

PROLIFERACION DE LAS CELULAS NO NEURONALES DEL
GANGLIO CILIAR EN CULTIVOS IN VITRO.

(THE PROLIFERATION OF NON-NEURON CELLS FROM CILIARY GANGLION IN CULTURES
IN VITRO).

por

Alcaín Tejada, F.J., F. Padilla Alvarez y M. Bustos Ruiz

Departamento de Biología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba
(España).

Palabras clave: Ganglio ciliar (ciliary ganglion); células no neuronales
(non-neuron cells); glucosa (glucose), PHA, MCC.

Summary

In our investigations, non-neuron cells from ciliary ganglion of chick embryos (8 days-old), were cultured on tissue culture plastic dishes, using as culture media heart-conditioned medium (HCM), HCM supplemented with glucose (HCMG) and with phytohemagglutinin (PHA) added to HCM (HCMPHA).

The low rate of proliferation observed in these cells in ovo, persists when the cells are cultured in vitro.

The highest index of proliferation is obtained by using HCM as culture medium. We observed that PHA prevents mitosis and produces cell vacuoles. The effect of glucose encourages cell adhesion, but it decreases the mitosis index.

Recibido para publicación el 7-4-1981.

Resumen

En nuestras investigaciones, cultivamos células no neuronales del ganglio ciliar de embriones de pollo de 8 días de incubación, sobre una superficie de plástico para cultivo de tejidos, utilizando como medios de cultivo medio cardiocondicionado (MCC), MCC suplementado con glucosa (MCCG) y MCC más fitohemaglutinina (PHA) (MCCPHA).

La baja tasa de proliferación celular observada en estas células in ovo, se mantiene cuando se cultivan in vitro.

El mayor índice de proliferación se consigue utilizando como medio de cultivo MCC. Se observa que la PHA inhibe la mitosis y causa vacuolizaciones en las células. El efecto de la glucosa es beneficioso para la adherencia celular pero disminuye el índice mitótico.

Para mantener in vitro la supervivencia de las neuronas disociadas del ganglio ciliar del embrión de pollo, se ha venido utilizando un medio de cultivo previamente condicionado por células cardíacas de embriones de pollo (Helfand y col. (1) y Bustos y col. (4)). En recientes experimentos hemos comprobado que la utilización de medio condicionado por las células no neuronales del propio ganglio ciliar permite una mayor supervivencia neuronal, así como un desarrollo más extenso en el crecimiento de los axones (Bustos y col. (5)). Debido a la baja tasa proliferativa de estas células se necesitan largos períodos de tiempo para condicionar el medio basal y poder utilizarlo después en los cultivos neuronales (Bustos y col. (6)). Por ello, el propósito de este trabajo ha sido intentar mejorar las condiciones de cultivo, para incrementar la capacidad mitótica en las células neuronales.

Usamos como testigo MCC, ya que anteriormente habíamos observado que la tasa de proliferación de las células no neuronales del ganglio ciliar era más alta con este medio que con el medio basal - F₁₂ modificado y suplementado con un 10 p.100 de suero fetal bovino. A este medio condicionado se le añadió glucosa, ya que la causa de la lenta proliferación podría deberse a una baja concentración de glucosa

en el MCC. También utilizamos en otra serie experimental PHA añadida al MCC, para comprobar si producía el mismo efecto en las células no neuronales, pues aquélla se considera un potente estimulador de la mitosis en la serie blanca sanguínea humana (Nowell (7) y Choi y col (8)).

Los cultivos se hicieron sobre una superficie de plástico para cultivos de tejidos, ya que al no adherirse las neuronas a este substrato se evita la estimulación de la mitosis en las células no neuronales por el contacto directo con las neuronas (Hanson y col. (9)).

El MCC se obtuvo según las condiciones establecidas anteriormente (Bustos y col.(4)). La densidad de siembra fue de 15.000 células por placa de 35 mm de diámetro (D_{35}), y el recuento se realizó sobre aproximadamente el 1 p.100 de la superficie de la placa, aplicando posteriormente un factor de conversión ($f= 104.77$) para hallar el número total de células por D_{35} . Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda y con una concentración del 5 p.100 de CO_2 y 95 p.100 de aire. Los cambios de medio se hacían cada 48 horas.

Las curvas de crecimiento en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la figura 1. Se observa que la adherencia de las células al substrato, en las primeras 24 horas, se incrementa considerablemente en el MCCG. Esta adhesión de las células no neuronales va acompañada también de una mayor adherencia de las neuronas, porque mientras en las placas mantenidas con MCC no se adhiere prácticamente ninguna neurona (35 neuronas/placa; s.d. ± 60), en las placas mantenidas con MCCPHA el número de neuronas era de 174 ± 60 por placa; y en MCCG la adherencia neuronal se incrementaba hasta 280 ± 61 neuronas por placa. Las neuronas estaban presentes en los cultivos durante 2 días, para el MCCPHA; y 6 días, para el MCCG (fig. 2,a), a pesar de que el número de neuronas sembrado fue aproximadamente igual al de células no neuronales, en todos los casos.

De las 24 h. a las 48 h. se produce un nuevo descenso en el número de células presentes en los cultivos, aunque esta vez la tasa de mortalidad de las células cultivadas en presencia de MCCG y de MCCPHA (31 p.100 y 30 p.100, respectivamente), es mayor que en MCC (20 p.100). A partir

de este momento observamos que la PHA inhibía la proliferación celular. El efecto de la PHA sobre las células afecta también a su morfología (fig. 2,b): empiezan a aparecer en el cultivo células vacuolizadas cuyo número aumenta en el transcurso del tiempo. Este proceso de vacuolización celular es diferente al que sobreviene en los cultivos prolongados en el tiempo, pues en estos últimos presentan numerosas vacuolizaciones de pequeño tamaño, mientras que en los cultivos con MCCPHA se observan de 2 a 6 grandes vacuolas citoplasmáticas. Una vez que la PHA comienza a ejercer su efecto, el número de células presentes en las placas va descendiendo lentamente.

En los cultivos mantenidos con MCC y MCCG, antes de llegar a la fase logarítmica existe un período en el que la tasa de proliferación celular es baja, sobre todo en MCCG. La duración de este período es de 6 días, en MCC; y de 3 días, en MCCG. Al final de este período comienza la fase de crecimiento exponencial.

Debido a la imposibilidad de contar el número de células presentes en las placas mantenidas con MCC y MCCG, a los 23 días de cultivo, a causa de la superposición celular, despegamos las células de la superficie de cultivo mediante bacto tripsina (BT) al 0,1 p.100 en solución de Hank. La BT se añadió a 40°C y se tripsinizó durante 20 min. a temperatura ambiente. Las células recogidas se contaron en un hemocitómetro.

Si comparamos las tasas de proliferación (cuadro I), observamos que durante los primeros 6 días de cultivo prácticamente no hay diferencia entre el MCCPHA y el MCCG y que el período previo a la fase exponencial comienza, tanto para el MCC como para el MCCG, cuando el número de células presentes en los cultivos era aproximadamente igual al que se observó a las 24 horas.

Si comparamos las tasas de proliferación de las células no neuronales del ganglio ciliar en cultivo con la que presentan las células no neuronales del ganglio de la raíz dorsal de ratón recién nacido (estas células producen 2×10^5 células en 4 días, a partir de 16.000 células sembradas (Manthorpe y col. (10)) vemos que las células del ganglio ciliar tienen una tasa de proliferación muy baja. Si bien estas diferencias proliferativas pueden deberse a ser tejidos de diferentes especies, un

estudio previo sobre la división celular en los ganglios del embrión de pollo in ovo muestra que la tasa de proliferación de los ganglios simpáticos es 4 veces mayor que la del ganglio ciliar, a los 9 días de incubación; además, el ganglio ciliar es el que menor proliferación celular presenta entre todos los ganglios estudiados del sistema nervioso periférico (Yates (11)). Esta diferencia en las tasas de crecimiento entre estos tipos ganglionales los habíamos observado anteriormente al cultivar in toto los ganglios ciliares y los ganglios de la raíz dorsal (Alcaín y col. (12)).

Los datos obtenidos por nosotros, en los cultivos, confirman el bajo índice de proliferación de estas células observado in ovo.

Bibliografía

1. Helfand, S.L., G.A. Smith and N.K. Wessells. Develop. Biol. 50: 541-547 (1976).
2. Nishi, R. and D.K. Berg. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5171-5175 (1977).
3. Collins, F. Develop. Biol. 65:50-57 (1978).
4. Bustos Ruiz, M., F.J. Alcaín Tejada, F. Niño Larrú y D. Jordano Barea. Arch. Zootec. 28:271-284 (1979).
5. Bustos Ruiz, M., F.J. Alcaín Tejada. Arch. Zootec. 29: 305-313 (1980).
6. Bustos Ruiz, M., F.J. Alcaín Tejada y D. Jordano Barea. Trab. Inst. Cajal. En prensa (1980).
7. Nowell, P.C. Cancer Res. 20:462-466 (1960).
8. Choi, K.W. and A.D. Bloons, Nature 277:171-173 (1970).
9. Hanson, G.R. and L.M. Partlow, Brain Res. 196:371-381 (1980).
10. Manthorpe, M., S. Skaper and S. Varon, Brain Res. 196:467-482 (1980).
11. Yates, R.D. J. Exptl. Zool. 147:167-181 (1961).
12. Alcaín Tejada, F.J. y M. Bustos Ruíz. Trab. Inst. Cajal, 70: 39-46 (1978).

Pie de las figuras.

Fig. 1. Curvas de crecimiento bajo las distintas condiciones experimentales de cultivo. La técnica utilizada ha sido descrita anteriormente (Bustos y col. (4)).(—) MCC. (---) MCC suplementado con 1.802 g de glucosa por litro. (-.-) MCC suplementado con 0.2 ml de PHA (Difco, 0528-56) por cada 10 ml de MCC.

Las gráficas representan la media de 3 placas y las barras corresponden a las desviaciones típicas.

Fig. 2. a) Células mantenidas en MCCG después de 6 días de cultivo. Obsérvese la neurona con prolongaciones, adherida a la superficie de plástico. Optica de contraste de fases oscuro. Aumento:x100.

b) Aspecto de las células tras 10 días de cultivo con MCCPHA. Optica de contraste de fases oscuro. Aumento:x100.

ALCAIN Y COL.: CULTIVO DE CELULAS NO NEURONALES DEL GANGLIO CILIAR.

Cuadro I. Tasa de proliferación de las células no neuronales del ganglio ciliar. Los datos están expresados como el cociente entre el número de células presentes en un día cualquiera y el número de células presentes a las 24 horas.

D I A S

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1	0,69	0,83	0,79	0,87*	1,00	1,20	1,21	1,47	2,12	3,00*	3,93*	6,37
B	1	0,70	0,61	0,76	0,90*	1,04	0,93	0,85	0,87	0,89	0,73*	0,65*	0,61
C	1	0,79	0,93	1,27	1,86*	2,69	3,76	4,28	4,80	6,42	15,13*	24,44*	33,37

* Representan los valores teóricos. MCCG (A). MCCPHA (B) y MCC (C).

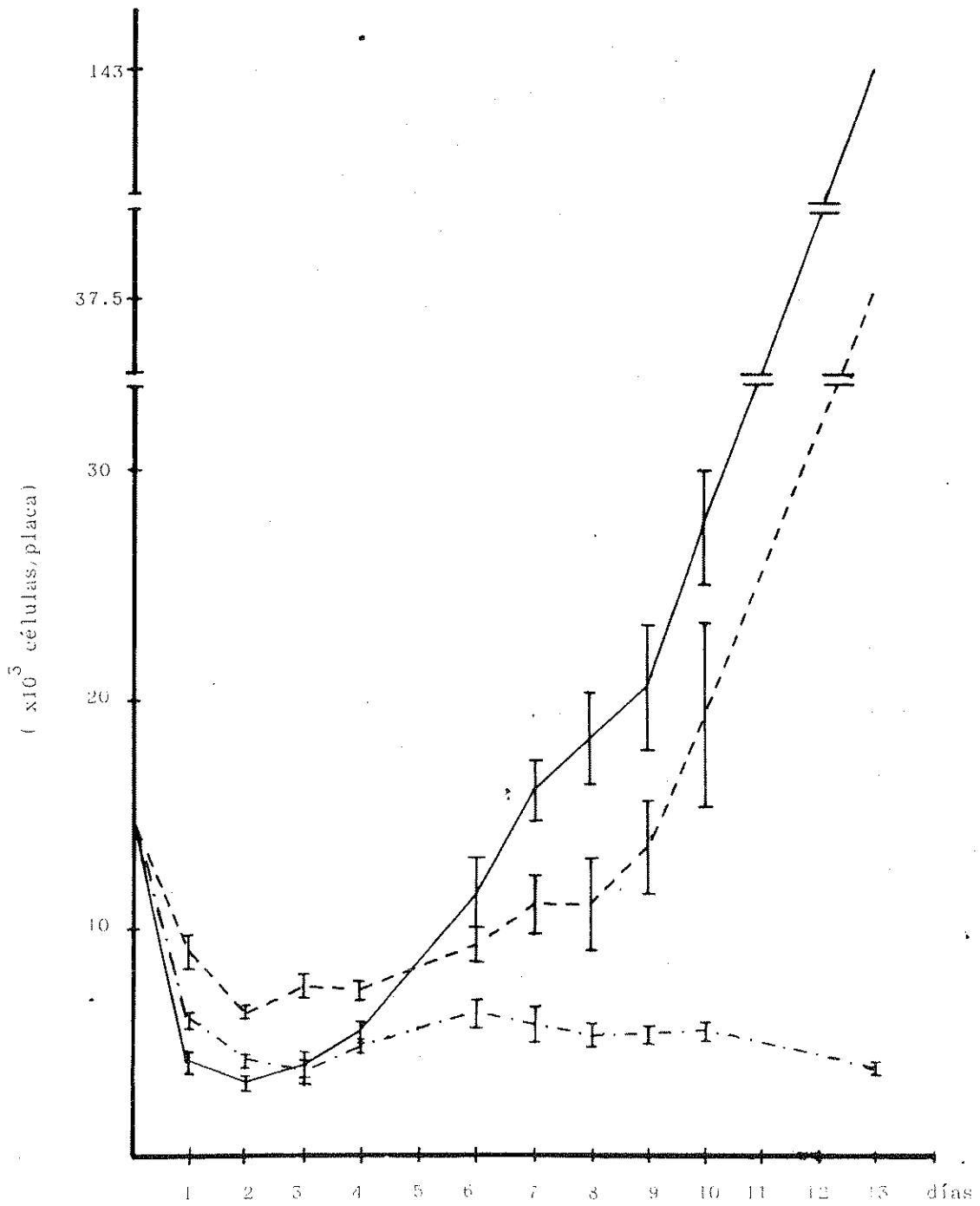


Figura 1

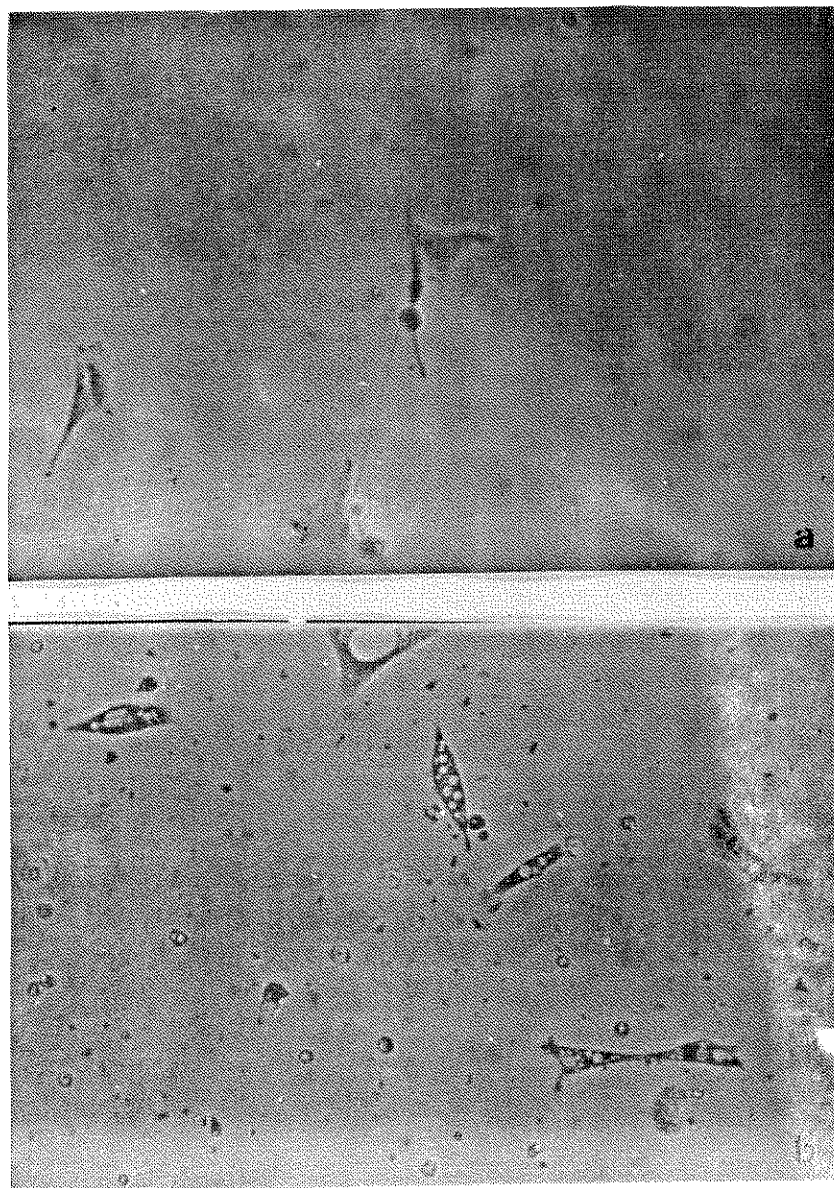


Figura 2