

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



Se utilizaron ratones BalbC de 7 a 10 días de nacidos
Fueron sacrificados por dislocación cervical



Principio de las tres Rs

Este método se publicó por Russel & Burch en 1960
Reemplazar por un método alternativo donde se evite el uso de animales de laboratorio
Refinar los métodos comúnmente utilizados para reducir y/o evitar el mayor sufrimiento de los animales
Reducir la cantidad de animales que se usen para la investigación

OBTENCIÓN DEL CEREBRO

Cerebro de ratón

Una vez decapitado, se expone el cráneo

Con unas tijeras de punta fina se realiza un corte en la base del cráneo, justo en zona de la médula espinal y se corta por los lados

Con pinzas de disección de puntas anguladas, el cerebro es recuperado y colocado en una caja de Petri que contiene hielo

El cráneo es levantado de la parte posterior separando los nervios y pedúnculos conectados al cerebro



IDENTIFICACIÓN Y DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO

Bulbos olfatorios
Cerebelo

Se ubicó el cerebro de tal manera que los bulbos olfatorios quedaran en la parte superior y el cerebelo en la parte inferior

Hipocampo

Se realizó un corte coronal a una altura ligeramente superior al cerebelo, con la ayuda de dos bisturís posicionados opuestamente, se obtuvo un corte delgado.



El hipocampo se identifica en este corte debido a que muestra una forma de M

Hipocampo

Con ayuda de dos jeringas se retiró el tejido que rodea el hipocampo de tal manera que se pudiera obtener solo el hipocampo

PROTOCOLO DE CULTIVOS NEURONALES

Los cerebros se colocaron en una caja de Petri con una solución balanceada de Hank amortiguada con HEPES (10mM) y 10pg/ml de sulfato de gentamicina

Se separó el hipocampo colocándolo en una caja de Petri estéril con HBSS y gentamicina para disociarse

Los pedazos de hipocampo se colocaron en un tubo cónico estéril de 15ml. El HBSS fue retirado y el hipocampo disectado de manera mecánica.

Se descartaron el 20% de células disociadas contadas en hemocitómetro

Las células se colocaron en cajas de Petri cubiertas con poli-L-lisina

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO2 durante 7 a 10 días. El medio de cultivo fue renovado cada 72 horas.