

RENDIMIENTOS DEL COLÁGENO, POLIORNITINAS (TIPOS: IB, IIB y IC) Y COLÁGENO MÁS POLIORNITINA IB, COMO SUBSTRATOS PARA EL CULTIVO DE GANGLIOS CILIARES DISOCIADOS DE EMBRIÓN DE POLLO.

(EFFICIENCY OF COLLAGEN, POLYORNITHINES (TYPES: IB, IIB AND IC) AND COLLAGEN PLUS POLYORNITHINES IB, SUBSTRATA, IN CHICK EMBRYO DISSOCIATED CILIARY GANGLIA CULTURES).

por

M. Bustos, F. Padilla y F.J. Alcaín.

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

Palabras claves (Keywords): Ganglios ciliares. Neuronas. Cultivo de tejidos. Embrión de pollo. Poliornitinas. Colágeno.

Summary

Dissociated ciliary ganglia of 8 days embryos were cultured in heart conditioned medium, employing different substrata types: collagen, polyornithines (types: IB, IIB and IC) and collagen plus polyornithine IB. The results from neuron survival (with and without prolongations) and non neuronal cells it obtained graphically. The polyornithines molecular weights are discussed respect inductor factors binding for conditioned medium. The type IB is better than others types (IIB y IC), but collagen is more effective than polyornithines.

Recibido para publicación el 10-7-1981.

Resumen

Se han cultivado ganglios ciliares disociados de embriones de pollo de 8 días de incubación en presencia de medio cardiocondicionado, sobre diferentes tipos de sustratos: colágeno, poliornitinas (tipos: IB, IIB y IC) y colágeno añadido de poliornitina IB. Se representan gráficamente los resultados obtenidos para la supervivencia de las neuronas con y sin prolongaciones y para las células no neuronales. Se discute la importancia de los pesos moleculares de los tipos de poliornitinas frente al ligamiento de factores inductores del medio condicionado para la supervivencia y desarrollo neuronal y se concluye que el tipo IB es el más eficaz, pero no alcanza los altos rendimientos obtenidos en colágeno.

El presente trabajo constituye el último, de la serie de experimentos realizados por nosotros para la determinación de las condiciones más eficaces de cultivos in vitro de neuronas de ganglios ciliares disociados, referidas dichas condiciones al tipo de sustrato empleado y al medio condicionado, como determinantes del grado de supervivencia y complejidad del desarrollo axonal de las neuronas.

El empleo de polímeros sintéticos como sustratos de revestimiento de las placas de cultivo se ha promovido notablemente durante la última década, en parte por la facilidad de manejo y utilización y en parte como método para la obtención de cultivos puros de neuronas 1,4,6,8,9.

También algunos autores(6,7) preconizan que algunos de estos polímeros ligan los factores inductores (F.I) de los medios condicionados, lo que facilitaría el aislamiento y caracterización de dichos factores.

En muchos casos cuando se trabaja con poliornitina o polilisina no se indica el tipo de polímero empleado, por lo que los resultados pueden diferir de unos autores a otros, máxime si se tiene en cuenta que su capacidad de ligar F.I. puede depender directamente de los pesos moleculares (Bustos y col. (3)).

Por todo ello y después de una serie de experimentos preliminares hemos querido comprobar la mayor o menor eficacia de 3 tipos diferentes

de poliornitina (PORN) frente al colágeno (COL), así como intentar el empleo de ambos substratos juntos para obtener la adición de los efectos positivos de ambos, con vista a facilitar el estudio de las neuronas cultivadas.

Material y métodos

Hemos empleado embriones de pollo con 8 días de incubación (fases 30-34). La técnica de extracción y disociación de los ganglios ciliares seguida fue la relatada anteriormente (Bustos y col. (1)).

El medio basal empleado fue F12 modificado (Bustos y col.(1)) suplementado con un 10 p.100 de suero fetal bovino para la obtención de los medios cardiocondicionados (MCC), y sin suplemento sérico para el acondicionamiento de las placas de cultivo.

La disociación se hacía en todos los experimentos con MCC y las siembras se realizaron en placas de 35 mm de diámetro (D₃₅), inoculando en cada una 50.000 células (neuronas + no neuronas) resuspendidas en 2 ml de MCC.

Todos los MCC utilizados no fueron sometidos a ningún proceso de eliminación de detritos.

Las D₃₅ fueron revestidas en unos casos con diferentes tipos de poliornitina: Poly-DL-ornithine HBr. Tipo IB (P.m. 10.000); poly-L-alfa-ornithine HBr. Tipo IIB (P.m. 30.000); y poly-L-alfa-ornithine HBr. Tipo IC (P.m. 100.000). Todas las poliornitinas eran de la casa Sigma, y se utilizaron a una concentración de 0,1 mg/ml, excepto el tipo IC que también se empleó a una concentración de 1 mg/ml. En otros casos las D₃₅ se revestían de colágeno reconstituido de cola de rata, o bien de una mezcla de colágeno y poliornitina IB a partes iguales.

Los recuentos celulares se hacían a las 24, 48, 72 y 144 horas en una serie experimental, y a las 24, 48 y 72 horas en otra de las series.

Los cambios de medio se efectuaban cada 48 horas, sustituyendo el MCC antiguo por 2 ml de MCC fresco.

Las incubaciones se realizaron a 37°C en atmósfera húmeda, 5 p.100 de CO₂ y 95 p.100 de aire.

Resultados y discusión

En la tabla I se expresan las condiciones referentes al sustrato empleado en cada serie experimental.

TABLA I.

	<u>Substrato</u>	<u>Concentración (mg /ml)</u>
Experimento 1º	PORN IB	0,1
	PORN IIB	0,1
	PORN IC	0,1
	PORN IC	1
Experimento 2º		<u>Lambdas</u>
	COL	50 + 10 de ClNa
	COL+PORN IB	50 + 50
	COL-PORN IB	50 + 10 de ClNa
	PORN IB	0,1 mg./ml

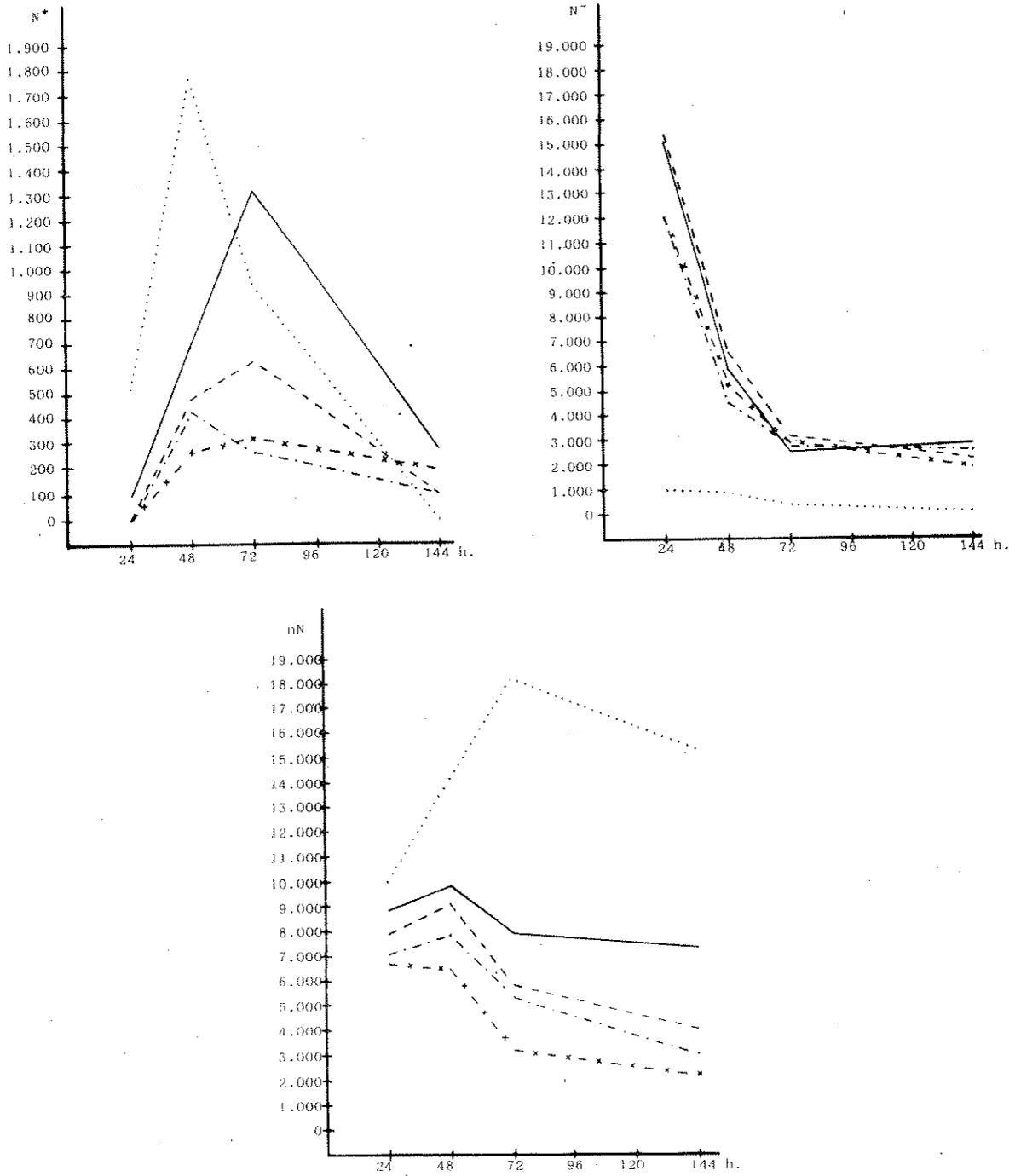


FIGURA 1

El gráfico nº 1 indica los resultados referentes al experimento 1º, respecto a la evolución de las tres poblaciones celulares controladas de los ganglios ciliares disociados: neuronas con prolongaciones de al menos el doble de diámetro del soma, neuronas sin prolongaciones y no neuronas.

Respecto a las N^+ observamos que el máximo aparece entre las 48 y 72 horas de cultivo, siendo la PORN IB la que alcanza los valores más altos de entre los tres tipos de PORN, y es la PORN IC la que muestra los peores resultados sobre todo a concentraciones altas, lo que podría indicar que los factores inductores del MCC son ligados por estos substratos en mayor o menor grado dependiendo de los pesos moleculares del polímero, siendo los de más bajo p.m. los que ligan en más alto grado los F.I. que promueven la elongación del axón; así mismo también se observa cómo la concentración más elevada del polímero ejerce un cierto efecto tóxico sobre las neuronas. Estas observaciones coinciden con las efectuadas por Collins (6 y 7).

Las N^- nos sirvieron de punto de referencia para comprobar la influencia de los diferentes tipos de PORN sobre la supervivencia neuronal, y observamos que a pesar de una mayor eficacia en este sentido de los tipos IB y IIB (p.m. más bajos), los resultados respecto al tipo IC (2 concentraciones) no son significativas al menos a partir de las 48-72 horas de cultivo.

Estos resultados indicarían que todas las PORN son igualmente aptas para la adhesión de las neuronas al substrato y que los F.I. que permiten la supervivencia se ligan a los polímeros sin la especificidad por los pesos moleculares que muestran los F.I. que desarrollan las neuritas.

La evolución de las nN es característica, siendo la PORN IC (1 mg / ml) la que dificulta mayormente el desarrollo de la glía, aunque en general ninguno de los tres tipos muestran una abolición total de esta población durante los 5 días de cultivo.

Una vez determinamos que la PORN IB a concentración de 0,1 mg / ml era el tipo que ofrecía mejores resultados para la supervivencia neuro-

nal y elongación axonal, procedimos a efectuar el experimento 2º para comprobar la eficacia de este polímero junto con un substrato altamente eficaz (colágeno) aprovechando la capacidad de la PORN para eliminar la proliferación de las nN, e intentar aunar efectos de uno y otro tipos de substratos. En el gráfico nº 2 se muestran los resultados obtenidos y se observa que la PORN IB junto al COL es menos eficaz que este último sin polímero para promover el desarrollo de prolongaciones aunque este efecto podría explicarse si se tiene en cuenta que con el COL solo, la distribución de las N⁺ no es uniforme en la D35 existiendo una tendencia a la agregación en el centro de la placa, lo que favorece la emisión y desarrollo de la red axonal, mientras que con la PORN IB la adhesión al substrato es casi inmediata, lo que origina una mejor distribución en la D 35 pero desaparecen los posibles influjos del efecto de agregación celular (Bustos y col. (2,3,4 y 5)).

Otra posible explicación podría estar en que el colágeno sólo promueve activamente la proliferación de las nN, que condicionarían in situ el MCC, añadiendo nuevos F.I. (Bustos y col. (2)), mientras que como se observa en el gráfico nº 2 las nN en PORN IB + COL tienden a disminuir, no produciéndose este efecto, o disminuyéndose la capacidad de regeneración del medio de cultivo.

El método de precipitación del COL, sólo con PORN IB o con ClNa + PORN IB, no muestra resultados muy diferentes, aunque parece ser que hay ciertos indicios de que el ClNa compite con la PORN IB en la precipitación del COL, produciéndose ésta en condiciones más favorables para el posterior crecimiento de las neuronas en presencia de ClNa.

En conclusión, después de todos los experimentos realizados en este y anteriores trabajos creemos que la opción idónea para los cultivos de neuronas de ganglio ciliar de embriones de pollo, respecto al substrato y al medio condicionado, son el empleo de colágeno y medio gliconducido por las propias nN del ganglio ciliar.

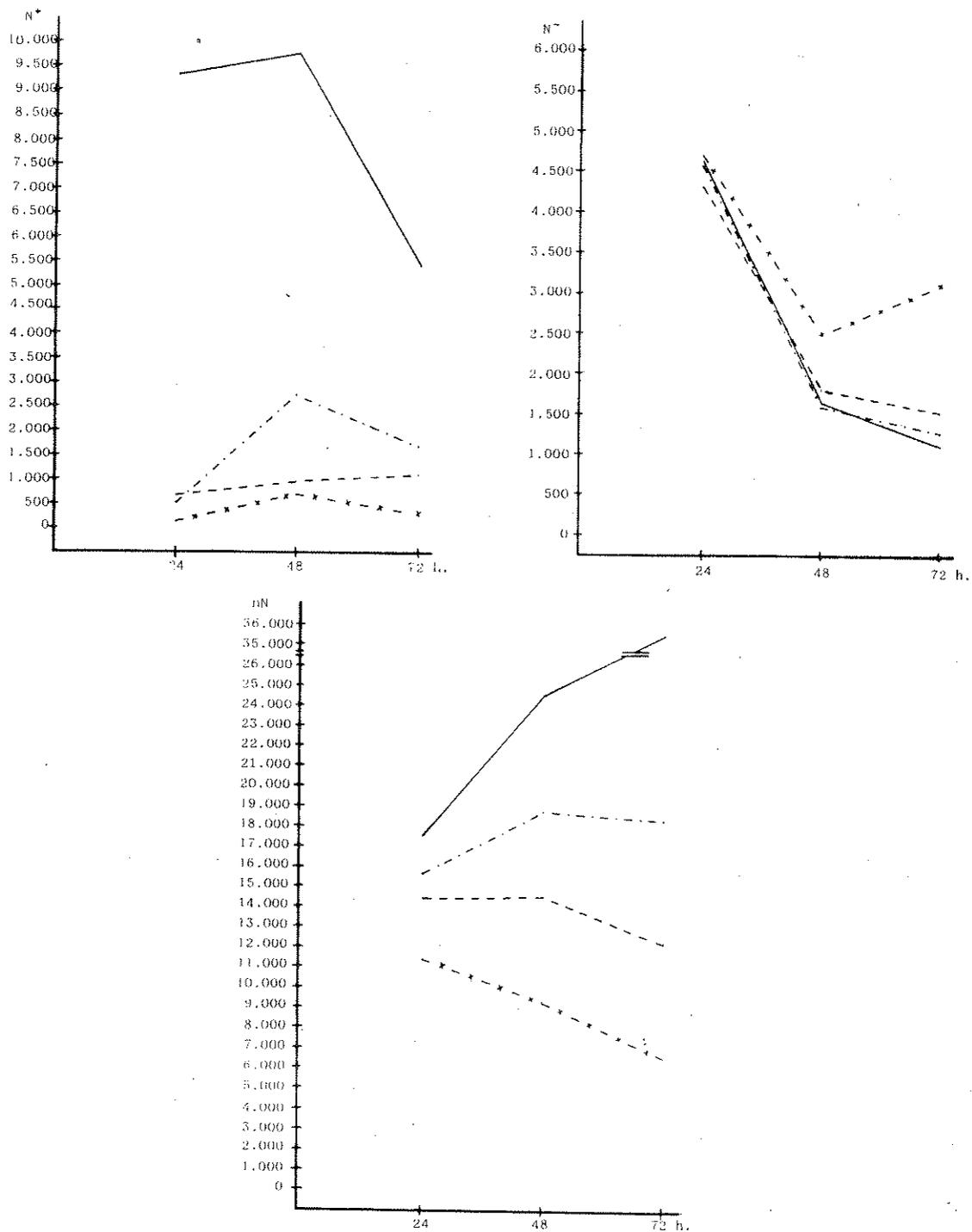


FIGURA 2

Gráfico 1.- Curvas de crecimiento y supervivencia de las tres poblaciones controladas in vitro de los ganglios ciliares disociados: N⁺ = neuronas con prolongaciones; N = neuronas sin prolongaciones; nN= células no neuronales.

Substratos empleados: PORN IB 0,1 mg/ml (——); PORN IIB 0,1 mg/ml (-----); PORN IC 0,1 mg/ml (-.-.-); PORN IC 1 mg/ml (-x-x-); TESTIGO (no revestida) (· · · ·).

Gráfico 2.- Curvas de crecimiento y supervivencia de las tres poblaciones controladas in vitro de los ganglios ciliares disociados (mismas que en el gráfico 1).

Substratos empleados por D₃₅: COL 50 lambdas + ClNa 10 lambdas (——); COL 50 lambdas + PORN IB 0,1 mg/ml, 50 lambdas (-----); COL + PORN IB 100 lambdas (-.-.-); PORN IB 0,1 mg/ml (-x-x-).

Bibliografía

1. Bustos, M., F.J. Alcaín, F. Niño y D. Jordano. Arch. Zootec. 28, 271-284 (1979).
2. Bustos, M. y F.J. Alcaín. Arch. Zootec. 29, 305-313 (1980).
3. Bustos, M., F.J. Alcaín y D. Jordano. Arch. Zootec. 30, 171-179 (1981).
4. Bustos, M., F.J. Alcaín y F. Padilla. Trab. Inst. Cajal. Tomo LXXI, fasc. 1º, 63-70 (1980).
5. Bustos, M., F. Padilla, F.J. Alcaín, F. Niño y D. Jordano. Acta científica Venezolana, 32, nº 5. (1981).
6. Collins, F. Develop. Biol., 65, 50-57 (1978).
7. Collins, F. Proc. Natl. Acad. Sci., 7, 5210-5213 (1978).
8. Helfand, S.F., G.A. Smith y N.K. Wessells., Develop. Biol., 50, 541-547 (1976).
9. Letorneau, P.C. Develop. Biol., 44, 77-91 (1975).
10. Letorneau, P.C. Develop. Biol., 44, 92-101 (1975).
11. Varon, S., M. Manthorpe y R. Adler. Brain Res., 173, 29-45 (1979).