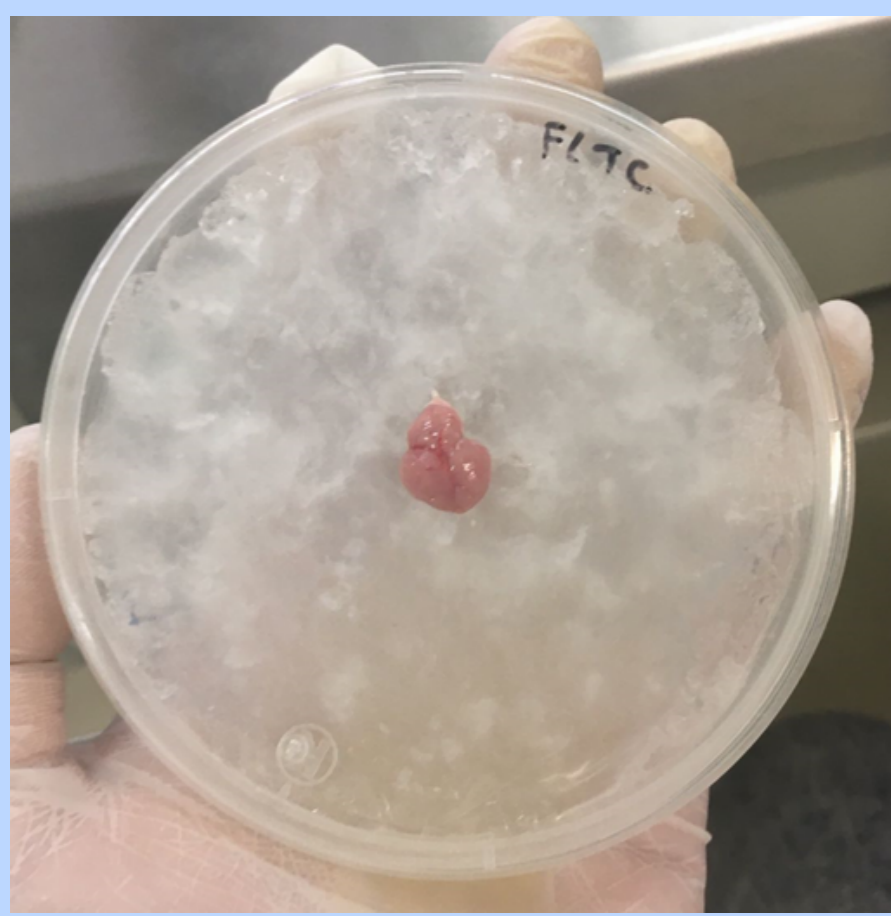
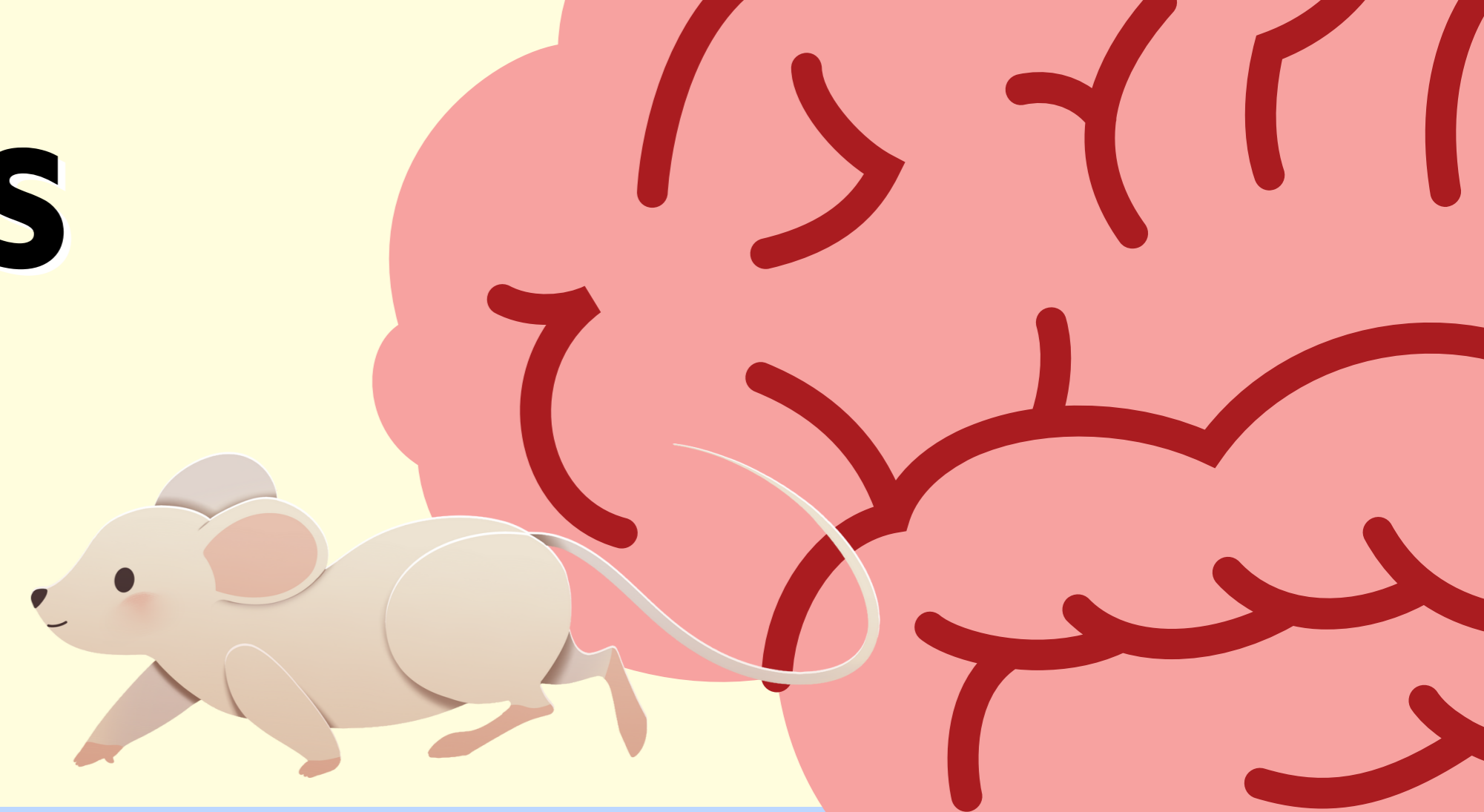


ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES DE HIPOCAMPO DE RATÓN



Resumen

El hipocampo es una estructura cerebral compleja que se encuentra dentro del lóbulo temporal. Tiene un papel importante en el aprendizaje y la memoria, además de ser una estructura plástica y vulnerable que puede dañarse por una variedad de estímulos. En investigación, se ha utilizado el cultivo de neuronas de hipocampo de murinos como modelo de estudio del sistema nervioso. En este proyecto se identificó y realizó la disección del hipocampo en condiciones de esterilidad, y se estandarizaron las condiciones óptimas de cultivos primarios de neuronas. Debido a la complejidad en la identificación del hipocampo, fue necesario primero aprender su localización en ratones neonatos de 7 días, en los cuales el proceso de mielinización está por completarse. Finalmente, los cultivos primarios fueron exitosos y se lograron mantener por 7 días.

INTRODUCCIÓN

Los modelos celulares han sido de suma importancia, por lo que, determinar condiciones óptimas para éstos, resulta indispensable para la realización eficiente de un estudio relacionado. La habilidad de poder cultivar neuronas del hipocampo, debido a que la población neuronal es más sencilla (Kaech & Banker, 2006) ha favorecido el avance en el estudio del sistema nervioso (Gordon et al., 2013) aplicado al estudio de enfermedades neurodegenerativas.

Se emplean modelos murinos que se mantienen en un entorno adecuado y controlado para su buen desarrollo siguiendo la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Buscando que el animal permanezca sin presentar cambios metabólicos o fisiológicos, que puedan resultar en variaciones poco favorables (Broderson et al., 1976; Schoeb et al., 1982; Vesell et al., 1976) hasta el momento de la eutanasia.

Diversos estudios en neurobiología con modelos animales han demostrado que el hipocampo funge un papel importante en la memoria a largo plazo y también se ha relacionado el papel fundamental de la memoria con un marco espaciotemporal dentro del cual se desarrollan las diversas funciones sensoriales relacionadas a la dirección y velocidad de movimiento, identificación olfativa, detección de coincidencia o no coincidencia, entre otros (Hölscher, 2003; Knierim, 2015; Nadel, 2021). Existe cierta diferencia en la topografía cerebral de humanos y ratones. Sin embargo, a nivel histológico el hipocampo en ambos organismos es parcialmente similar.

La clasificación de los componentes del hipocampo, se da en 4 regiones de acuerdo con Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1982), cada una de las cuales posee subdivisiones de acuerdo con el tipo de células que los conforman:

1. Hipocampo propio que se subdivide en regiones interconectadas, las cuales comprenden el cuerno de Amón, el cual a su vez se divide en 3 regiones desde la más distal hasta la más proximal en: CA1, CA2 y CA3 (Magdariaga Hernández et al., 2018), conformadas por células piramidales (Rodríguez Sáez, 2012)
2. Giro dentado que es una estructura de tres capas (Schröder et al., 2020): stratum moleculare (SM), stratum granulare (SG), y el hilus (Hi). Entre los dos últimos se pueden encontrar precursores neuronales con actividad neurogénica en la vida adulta (Rodríguez Sáez, 2012; Schröder et al., 2020)
3. Complejo subicular (subiculum) difieren respecto a la región CA1 por el empaquetamiento mucho más suelto de neuronas piramidales (Schröder et al., 2020).
4. Corteza entorrinal, se divide en 2 subcampos: lateral y medial (Schröder et al., 2020), que en conjunto forman 6 capas corticales, las cuales pueden diferenciarse debido al tamaño celular (Rodríguez Sáez, 2012). Este segmento del hipocampo recibe información sensorial de varias áreas cerebrocorticales y su funcionamiento contribuye a la formación de la memoria y las emociones.

RESULTADOS

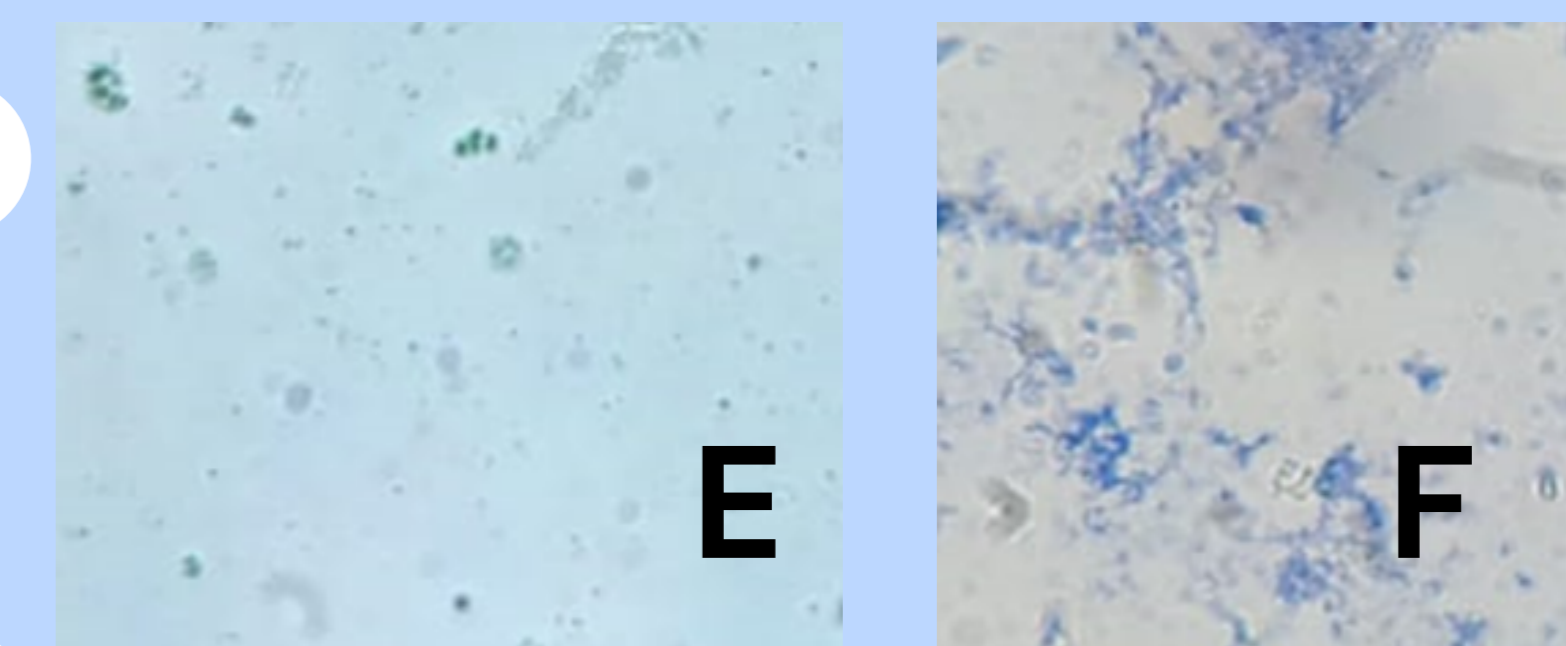
Se obtuvieron los cerebros de los ratones de 7 a 10 días de nacidos, de los cuales se identificaron los bulbos olfatorios y el cerebelo. Se ubicó el cerebro de tal manera que los bulbos olfatorios quedaron en la parte superior y el cerebelo en la parte inferior (Figura A). se realizaron cortes coronales para retirar estas estructuras, quedando la zona media del cerebro, en la cual se procedió a realizar la localización y disección del hipocampo (Figura B, C). El cuerpo calloso es una estructura mielinizada que sirvió de referencia para la mejor localización del hipocampo (Figura C).



Con relación a la obtención de los cultivos primarios, se tuvo contaminación por hongos en algunas de las cajas (Figura D). Presencia de hifas en placa de cultivo primario. 40x, microscopio de luz.



A los 3 días de observación del cultivo (Figura E) se observó la presencia de células escasas y sin procesos. Sin embargo, se obtuvo la presencia de células con algunos procesos a los 7 días (Figura F) de cultivo, las cuales fueron observadas con azul de tripano.



DISCUSIÓN

Los cultivos primarios de neuronas obtenidos a partir de estructuras cerebrales de roedores son ampliamente utilizados para el estudio de las propiedades fisiológicas básicas de las neuronas, y representan una técnica muy útil para comprender mecanismos de neurotoxicidad. (Catlin et al., 2016). La utilización de los cultivos primarios, a diferencia de las líneas celulares, es preferible debido a que no provienen de células tumorales lo que favorece que se puedan evaluar las propiedades neuronales más cercano a lo que ocurre in vivo. (Gordon et al., 2013)

Los medios de cultivo libres de suero son muy útiles cuando se necesita controlar factores de crecimiento, hormonas. La utilización de inhibidores de mitosis, resultan ser muy tóxicos para el crecimiento de neuronas (Wallace' & Johnson, 1989), por lo que en este trabajo se optó por la utilización de un suplemento, el B27, que evita la utilización de suero, y con ello, disminuye la proporción en el crecimiento de este tipo de células gliales. (Brewer et al., 1993).

Uno de los principales problemas en la realización de los cultivos primarios es la contaminación por hongos. Tanto los hongos como las esporas se encuentran de manera ubicua en el ambiente y pueden contaminar los cultivos por medio de la vía aérea. Durante la observación de los cultivos, algunas de las placas presentaron el crecimiento de hifas, lo que pudo evitar que tuviéramos un adecuado crecimiento de las células obtenidas de los hipocampos de ratón.

CONCLUSIÓN

Fue posible la correcta identificación del hipocampo y su posterior disección en ratones de 7 a 10 días de nacidos, etapa en la cual aún es complicado la observación de esta estructura para un ojo no entrenado. Se establecieron las condiciones para el cultivo primario de células de hipocampo, identificando los puntos en los que se pudo tener el problema de contaminación por hongos.