

PROGRAMA ANALÍTICO DEL CURSO:
**“CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS DEL SISTEMA NERVIOSO;
HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO CELULAR EN LAS NEUROCIENCIAS”**

**MÓDULO 1: Cultivos primarios de Neuronas: a) neuronas corticales
b) células granulares de cerebelo**

RESUMEN

En el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos existen diversos tipos celulares que incluyen los distintos tipos de neuronas y las células de la glía. Este módulo incluye una actividad teórico-práctica en la que se desarrollarán cultivos primarios de neuronas corticales de rata, partiendo de la corteza de embriones de rata de 17-19 días de gestación y cultivos de neuronas granulares de cerebelo partiendo de los cerebelos disecados de ratas de 6-7 días de edad. El aislamiento y cultivo de estos tipos neuronales permite el estudio *in vitro* de diferentes procesos celulares, constituyendo un modelo experimental apropiado para dilucidar mecanismos involucrados en estudios realizados *in vivo*.

El cultivo primario de neuronas corticales se basa en las técnicas descritas por (1, 2) y tiene la ventaja de tratarse de un cultivo altamente enriquecido en neuronas corticales GABAérgicas. La estrategia está basada en el aislamiento del cerebro en el momento del desarrollo en el cual un número importante de neuronas entran en la fase postmitótica de diferenciación y coexisten un número reducido de precursores gliales proliferantes.

El cultivo primario de células grano de cerebelo se basa en la técnica descrita por (3) y modificada por Borodinsky y Fiszman(4) . En este caso la estrategia se basa en disecar los cerebelos de ratas de 7 días de edad, momento del desarrollo en el cual los otros tipos de neuronas cerebelares alcanzaron el estadio de diferenciación mientras que las células grano todavía están en condiciones de proliferar.

BIBLIOGRAFIA

1. Yavin, Z., and Yavin, E. (1980) Survival and maturation of cerebral neurons on poly(L-lysine) surfaces in the absence of serum, *Dev Biol*75, 454-459.
2. Yu, A. C., Hertz, E., and Hertz, L. (1984) Alterations in uptake and release rates for GABA, glutamate, and glutamine during biochemical maturation of highly purified cultures of cerebral cortical neurons, a GABAergic preparation, *J Neurochem*42, 951-960.
3. Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R., and Jorgensen, O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture, *J Neurosci*7, 2203-2213.
4. Borodinsky, L. N., and Fiszman, M. L. (1998) Extracellular potassium concentration regulates proliferation of immature cerebellar granule cells, *Brain research. Developmental brain research*107, 43-48.

MÓDULO 2 y 3: Cultivos primarios de células gliales: oligodendroglía y astrogλία

RESUMEN

Las células de la glía se pueden subdividir en macroglía –oligodendroglía y astrogλία– y microglía. Dicha división se establece a partir del origen embrionario de las células. La macroglía, al igual que las neuronas tiene un origen neuroectodérmico y las células de la microglía se generan en la capa germinal embrionaria mesodérmica y provienen del tejido mieloide del sistema inmune que coloniza el SNC durante el desarrollo.

Los contenidos del módulo incluyen las características morfológicas y propiedades biológicas de cada uno de los tipos celulares que se obtienen del cultivo primario mixto de glía. Las células de la microglía son células mieloides en el parénquima del SNC. Son macrófagos que representan el sistema inmune innato (Ransohoff y col., 2012) cuya principal función es proteger al SNC de las diversas lesiones mediante la respuesta inmune. Los astrocitos son las células de la glía más abundantes del SNC, son de forma estrellada con una amplia variedad de roles asociados con el mantenimiento de la estructura, la organización y las funciones del cerebro (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Winters, 2010). En un principio se los definía como células proveedoras de soporte físico a las neuronas, pero hoy se sabe que sus funciones son mucho más complejas. Los oligodendrocitos (OLGc) son las células encargadas de mielinizar los axones en el SNC. El conocimiento de los factores que regulan su diferenciación es fundamental para el tratamiento de diversas patologías desmielinizantes.

Se brindaran consideraciones técnicas especiales y particulares del cultivo para la obtención de las diferentes fracciones gliales: microglía, oligodendrocitos y astrocitos junto a la explicación del protocolo de cultivo. Métodos de separación (agitación, inmunopanning, leu-leu, etc). Microscopia en vivo de astrocitos de la rata GFP. Contraste de fase. Cultivo de astrocitos y técnicas de tinción para su identificación

BIBLIOGRAFIA

- 1-McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890–902.
- 2-B A. Barres, I. K.Hart, H. S. R. Coles et al., “Cell death in the oligodendrocyte lineage,” *Journal of Neurobiology*, vol. 23, no. 9, pp. 1221–1230, 1992
- 3- Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR. (2007) Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1044-51.
- 4- Niu J1, Wang L, Liu S, Li C, Kong J, Shen HY, Xiao L. (2012) An efficient and economical culture approach for the enrichment of purified oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci Methods.* 2012 Jul 30;209(1):241-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.05.032. Epub 2012 Jun 9.
- 5- de Vellis J, Cole R. (2012) Preparation of mixed glial cultures from postnatal rat brain. *Methods Mol Biol.* 2012;814:49-59. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_4.
- 6- O'Meara RW1, Ryan SD, Colognato H, Kothary R. (2011) Derivation of enriched oligodendrocyte cultures and oligodendrocyte/neuron myelinating co-cultures from post-natal murine tissues. *J Vis Exp.* 2011 Aug 21;(54). pii: 3324. doi: 10.3791/3324.

MÓDULO 4: Cultivos primarios de células de Schwann

RESUMEN

El sistema nervioso periférico (SNP), encargado de transmitir el impulso nervioso, está formado por axones mielinizados y no mielinizados envueltos por las células de Schwann (CS) que son las encargadas de formar la mielina en el SNP. La mielinización en el sistema nervioso periférico (SNP) se produce a partir de una secuencia de eventos que involucran tanto la proliferación como la diferenciación de las células de Schwann (CS) y que requiere una planificación altamente programada que resulta en la expresión de genes y el aumento en la expresión de proteínas de mielina.

La maduración de las CS se produce durante la etapa embrionaria, a partir de células de la cresta neural. Los precursores de CS aparecen en el día embrionario 14 (E14) generados por las células migrantes de la cresta neural, que adquieren para su diferenciación la proteína S100 β , se transforman en CS inmaduras en el día embrionario 17 (E17), siguiendo con la aparición de las proteínas de mielina en el momento del nacimiento transformándose en CS maduras que pueden ser mielinizantes y no mielinizantes.

Una característica fundamental de la maduración de las CS es su reversibilidad. Esto significa que frente a una situación en la que se interrumpe el diálogo entre el axón y la CS, como puede ser una lesión o un cultivo primario de CS libre de neuronas, se promueve la desdiferenciación de las CS. Si se reestablece dicha señal *in vivo* o si se suplementa el cultivo primario con factores neurotróficos o haciendo un cocultivo con neuronas las CS vuelven a diferenciarse y a expresar marcadores de mielina.

En el presente curso se estudiará la reversibilidad del fenotipo de las CS *in vitro* mediante la evaluación de su desdiferenciación, una vez mantenidas en cultivo, y su rediferenciación frente al agregado de factores neurotróficos adecuados.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in the peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* 6: 671-682, 2005.
- 2- Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia.* 2008 Nov 1;56(14):1481-90.

MÓDULO 5: Cultivo de cortes de cerebelo, tronco y medula espinal.

RESUMEN

El modelo de cultivo de cortes es un muy útil paso intermedio entre los experimentos *in vitro* y los extensos estudios *in vivo*, ya que permite seleccionar solo aquellas estrategias más promisorias para luego probadas *in vivo*, acelerando la translación de dichas terapias desde el ratón al humano, reduciendo el uso de animales, el tiempo y los recursos. Estos cultivos de cortes pueden ser trasplantados con distintos tipos células progenitoras neurales y estas células proliferan en respuesta a diferentes daños, los macrófagos están presentes para fagocitar diferentes residuos generados durante el daño, y los vainas de mielina pueden regenerarse al igual que los axones. Este sistema puede ser usado para testear diferentes factores obteniéndose resultados altamente coincidentes con aquellos obtenidos *in vivo*. En este sistema no existe suministro sanguíneo, por lo cual infiltrados de células T y B no están presentes. Por ende su uso es importante a la hora de querer independizar los resultados de la influencia de la inflamación periférica.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Zhang, Andrew A. Jarjour, Amanda Boyd, Anna Williams. Central nervous system remyelination in culture. A tool for multiple sclerosis research. *Experimental Neurology* 230 (2011) 138–148.
- 2-Asa Gardner, Peter Jukkola and Chen Gu. Myelination of rodent hippocampal neurons in culture. **Nature protocols**. VOL.7 NO.10 | 2012 |