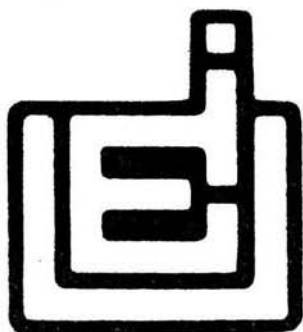


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala



"Efecto de la Clorpromacina sobre la Adhesividad
de Glioblastos en Cultivo"

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a
Ma. Dolores Araceli Espinosa de los Monteros Basulto

San Juan Iztacala

México, 1981



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.



ASOCIACIÓN NACIONAL DE ESCUELAS
PROFESIONALES DE MÉXICO

A mis padres y hermanos, con el
cariño y respeto que me merecen.

A mis familiares.

A mis amigos.

Al Dr. Victor Alemán A., a quien deseo
expresarle mi agradecimiento por su -
apoyo continuo durante la realización
de esta tesis.

A todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

INTRODUCCION

La adhesividad celular es una propiedad fundamental de la célula, la cual interviene en procesos de desarrollo, tales como migración celular durante la embriogénesis y morfogénesis en respuesta a matrices particulares extracelulares; interviene en procesos homeostáticos tales como estabilidad de tejidos y órganos, trombosis, inflamación y reparación de heridas.

La adhesividad celular también interviene en la patología de algunas enfermedades como el comportamiento invasivo y metastático de células malignas, así como en el funcionamiento de las plaquetas y leucocitos.

Se han caracterizado dos tipos de estudio sobre la adhesividad celular: adhesión célula-célula y la adhesión de la célula al sustrato extracelular. (fig 1).

El presente trabajo es concerniente al segundo fenómeno, realizado en células astrogliales.

Se han reportado estudios realizados en células epiteliales y fibroblastos, los cuales muestran algunos aspectos del fenómeno de la adhesividad celular y algunos de estos estudios revelan que hay mecanismos que son comunes en ambos sistemas.

El desarrollo técnico del cultivo de células, ha adquirido

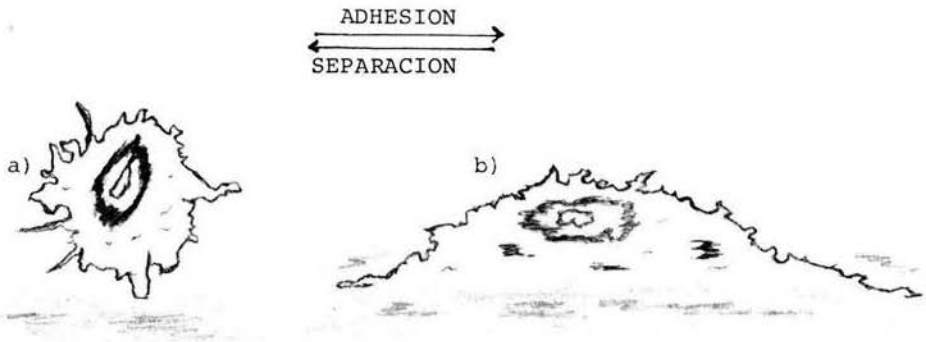


Figura 1.- Adhesividad celular al sustrato.
Esquema de dos estados morfológicos celulares: a) Célula no adherida; b) Célula adherida al sustrato.

ruido gran importancia, pues representa un buen modelo que facilita el estudio tanto de aspectos morfológicos como - bioquímicos de poblaciones celulares, homogéneas y especí_ ficas.

MORFOLOGIA CELULAR

En las células que se cultivan existen estados morfoló_ gicos cambiantes y ello depende al menos en parte de la rela_ ción que existe entre la célula y el sustrato, así como del tipo de célula del que se trate.

En las células que se cultivan en monocapa (como fibro_ blastos y epiteliales), se encuentran principalmente dos con_ formaciones diferentes: esféricos y polarizados (Grinnell, 1976). Los estados esféricos en buena proporción son carac_ terísticos de cé_ lulas que todavía no se han adherido al sus_ trato, o bien células adheridas que van a sufrir el proceso de división; normalmente cuando dichas células se fijan al sustrato adecuado, adquieren gradualmente la forma polariza_ da, aplanada y extendida. Las células en estas condiciones, presentan dos zonas estructurales diferentes:

a) Zona central o endoplasma, en la cual se encuentran el núcleo y los organelos celulares.

b) Citoplasma lamelar, o lameloplasma, que es la zona - periférica en la cual no se encuentran organelos y es la zona en que se localizan los sitios de adhesión con el sustrato,

(Vasiliev y Gelfand 1976a). Las células antes de aplanarse tienen periferia circular y el lameloplasma presenta forma de anillo alrededor del endoplasma. En las células aplanadas que inician el extendimiento, el lameloplasma pierde la apariencia de anillo antes mencionada para dividirse en varias áreas o "compartimientos" discretas, localizadas en la periferia de la célula.

La porción de la célula que hasta ahora se ha considerado que juega un papel importante en la transición de la célula de un estado morfológico a otro que se ha denominado "capa cortical submembranal", (Vasiliev y Gelfand, 1976). En esta porción de la célula otros autores han reportado que se encuentran estructuras a las que han denominado citoesqueleto. (Lazarides E. 1975).

La capa cortical es una "zona" localizada inmediatamente por debajo de la membrana celular, de 0.1 - 0.5 μ m de espesor y puede observarse en toda el área celular, pero particularmente forma parte de la estructura pseudópodos y del lameloplasma celular. En dicha capa cortical las estructuras observadas con mayor frecuencia son las llamadas microfilamentos de 4 a 7 nm. de diámetro. Estos filamentos contienen actina polimerizada

(Lazarides y Weber, 1974; Lazarides 1975; Pollack et al, 1975).

Cuando las células son observadas al microscopio electrónico, se encuentra que la mayor parte de actina polimerizada se localiza en la capa cortical de células en cultivo (Buckley y Porter, 1967; Goldman et al., 1975).

Grandes cantidades de actina se han encontrado tanto - en células musculares y no musculares (Weber, et al., 1974). Se ha observado (Spooner et al., 1971; Wessels, et al., -- 1973), que los microfilamentos de actina presentan dos tipos de configuraciones en la capa cortical:

a) Una matriz tridimensional de microfilamentos sin un patrón regular visible, resultando imposible distinguir microfilamentos individuales.

b) Paquetes de microfilamentos paralelos, los cuales - se localizan en otras áreas de la célula (cerca a la periferia), y es posible observarlos por inmunofluorescencia indirecta, una técnica descrita por Lazarides (1975a). Con dicha técnica, los microfilamentos se ven como fibras tensas en la célula (Buckley y Porter 1967; Goldman, 1975), localizándose dichos microfilamentos en la zona o "estructura de adhesión" que forman los pseudópodos cuando las células se encuentran en contacto con el sustrato.

La estructura cortical que contiene los microfilamentos de actina provee suficiente estabilidad mecánica a la célula y al mismo tiempo le permite moverse y cambiar de forma, por lo que se considera que los microfilamentos organizados son responsables de formar una estructura celular con capacidad plástica para generar los cambios de forma y movimiento. (Grinnell, 1976).

El mayor componente de los microfilamentos citoplásmicos están constituidos por actina y posiblemente la miosina provee la energía necesaria para los eventos de movilidad celular. Así se ha reportado que el citoesqueleto provee las bases mecanoquímicas de muchas actividades celulares como son: la motilidad cuando la célula se adhiere a sustratos sólidos, fagocitosis, procesos de secreción, división celular y posiblemente interviene en la regulación topográfica de la membrana celular en la redistribución de las proteínas y las interconexiones funcionales de la membrana con el núcleo, (Weihing, RR., 1976).

En estudios recientes de microscopía de interferencia efectuados en fibroblastos, se ha observado que las fibras de tensión formadas por actina (Goldman, 1975), se encuen-

tran en relación directa con el patrón de adhesión (Koltcher y Weber, 1978; Andrew, Badley et al., 1980), observándose que cada estructura de adhesión se encuentra relacionada con al menos una fibra de tensión. (Koltcher y Weber, 1980).

Las principales estructuras de adhesión que se forman cuando la célula entra en contacto con el sustrato, se han denominado en base a su dimensión y forma: (fig 2)

Microespículas, que son procesos cilíndricos o cónicos de 0.4 a 0.5 μm de diámetro.

Microvilli, que son procesos de menor diámetro, de 0.1 - 0.2 μm .

Filopodios, que son extensiones con diámetro intermedio entre los dos anteriores con longitud de 10 a 20 μm .

Lamelipodios, son extensiones aplanadas, usualmente de 0.1 a 0.5 μm ., de ancho cuando se encuentran en la periferia celular, las extensiones citoplásmicas que se encuentran en la cara superior de la célula, se denominan rufles.

Blebs, (burbujas), son estructuras con forma esférica o semiesférica de 1.0 a 2.0 μm ., de diámetro.

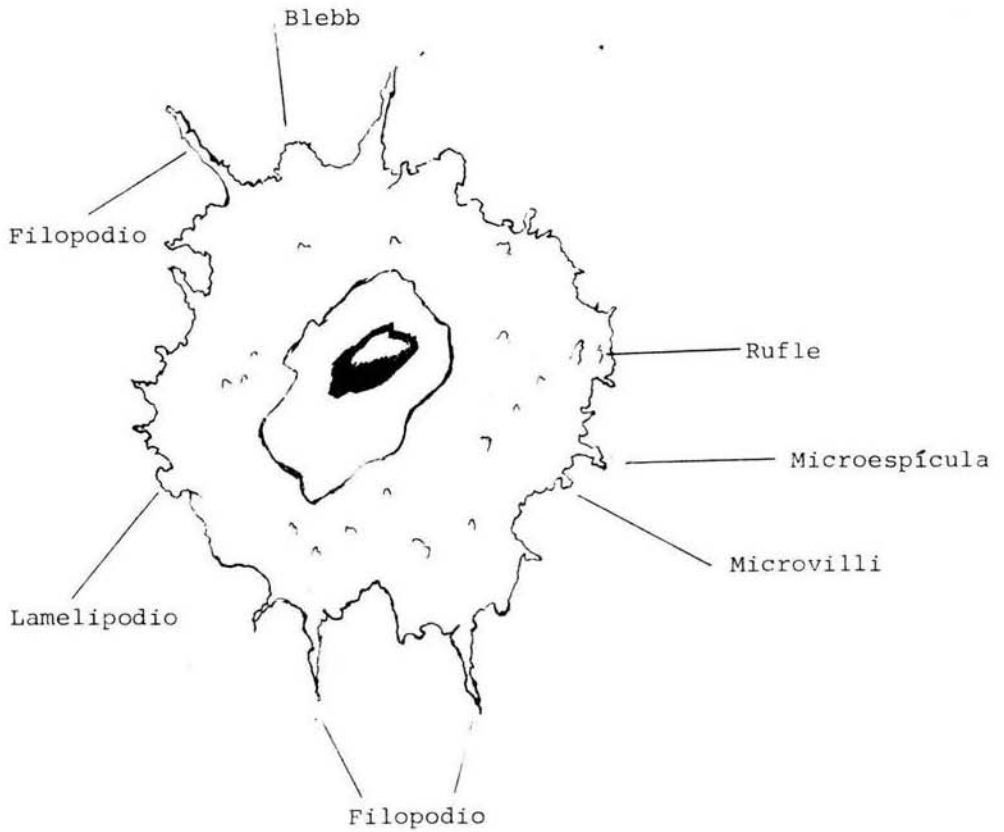


Figura 2.- Esquema de diferentes tipos de micro_ extensiones citoplásmicas.

ADHESIVIDAD CELULAR AL SUSTRATO

La adhesividad celular es una propiedad de la célula, (Grinnell, 1976a), y es un fenómeno que se presente tanto in-vivo en los tejidos de animales multicelulares, como in-vitro en células en cultivo.

El fenómeno de adhesividad celular es un proceso dinámico en el cual hay una secuencia de eventos tales como: contacto inicial con el sustrato, reorganización de las proteínas de superficie las cuales migran a una zona determinada de la célula, (capping), (Rayan et al., 1974), aplanamiento celular y formación de microextensiones citoplásmicas que forman a su vez los enlaces de adhesión, el núcleo se hace visible, y la célula pierde su forma redondeada, adquiriendo una forma asteroidea o polarizada, por último, la célula alcanza un estado de equilibrio y su morfología es de acuerdo al número y organización final de los enlaces de adhesión, (Grinnell, 1976a) así como la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, (Vasiliev y Gelfand, 1976).

Las células que se cultivan en monocapa, requieren la adhesión al sustrato, lo que les permite continuar su crecimiento y diferenciación normal, (Stocker et al., 1968).

Estudios realizados en células que se cultivan en mo-

nocapa, tales como células epiteliales y fibroblastos - - muestran que éstas se adhieren a una gran variedad de sustratos incluyendo vidrio, varios plásticos, metales, colágena, etc.; sin embargo, el grado de adhesión y extensión final varía según el sustrato utilizado, (Weiss, 1961, -- 1962m Rosemberg y Margolis, 1973). Resultados semejantes se han observado en axones elongados (P.A. Weiss, 1945; - Dunn, 1973, Ebhendam, 1976; Cooper et al., 1976).

Existen factores que afectan la adhesividad y son - de tipo físico, fisicoquímico y biológicos, y éstos son - capaces de afectar el aplanamiento y extendimiento celular (Grinnell, 1976; Elsdale y Bard 1972). Entre los factores biológicos se encuentran los microexudados celulares - (elaborados por las propias células en cultivo) (Rosemberg, 1960). Estos microexudados contienen glicoproteínas, proteínas análogas a la miosina, proteínas semejantes a la actina, y una proteína de alto peso molecular llamada LETS - (Vasiliev, Vaheri y Rouslati, 1975; Yamada y Patsan, 1977). Por otra parte, se han encontrado que factores aislados del medio de cultivo, promueven el extendimiento celular una vez que la célula se ha adherido al sustrato, (Takeichi, 1973; - Yasuda, 1974; Millis y Hoyle, 1978).

Estudios realizados en células epiteliales y fibroblastos, revelan que durante la adhesión y extendimiento celu--

lar es cuando la célula excreta los microexudados (Maslow y Weiss, 1972).

Por otra parte, se ha encontrado que el suero es uno de los componentes más importantes del medio de cultivo, - el cual interviene en el extendimiento celular (Yamada y Patsan, 1977), lo anterior se ha probado en líneas celulares las cuales requieren de la presencia de suero para adherirse y extenderse sobre el sustrato (Grinnell y K. Feld, 1979).

Dentro de los factores físicos que pueden afectar la adhesión y el extendimiento celular, se encuentran el tipo de sustrato, humedad y temperatura, pues se ha encontrado - que la adhesión celular puede ser inhibida por bajas temperaturas. Así, las células incubadas a 4°C., no presentan adhesión al sustrato (Moscona, 1961); en base a lo anterior y tomando en cuenta que en presencia de inhibidores de glicólisis y de fosforilación oxidativa la adhesión celular se ve inhibida, se ha propuesto que se trata de un fenómeno dependiente de energía, (Michaelis y Delgrano, 1971; Juliano y Gagaland, 1977; Nath y Srere, 1977). Otra base para decir lo anterior es que se inhibe la formación de extensiones citoplásmicas (Albrecht-Buheler y Lancaster, 1976). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que en células incubadas a 4°C. aumente la rigidez de la membrana como consecuencia

de una transición de la fase lipídica (Ueda et al., -- 1976).

Entre los factores fisicoquímicos que afectan la adhesividad celular se encuentra el porcentaje de CO_2 , la concentración de iones contenida en el medio de cultivo, pues se ha encontrado que la presencia de calcio y magnesio es esencial para el extendimiento celular (Grinnell 1976b, 1976c).

Muchos agentes que bloquean los grupos sulfhidrilo, son efectivos para inhibir la adhesividad celular al sustrato, (Grinnel y Srere, 1971). Existen otros grupos de agentes entre los que se encuentran alquilantes, arsenicales, mercuriales y otros, (Marrouandas, 1975; Juliano y Gagaland, 1977), también inhiben la adhesividad.

Entre otros inhibidores de la adhesividad celular, se encuentran las citocalacinas, las cuales se sabe que impiden el movimiento de las microestensiones celulares (Allison, 1973).

Otras sustancias entre las que se encuentran anestésicos locales y tranquilizantes tales como procaína, clorpromacina, promacina, xilocaína, pantocaína, etcétera, también inhiben la adhesividad celular al sustrato cuando se agregan al medio de cultivo, (Rabinowitz y DeStefano, -- 1973 a, 1975). Esta inhibición no es reversible, aún cuan

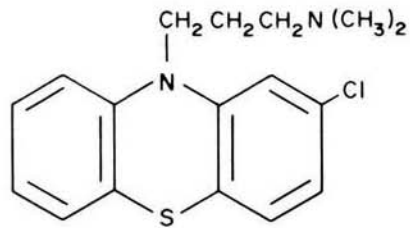
do las células reciban presión por centrifugación hacia el sustrato (Grinnell, 1974a). Se ha reportado que estos agentes inhiben el "capping", (Rayan et al, 1974) y que es posible que afecten la estructura de los microfilamentos, (Nicholson, et al., 1976a). Estas drogas también han sido probadas para el despegamiento celular de fibroblastos de la caja de cultivo, (Rabinovitz, 1974; 1975).

Otros estudios realizados en células ganglionales de embrión de pollo con clorpromacina, indican que hay una desaparición parcial de microtúbulos citoplásmicos, con un concomitante aumento de microfilamentos, (Johan Wiberg, et al., 1977).

En el laboratorio, se ha probado el efecto de los fármacos antes mencionados, sobre el despegamiento de células gliales en cultivo, encontrándose que la clorpromacina (fig 3) en una concentración de $50\mu\text{M}$, produce un despegamiento celular adecuado, evitando la agregación celular después del despegamiento y permitiendo la conservación del mismo grado de viabilidad celular.

Debido a las características antes mencionadas, se eligió la clorpromacina para la realización del presente trabajo.

Se propone estudiar el efecto de la clorpromacina sobre el fenómeno de adhesividad al sustrato de glioblastos en cultivo.



CHLOROPROMAZINE

2 cloro-10 (3-dimethylaminopropyl)-phenothiazine

Figura 3.- Fórmula de la Clorpromacina.

Para facilitar dicho estudio, y en base a observaciones microscópicas previas, dividiré el fenómeno de adhesividad el sustrato en las siguientes etapas: (fig 4).

a) Asentamiento o contacto celular, es cuando la célula establece el primer contacto con su sustrato.

b) Extendimiento celular, que consiste en la formación de prolongaciones celulares al principio cortas y después de mayor longitud, tendiendo la célula a aplanarse.

c) Anclaje, es la etapa en que la célula alcanza un equilibrio o pseudoequilibrio en la organización de los -enlaces de adhesión entre la célula y el sustrato, adquiriendo un forma determinada y estable y es una etapa cuando posiblemente se produce la reorganización de los microfilamentos.

OBJETIVOS:

En base a lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

- I. Estudiar el efecto de la clorpromacina sobre el fenómeno de adhesividad celular al sustrato.
- II. Estudiar en qué etapa o etapas el fenómeno - de adhesividad actúa el fármaco.

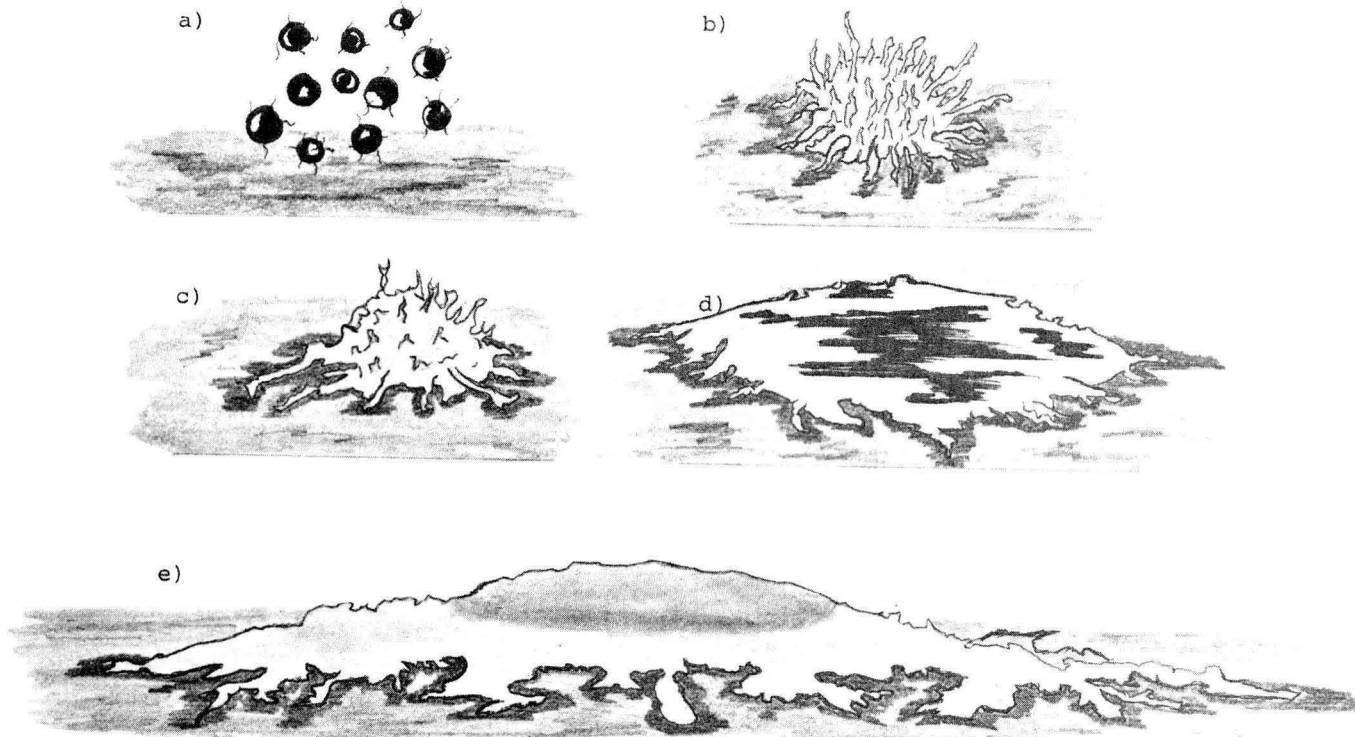


Figura 4.- Esquema de las etapas de la adhesividad celular al sustrato:
a) células en suspensión; b) células en contacto inicial con el sustrato; c) formación de microextensiones citoplásmicas; d) estendimiento celular; e) anclaje celular.

III. Estudiar los aspectos generales sobre el posible mecanismo de acción de la clorpromacina.

MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas Wistar-Porton de cinco días de edad con alimentación ad-libitum.

MATERIAL PARA CULTIVO

Medio Esencial Mínimo de Eagle, en polvo, (MEM, - cat. 410-1400, GIBCO, Grans Island, New York. U.S.A.).

Solución de aminoácidos no esenciales, (MEM-nonesesential amino acids, cat. 320-1140 GIBCO, U.S.A.).

Suero Bovino Fetal, en suspensión, (Fetal Bovine - Serum Mycoplasma Tested, cat. 200-6140 GIBCO, U.S.A.).

Trypsina 1:250, de páncreas de cerdo, cat. 103139, ICN Pharmaceuticals, Cleveland, Ohio, U.S.A.

β /D (+) Glucosa, anhidra, P. Molecular 180.2 (Sigma Chemical Company), St. Louis Mo., U.S.A.

Penicilina G. cristalina potásica, 1 000 000 U.I. - (Squibb).

Sulfato de Estreptomicina anhidra, P. Molecular, -
1457. Sigma Chemical Company, St. Louis Mo., U.S.A.

Cajas de plástico para cultivo en monocapa de 8cm.
de diámetro, cat. 3003, (Falcon Plastics, Oxnard, Ca. -
U.S.A.

Cajas de plástico para cultivo en monocapa de 3cm.
de diámetro, cat. 3001, (Falcon Plastics).

Bicarbonato de Sodio, P. Molecular 84.0 (Sigma --
Chem. Company, St. Louis Mo., U.S.A.)

COLORANTES

Azul de tripán, Sigma Chemical Company.

Violeta Cristal, Sigma Chemical Company.

REACTIVOS.

Clorpromacina P. Molecular 355.3 (Sigma Chemical -
Company).

Acido Etilendiamino tetracético (EDTA), P. Molecular
336.2 (Sigma Chemical Company).

Etilenglicol bis-B-eter aminoetílico (Sigma Chemical company).

Solución de(PBS), sol. reguladora de fosfatos. (preparada en el laboratorio.

EQUIPO

Centrífuga clínica MSE, (USA).

Incubadora Hotpak, (Phyla, P. A. USA.)

Espectrofotómetro, (Ziess).

Fotomicroscopio invertido de contraste de fases (Ziess- Alemania).

Microscopio estereoscopico, (Ziess- Alemania).

Micrómetro (ziess- Alemania).

Microscopio Electrónico JEOL, (Japón).

Cámara Neubauer, Bright-Line, (USA).

METODOS

CULTIVO CELULAR PRIMARIO

Se trabajó con cerebro de ratas de cinco días de edad, en condiciones de esterilidad. Se decapitan las ratas con tijera aproximadamente a nivel de la tercera vértebra cervical. Las cabezas se ponen en un vaso conteniendo alcohol al 70%, se lavan rápidamente dos veces con esta solución, y después se lavan dos veces con benzal al 20% y dos veces más con solución salina isotónica a 37°C.

Con pinzas finas se eliminan las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Todo el proceso de disección se realiza a temperatura ambiente, en un tiempo de aproximadamente 4-5 minutos por cerebro.

Cada vez que se sembraron células, se trabajó con tres cerebros, a los cuales se les agregó 10 ml., de solución de MEM (Medio de cultivo esencial mínimo, con glucosa al .4%) y tripsina al .05%, los cerebros se fragmentan con tijera - fian en cortes de aproximadamente 2mm., se incuba esta mezcla durante 20 minutos a 37°C. y 90 oscilaciones por minuto en un baño de agitación.

Las células son transferidas con una pipeta pasteur a un tubo cónico de 50 ml., con tapón de rosca, el cual contiene 1 ml. de suero bovino fetal (SBF), se centrifuga a 60 x g

durante 7 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante se decanta y se agraga cuidadosamente por cada tres cerebros, 12 mililitros de MEM conteniendo glucosa al 0.4% y suero bovino fetal al 15%, a 37°C, - las células se resuspenden suavemente con una jeringa desechable y aguja del núm. 18 y esta suspensión se pasa por un filtro de seda con malla de poro de 145 micras. El filtro se lava con dos mililitros más del mismo medio en el que se resuspendieron las células. Esta suspensión celular se vuelve a centrifugar a 60 x g, el sobredante se decanta y la pastilla celular resultante se resuspende suavemente a 37°C en una solución reguladora de fosfatos (PBS), conteniendo 0.9 M. de sacarosa, se centrifuga a 60 x g, durante seis minutos.

El sobredante se retira cuidadosamente con una pipeta pasteur, la pastilla se resuspende en 100 ml. de MEM'S al 15% a 37°C y se siembre en cajas de plástico (Falcon) de 10 cm. de diámetro, agragando diez ml. de suspensión celular a cada caja. Las células sembradas se mantienen en una incubadora Hotpack a 37°C, en presencia de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 hrs. de haberse sembrado las células, se elimina el medio de cultivo por succión con aguja y se vuelve a agregar MEM'S al 15%, 10 ml. por caja. A partir de este momento el cambio de medio se efectúa cada tercer día. En estas condiciones las células alcanzan confluencia a los seis días de cultivo.

CULTIVO SECUNDARIO

Se toma una caja de células en confluencia (de cultivo primario, de seis días de edad), se retira el medio de cultivo por succión, se agregan cinco mililitros de una solución de MEMG, a 37°C conteniendo tripsina al 0.05%, se incuba durante siete minutos a la misma temperatura (en la incubadora), al término de este tiempo, las células se despegan suavemente con un gendarme y se transfieren con una pipeta pasteur a un tubo cónico con tapón de rosca, el cual contiene 10 mililitros de MEM'S al 15% para detener la reacción enzimática, después las células se centrifugan durante seis minutos a 600 x g, se decanta el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspende en el medio de incubación (el cual varía de acuerdo al experimento que se va a realizar), antes de la resiembra, la suspensión celular se pasa por una malla de 145 micras, ésto es con el fin de que las células queden disgregadas y uniformemente suspendidas, (sin grumos).

La resiembra se efectúa inmediatamente después del filtrado para evitar la formación de agregados en la suspensión.

DETERMINACION DEL PORCIENTO DE CELULAS LIBRES Y ADHERIDAS

Para la cuantificación del porcentaje de células libres y adheridas se utilizaron tanto método de conteo directo co-

mo el método de conteo indirecto, en ambos se utiliza el -
microscopio de contraste de fases. También en algunos ca-
sos se usó el método turbidométrico descrito por Grinnell,
(1976a,b,).

Conteo Directo

En este método antes de sembrar las células en cajas
Falcón con cuadrícula se marcan campos y al término del
tiempo de incubación, se cuentan directamente las células
adheridas por cada campo y después se hace un promedio de
contenido de células en los campos contados. El conteo de
las células se efectuó en un microscopio invertido de con-
traste de fases.

Conteo indirecto.

En este caso el conteo se realiza en una cámara cuen-
ta glóbulos, utilizando microscopio de contraste de fases
en la siguiente forma:

Una vez que se han fijado las células con formol al -
4%, con una pipeta pasteur se recoge el sobrenadante de --
las cajas de cultivo, el cual contiene las células no adhe-
ridas y se pone en tubos cónicos de vidrio siliconizados,
después con un gendarme se despegan las células adheridas
y se resuspenden en 0.5 ml. de formol al 4%, se recogen con

una pipeta pasteur, colocándose también en tubos siliconizados.

Cada tubo, (sobrenadante y adheridas), se cuenta por seis veces y se obtiene el promedio de estos datos.

Método Turbidimétrico. (Grinnell, 1976)

Al término de cada experimento las cajas son agitadas a 150 oscilaciones por minuto a temperatura ambiente durante 10 seg., las células que son resuspendidas por este procedimiento se consideran no adheridas y se retiran cuidadosamente con una pipeta pasteur y se colocan en tubos de vidrio cónicos siliconizados. Las células que permanecieron adheridas se despegan con un gendarme y se resuspenden en 1 ml. de solución reguladora de fosfatos (PBS), a 37°C. Estas últimas se transfieren a un tubo de vidrio siliconizado; las células no adheridas, se centrifugan durante 5 min., a 60 x g, se decanta el sobrenadante, y la pastilla se resuspende en 2ml, de PBS y se vuelve a centrifugar en la misma forma, posteriormente el paquete celular es resuspendido a razón de 1 ml. por tubo. Cada tubo, tanto los que contienen las células adheridas como los que contienen las células no adheridas es leído en un espectrofotómetro a 640 nm, dos veces. La concentración celular se calcula obteniendo el número total de células adheridas y no adheridas.

ADHESIVIDAD CELULAR.

Efecto de la Clorpromacina Sobre el Fenómeno de Adhesividad Celular al Sustrato.

En cajas Falcón de 5.5 cm. de diámetro se agregan - 2.5 ml. de MEM'S 15%, y se equilibran durante 1 hora en la incubadora, después a partir de un cultivo primario se obtiene la suspensión celular en la forma antes descrita. Se agrega 0.5 ml. de esta suspensión celular a cada caja y al mismo tiempo las cajas que se incubarán con clorpromacina se preparan con las siguientes concentraciones fi-nales: 0.0, 25.0, 50.0, y 100.0 M.

Las células se incuban durante dos horas en la incubadora a 37°C en presencia de CO₂ y humedad a saturación. - Al término del tiempo de incubación se cuantifica el porcentage de células adheridas y no adheridas por el método turbidimétrico previamente descrito.

Efecto de la Clorpromacina Sobre la Adhesividad Celular al Sustrato con Respecto al Tiempo.

A cajas de petri Falcon de 5.5 cm. de diámetro conteniendo 2.5 ml. de MEM'S 15%, previamente equilibradas durante una hora en la incubadora, se les agregó 0.5 ml. de sus-

pensión celular a un volúmen final de 3 ml., se usaron cajas controles y cajas con clorpromacina a las cuales se les agregó CPC, en una solución de 100 mM. a una concentración final de 50 M. Estas cajas se incuban en condiciones estandard de humedad, temperatura y CO₂, en los siguientes tiempos: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 min.

Al término del tiempo de incubación las cajas se agitan durante 10 seg. a temperatura ambiente, e inmediatamente después se agrega 0.25 ml. de formaldehído, lo que da una concentración final de formol al 4%. Se dejan las células con el fijador dos horas y después se cuantifica el porcentaje de células adheridas y no adheridas por el método turbidimétrico.

Efecto de Agentes Quelantes Sobre el Fenómeno de Adhesividad Celular al Sustrato Con y Sin Clorpromacina.

Cajas Falcon de 5.5 cm. de diámetro ctneniendo 2.5 ml. de MEM'S 15% se equilibran durante una hora en la incubadora, después se agrega 0.5 ml de la suspensión celular y el agente quelante a las siguientes concentraciones finales:
0.0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0 mM de EGTA
0.0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 de EDTA

Al mismo tiempo se pone otro lote de cajas en presencia de clorpromacina 50 M y las mismas concentraciones de EDTA y EGTA.

Las células se incuban en condiciones estandar, durante dos horas, al concluir este tiempo, se procede a la cuantificación del porciento de células adheridas y no -- adheridas por el método turbidimétrico.

Efecto de Iones Calcio Sobre la Adhesividad de Glioblastos al Sustrato en Presencia y Ausencia de Clorpromacina.

Las cajas de petri Falcon de 5.5 cm. de diámetro conteniendo 2.5 ml de MEM'S 15%, se equilibran durante una hora en condiciones estandar, después se agrega 0.5 ml de la suspensión celular y el CaCl_2 a las concentraciones finales que a continuación se indican: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 mM.

Otro lote de cajas se prepara al mismo tiempo con los Iones Calcio en las mismas concentraciones y se les agrega clorpromacina 50 M.

Todas las cajas se incuban durante dos horas a 37°C con CO_2 al 10% y humedad a saturación.

Al término de dicho tiempo se procede a cuantificar el porcentaje de células libres y adheridas, por el método turbidimétrico.

Efecto de la Temperatura Sobre la Adhesividad de Glioblastos Tratados y no tratados con Clorpromacina.

Las células en suspensión se siembran en MEM'S 15% en cajas Falcon de 5.5. cm de diámetro con CO₂ al 10% y humedad a saturación, inmediatamente después de la siembra, se preincuban estas cajas con las células durante - 10 minutos a las siguientes temperaturas: 5, 10. 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C.

Una vez que han transcurrido los 10 minutos a la temperatura indicada, todas las cajas se incuban a 37°C en - condiciones estandard durante dos horas.

Las células que llevan clorpromacina se les añadió a una concentración final de 50 μ M.

Al término del tiempo de incubación a 37°C se cuantifica el porcentaje de células adheridas y no adheridas por el método turbidimétrico.

ASENTAMIENTO O CONTACTO CELULAR

Para conocer el efecto de diferentes medios de incubación sobre este fenómeno, se efectuaron experimentos de 0 a 40 minutos en la siguiente forma:

Se obtiene una suspensión celular a partir de células de cultivo primario, en la misma forma que para los experimentos de adhesividad celular al sustrato, se hace un cultivo secundario, de las células en cajas Falcon de 3 cm de diámetro, con los siguientes medios de incubación:

MEM'S 15%
MEM'S 15% y Clorpromacina 50 μ M
MEM G
MEM G y Clorpromacina 50 μ M
MEM'S 15% (con suero dializado)
MEM'S 15% (con suero dializado) y Clorpromacina
50 μ M.

Los tiempos de incubación para cada medio de cultivo - fueron de: 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 25 y 40 minutos.

Al cumplirse el tiempo de incubación en cada caso, las cajas se agitan 10 seg a 150 oscilaciones por minuto y se - agrega formol a una concentración final de 4%.

Las células se dejan en el fijador dos horas, al térmi no de este tiempo se recoge cuidadosamente el sobrenadante y se pasa a tubos de centrifuga siliconizados, se decanta y resuspende la pastilla en 0.2 ml de la solución de formol al 4%. A las células adheridas se les añado 0.2 ml de la solu- ción fijadora, y se despegan con un gendarme, cada muestra - de células tanto del sobrenadante como de las cédulas adhe^{ri} das se cuentan seis veces en el hematocitómetro, el porcenta je se saca con la media de estos datos.

EXTENDIMIENTO CELULAR

Para conocer el efecto de diferentes medios de incuba- ción sobre el fenómeno de extendimiento celular, se efectua ron experimentos de 0 a 40 min en la siguiente forma:

Cajas Falcon de 2.5 cm de diámetro se equilibran duran te dos horas con 1.8 ml del medio de cultivo correspondiente.

Los medios de incubación utilizados fueron:

MEM'S 15%

MEM'S 15% y Clorpromacina 50 μ M

MEM'S 15% y EGTA 500 μ M

MEM'S 15%, EGTA 500 μ M y Clorpromacina 50 μ M

Una vez concluido el tiempo de equilibrio del medio de cultivo en las cajas, se obtiene la suspensión celular en la forma previamente descrita y se siembra 0.2 ml de ésta en cada caja de cultivo, se incuba a 37°C, en presencia de CO₂ y humedad a saturación durante los siguientes tiempos para cada medio: 2.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y - 40 minutos.

Al término del tiempo de incubación se agitan las cajas durante 10 seg, a 150 oscilaicones por minuto a temperatura ambiente, se agrega el formol al 4% y se dejan con el fijador durante dos horas, posteriormente se observan al microscopio de contraste de fases, después se agrega 0.5 ml de una solución violeta cristal al 5% y se espera 15 minutos para que se tiña el núcleo de las células, depsués se - lava con 1.5 ml de PBS, el exceso de colorante y se agrega nuevamente 1 ml de la solución de PBS.

Una vez teñido el núcleo, se obtiene la relación núcleo citoplasma de las células, observándose al microscopio invertido en contraste de fases y con ayuda de un micrómetro se -

obtienen los siguientes datos:

Diámetro total de la célula

Diámetro del núcleo

Forma de la célula (y otros detalles*)

Una vez observadas dichas características se saca el porcentaje de células adheridas con el método de conteo directo con la ayuda del microscopio de contraste de fases, ya previamente descrito.

DESPEGAMIENTO CELULAR (ANCLAJE)

Para todos los experimentos de despegamiento celular se trabajó con células de cultivo secundario de 48 horas de edad, no confluentes, en cajas Falcon de 5.5 cm de diámetro con MEM'S 15% y en presencia de CO₂ y humedad a saturación.

Al término de este tiempo, el medio de las cajas se quita por succión, se lava la caja dos veces con una solución reguladora de fosfatos pH 7.3 a 37°C, después se añaden 3 ml de MEM'S 15% a 37°C, y la sustancia con la que se trabajará, (quelante CPC, etc.).

Efecto de la Clorpromacina sobre el Despegamiento Celular

Una vez lavadas las cajas de cultivo secundario de 48 horas de edad, se agregaron 3 ml de MEM'S al 15% y se hicieron dos lotes de cajas, las que sólo llevan el medio de culti

tivo y las que llevan la clorpromacina en las siguientes concentraciones: 0, 25, 50 y 100 μ M

Todas las cajas se incuban durante dos horas a 37°C, en condiciones estandard.

Una vez cumplidas las dos horas de incubación, se agitan las cajas a 150 oscilaciones por minuto, durante 10 segundos y se efectúa la cuantificación del porcentaje de células adheridas y no adheridas al sustrato por el método turbidimétrico.

Efecto de EDTA y EGTA Sobre Despagamiento Celular Con y Sin Clorpromacina.

Una vez lavadas las cajas de cultivo secundario de 48 - horas de edad, (células no confluentes), se agregan 3 ml de medio de cultivo MEM'S 15% y el agente quelante a una concentración de: 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.1 y 4 mM de EGTA y 0, - - 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 y 8 mM de EDTA.

Al mismo tiempo se prepara otro lote de cajas en las mismas condiciones y se agrega clorpromacina en una concentración final de 50 μ M.

Todas las cajas se incuban durante dos horas en condiciones estandard de humedad, temperatura y CO₂. Al concluir este tiempo se procede a la cuantificación del porcentaje de células adheridas y no adheridas por el método turbidimétrico.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se incubaron los glioblastos en cultivo secundario - en condiciones estandard en presencia y ausencia de CPC - 50 μ M durante 60', se fijan con glutaraldehído y se observan al microscopio electrónico a 5000 aumentos.

METODOS ESTADISTICOS APLICADOS

Se aplicaron la prueba de \bar{X} , sigma y "t" de "STUDENT", ésta última se aplicó probando los problemas contra el control y los problemas entre sí.

RESULTADOS

EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR AL SUSTRATO.

Efecto de clorpromacina.

La adhesividad celular al sustrato disminuyó en presencia de clorpromacina y esta disminución fue mayor conforme se incrementó la concentración del fármaco, alcanzándose (fig 5) una inhibición de 60% cuando se utilizó -- CPC., 100 μ M. Además, se encontró que la viabilidad celular utilizando el fármaco a una concentración de 50 μ M se conservó, mientras que a concentraciones mayores el grado de viabilidad decrece, llegando hasta un 45% a concentraciones de 100 M a los 120 minutos de incubación en presencia del fármaco. Así pues, la clorpromacina tiene un efecto inhibitorio importante en la adhesividad de cultivos secundarios de glioblastos.

La velocidad con que se pegan estas células es muy rápida en los primeros 10 min. (70%), para luego alcanzar el máximo a los 150 min.

Cuando se estudió el efecto de la CPC a una concentración de 50 μ M sobre la velocidad de adhesión de los glioblastos, se observó que ésta disminuyó en forma significativa -

TABLA I

EFECTO DE CPC SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR AL SUSTRATO

CPC (μ M)	Sin EGTA + CPC 50 μ M	EGTA 500 μ M + CPC 50 μ M
	% Células Adheridas	
0	96.98 \pm 0.312	96.83 \pm 0.314
25	69.01 \pm 0.470	61.03 \pm 0.618
50	52.48 \pm 0.337	47.51 \pm 0.172
100	40.51 \pm 0.426	30.48 \pm 0.292
Prueba de "t" $P \leq 0.05$		

NOTAS:

1. Tiempo de incubación: 120 minutos.
2. Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

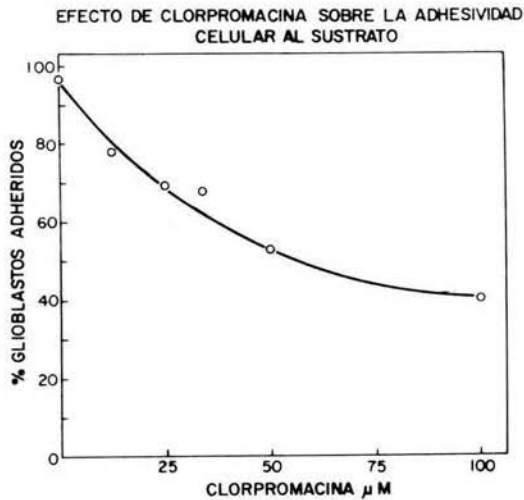


Figura 5.- Efecto de la concentración de CPC sobre la adhesividad al sustrato de glioblastos incubados durante 120' en condiciones estandard (37°C, CO₂ y humedad a saturación), la cuantificación del porcentaje de las células se efectuó con el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

durante los primeros 60 min. de incubación en presencia de la droga. Por otra parte, el número de células totales adheridas es menos en aproximadamente un 16% en presencia del fármaco después de los 90 min. de incubación. (fig 6).

EFEECTO DE AGENTES QUELANTES SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

El efecto de concentraciones crecientes de EGTA sobre la adhesividad celular es de tipo exponencial y a una concentración de 4mM alcanza una inhibición de más del 70%, como podrá observarse en la figura (7), esta inhibición es bastante significativa. El efecto de EDTA hasta una concentración de 2 mM tiene un efecto cuantitativa y cualitativamente muy similar al EGTA pero por arriba de estas concentraciones el EDTA tiene un efecto mayor, logrando una inhibición de más de 95% a una concentración de 6.0 mM. En presencia de 50 M - de CPC el efecto de los quelatos es similar, (fig. 8), -- excepto porque la clorpromacina inhibe el efecto quelante cuando la concentración de éste, está por debajo de 0.5 mM y el porcentaje de inhibición de la adhesividad es aproximadamente un 10% menor cuando no está presente la clorpromacina. Este primer efecto también se hace patente en la curva de concentración de clorpromacina en presencia de 500 μ M de EGTA (fig. 9) en la que además hay un aumento en el grado de inhibición de células adheridas debido a la presencia del EGTA.

TABLA II

ADHESIVIDAD CELULAR AL SUSTRATO CON RESPECTO
AL TIEMPO

t (min)	sin CPC	CPC 50 μ M
% Células Adheridas		
10	61.58 \pm 0.801	16.92 \pm 0.534
20	65.83 \pm 0.615	33.18 \pm 0.926
30	72.38 \pm 0.516	46.00 \pm 0.550
60	76.26 \pm 0.397	62.57 \pm 2.860
90	80.78 \pm 0.714	67.88 \pm 1.100
120	83.35 \pm 0.549	71.00 \pm 0.577
150	85.00 \pm 0.459	70.92 \pm 0.752
180	85.60 \pm 0.707	70.87 \pm 0.853
210	86.55 \pm 0.374	71.15 \pm 0.748
240	86.60 \pm 0.352	71.00 \pm 0.668
Prueba de "t" $P \leq 0.05$		

* Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

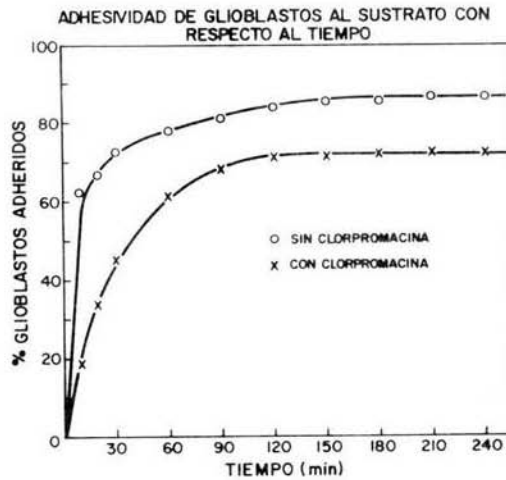


Figura 6.- Adhesividad de glioblastos al sustrato con respecto al tiempo, incubados en condiciones estandar (o) control; (x) con CPC - 50 μ M. La determinación del porcentaje de células adheridas se efectuó con el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

TABLA III

EFFECTO DE AGENTES QUELANTES SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CLORPROMACINA

QUELATO (mM)	EDTA	EDTA + CPC 50 M	EGTA	EGTA + CPC 50 M
% Células Adheridas				
0.00	97.96 ± 0.22	80.00 ± 0.27	95.70 ± 0.27	78.00 ± 1.55
0.25	80.01 ± 0.14	79.00 ± 1.55	80.00 ± 0.37	76.00 ± 1.02
0.50	68.51 ± 0.21	78.00 ± 0.58	72.00 ± 0.26	75.00 ± 0.37
1.00	58.93 ± 0.25	45.50 ± 0.26	61.01 ± 0.13	60.50 ± 0.93
2.00	37.75 ± 0.13	17.00 ± 0.75	35.71 ± 0.17	36.50 ± 0.26
4.00	8.01 ± 0.30	14.50 ± 1.10	28.60 ± 0.18	30.00 ± 1.55
8.00	1.50 ± 0.14	11.50 ± 0.67	28.00 ± 1.80	29.01 ± 1.98

Prueba de "t" $P \leq 0.05$

* Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

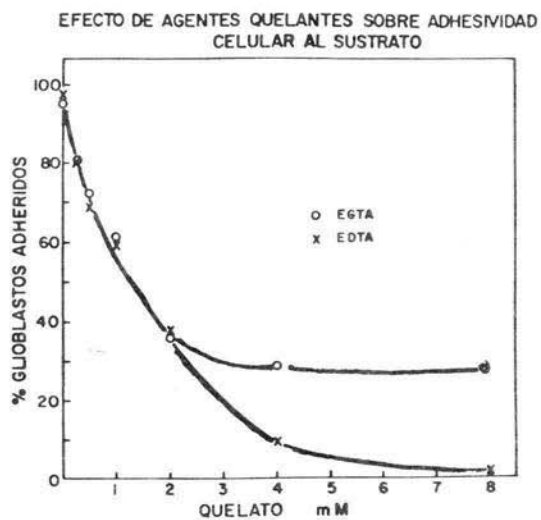


Figura 7.- Efecto de agentes quelantes (x) EDTA, - (o) EGTA sobre la adhesividad de glioblastos al sustrato incubados durante 120' en condiciones estandar, la cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

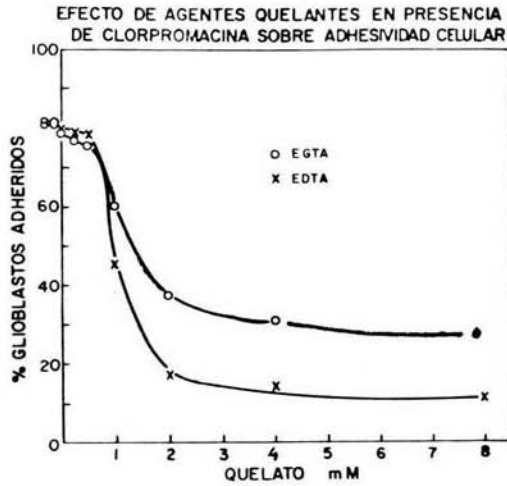


Figura 8. Efecto de agentes quelantes (x) EDTA y (o) EGTA en presencia de CPC $50 \mu\text{M}$ sobre la adhesividad de glioblastos al sustrato, incubados durante 120' en condiciones estandard. La cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

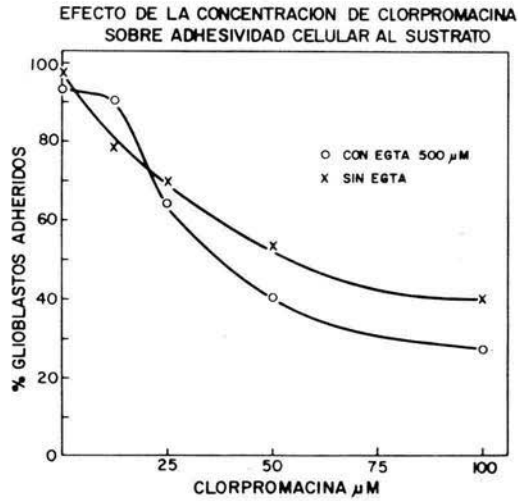


Figura 9.- Efecto de la concentración de CPC sobre la adhesividad de glioblastos al sustrato (x) sin EGTA (o) con EGTA 500 μM . - Células incubadas 120' en condiciones estándar; la cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

EFECTO DEL CALCIO EN LA ADHESIVIDAD CELULAR

A las concentraciones usadas, el calcio no tuvo efecto en la adhesividad de los glioblastos. Por otra parte, el calcio en presencia de clorpromacina produjo un ligero aumento en la adhesividad (fig 10). Se observó también un efecto inhibitorio de la clorpromacina a concentraciones bajas del ion, como ya fue descrito anteriormente, aún cuando dicho efecto fue menos marcado en presencia de concentraciones crecientes de calcio.

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR

A la temperatura más baja que fue la de 5°C., sólo - hubo un ligero decaimiento en la adhesividad de los glioblastos, o sea que hasta la más baja temperatura usada tuvo poco efecto sobre la adhesividad. Sin embargo, en presencia de 50 μ M de clorpromacina sí se percibe una tendencia a disminuir la adhesividad de los glioblastos a medida que decrece la temperatura (fig 11).

TABLA V

EFFECTO DE IONES CALCIO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR
AL SUSTRATO

CALCIO (mM)	Sin CPC	CPC 50 μ M
% Celulas Adheridas		
0.0	93.25 \pm 0.259	69.75 \pm 0.257
0.5	93.00 \pm 0.316	73.43 \pm 0.314
1.0	93.25 \pm 0.223	75.74 \pm 0.204
2.0	93.20 \pm 0.188	77.25 \pm 0.225
4.0	93.17 \pm 0.255	79.50 \pm 0.228
16.0	93.25 \pm 0.223	85.76 \pm 0.163
Prueba de "t" $P \leq 0.05$		

* Cada punto es la media de seis determi_ naciones por duplicado.

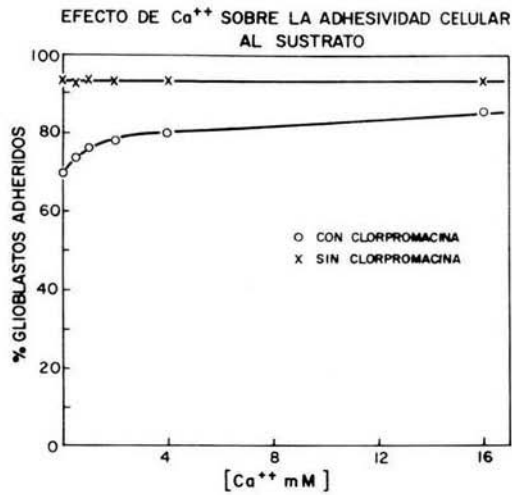


Figura 10.- Efecto de la concentración de iones calcio sobre la adhesividad al sustrato de glioblastos cultivados 120' en condiciones estandar, (x) control; (o) con CPC 50 μ M, la cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó con el método turbidimétrico. Cad punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

TABLA VI

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE ADHESIVIDAD
 CELULAR AL SUSTRATO .

t (min)	Sin CPC	CPC 50 M
% de Células Adheridas		
5	83 \pm 2.1	36 \pm 3.5
10	88 \pm 3.2	35.2 \pm 5.1
20	90 \pm 1.5	44.1 \pm 2.5
30	90 \pm 1.2	51.0 \pm 2.1
40	90.5 \pm 0.85	64.0 \pm 0.90

NOTA: 1. Células pre-incubadas durante
 10' a las temperaturas indicadas,
 e incubadas 120'.

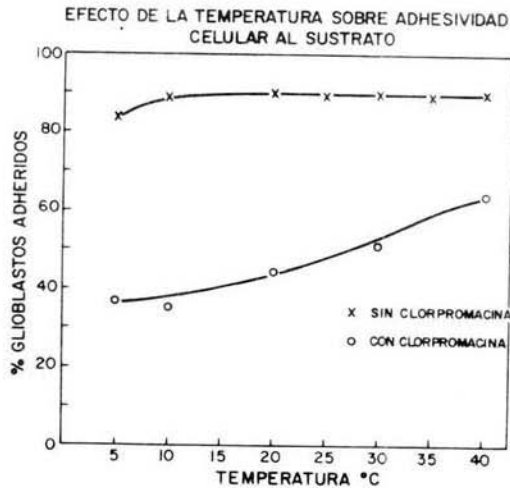


Figura 11.- Efecto de la temperatura sobre la adhesion al sustrato de glioblastos preincubados a las temperaturas indicadas durante 10 minutos e incubados en condiciones estandard hasta 120': (x) sin CPC, (o) con CPC 50 μ /M. La cuantificacion del porcentaje de celulas adheridas se efectuo por el metodo turbidimetrico. Cada punto es el - promedio de seis determinaciones por duplicado.

EFEECTO DEL SUERO EN EL CONTACTO CELULAR CON EL SUSTRATO
(1a. Etapa de la adhesividad celular).

Como ya se describió anteriormente, en los primeros 10 minutos los glioblastos hacen contacto con el sustrato. Como puede observarse en la figura (12), la velocidad de este fenómeno está marcadamente disminuído en presencia de clorpromacina, pero con el tiempo el porcentaje de células adheridas es sólo un 25% menos a los 35 minutos que en las células control.

En el medio sin suero, por el contrario, hay un incremento en la velocidad de este fenómeno de tal forma que - entre los 6 - 7 minutos, todas las células que se van a adherir ya han hecho contacto con el sustrato. La totalidad de las células adheridas es significativamente menor, cuando menos en un 25%. En medio sin suero y en presencia de CPC, todavía se incrementa un poco más la velocidad del contacto celular, de tal forma que aproximadamente a los 4 minutos, todas las células que se van a adherir ya han hecho contacto.

Como puede observarse, la clorpromacina deprime aún - más (aprox. 10%) el número de células adheridas. En la - figura (13), se muestra que el suero dializado, prácticamente no tiene efecto sobre el contacto celular; sin embargo, la clorpromacina tiene efecto sobre el contacto, -

TABLA VII
EFECTO DEL SUERO EN EL CONTACTO CELULAR CON EL SUSTRATO

t (min)	MEM'S 15%	MEM'S 15%+ CPC 50 μ M	MEM	MEM + CPC 50 μ M	MEM'S 15 % Dial	MEM'S 15% Dial + CPC 50 μ M
% Células adheridas						
5	33.0 \pm 0.50	7.6 \pm 0.30	47.0 \pm 0.86	35.93 \pm 1.47	42.0 \pm 0.75	11.03 \pm 0.55
10	61.1 \pm 0.44	22.1 \pm 0.37	45.8 \pm 0.88	36.43 \pm 1.19	45.5 \pm 0.60	24.03 \pm 0.90
15	64.1 \pm 0.30	30.8 \pm 0.76	46.4 \pm 0.96	36.16 \pm 0.55	55.3 \pm 0.40	27.97 \pm 0.85
20	66.1 \pm 0.65	34.6 \pm 0.57	44.5 \pm 0.70	36.10 \pm 1.23	59.3 \pm 0.20	27.06 \pm 0.75
25	70.1 \pm 1.97	41.2 \pm 0.30	48.5 \pm 0.90	36.20 \pm 0.30	67.2 \pm 0.41	27.06 \pm 1.05
30	72.0 \pm 0.37	45.1 \pm 0.35	47.0 \pm 0.50	36.13 \pm 0.35	73.4 \pm 0.69	30.33 \pm 1.66
35	73.0 \pm 0.12	49.1 \pm 0.35	47.3 \pm 0.49	36.00 \pm 0.50	74.3 \pm 0.70	29.96 \pm 0.56
Prueba de "t" P \leq 0.05						

* Cada punto es la media de tres determinaciones
por duplicado.

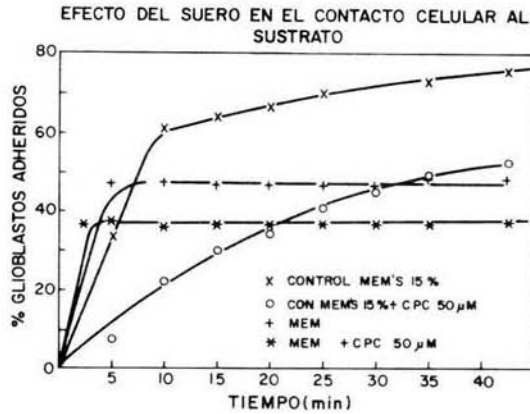


Figura 12.- Efecto del suero en el contacto celular al sustrato, en medio: (x) con suero; (+) sin suero; (o) con suero y CPC 50 M y (*) sin suero y CPC 50 μ M. Células incubadas durante 40 minutos iniciales del cultivo en condiciones estandar. La cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método indirecto. Cada punto es el promedio de tres determinaciones por duplicado.

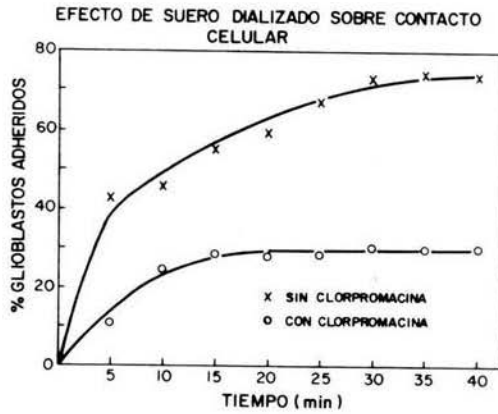


Figura 13.- Efecto del suero dializado sobre el contacto celular con el sustrato: (x) medio con suero dial. (o) con suero dial, y CPC 50 μ

M. La determinación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método in directo. Cada punto es el promedio de tres determinaciones por duplicado.

decreciendo la velocidad de adhesión y la adhesividad celular total, siendo este efecto más marcado que el que presentó CPC en medio con suero sin dializar.

EFEECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE INCUBACION SOBRE EL EXTENDIMIENTO CELULAR (2a. Etapa de la adhesividad celular)

En condiciones usuales, (control), el extendimiento celular o segunda etapa de la adhesividad, ocurre tal como se muestra en la figura (14 , 15) y puede observarse que a los 35 minutos alcanza un máximo. En presencia de 50 μ M de clorpromacina este fenómeno no se lleva a cabo, al menos hasta 35 minutos de incubación, o se manifiesta en una forma muy ligera, es como un retraso del fenómeno. (16)

En presencia de clorpromacina y EGTA 500 μ M combinados, así como EGTA 500 μ M solo, no se manifiesta, el extendimiento en ningún caso. El mismo resultado se observó cuando las células fueron incubadas sin suero, con y sin CPC 50 μ M. (Tabla No. 8). (Figura 19 - 20)

TABLA VIII
 EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE INCUBACIÓN SOBRE
 EL EXTENDIMIENTO CELULAR

t (min)	MEM'S 15%	MEM'S 15% + CPC 50 μ M	MEM'S 15% + EGTA 500 μ M	MEM'S 15% +EGTA500 M + CPC 50 μ M
% Células adheridas				
5	1.78 \pm 0.68	1.53 \pm 0.45	1.50 \pm 0.10	1.46 \pm 0.27
10	2.30 \pm 1.15	1.58 \pm 0.37	1.54 \pm 0.08	1.58 \pm 0.20
15	3.00 \pm 1.55	1.81 \pm 0.43	1.57 \pm 0.20	1.55 \pm 0.05
20	3.28 \pm 0.80	1.80 \pm 0.13	1.54 \pm 0.35	1.55 \pm 0.35
25	3.50 \pm 1.17	1.90 \pm 0.35	1.54 \pm 0.51	1.58 \pm 0.20
30	3.78 \pm 1.07	1.83 \pm 0.66	1.56 \pm 0.12	1.66 \pm 0.20
35	4.0 \pm 0.55	1.80 \pm 0.22	1.52 \pm 0.12	1.73 \pm 0.25
		Prueba de "t"		P \leq 0.05

* Cada punto es la media de tres determinaciones por duplicado.

TABLA IX

EXTENDIMIENTO CELULAR

MEM'S 15 %

t min.	% Cel.	Diámetro celular total (μ)	Diámetro del núcleo (μ)	Diámetro del citoplasma (μ)	Características observadas
5	7	1.60	1.44	-.-	Hay formación de microvilli y microespículas en 80 % de las células todas con forma esférica.
	80	1.60	1.25	0.35	
	10	1.76	1.48	0.28	
	3	2.00	1.44	0.56	
10	65	2.40	1.60	0.80	Un 80% de las células redondeadas, núcleo conspicuo en todas hay microvilli, microespículas y blebs, 20% de las células en forma ameboidea, las prolongaciones distribuidas uniformemente en las célula.
	14	2.80	1.60	1.20	
	12	1.60	1.60	-.-	
	6	3.20	1.60	1.60	
	3	4.00	1.60	2.40	
15	40	2.00	1.44	0.56	Un 70% de las células redondeadas, -- 25% con forma ameboidea, se observaron blebs, lamelipodios y filopodios.
	30	2.40	1.60	1.80	
	15	3.20	1.60	1.60	
	10	4.00	1.60	2.40	
	5	4.80	2.00	2.80	
20	40	2.80	1.25	1.55	Disminuyó la cantidad de blebs y aumentan lamelipodios y filopodios, la mayoría son células asteroideas.
	30	2.40	1.60	0.80	
	15	3.20	1.60	1.60	
	10	4.00	1.84	2.16	
	3	6.40	1.48	4.92	
	1	2.00	1.25	0.75	
25	40	2.40	1.60	0.80	La mayoría de las células con forma asteroidea, hay rufles y filopodios de varios tamaños, extensiones hasta de 3.0 , - se han formado lamelipodios.
	25	2.00	1.20	0.80	
	15	4.00	2.00	2.00	
	10	3.20	1.60	1.60	
	8	3.60	1.60	2.00	
	2	4.80	1.60	3.20	
30	25	2.00	1.48	0.52	Ya no se observan células redondeadas. El núcleo se ve aplanado, hay lamelipodios y filopodios, células con forma asteroidea.
	20	3.20	1.76	1.44	
	20	2.40	1.60	0.80	
	20	4.00	1.60	2.40	
	10	3.60	1.60	2.00	
	5	4.80	1.76	3.04	
35	30	2.40	1.60	0.80	Se observan mayor número de lamelipodios, la morfología celular semejante a la observada a los 30'
	20	3.20	1.60	1.60	
	22	4.00	1.76	2.24	
	15	4.80	1.76	3.04	
	13	6.40	1.76	4.64	

TABLA X
EXTENDIMIENTO CELULAR
MEM'S 15 % + CPC 50 μ M

t min	% Cel	Diámetro celular total (μ)	Diámetro del núcleo (μ)	Diámetro del citoplasma (μ)	Características observadas
5	70	1.60	1.60	-.-	La mayoría de las células no se distingue el núcleo, todas las células presentan forma - esférica.
	20	1.60	1.52	0.08	
	10	1.44	1.44	-.-	
10	84	1.60	1.48	0.12	En un 84% de las células se ve un anillo alrededor del núcleo, sin extensiones citoplásmicas de otro tipo todas las células redondeadas y poco aplanadas.
	15	1.44	1.44	-.-	
	1	2.00	1.44	0.56	
15	83	1.60	1.48	0.12	Células redondeadas, hay formación de microvilli, en la mayoría de ellas y algunas microespículas distribuidas uniformemente en la superficie - celular.
	14	1.44	1.44	-.-	
	3	2.20	1.48	0.72	
20	83	1.60	1.48	0.12	Células redondeadas con núcleo visible en la mayoría, pero pocas - con extensiones citoplásmicas, microespículas y microvilli.
	15	1.48	1.48	-.-	
	5	2.20	1.48	0.72	
25	87	1.60	1.44	0.16	Las células presentan forma redondeada, con núcleo visible en 90% y pequeñas prolongaciones citoplásmicas uniformemente distribuidas en la superficie celular.
	7	1.44	1.44	-.-	
	6	2.40	1.48	0.92	
30	87	1.60	1.44	0.16	Todas las células son redondeadas, y características semejantes a las observadas en 25'
	7	1.44	1.44	-.-	
	3	2.00	1.44	0.56	
	3	2.40	1.48	0.92	
35	87.5	1.60	1.44	0.16	Características - semejantes a las observadas a los 25' de incubación
	6.0	1.44	1.44	-.-	
	3.5	2.00	1.44	0.56	
	3.0	2.40	1.48	0.92	

TABLA XI

EXTENDIMIENTO CELULAR
MEM'S 15% + EGTA 500 μ M.

t min	% cel	Diámetro celular total (μ)	Diámetro del núcleo (μ)	Diámetro (μ) del citoplasma	Características observadas
5	70	1.60	1.48	0.12	Las células se ven esféricas, y sin prolongaciones citoplásmicas únicamente muestran un delgado anillo alrededor del núcleo.
	30	1.44	1.44	--	
10	50	1.60	1.48	0.12	(1) Células redondas, y poco aplanadas.
	50	1.44	1.44	--	
15	50	1.44	1.44	--	" "
	40	1.60	1.44	0.12	
	10	1.60	0.96	0.64	
20	55	1.44	1.44	--	" "
	40	1.60	1.60	--	
	5	1.60	1.44	0.16	
25	55	1.44	1.44	--	" "
	(2) 40	1.60	1.60	--	
	5	1.60	1.44	0.16	
30	60	1.44	1.44	--	Células redondeadas poco aplanadas sin extensiones citoplásmicas.
	35	1.60	1.60	--	
	5	1.60	1.44	0.16	
35	85	1.44	1.44	--	" "
	13	1.60	1.60	--	
	2	1.60	1.44	0.16	

(1) En ningún caso se observaron extensiones citoplásmicas y en pocos casos se observó un delgado anillo alrededor del núcleo.

(2) A partir de este tiempo el número de células adheridas disminuyó en 20% aproximadamente.

TABLA XII

EXTENDIMIENTO CELULAR

MEM'S 15% + EGTA 500 μ M. + CPC 50 μ M.

t min	% Cel	Diámetro celular total (μ)	Diámetro del núcleo (μ)	Diámetro del citoplasma (μ)	Características observadas
5	70	1.44	1.44	-. -	* En ningún caso se observaron extensiones citoplásmicas de ningún tipo; todas las células se observaron redondeadas y poco aplanadas
	30	1.60	1.60	-. -	
10	75	1.44	1.44	-. -	
	25	1.60	1.60	-. -	
15	50	1.60	1.60	-. -	
	50	1.44	1.44	-. -	
20	50	1.60	1.60	-. -	
	40	1.44	1.44	-. -	
	10	1.60	1.44	0.56	
25	85	1.60	1.60	-. -	
	10	1.44	1.44	-. -	
	5	1.44	1.36	0.08	
30	85	1.60	1.60	-. -	
	10	1.44	1.44	-. -	
	5	1.44	1.36	0.08	
35	85	1.60	1.60	-. -	En este caso el núcleo es observado con un anillo citoplásmico alrededor de él. (No hay extensiones citoplásmicas.
	10	1.44	1.44	-. -	
	5	2.00	1.44	0.08	

* Estas observaciones fueron constantes hasta los 30', en que no hubo propiamente ningún indicio de extensión citoplásmica.

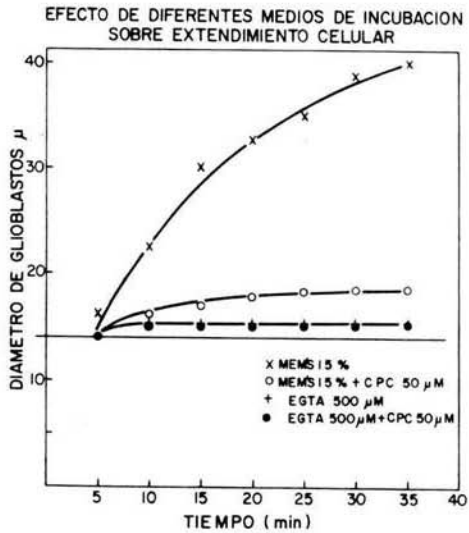


Figura 14.- Efecto de diferentes medios de incubación sobre el extendimiento de glioblastos durante los primeros 35' de cultivo; la línea marca el diámetro de un glioblasto antes de iniciar el proceso de extensión citoplásmica. (x) MEM'S 15%; (o) MEM'S 15% y CPC 50 μ M; (+) MEM'S 15% y EGTA 500 μ M; (●) EGTA 500 μ M y CPC 50 μ M. La determinación del diámetro se efectuó al microscopio de contraste de fases, con ayuda de un micrómetro. (método directo), cada punto es el promedio de 12 campos contados por caja.

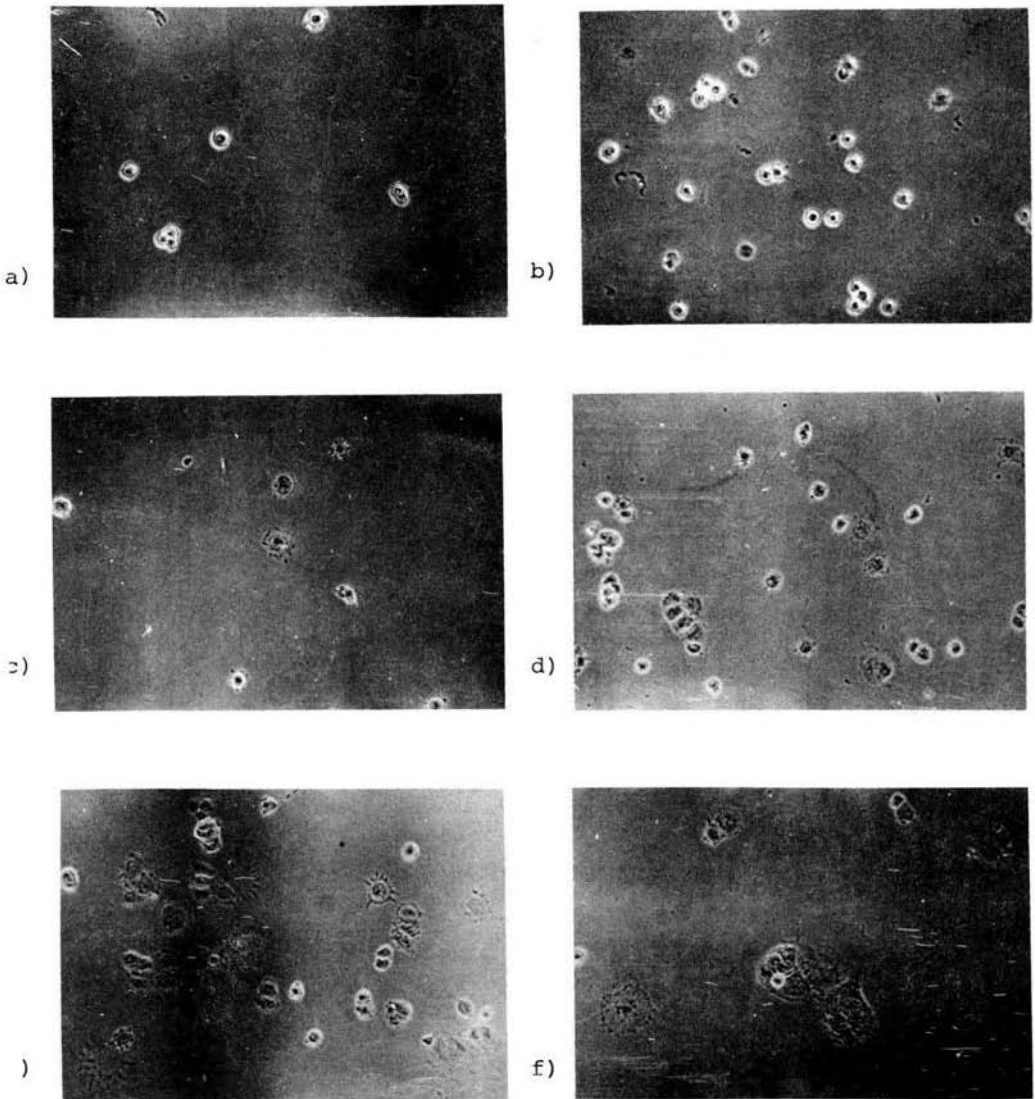


Figura 15.- Microfotografía en contraste de fases a 128 aumentos de glioblastos incubados durante los primeros 35 min de cultivo en MEM'S 15%: a) 5'; b) 10'; c) 15'; - d) 20'; e) 30'; f) 35'. (Detalle en el texto).

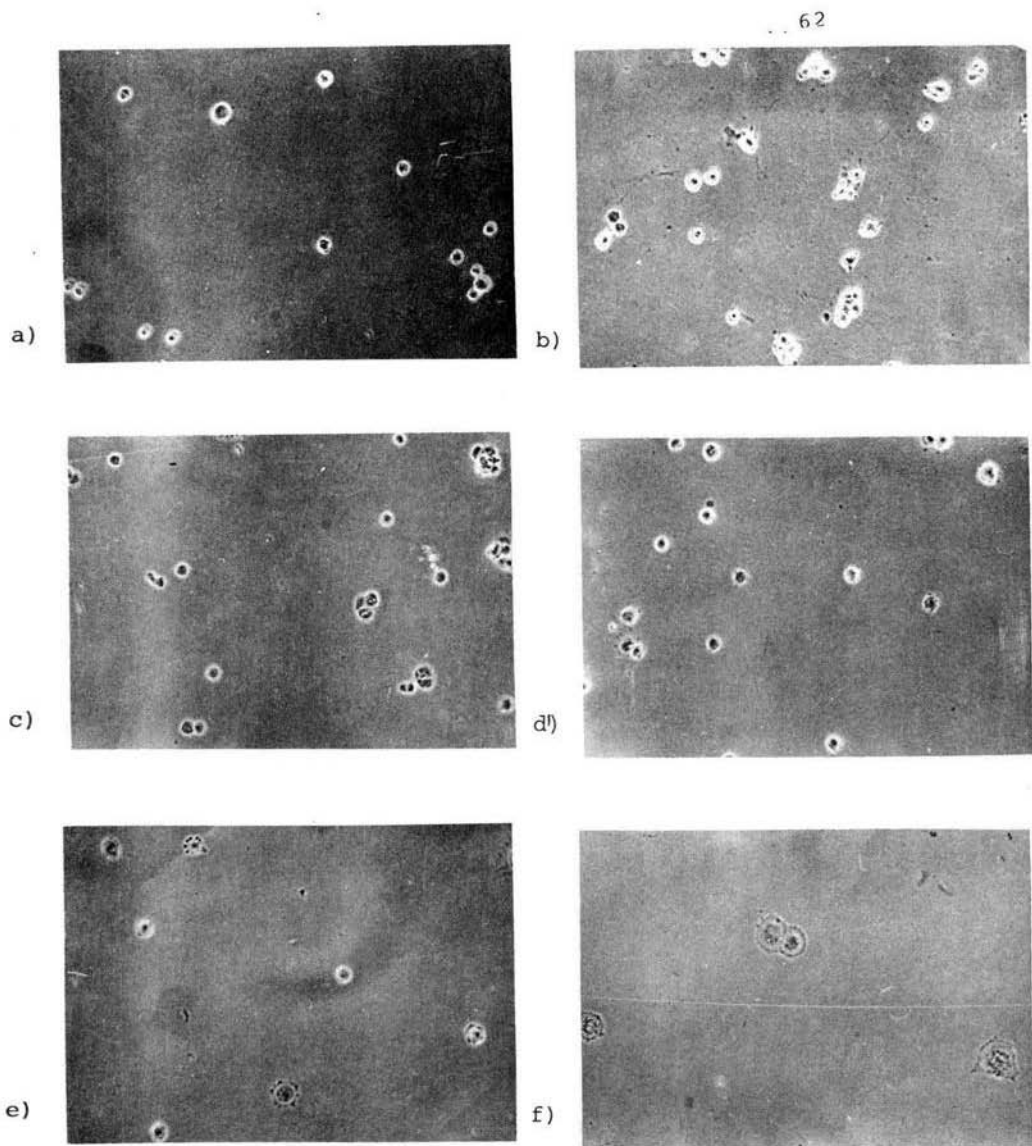


Figura 16.- Microfotografías en contraste de fases a 128 aumentos de glioblastos incubados durante los primeros - 35 min del cultivo en MEM'S 15% y CPC 50 μ M. a) 5'; b) 10'; c) 15'; d) 20'; e) 25'; f) 35'. (Detalles referidos en el texto).

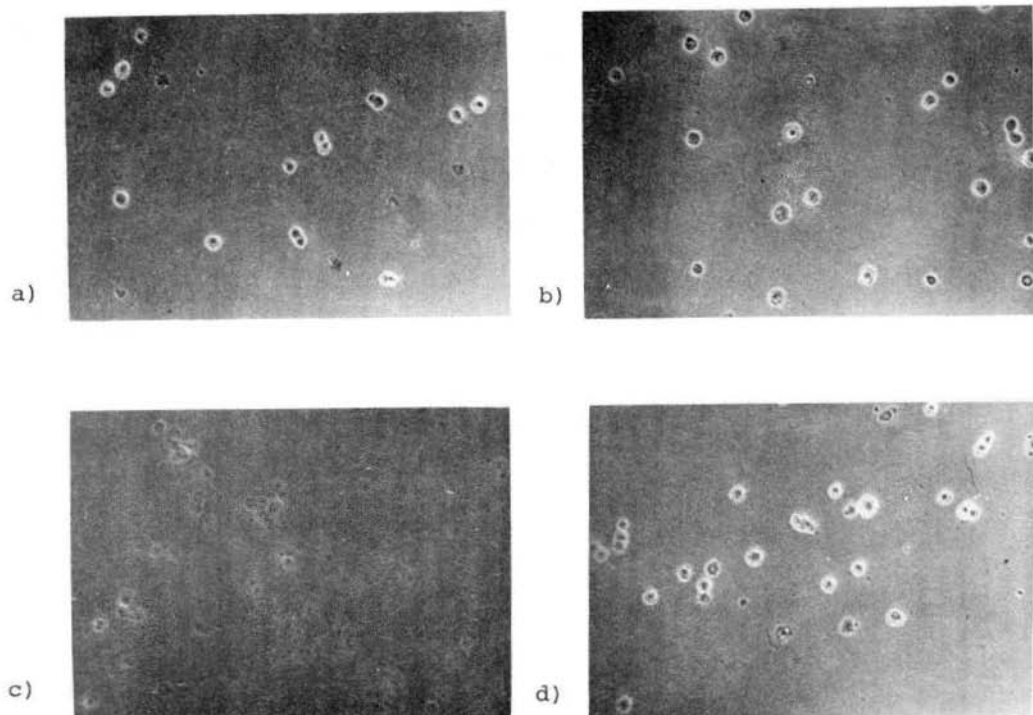


Figura 17.- Microfotografías en contraste de fases a 128 aumentos del efecto de MEM sobre el extendimiento de glioblastos incubados los primeros 35 min de cultivo en condiciones estandar: a) 5'; b) 15'; c) 25'; d) 35'. (Detalles en el texto).

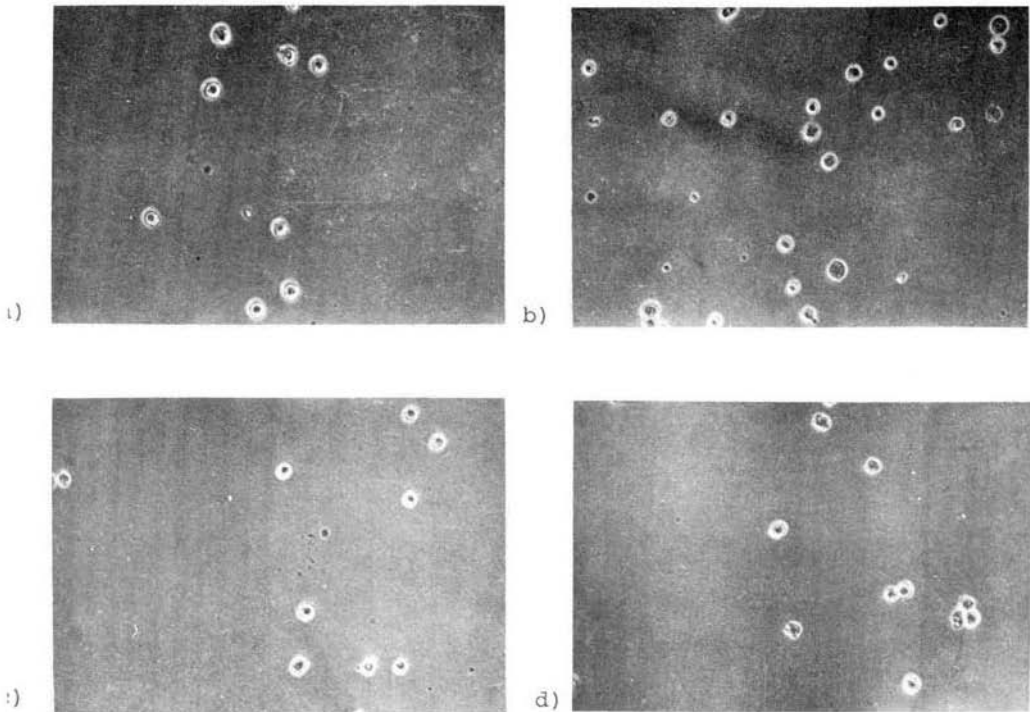


Figura 18.- Microfotografías en contraste de fases a 128 aumentos del efecto de CPC $50\mu\text{M}$ en MEM sobre el extendimiento de glioblastos incubados durante los primeros 35 min de cultivo en condiciones estandard: a) 5'; b) 15'; c) 25'; - d) 35. (Detalles referidos en el texto).

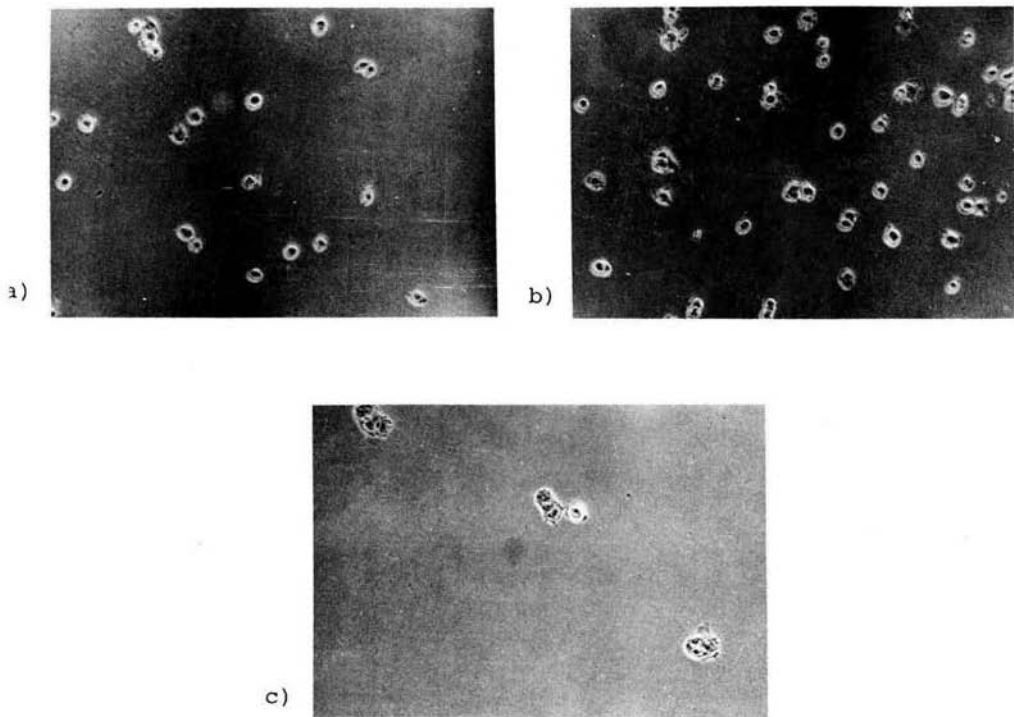


Figura 19.- Microfotografías en contraste de fases del efecto de EGTA sobre el extendimiento de glioblastos durante los primeros 35 min. de cultivo en condiciones estandard: a) 10'; b) 20'; c) 35'. (Detalles en el texto).

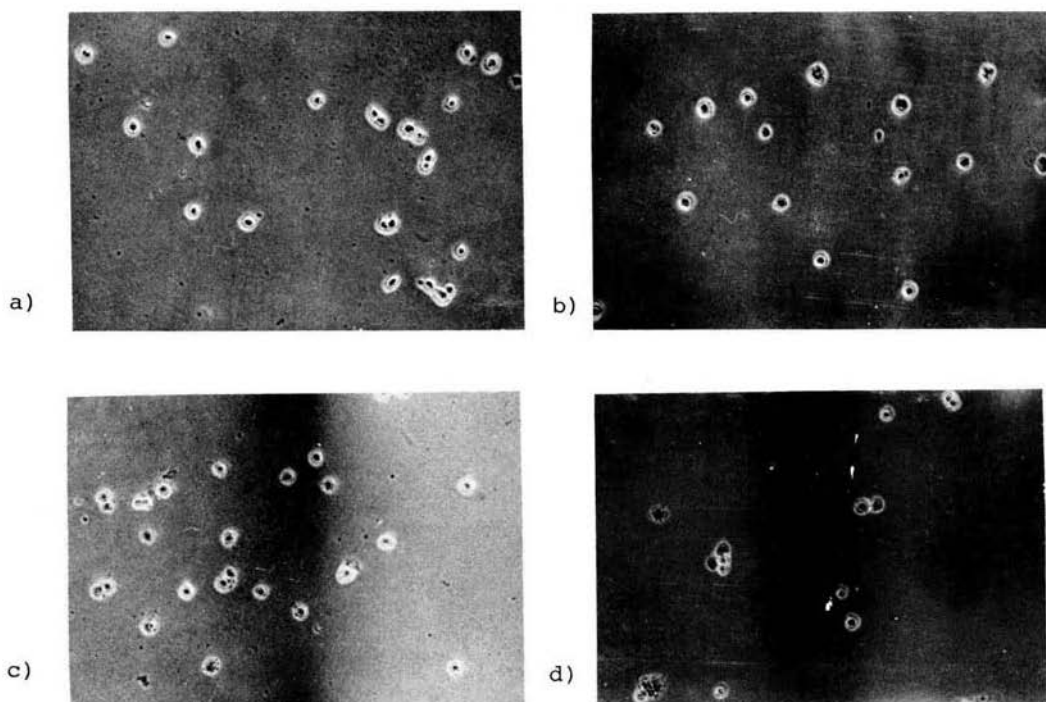


Figura 20.- Microfotografía del efecto de EGTA y CPC 50 μ M sobre el extendimiento de glioblastos durante los primeros 35 min. de cultivo en condiciones estándar: a) 5'; b) 15'; c) 25'; d) 35'. (Detalles referidos en el texto).

EFEECTO DE CLORPROMACINA SOBRE DESPEGAMIENTO CELULAR.

(3a. Etapa de la Adhesividad Celular).

Esta etapa de la adhesividad celular o anclaje, se determinó midiendo el efecto tanto de la clorpromacina - como de agentes quelantes en el despegamiento o desprendimiento de la célula de su sustrato, (glioblastos en cultivo no confluentes). La clorpromacina presentó un efecto muy marcado en la morfología de la célula, pues la gran mayoría de las células se retraen y tienden a la forma esférica. Sin embargo, CPC tiene un efecto menor que en el caso de la adhesividad, es decir, CPC a la concentración de 50 M despega aproximadamente 20% de glioblastos adheridos. (fig. 21).

EGTA a una concentración de 4.0 mM despega una contidad similar de glioblastos que la clorpromacina, (20%).(22)

En cambio, el EDTA tiene un efecto mucho mayor a una concentración de 2.0 mM desprendiendo por arriba de un 70 por ciento de las células adheridas. El efecto de EGTA o EDTA en presencia de clorpromacina es muy similar a su -- efecto en ausencia de la misma. (Fig. 23).

RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Al observarse los glioblastos incubados en presencia de clorpromacina 50 M, se encontró que aumentó la organización de los filamentos, encontrándose principalmente en áreas cercanas al núcleo y aparentemente el número de los

mismos es mayor comparado con las células incubadas en condiciones estándar. (Fig. 24).

PRUEBAS ESTADISTICAS

Las pruebas estadísticas aplicadas χ^2 y "t" de "STUDENT" indican que los datos son altamente significativos, pues - la "t" calculada para cada caso resulta ser mucho mayor que la "t" de tablas, excepto en un caso (la concentración 2 M de agentes quelantes sobre la adhesividad celular).

TABLA XIII

EFECTO DE CPC SOBRE DESPEGAMIENTO DE
GLIOBLASTOS EN CULTIVO

CPC μ M	% de células adheridas
0.0	93.0 \pm 2.5
25.0	75.0 \pm 1.2
50.0	70.0 \pm 1.1
100.0	69.5 \pm 2.7

NOTA: Las células fueron incubadas 48 h antes del experimento en condiciones estandar. Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

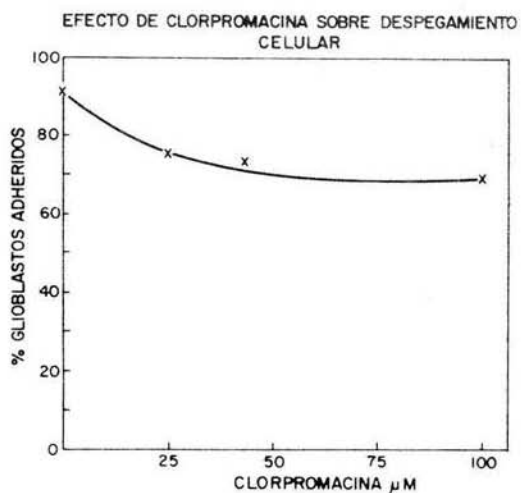


Figura 21.- Efecto de CPC sobre el despegamiento celular, células en cultivo secundario incubadas 48 horas antes del experimento, (no confluentes, incubadas 120' en presencia de CPC y en condiciones standard.). La cuantificación de porcentaje de células adheridas se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de --- seis determinaciones por duplicado.

TABLA IX
 EFECTO DE AGENTES QUELANTES SOBRE EL DESPEGAMIENTO CELULAR
 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CPC

QUELATO (mM)	EDTA	EDTA + CPC 50 μ M	EGTA	EGTA + CPC 50 μ M
% células adheridas				
0.00	91.16 \pm 0.41	90.4 \pm 0.54	96.00 \pm 0.16	96.01 \pm 0.16
0.50	87.46 \pm 0.38	82.5 \pm 0.34	91.96 \pm 0.30	95.96 \pm 0.08
1.00	82.02 \pm 0.23	73.4 \pm 0.37	87.01 \pm 0.14	94.00 \pm 0.14
2.00	28.16 \pm 0.29	30.4 \pm 0.39	82.00 \pm 0.15	90.00 \pm 0.16
4.00	23.98 \pm 0.29	20.5 \pm 0.14	78.48 \pm 0.20	88.68 \pm 0.56
8.00	22.01 \pm 0.19	17.9 \pm 0.10	76.48 \pm 0.20	78.48 \pm 0.36
Prueba de "t			P \leq .05	

* Cada punto es la media de seis determinaciones por duplicado.

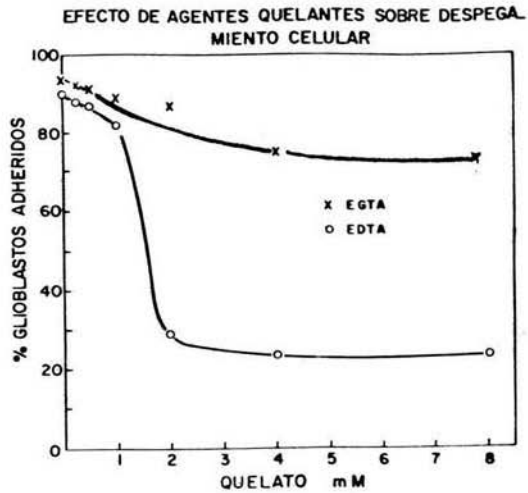


Figura 22.- Efecto de agentes quelantes (x) EGTA y (o) EDTA sobre el despegamiento de glioblastos en cultivo secundario de 48 hrs de edad, incubadas en condiciones estandar; la cuantificación se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

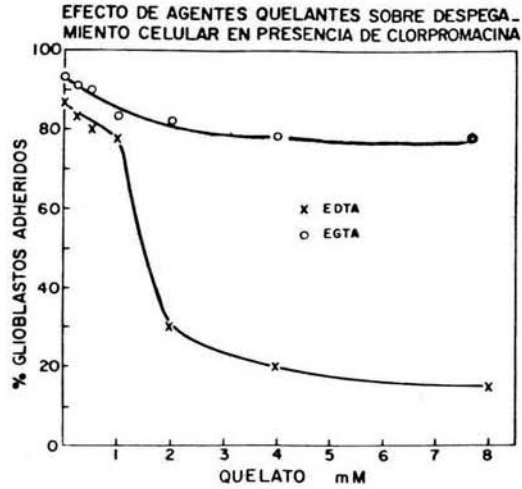
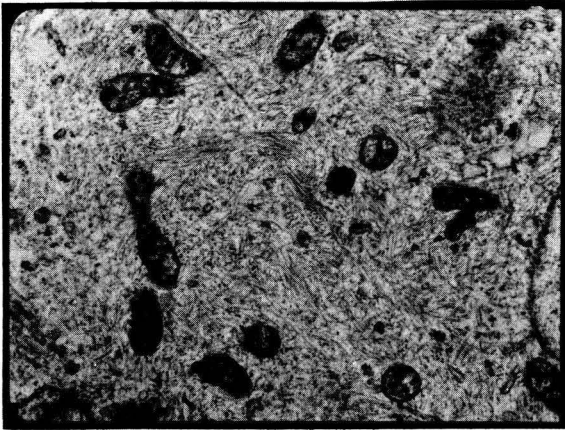


Figura 23.- Efecto de agentes quelantes (o) EGTA y (x) EDTA sobre el despegamiento de glioblastos en cultivo secundario de 48 hrs de edad, incubadas 120' en presencia de CPC 50 μ M; la cuantificación del porcentaje de células adheridas se efectuó por el método turbidimétrico. Cada punto es el promedio de seis determinaciones por duplicado.

a)



b)

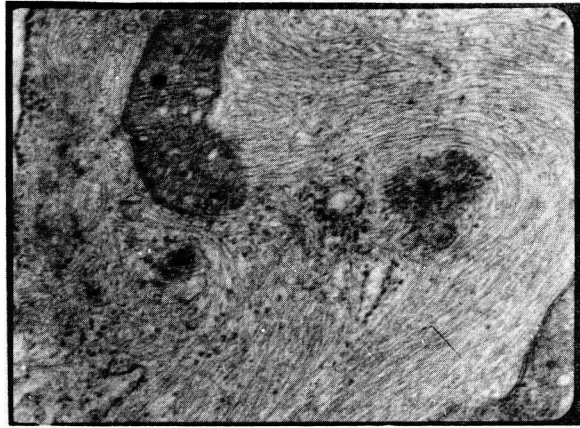


Figura 24.- Ultraestructura de glioblastos incubados
60 min a) con MEM'S 15%; b) con CPC 50 μ M;
5,000 aumentos. (Detalles referidos en
el texto).

DISCUSION

EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR AL SUSTRATO

Tanto EGTA como EDTA y CPC tienen un efecto inhibitor sobre el fenómeno de adhesividad celular al sustrato y aún cuando CPC tiene un efecto significativo sobre el fenómeno, éste es menor que el efecto de EGTA y menor aún que el de EDTA, pues este último bloquea casi completamente la primera etapa de adhesividad. (fig. 7).

En presencia de las tres sustancias las células que se pegan a la caja de cultivo permanecen redondeadas. Lo anterior sugiere que el efecto de las tres sustancias sobre la primera etapa es a nivel de la membrana celular, pues se ha reportado que agentes quelantes alteran la superficie de membrana (Schreiner, et al., 1976) y que CPC altera la distribución de macromoléculas de superficie (Braun, 1978) además que modifica la fluidez de la membrana plasmática (Halla, et al., 1980).

Es posible que los quelantes, EDTA y EGTA actúen a través de su efecto quelante en el caso de iones divalentes, calcio y magnesio los cuales son importantes para el fenómeno de adhesividad (Okada, 1974) o que la acción de estos agentes sea directamente sobre proteínas de membrana (Schreiner, -- 1976).

Lo anterior puede explicar el efecto de las tres sustancias sobre la primera etapa de adhesividad celular.

Un descenso en la temperatura a 5°C no impidió que las células se fijaran al sustrato, además éstas permanecen redondeadas si se mantiene esta temperatura.

La aparente carencia de efecto de la temperatura sobre la primera etapa de adhesividad se ve modificada en presencia de CPC figura (12), así a menor temperatura mayor es el efecto de CPC. Estos resultados indican que la temperatura interfiere con el fenómeno fisicoquímico de esta primera etapa de adhesividad, pues el efecto aislado de temperatura sugiere que esta primera etapa no es dependiente de energía.

ETAPAS DE LA ADHESIVIDAD

La observación directa en el tiempo del fenómeno de adhesividad en el microscopio de contraste de fases muestra que éste es un fenómeno complejo. Esto y los datos que se acaban de discutir obligaron a estudiar con mas detalle el fenómeno en tres etapas diferentes.

Primera Etapa

Como se indicó en la sección de resultados, a los 10 minutos de incubación la gran mayoría de células terminó la primera etapa de adhesividad, o contacto celular. Así que pa_

ra analizar en el tiempo el efecto de estas sustancias, se probó el efecto de CPC, de medio sin suero y de medio con suero dializado. Se pudo observar que el efecto de CPC mencionado anteriormente, es un efecto de retardo, pues conforme pasa el tiempo, el número de células adheridas aumentó, sin embargo a los 35 minutos de incubación la CPC muestra un discreto efecto inhibitorio (aproximadamente 15%) sobre adhesividad. lo que también se observa en medio sin suero. Este es un efecto del fármaco diferente a los ya descritos y es posible que sea un efecto tóxico (Rabinovitch and DeStefano, 1973, 1975).

Por otra parte en ausencia de suero esta primera etapa de adhesividad o contacto al sustrato es mucho más rápida (fig 12) aún cuando el porcentaje de células que hacen contacto es menor tabla (VII), esto último posiblemente se deba a que algunas células en ausencia de suero no se recuperan y no puedan continuar el fenómeno de adhesión, o bien que exista un factor del suero que actúe con un efecto inhibitorio, pero que exista una relación directamente proporcional entre el número de células (densidad celular) y la concentración del factor inhibitorio y por eso el porcentaje de células que hace contacto resulte ser menor y que en presencia del suero la concentración necesaria del factor inhibitorio disminuya, por lo que menor número de células hace contacto, y podría ser que un factor existente en el suero potenciara la acción del inhibitorio. También puede pensarse

que algun (os) componente (s) del suero interfieren o compite(n) con éste fenómeno. Esto por ejemplo puede ser por cargas iónicas o por competencia de iones del medio con macromoléculas del suero. (Lloyd, et al., 1976).

Debido a lo anterior se determinó el efecto del suero dializado sobre este fenómeno no detectándose ninguna diferencia sensible con respecto al suero no dializado, entonces se piensa que es posible que el calcio del suero, que es el único que se añade al medio de cultivo, es necesario para que se lleve a cabo el contacto celular con el sustrato y es posible que el factor que inhibe el contacto celular sea de origen macromolecular, pues la velocidad de adhesión en presencia de suero tanto dializado como no dializado es muy semejante (figura 13).

Segunda Etapa

Para estudiar el extendimiento celular, se determinó el efecto de CPC y de EGTA. El efecto de CPC sobre el extendimiento celular, fue muy marcado, y es semejante al que tiene citocalacina B en este fenómeno (Grinnell, et al., 1976). El efecto que tiene el EGTA aunque no fue analizado con detalle al microscopio, inhibe el extendimiento celular un poco más marcadamente (fig 14) y ya que éste es un quelato con gran especificidad por calcio, sugiere que este ión es

indispensable para este fenómeno.

Tercera Etapa

Como parámetro de estudio para la primera etapa de adhesividad de las células o anclaje, se usó el desprendimiento celular y se determinó el efecto de CPC y agentes quelantes en este fenómeno. Este farmaco así como los quelantes presentan como primer efecto, el cambio de la morfología de la célula, pues la mayoría de éstas, tiende a redondearse en los primeros 20 minutos, esto nos indica que el citoesqueleto de estas células ha modificado su arquitectura, - (Lazarides, 1976). Después, aproximadamente un 25 % de la población de glioblastos se desprende, se puede pensar que se trata de células que se encuentran en una determinada etapa del ciclo celular más susceptible de desprenderse.

El efecto de EGTA sobre la morfología y el desprendimiento celular cuantitativa y cualitativamente (tabla IX) es muy semejante al de la CPC (fig 22). El EDTA por otra parte, no sólo afectó a la morfología (fig 22), sino que presentó un efecto más marcado en el desprendimiento de glioblastos, (más del 70 %) tabla (IX). Esto sugiere que el EDTA, no afecta la arquitectura del citoesqueleto sino que en forma directa, o bien modifica la membrana plasmática o las proteínas que están involucradas en el anclaje, o bien a través de quelar --

iones contenidos en el medio de cultivo, o de quelar iones - que estén formando complejos con estas estructuras (Llold, et al., 1976), y que son necesarias para el fenómeno de - adhesividad (Grinnell, 1976).

Del presente trabajo se confirma que la adhesividad ce_ lular es un proceso dinámico, continuo y complejo, constituí_ do a su vez por diferentes fenómenos o etapas en secuencia o imbricadas en el tiempo y que le permite a la célula adherir_ se a un sustrato natural o artificial. Se considera que el conocer este hecho permitirá estudiar con mas detalle estos fe_ nómenos y conocer sus mecanismos moleculares.

Los datos aquí discutidos muestran que el mecanismo de - acción es diferente y que a las concentraciones usadas los que_ lantes afectan principalmente a la membrana celular mientras que la CPC aún cuando afecta a la primera etapa de adhesivi_ dad, su mayor efecto está sobre la segunda etapa la cuál re_ quiere mayor movimiento celular.

Esto sugiere que el efecto de CPC es a nivel de citoes_ queleto y que aún cuando no es posible con los datos obteni_ dos afirmar si el efecto es a nivel de filamentos intermedios o microfilamentos , se observó (fig 24) que hay un incremento de dichos filamentos visibles a M. E. En caso de tratarse de microfilamentos, se podría pensar que el efecto de CPC es a nivel de actinas, que son el principal componente de estos microfilamentos.

CONCLUSION

De los resultados presentados en este trabajo, se concluye que tanto EDTA, EGTA y CPC, afectan el fenómeno de adhesividad celular en sus tres etapas, sin embargo el efecto de los agentes quelantes es mas marcado en la primera etapa de adhesividad, mientras que CPC presenta su máximo efecto sobre la segunda etapa o extendimiento celular.

RESUMEN

El proceso de adhesividad celular a cajas de petri - de plástico (Falcon), fue observado durante su desarrollo en microscopio de contrase de fases.

Basándose en estas observaciones se dividió el proceso de adhesividad, para su estudio en etapas; contacto celular con el sustrato, extendimiento celular y anclaje - y se estudió el efecto de Clorpromacina, EGTA y EDTA sobre dichas etapas.

La clorpromacina y el EGTA tienen un efecto inhibitorio del 20% en el contacto celular, pero el EDTA tiene un efecto inhibitorio mucho mayor, 70%.

La clorpromacina y el EGTA tienen un efecto similar - cuantitativa y cualitativamente, sobre el extendimiento celular.

Finalmente, el despagamiento celular fue usado como - una medida del anclaje celular.

Tanto los quelantes como la clorpromacina afectaron - primero la morfología celular, pues la célula adquirió una forma redondeada, las tres sustancias despegaron la célula de la caja, siendo el EDTA el que presentó un efecto mucho más marcado.

En conclusión, las tres sustancias usadas afectaron - las tres etapas del fenómeno de adhesividad; sin embargo, el efecto fue más marcado en el extendimiento celular.

APENDICE I

ABREVIATURAS .

- BLEBB: Extensión citoplásmica de uno a dos μ m de diámetro.
- CAP: Zona de la superficie celular en la que se agregan proteínas de la superficie, las cuales migran a dicha zona antes del extendimiento celular formando una especie de gorrito.
- CAPPING: Migración de las proteínas de superficie a una zona determinada de ésta.
- CPC: Clorhidrato de clorpromacina.
- EDTA: Etilen diamin-tetraacético, (sal disódica).
- EGTA: Etilen glicol-bis B- (amino etil eter) N, N'-acido tetraacético.
- LETS: (Large external transformation sensitive protein) glicoproteína de PM 220 000 que se encuentra en la superficie celular.
- MEM: Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle.

- MEM'S: Medio de cultivo (MEM), suplementado con suero de bovino fetal.
- PBS: Solución reguladora de fosfatos (Na_2HPO_4 4mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 2mM), pH 7.3 .
- SBF: Suero de bovino fetal.
- SBF/DIAL: Suero de bovino fetal dializado.

BIBLIOGRAFIA

1. Allison F. Jr; Smith M. R., and Wood W. B., Studies on The Pathogenesis of Active Inflammation; J. Exp. Med. 102. 655- 668 (1955).
2. Badley R. A., Cytoskeletons, Membranes and Fibro_ blasts Adhesion; Cell Biol. Int. Rep. 4, 8 (1980).
3. Badley, R. A., Cytoskeleton Changes In fibroblast - Adhesion and Detachment; J. Cell Sci. 43, 379 - 390 (1980).
4. Boakes, R. J., Bradley, P. B., Candy, J. M., Inter_ actions of (+) amphetamine and Chlorpromazine on - Neurones In the Lower Brain Stem of The Rat. Br. J. Pharmac. 67, 165-171 (1979).
5. Braun J., Fujiwarak et al, Two Distinct Mechanisms For Redistribution of Lymphocyte Surface Macromole_ cules. J. Cell Biol. 79, 419-426 (1978).
6. Boyer, J. L., CPZ and Its Metabolites Alter Polyme_ rization and Gelation of Actin. Science, 206, 1404 1406, (1979).
7. Buckley and Porter, Cytoplasmic Fibrils In Living - Cultured Cells. Protoplasma, 64, 349-380 (1967).
8. Bosman H.B., et al, Surface Biochemical Changes Ac_ compaining Primary Infection With Rous Sarcoma virus

Exp. Cell Res., 83, 15-24 (1974).

9. Byczkowsky, J.Z., Contrasting Effects of Local Anesthetics and Calcium Ionophore. J. Cell Biol. 79, 419-426 (1978).
10. Byczkowsky H. Z., The Action of CPZ and Impriamide on rat Brain Mithochondrie. Gen Pharma 10, 369-372 (1979).
11. Chatouverdi A. K., et al., Influence of Chloropromazine on Calcium Movements and Contractile Responses of Guinea-pig-Ileum, Longitudinal Smooth Muscle To Agonists; Anh. Int. Pharmacodyn. 236, 109-124, (1978).
12. Cooper, H., et al., The Growth of Mouse Neuroblastoma Cells In Controlled Orientations on Thin Films of silicon Monoxide. Exp. Cell Res. 103, 435-439 (1976).
13. Dunn, Locomotion Tissue Cells, Ciba Found. Symp. 14 (NS). 211, (1972).
14. Ebendal, et al, The Relative Roles of Contact Inhibition and Contact Guidance In Orientation of Axons Extending on Aligned Collagen Fibrills in Vitro. - Exp. Cell Res. 14 (NS) 98, 159-169, (1976).
15. Frankel F. R. and Plegman, P. G. W. Organization and Energy-dependant Growth of Microtubules in Cells, Proc. Nath. Acad. Sci. USA, 73, 2798-2802 (1972).
16. Halla D. N.S., Lee S. L. et al., Effect of CPZ and Impriamine on rat Heart Subcellular Membranes. Biochem Pharma 29, 629-633 (1980).

17. Hayne, B. Marcy G., Relationship between the "phos_ pholipidic effect and Calcium In Thiroid. Bioche - mie 61, 905-912 (1979).
18. Gelfand, V. I. Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 215, - 460- 463 (1974).
19. Goldman, R. D. and Knipie, D.M. J. Cell Biol., 51 752-762 (1971).
20. Goldman R. D. and Knipie, D. M., Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 37, 523-534 (1973).
21. Goldman R. D. Pollack, R. and Hopkins N. H. Preser_ vation of Normal Behavior by Enucleated Cells in Cul_ ture. Proc. Nath. Acad. Sci. USA 70, 750-754(1973).
22. Goldman R. D., Lazarides, E. Pollack R. and Weber K. The Distribution of Actin In Non Muscle Cells. Exp. Cell Res.90, 333-344 (1975).
23. Grinnell, F. Concanavalin A Increases Cell Attachment to Substratum. J. Cell Biol 58, 602 (1973).
24. Grinnell, F. Studies on the Mechanism of Cell At_ tachment to a Substratum: Evidence for three Bioche_ mically Distinct Processes, Arc. Biochem. Biophys - 160, 304-310 (1974).
25. Grinnell, F. Studies on the Mechanism of Cell Attach_ ment to a Substratum With Serum in The Medium: Fur_ ther Evidence Suppourtng a Requierement for Two - Biochemically Distinct Processes. Arch. Biochem - Biophys 165, 524-530 (1974).

26. Grinnell, F. Cell Attachment to a Substratum and Cell Proteases, Biochem. Biophys. 169, 474-482 (1975).
27. Grinnell, F. Membranes and Neoplasia: New Approaches and Strategies, (V. T. Marchesi, ed) 227, Alan. R. - Lissis Inc. New York (1976).
28. Grinnell, F. The Serum Dependence of Baby Hamster - Kidney Cell Attachment to a Substratum. Exp. Cell Res. 97, 265-274 (1976).
29. Grinnell, F. Cell Spreading Factor. Exp. Cell Res. 102, 51-62 (1976).
30. Grinnell, F. Cell Adhesion and Cell Spreading: Two separated Phenomena, Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 36, - 835 (1977).
31. Grinnell, F. and Hays, D. Cell Adhesion and Cell Spreading Factor, Exp. Cell Res. 110, 175-190 (1977).
32. Grinnell, F. and Feld M. K., Initial Adhesion of Human Fibroblasts In Serum-free Medium: Possible Role of Secreted Fibronectin; Cell . 17, 117-129 (1979).
33. Haynes, R. O. Alteration of Cell-surface Proteins by Viral Transformation and by Proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3170-3174 (1973).
34. Ivanova, O. Y. and Margolis, L. B. The Use of Phospholipid Film for Shaping Cell Cultures, Nature, - 242, 200-201 (1972).

35. Ivanova, O. Margolis, L. B. Vasiliev, J. M. and - Gelfand I. M. Orientation of Mitosis of Fibro_ blasts Is Determined In The Interphase. Proc. Natl. Sci. USA 71, 2032 (1974).
36. Ivanova O. Y. Margolis L. B. Vasiliev, J. M. and - Gelfand I. M. Effect of Colcemid on The Spreading of Fibroblasts In Culture. Exp. Cell Res. 101, 207-219 (1976).
37. Kallen, B. et al, Studies on Rat Neuroglia Cells in Tissue Culture. Lund, Sweden 458-467. (1980)
38. Klebe, R. J. Isolation of a Collagen-dependant cell Attachment Factor. Nature 250, 248-251 (1974).
39. Klebe, R. J. Cell Attachment to Collagen the Requi_ rement for Energy, J. Cell Phys. 86, 231-236 (1975).
40. Knox, P. et al., A Cell Spreading Factor in Human - Serum That is not Could-Insoluble-Globulin, Exp. Cell Res. 123, (1977).
41. Korey, S. R. And Orchén Mildred; Relative Respira_ tion of Neuronal and Glial Cells, Jour. of Neuro_ chem. 3, 277-285 (1950).
42. Lazarides, E. J. Cell Biol. 65, 459-461 (1975).
43. Lazarides E. J. Histochem Cytochem. 23, 507-528 - (1975).
44. Lazarides, E. and Weber K. Actin Antibody: the Spe_ cific Visualization of Actin Filaments In Non Muscle Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2268-2272 - (1974).

45. Lloyd, C. W. et al., Mechanisms of Cell Adhesion J. Cell Sci. 22, 671-684 (1976).
46. Maroundas R. G., Adhesion and Spreading of Cells on Charged Surfaces, J. Theor. Biol, 49, 417 (1975).
47. Maroundas N. G., Polymer Exclusion, Cell Adhesion and Membrane Fusion, Nature, 254, 695-696 (1975).
48. Maroundas, N. G., Chemical and Mechanical Requirements for Fibroblast Adhesion. Nature 244, 353-354 (1973).
49. Maslow, D. E., and Weiss L. Exp. Cell Res 71, -- 204 (1972).
50. Michaelis and Delgrano, Biochemical Aspects of the Attachment of a pig-Kidney monolayer Cell Line to Glass Surfaces, Exp. Cell Res, 65, 43-48.
51. Moscona A., Nature 190, 408 (1961).
52. Moscona, A., The Cell Surface Development, (A Moscona ed.) 67-100 Wiley New York (1974).
53. Nath R. and Srere P. A. Effects of Temperature Metabolic and Cytoskeletal Inhibitors on The Rate of B. H. K. Cell Adhesion to Polystyrene J. Cell Phys 92, 33-42 (1977).
54. Nicholson G. L., Int Rev. Cytol. 39, 89-190 (1974).

55. Nicholson, et al., Effects of Local Anesthetics on Cell Macrophage Membrane Associated, Cytoskeletal - Organization In BALB 3 T 3 Cells. J. Cell Biol.68, 395.
56. Jakoubek B., Different Effects of CPZ on The Synthesis of Proteins In Cell-free Systems of Rat cortex, Hypocampus, Medulla and Cerebellum. Brain Res. 182, 242-245 (1980).
57. Pollak, et al., Patterns of Organization of Actin - and Miosin In Normal and Transformed Cultured Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 994-998. (1975).
58. Rappaport, C. Chemistry of Biosurfaces, (M. L. Hair ed) 2, 449 (1976).
59. Rabinovitch M. and DeStefano , Macrophage Spreading In Vitro, Exp. Cell Res88, 153-162 (1974).
60. Rabinovitch, R., J. Cell Phys. 85, 189.
70. Rabinovitch R., Use of the Local Anesthetic Lidocaine for Cell Harvesting and Subcultivation. In Vitro 11, 379-381 (1975).
71. Rayan, G. B. et al., Capping of Concanavalin A on Human Polymorphonuclear Leukocytes: Factors Affecting Redistribution of Surface Receptors; J. Cell Biol.-62, 351 (1974).
72. Rosenberg, et al., Microexudates from Cells Growth In Tissue Culture. Biophys. J.1, 137-159 (1960).

73. Rosenberg and Margolis, Cell Guidance by Alterations In Monomolecular Films, Science 139, 411-412 (1963).
74. Schreiner, G. F. and Unanue E. R. Calcium Sensitive - Modulation of Ig Capping Evidence Supporting a Cyto_ plasmic Control of Surface-Receptor Complexes. J. Exp Med. 143, 15 (1976).
75. Schreiner, C. F. Braun J., Unanue, E. R., Spontaneous Redistribution of Surface Immunoglobulin In The Mo_ tile B-Lymphocyte, Jour. of Exp. Med. 144, (1976).
76. Schreiner, G. F., Unane, E. R., The Disruption of In_ immunoglobulin Caps by Local Anesthetics, Clinical Inmu nology and Immunopatology 6, 264_269 (1976).
77. Spooner, et al., Dev. Biol. 35, 13 (1973).
78. Sensebrener, M., et al., Cultivation and Growth of Dis_ sociated Neurons From Chick Embryo Cerebral Cortex In The Presence of Different Substrates. Zeitschrift fur_ Zellfor Schurg und Mikroskopie Anatomic 117, 559 -- (1971).
79. Stocker, M. O' Neil C., Berryman, S. and Waxman V., J. - Cancer, 3, 683 (1968).
80. Takeichi, M. and Okada, T. S., Roles of Magnesium and - Calcium Ions in Cell-to-Substratum Adhesion, Exp. Cell Res. 74, 51-60 (1972).
81. Takeichi, M. and Okada T. S., The Factor Affecting the -

- Spreading of Chondriocytes Upon Inorganic Substrata. J. Cell Sci. 13, 193-204 (1971).
82. Taylor, A. C., Adhesion In Biological Systems; (R. S. Manly ed), 51, Acad. Press, New York (1970).
83. Temin, H. M., et al., Growth Nutrition and Metabolism of Cells In Culture, (G. H. Rothblat and V. J. Christophalo eds.) 1, 50 Academic Press, New York (1973).
84. Thybeg, J. et al., In Vitro Effects of CPZ., on Micro tubules and Golgi Complex in Embryonic Chick Spinal: - Ganglion Cells and Electron Mycroscopic Study. Brain Research 137, 323-332 (1977).
85. Vaheri A. and Rouslati E., Fibroblast Surface Antigen - Produced But Not Retained By Virus-Transformed Human - Cells. Int. J. Cancer 13, 579-586 (1964).
86. Vasiliev, J. M. and Gelfand, I. M., Fundamental Aspects of Metastasis, (L. Weiss, ed) 71 Am. Elseiver New York, - (1976)
87. Vasiliev, J. M. and Gelfand, I. M., Cell Motility, 279-304, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York (1976).
88. Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Zakharova and Ljobimov, A. V., Wound Healing Processes In Cell Cultures. Exp. Cell Res. 54, 83-93 (1969).
89. Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Zakharova and Ljobimov A. V. Contact Inhibition of Phagocytosis in Epitelial - Shets; Alterations of Cell Surface Properties Induced In

- Cell-Cell Contacts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, -
719-722 (1975).
90. Weber, K. et al., Iroc. Natl. Acad.Sci.USA., 71, 4561-
4564.
91. Weber, K., et al., In Scanning Electron Mycroscopy, O. J.
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 4565, (1974).
92. Weiss, P. A. Guiding Principles In Cell Locomotion and -
Cell Aggregation, Exp. Cell Res. suppl. 8, 260-281, --
93. Weiss, P. A. Biological Interactions In Normal and Neo_
plastic Growth, (M. J. Brennan and W. L. Simpson eds), --
(1962).
94. Wessels, M., et al., Locomotion Tissue Cells, Ciba Foun
dation Symp. (1973).
95. Yamada, K. M. et al., Ultrastructure and Function of --
Growth Cones and Axons of Cultured Nerve Cells. J. Cell
Biol. 49, 614-635 (1971).
96. Yasuda, K., et al., Studies on The Factors Affecting Ce
lular Spreading upon Culture-Substrate. J. Cell Sci.,
15, 269-278 (1974).
97. Yavin, E. The Culture of Dissociated Cells From Rat Ce_
rebral Cortex. J. Cell Biol. 57,232-237 (1973).
98. Vragina, E. E. Formation of Bundles of Microfilaments Du
ring Spreading of Fibroblasts on the Substrate.Exp. Cell
Res. 97, 241-248 (1976).

INDICE

1.0	INTRODUCCION	1
2.0	OBJETIVOS	15
3.0	MATERIALES	18
4.0	METODOS	21
4.1	Cultivo Celular Primario	21
4.2	Cultivo Secundario	23
4.3	Cuantificación del porcentaje de células li_	
	bres y adheridas	23
	- Conteo Directo	24
	- Conteo Indirecto	24
	-Método Turbidimétrico	25
4.4	Adhesividad Celular:	
	- Efecto de la CPC sobre la adhesividad celular	
	al sustrato	26
	- Efecto de CPC sobre la adhesividad celular al	
	sustrato con respecto al tiempo	26
	- Efecto de agentes quelantes sobre el fenómeno	
	de adhesividad celular al sustrato en presencia	
	y ausencia de CPC	27
	- Efecto de Iones Calcio sobre la Adhesividad de	
	Glioblastos al sustrato en presencia de CPC	28

- Efecto de la Temperatura Sobre la Adhesividad de Glioblastos Tratafos y no Tratados con CPC_____	28
4.5 Contacto Celular_____	29
4.6 Extendimiento Celular_____	30
4.7 Despegamiento Celular_____	31
- Efecto de CPC Sobre el Despegamiento Celular_____	31
- Efecto de EDTA y EGTA sobre el Despegamiento Celular en Presencia y Ausencia de CPC_____	32
4.8 Microscopía Electrónica_____	34
4.9 Pruebas Estadísticas_____	34
5.0 RESULTADOS:	
5.1 Efecto de Diferentes Condiciones Sobre la Adhesividad Celular al Sustrato_____	35
5.2 Efecto de Agentes Quelantes Sobre la Adhesividad Celular_____	38
5.3 Efecto del Calcio Sobre la Adhesividad Celular al Sustrato_____	44
5.4 Efecto de la Temperatura sobre la Adhesividad Celular_____	45
5.5 Efecto de Diferentes Medios de Incubación Sobre el Contacto Celular con el Sustrato_____	50
5.6 Efecto de Diferentes Medios de Incubación Sobre el Extendimiento Celular_____	54
5.7 Despegamiento Celular_____	54
5.8 Microscopía Electrónica_____	67

5.9 Pruebas Estadísticas	67
6.0 DISCUSION	
6.1 Adhesividad Celular	75
6.2 Morfología, (extendimiento Celular)	76
6.3 Anclaje	79
6.4 Microscopía Electrónica	80
7.0 CONCLUSIONES	81
8.0 RESUMEN	82
9.0 APENDICE	83
10.0 BIBLIOGRAFIA	85
11.0 INDICE	95