

206



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Un modelo de regeneración
neural “ in vitro”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Leticia Valadez Rodríguez



DIRECTOR DE TESIS

Dra. Beatriz Fuentes Pardo



2001

295439

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios
Profesionales

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO
P R E S E N T E.**

Me permito comunicar a Usted, que la División de Estudios Profesionales de esta Facultad ha dado su aprobación para que el (la) pasante VALADEZ RODRÍGUEZ LETICIA, con número de cuenta 8321046-6 de la Carrera de BIOLOGIA, realice el trabajo de tesis bajo su dirección con el título:

"Un modelo de regeneración neural "in vitro"

Doy las gracias por su atención y le reitero las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

A t e n t a m e n t e

Ciudad Universitaria, D.F., a 4 de diciembre de 1998.

JEFA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Virginia Abrin Batule

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

*llgg

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Un modelo de regeneración neural "in vitro"

realizado por Leticia Valadez Rodríguez

con número de cuenta 8321046-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Beatriz Fuentes Pardo

Propietario

Dr. Pedro Nicolás Velázquez

Propietario

Dra. Margarita González del Pliego Olivares

Suplente

Dra. Patricia Rivas Manzano

Suplente

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Consejo Departamental de FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA A. M.

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

ESTE TRABAJO FORMA PARTE
DE LOS PROYECTOS
27841-N DE CONACYT Y IN228399 DE DGAPA

A LA MEMORIA DE MI PADRE.

De quién heredé su tenacidad y espíritu de lucha por conseguir lo que se quiere.

A LA MEMORIA DE MI ESPOSO.

En especial a él porque siempre estuvo orgulloso de mí, de lo que soy y de lo que hago, porque en estos momentos se sentiría muy feliz por haber logrado llegar a esta meta y de quién siempre tuve su paciencia, su apoyo moral y espiritual que me permitió seguir por este camino.

A MI HIJO.

Quién me mantiene de pie y luchando para recorrer el camino que me falta.

A MI MADRE.

Quién me dio nada menos que la vida.

A MIS HERMANOS.

Ya que gracias a su ejemplo y comprensión decidí llevar a cabo una vida académica.

Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil
y sin embargo es lo más
preciado que tenemos.
Albert Einstein
(1879 - 1955).

El universo que se nos
muestra incognoscible no es
lugar ciertamente adecuado
para un ser que piensa. El
universo ideal para nosotros
es algo bastante más similar
al sitio en que vivimos. Y me
atrevo a conjeturar que no es
simple coincidencia.
Carl Sagan
(1936 - 1996)

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | |
| - CULTIVO DE TEJIDOS | 1 |
| Uso de Enzimas en Cultivos de Tejidos | 2 |
| Colorantes Vitales | 2 |
| Técnica Inmunoquímica | 3 |
| Reactivos Comúnmente Utilizados | 4 |
| - SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL | 5 |
| Cordón Ventral del Acocil | 6 |
| - DEGENERACION Y REGENERACION NEURAL | 7 |
| Degeneración Neural | 7 |
| Regeneración Neural | 8 |
| - FACTORES Y ESTRUCTURAS QUE INTERVIENEN EN LOS PROCESOS DE REGENERACION | 11 |
| Efecto de la Temperatura | 11 |
| Participación de la Glía | 11 |
| Estructuras Neuronales Implicadas en los Procesos Regenerativos | 13 |
| Neuronas Periféricas y Transporte Axonal | 13 |
| Cambios Estructurales Durante la Degeneración y Regeneración | 14 |
| Axones Gigantes Mediales | 15 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| HIPOTESIS | 18 |
| OBJETIVO GENERAL | 19 |
| OBJETIVO PARTICULAR | 19 |
| MATERIAL Y METODOS | 20 |
| Material Biológico | 20 |
| Composición de la Solución Salina | 22 |
| Composición del Medio de Cultivo | 23 |
| Procedimiento Experimental | 24 |
| Cultivo Tipo I | 24 |
| Cultivo Tipo II a y b | 24 |
| Cultivo Tipo III | 24 |
| Cultivo Tipo IV | 25 |
| Criterios de Viabilidad | 25 |
| Inmunoquímica | 26 |
| Soluciones para Inmunoquímica | 26 |
| Análisis de Resultados | 27 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 28 |
| Cultivo Tipo I | 29 |
| Cultivo Tipo Iia | 31 |
| Cultivo Tipo Iib | 33 |
| Cultivo Tipo III | 35 |
| Cultivo Tipo IV | 37 |
| Porcentaje de Reconexión | 39 |
| Porcentaje de Reconexión con y sin colagenasa | 40 |
| Azul de Metileno | 42 |
| Nigrosina | 44 |
| Tiempo de Cultivo, Refringencia y Adhesividad | 46 |
| Inmunohistoquímica | 49 |
| DISCUSION | 51 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFIA | 57 |

INTRODUCCIÓN

CULTIVO DE TEJIDOS.

Entre las diversas formas que se emplean en el estudio de la función de los organismos destaca el cultivo de tejidos como una de las técnicas de estudio que ha ayudado a comprender algunos de los mecanismos básicos de las funciones celulares. El primer informe que se tiene sobre el cultivo de tejidos data de 1907 (**Harrison, 1907**), a partir de entonces, las técnicas se han modificado y desarrollado y en la actualidad es posible obtener cultivos *in vitro* no sólo de varios tipos de tejidos sino también de una gran variedad de tipos celulares.

La característica más importante de la técnica de cultivo es la posibilidad de aislar al tejido, o a las células, de las influencias del medio, de tal forma que se mantienen en condiciones experimentales mucho más controladas y estrictas. De esta manera, se utilizan como una herramienta para estudios morfológicos, bioquímicos, ontogénicos y fisiológicos que contribuyen a entender los procesos básicos del funcionamiento celular, las interacciones intercelulares, el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo y los cambios degenerativos de las células, entre otros.

El cultivo de tejidos consiste en aislar pequeños fragmentos de un tejido en particular, los cuales contienen un gran número de células del mismo tipo que conservan relaciones espaciales entre sí y con otros tipos celulares, como el tejido conectivo y otros. La organización original del tejido puede perderse aunque las células continúen funcionales. Los fragmentos son "sembrados" en un medio adecuado para su crecimiento, la formación de colonias y; en el mejor de los casos, la continuación de algunas de sus funciones normales. En el cultivo de órganos, además de aislar el órgano en estudio, se trata de mantener las condiciones homeostáticas originales.

La diversificación de los tipos de cultivo y de las especies utilizadas en ellos ha alcanzado al sistema nervioso por un lado, y al uso de órganos de invertebrados por el otro. Harrison, quien inició estos estudios, hace notar con respecto a las fibras nerviosas la aparición de prolongaciones a partir de un punto del soma neuronal y la capacidad de las fibras para "dirigirse" hacia un "blanco específico". Enfatiza, también, la capacidad del tejido para adherirse a una superficie extraña y crecer dentro de ella. Por este trabajo se ha considerado a Harrison como el "inventor" del cultivo de tejidos.

El tejido neural de invertebrados también se ha cultivado con mayor o menor éxito. Carlson ha cultivado neuroblastos de embrión de grillo (**Carlson, 1961**) y Braeman obtuvo crecimiento de axones de embriones de langosta, (citado por **Jones, 1965**). Estos aspectos son el tema central de este trabajo, en el que se pretende poner de manifiesto, algunos de los factores que influyen en la capacidad de reconexión del tejido nervioso del acocil (**Ringer, 1880**), en un medio de cultivo bien definido

Uso de Enzimas en Cultivos de Tejidos

En 1937 se empleó el tratamiento enzimático para mejorar el crecimiento de cultivos de fibroblastos, como tripsina, caseína o papaína, las cuales incrementan el crecimiento celular. Aparentemente ninguna causó daño a las células en estudio (**Simms y Stillman, 1937**) Entre 1950 y 1960 se usó colagenasa para separar células de tejido adiposo de glándulas mamarias (**Lasfargues, 1957**) y se demostró una buena capacidad para la disociación, pero elevados riesgos en la viabilidad celular. Se observó que la colagenasa no era eficiente para la disociación de células embrionarias y que incluso podía lesionarlas severamente (**Sobel, 1958; Rinaldi, 1958; Grover, 1962**); tal vez porque en los primeros trabajos los contaminantes asociados eran muchos y tóxicos. No obstante, la estandarización de las técnicas y la purificación de las enzimas la han llevado a ser, junto con la tripsina, una de las de mayor uso en las técnicas de cultivo y disociación de células.

Colorantes Vitales

Desde hace mucho tiempo el uso de colorantes ha sido una herramienta muy importante para la identificación, diferenciación y marcaje de células o estructuras, lo que facilita los estudios a un nivel morfológico y anatómico. Algunas técnicas auxiliares de tinción que se conocen como colorantes vitales, debido a que son compatibles con la vida, permiten conocer y valorar otras características de las células o tejidos. Entre estos colorantes se encuentran el azul de metileno, el rojo neutro, el moreno de Bismarck, etc. (**Gurr, 1962**).

Antes de 1968 sólo había dos métodos histológicos para hacer una tinción selectiva y completa de una sola neurona, los métodos de Golgi y la aplicación de azul de metileno.

Hoy (1969) en su estudio sobre degeneración y regeneración en neuronas motoras flexoras abdominales de acocil, aplicó azul de metileno a una concentración de 0.2% como colorante supra-vital en solución salina para identificar los nervios periféricos. Este método reveló el patrón de ramificación de los axones motores sobre las fibras musculares. Fue también empleado para obtener información anatómica gruesa sobre la regeneración nerviosa, por ejemplo, para determinar si la regeneración nerviosa sigue rutas nuevas hacia las estructuras reinervadas (**Hoy, 1969**).

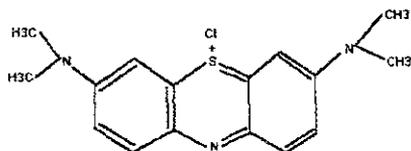
Por la forma en que tiñen, los colorantes se pueden clasificar en:

-Colorantes directos: por ejemplo, el azul de metileno, que da color al organismo estudiado.

-Colorantes indirectos: que no tiñen a la estructura, pero sí al medio que lo rodea, de manera que se ve por contraste, como por ejemplo la nigrosina.

En nuestro estudio utilizamos el azul de metileno y la nigrosina para observar la viabilidad de los tejidos en cultivo. Las características de estas sustancias son las siguientes:

Azul de metileno: sustancia con pH básico, soluble en agua y en etanol, es un colorante nuclear y de bacterias, tiñe sin dañar al tejido nervioso, no es tóxico. Es también adecuado para teñir protozoos, cuerpos de Negri, virus, tejido conectivo, rickettsias. Su estructura química es la siguiente:



Nigrosina: sustancia con pH ácido, hidrosoluble, ofrece tinciones negativas, es decir que tiñe al medio de cultivo y no al tejido cuando éste está vivo y es especialmente recomendado para: tejido nervioso y páncreas. Tiñe negativamente la cromatina, algas, hongos y cápsulas bacterianas (Gurr, 1962).

Técnica Inmunohistoquímica.

La técnica inmunohistoquímica fue ideada por A. H. Coons y ha sufrido modificaciones desde su introducción en la década de los años sesentas, principalmente con el uso de anticuerpos monoclonales (Polak y Van Noorden, 1986).

La introducción de la inmunohistoquímica en el estudio del sistema nervioso ha servido como una herramienta para la localización de transmisores, lo cual ha ayudado a descubrir numerosas conexiones neuronales antes desconocidas (Cuello, 1983).

Los anticuerpos son producidos por un hospedero como parte de una respuesta inmune a un antígeno extraño, el cuál al invadirlo como patógeno produce toxinas. Estos anticuerpos se unen en distintos sitios y son altamente específicos contra una molécula antigénica.

Convencionalmente, los anticuerpos se preparan a partir del suero de los animales, los cuales son activados policlonalmente. Estos reactivos pueden ser purificados y absorbidos específicamente por el antígeno de interés. Un solo individuo puede responder de diferentes maneras al mismo inmunógeno, lo que hace casi imposible procesar los reactivos a gran escala. De esta manera se han desarrollado técnicas de producción de anticuerpos monoclonales. Aparte un anticuerpo monoclonal es un reactivo que se produce de una sola clona de células B inmortalizadas, con estructura molecular uniforme y afinidad/actividad específicas. Adecuadamente pueden ser producidas en grandes cantidades (Cuello, 1983).

Los linfocitos B pueden producir anticuerpos con diferente grado de especificidad pero con un tiempo de vida muy corto en condición *in vitro*. En contraste, hay líneas celulares de mieloma (derivadas de células plasmáticas

tumorales) que han perdido su habilidad para secretar inmunoglobulinas, pero que pueden crecer indefinidamente en cultivo. Estos dos tipos de células pueden fusionarse para formar híbridos que posean las propiedades inmortales de las células de mieloma y la habilidad de los linfocitos B para sintetizar y secretar anticuerpos. La relevancia de los hibridomas es que pueden ser clonados a gran escala. Este proceso es a partir de una sola clona, por ello la definición de monoclonales y homogéneos **(Cuello, 1983)**.

Reactivos comúnmente utilizados.

Algunas enzimas como la peroxidasa son marcadores muy utilizados. La peroxidasa puede reaccionar con la diaminobenzidina formando el complejo (DAB)-peróxido de hidrógeno, sustancia insoluble que tiñe intensamente de color café.

La biotina es una vitamina insoluble en agua, de muy bajo peso molecular presente en la yema del huevo y otros tejidos tanto animales como vegetales. Su grupo carboxilo es el responsable de la unión que tiene con los residuos NH_2 de diferentes proteínas, lo que hace que se utilice como un marcador de unión que puede formar enlaces con alguna enzima o con la avidina.

La avidina es una glucoproteína básica presente en gran variedad de tipos de huevos blancos, de los que se extrae. Está formada por cuatro subunidades, cada una de ellas representada por una sola cadena polipeptídica de 128 aminoácidos. El azúcar de cada subunidad incluye un oligosacárido que contiene una manosa y una glucosamina.

En cultivos de órganos (explantos), el anticuerpo puede ser aplicado a las células intactas, fijadas y colocadas en una superficie de vidrio o plástico.

Los anticuerpos de una especie pueden reaccionar con inmunoglobulinas de otras especies y el anticuerpo secundario puede unirse al tejido de forma específica pero no deseada. Este problema se puede evitar con facilidad agregando un segundo anticuerpo en solución 5% de suero normal **(Polak, 1986)**.

Para la localización de péptidos por microscopía de luz el uso de anticuerpos ha dado buenos resultados siempre que se mantenga una buena inmunoreactividad y la estructura del tejido o las células mediante el uso de fijadores adecuados. Aparte tanto en microscopía de luz como en microscopía electrónica, para marcar fibras y cuerpos celulares, la adición de Triton X-100 antes del primer antisuero, puede permitir una mejor penetración de los anticuerpos **(Cuello, 1983)**.

SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL

En la región cefálica de animales simples con simetría bilateral, se ha desarrollado un agrupamiento de células nerviosas que se conoce como ganglio cerebroide. A partir de este agrupamiento nacen los haces nerviosos en dirección al extremo posterior del cuerpo del animal. Aparte el acocil, así como otros artrópodos tiene un sistema nervioso central (SNC) formado por parejas de ganglios unidos por segmentos en sentidos longitudinal y transversal. El ganglio cerebroide lo forman los dos ganglios esofágicos superiores dispuestos en posición dorsal con respecto al intestino anterior. El ganglio cerebroide se conecta hacia abajo con los ganglios torácicos, los cuales comunican a su vez con los 6 ganglios inferiores que ocupan una posición ventral y que se conectan entre sí por medio del cordón ventral.

Un ganglio es una agrupación de muchos somas de neuronas organizados alrededor de una compleja red de fibras nerviosas que se conocen como neuropilo. En esta organización hay extensas interconexiones entre las neuronas que hacen contacto con procesos colaterales. Las colaterales son ramas laterales que forman arborizaciones con el neuropilo y salen de los axones para conectar bilateralmente cada segmento.

Aunque el neuropilo tiene el aspecto de una red intrincada de finos procesos, estudios recientes realizados con marcadores y colorantes inyectados intracelularmente indican que las colaterales arborizadas difieren mucho en detalles finos de un espécimen a otro.

Cada segmento corporal está provisto de un ganglio segmentado que sirve normalmente para las funciones reflejas del segmento que ocupa y de uno o más de los segmentos adyacentes. Los ganglios de los sucesivos segmentos corporales están unidos por haces de fibras nerviosas denominadas conectivos, que constituyen el cordón nervioso ventral característico de anélidos y artrópodos, en los que la organización segmentaria se detecta con toda claridad. Los ganglios segmentarios proporcionan un material conveniente para la investigación neurofisiológica debido a que poseen un número relativamente pequeño de neuronas en cada segmento y hay una redundancia de las estructuras y la función en los diferentes segmentos del cordón nervioso. Así, un análisis de las interacciones de las neuronas de uno de los segmentos proporciona el esquema básico del resto de los segmentos del cordón nervioso. **(Eckert y Randall, 1990).**

Lo que hace que el SNC no esté diferenciado en sustancia gris y blanca, es que los axones no tienen vaina de mielina. Los axones están acompañados de células gliales y por lo general quedan envueltos por una vaina glial. Los pericariones en los ganglios centrales se ordenan, por lo general, en forma marginal, mientras que la región central está ocupada por el neuropilo. En el neuropilo tienen lugar los procesos de elaboración de la información **(Wolf, 1976).**

Cordón Ventral en el Acocil

El cordón ventral es esencialmente una doble hilera de ganglios, cada uno unido longitudinalmente a los demás por el tejido interganglionar. La cadena ganglionar abdominal en el acocil, la forman cuatro axones nerviosos que marchan paralelos a lo largo de la parte dorsal del cordón nervioso de un extremo al otro del animal y que corresponden a los axones gigantes mediales (AGM). Los AGM van desde el ganglio supraesofágico hasta el telson; mientras que los axones gigantes laterales (AGL) y se conectan en serie formando sinápsis eléctricas en cada segmento, de uno a otro a través de cada ganglio por conexiones análogas.

Los axones gigantes mediales y laterales pertenecen a las interneuronas, son estructuras bilaterales no ramificadas. Tienen diámetros similares que van de 100 a 200 μ m. Los axones gigantes mediales miden de 50 a 90mm de largo, recorren todo el cordón nervioso ventral y hacen sinapsis con neuronas en cada ganglio. Los axones gigantes laterales miden de 5 a 13mm de largo y se extienden de un ganglio segmentado al siguiente.

Los AGM, comparados con los AGL contienen el doble de vesículas subaxolemales y elementos del retículo endoplásmico rugoso. Las vesículas citoplasmáticas a menudo están asociadas con sitios de actividad endocitótica/exocitótica. Los AGMs son más dependientes de células gliales adyacentes.

Las neurofibrillas y los microtúbulos son también característicos de los axones, las neurofibrillas se componen de neurofilamentos cuyo diámetro es de 100 a 150Å que se observan en el soma y en las prolongaciones. Los microtúbulos tienen un grosor de 150 a 300Å y se encuentran principalmente en las prolongaciones de neuronas que se orientan en paralelo a lo largo del axón. **(Wolf, 1976).**

En condiciones normales existen mecanismos para el mantenimiento axonal. Existen dos tipos de transporte axonal uno lento y otro rápido. Aunque no se conocen las bases estructurales, en el transporte rápido, los microtúbulos y neurofilamentos de la neurona, al parecer tienen estructuras de translocación. El movimiento lento de materiales podría ser una consecuencia de presiones microperistálticas en el axolema. **(Bullock y Horridge, 1965).**

Respecto a la función a nivel celular, el sistema nervioso parece haber experimentado menos modificaciones durante la evolución que cualquier otro tejido. Las propiedades eléctricas y químicas de las células nerviosas son marcadamente similares en los vertebrados e invertebrados.

Los sistemas nerviosos que anatómicamente están organizados de forma más simple consisten de fibras nerviosas muy finas (axones) que se entrecruzan como una red difusa y establecen contacto sináptico en los puntos de intersección.

DEGENERACION Y REGENERACION NEURAL

Degeneración Neural

La degeneración neural generalmente se considera como una alteración del tejido o de los elementos anatómicos que lo constituyen, que se asocia con la detención del flujo de sustancias neurotróficas somáticas necesarias para el mantenimiento celular. Esto da lugar a la pérdida de las características esenciales y funcionales de las neuronas. Con la ayuda de determinadas técnicas histológicas, es posible hacer visible, en forma selectiva, el tejido nervioso degenerado. Por medio de experimentos morfológicos de degeneración que ha podido llevar a cabo un análisis de la estructura arquitectónica del SNC, de tal manera que en el animal de experimentación se destruyen ciertas zonas de interés del SNC y al cabo de algunos días los animales se sacrifican con el fin de observar microscópicamente el trayecto de las fibras que degeneraron después de la lesión.

Las lesiones en el tejido nervioso se clasifican de acuerdo con su magnitud, de tal manera que para el tejido nervioso de invertebrados se consideran los siguientes tipos de lesión:

- De primer grado: lesión causada por la presión ejercida sobre una porción localizada del tejido nervioso que produce anoxia en los axones sin impedir su función. Con este tipo de lesión las fibras sensitivas se afectan más rápidamente que las motoras. Se puede recuperar la función en minutos, horas o semanas.

- De segundo grado: cuando la presión es prolongada y/o intensa, provoca la muerte axonal en la zona afectada. Lo que produce, a su vez, la muerte de la parte distal al quedar ésta separada del cuerpo celular.

- De tercer grado: en donde la vaina de tejido conectivo no conserva su continuidad a nivel de lesión, pero las fibras nerviosas sí.

- De cuarto grado: presentan lesión tanto la vaina de conectivo como las fibras nerviosas.

- De quinto grado: se consideran aquellas lesiones en las que el tejido nervioso está totalmente seccionado y los axones quedan separados del cuerpo celular y en este caso se necrosan y mueren (**Ham, 1970**).

Los axones degeneran primero en la porción proximal, cerca del corte y posteriormente empiezan a crecer poco a poco hasta cubrir el espacio donde se produjo el corte.

El tiempo de supervivencia de un axón lesionado depende de diversos factores como son: a) el largo del segmento lesionado, b) la naturaleza de la respuesta de las células de la vaina glial, c) la presencia de extensiones sinápticas (químicas o electrotonicas) que hacen contacto con otras células, d) la presencia de axones adyacentes conectados con sus cuerpos celulares y e) la capacidad sintética del axoplasma.

Después de quitar el cuerpo celular neuronal, en los vertebrados y en muchos invertebrados, los axones se fragmentan y degeneran en semanas debido a un rápido proceso de degeneración retrógrado (degeneración Walleriana). Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que el muñón distal de algunos axones de insectos sobreviven por más de 20 días después de la transección. El descubrimiento más sorprendente se llevó a cabo en el acocil y otros crustáceos donde los muñones lesionados de axones motores periféricos y axones gigantes mediales del SNC han mostrado la capacidad de permanecer morfológicamente intactos y fisiológicamente activos durante más de 100 días a pesar de la ausencia de los cuerpos celulares (axones anucleados) (**Bittner y Mann, 1976**).

La sobrevivencia de axones anucleados a largo plazo (de semanas hasta años) ha sido extensamente reportada en muchos grupos de invertebrados (anélidos, artrópodos, moluscos y platelmintos). En los crustáceos la degeneración se lleva a cabo rápidamente (dos semanas), esto en axones anucleados de neuronas sensitivas periféricas, lo cual puede ser una excepción.

La sobrevivencia a largo plazo del citoplasma anucleado ciertamente depende de la presencia de proteínas estructurales (citoesqueléticas) y funcionales (enzimáticas) y es posible que también se relacionen con la acción combinada de tres mecanismos cualitativamente diferentes que pueden asegurar la continua presencia de tales proteínas: 1) síntesis de nuevas proteínas en el axoplasma; 2) transferencia de proteínas al axón de la glía adyacente u otras células intactas y 3) el mantenimiento de las proteínas axoplasmáticas existentes en los alrededores.

Este proceso ha sido extensamente estudiado en el axón gigante medial y lateral de los acociles *Procambarus clarkii* y *P. simulans*. Los axones gigantes mediales anucleados permanecen morfológicamente intactos y funcionalmente competentes de alrededor de 150 a 250 días, los elementos restantes citoesqueléticos en el axoplasma permanecen intactos (**Bittner, 1991**).

Hay diversos mecanismos que aparecen después de una lesión, y que son importantes para la supervivencia, a largo plazo, de diversos segmentos de axones motores y gigantes mediales del acocil. Entre estos mecanismos se encuentra la síntesis axonal de macromoléculas y metabolitos, el transporte bidireccional en el axón lesionado de sustancias a través de sinapsis y la formación por parte de las células de la vaina glial, de diversos componentes axonales. Estos mecanismos se ha propuesto que se llevan a cabo en una gran variedad de neuronas (**Gorio y cols., 1993**).

Regeneración Neural

La sobrevivencia de neuronas lesionadas es un prerrequisito fundamental para la regeneración. Las neuronas sensitivas y motoras pueden ser afectadas de distintas maneras. Los grados de lesión pueden afectar de diferente manera, mientras el machacado puede ser inofensivo, la sección del nervio puede causar una degeneración (**Gorio y cols., 1993**).

La regeneración neural es el proceso de reparación del tejido nervioso, en el cual hay restablecimiento de la función. En raras ocasiones, especialmente en preparaciones de nervios cortados, la reconexión se lleva a cabo en tiempos cortos, estos tiempos son muy similares en los diferentes sistemas estudiados. Los casos en los que la regeneración ocurre antes de 40 días, entre 25 y 36 días los experimentos se llevaron a cabo en axones donde se machacó sólo el conectivo (**Hoy, 1969**).

La regeneración neuronal es un proceso morfo-funcional que restablece los detalles perdidos en la organización neuronal para la reconstrucción de los axones periféricos y la arborización terminal. En el sistema nervioso la formación de partes perdidas, se da por extensión de porciones proximales y reformación de procesos degenerados (**Hoy, 1969**).

La regeneración ocurre más rápidamente y con mayor probabilidad en nervios machacados que en nervios que son cortados (**Hoy, 1969**). Esto se debe a que en el machacamiento existe la posibilidad de que sólo algunos axones sean lesionados, y que otros permanezcan intactos o con una lesión menor. De ahí que haya una mayor posibilidad de que la regeneración se lleve a cabo por parte de las fibras que permanecen intactas. También hay que tomar en cuenta que el tejido no se separa por completo ya que en algunas porciones permanece unido lo que facilita aún más los procesos de recuperación. Cuando por otra parte, se lleva a cabo un corte transversal total, los nervios son lesionados por completo por lo que el tiempo durante el cual se lleva a cabo la regeneración es notablemente mayor. También se debe considerar que si el tejido fue separado por completo, las fibras deben traspasar el área de lesión para reconectarse unas con otras (**Tashiro y Komiya, 1991**).

Se ha visto que las neuronas periféricas responden a la axotomía mediante una regeneración activa, después de un período de entre 1-4 días. Durante este tiempo se forma un cono de crecimiento en la punta del muñón del axón proximal. Debido a que el transporte que lleva proteínas citoesqueléticas hacia el axón, no es lo suficientemente rápido para alcanzar el sitio de lesión, la organización local del citoesqueleto preexistente puede ser la responsable de la formación de los conos de crecimiento. Sigue después una fase de maduración en la cual las proteínas citoesqueléticas alcanzan sus niveles normales, lo que incrementa los procesos regenerativos (**Tashiro y Komiya, 1991**).

El esquema clásico en la regeneración de axones lesionados muestra que ésta se establece sólo después de que emergen finos brotes de axones en crecimiento que han alcanzado sus blancos apropiados. Sin embargo en organismos invertebrados (sanguijuela, insectos) se han propuesto otros mecanismos de recuperación nerviosa.

En general, se conocen tres tipos de mecanismos por medio de los cuales las fibras lesionadas pueden regenerar:

- 1) Los muñones distales degeneran, mientras crecen axones nuevos desde el muñón proximal y que se encargan de reestablecer las terminales nerviosas.

2) Los muñones distales sobreviven por más tiempo, mientras el axón proximal crece y forma nuevas terminales. El segmento distal original degenera.

3) El muñón distal permanece intacto y las proyecciones citoplásmicas de los muñones proximales se fusionan con éstas (**Bittner, 1973**).

En estudios de regeneración axonal en neuronas mecanosensitivas de sanguijuelas, hay evidencias de que los axones lesionados pueden fusionarse o reconectarse después de una lesión. Las neuronas mecanosensitivas son capaces de regenerar axones lesionados por corte o machacamiento del conectivo y pueden reconectarse con ganglios normales y ganglios adyacentes.

Son muchos los factores de los que depende la posibilidad de regeneración de una neurona: la edad del organismo, la especie, el animal del que se trate, el tipo de neurona, etc. Al comparar la capacidad de regeneración que presentan los acociles juveniles y los acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii*, se encontró que los organismos adultos poseen muy poca capacidad para regenerar axones no gigantes del SNC a través del sitio de lesión, así como mantener el crecimiento de procesos axonales en axones gigantes para reemplazar cuerpos neuronales retirados quirúrgicamente en el SNC. En crías de las especies *P. simulans* y *P. clarkii* Seshan y Bittner encontraron en estas especies que hay un incremento en la habilidad para regenerar axones nerviosos no gigantes. También mostraron que hay diferencias en la habilidad regenerativa de axones nerviosos no gigantes entre miembros de especies estrechamente relacionadas. Finalmente, los axones gigantes de organismos en etapas postembrionarias muestran en ambas especies, un incremento en el crecimiento de procesos axonales, comparado con los experimentos llevados a cabo en axones gigantes de adultos en esas mismas especies (**Seshan y Bittner, 1987**).

Cuando los axones gigantes mediales son canalizados individualmente, perfundidos con solución salina axoplásmica artificial y marcados con aminoácidos radiactivos, se tiñen muchas especies de polipéptidos tanto en los axones nucleados como en los anucleados. Se ha visto que las proteínas trazadoras de bajo peso molecular al ser inyectadas en estos axones aparecen en la glía adaxonal en cuestión de minutos. Todos estos datos son consistentes con la hipótesis de que tanto las proteínas como otros compuestos se intercambian rutinariamente entre el axón gigante medial y la glía adaxonal, y que las transferencias intercelulares pueden acontecer en parte, por sobrevivencia a largo plazo de axones anucleados de este tipo (**Bittner, 1991**).

Experimentos en *Asellus aquaticus* muestran que los nervios periféricos son necesarios para que la regeneración se lleve a cabo a velocidades normales. La denervación del muñón retarda marcadamente la velocidad de regeneración de los miembros torácicos. En crustáceos y urodelos, la presencia de un abastecimiento nervioso adecuado en la región amputada es esencial para la regeneración de los miembros (**Bullock y Horridge, 1965**).

Los axones que inervan los músculos flexores superficiales en el acocil *Procambarus clarkii*, pueden regenerar sus conexiones. Se ha demostrado que las neuronas que inervan los músculos abdominales del acocil tienen

conectividad específica. Durante el desarrollo y regeneración, se ha postulado la presencia temporal y/o espacial de diversos factores, que tienen una influencia en el crecimiento nervioso (Hunt y Vélez, 1982).

FACTORES Y ESTRUCTURAS QUE INTERVIENEN EN LOS PROCESOS DE REGENERACION

Efecto de la Temperatura

Se sabe que hay proteínas del estrés que son sintetizadas por muchos organismos eucariontes y procariontes en respuesta a una gran variedad de estrés medioambiental, incluyendo hipertermia, metales pesados, químicos tóxicos, alcohol, pH no fisiológico, glucosa baja, oxígeno insuficiente o análogos de aminoácidos. En varias líneas o tejidos neurales y no neurales estas proteínas tienen una participación muy importante en la adquisición de la tolerancia al estrés (Rochelle y cols., 1991).

En axones motores de acocil colocados a 16°C, no muestran degeneración del segmento distal después de 26 semanas. Se ha observado que las temperaturas elevadas (22 a 28°C) inducen la degeneración neural. En respuesta a este proceso degenerativo la glía adaxonal muestra un incremento de los organelos que están asociados con la actividad sintética: mitocondrias, Golgi y retículo endoplásmico (Nordlander y Singer, 1973).

Participación de la Glía

En contraste con la gruesa capa de mielina que se encuentra a menudo en los vertebrados, los axones de los invertebrados usualmente están rodeados por una frágil vaina glial. En crustáceos por ejemplo, la capa más interna de las células gliales (glía adaxonal) está separada del axolema por un espacio extracelular (Sheller y cols., 1991). Las fibras sensitivas de los nervios periféricos del acocil pueden agruparse en dos clases morfológicas generales de acuerdo con la relación que tienen con las células gliales. Hay axones pequeños, organizados en grupos, los cuales están embebidos en el citoplasma glial, de tal manera que desarrollan fibras no mielinizadas. Otro tipo de fibras, forman dos o cuatro capas de procesos gliales que alternan con el tejido conectivo y de esta manera forman una especie de fibra de colágena, la cual queda embebida en una matriz extracelular, este conjunto forma un complejo de múltiples capas de tejido conectivo-glial. El axoplasma contiene mitocondrias, retículo endoplásmico liso, vesículas y microtúbulos. El citoplasma de los procesos gliales contiene pequeñas cantidades de retículo endoplásmico rugoso, elementos de Golgi, mitocondrias de gran tamaño y microtúbulos (Nordlander y Singer, 1973). La vaina es una sola célula glial con su membrana celular que rodea al axón y forma una delgada espiral. En el acocil hay una membrana basal fibrosa interpuesta entre las capas de citoplasma, que forma la vaina (Bullock y Horridge, 65).

La glía se hincha como una primera respuesta a la lesión axonal, el cual es un fenómeno general que ha sido reportado en vertebrados e invertebrados. Las capas gliales que rodean los axones motores lesionados en el acocíl se hinchan. El hinchamiento va acompañada por una acumulación de organelos, lo cual sugiere que éstos pueden estar relacionados con el apoyo que tienen los axones motores durante la larga vida que muestran aun después de estar separados de sus cuerpos celulares. La acumulación característica de organelos no se observa en la glía que rodea a los axones sensitivos lesionados en los últimos estados de degeneración, es decir cuando las células están por dejar el proceso degenerativo y entrar a los procesos regenerativos. Por otro lado, para el mantenimiento axonal y su posterior restauración, la vaina glial desempeña un papel muy importante, en los nervios lesionados, ya que desempeña un papel trófico, debido a que las células de la vaina producen sustancias de apoyo requeridas para el crecimiento axonal **(Nordlander y Singer, 1973)**.

Los cambios morfológicos de las células gliales que rodean los axones motores lesionados en degeneración son similares a los que rodean los axones sensitivos lesionados después de una semana. Las observaciones en nervios periféricos transplantados sugieren que la glía que rodea los axones motores lesionados puede cambiar la función de soporte por una función destructiva, mientras que el papel de la glía que rodea los axones sensitivos lesionados es principalmente destructiva.

Aunque no toda la glía tiene el mismo papel con respecto a los axones sobrevivientes, parece estar siempre implicada en el mantenimiento de estos axones. La vaina glial incrementa su grosor alrededor del muñón proximal de axones motores y gigantes mediales lesionados, así como alrededor de axones gigantes mediales no lesionados contralaterales al conectivo dañado. Estas observaciones indican que las células gliales pueden responder de una manera generalizada al daño en axones adyacentes, debido quizá a la liberación de sustancias difusibles desde el soma hacia los axones seccionados **(Bittner y Mann, 1976)**.

Algunas semanas después de una lesión en la langosta *Panulirus pennicillatus*, se puede observar que el núcleo glial de la capa adaxonal es incorporado en el axoplasma del muñón distal lesionado del axón motor (axones anucleados). Esta observación es importante porque los axones anucleados de muchos invertebrados, incluyendo la langosta, sobreviven morfológica y funcionalmente intactos por semanas y hasta años. Esta sobrevivencia a largo plazo de axones anucleados parece significar el mantenimiento de proteínas axoplásmicas. Para ello se han sugerido tres posibles mecanismos: 1) transferencia de proteínas hacia los axones anucleados desde células adyacentes (especialmente glía adaxonal), 2) proteínas axoplásmicas con una vida media larga y 3) síntesis de proteínas que son producidas en el mismo axón **(Sheller y cols., 1991)**.

Estructuras Neuronales Implicadas en Procesos Regenerativos.

Hay tres elementos citoesqueléticos que desempeñan distintos papeles en el crecimiento neural y la regeneración: microtúbulos, neurofilamentos. Los microtúbulos proveen un armazón estructural para el axón. Están formados por polipéptidos y le dan a la célula plasticidad y estabilidad morfológica. Desempeñan un papel importante en la determinación del tamaño y la forma de los procesos neuronales. En fibras pequeñas no mielinizadas y muchas dendritas, hay sólo unos cuantos neurofilamentos y microtúbulos que actúan como elementos estructurales primarios. Este papel es particularmente importante en axones de insectos y crustáceos,

Los microtúbulos neuronales de axones, dendritas, etc. son bioquímica y fisiológicamente distintos. Las subunidades primarias de los microtúbulos son α y β tubulinas. Las tubulinas están sujetas a modificaciones postraduccionales por acetilación y destirosinación, lo que *in vivo* incrementa la estabilidad de los microtúbulos. Los sitios donde se incrementa la estabilidad se conservan como cortos segmentos de microtúbulos cuando otros han sido despolimerizados. Los segmentos estables de microtúbulos pueden servir como un núcleo de microtúbulos que organizan el axón, particularmente durante la regeneración. Aparentemente los microtúbulos pueden ser desensamblados como parte de la reorganización del citoesqueleto para la formación de neuritas y reensamblarse para la extensión de las mismas. Por lo tanto los microtúbulos sirven para el transporte de materiales requeridos por los conos de crecimiento y como elementos estructurales primarios en el crecimiento de neuritas (**Scott, 1993**).

Los filamentos intermedios también conocidos como neurofilamentos son polímeros de proteínas fibrosas que se extienden a lo largo del citoplasma proporcionando a las células resistencia mecánica y sosteniendo la tensión mecánica (**Alberts, 1996**).

Se considera que los movimientos anterógrado y retrógrado de organelos están presentes en el segmento distal en el momento de la transección y podría mantenerse hacia su blanco respectivo, compensándose así la ausencia del segmento distal por la translocación de organelos.

Si esta suposición es correcta, el movimiento anterógrado de organelos podría compensar la ausencia del segmento lesionado, primero desde la región del segmento distal hacia el sitio de sección y así sucesivamente hacia las siguientes regiones (**Viancour, 1990**).

Neuronas Periféricas y Transporte Axonal

Las neuronas periféricas responden a la axotomía con una regeneración activa después de un período de entre 1 y 4 días. Durante este tiempo se forma un cono de crecimiento en la punta del muñón del axón proximal. La velocidad del transporte axonal que lleva las proteínas citoesqueléticas hacia el axón, no es suficientemente rápido para alcanzar el sitio de lesión por lo que este periodo

se retrasa. La organización local del citoesqueleto preexistente puede ser responsable de la formación de conos de crecimiento. Durante la fase de vigorosa regeneración, la velocidad de ésta, está correlacionada con la velocidad del transporte axonal lento. Durante esta fase hay cambios cuantitativos y cualitativos en la síntesis de proteínas citoesqueléticas. Después de la axotomía se ha observado que durante 1 a 2 semanas, hay una reducción en la síntesis de proteínas neurofilamentosas y un incremento en la síntesis de actina e isotipos de tubulina para facilitar y permitir la reinervación. La fase de maduración que sigue se caracteriza por el regreso de la síntesis de las proteínas del citoesqueleto a niveles normales y un incremento en el calibre de los procesos regenerados (**Tashiro y Komiyu, 1991**).

No es fácil precisar las bases estructurales del transporte axonal lento y rápido. En el transporte rápido, los microtúbulos y/o neurofilamentos en una neurona, al parecer tienen estructuras de translocación. El movimiento lento de materiales podría ser una consecuencia de presiones microperistálticas en el axolema. Recientemente se ha demostrado que la colchicina, se une selectivamente a proteínas microtubulares y podría bloquear el transporte lento y rápido. Estas observaciones sugieren que ambos sistemas de transporte están íntimamente relacionados y pueden depender de un complejo microtubular en los axones.

Hay experimentos que muestran que la colchicina y las bajas temperaturas (3°C), también interfieren con la estructura de ciertos microtúbulos, bloqueando el movimiento lento de proteínas en el cordón nervioso del acocil (**Fernández y col., 1971**).

Cambios Estructurales Durante la Degeneración y la Regeneración Nerviosa.

La degeneración neural ocurre una o dos semanas después de la lesión. La magnitud y la velocidad de la regeneración, por otra parte, depende de factores locales y sistémicos, como la distancia entre el soma y el sitio de lesión, la temperatura y la presencia de tejido glial.

Hay una diferencia en el proceso que ocurre en el axón gigante medial (AGM) y el resto de las fibras de la cadena ganglionar, cuando el cordón nervioso ventral (CNV) del acocil es transectado. En fibras pequeñas, los principales cambios que se observan son contracciones de la porción separada del soma celular, la vacuolización del segmento restante y la pérdida del arreglo en la membrana celular y los organelos celulares. Dos semanas después de la transección, la porción distal del axón desaparece y la región es invadida por glía y tejido conectivo.

En lo que respecta a los axones gigantes laterales (AGL) se observa que entre uno y catorce días después de la lesión, el segmento distal del axón tiene cambios estructurales en las mitocondrias y la organización microtubular. De dos semanas a diez meses después de la lesión, los muñones sobrevivientes de

los AGL lesionados a menudo se ven normales excepto por la persistencia de alteraciones en las mitocondrias y microtúbulos (Tanner y cols., 1995).

Estos datos sugieren que el segmento distal de los AGL recibe apoyo trófico de AGL adyacentes intactos. Los mecanismos de este apoyo probablemente ocurran por vía exocitosis/pinocitosis de vesículas que siempre están presentes en ambos lados del septo entre el AGL intacto y el segmento distal del AGL lesionado.

Como fuente de este aporte extracelular, se ha sugerido que los segmentos de los AGL anucleados reciben aporte trófico mas que del conectivo de algún ganglio próximo. Por ejemplo, al cortar el segmento distal del AGL que tiene contactos con otras neuronas en otro ganglio, aquel sobrevive por más de 10 meses y muestra poca evidencia de degeneración. Inversamente, los segmentos aislados de los AGL que están separados del cuerpo celular y no tienen contactos sinápticos con otras neuronas en algún otro ganglio, muestran poca reacción glial y degeneran en dos semanas (Tanner y cols., 1995).

Axones Gigantes Mediales (AGM)

En el axón gigante medial de los acociles (*Procambarus clarkii* y *Procambarus simulans*) la sobrevivencia a largo plazo ha sido ampliamente estudiada. Los AGM anucleados, permanecen morfológicamente intactos y funcionalmente competentes entre 150-250 días.

Después de la lesión, tanto las proteínas como otros compuestos pueden ser intercambiados rutinariamente entre el AGM y la glía adaxonal. Lo que significa que estas transferencias intercelulares se pueden llevar a cabo, al menos en parte, debido a la sobrevivencia a largo plazo de los axones anucleados. Este tipo de axones mantiene el mismo perfil proteínico de los AGM intactos por más de 4 meses; sólo después de 7 meses se observa que algunas proteínas decrecen en los AGM anucleados. La vida media de estas proteínas para el transporte axonal en estos axones es de 17 días.

Por otro lado, los niveles de actina también son muy parecidos entre los axones intactos y los axones anucleados. Sin embargo se ha encontrado que la tubulina en los AGM anucleados decrece considerablemente en menos de 2 meses (Tanner y cols. 1995).

Mediante experimentos con peroxidasa de rábano (HRP) se ha visto que los axones gigantes mediales del acocil son capaces de introducir sustancias que pueden ser sintetizadas por células gliales y liberadas en el espacio extracelular periaxonal. Se ha especulado sobre la posibilidad de que el transporte del axón a la glía se dé gracias a la participación de células gliales, que contienen información acerca de cómo se debe llevar a cabo la síntesis y la liberación de sustancias tróficas (González del Pliego y cols., 1998).

A partir de un análisis morfológico por microscopía de luz, microscopía electrónica de transmisión y por exploración del CNV transectado, el primer cambio que se detecta en los animales experimentales es un incremento en la glía adaxonal presente tanto en las fibras gigantes como en las no gigantes. Las

fibras mediales y laterales muestran un incremento en la glía adaxonal durante los primeros 10 días después de la lesión. La contracción y el desarreglo de los organelos intracelulares de los axones lesionados son cambios que están ausentes en las preparaciones control las que, evidentemente fueron procesados de la misma manera y al mismo tiempo que los experimentales.

Los cambios que se registran en las estructuras lesionadas, corresponden a lo que se esperaría al inicio de los procesos degenerativos. Esto se refleja en un fuerte incremento en la latencia de la respuesta normal. Después de un cierto tiempo de que los procesos degenerativos han progresado de manera continua se inician los cambios regenerativos: reducción en la latencia normal, unión del tejido conectivo entre el muñón proximal y distal y crecimiento glial

Entre 2 y 3 meses después de la transección, la glía ha llenado los espacios dejados por las fibras no gigantes degeneradas y las fibras gigantes han incrementado sus irregularidades en la membrana. El incremento en el tejido glial es el responsable de las conexiones entre los muñones distal y proximal. Simultáneamente con la reconexión, las fibras gigantes muestran cambios supresores alrededor del sitio de sección en ambos muñones. No se descarta la posibilidad de que el tejido conectivo pueda ser atravesado por pequeños brotes axonales no gigantes que reconectan ambos muñones.

La gran cantidad de glía puede reflejar no sólo el papel de este tejido en la sobrevivencia de las fibras gigantes, también ha sido asociada con su papel de guía para el restablecimiento de nuevas conexiones y/o liberación de sustancias tróficas lo que refuerza las comunicaciones preexistentes entre neuronas no gigantes. Al considerar el papel del tejido glial en la degeneración y regeneración neural, se encuentran varias características que vale la pena considerar: macromoléculas que pueden ser transferidas desde la glía hasta los axones gigantes y que parecen ser las que permiten la supervivencia **(González del Pliego, y cols., 1998)**.

Después de la lesión, los axones motores a menudo muestran múltiples procesos, llamados "axones satélite", en la vaina de los muñones distales lesionados. Estos axones aparecen entre 7 a 15 días después del corte o machacado y se ven más distales conforme pasa el tiempo después de la lesión. Esto sugiere que los axones satélite aumentan, mediante el crecimiento de finos procesos desde el muñón proximal, las vías con las que se comunicarán los axones motores lesionados.

Hay datos que sugieren que después de una lesión, puede haber un incremento en el área de intercambio de sustancias tróficas entre la glía y las neuronas. Cuando el axón es seccionado hay múltiples procesos de axones no gigantes que pueden aumentar mediante la división del axoplasma gracias a la participación de la glía. Esta reacción puede incrementar el área superficial para el intercambio de sustancias tróficas entre glía y neurona. **(Ballinger y Bittner, 1980)**.

Las neuronas y la glía son células hermanas que al parecer tienen el mismo precursor embrionario, el neuroectodermo. La relación morfológica entre

ambas sugiere que estos dos tipos celulares están interrelacionados funcionalmente. Las neuronas tienen claramente una función central característica en el sistema nervioso; mientras que las células gliales actúan como elementos de soporte para las neuronas. La glía parece tener dos funciones principales, por un lado aislar a una neurona de otra; y por otro lado apoyar metabólicamente a las neuronas, mediante el aporte de metabolitos como la glucosa o precursores de lípidos y posiblemente también macromoléculas como proteínas.

Las interacciones glía-neurona están relacionadas especialmente con el intercambio de macromoléculas, nutrientes y iones. Las zonas morfológicas y fisiológicas de las neuronas de crustáceos (cuerpo celular, axón y neuropilo) están asociados tanto con la glía adaxonal como con la glía embebida en la vaina de tejido conectivo.

Redes Tubulares. Algunas células gliales se caracterizan por poseer una red de membranas tubulares anastomosadas, las cuales atraviesan la vaina glial. Esto se ha encontrado por ejemplo, en los axones gigantes de acocil *Procambarus clarkii*, (Cuadras, 1986).

Canales Transgliales. Se encuentran en la glía perineuronal en *P. clarkii*. Aparecen como una sola invaginación tubular de la membrana glial. Tanto los canales transgliales como las redes tubulares pueden facilitar el transporte iónico o macromolecular entre las neuronas y la hemolinfa probablemente hacia las células gliales perivasculares que están separadas de la glía perineuronal.

Endocitosis Neuronal. Acoplado con la exocitosis glial, es un mecanismo para la transferencia de proteínas desde las vesículas citoplasmáticas gliales hacia las neuronas en el espacio extracelular.

Endocitosis Neuronal Modificada. Este es un mecanismo endocitótico particular que se ha observado en los cuerpos celulares de neuronas de *P. clarkii*. Pequeñas expulsiones citoplasmáticas de células gliales, forman una doble pared de vesículas endocitóticas en el citoplasma neuronal. Este mecanismo puede ayudar en la transferencia, de proteínas libres en el citoplasma glial, como la actina, desde la glía hasta la neurona.

Poros glía-neurona. Las membranas glial y axonal de *P. clarkii* pueden fusionarse y formar un pasaje directo entre el citoplasma glial y el citoplasma axonal, lo cual ayuda a la transferencia de RNA y de proteínas citoplasmáticas libres.

Uniones Tipo Gap. Se encuentran en el pericarion de motoneuronas abdominales y glía perineuronal de *P. Clarkii*. A través de estas uniones pueden pasar proteínas de distintos pesos moleculares. Son sitios de apoyo para el acoplamiento iónico.

Aposición de membranas. Se han observado en los neuropilos de ganglios abdominales, entre neurona-glía.

Proyecciones capacitadas. Individuales o asociadas a la superficie, consisten de pequeñas proyecciones gliales en el axoplasma. Las membranas neuronal y glial están separadas por uniones comunicantes (Cuadras, 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como parte de este estudio, en el laboratorio hemos iniciado desde hace algunos años una línea de trabajo en la que abordamos diferentes problemas relativos al estudio de los procesos de degeneración y regeneración en el tejido nervioso del acocil. Dentro de esta línea se han logrado establecer las características esenciales del medio de cultivo óptimo para este tipo de tejido, así como la ultraestructura del mismo, antes, durante y después de una lesión producida en el organismo completo. Se han estudiado también los tiempos de recuperación de las funciones motrices *perdidas a consecuencia de una lesión*. En la actualidad se trabaja en el estudio de la recuperación de la actividad eléctrica del tejido nervioso lesionado, analizado desde un punto de vista fisiológico.

En esta etapa, se pretende contribuir al conocimiento de las condiciones mínimas que deben darse en un medio de cultivo definido con respecto a su composición, temperatura y pH para lograr la sobrevivencia del tejido nervioso lesionado del acocil. Una vez establecidas esas condiciones para el mantenimiento de explantes de este tejido, se establecerá la relación que existe entre el arreglo que mantengan las fibras después de una lesión y la capacidad del tejido para regenerar *in vitro* las conexiones perdidas a consecuencia de la lesión misma.

Para ello se pretenden utilizar técnicas auxiliares que nos permitan comprobar la viabilidad del tejido y por ende si las fibras de reconexión son de carácter nervioso. Dentro de los criterios de viabilidad se usarán colorantes vitales como el azul de metileno y la nigrosina. Mientras que para comprobar si las reconexiones son de tipo nervioso, se usará la *inmunohistoquímica* para la detección de la proteína tau.

Nuestra propuesta, durante el desarrollo de este trabajo, es que la presencia de la glía y del tejido conectivo contribuyen de manera esencial en la recuperación de la continuidad total de las dos partes de tejido nervioso separadas a consecuencia de una lesión. El grado de recuperación de la continuidad se evalúa mediante criterios morfológicos y cualitativos.

HIPOTESIS

Si existe un apoyo trófico y estructural entre el tejido conectivo-glial y el tejido nervioso, entonces la presencia de la glía en una región próxima a un sitio de lesión favorecerá la posibilidad de recuperación del tejido nervioso lesionado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como parte de este estudio, en el laboratorio hemos iniciado desde hace algunos años una línea de trabajo en la que abordamos diferentes problemas relativos al estudio de los procesos de degeneración y regeneración en el tejido nervioso del acocil. Dentro de esta línea se han logrado establecer las características esenciales del medio de cultivo óptimo para este tipo de tejido, así como la ultraestructura del mismo, antes, durante y después de una lesión producida en el organismo completo. Se han estudiado también los tiempos de recuperación de las funciones motrices perdidas a consecuencia de una lesión. En la actualidad se trabaja en el estudio de la recuperación de la actividad eléctrica del tejido nervioso lesionado, analizado desde un punto de vista fisiológico.

En esta etapa, se pretende contribuir al conocimiento de las condiciones mínimas que deben darse en un medio de cultivo definido con respecto a su composición, temperatura y pH para lograr la sobrevivencia del tejido nervioso lesionado del acocil. Una vez establecidas esas condiciones para el mantenimiento de explantes de este tejido, se establecerá la relación que existe entre el arreglo que mantengan las fibras después de una lesión y la capacidad del tejido para regenerar *in vitro* las conexiones perdidas a consecuencia de la lesión misma.

Para ello se pretenden utilizar técnicas auxiliares que nos permitan comprobar la viabilidad del tejido y por ende si las fibras de reconexión son de carácter nervioso. Dentro de los criterios de viabilidad se usarán colorantes vitales como el azul de metileno y la nigrosina. Mientras que para comprobar si las reconexiones son de tipo nervioso, se usará la inmunohistoquímica para la detección de la proteína tau.

Nuestra propuesta, durante el desarrollo de este trabajo, es que la presencia de la glía y del tejido conectivo contribuyen de manera esencial en la recuperación de la continuidad total de las dos partes de tejido nervioso separadas a consecuencia de una lesión. El grado de recuperación de la continuidad se evalúa mediante criterios morfológicos y cualitativos.

HIPOTESIS

Si existe un apoyo trófico y estructural entre el tejido conectivo-glial y el tejido nervioso, entonces la presencia de la glía en una región próxima a un sitio de lesión favorecerá la posibilidad de recuperación del tejido nervioso lesionado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como parte de este estudio, en el laboratorio hemos iniciado desde hace algunos años una línea de trabajo en la que abordamos diferentes problemas relativos al estudio de los procesos de degeneración y regeneración en el tejido nervioso del acocil. Dentro de esta línea se han logrado establecer las características esenciales del medio de cultivo óptimo para este tipo de tejido, así como la ultraestructura del mismo, antes, durante y después de una lesión producida en el organismo completo. Se han estudiado también los tiempos de recuperación de las funciones motrices perdidas a consecuencia de una lesión. En la actualidad se trabaja en el estudio de la recuperación de la actividad eléctrica del tejido nervioso lesionado, analizado desde un punto de vista fisiológico.

En esta etapa, se pretende contribuir al conocimiento de las condiciones mínimas que deben darse en un medio de cultivo definido con respecto a su composición, temperatura y pH para lograr la sobrevivencia del tejido nervioso lesionado del acocil. Una vez establecidas esas condiciones para el mantenimiento de explantes de este tejido, se establecerá la relación que existe entre el arreglo que mantengan las fibras después de una lesión y la capacidad del tejido para regenerar *in vitro* las conexiones perdidas a consecuencia de la lesión misma.

Para ello se pretenden utilizar técnicas auxiliares que nos permitan comprobar la viabilidad del tejido y por ende si las fibras de reconexión son de carácter nervioso. Dentro de los criterios de viabilidad se usarán colorantes vitales como el azul de metileno y la nigrosina. Mientras que para comprobar si las reconexiones son de tipo nervioso, se usará la inmunohistoquímica para la detección de la proteína tau.

Nuestra propuesta, durante el desarrollo de este trabajo, es que la presencia de la glía y del tejido conectivo contribuyen de manera esencial en la recuperación de la continuidad total de las dos partes de tejido nervioso separadas a consecuencia de una lesión. El grado de recuperación de la continuidad se evalúa mediante criterios morfológicos y cualitativos.

HIPOTESIS

Si existe un apoyo trófico y estructural entre el tejido conectivo-glial y el tejido nervioso, entonces la presencia de la glía en una región próxima a un sitio de lesión favorecerá la posibilidad de recuperación del tejido nervioso lesionado.

OBJETIVO GENERAL.

Obtener evidencia morfológica de la regeneración neural *in vitro*, usando como referencia la presencia o ausencia de la glía y el tejido conectivo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Obtener diferentes tipos de cultivos, en los cuales se diversificará la manipulación y el tratamiento del tejido nervioso.
- b) Mantener los cultivos por un mínimo de 5 días en un medio mínimo esencial.
- c) Conocer y evaluar a nivel morfológico y cualitativo los diversos grados de regeneración, según el tipo de arreglo que tengan las fibras después de haber sido lesionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El tejido neural de acocil ha sido muy poco manejado en condiciones de cultivo; la información disponible señala como principales fuentes de tejido al tallo ocular (Cooke y cols., 1991), y los ganglios de la cadena abdominal (Krenz, 1990). Por su ubicación, la cadena ganglionar abdominal del acocil es de fácil acceso y se encuentra relativamente lejos de regiones como la boca, órgano potencialmente capaz de almacenar diversos tipos de contaminantes bacterianos o micóticos. Por ello se eligió a la cadena ganglionar ventral como fuente de tejido neural para los explantes.

Material Biológico.

Se utilizaron aproximadamente 120 acociles de la especie *Procambarus clarkii*, adultos, de 8 a 12 cm de longitud, sin distinción de sexo, procedentes de Chihuahua, México. Desde su llegada al laboratorio, se mantuvieron en acuarios con aireación constante, a una temperatura de 16-18° C. Se alimentaron cada tercer día con zanahoria, calabaza y pescado. El agua les fue reemplazada cada tercer día.

Los cultivos de tejido neural se llevaron a cabo, en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar **Forma Scientific**, siguiendo estrictas medidas antisépticas como la limpieza del área de trabajo con etanol al 80% y la exposición con luz ultravioleta del equipo quirúrgico, de la cristalería y del microscopio, durante, por lo menos, una hora antes de cada cultivo.

El material quirúrgico se esterilizó conforme se utilizaba en un esterilizador **Hot Bead Sterilizer Sold By Fine Science Tools, Inc.** El material de cristalería y los filtros **Swinnex W/O Filter Milipore** se esterilizaron previamente en una esterilizadora con calor seco.

Para la disección de la cadena ganglionar se empleó un microscopio de disección **American Optical**.

Cada acocil utilizado se anestesió por enfriamiento a -4°C, durante una hora. Inmediatamente después se decapitó y se lavó con etanol al 80%. Se flameó, se limpió la superficie con benzal y se fijó a una placa de corcho, (limpiada previamente con etanol 80% e irradiada con luz ultravioleta), a fin de llevar a cabo la extracción de la cadena. Para obtener la cadena nerviosa ganglionar abdominal del acocil se hizo un corte en el surco transversal del cefalotórax, con el fin de separar la región cefálica del resto del cuerpo. Se eliminaron los pereiópodos (patas de desplazamiento) y los pleópodos (patas natatorias), con el fin de facilitar el acceso a la cadena ganglionar.

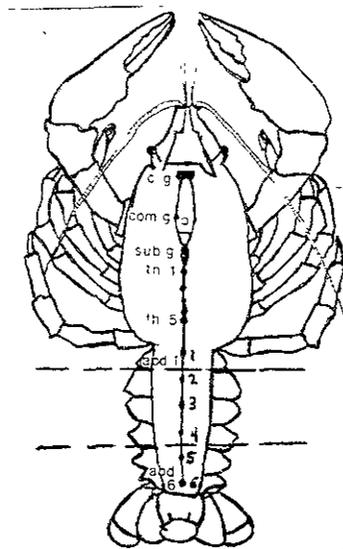


Figura 1. Sistema nervioso central del acocil *Procambarus clarkii*, donde se muestran los niveles en los cuales se llevaron a cabo las lesiones (2º y 3er ganglio y 4º y 5º ganglio). Tomado de Horiuchi y cols., 1971.

Por medio de un corte a lo largo de la línea media torácica se accedió a los tres últimos ganglios nerviosos torácicos. En el primer segmento abdominal se realizó un corte transversal de la cutícula en la región ventral. Luego, se efectuaron dos cortes longitudinales paralelos que iban desde el primero hasta el último segmento abdominal. De esta manera se pudo retirar la cutícula de la región ventral por disección roma, lo que hizo que la cadena ganglionar quedara expuesta en su porción abdominal. Con pinzas finas se expuso también la cadena en la región torácica. Una vez descubierta toda la cadena nerviosa se amarraron dos hilos de seda (5-0) estériles, uno en la región torácica y otro en el extremo distal, mediante los cuales la cadena se pudo sujetar y extraer, lo cual se hizo después de efectuar un corte transversal por arriba del último ganglio torácico y otro por abajo del VI ganglio abdominal.

Desde su exposición hasta su siembra, la cadena ganglionar se mantuvo hidratada con solución salina de Van Harreveld (VH) (Van Harreveld, 1936), estéril. Una vez extraída, la cadena se colocó en una caja de petri con sylgard y con nueva solución de VH. Durante este paso, el tejido conectivo que cubría la cadena se retiró tanto como fue posible.

Con la finalidad de observar la influencia que tiene el tejido conectivo y la glía en la regeneración, se siguieron procedimientos mecánicos y químicos para quitar de la cadena ganglionar el exceso o la mayor cantidad posible de este tejido. Para la eliminación por medios mecánicos se emplearon pinzas de disección, por medios químicos se añadió enzima colagenasa Tipo V al 2%, durante 10 minutos.

Los explantes se colocaron en una caja de petri Nunc (cat. No. 150318), pretratada con cargas, de 35 cm de diámetro.

Después de la disección, los cultivos se mantuvieron en incubación por lapsos de hasta cinco días a 27° C, en una incubadora **Forma Cientific Water-Jacketed incubator 3250**.

El medio fue renovado dos veces por semana y los cultivos eran revisados los días 1, 3 y 5, con ayuda de un microscopio invertido **Diaphot-TMD Nikon**, con la técnica de **Diascopic Dic Nomarski Attachment TMD-NT2**. Durante la revisión se evaluó la viabilidad de los cultivos. Tomando en cuenta como parámetros la refringencia, la adhesividad y sobre todo, el grado de regeneración del tejido lesionado. Los cultivos que presentaron reconexiones fueron fotografiados con una cámara **Nikon F601 M**.

En algunos cultivos se hicieron pruebas de viabilidad mediante colorantes vitales (azul de metileno a la concentración de 0.1 g / 10 ml y nigrosina a la misma concentración). Si el explante había sobrevivido el azul de metileno era absorbido o integrado de manera que el tejido se teñía de color verde. En el tejido muerto no había tinción ya que el colorante no era absorbido. Por otra parte, en el caso de la nigrosina, ésta no era absorbida por el tejido vivo el cual permanecía con su coloración natural; el colorante permanecía en el exterior y teñía de color negro sólo al medio de cultivo. En consecuencia si el tejido no estaba vivo, éste se teñía de color negro debido a la incorporación de este colorante.

Composición de la Solución Salina.

TABLA 1

La solución salina de Van Harreveld a pH= 7.2-7.4 consta de los siguientes componentes:

| COMPONENTE | CONCENTRACION |
|--------------------|---------------|
| | mol/litro |
| NaCl | 0.205 |
| CaCl ₂ | 0.013 |
| KCl | 0.005 |
| MgSO ₄ | 0.005 |
| NaHCO ₃ | 0.002 |
| Glucosa | 0.040 |

Composición del Medio de Cultivo.

Como medio básico para el cultivo de los explantes se utilizó solución salina de Van Harreveld adicionada con aminoácidos a pH= 7.2-7.4. Los aminoácidos y la concentración a la que fueron utilizados se detalla a continuación:

TABLA 2

| COMPONENTE | CONCENTRACION mMol/litro |
|--------------------|-----------------------------|
| NaCl | 205 |
| CaCl ₂ | 13 |
| KCl | 5 |
| MgSO ₄ | 5 |
| NaHCO ₃ | 2 |
| Glucosa | 0.040 |
| DL-alfa Alanina | 5.05 |
| L-Arginina | 2.87 |
| L-Asparagina | 1.89 |
| L-Cisteina | 0.99 |
| L-Glutamina | 2.05 |
| Glicina | 2.66 |
| L-Histidina | 1.61 |
| DL-Isoleucina | 1.90 |
| L-Leucina | 0.954 |
| L-Lisina | 0.513 |
| DL-Metionina | 1.0 |
| DL-Treonina | 5.04 |
| L-Triptofano | 0.098 |
| L-Tirosina | 1.65 |
| DL-Valina | 1.68 |

Procedimiento Experimental.

Los cultivos se clasificaron en cuatro tipos, de acuerdo con el tipo de lesión que se deseaba obtener, así como si el conectivo y por tanto parte de la glía (de la vaina) era retirada mecánica y/o enzimáticamente. En todos los casos las cadenas se dividieron en dos porciones, 3 ganglios anteriores (1o-3er ganglios) y 3 posteriores (4o-6o ganglios). Los explantes fueron colocados en una caja de petri Nunc, pretratada, de 35 mm de diámetro. Una vez hecha la lesión las fibras se alinearon y se aproximaron tanto como fue posible a efecto de favorecer la reconexión. Para cada uno se elaboraron aproximadamente 24 cultivos.

Los cultivos se mantuvieron durante tres días, debido a que durante este tiempo ya se podía hacer un análisis cualitativo del grado de lesión y del nivel de recuperación del tejido nervioso lesionado. En los cultivos Tipo I se hizo un seguimiento del tejido hasta por cinco días, ya que en esta etapa apenas se iniciaban los experimentos y no se tenía conocimiento del tiempo necesario para observar procesos regenerativos. Posteriormente se vio que en la mayor parte de los casos antes del tercer día ya se podían observar puentes de reconexión o algunos procesos de regeneración. Algunos cultivos de tipo IV, se mantuvieron hasta por 55 días con buena refringencia y adhesividad que nos aseguraba que estaban vivos. Sin embargo, sólo durante los tres primeros días se encontraron fibras de reconexión.

CULTIVO TIPO I En este tipo de cultivo, la vaina de tejido conectivo que rodeaba la cadena nerviosa ganglionar se retiró por completo, en todos y cada uno de los explantes y en algunos, además, se utilizó enzima por lo que los haces de fibras nerviosas quedaron completamente desnudos. Las dos hemicadenas se separaron y en una de ellas se efectuó un corte transversal: entre el 1o y 2o ganglios y entre el 4o y 5o ganglios.

CULTIVO TIPO II Se hicieron 2 variedades de este tipo de cultivo: El Tipo IIa formado por la región comprendida entre el 1o y el 3er ganglios. En el tipo IIa se retiró el exceso de conectivo y sólo se dejó la vaina que rodea a la cadena, sólo en algunos casos se usó colagenasa. Entre el 1o y el 2o ganglios, sin separar las hemicadenas se hizo un corte a nivel de una de ellas.

En el Tipo IIb, región comprendida entre el 4o y el 5o ganglios, se separaron tanto las hemicadenas como las fibras que las componen sin retirar completamente el tejido conectivo, es decir respetando la vaina, salvo en algunos casos en los que se quitó el exceso de manera enzimática, posteriormente se llevó a cabo un corte transversal en una de ellas.

CULTIVO TIPO III En todos estos cultivos se eliminó mecánicamente todo el tejido conectivo, incluida la vaina y en algunos más se usó también colagenasa. En ambas porciones (entre el 1o y el 2o y el 4o y el 5o ganglios),

se separaron las fibras de las dos hemicadenas y se hizo un corte transversal en una de éstas

CULTIVO TIPO IV En este tipo de cultivos también se retiró de manera mecánica todo el conectivo, incluida la vaina. En la mitad de ellos, además, se utilizó colagenasa. Se separaron las hemicadenas y posteriormente las fibras entre el 1o y el 2o y entre el 4o y el 5o ganglios. Se hizo un corte transversal en ambas hemicadenas y finalmente se dio un giro de 180° al 1o y al 4o ganglios, de manera que se hicieron coincidir el primer ganglio con el segundo y el cuarto con el quinto

Para el análisis se tomaron en consideración cinco parámetros: 1) Tipo y tiempo de cultivo, 2) si fueron o no tratados con colagenasa, 3) adhesividad, 4) refringencia y 5) si presentaron o no conexiones.

Criterios de Viabilidad.

1 Observación microscópica de la refringencia tisular.:

La característica más notable de las células vivas vistas al microscopio de contraste de fases, es la refringencia que muestran. Esta propiedad se mantiene en cultivo como función de la viabilidad celular. Por ello se realizaron observaciones cada tercer día, al momento de llevar a cabo el cambio de cultivo, (análisis cualitativo). La pérdida total de refringencia se consideró equivalente a la muerte del tejido.

2. Observaciones del grado de adherencia a la superficie de la caja de cultivo:

La adhesión de las células a la superficie del recipiente de cultivo está determinada por la viabilidad de las mismas. Es decir, dado un sustrato adecuado, a las pocas horas de sembrado el tejido, este se adhiere al fondo de la caja de cultivo y se mantiene adhiriendo hasta que muere. Bajo estas consideraciones, cada tercer día se observó que el tejido nervioso permaneciera adherido a la superficie de la caja de cultivo. Cuando se despegaba, era desechado.

Estos criterios de viabilidad fueron expresados en porcentaje de refringencia y adhesividad.

3. Como auxiliares en la observación de la viabilidad del tejido se usaron técnicas de tinción a partir de colorantes vitales, como:

a) Azul de Metileno: cuando el tejido si está vivo, al aplicar el colorante éste es absorbido por la muestra, de manera que se tiñe de color verde. Mientras que si el tejido no está vivo el colorante no se absorbe o no completamente, permaneciendo el explante con su color natural.

b) Nigrosina: éste colorante actúa de manera contraria al azul de metileno, es decir, cuando el tejido sí está vivo, al aplicar el colorante, éste no es absorbido y se mantiene en el medio de cultivo, a la inversa, si el tejido está muerto el colorante tiñe al explante de color negro.

Inmunohistoquímica.

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica contra tau, proteína asociada a microtúbulos (MAP) para comprobar si la prolongaciones que presentaron los cultivos en donde se encontraron puentes de reconexión eran de tipo nervioso. La técnica consistió en lo siguiente:

Soluciones para Inmunohistoquímica.

PBS 0.1M, pH 7.4

| | |
|---------------------------|--------|
| Fosfato sódico monobásico | 0.510g |
| Fosfato sódico dibásico | 2.945g |
| NaCl | 0.714g |

PBS 0.2 M, pH 7.4

| | |
|---------------------------|-------|
| Fosfato sódico monobásico | 4.08g |
| Fosfato sódico dibásico | 23.6g |
| NaCl | 5.6g |

TBS 0.1M, pH 7.6

| | |
|-------------|--------|
| Trizma HCl | 3.030g |
| Trizma base | 0.695g |
| NaCl | 0.945g |

PARAFORMALDEHIDO al 4%, disuelto en 5 ml de agua, a 60°C, se deja enfriar y se agregan 5 ml de PBS 0.2M, pH 7.4

1. Se fija el tejido, se retira con cuidado el medio de cultivo y se coloca en su lugar la solución de paraformaldehído (SIGMA)
2. Se deja en el refrigerador de 12 a 24 hs
3. Se lava 3 veces con PBS 0.1 M y 3 veces con TBS 0.1 M
4. Se incuba una hora con TBS 0.1 M + 3% de suero normal de cabra + 0.3% de TRITON:

9.67 ml de TBS

300 µl de suero normal de cabra (VECTOR)

30 µl de tritón (SIGMA)

5. Se lava 3 veces (lavados cortos, 5 min) con TBS
6. Se agrega el primer anticuerpo en dilución 1:4000
19.8 ml de TBS

- 200 µl de suero normal de cabra (VECTOR)
10 µl de anticuerpo contra tau (VECTOR)
7. Se deja en el refrigerador durante 2 días (3 noches).
 8. Se lava 3 veces con TBS 0.1 M + 1% de suero normal de cabra (VECTOR) 10 min.
 9. Se incuba 60 min con el anticuerpo secundario (VECTOR) 1:200. Se guarda el primer anticuerpo, probablemente para reutilizarlo.
1 gota = 50 µl de anticuerpo biotinilado (VECTOR) + 10 ml de TBS + 1% de suero normal de cabra (VECTOR).
 10. Se lava 3 veces con TBS 0.1 M + 1% de suero normal de cabra (VECTOR) 5 min.
 11. Se incuba 60 min en AVIDINA-BIOTINA (VECTOR)
2 gotas frasco A
2 gotas frasco B
10 ml de TBS
 12. Se lava 3 veces con TBS (5 min).
 13. Se incuba con DAB-H202 (SIGMA), se observa al microscopio.
DAB (Diaminobenzidina) 0.005%, 5 mg en 10 ml de TBS. La solución está en 5 mg/ml,
Se diluye en una alícuota de 1 ml en 10 ml de TBS.
Se agregan después de 3 a 5 min 100 µl de peróxido de hidrógeno.
 14. Se lava 3 veces con TBS para guardar.

Análisis Resultados.

Los cultivos se mantuvieron durante 3 días, debido a que durante este tiempo ya se podía llevar a cabo un análisis cualitativo del grado de lesión y del nivel de recuperación del tejido nervioso. Sólo en los cultivos Tipo I se hizo un seguimiento del tejido hasta por 5 días. En la mayor parte de los casos antes del tercer día ya se podían observar puentes de reconexión o algunos procesos de regeneración

Para el análisis de resultados se tomaron en consideración cinco parámetros: 1) Tipo y días de cultivo, 2) si fueron o no tratados con colagenasa, 3) adhesividad, 4) refringencia y 5) si presentaron o no reconexiones.

Se calculó el porcentaje de reconexión que presentó cada tipo de cultivo, es decir, cantidad de cultivos que presentaron reconexión para cada uno de los Tipos.

RESULTADOS

En la siguiente figura se presenta un cultivo Tipo III después de 3 horas de haberse sembrado la cadena ganglionar del acocil, durante este tiempo, como se puede observar en la figura, no se presenta aún ningún tipo de regeneración ni fibras que atraviesen el área de lesión.

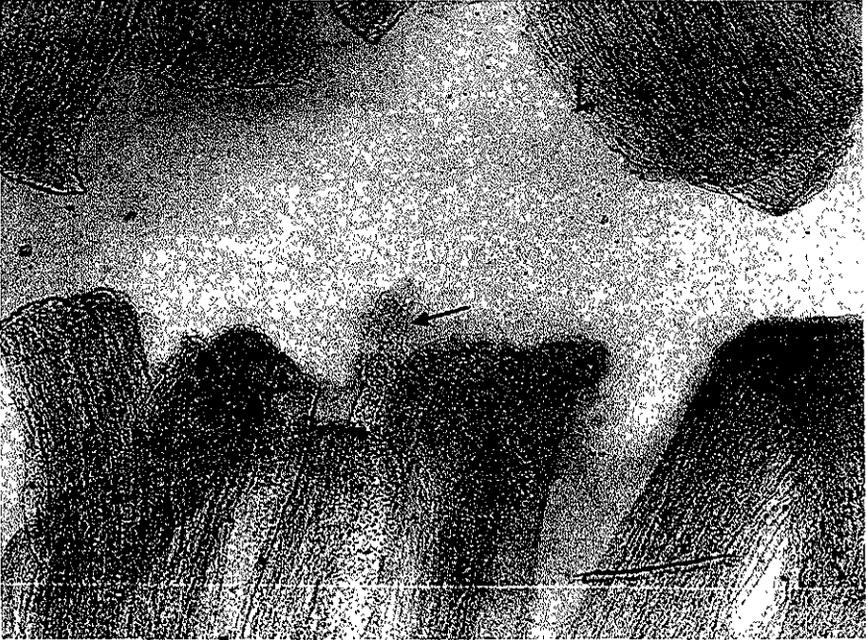


Figura 2. Cultivo Tipo III de 3 horas, observe que después de este tiempo no existe aún ningún tipo de interconexión, pero en la parte central inferior se aprecia una digitación (flecha) que posteriormente podría convertirse en un puente de reconexión.

Cultivos Tipo I

1) En este grupo se hicieron once cultivos de este tipo. El tiempo de cultivo fue de 5 días (excepto en un caso que fue de 3 días).

2) Del total de cultivos, ocho no fueron tratados con colagenasa y sólo a tres se les aplicó la enzima.

3) La mayor parte de los cultivos de este tipo, presentó adhesividad del 100 %, lo que significó que su viabilidad fue buena y que el tejido estaba vivo; sólo en un caso la adhesividad se redujo al 50 % y en otro al 25 %.

4) La mayor parte de los cultivos presentó 100 % de refringencia lo que refuerza la idea de que el tejido estaba en buenas condiciones de viabilidad. Igual que en el caso de la adhesividad sólo un cultivo llegó al 50 % de refringencia y otro al 25 %.

5) En la figura 3 (a y b) se muestra un ejemplo de este tipo de cultivo, en el cual podemos observar algunas fibras por la parte interna de la hemicadena seccionada, que atraviesan el área de lesión y conectan los dos muñones. En ocho de estos cultivos no se presentó ningún tipo de regeneración. En los otros tres se observaron algunos procesos regenerativos a manera de puentes de reconexión. Esto significa que hubo conexiones regenerativas en un 27.3 % de los casos, mientras que en el 72.7% no las hubo. Un concentrado de todos los resultados se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3

Cultivo Tipo I

N = 11

| Días de Cultivo | Colagenasa | Reconexiones | Adhesividad | Refringencia |
|---|------------|--------------|-------------|--------------|
| 5 | Si | Sin | 50% | 50% |
| 5 | No | Sin | 25% | 25% |
| 5 | No | Sin | 100% | 100% |
| 5 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 5 | No | Sin | 100% | 100% |
| 5 | No | Sin | 100% | 100% |
| 5 | No | Con | 100% | 100% |
| 5 | Si | Sin | 100% | 100% |
| 5 | No | Sin | 100% | 100% |
| 5 | No | Sin | 100% | 100% |
| Porcentaje de cultivos con reconexiones 27.3% | | | | |
| Porcentaje de cultivos sin reconexiones 72.7% | | | | |

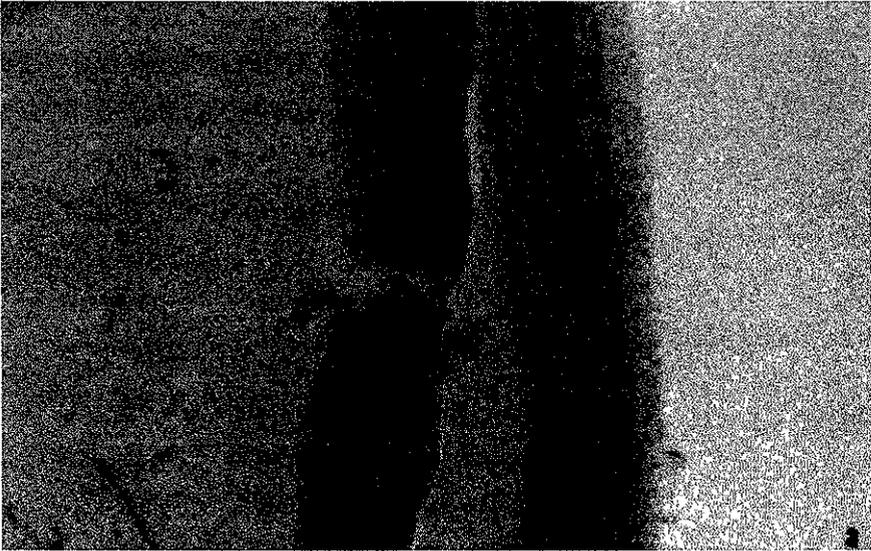


Figura 3. Cultivo Tipo I, de cinco días. a) Aumento a 10X. Se aprecia el área de lesión y el puente de reconexión (flecha). b) Aumento a 40X en donde se observa con mayor detalle el puente de reconexión (flecha)

Cultivos Tipo Ila

1) Los once cultivos Tipo Ila que se hicieron se mantuvieron durante 3 días. La lesión se llevó a cabo entre el 1o y 2o ganglios.

2) De los once cultivos de este tipo, cuatro fueron tratados con colagenasa y siete no.

3) y 4) La refringencia y la adhesividad se presentó en todos los cultivos, (como se puede observar en la Tabla 4), lo que indicó el buen estado y la viabilidad del tejido.

5) A diferencia de los cultivos Tipo I, la mayor parte de estos cultivos tuvieron cierto grado de recuperación ya que de once cultivos, siete (63.6 %) reconectaron y cuatro (36.4 %) no lo hicieron. En la figura 4 se presenta un ejemplo de este cultivo, en donde se observa que 3 días después de la lesión (fig 4b) hay un gran avance en el proceso regenerativo del tejido dañado. Un resumen de estos resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4 Cultivo Tipo Ila N = 11

| Días de Cultivo | Colagenasa | Reconexiones | Adhesividad | Refringencia |
|---|------------|--------------|-------------|--------------|
| 3 | Si | Sin | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Sin | 100% | 100% |
| 3 | Si | Sin | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Sin | 100% | 100% |
| Porcentaje de cultivos con reconexiones | | | 63.6% | |
| Porcentaje de cultivos sin reconexiones | | | 36.4% | |

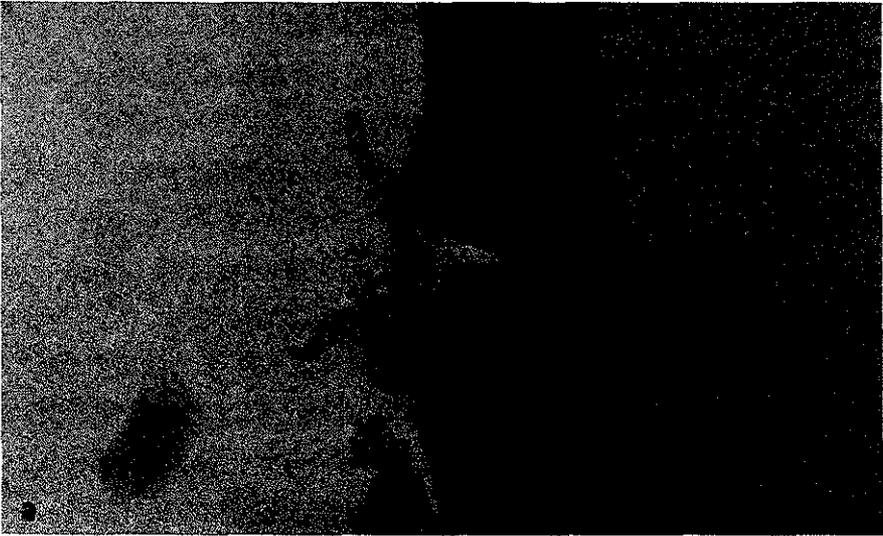


Figura 4. Cultivo Tipo IIa, **a)** de un día, se observa la lesión en una hemicadena, entre 1° y 2° ganglios (flecha), Aumento a 10X. **b)** Cultivo de tres días. Después de la lesión se puede observar la presencia de una cicatriz (flecha). Aumento 10X

Cultivo Tipo IIB

1) El tiempo, del cultivo Tipo IIB fue, al igual que el Tipo IIA, de 3 días. Sólo varió el sitio de la lesión que en este cultivo se hizo entre el 4o y 5o ganglios.

2) Por ser el mismo cultivo que el Tipo IIA, el número total de casos fue de once, de los cuales también siete no se trataron con colagenasa y cuatro sí.

3) y 4) Los once cultivos presentaron un 100 % de refringencia y adhesividad (Tabla 5).

5) La diferencia entre estos cultivos y los del Tipo IIA, fue que mientras ocho de estos reconectaron, sólo siete de los del Tipo IIB lo hicieron. En el ejemplo que se muestra en la figura 5 (a y b) observamos los puentes de reconexión que provienen de uno de los muñones, los cuales aunque no atraviesan toda el área lesionada para llegar al muñón contrario, llegan en algunos casos a reconectar con la hemicadena contralateral. En la tabla 5 se presenta un resumen de estos resultados.

TABLA 5 Cultivo Tipo II b

N = 11

| Días de cultivo | Colagenasa | Reconexiones | Adhesividad | Refringencia |
|--|------------|--------------|-------------|--------------|
| 3 | Sí | Con | 100% | 100% |
| 3 | Sí | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Sin | 100% | 100% |
| 3 | Sí | Sin | 100% | 100% |
| 3 | No | Sin | 100% | 100% |
| 3 | Sí | Sin | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| Porcentaje de cultivos con reconexiones 63.6 % | | | | |
| Porcentaje de cultivos sin reconexiones 36.4 % | | | | |

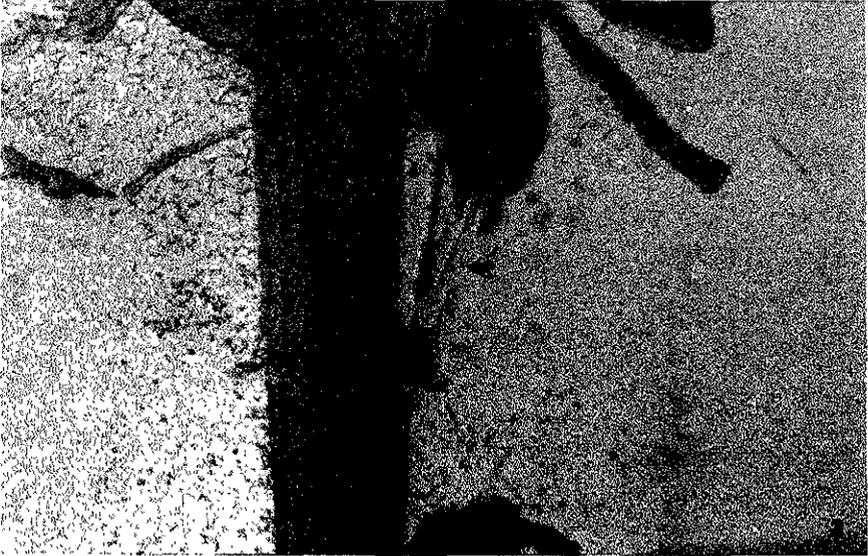


Figura 5. Cultivo tipo IIb, de tres días. a) Lesión transversal total en la hemicadena izquierda, donde se observan puentes que reconectan con la hemicadena contralateral (flecha). Aumento 10X.

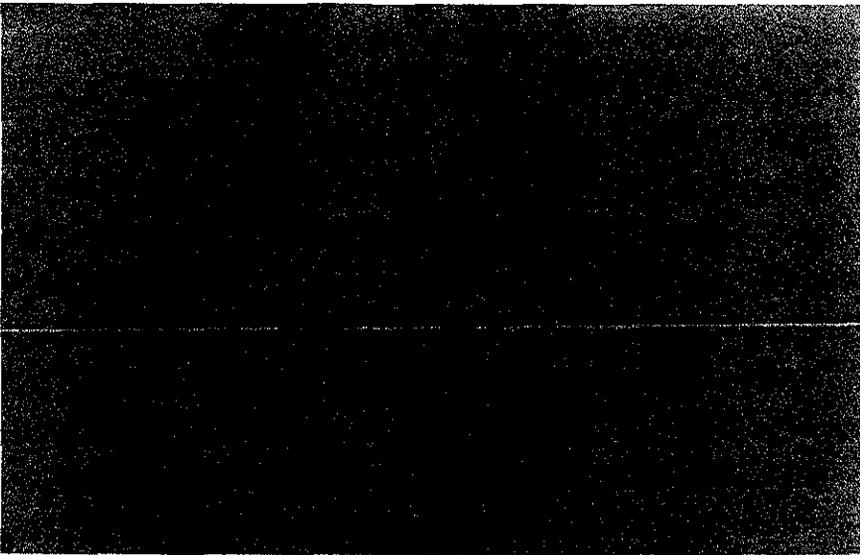


Figura 6 a y b. Cultivo tipo III, de tres días. En ambos casos se observan algunas fibras que atraviesan el área de lesión (flechas). Aumento 10X.

Cultivos Tipo IV

1) Se hicieron ocho cultivos del Tipo IV, los cuales se mantuvieron durante 3 días.

2) De los ocho cultivos, cuatro fueron tratados con colagenasa y a cuatro de ellos no se puso colagenasa. En estos cultivos el tejido conectivo también se retiró mecánicamente en su totalidad.

3) y 4) La adhesividad y la refringencia se observó en el 100 % de los cultivos, lo que indica la buena viabilidad que mostraron.

5) En la Tabla 7 se muestra que los ocho cultivos, es decir el 100% de ellos, presentaron procesos regenerativos, En la figura 7, de este tipo cultivos vemos algunos puentes de interconexión que atraviesan la zona lesionada y reconectan los muñones distales y proximales. También se observa, en los muñones de la parte baja de la figura 7b una fibra que pasa de manera contralatera de una hemicadena a la otra.

Los resultados de los cultivos Tipo IV se resumen en la Tabla 7.

TABLA 7

Cultivo Tipo IV

N = 8

| Días de cultivo | Colagenasa | Reconexiones | Adhesividad | Refringencia |
|---|------------|--------------|-------------|--------------|
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | Si | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| 3 | No | Con | 100% | 100% |
| Porcentaje de cultivos con reconexiones | | 100% | | |
| Porcentaje de cultivos sin reconexiones | | 0.0% | | |

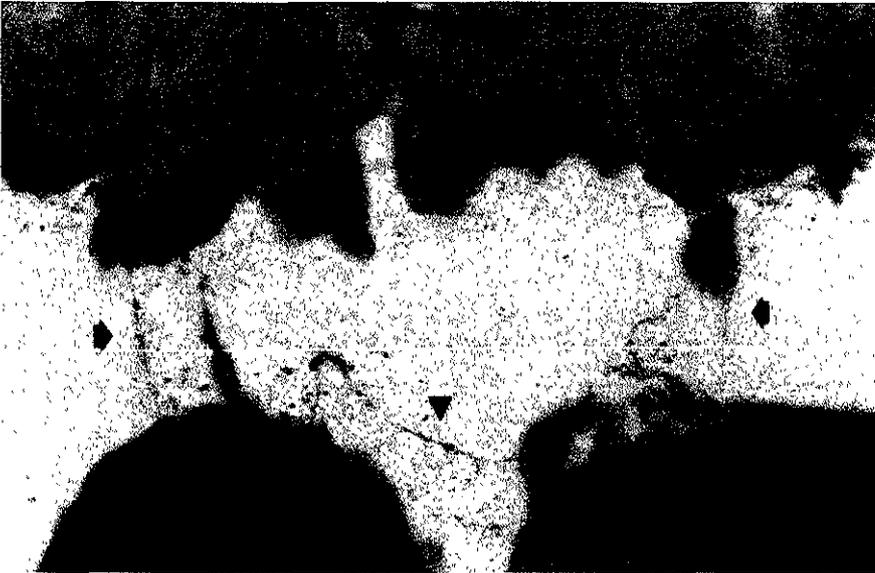
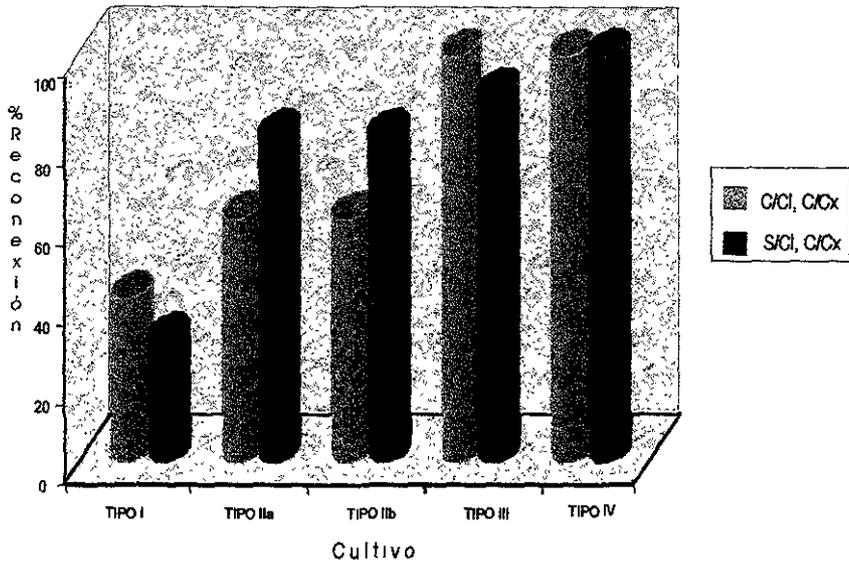


Figura 7. Cultivo Tipo IV, de tres días. a) Se observa un corte transversal completo en ambas hemicadenas, varias fibras atraviesan el área de lesión (flechas), aumento 10X. b) Aumento a 40X en donde las fibras se aprecian mas claramente. Nótese una fibra que atraviesa de una hemicadena a la contralateral (cabeza de flecha).

TABLA 8

| CULTIVO TIPO I | GRAFICA 2 |
|------------------------|-------------------|
| | Con Conex. |
| Sin colagen. | 25% |
| Con colagen. | 33% |
| CULTIVO TIPO Ila y Iib | |
| Sin colagen. | 71.40% |
| Con Colagen. | 50% |
| CULTIVO TIPO III | |
| Sin colagen. | 85.70% |
| Con Colagen. | 100% |
| CULTIVO TIPO IV | |
| Sin Colagen. | 100% |
| Con Colagen. | 100% |

Resumen de los porcentajes de reconexión, con y sin colagenasa que presentaron los diferentes tipos de cultivo. Estos datos se muestran en la gráfica 2.



GRAFICA 2. Porcentaje de reconexión en los diferentes tipos de cultivo con y sin colagenasa.

Azul de Metileno

Para verificar la viabilidad de los tejidos, durante los 3 días que eran analizados los cultivos, en seis de ellos se llevó a cabo la prueba de azul de metileno.

En la figura 8 se muestra un cultivo de 3 días, en el que se puede observar una tinción prácticamente completa del tejido. La intensidad de la tinción es máxima en la periferia y disminuye ligeramente, sin llegar a desaparecer hacia el centro.

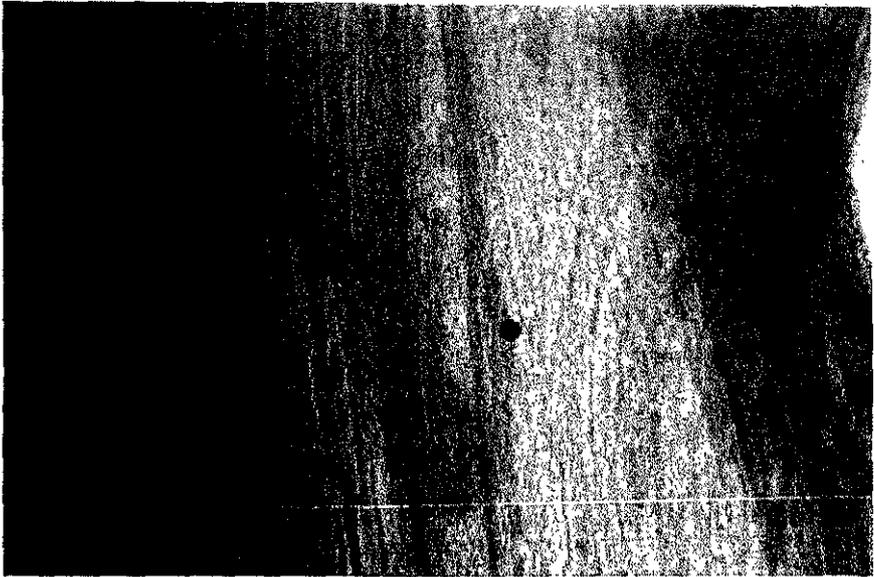


Figura 8. Cultivo Tipo III, de tres días. A este cultivo se le aplicó azul de metileno como prueba de viabilidad. Se puede observar que las fibras que se encuentran en la periferia están teñidas (asteriscos) y la intensidad de la tinción disminuye hacia las porciones centrales (círculo negro). Aumento 20X.

En la figura 9 se observa un cultivo también de 3 días, en el que el tejido presenta un menor grado de viabilidad, ya que las fibras periféricas presentan una mayor intensidad de tinción mientras que las fibras centrales no se tificen.



Figura 9. Cultivo Tipo III, de tres días. El cultivo fue teñido con azul de metileno. Nótese que la tinción de las fibras centrales es más débil (círculo negro) que la que se presenta en el tejido de la figura 7. El asterisco muestra las fibras periféricas teñidas. Aumento 40X.

Cultivos con Nigrosina

El efecto de la nigrosina sobre un cultivo de 3 días se observa en la figura 10. La ausencia de tinción con este colorante en todo el tejido nervioso puso de manifiesto la viabilidad del tejido.

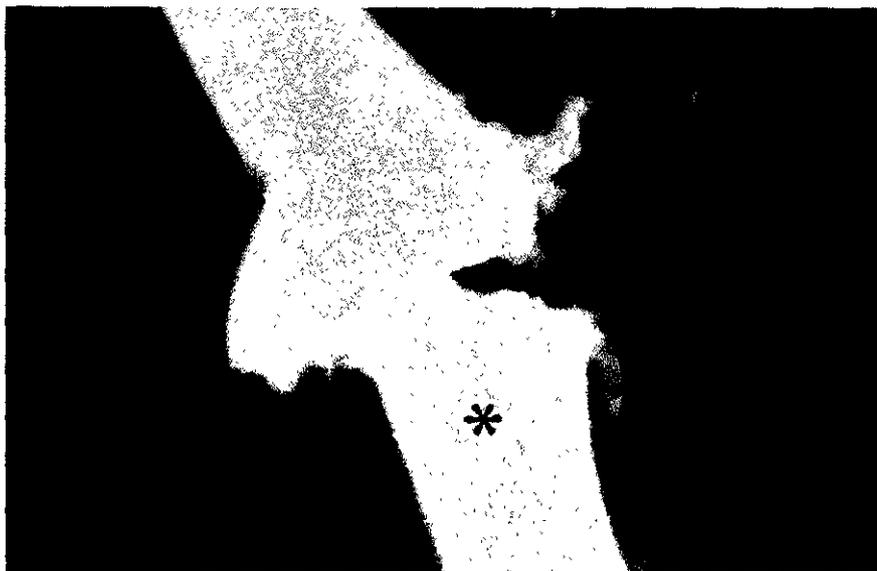


Figura 10. Cultivo Tipo II, de tres días. Como se puede ver el medio de cultivo está teñido de negro, mientras el tejido presenta su coloración normal (asterisco). En este ejemplo se puede distinguir de manera importante la refringencia del tejido. Aumento 20X.

La figura 11 contrasta con la figura 9. La nigrosina se aplicó al medio de cultivo y al tejido que tenía 3 días de haber sido cultivado. El tejido se tiñó de inmediato lo que puso de manifiesto la falta de viabilidad del mismo.



Figura 11. Cultivo Tipo III, de tres días. Se aplicó nigrosina al medio de cultivo, el cual fue retirado después de 2 minutos. Observe que el tejido está totalmente teñido (asteriscos) indicativo de que la viabilidad es nula. Aumento 40X.

La figura 12 se muestra el ejemplo de un cultivo que se mantuvo durante 55 días. Se puede observar que las células conservan la refringencia, tanto en cadenas intactas como en cadenas lesionadas, ya que estos ejemplos corresponden a los cultivos tipo IV.

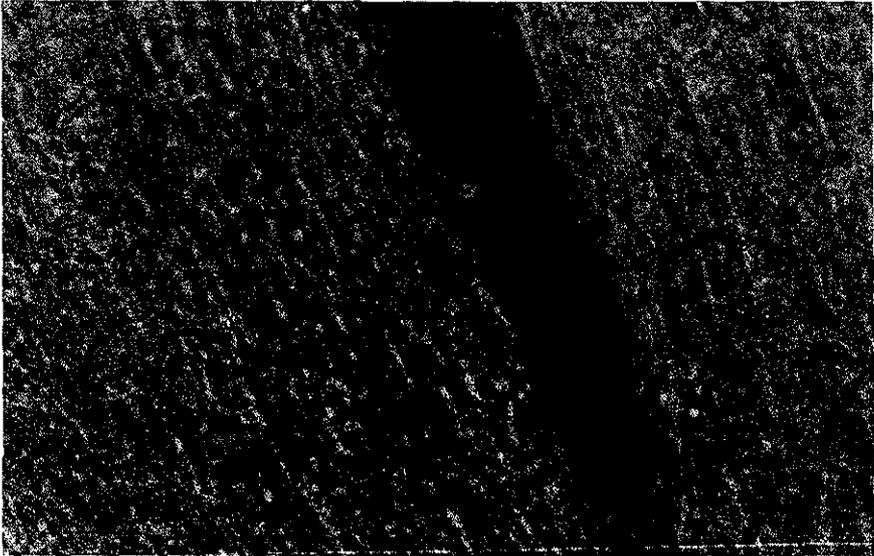


Figura 12. Cultivo Tipo IV. En esta fotografía se muestra un ejemplo de un cultivo que se mantuvo durante 55 días, aprecie la refringencia y adhesividad que presenta el tejido aun después del tiempo de cultivo (asteriscos).

En la figura 13 a, 13 b y 14 se muestra un ejemplo del cultivo tipo I, en el que podemos observar el crecimiento del tejido conectivo que rodea los haces de fibras nerviosas, aun después de haber sido retirada la vaina conectivo-gliial. Debido a que en este caso no se separaban las fibras, probablemente quedaba una buena parte de tejido conectivo-gliial entre ellas, o el recrecimiento de éste tejido pudiera haber recibido aporte de la hemicadena no lesionada; de tal manera que con frecuencia se observaba que al crecer el conectivo rodeaba a los muñones y formaba una especie de saco, lo que evitaba el crecimiento de algunas fibras hacia el muñón contrario.



Figura 13. Cultivo Tipo I, a) se aprecia que en uno de los muñones de la hemicadena lesionada el tejido conectivo crece nuevamente cubriendo el tejido nervioso formando una especie de saco (flecha). Aumento 10X.



Figura 13.b) Observe con otro enfoque la presencia del conectivo, nótese en la parte central del muñón (flecha) que se forma una especie de abertura de saco. Aumento 10X.

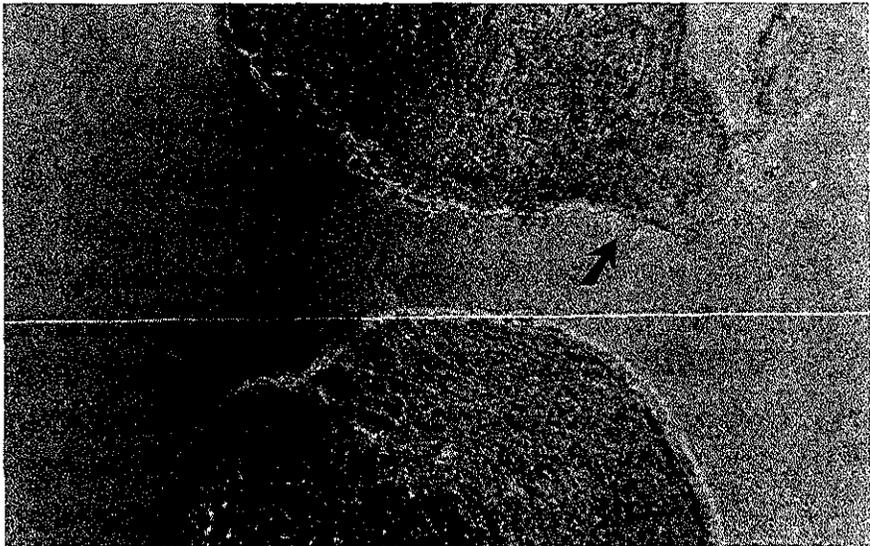


Figura 14. Cultivo Tipo I. Compare el muñón de la parte superior con las figuras 13 a y b, y aprecie que el conectivo no cubre en su totalidad al tejido nervioso, lo cual hubiera permitido la proyección de puentes de reconexión (flecha superior), sin embargo, el conectivo del muñón inferior presenta el mismo patrón de crecimiento del conectivo como el de la figura anterior, (flecha inferior). Aumento 10X.

En las figuras 15, 16 y 17 se muestran tres ejemplos de cultivos tipo IV, de tres días de cultivo, en los cuales se realizó la técnica de inmunohistoquímica. La primera figura (fig. 15) se presenta antes de llevar a cabo la técnica, en la segunda (fig.16) se presenta un aumento a 40X y la última figura (fig.17) muestra el tejido después de haberse hecho la inmunohistoquímica, en donde vemos que las fibras que atraviesan el área lesionada se tiñen de color café.



Figura 16. Cultivo Tipo IV. Se aprecia una sección completa en ambas hemicadenas, en donde se pueden distinguir algunas fibras que atraviesan el área de lesión (flechas), Antes de llevar a cabo la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 10X.



Figura 16. Cultivo Tipo IV, de tres días. Se observan a mayor aumento y con más detalle las fibras translúcidas que atraviesan el área de lesión (flechas); así como las fibras que pasan entre los muñones contralaterales (flechas incompletas). Aumento 40X. Antes de la inmunohistoquímica.

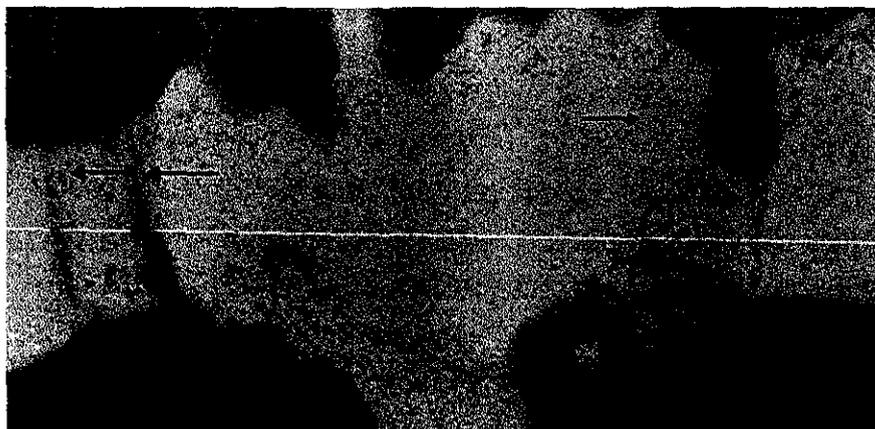


Figura 17. Cultivo Tipo IV, de tres días. Compare con la figura anterior la coloración café que adquiere el tejido después de la técnica inmunohistoquímica. Aprecie el color café en las fibras que atraviesan el área de lesión (flechas), y la fibra que atraviesa hacia la hemicadena contraria (cabeza de Flecha). Aumento 40X

DISCUSION

La sobrevida de un tejido en cultivo se ha asociado con muchas características el tipo celular, la técnica de cultivo, es decir, si se trata de células disociadas, explantes, órganos aislados, el medio de cultivo utilizado. De acuerdo con estas características, la duración del cultivo puede variar desde algunos días hasta meses o años. Por otra parte, y cualquiera que sea el medio que se haya empleado, el recambio adecuado de éste es otro factor también determinante en la viabilidad del cultivo.

El cultivo de tejido nervioso es un cultivo de corta duración. Esto se debe a las limitaciones propias de este tipo de tejido, el cual posee elevados requerimientos metabólicos, más aún, su gran especialización parece haberlo llevado a depender exclusivamente de la provisión extrínseca de los nutrientes. Más aún, el tejido nervioso posee muy baja capacidad de obtener energía a partir de procesos metabólicos anaerobios, lo que lo hace sumamente vulnerable a medios en los que hay baja disponibilidad de oxígeno.

En un trabajo previo desarrollado en este laboratorio (**Jiménez, 1993**), se puso de manifiesto la efectividad que tiene el empleo de solución salina para crustáceos (**Van Harrevel, 1936**), adicionada con aminoácidos (VHA) como medio de cultivo para el tejido nervioso de acocil. Los explantes de este tejido se mantuvieron en buenas condiciones durante un mínimo de 30 días. La solución VHA es un medio simple y definido que no sólo mantiene el equilibrio osmótico de las células sino que las provee de los elementos necesarios para su supervivencia en las precarias condiciones de cultivo.

Con este antecedente, los cultivos lesionados que trabajamos fueron siempre puestos en solución de VHA, e inicialmente seguidos por tiempos de hasta 55 días durante los cuales detectamos su viabilidad (Figura 12).

La viabilidad de los cultivos se basó en la observación de la adhesividad y la refringencia que mostraba el tejido día con día (Tablas 3 a 7). Las células vivas poseen la capacidad de adherirse a distintas superficies, de ahí que también se haya empleado esta propiedad como índice de la sobrevida de una célula o un conjunto de células en un medio de cultivo (**Jiménez, 1993**). Además, como se mencionó en la sección de métodos las cajas de cultivo que se emplearon (Nunc) son pretratadas con cargas negativas, las cuales facilitan la adhesión del tejido a la superficie de contacto. En nuestros experimentos de lesión pudimos comprobar que el criterio de adhesividad no sólo se puede aplicar a las células vivas sino que, de manera relevante, esta propiedad se hace evidente en los cultivos de tejido lesionado ya que las fibras de reconexión que aparecen durante el procesos regenerativo se adhieren a la superficie de contacto y mantienen su organización durante su desarrollo gracias, en buena medida, a que las cargas electrostáticas negativas guían su crecimiento y favorecen su sujeción a la superficie de contacto. Esto significa que en los casos en los que la célula no se adhirió al fondo de la caja, nunca se encontraron procesos regenerativos.

Por otro lado, la falta de refringencia de las células en cultivo es sinónimo de muerte celular. La evidencia de este hecho proviene de la pérdida de la organización que muestran el citoplasma y los organelos que al morir la célula, presentan procesos necróticos. Es en las porciones centrales, principalmente donde se inician los procesos necróticos debido a que son las regiones del cultivo en las que primero falla el aporte de oxígeno a la célula. De hecho, entre mayor es la masa del tejido en cultivo, mayor es el riesgo de aparición de zonas necróticas debido a la dificultad del oxígeno para difundir de manera adecuada (**Jiménez, 1993**)

La sobrevivencia celular de nuestros cultivos se evaluó también mediante el empleo de colorantes vitales como el azul de metileno y la nigrosina. La aplicación de azul de metileno hace que se tiñan sólo las células vivas. Con este colorante es frecuente observar que, de acuerdo con lo que mencionamos en el párrafo anterior, los tejidos u órganos en cultivo muestran mayor intensidad de la coloración en las regiones periféricas que en las centrales (Figuras. 15, 16 y 17). Esta situación se hace más evidente en la figura 17 en la que es evidente la ausencia de coloración principalmente en la región ganglionar lo que es un signo inequívoco de muerte celular. Esta técnica, ha sido implementada por algunos autores (**Hoy, 1969; Kendig, 1967**) en la identificación de los patrones de ramificación de axones motores de acocil durante la regeneración neural.

La aplicación de nigrosina a los tejidos en cultivo es otra prueba de la viabilidad que complementa la del azul de metileno, ya que el colorante no puede penetrar a las células vivas y se queda en el medio que las rodea (Figura 10). Si la nigrosina difunde libremente al interior de la célula, es signo evidente de la muerte de ésta. En la figura 11 se muestra un cultivo de 3 días al que se le aplicó nigrosina. En este caso se pudo comprobar que las células se tiñeron de un tono negro, el cual se mantuvo a pesar de que la preparación se lavó cuidadosamente (**Gurr, 1962**).

Durante las primeras fases de este trabajo pudimos también comprobar que los tejidos lesionados muestran signos de degeneración inmediatamente después de la lesión y que en unas cuantas horas y hasta transcurridos tres días después de la lesión, se lleva a cabo la regeneración. Este hecho, sin embargo, no significaba que el tejido no sobreviviera por más de tres días, simplemente se puso de manifiesto que, en cultivo, el proceso regenerativo no se prolonga más allá de unos cuantos días. Estas observaciones hicieron que limitáramos la duración de los cultivos con el tejido lesionado a no más de 5 días.

Para lograr una supervivencia óptima de los tejidos lesionados, además del factor primordial referente al medio de cultivo empleado (VHA), fue necesario considerar otro no menos importante: la temperatura. Se sabe que el sistema nervioso del acocil, incubado con arsenito a temperatura de 20°C induce la expresión pasajera de diversas proteínas del estrés (**Rochelle y cols., 1991**). En este estudio queda implícito el hecho de que a determinadas temperaturas se genera en las células en cultivo, mediante la síntesis de las

proteínas del estrés, la capacidad de tolerar, adaptarse y sobrevivir a una variedad de situaciones potencialmente destructoras de las células del sistema nervioso central que se generan como resultado de haberlas sometido a condiciones poco adecuadas. Debido a esta situación, en nuestro estudio con los explantes lesionados mantuvimos una temperatura de 27°C la cual, de acuerdo con datos de otros autores (**Bittner y cols., 1974; Seshan y Bittner, 1987**), está muy próxima a la que favorece la formación de brotes de procesos regenerativos en axones motores y sensitivos

Desde muchos años atrás, se ha reconocido la importancia que tienen el tejido conectivo y la glía en los procesos de reconexión característicos de la regeneración nerviosa. En particular, el tejido glial desempeña un papel primordial en estos procesos debido, según se considera, al apoyo trófico que da a las neuronas lesionadas cuyas fibras pierden la capacidad de transportar las sustancias nutritivas. También se ha propuesto que en el tejido lesionado la glía se convierte en una especie de guía de los procesos regenerativos para que éstos alcancen el blanco adecuado (**González del Piégo y cols., 1998**).

Cuando la cadena ganglionar del acocil (entre el tercero y cuarto ganglios abdominales) ha sido lesionada *in situ*, los cambios degenerativos consecutivos a la lesión se expresan, entre otros procesos, con la pérdida de algunos reflejos característicos de algunas conductas estereotipadas de esta especie. El reflejo de enderezamiento y el de flexión de la cola durante la huida, son dos reflejos que desaparecen poco tiempo después que el animal ha sido lesionado en la región mencionada. Algunas semanas después de la lesión, la recuperación de estas conductas resulta evidente. Al hacer la correlación entre los tiempos en los que se expresa la pérdida, primero y la recuperación posterior, de las conductas motoras alteradas como consecuencia de la lesión de la cadena ganglionar, con respecto a los tiempos en los que se llevan a cabo los procesos degenerativo y regenerativo de la cadena lesionada (determinados ambos por la organización estructural de la cadena), se encontró que la glía adaxonal desempeña un papel central en los mecanismos de regeneración nerviosa (**González del Piégo y cols., 1998**).

Tomando en consideración estos antecedentes, quisimos conocer si la regeneración del tejido nervioso de acocil, consecutiva a la lesión *in vitro* de la cadena ganglionar abdominal, se ve influida, como parece suceder en el organismo con lesión de la cadena ganglionar *in situ*, por la cantidad de tejido conectivo presente en la zona de la lesión. **Nordlander y Singer, 1973**, reportaron la presencia de complejos de unión intercelular en células nerviosas y gliales en crecimiento. También se han encontrado hemidesmosomas en nervios en crecimiento, como complejos de unión que aparecen durante el crecimiento y diferenciación, lo que sugiere que se forman sitios de unión entre los procesos gliales y el tejido conectivo, con lo que se facilita el apoyo estructural (**Shivers y Brightman, 1977**). Debido a esta interacción entre células gliales y tejido conectivo, se propone que, entre menor cantidad de conectivo se conserve, las células gliales cumplirían su función de guía y apoyo trófico de manera más adecuada. Evidentemente lo contrario también operaría

ya que cuanto mayor conectivo se deje próximo al sitio de lesión la capacidad de reconexión se reduciría debido a que el tejido conectivo únicamente cumple una función de cicatrización y no permite el crecimiento nervioso (fig. 13 a y b). Fue así que se planearon los cuatro grupos experimentales, los cuales difirieron entre sí fundamentalmente en dos aspectos: la aplicación de colagenasa, sustancia que se caracteriza por su acción enzimática sobre el tejido conectivo, y el grado de lesión que refleja, de alguna manera, la acción mecánica mediante la cual se retira una mayor o menor cantidad de este tejido

En algunos de los casos observados (cultivos Tipos IIa, figura 4 a y b) la participación del tejido conectivo tiene, al parecer un efecto de cicatrización, mientras que en el tipo IIb (figura 5) parece ser un factor determinante en la aparición y número de las fibras de reconexión típicas del proceso de regeneración nerviosa. Sin embargo, en la mayor parte de los cultivos se comprobó que la formación y número de puentes de reconexión que se tienden entre dos extremos de la zona lesionada, es ajena a la presencia de tejido conectivo (cultivos Tipos III y IV, figuras de 6 y 7). Más aún, pudimos observar (fig. 13 a y b)), que el tejido conectivo forma una verdadera barrera que evita que los dos extremos del tejido lesionado puedan volver a comunicarse por medio de los procesos que se producen en la zona proximal de la lesión.

En apoyo a esta misma propuesta pudimos comprobar que en algunas ocasiones no se desarrolló de igual manera el tejido conectivo en los dos muñones (fig. 14) lo que significó que la reconexión entre los dos segmentos afectados por la lesión sólo se produce a partir del muñón en el que el tejido conectivo (parte superior en la figura) no obstaculiza el desarrollo de las fibras nerviosas de reconexión.

En consecuencia, podemos afirmar que, por lo menos en el modelo experimental que trabajamos, no se cumple la premisa de que el tejido conectivo de la vaina, incluida la glía, favorezca la formación de procesos neurales que son la base estructural en la que se sustenta la posibilidad de que el tejido neural lesionado recupere la capacidad funcional perdida a consecuencia de una lesión. Esto se desprende de los resultados presentados, ya que cuanto menor cantidad de tejido conectivo se conservó en el tejido nervioso las posibilidades de regeneración disminuyeron o no se presentaron. Nordlander y Singer (1973) mencionan la presencia de la glía adaxonal compuesta entre varios organelos, por retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, en donde se encuentran embebidos los axones y una glía no adaxonal que junto con el tejido conectivo forma la vaina que envuelve al tejido nervioso.

Algo similar fue propuesto por González del Pliego y cols. (1993) al analizar los efectos de la lesión "in situ" de la cadena ganglionar del acocil en los procesos de degeneración y regeneración en la especie *Procambarus darkii*.

Con la ayuda de la técnica inmunohistoquímica anti-tau que aquí empleamos, pudimos comprobar el carácter nervioso de las fibras de reconexión que se observan en gran número de preparaciones. En particular empleamos esta técnica con los cultivos tipo IV (fig. 17) por ser los que muestran mayor capacidad regenerativa, ya que no ejercimos ningún tipo de manipulación

directa sobre la gúía adaxonal. En efecto, de acuerdo con lo esperado, las fibras que proyectaron de uno a otro sitio de la lesión, reaccionaron ante la presencia de los anticuerpos a la proteína tau, característica de los microtúbulos de las células nerviosas y se tiñeron en color café poniendo de manifiesto que se produjo la correspondiente reacción antígeno-anticuerpo.

Los resultados que presentamos se basan en un análisis cualitativo, debido a que buena parte del trabajo se orientó a determinar la viabilidad de los explantes en el medio propuesto. En cuanto a la reconexión obtenida en cada grupo experimental, sólo se consideró el porcentaje de cultivos de un determinado grupo en los que se encontraron procesos de regeneración en el área lesionada.

CONCLUSIONES

Los métodos utilizados para comprobar la viabilidad de los cultivos, pusieron de manifiesto que los cultivos en los que se encontraron puentes de reconexión, mostraron características de refringencia y adhesividad adecuadas.

En condiciones óptimas, los cultivos de explantes de cadena ganglionar de acocil pueden sobrevivir hasta por 55 días, colocados en solución salina de Van Harreveld adicionada con aminoácidos (VHA); mientras que la regeneración del tejido nervioso lesionado se lleva a cabo durante los tres primeros días después de la lesión.

Los cuatro tipos de cultivo que se manejaron durante el desarrollo de este trabajo fueron suficientes para comparar las diferencias y la importancia del tejido de la vaina conectivo-glial en la aparición de los procesos regenerativos, como se observó en los resultados, al parecer el tejido conectivo funciona como una barrera que evita la formación y crecimiento de procesos de reconexión, es decir, al parecer este tejido tiene como función cicatrizar el área lesionada, cubriendo las fibras y evitando su crecimiento. En la contraparte, en los cultivos en donde se retiró lo más posible el conectivo, se presentaron reconexiones en la mayoría de ellos, posiblemente debido a que, al ya no estar presente el conectivo, la función y el apoyo de la glía adaxonal al tejido nervioso lesionado se facilitó, de tal manera que se formaron puentes de reconexión. Esto lo pudimos comprobar con la utilización de la técnica inmunohistoquímica anti-tau, con la cual estos puentes de reconexión se tiñeron de manera importante, lo que demuestra el carácter de tipo nervioso de las fibras que crecen formando puentes reconexión entre los muñones lesionados.

Por último los cultivos de explantes de tejido nervioso de la cadena ganglionar de acocil *Procambarus clarkii*, son una herramienta adecuada y de relativamente fácil manejo para el estudio de los procesos de regeneración neural.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Aliberts B. Bray D. Lewis J. Raff M. Roberts K. y Watson J. (1996), *Biología molecular de la célula*, 3ª, Omega, Barcelona, 1387 pp.
- 2 Ballinger M. and Bittner G. (1980) Ultrastructural changes at Gap junctions between lesioned crayfish axons. *Cell Tissue Res* 207:143.
- 3 Bittner G. Ballinger ML. And Larimer JL (1973) Degeneration and regeneration in crustacean neuromuscular systems *Amer Zool* 13:379.
- 4 Bittner G. (1974) Crayfish CNS: minimal degenerative-regenerative changes after lesioning. *J Exp Zool* 189:13.
- 5 Bittner G. and Mann D. (1976) Differential survival of isolated portions of crayfish axons *Cell Tissue Research* 169:301.
6. Bittner G (1991) Long-term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *TINS* (14) 5:188.
- 7 Bullock T. Horridge A. (1965), *Structure and function in the nervous systems in vertebrates*, Vol II, W. H. Freeman and Company Ed , Londres, pp 849-861.
- 8 Carlson J G. (1961) The grasshopper neuroblast culture technique and its value in radiobiological studies. *Ann Acad Sci N Y* 95:932.
9. Cooke I, Graf R, Grau S, Haylett B, Meyer D and Ruben P (1991) Crustacean peptidergic neurons in culture show immediate outgrowth in simple medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:402.
10. Cuadras J. (1985) Neuron-glia communicatory structures in crustaceans. *Comp Biochem Physiol* (83) 1:9
11. Cuadras J. (1986) Are glial cells involved in neuron membrane recycling? *J Electron Microsc.*, 34 (4): 419-21.
12. Cuello A C. (1983) *Immunohistochemistry IBRO handbook series: methods in the neurosciences*. vol 3 501pp.
13. Eckert y Randall (1990), *Fisiología animal, mecanismos y adaptaciones*, 3ª, Interamericana Ed., España, 683pp.
14. Fernández H. Burton P. and Samson F. (1971) Axoplasmic transport in the crayfish nerve cord. *J Cell Biol* 51:176.

15. González del Pliego M, Hernández-Falcón J, Aguirre –Benitez E, Gutiérrez-Novoa R, and Fuentes-Pardo B (1998) Ventral nerve cord transection in crayfish a study of functional anatomy. *J. Crustacean Biol.*, 18(3).449.
16. Gorio A, Di Giulio A, and Mantegazza P. (1993) *Pharmacology of neuronal regeneration*. Raven Press Ltd New York 289-311
17. Grover J W (1962) The influence of age and environmental factors on the behaviour of reaggregated embryonic lung cells in culture. *Exp Cell Res* 26:344
18. Gurr E. (1962) *Staining animal tissues Practical and Theoretical*. Londres, Leonard Hill (Books), Limited, 630 pp
19. Ham Arthur (1970), *Tratado de Histología*, 6ª, Interamericana Ed., México, 1025pp.
20. Harrison R G. (1907) Observation on the living developing nerve fibre. *Pro Soc Exp Biol N Y* 4:140.
21. Horuchi E, Hayashi H, and Takahashi I. (1971) A study of the median giant fiber system in the cephalic ganglion of a crayfish (*Procambarus clarkii*). *J Comp Neur* 141: 53-62.
22. Hoy R. (1969) Degeneration and regeneration in abdominal flexor motor neurons in the crayfish. *J Exp Zool* 172:219.
23. Hunt W, and Vélez S. (1982) *Regeneration of specific neuromuscular connections in the crayfish. II Effect of changes in target area*. *J Neurophysiol* (47) 4:666.
24. Jiménez M L. (1993) *Desarrollo de un medio de cultivo para la preservación y supervivencia de tejido nervioso de invertebrado*. Tesis de licenciatura QFB, UNAM, 86 pp.
25. Jones B M. (1965) Inhibitory effect of p-benzoquinone on the aggregation behaviour of embryo-chick fibroblast cells. *Nature Lond* 205:1280.
26. Kendig JJ. (1967) Structure and function in the third abdominal ganglion of the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Zool* 164: 1-20
27. Krenz D. (1990) *Crustacean nerve cells in primary culture*. *Frontiers in crustacean. Neurobiology Advances in life sciences* 509.

- 28 Lasfargues E Y. (1957) Cultivation and behavior *in vitro* of the normal mammary epithelium of the adult mouse *Exp Cell Res* 13:553.
- 29 Nordlander R. and Singer M. (1973) Effects of temperature on the ultrastructure of severed crayfish motor axons. *J Exp Zool* 184:289.
- 30 Polak J and Van Noorden S. (1986), *Immunocytochemistry modern methods and Applications*, 2ª, Wright, 703 pp.
- 31 Rinaldi L M (1958) The isolation of living cells from animal tissues. *Int Rev Cytol* 7:587.
- 32 Ringer S. (1880) Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle *J Physiol* 3:380.
33. Rochelle MJ, Grossfeld RM, Bunting DL, Tytell M, Dwyer BE, And Xue Z. (1991) Stress protein synthesis by crayfish CNS tissue *in vitro*. *Neur Research* 16 (5): 533-42.
34. Scott B. (1993) *Axonal dynamics and regeneration*. Raven Press Std New York 7-26.
35. Seshan K. and Bittner G. (1987) Developmental and other factors affecting regeneration of crayfish CNS axons. *J comp neurology* 262:535.
- 36 Sheffer R. Balinger M. and Bittner G. (1991) Long-term survival of severed crayfish giant axons is not associated with an incorporation of glial nuclei into axoplasm. *Neuroscience Lett* 133:113.
- 37 Simms H and Stillman N. (1937) Substances affecting adult tissue *in vitro*. *J gen Physiol* 20:603.
38. Shivers RR, Brightman MW. (1977) Formation of Hemi-desmosomes during regeneration of crayfish nerve root sheath as studied with freeze-fracture. *J Comp Neur* 173: 1-22
39. Sobel H. (1958) The behaviour *in vitro* of dissociated embryonic pituitary tissue. *J Embryol Exp Morph* 6:518.
40. Tanner S, Storm E. and Bittner G. (1995) Maintenance and degradation of proteins in intact and severed axons: implications for the mechanism of long-term survival of anucleated crayfish axons. *J Neurosci* (1) 15:540.
41. Tashiro T. and Komiya Y. (1991) Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. *J Neurochem* 56:1557.

- 42 Van Harreveld A. (1936) A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc Soc Exp Biol Med B34: 428.
43. Viancour T. (1990) Organelle flux in intact and transected crayfish giant axons Brain Res 595:176.
- 44 Wolf G. (1976), Neurobiología, principios básicos de psicofisiología, H. Blume Ed., Madrid, España, 160 pp.