

# Morfología y supervivencia de células estriatales cultivadas en un medio con suero y en un medio químico definido

Lázara Castillo Díaz, Orlando Castellano Benítez,\* Alain García Varona, Johanka Soto Alonso\*\* y Karelys de la Cuétara Bernal.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, \*Laboratorio de Neuromorfología; \*\*Laboratorio de Radioisótopos, Centro Internacional de Restauración Neurológica, Avenida 25 No.15805, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 6 de septiembre de 1997. Aceptado: 18 de diciembre de 1997.

Palabras clave: cultivo de neurona, células estriatales cultivadas, supervivencia neuronal, medios de cultivo, factor de crecimiento epidérmico. Key words: neuronal culture, cultured striatal cells, neuronal survival, culture media, epidermal growth factor.

**RESUMEN.** Las células del estriado obtenidas de embriones de rata de 17 d se disociaron y cultivaron en un medio convencional con suero como suplemento (MS) y en otro en el cual se sustituyó el suero por una mezcla de insulina, transferrina, putrescina, progesterona y selenito de sodio (MSS). En ambos medios las neuronas mostraron un desarrollo morfológico típico. El MSS mantuvo selectivamente a estas y no permitió la proliferación de elementos no neuronales, los cuales en su mayoría fueron eliminados. En este medio la supervivencia de las neuronas fue menor que en el MS y se logró incrementar con una concentración más alta de transferrina. El MS resultó un medio apropiado para el mantenimiento y desarrollo *in vitro* de las células estriatales en cultivos de más larga duración. La detección de un efecto proliferativo del factor de crecimiento epidérmico sobre las células estriatales en el MSS y no en el MS, enfatizó la importancia del empleo de los medios con una composición química definida (libres de suero) para la detección y estudio de la acción de los factores tróficos.

**ABSTRACT.** Striatal cells obtained from 17-day-old embryo rats were cultivated in conventional serum-containing medium (SM) and in serum-free medium (SFM) in which serum is replaced by a mixture of insulin, transferrin, putrescine, progesterone, and sodium selenite. Neurons in both media showed a typical morphological development. SFM selectively maintained the neurons and did not support proliferation or even survival of almost all non-neuronal elements. Survival of neurons in SFM was lower than in SM. Increasing the transferrin concentration it was achieved a higher neuronal survival. SM was useful for the maintenance and development *in vitro* of striatal cells for longer culture periods. EGF proliferative effect on striatal cells observed in SFM but not in SM account for the importance of using chemical defined media (serum free) for the detection and study of growth factor action.

## INTRODUCCION

Los cultivos primarios disociados obtenidos del sistema nervioso central inmaduro han sido útiles como modelos para el estudio del desarrollo de estructuras neuronales y conexiones sinápticas. Estos sistemas han proporcionado mejores condiciones para el control y la manipulación experimental que el tejido intacto.

Numerosas y diversas preparaciones desde sistemas extremadamente complejos de interacciones neuronales hasta cultivos de células aisladas e identificadas han sido desarrolladas. Por lo tanto, para el estudio de un problema particular de investigación una primera etapa necesaria, es la elección del sistema de cultivo apropiado.

El suero ha sido empleado tradicionalmente como elemento nutri-

tivo en los medios de cultivo. Sin embargo, su compleja e indefinida composición introduce variabilidad en los resultados de los experimentos y enmascara la respuesta celular a las sustancias neuroactivas, como los factores neurotróficos. En los últimos años, han sido desarrollados medios sintéticos libres de suero, los cuales permiten el crecimiento de diferentes tipos de células y eliminan los problemas que se presentan con los medios en los que se emplea como suplemento.

El estriado es una estructura cerebral que está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades degenerativas como la Enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington,<sup>1,2</sup> por lo que es el foco de numerosas investigaciones neuroquímicas y neurofisiológicas. El establecimiento de las condiciones para el mantenimiento *in vitro* de las poblaciones neuronales estriatales permite estudiar los factores que influyen sobre la supervivencia de estas células.

En este trabajo se comparan dos métodos utilizados para la preparación de cultivos disociados a partir del estriado embrionario, uno empleando un medio convencional con suero como suplemento y otro en el cual este fue reemplazado por una mezcla definida de suplementos nutricionales. A partir de la experiencia de laboratorio, se realiza un análisis de las posibilidades experimen-

tales de ambos sistemas, basado en el estudio de la supervivencia y el desarrollo neuronal y se reporta la utilidad de estos para detectar la acción proliferativa del factor de crecimiento epidérmico sobre esta población celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo empleados procedían de la Gibco (UK), y los suplementos y otros reactivos de la Sigma (USA).

### Preparación del cultivo de células estriatales disociadas

El tejido estriatal fue obtenido de embriones de ratas Wistar con 17 d. El estriado se disecó aplicando un corte a través de la corteza medial y se expuso el primordio estriatal en la superficie inferior de los ventrículos laterales. La eminencia estriatal fue separada mediante un corte longitudinal superficial.<sup>3</sup>

Las etapas fundamentales en la disociación del tejido y la preparación de la suspensión celular se describen brevemente a continuación.

El tejido fragmentado fue tratado con una disolución de tripsina 0,1 % a 37 °C durante 20 min. Finalizada la digestión, la tripsina se inactivó añadiendo suero de ternera fetal (STF) 10 %, contenido en el medio basal [medio mínimo esencial de Eagle + glucosa 5,5 g/L (MEM- Glu) o una mezcla 1:1 (v/v) del MEM modificado por Dulbecco y del medio F-12 (DMEM/F-12)]. La disgregación de las células se realizó con pipetas Pasteur de diámetros internos decrecientes y la suspensión se centrifugó a 1 500 r/min durante 5 min a 4 °C. La concentración celular y la viabilidad de las células se determinaron por conteo en cámara de Neubauer empleando azul de tripan. La viabilidad celular fue superior al 90 % en todas las experiencias.

**Experimento 1.** Este experimento se diseñó para seleccionar la densidad celular de siembra, el medio basal y el tratamiento a la superficie de cultivo. Se utilizaron densidades de siembra de 130, 263 y 2 631 células/mm<sup>2</sup> (cél./mm<sup>2</sup>) y se compararon el MEM-Glu y DMEM/F-12 ambos con 2 mmol de glutamina y STF 10 % como suplemento. La siembra se realizó en multiplacas de 24 pozos o cubreobjetos contenidos en estas (para las determinaciones inmunocitoquímicas). Los resultados se evaluaron determinando la eficiencia de siembra (ES) entre las 22 y 24 h de cultivo<sup>4</sup> y la emisión de fibras neuríticas. El número de células que

emitieron neuritas (celneur), se determinó contando las células que mostraban morfología neuronal, es decir, un soma oval o redondo, refringente y con neuritas con una longitud superior al diámetro del soma. Se contaron 20 campos no superpuestos en cada cultivo. El área del campo fue de 0,5 mm. Se ensayaron dos tratamientos de la superficie de cultivo, poli-L-lisina 0,1 mg/mL, 10 min, a temperatura ambiente (PLL) y poli-L-lisina seguido de un recubrimiento con DMEM + STF 10 %, 2 h, a 37 °C (PLL+ STF). A los 7 d, se determinó la supervivencia neuronal mediante el conteo en los cultivos frescos de las células con la morfología característica, cuya identidad se corroboró mediante la demostración inmunocitoquímica de la proteína del neurofilamento (NF) como se describe posteriormente.

**Experimento 2.** A partir de los resultados del experimento 1, se examinó el desarrollo de las células en un medio con STF 10 % (MS) y en el MSS como suplemento. Para el cultivo en el segundo, las células fueron cultivadas previamente en el MS, 22 a 24 h y después de eliminado el medio, se lavaron las placas una vez con DMEM/F-12, añadiendo un MSS compuesto por DMEM/F-12 con suplemento de albúmina de suero bovino fracción V (0,25 %), transferrina (50 ó 100 mg/mL, dependiendo del experimento), insulina (25 mg/mL) (BDH, UK) putrescina (60 mmol), progesterona (20 nmol), selenito de sodio (30 nmol), glutamina 2 mmol, Hepes 15 mmol y hidrógenocarbonato de sodio 1,2 g/L. La selección del MSS se realizó a partir de la composición que se conoce.<sup>5,6</sup> Los cultivos se mantuvieron en atmósfera de 6 % de CO<sub>2</sub>-aire saturada de humedad, durante 7 y 16 d cambiando el medio cada 48 h. Los cultivos se observaron diariamente empleando microscopía de contraste de fase.

El número de células totales se determinó por conteo en cámara de Neubauer después de la tripsinización y resuspensión de las células en disolución salina amortiguada (PBS). Las neuronas se determinaron por conteo en la placa. Para evaluar cualitativamente la proporción de astrocitos, estos se detectaron mediante marcaje inmunocitoquímico de la proteína ácida fibrillar glial (GFAP).

### Inmunocitoquímica

En la identificación de las neuronas se empleó un anticuerpo monoclonal (A<sub>c</sub>) que reconoce NF (NF 160 kD; Böehringer Mannheim,

Germany) y los astrocitos se identificaron con un A<sub>c</sub> policlonal contra la GFAP (Dako). El marcaje fue realizado a los cultivos sobre cubreobjetos. A t = 7 estos fueron fijados con paraformaldehído amortiguado al 4 % durante 20 min. La reacción inmunocitoquímica se llevó a cabo como sigue: las muestras después de fijadas, se lavaron abundantemente con PBS, se bloquearon y permeabilizaron por 20 min con una mezcla de STF 20 %-triton X-100 25 % en PBS, incubándose posteriormente con el A<sub>c</sub> primario durante toda la noche (las diluciones fueron: NF, 1:9; GFAP, 1:800). Después de lavar tres veces, se incubó 1 h con los A<sub>c</sub> biotinilados apropiados. La incubación posterior con el complejo EstreptAB conjugado con fosfatasa alcalina (Dako) fue de 1 h. En el revelado se utilizó naftol y el cromógeno *fast red*.

### Determinación de la actividad colina acetiltransferasa (CAT)

Para hallar la supervivencia de la población neuronal colinérgica, se determinó la actividad de la CAT, un marcador funcional de estas células.<sup>7,8</sup>

A los 16 d *in vitro* los cultivos fueron lavados tres veces con una disolución amortiguadora de fosfato 25 mmol (pH 7,4). Las células fueron desprendidas mecánicamente de la placa y trituradas en un homogenizador de vidrio. La actividad CAT en el homogenado, (nmol/(h · μg de proteína), se determinó mediante el método de Fonnum modificado,<sup>9</sup> empleando como sustrato la 1-<sup>14</sup>C acetil CoA (50 μCi/mL). Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.<sup>10</sup>

**Experimento 3.** Se determinó si los sistemas de cultivos en MS Y MSS, establecidos en los experimentos precedentes, podían ser utilizados convenientemente para la evaluación de la acción proliferativa del factor de crecimiento epidérmico. Con este fin, a las 24 h (t = 1), los cultivos fueron lavados con DMEM/F-12, y se les añadió el MSS o MS y 20 ng/mL del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (FCE-Hr) (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana) a los cultivos tratados. En los controles no se añadió este producto. El medio se cambió cada 48 h adicionando el FCE-Hr en los cultivos tratados durante 6 d. El crecimiento celular se determinó por conteo de las células en cámara de Neubauer según el procedimiento anteriormente descrito.

**Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron expresados a través de la media y el error estándar de la media (EEM), y la significación estadística fue establecida aplicando la prueba de la U de Mann-Whitney.<sup>11</sup>

**RESULTADOS**

**Experimento 1.** La densidad de siembra sobre la ES y la emisión neurítica aumentaron con el número de células inoculadas, sin embargo, sólo hubo un incremento significativo de la emisión neurítica ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1). En los cultivos inoculados con 2 631 cél./mm<sup>2</sup>, no fue posible contar las células en la placa ni evaluar la emisión de neuritas debido a la formación de agregados celulares. Teniendo en cuenta que la supervivencia neuronal es dependiente de la densidad celular,<sup>12, 13</sup> los experimentos subsiguientes fueron realizados con una densidad celular de 1 315 cél./mm<sup>2</sup>, lo cual permitió la evaluación cuantitativa del desarrollo celular.

El DMEM/F-12 influyó positivamente sobre la ES ( $p < 0,05$ ) y la emisión neurítica, aunque esta última no fue significativamente mayor (Fig. 1). Este fue el medio seleccionado para cultivar las células.

Para el tratamiento de la superficie (Fig. 2), el recubrimiento con PLL fue satisfactorio y la adición de STF (PLL + STF) no aumentó significativamente la supervivencia obtenida.

**Experimento 2.** Los cultivos de células estriatales obtenidos utilizando el MS y el MSS, fueron comparados atendiendo a la supervivencia celular, el desarrollo neuronal y a la composición celular. La apariencia morfológica de un cultivo de estriado con 24 h *in vitro* ( $t = 1$ ) se muestra en la Fig. 3a. La mayoría de las células mostraron un soma oval o redondo, refringente, con uno o dos filamentos neuríticos, morfología típica de las neuronas inmaduras.<sup>14</sup> En este período del desarrollo *in vitro* fueron muy escasas las células no refringentes poligonales, morfología que caracteriza a las células astrogiales y otros tipos no neuronales.

En los cultivos donde el MS fue sustituido por el MSS, el número de células disminuyó a ( $55 \pm 8$ ) % con respecto al número de estas a  $t = 1$  durante las 24 h que siguieron al cambio de medio, a partir de lo cual, se mantuvo aproximadamente constante hasta el día 7, que fue el último en que se realizó el conteo. Sin embargo, en aquellos que continua-

**Tabla I.** Efecto de la densidad celular sobre la eficiencia de siembra y la emisión neurítica.

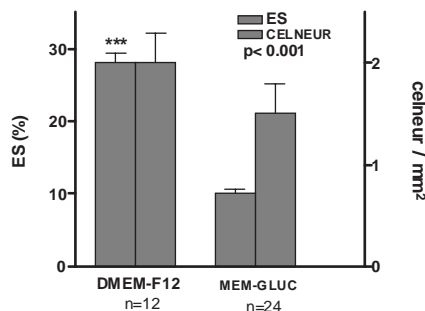
Densidad celular (cél./mm <sup>2</sup> )	ES (%)	Células con neuritas (células/mm <sup>2</sup> )
130	29 ± 3	0,3 ± 0,1 (0,3 %) <sup>a</sup>
263	36 ± 3	1,7 ± 0,3 (0,9 %) <sup>a*</sup>
2 631	—	—

DMEM/F-12, tiempo de cultivo 22 a 24 h .

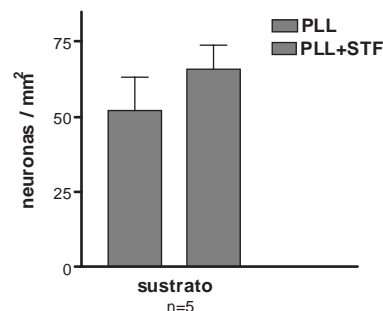
\*  $p < 0,05$ , prueba de la U de Mann-Whitney.

<sup>a</sup> Porcentaje de células con respecto al total adheridas.

(—) No evaluado.



**Fig. 1.** Efecto del medio de cultivo sobre la eficiencia de siembra y la emisión neurítica. El DMEM/F-12 influyó positivamente sobre ambos indicadores, siendo significativo el aumento de la emisión neurítica.



**Fig. 2.** Efecto del sustrato de cultivo sobre la supervivencia celular.

La adición de suero después de la poli-L-lisina no aumentó significativamente la supervivencia neuronal.

ron en MS, aunque no se realizó conteo de las células, la observación microscópica evidenció que la viabilidad de estas no se afectó significativamente. Estos cultivos se trataron igual que los mantenidos en MSS, es decir, fueron lavados con DMEM/F-12 y se les cambió el medio, con el objetivo de garantizar condiciones paralelas en el tratamiento.

El desarrollo *in vitro* de las células en ambos medios entre los días 2 y 7 estuvo caracterizado por un aumento de la longitud de los procesos neuríticos. Las figuras 3 y 4, muestran la apariencia morfológica de los cultivos en MS y MSS a los 7 d después de procesados por inmunohistoquímica. Como puede observarse en el MS las neuronas (Fig. 3b) y los astrocitos (Fig.3c) fueron más abundantes que en el MSS (Fig. 4a y b, respectivamente). En el MS la superficie de la placa se cubrió de una monocapa de células no neuronales sobre la cual las neuronas se encontraban adheridas.

En un intento de incrementar la supervivencia neuronal en el MSS la concentración de transferrina en este se aumentó a 100 µg/mL . La transferrina es uno de los nutrientes que más influyen sobre la supervivencia neuronal y se utilizó

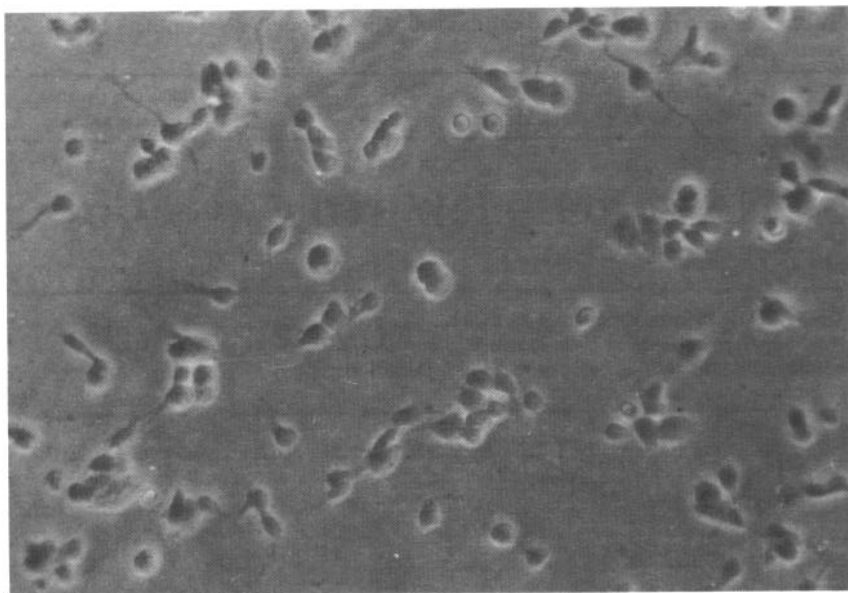
una concentración reportada con resultados óptimos.<sup>5, 6</sup> El efecto de la concentración de transferrina sobre la supervivencia fue determinado cuantitativamente mediante el conteo de las neuronas en los cultivos frescos a los 7 d *in vitro*. Esta transformación en el MSS (MSS-T100) aumentó la supervivencia neuronal aproximadamente 19 veces con respecto al medio con 50 µg/mL (MSS-T50), sin embargo, no logró resultados comparables al MS (Fig. 5).

Después de los 7 d fue evidente una disminución de las células en los cultivos en MSS (ambas variantes) y a los 16 días no hubo supervivencia neuronal en estos, a diferencia de los mantenidos en MS.

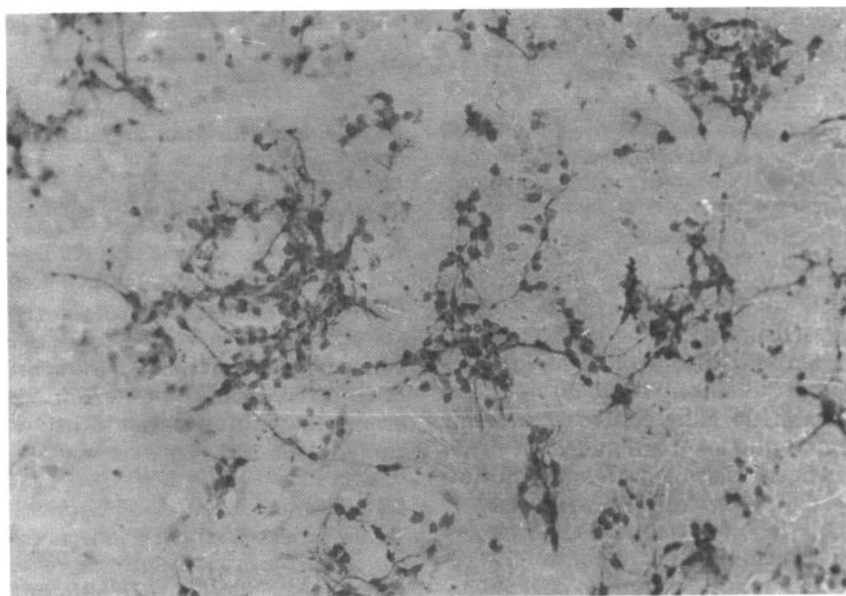
La actividad CAT detectada en los cultivos en MS, demostró la presencia en estos de una subpoblación de neuronas colinérgicas funcionalmente activas (Tabla 2).

De las características de los sistemas de cultivo resumidas (Tabla 2) es importante destacar que el escaso crecimiento de los astrocitos y otros tipos celulares en el MSS, permitió la obtención de cultivos de neuronas con una mayor pureza.

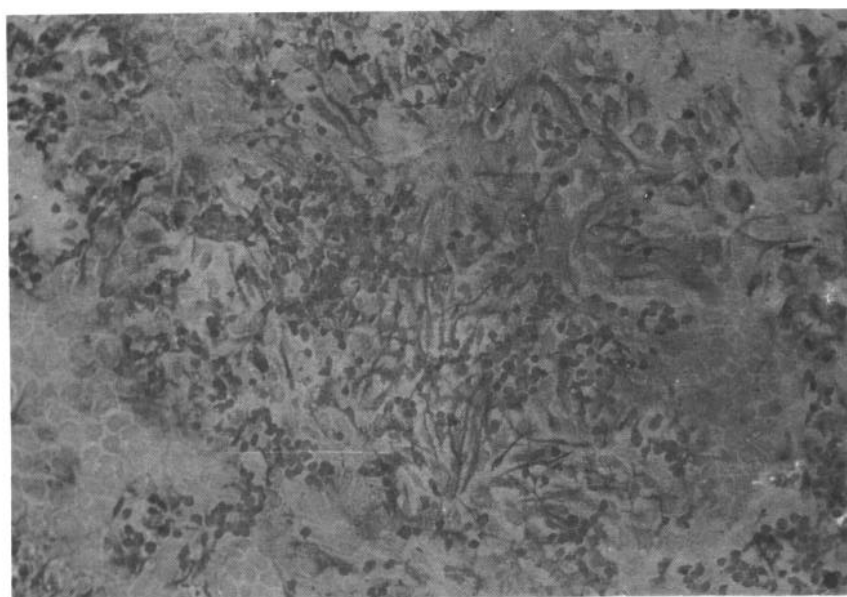
**Experimento 3.** El MS y el MSS-T50 fueron utilizados para detectar



A



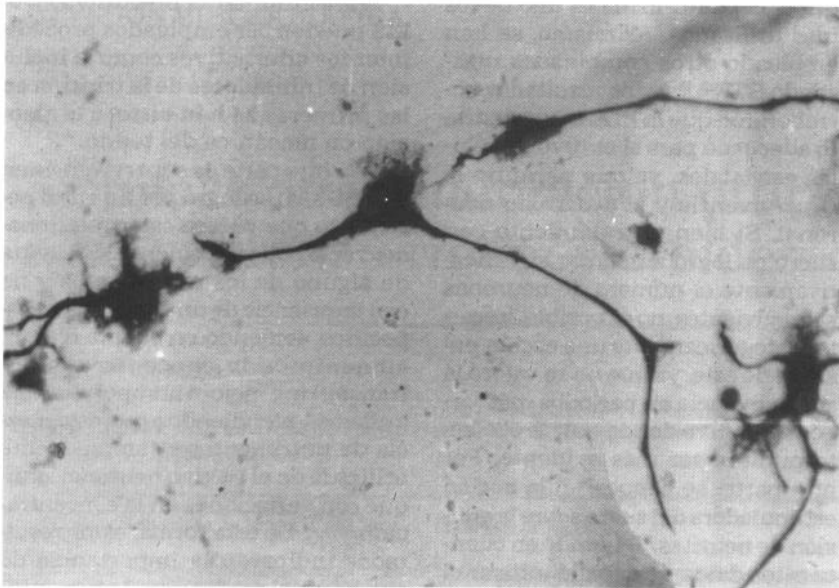
B



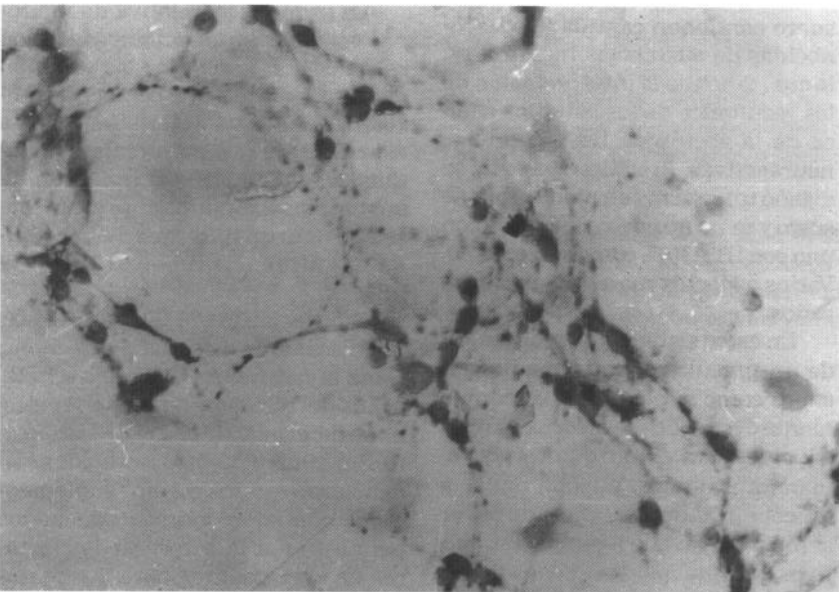
C

**Fig. 3.** Morfología de un cultivo de células estriatales.

A las 24 h *in vitro* las neuronas inmaduras mostraron un soma oval o redondo refringente con uno o dos filamentos neuríticos. Cultivo fresco, contraste de fase, 200X. (A). A los 7 d *in vitro* en el MS las neuronas (B) y los astrocitos y células no neuronales (C) fueron más abundantes que en el MSS. Inmuno-tinción para el NF (B), 200X y para la GFAP (C), 100X.



A



B

Fig. 4. A los 7 d *in vitro* en el MS las neuronas y los astrocitos y células no neuronales fueron más abundantes que en el MSS (A) neuronas y (B) astrocitos. Inmuno-tinción para el NF (A) 200X y para B, 200X.

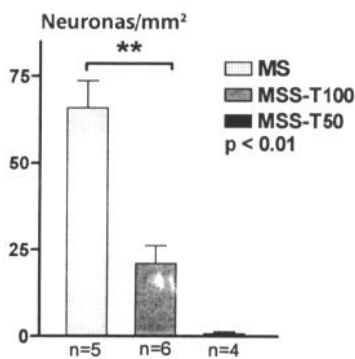


Fig. 5. Supervivencia neuronal en el MS y MSS y efecto de la concentración de transferrina.

El aumento de la concentración de transferrina a 100 µg/mL aumentó significativamente la supervivencia neuronal en el MSS, pero no se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos en el MS.

Tabla 2. Resumen de las características fundamentales de los cultivos en MS y MSS.

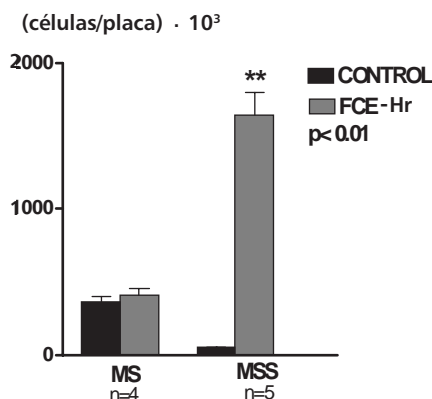
Medio	Neuronas/mm²	Astrocitos	CAT [nmol/(h · µg proteína)]
	n = 4-5 (1)	n = 4-5 (1)	n = 10 (2)
MSS	21 ± 5,2	aislados	—
MS	66 ± 7,7	confluentes	0,02 ± 0,001

Tiempo de cultivo: (1) 7 d; (2) 16 d.  
(—) No evaluado.

un posible efecto estimulador del FCE-Hr sobre la multiplicación celular, para ello, 20 ng/mL de este fueron añadidos a los cultivos. Se ha demostrado que esta concentración del FCE-Hr induce la proliferación de

las células obtenidas de diferentes estructuras del sistema nervioso.<sup>15,16</sup> Cuando el medio utilizado fue el MSS, el FCE-Hr aumentó aproximadamente 30 veces el número de células con respecto a los controles ( $p < 0,01$ ),

no así en MS, donde las diferencias con respecto al control no fueron significativas (Fig. 6). Estos resultados evidenciaron un efecto negativo del suero sobre la actividad proliferativa del FCE-Hr:



**Fig. 6.** Actividad proliferativa del FCE-Hr empleando MS y MSS. La presencia de STF en el MS eliminó el efecto proliferativo ejercido por el FCE-Hr, el número de células no aumentó significativamente con respecto al control.

## DISCUSION

La supervivencia de las neuronas en cultivo primario es dependiente de la edad del animal del cual se obtiene el tejido y de la cantidad de células empleadas en la siembra.<sup>4</sup> En los embriones de rata de 17 d, el estado de inmadurez de las neuronas<sup>17</sup> permite la disociación celular sin afectar la supervivencia neuronal.

Los resultados corroboraron la importancia de utilizar una densidad de siembra alta dentro de los límites que el diseño experimental lo permita, ya que fue estimulada la emisión de neuritas, la cual fue representativo del desarrollo neuronal. El efecto de la densidad celular sobre la emisión neurítica parece evidenciar la importancia de las interacciones celulares para las neuronas en cultivo.

Dada la heterogeneidad bioquímica y funcional de las neuronas, los medios basales difieren en su capacidad de promover la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de los distintos fenotipos neuronales. En las condiciones de trabajo, el DMEM/F-12 permitió una mayor supervivencia de las células estriales en etapas primarias del desarrollo *in vitro*.

El tratamiento de la superficie con policaciones es ampliamente empleado en el cultivo neuronal, de

estos, la poli-L-lisina es uno de los más utilizados. Asimismo, se han empleado otros combinados utilizando STF.<sup>18, 19</sup> Estos resultados corroboraron que la PLL es un sustrato adecuado para el cultivo de células estriales, ya que permitió la supervivencia y el desarrollo neuronal. Si bien el tratamiento con suero no logró aumentar significativamente el número de neuronas sobrevivientes, no es posible descartar categóricamente una acción positiva de éste, ya que no se valoró la supervivencia en periodos más largos de cultivo donde quizás el efecto pudiera ser más evidente. Por otra parte, se conoce<sup>20, 21</sup> la acción estimuladora del suero sobre la emisión de neuritas. Teniendo en cuenta estos datos, se decidió utilizar el tratamiento PLL+STF en los cultivos de trabajo.

Los medios suplementados con suero contienen cantidades desconocidas de sustancias indefinidas, lo cual dificulta la interpretación de los resultados de los estudios acerca de la acción de las sustancias neuroactivas. Atendiendo a esto, se diseñó un sistema en medio libre de suero y se valoró por comparación con uno con STF 10 % como suplemento. Varios aspectos merecen ser destacados.

En estos sistemas, la realización de un precultivo en un medio con suero como suplemento, es conveniente después de la disociación con tripsina, para evitar que trazas remanentes de ésta puedan dañar a las células. Además, antes de pasar al MSS, un lavado ligero de los cultivos permite mantener cantidades residuales de suero en el medio, lo que posibilita, en cierta medida, un cambio gradual en las condiciones nutricionales de las células. A pesar de esto, en los cultivos de trabajo se produjo una inmediata pérdida celular después del lavado y cambio al MSS, posiblemente motivada por el desprendimiento de las células del sustrato, ya que, como ha sido observado en otros sistemas,<sup>22</sup> al parecer una de las funciones del suero está vinculada con la estabilización de la unión de las células al sustrato. Este requerimiento no lo satisface el MSS. Soportando esta interpretación está la inmediata pérdida de células después del lavado y el no haber observado este fenómeno en los cultivos en MS, donde el suero se reintrodujo rápidamente después del lavado.

Para eliminar el precultivo en el MS pueden ser empleados procedimientos alternativos como la inclusión de inhibidores de la tripsina en las primeras 24 h *in vitro*, o la disociación mecánica del tejido.

Por otra parte, la supervivencia en el MSS solo se logró por un corto periodo, lo que parece estar relacionado con la concentración insuficiente de alguno de los nutrimentos y no con la ausencia de un componente específico, teniendo en cuenta que un aumento de la concentración de transferrina mejoró la supervivencia y además, atendiendo a que esta mezcla de nutrimentos es ampliamente utilizada en el cultivo neuronal, aunque con variaciones en la concentración.<sup>5, 23, 24</sup> De esta forma, estos resultados indicaron la importancia de optimizar el medio para lograr cultivos de más larga supervivencia *in vitro*.

La proporción relativa de neuronas en el MSS fue incrementada con respecto al MS, debido a la reducción del crecimiento de las células no neuronales. Esta característica hace a este sistema útil para realizar estudios relacionados con la acción de sustancias exógenas sobre el desarrollo neuronal, lo que hace mínima la influencia de otros tipos celulares.

En presencia del STF el FCE-Hr no incrementó el número de células. Dada la naturaleza compleja e indefinida del STF, en estas experiencias, no se determinó la causa de este efecto. Sin embargo, estos resultados evidenciaron que los medios suplementados con suero no son adecuados para estudiar la acción de los factores de crecimiento sobre las neuronas. En estos medios las complicaciones se derivan de dos fuentes fundamentales, por un lado el suero puede antagonizar con el FCE-Hr a través de diferentes mecanismos y por el otro, este estimula el crecimiento de otros tipos celulares, mayoritariamente glías, que pueden influir sobre el desarrollo neuronal mediante la acción de los factores tróficos que estas producen.<sup>25</sup>

Finalmente, la expresión de la CAT en los cultivos en MS indicó que este medio es adecuado para el desarrollo y la diferenciación de las células colinérgicas estriales. Una característica relevante de estas células en el contexto de las enfermedades degenerativas, es su vinculación funcional con el sistema nigroestriatal cuyo desbalance se encuentra entre las causas del desajuste motor

presente en la Enfermedad de Parkinson.

### CONCLUSIONES

En el MS las células estriatales cultivadas presentan una supervivencia y un desarrollo que posibilitan la utilización de este medio para el mantenimiento *in vitro* de esta población celular. El MSS empleado en este estudio sólo permitió una limitada supervivencia neuronal, lo que hace necesario la optimización de su composición. Este medio posee la importante propiedad de ser selectivo, lo que aumenta la proporción relativa de neuronas con respecto al MS. Además, en las condiciones empleadas resultó útil para detectar el efecto proliferativo del FCE-Hr.

Los resultados enfatizaron la importancia del empleo de los medios libres de suero para la detección y estudio de la acción de los factores tróficos, un campo de activa investigación en la neurobiología actual.

### AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología la donación del Factor de Crecimiento Epidérmico utilizado en este trabajo.

### BIBLIOGRAFIA

- Purdon S.E., Mohr E., Ilivitsky V., Barry D.W., Jones M.D. Hunting-ton's Disease: Pathogenesis, diagnosis and treatment. **J. Psychiatr. Neurosci.**, **19**, 359, 1994.
- Braak H. , Braak E. , Yilmazer D. , Schultz C., de Vos R.A.I., Jansen E.N.H. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. **J. Neural. Transm. (Suppl.)**, **4**, 15, 1995.
- Dunnett S.B. and Bjorklund A. Neural transplantation. A Practical Approach. chapter I. Dunnett S.B. and Bjorklund A, 1-19, 1993.
- Freshney R.I. Culture of animals cells, Chapter XVII. 2nd Ed., Alan R. Liss, Inc., New York, 227-248, 1988.
- Bottenstein J.E. and Gordon S. Cell culture in the Neuroscience, chapter I, Bottenstein J.E. and Gordon S., Plenum Press, New York, 3-35, 1989.
- Aizenman Y. and de Vellis J. Brain neurons develop in a serum and glial free environment, effects of transferin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival growth and differentiation, **Brain Res.**, **406**, 32, 1987.
- Vaca K. The development of cholinergic neurons, **Brain Res. Rew.**, **13**, 261, 1988.
- Nonner D, Temple S, Barrett J.N. Rat embryonic septal neurons survive and express cholinergic properties in isolation and without nerve growth factor, **Dev. Brain Res.**, **70**, 197, 1992.
- Fonum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase, **J. Neurochem.**, **24**, 407, 1975.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **J. Biol. Chem.**, **193**, 265, 1951.
- Siegel S. Diseño experimental no paramétrico aplicado a las ciencias de la conducta, Cap. VI, Instituto del Libro, La Habana, Cuba, 120-186, 1972.
- Hertz L., Juurlink B.H.J., Szuchet S. Hanbook of Neurochemistry, Chapter XXIII, Vol. 8 , Lajtha A, Ed., Plenum Publishing Corporation, 603-666, 1985.
- Ronnback E.H. A dissection and tissue culture manual, Chapter XX, 2nd Ed., Shahar A., de Vellis J., Vernadakis A. *et al.*, Alan R. Liss, Inc, 993-999, 1989.
- Truex R. y Carpenter M.B. Neuroanatomía Humana, Cap. 6, 3ra Ed., Instituto del Libro, La Habana, Cuba, 93-122, 1967.
- Mytilineou C., Park T.H., Shen J. Epidermal growth factor-induced survival and proliferation of neuronal precursor cells from embryonic rat mesencephalon, **Neurosc. Lett.**, **134**, 62, 1992.
- Svendsen C.N., Fawcett J.W., Bentlage C., Dunnett S.B. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium, **Exp. Brain. Res.**, **102**, 407, 1995.
- Fentress J.C., Stanfield B.B., Cowan W.M. Observations on the development of the striatum in mice and rats, **Anat. Embryol.**, **163**, 275, 1985.
- Yavin E. Yavin Z. Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface, **J. Cell. Biol.**, **62**, 540, 1974.
- Bottenstein J.E. Environmental influences on cells in culture. Neuro-methods. Practical Cell Culture Techniques, Vol. 23, Boulton A., Baker G., and Wals W., The Human Press Inc., 23, 63, 1992.
- Oorschot D.E., Jones D.G. Tissue Culture Analysis of Neurite Outgrowth in the presence and absence of serum: possible relevance for central nervous system regeneration, **J. Neurosc. Res.**, **5**, 341, 1986.
- Faivre-Bauman A., Rosenbaum E., Puymirat J., *et al.* Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium, **Dev. Neurosci.**, **4**, 118, 1981.
- Carter W.G., Rauvata H., Hakomori S. Studies on cell adhesion and recognition, **J. Cell. Biol.**, **88**, 138, 1981.
- Ahmed S., Reynolds B.A., Weiss S. BDNF enhances the differentiation but the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors, **J. Neurosc.**, **18**, 5765, 1981.
- Bouvier M.M., Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors *in vitro*, **J. Neurosc.**, **15**, 7141, 1981.
- Martin D.L. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. **Glia**, **5**, 81, 1992.