliornitina el gran crecimiento y redes de neuritas que aparecen en las placas revestidas de colágeno.

En general, los MCC con 2 y 16 días de almacenamiento son más eficaces que los MCC almacenados durante más días, aunque pudiera ser en realidad que no fuese el factor tiempo el desencadenante de esa paulatina pérdida de potencialidad, sino la progresiva alcalinización del MCC por pérdida del CO₂, durante el almacenamiento a 4° C (Helfand y col. (6,7)).

Hemos de hacer notar que en todas las curvas de supervivencia mostradas en el presente trabajo se ha asignado el valor 100 a las neuronas supervivientes en las placas después de las primeras 24 horas de cultivo.

Una conclusión adicional se puede extraer respecto a los dos tipos de poliornitina. En el tipo IC se observa tendencia a estabilizarse la supervivencia en las primeras 72 horas, mientras que en el tipo IB no

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

aparece este fenómeno. Este hecho nos hace pensar de acuerdo con Collins (4) que las poliornitinas ligan factores inductores del MCC pero que estos factores no son todos iguales y deben existir al menos dos factores distintos: uno que permite la supervivencia (favorecido en su ligamiento por el tipo ICE) y otro que favorece la emisión y desarrollo del axón (posibilitado por el tipo IB). Esta hipótesis se ve reforzada si tenemos en cuenta, además, la diferencia entre los pesos moleculares de los dos tipos de poliornitina: tipo IB, 3.000-5.000; tipo IC, 100.000-200.000.

Varon y col. (12,13) obtienen resultados diametralmente opuestos a los nuestros, ya que encuentran la mayor supervivencia y desarrollo en las placas revestidas por poliornitina y una escasa viabilidad celular en las revestidas con colágeno. La discusión de estos resultados ya la hicimos en su momento, en otro trabajo (Bustos y col. (1)), pero conviene señalar aquí las condiciones diferentes de cultivo en que trabajan ellos y nosotros, sobre todo en lo que se refiere al plástico de cultivo empleado, el método de precipitación del colágeno y el tipo de poliornitina empleada.

La supervivencia neuronal, expresada en números reales y referida al inóculo inicial (50.000 células/D35), se ve afectada por los substratos colagenizados, en el sentido de que disminuye, en comparación con los substratos de poliornitina, ya que la adhesión se ve favorecida en estos últimos (fig. 4; c,d), aunque el desarrollo de las neuritas es más complejo sobre colágeno, al producirse fenómenos de reagregación celular y proliferación de la glía (fig. 4; b). De todos modos pensamos que la concentración celular del inóculo, por placa, también desempeña un importante papel en esos fenómenos de reagregación. Las densidades más bajas de las que hemos empleado son las que ofrecen mejores resultados, al disminuir la competencia celular por los factores tróficos propios del MCC.

Las imágenes presentadas en la figura 4 (c,d) son excepcionales en cuanto a desarrollo de los axones de neuronas cultivadas sobre poliornitina tipo IC, pues en este substrato las neuronas se presentan nada más que con pequeños y cortos conos de crecimiento y muchas veces sólo con un soma refrigente sin ninguna emisión neurítica.

Sobre poliornitina tipo IB el desarrollo de los axones se produce de forma gradual, siguiendo los patrones clásicos descritos por Bray (3) y logran alcanzar longitudes y complejidad semejantes a los que se observan en cultivos sobre colágeno (fig. 4; f,g,h).

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

NEURONAS EN COLAGENO

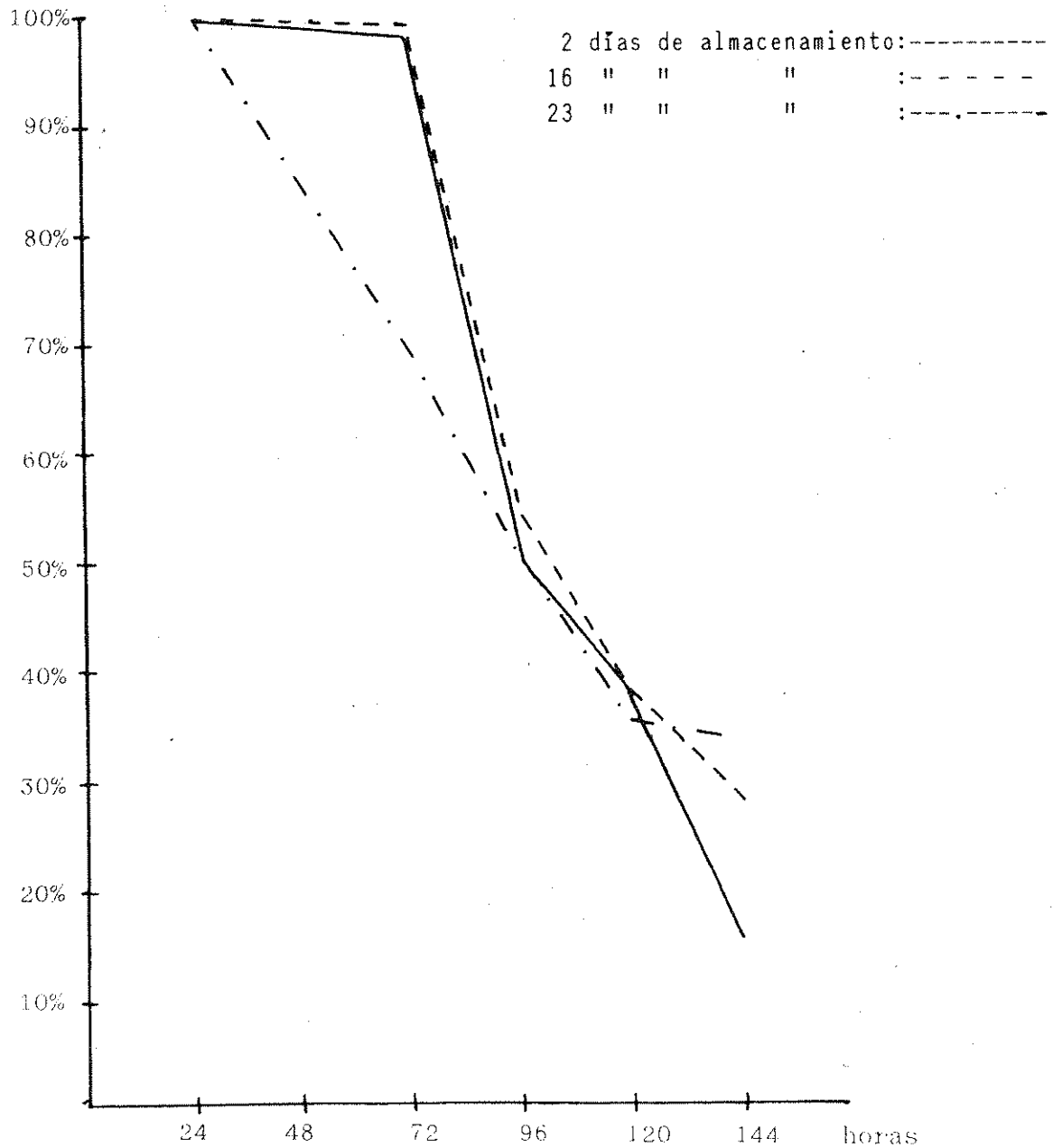


Fig. 1a.-Curvas de supervivencia de neuronas de ganglio ciliar, disociado, en medios cardio-condicionados con diferentes períodos de almacenamiento. Substrato empleado: colágeno.

NEURONAS EN PORN. IC

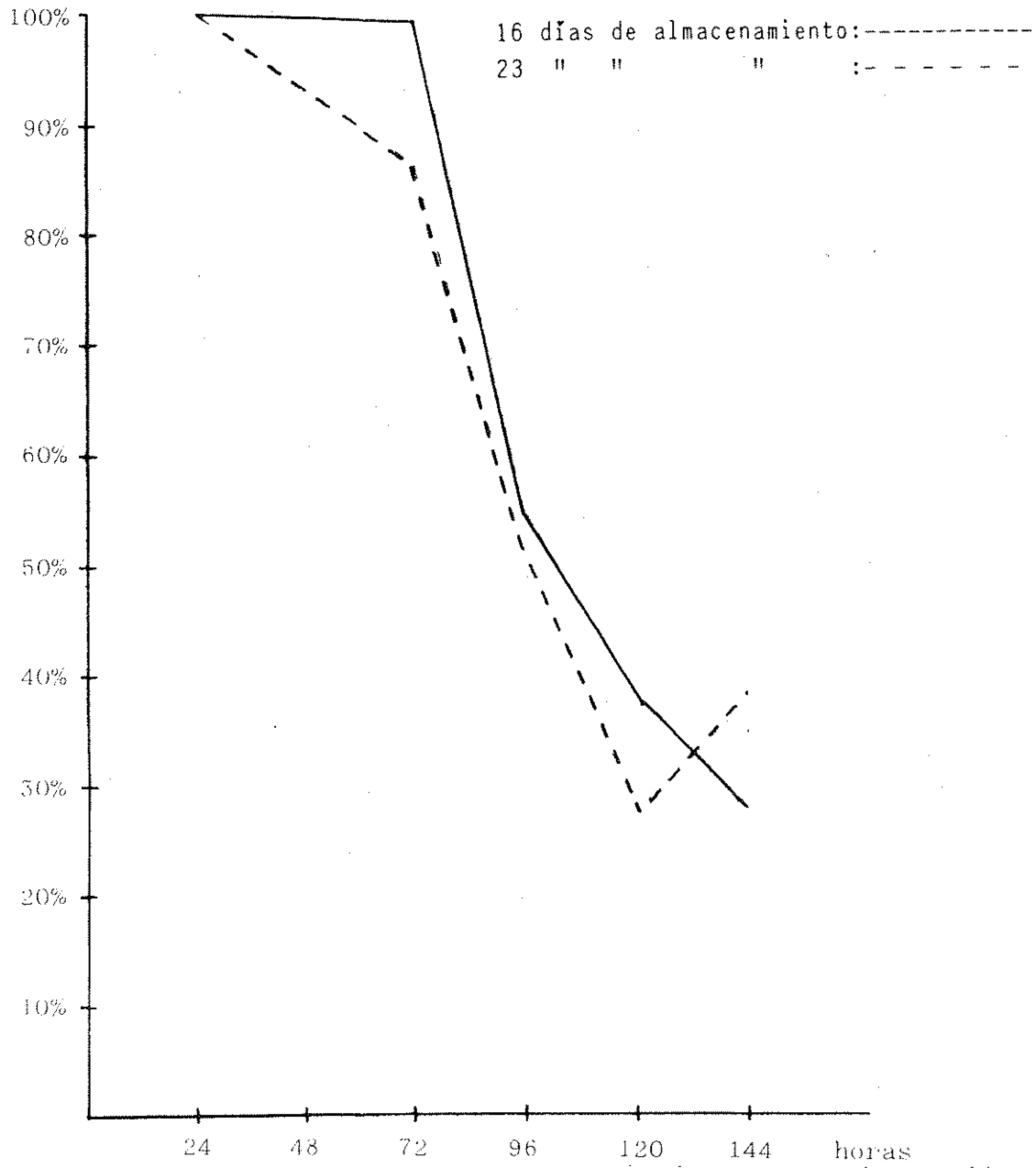


Fig. 2a.-Curvas de supervivencia de neuronas de ganglio ciliar, disociado, en medios cardio-condicionados con diferentes períodos de almacenamiento. Substrato empleado: poliornitina, tipo IC.

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

NEURONAS EN PORN. IB

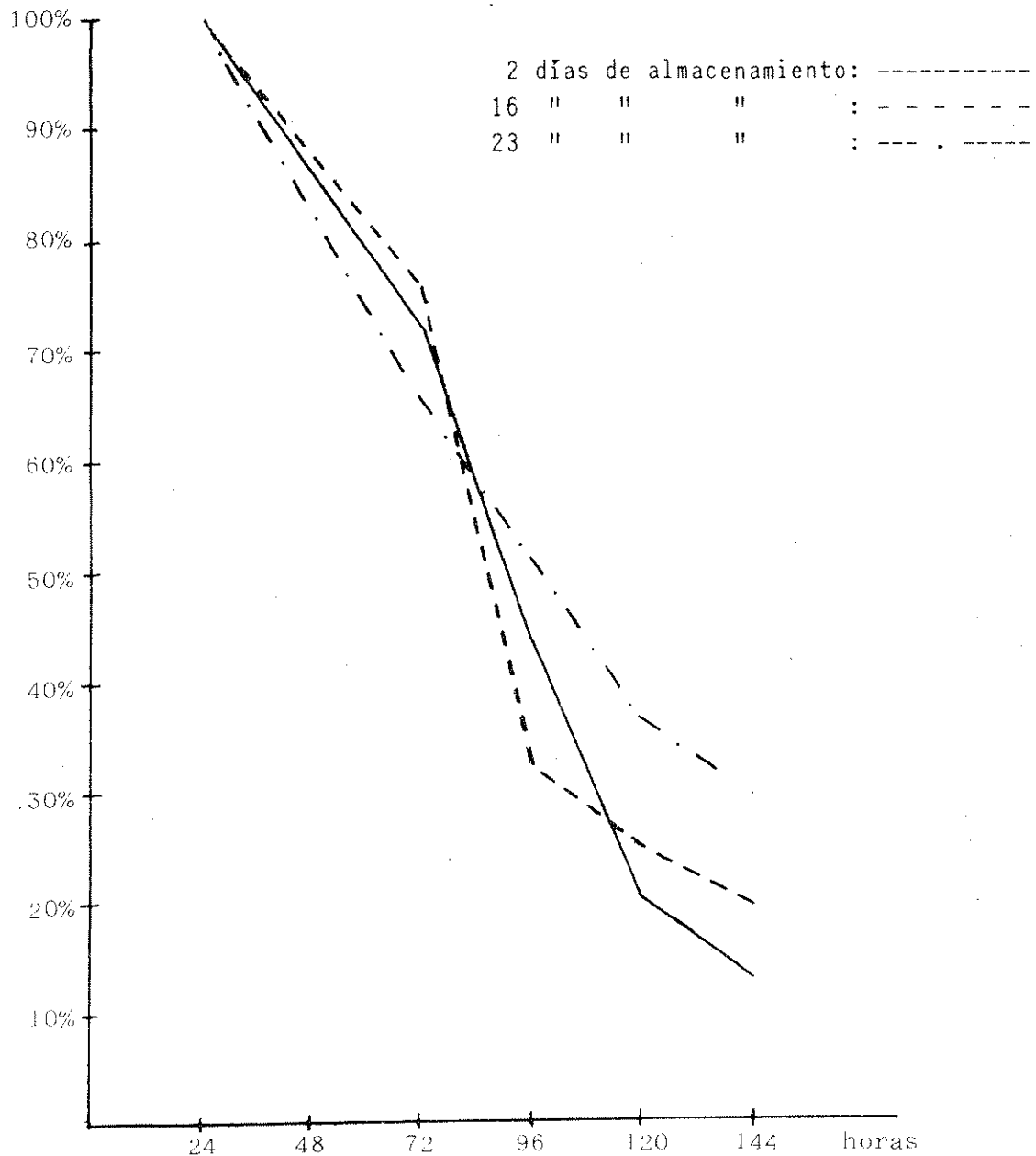


Fig. 3ª.-Curvas de supervivencia de neuronas de ganglio ciliar, disociado, en medios cardio-condicionados con diferentes períodos de almacenamiento. Substrato empleado: poliornitina, tipo IB.



FIGURA 4

Bustos y col. Efectos del MCC y poliornitinas sobre cultivos de neuronas

Ocasionalmente hemos encontrado, en algunas placas, neuronas que si bien presentaban un aspecto normal respecto a la morfología del axón, mostraban un soma oscuro sin refrigencia y de tamaño muy disminuido (fig. 4; e).

Bibliografía

1. Bustos, M., F.J. Alcaín, F. Niño y D. Jordano. Arch. Zootec. 28, 271-284 (1979).
2. Bustos M., F.J. Alcaín y F. Padilla. Pendiente de publicación en Trab. Inst. Cajal. (1980).
3. Bray, D. Jour. Cell. Biol. 56, 702-712 (1973).
4. Collins, F. Develop. Biol., 65, 50-57 (1978).
5. Collins, F. Proc. Natl. Acad. Sci., 7, 5210-5213 (1978).
6. Helfand, S.F., G.A. Smith y N.K. Wessells. Develop. Biol., 50, 541-547 (1976).
7. Helfand, S.F. Exp. Cell. Res., 113, 39-45 (1978).
8. Letourneau, P.C. Develop. Biol. 44, 77-91 (1975).
9. Letourneau, P.C. Develop. Biol., 44, 92-101 (1975).
10. Ludueña, M.A. Develop. Biol., 33, 268-284 (1973).
11. Ludueña, M.A. Develop. Biol. 33, 470-476 (1973).
12. Varon, S. Exp. Neurol., 54, 1-6 (1977).
13. Varon, S., M. Manthorpe y R. Adler. Brain. Res., 173, 29-45 (1979).

Fig. 4. Cultivos de neuronas de ganglios ciliares disociados, de embrión de pollo, en medio cardio-condicionado (MCC) y en diferentes substratos.

a y b: cultivos sobre colágeno; 72 y 96 horas, respectivamente.

c y d: cultivos sobre poliornitina tipo IC; 72 y 96 horas, respectivamente.

e, f, g y h: cultivos sobre poliornitina tipo IB; 24, 72, 96 y 120 horas, respectivamente.

Contraste de fase oscuro. 10 x 10. Escala = 50 μ m.