

AAQ6215

TESIS
ED 2006
C34

Universidad Católica Andrés Bello
Facultad de Humanidades y Educación
Escuela de Educación
Departamento de Biología y Química

AAQ6215

La célula de Schwann como responsable de la producción de los factores neurotróficos presentes en el medio condicionado por nervio ciático.

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciada en Educación, Mención Biología y Química

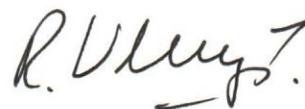
Autor: Valery Chávez
Tutor: Raimundo Villegas

Caracas, Septiembre de 2006

Aceptación del Tutor

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado titulado: “La célula de Schwann como responsable de la producción de factores neurotróficos presentes en el medio condicionado por nervio ciático”, realizado por la Bachiller Valery Chávez para optar al título de Licenciada en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del jurado examinador designado

En Caracas, a los 11 días del mes de Septiembre de 2006



Raimundo Villegas
C.I. 940.347

*A mis padres por darme
la oportunidad de venir al mundo
para llenarlos de amor, alegrías y satisfacciones*

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por haberme guiado a lo largo de los seis años de mi carrera, y en la construcción de este trabajo.
- Al Doctor Raimundo y a la Doctora Gloria por ser tan especiales conmigo, por abrirme las puertas de sus laboratorios, por acompañarme durante el desarrollo de mi trabajo y por haberme brindado tanto apoyo. Muchas Muchas Gracias!
- A mis Padres por apoyarme desde el principio con mis estudios y ahora con mi trabajo de grado. Los Adoro.
- A Catire y a Cris por estar siempre pendiente de mi.
- A Ernesto por ser mi compañero y amigo fiel en todo momento.
- Al Instituto de Estudios Avanzados IDEA, y en especial a todo el equipo del Centro de Biociencias por abrirme sus puertas para trabajar junto a ellos durante el desarrollo de mi trabajo de grado.
- A Marianela, Jorge, Jerónimo, Elías, Lisbeth, Arnaldo y Elizabeth por apoyarme incondicionalmente.
- A Mary y Lisset por estar siempre pendiente de mi.
- Sin ser menos importante a la Universidad Católica Andrés Bello por ser mi eterna casa de estudios. Gracias por hacerme una profesional.
- A todos mis amigos simplemente por estar siempre conmigo.
- Si se me escapa alguien ofrezco disculpas, pero una vez más a todos Mil Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Índice	5
Lista de Figuras	6
Introducción	11
Lista de abreviaturas	12
Capítulo I. El Problema	13
1. Planteamiento del problema	13
2. Justificación	13
3. Objetivo General	14
4. Objetivos específicos	14
5. Alcances y Limitaciones	15
Capítulo II. Marco Teórico	16
1. Bases Teóricas y referenciales	16
2. Antecedentes de la Investigación	18
Capítulo III. Metodología	21
Capítulo IV. Resultados y Análisis de los Resultados	29
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	59
Referencias	60

LISTA DE FIGURAS

1. Micrografía de luz tomada con aumento de 32X que muestra un campo tomado a partir de un cultivo de células de Schwann, conformado por tres de dichas células dispuestas en forma de rosario señaladas con una flecha de color azul. A la derecha marcado con flecha de color naranja se puede observar la presencia de un fibroblasto. (Página 13)
2. Micrografía electrónica de un corte transversal de nervio ciático. Si se observa la imagen desde la parte más externa y señalado con la flecha amarilla encontramos el epineuro, la flecha azul señala el perineuro y la flecha naranja el endoneuro. (Página 14)
3. La imagen al lado izquierdo muestra un grupo de células PC12 control típicas. Nótese que la morfología de las mismas es esférica con núcleo redondo, grande y claro con un nucleolo definido y sin extensión de neuritas, o con neuritas cortas. A la derecha células PC12 que han sido estimuladas con factores de crecimiento neuronal, hecho que permite elongar sus cuerpos celulares y extender neuritas con conos de crecimiento bien definidos. (Página 16)
4. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 24 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control. (Página 25)
5. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 26)
6. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 27)
7. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 27)
8. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 28)

9. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 29)
10. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 48 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control. (Página 30)
11. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 31)
12. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 32)
13. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 32)
14. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 33)
15. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 34)
16. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 72 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control. (Página 35)
17. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC

corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 36)

18. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 36)
19. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 37)
20. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 37)
21. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 38)
22. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 24 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCSch I, (B) Efecto MCSch II, (C) Efecto MCSch III, (D) Efecto MCSch IV, (E) Efecto MCSch V, (F) células control. (Página 39)
23. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 23)
24. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 41)
25. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 42)

26. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 42)
27. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 43)
28. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 48 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCSch I, (B) Efecto MCSch II, (C) Efecto MCSch III, (D) Efecto MCSch IV, (E) Efecto MCSch V, (F) células control. (Página 44)
29. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 48)
30. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 46)
31. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 46)
32. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 47)
33. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 47)

34. Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 72 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCSch I, (B) Efecto MCSch II, (C) Efecto MCSch III, (D) Efecto MCSch IV, (E) Efecto MCSch V, (F) células control. (Página 48)
35. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 49)
36. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 50)
37. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 51)
38. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 51)
39. Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 52)
40. Gráfica del promedio de los porcentajes de diferenciación celular a las 24, 48 y 72 horas de haber iniciado el ensayo sobre células PC12. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 53)
41. Gráfica del promedio de los porcentajes de diferenciación celular a las 24, 48 y 72 hora de haber iniciado el ensayo sobre células PC12. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas. (Página 54)

INTRODUCCIÓN

El presente Proyecto del Trabajo de Grado para optar por el Título de Licenciada en Educación, Mención Biología y Química, plantea la situación reportada por investigaciones previas, en las que se atribuye el efecto diferenciador observado en células de tejido nervioso en cultivo, a las células de Schwann; siendo éstas, por su parte, las células gliales responsables de mielinizar el sistema nervioso periférico.

Ahora bien, cuando se producen lesiones a nivel de nervios periféricos, se originan una serie de procesos que conllevan a la reparación del daño provocado. De esta manera entonces, un individuo que haya sido lesionado podrá recuperar, dependiendo del tipo de daño el cien por ciento de sus funciones.

La idea de este trabajo es tratar de explicar si realmente el efecto que producen las células de Schwann sobre un tejido lesionado, es el responsable de la reparación nerviosa. Para ello se realizaron una serie de actividades en el laboratorio, cumpliendo así con los objetivos propuestos, de manera que se plasmaran posteriormente en este escrito el cual fue dividido de la siguiente forma: **Capítulo I** donde se expone el planteamiento del problema debidamente justificado y los objetivos de la investigación; así como los alcances y las limitaciones de la misma. **Capítulo II** en el que han sido desarrollados los antecedentes de la investigación, y las bases teóricas. **Capítulo III** el cual se señala en forma detallada la metodología a emplear para dar respuesta a los objetivos propuestos. **Capítulo IV** presenta en forma detallada todos los resultados obtenidos, así como la justificación de los mismos. Finalmente en el **Capítulo V** se proponen las ideas que concluyen la investigación.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNP: Sistema Nervioso Periférico

MCC: Medio Condicionado por Nervio Ciático

MCSch: Medio Condicionado por Células de Schwann

DMEM: Dulbecco`s Modified Eagle Médium

DMEM + 10% SFB: Dulbecco`s Modified Eagle Medium más 10% de suero fetal Bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

NGF: Factor de Crecimiento Neuronal

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

NT-3: Neurotrofina 3

CNTF: Factor Neurotrófico Ciliar

GDNF: Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales

IL-6: Interluquina 6

TNF α : Factor de Necrosis Tunomal α

LIF: Factor Inhibidor de la Leukemia

CC: Células Control

CNC: Células con Neuritas Cortas

CNL: Células con Neuritas Lagras

Capítulo I.

El problema

Debido a la importancia biológica que se le viene dando a la actividad celular sobre procesos regenerativos de diferentes organismos y en especial para el hombre, nos hemos dedicado a estudiar en detalle, la participación de la célula de Schwann en la regeneración del sistema nervioso periférico; para lo cual se ha planteado la siguiente pregunta:

¿Es la célula de Schwann la responsable de producir los factores neurotróficos presentes en el medio condicionado por nervio ciático, determinantes de la diferenciación neuronal de las células PC12 en cultivo?.

Gracias a los experimentos realizados por Ramón y Cajal en el siglo XIX y comienzos del XX, así como otros científicos del siglo XX y del presente, se han podido conocer una serie de avances científicos en las Neurociencias. Parte de esos estudios se han dedicado a la capacidad regenerativa del Sistema Nervioso Central, la cual ha sido desde siempre un completo enigma.

En la actualidad para nadie es un secreto que las lesiones del Sistema Nervioso Central, a diferencia del Sistema Nervioso Periférico; son en la mayoría de los casos irrecuperables. Por ello, actualmente muchos científicos se han centrado en la tarea de tratar de dar respuesta al por qué de la tan marcada diferencia entre ambos sistemas, a pesar de que forman parte de un mismo individuo en estudio.

A pesar de los avances logrados hasta ahora, aún existen divergencias con respecto a cuál es el tipo celular que realmente participa en el fenómeno estudiado. Algunos científicos en el caso de lesiones en un nervio periférico, opinan que es la célula de Schwann la responsable de producir factores neurotróficos, los cuales en conjunto son responsables de producir cambios regenerativos en un nervio lesionado; algunos de dichos factores son las llamadas neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3), la linfoquina CNTF derivada

del ganglio ciliar, el GDNF, la interleukina IL-6, y otros como TNF α y LIF. Bunge, 1994 y otros (citado en Mendoza y col., 2002)

Por el contrario cuando se habla del Sistema Nervioso Central asociado a este tema, aparecen no factores tróficos, sino inhibidores que posiblemente sean los responsables de la no regeneración de un nervio central lesionado.

De esta manera, entonces, nos hemos concentrado en estudiar, a nivel del Sistema Nervioso Periférico, el posible responsable de la regeneración; en tal sentido y apoyando la tesis de muchos autores, se ha considerado a la célula de Schwann como la responsable de dicha regeneración.

Para dar respuesta a la ya mencionada situación, se ha propuesto como objetivo general, el “Comprobar si la célula de Schwann es la responsable de producir los factores tróficos que se encuentran presentes en el medio condicionado por nervio ciático, determinantes de la diferenciación neuronal de las células PC12 en cultivo”.

A partir de ese objetivo general anteriormente señalado se han puntualizado los siguientes objetivos específicos que contribuirán a dar respuesta al problema, y los cuales son:

- Preparar cinco medios condicionados por nervios ciáticos (MCNCs) de rata adulta, que serán colectados el día doce de cultivo.
- Preparar cinco medios condicionados por células de Schwann (MCSch) de nervios ciáticos de rata adulta, que serán colectados el día 12 de cultivo.
- Probar la actividad de cada uno de los medios condicionados sobre células PC12.
- Evaluar por métodos estadísticos la actividad neurotrófica sobre células PC12, de cada uno de los medios condicionados.

- Determinar la concentración de proteínas de cada uno de los medios condicionados.

Alcances y Limitaciones

Como ya se ha dicho anteriormente, para el desarrollo de este trabajo de investigación se propusieron una serie de objetivos diseñados a partir de una hipótesis o pregunta planteada, para dar inicio al proyecto, de esa manera y a nivel de alcances, se ha considerado que el trabajo debe ir en el orden en que se han expuesto los objetivos específicos, desde la preparación en el laboratorio de los medios condicionados por nervio ciático y por células de Schwann, hasta la determinación de la concentración proteínas, presentes en cada uno de dichos medios, de manera que al final, se pueda realizar un análisis comparativo en el que se establezcan, tanto semejanzas como diferencias, con respecto al efecto que producen ambos medios condicionados sobre las células PC12.

Por otra parte, es de resaltar que la principal limitación que ha afrontado el proyecto de investigación es el factor tiempo, puesto que los medios de cultivo y en especial el medio condicionado por células de Schwann presenta una serie de condiciones especiales que deben ser tomadas en cuenta a la hora de preparar dicho medio.

Para el caso del medio condicionado por nervio ciático, es indispensable contar con los materiales necesarios para su preparación, además de disponer de doce (12) días de espera para así obtener la colecta de 9-12 días de cultivo; mientras que por el contrario, para la obtención de medio condicionado por células de Schwann de 9-12 días es necesario contar con diferentes medios de cultivo, así como frascos de cultivo pretratados con colágeno y enzimas, entre otros elementos, que más adelante serán señalados en el marco metodológico del trabajo; además, quizás el tiempo fue el elemento que siempre influyó negativamente la celeridad de la investigación, puesto que se necesitan veintisiete (27) días para la obtención del medio condicionado por células de Schwann (MCSch), hecho que obligatoriamente marcó la pauta para la creación de un calendario de trabajo en el cual se especificaban las fechas de extracción de nervios para la preparación de cada uno de los medios condicionados.

Capítulo II

Marco Teórico

Primeramente es necesario aclarar que el sistema nervioso, como lo expone Kamina (1997), es un tejido constituido por estructuras que se encargan de recibir, integrar, transformar y transmitir la información proveniente del medio que rodea al individuo o del propio organismo, asegurando así, la regulación de las diferentes funciones del mismo. De igual forma, cabe acotar que el sistema nervioso se clasifica en dos tipos:

- Sistema Nervioso Central, caracterizado por ser la parte integradora del tejido
- Sistema Nervioso Periférico, cuya función es receptora y efectora. (p. 155)

Por otra parte, Kamina (1997) dice que el Sistema Nervioso Periférico (SNP) es el encargado de establecer la relación entre los centros nerviosos y los órganos efectores o receptores; además conduce los impulsos nerviosos y participa en la regulación de las diversas funciones del organismo. Para ello se encuentra constituido por ganglios y nervios. (p.172)

De igual manera Ramos (1981), describe que el SNP "...está conformado estructuralmente de una manera muy sencilla: sus componentes fundamentales, las **fibras nerviosas periféricas**, se agrupan en manojos llamados **nervios** y se distribuyen por todas las regiones del organismo..." (p. 113). Se ha hecho esta referencia especial a los nervios, debido a que son el componente del SNP que será empleado como material del trabajo experimental para el desarrollo de la presente investigación.

Los nervios y específicamente los periféricos, dice Kamina (1997); son conocidos como nervios espinales, debido a que las neuronas que los originan están en la médula espinal (p. 172), por lo cual el nervio ciático de rata adulta, que será el material biológico a emplear para la investigación, entra dentro de esta clasificación.

Ahora bien, como todo nervio, el nervio ciático se encuentra constituido por unidades denominadas fibras nerviosas, dispuestas en paralelo y agrupadas en fascículos,

de manera tal que el conjunto de varios fascículos constituye un nervio periférico. (Leeson, Lesson y Paparo, 1988, p. 92)

Histológicamente, cada fibra nerviosa de un nervio periférico, está conformada por el axón de una neurona situada en la médula espinal, axón que está revestido por una capa de células satélites gliales, conocidas como células de Schwann. Las fibras a su vez, se encuentran separadas unas de otras por tejido conjuntivo (fibroblastos y fibras colágenas) que constituye el llamado endoneuro. (Fawcett y Bloom, 1995, p. 375)

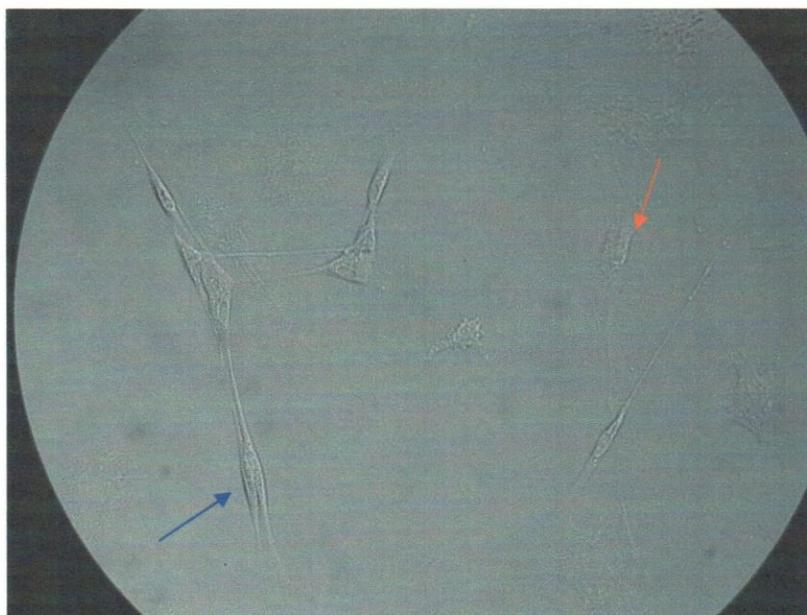


Fig.1 Micrografía de luz tomada con aumento de 32X que muestra un campo tomado a partir de un cultivo de células de Schwann, conformado por tres de dichas células dispuestas en forma de rosario señaladas con una flecha de color azul. A la derecha marcado con flecha de color naranja se puede observar la presencia de un fibroblasto.

Por su parte un haz de fibras nerviosas o también llamado fascículo, está individualizado por un revestimiento periférico conocido como perineuro y formado por capas concéntricas de células, separadas dichas capas entre sí por fibras colágenas. En cada capa concéntrica, los extremos de las células perineurales están conectados con los de sus vecinas por uniones epiteliales estrechas, distribución anatómica que protege a las fibras nerviosas de la libre difusión de todo tipo de compuestos que puedan circular desde el exterior del nervio. (*ibidem*)

Es importante resaltar que por la existencia de estas uniones epiteliales estrechas, aunado a la presencia de una membrana o lámina basal recubriendo la membrana plasmática de cada célula del perineuro, es por lo que se acepta hoy día que el epineuro es una capa epitelial y no de tejido conjuntivo.

Por último un tronco nervioso o nervio (como el ciático) está formado por 2 ó 4 fascículos, mantenidos juntos por un revestimiento de tejido conjuntivo (colágeno y fibroblastos) conocido como epineuro y el cual es una capa gruesa, blanca y brillante que permite reconocer de inmediato los nervios durante su disección. (*ibidem*)

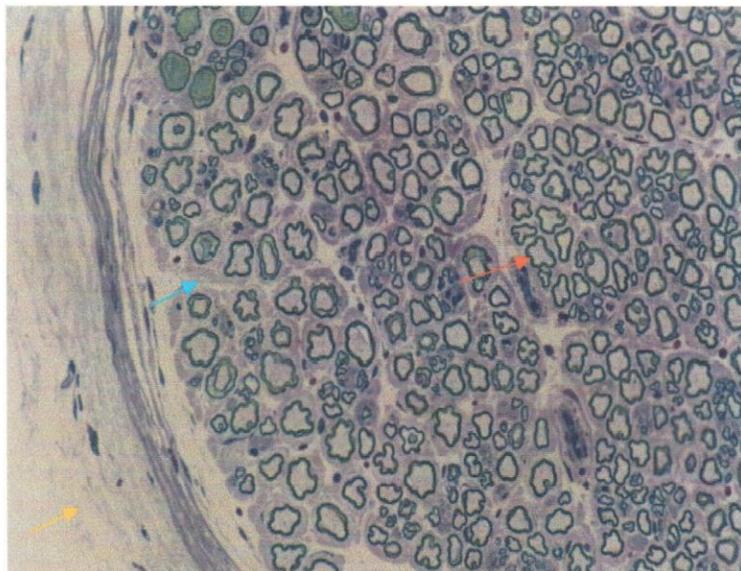


Fig. 2 Micrografía electrónica de un corte transversal de nervio ciático. Si se observa la imagen desde la parte más externa y señalado con la flecha amarilla encontramos el epineuro, la flecha azul señala el perineuro y la flecha naranja el endoneuro.

Como se mencionó anteriormente, las células de Schwann constituyen la glía envolvente de los nervios del SNP, sistema responsable de la transmisión de los impulsos nerviosos. Ellas se originan de la cresta neural. Y sus funciones principales son de protección y soporte metabólico de los axones, proporcionan sostén mecánico, funcionan mediante la capa de mielina, formada por su propia membrana plasmática, como aislantes para la conducción del impulso nervioso. Además, son responsables de captar y almacenar sustancias que actúan como neurotransmisoras. (Muñetón, 1998, p.46)

Griffin y col.(1993) y Ziller y otros en el mismo año (citados en Muñetón y col., 1998) afirman que las células de Schwann facilitan la regeneración axonal cuando se producen lesiones en el sistema nervioso periférico, proporcionando soporte físico y metabólico (moléculas neurotróficas y de adhesión) al tejido en regeneración.

Por su parte, Gold y col. (1995) aseguran que las células de Schwann son también responsables de eliminar restos neuronales mediante procesos fagocitarios, en caso de lesiones, además de formar el tejido cicatricial e intervenir en la inmunidad local de la lesión.

Según una publicación de Myrna y Dent (2003), el sistema nervioso periférico se caracteriza por una excelente regeneración axonal, tanto en mamíferos adultos como en el resto de los vertebrados (p. 68). De igual forma, muchos autores entre los que se encuentran Mendoça y col. han tratado de explicar dicho fenómeno implicando a la célula de Schwann, como la responsable de la producción de factores neurotróficos que conllevan a la futura regeneración de un nervio lesionado; para ello plantean la estrecha relación entre diferentes citoquinas y neurotrofinas producidas por la célula de Schwann, que juegan un papel fundamental en la vida de las neuronas, durante el desarrollo y en el estado adulto de un individuo. (p. 11-12)

Asímismo Evans (2001) asegura y confirma lo que muchos autores han manifestado y es que el SNP es capaz de regenerar por presencia de células de Schwann.

Por su parte, Villegas R. y col. en diferentes investigaciones publicadas en los años 2000 y 2005 han reportado que el medio condicionado por nervio ciático (MCC), es decir medio en el que se han mantenido los nervios ciáticos en cultivo, es capaz de producir la diferenciación neuronal en una línea clonal de células modelo; células PC12, atribuyendo dicha diferenciación a la presencia de factores neurotróficos; específicamente a la neuregulina. Dicho efecto además, cabe resaltar que es significativo a partir de las 48 horas contadas desde el inicio del ensayo.

Así mismo Villegas, Haustein y Villegas (1995) afirman que ciertamente el MCC es capaz de producir efectos diferenciadores sobre células PC12, atribuyendo la responsabilidad de dicho efecto entre otras cosas al NGF.

En investigaciones posteriores del mismo grupo, Malavé y col. (2003) identificaron, mediante técnicas de biología molecular e inmunología, el rol que cumple otro factor neurotrófico que recibe el nombre de glypicán, asociando a este proteoglicano con la producción de un efecto diferenciador de células nerviosas modelo como las PC12 en cultivo. (p. 74-81)

De igual forma, Bolin y Shooter (1994) reportaron que la célula de Schwann facilita el crecimiento de los axones durante el desarrollo y la regeneración de nervios lesionados. (p. 23)

Es importante resaltar que así como los nervios ciáticos de rata adulta serán parte del material biológico necesario para el desarrollo de la presente investigación, también se hará uso de las células PC12 una línea clonal de células, derivadas de un tumor suprarrenal, y por lo tanto de origen simpático, que se caracterizan por expresar características neuronales cuando son sometidas a condiciones específicas de estimulación con factores de crecimiento neuronal (Lloyd y Tischler, 1976, p. 2424).

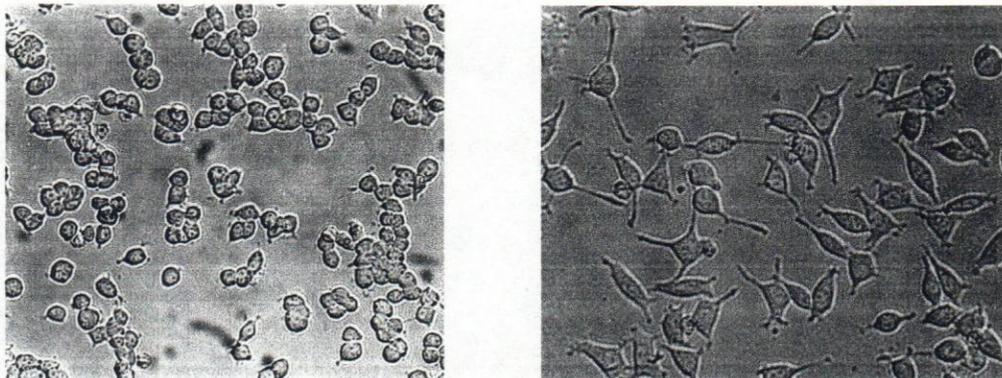


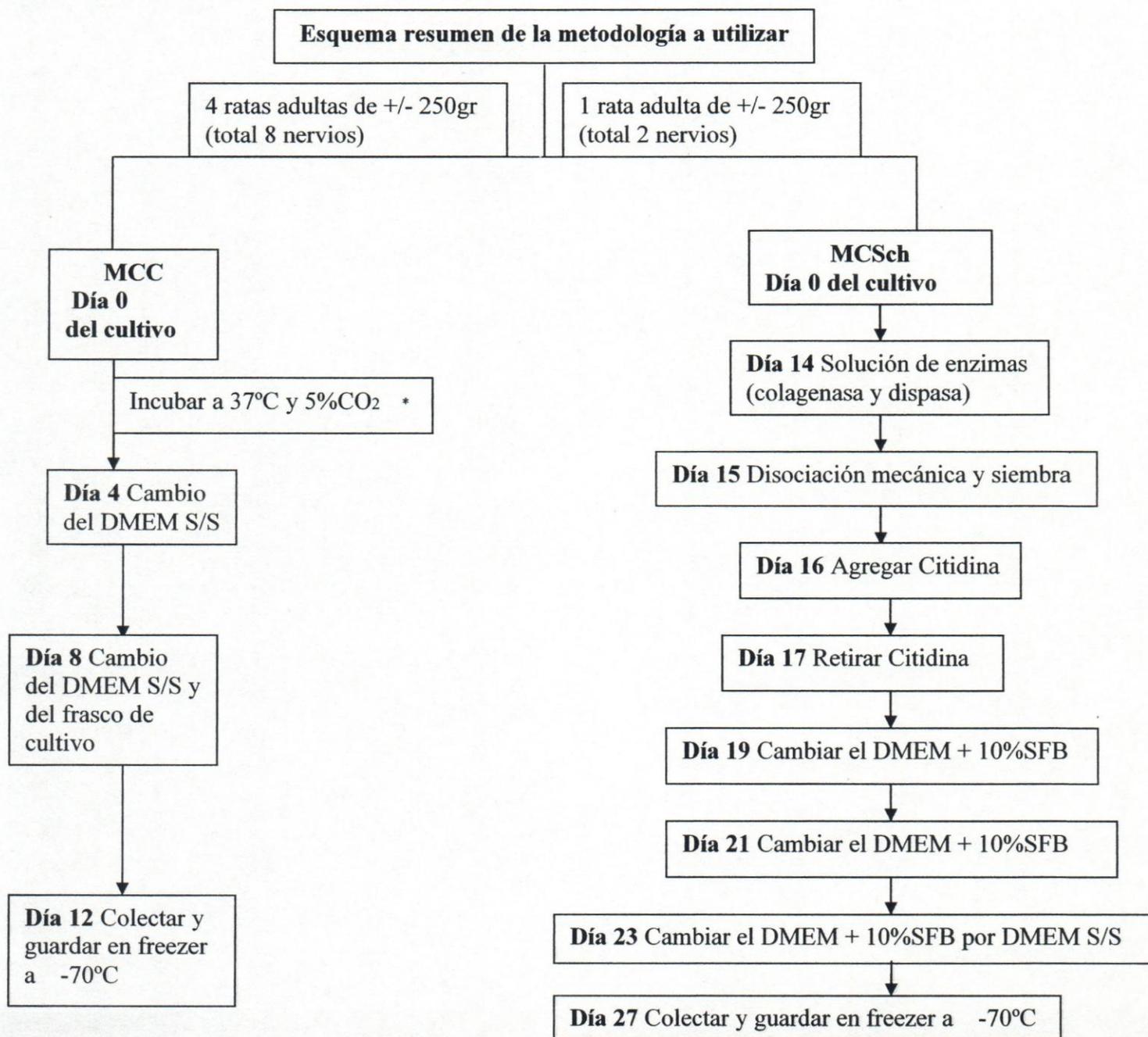
Fig. 3 La imagen al lado izquierdo muestra un grupo de células PC12 control típicas. Nótese que la morfología de las mismas es esférica con núcleo redondo, grande y claro con un nucleolo definido y sin extensión de neuritas, o con neuritas cortas. A la derecha células PC12 que han sido estimuladas con factores de crecimiento neuronal, hecho que permite elongar sus cuerpos celulares y extender neuritas con conos de crecimiento bien definidos.

Finalmente es importante resaltar que la línea celular PC12 ha sido establecida a partir de actividades experimentales realizadas con neuroblastomas humanos y murinos y de tumores desarrollados en el sistema nervioso central de ratas. (*ibidem*)

Capítulo III

Metodología

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, será necesaria la puesta en práctica de los siguientes protocolos de cultivos celulares:



***Nota: la incubación bajo estas condiciones se cumple entre cada uno de los pasos seguidos para mantener los cultivos bien sea nervio ciático o de células de Schwann.**

- **Protocolo para la preparación de medio condicionado por Nervios Ciáticos.
Tomado de Villegas, Haustein y Villegas (1995)**

1. "Usar ratas Sprague-Dawley adultas de 250-300gr. Sacrificarlas en cámara de CO₂ y luego decapitarlas con guillotina en una campana de extracción.
2. Dentro de la campana, sumergir la mitad posterior del animal en agua clorada al 50%, luego lavar en etanol al 70%.
3. Colocar el animal sobre una tabla de disección desinfectada con etanol al 70% y cubierta con papel de aluminio o plástico y servilleta.
4. Limpiar la piel del animal con etanol al 70%.
5. Con tijera estéril, cortar la piel a nivel de la cola e introducir dicha tijera entre la piel y el músculo para separarlos por divulsión. Levantar la piel hacia la cabeza como haciendo una ventana.
6. Limpiar los músculos de restos de pelo, con etanol al 70%.
7. Fuera de la campana y sobre una tabla de disección similar a la anterior, con tijera estéril, cortar a través de la fascia oblicua que sigue el trayecto del fémur, para exponer el nervio ciático.
8. Disecar el nervio con tijera de punta fina estéril, desde su emergencia de la escotadura isquiática hasta debajo de la rodilla. Dejar las ramas colaterales unidas al nervio. Cortar los extremos tanto proximal como distal, cuidando de no cortar los vasos sanguíneos. Hacer lo mismo para obtener el otro nervio ciático.

9. Una vez extraídos los nervios con sus ramas colaterales, irlos colocando en cápsula de Petri estéril de 35mm de diámetro, con PBS estéril, hasta un número de ocho nervios por cápsula.
10. Descartar el animal.
11. Se llevan las capsulas a una campana de flujo laminar y se procede a lavar los nervios, sucesivamente en cuatro cápsulas más, con solución PBS estéril, usando la misma pinza.
12. De la cuarta cápsula de Petri y con una nueva pinza, se introducen los ocho nervios en un frasco de cultivo T-25 estéril, previamente irradiado con luz UV y con 6ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), sin sueros.
13. Se seca la boca del frasco con un hisopo estéril y se lleva a incubación a 37°C y 5% de CO₂. Se debe aflojar un poco la tapa del frasco para así permitir el intercambio gaseoso.
14. El medio condicionado por Nervios Ciáticos deberá ser colectado el día doce de cultivo, contado a partir del día de extracción de los nervios y tomando en cuenta que cada cuatro días deberá ser cambiado el DMEM sin sueros por medio fresco.

Nota: la colecta se realizará en tubos cónicos de 15ml y en dos Eppendorfs con 1.5ml cada uno aproximadamente, que luego serán congelados a -70°C hasta el momento de la determinación de la concentración de proteínas en el medio y de su uso.

15. Una vez colectado el medio condicionado, se tomará una muestra para probar y evaluar su actividad neurotrófica sobre células PC12 previamente sembradas, de 6 a 24 horas antes". (p. 78)

- **Protocolo para la preparación de medio condicionado por células de Schwann.**
Tomado de Muñetón, Garavito y Hurtado (1998)

1. “Usar ratas Sprague-Dawley adultas de 250-300gr. Sacrificarlas en cámara de CO₂ y luego decapitarlas con la guillotina en campana de extracción.
2. Dentro de la campana, sumergir la mitad posterior del animal en agua clorada al 50%, luego lavar en etanol al 70%.
3. Colocar el animal sobre una tabla de disección desinfectada con etanol al 70% y cubierta con papel de aluminio o plástico y servilleta.
4. Limpiar la piel del animal con etanol al 70%.
5. Cortar la piel a nivel de la cola e introducir tijera estéril entre la piel y el músculo para separarlos por divulsión. Levantar la piel hacia la cabeza como haciendo una ventana.
6. Limpiar los músculos de restos de pelo, con etanol al 70%.
7. Fuera de la campana y sobre una tabla de disección similar a la anterior, con tijera estéril, cortar a través de la fascia oblicua que sigue el trayecto del fémur, para exponer el nervio ciático.
8. Diseccionar el nervio con tijera de punta fina estéril, desde su emergencia de la escotadura isquiática hasta debajo de la rodilla. Dejar las ramas colaterales unidas al nervio. Cortar los extremos, tanto el proximal como el distal, cuidando de no cortar los vasos sanguíneos. Hacer lo mismo para obtener el otro nervio ciático.
9. Una vez extraídos ambos nervios con sus ramas colaterales, colocarlos en cápsula de Petri estéril de 35mm de diámetro y con PBS.

10. Descartar el animal.
11. En campana de flujo horizontal en una cápsula de Petri estéril con DMEM + 10%SFB y bajo la lupa con aumento de 8x, sostener con una pinza el extremo proximal, quitar con otra pinza el epineuro como si fuera una media, yendo desde el extremo proximal al distal.
12. Colocar los dos nervios limpios en cápsula de Petri de vidrio, estéril, a la cual se le ha agregado DMEM + 10%SFB.
13. En la misma cápsula, realizar cortes transversales de 1mm de grosor aproximadamente, de los nervios ciáticos y sus ramas laterales con el bisel de una aguja hipodérmica (calibre 20).
14. En un frasco de cultivo T-25 con 5ml de medio de cultivo DMEM + 10%SFB, pasar los cortes del nervio con una pipeta Pasteur de vidrio y dejarlos en degeneración por catorce días en incubadora con 5% de CO₂ y 37°C.
15. Una vez transcurridos los catorce días de degeneración de los explantes, pasarlos con el medio de cultivo a un T-25 nuevo con una pipeta Pasteur de vidrio, (tener cuidado de no despegar los fibroblastos adheridos al fondo del frasco de cultivo). Agregar 4ml de una solución de colagenasa (0.241mg/ml) y dispasa (1.94mg/ml), en DMEM + 10%SFB, filtrándola estéril sobre los explantes, a través de una membrana de 0.22 µm y dejar incubando toda la noche a 37°C y 5%CO₂.
16. El día quince disociar mecánicamente (de manera gentil) los explantes en el mismo frasco de cultivo, con tres pipetas Pasteur de diferente diámetro de punta cada una, comenzando la disociación con la de mayor diámetro.
17. Pasar el homogeneizado con pipeta Pasteur de vidrio a un tubo cónico de 15ml y agregar 8ml de DMEM + 10%SFB; es decir, el doble del volumen de la solución de

enzimas, para frenar la acción de las mismas y centrifugar luego a 1000 rpm durante 5-7min.

18. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5ml de DMEM + 10%SFB.
19. Lavar los frascos T-25 previamente tratados con colágeno tipo I, con aproximadamente 1.5ml de DMEM + 10%SFB.
20. Agregar 5ml de DMEM + 10%SFB a cada frasco de cultivo.
21. Sembrar en cada T-25, 500µl de suspensión de células, completando así un volumen total de solución de 5,5ml por cada frasco, y para asegurar un buen intercambio de gases con el medio dejar la tapa no ajustada. Nota: este día es el día de siembra y por tanto, será tomado como el primer día de cultivo de las células de Schwann.
22. Secar la boca de cada frasco con bomba de succión y después con hisopo estéril, antes de taponarlos, e incubar a 37°C y 5%CO₂.
23. A las 24 horas de haber realizado la siembra, agregar 50 µl/ml de Citidina (Citosina – arabinósido) 1mM y dejar por 24 horas más, para disminuir o eliminar la población de fibroblastos, ya que se encuentran en actividad mitótica; hecho que los hace sensibles a la citidina.
24. A las 24h, retirar el medio con Citidina y lavar los frascos, con 1.5ml de DMEM + 10%SFB, para eliminar los restos de Citidina.
25. Agregar 5ml de DMEM + 10%SFB fresco y dejar incubando nuevamente.
26. Cambiar el medio cada 48 horas, tomando en cuenta que el medio de cultivo no caiga sobre la pared del frasco donde están sembradas las células, para que no se desprendan.

27. El día 8, contado a partir del día de siembra; retirar el DMEM + 10%SFB, lavar los frascos con aproximadamente 1.5ml de DMEM sin sueros para eliminar los restos del SFB. Finalmente agregar 5ml de este mismo medio de cultivo a cada frasco.

28. Repetir el punto 22.

29. El día doce, coleccionar el medio condicionado por células de Schwann en tubos cónicos de 50ml y en 3 Eppendorfs. Estos últimos, para probar y evaluar su actividad sobre células PC12 previamente sembradas. El resto del medio condicionado deberá ser congelado hasta que se realice la determinación de la concentración de proteínas contenidas en dicho medio y proceder de inmediato a su uso” (p. 45-54).

- **Protocolo para obtener medio condicionado por células de Schwann, con disminución de la contaminación por fibroblastos. Modificación realizada en el laboratorio, del protocolo propuesto por Muñetón, Garavito y Hurtado.**

En este protocolo se deberán seguir los mismos pasos del método anterior, con la única diferencia que en este protocolo no se utilizarán las ramas colaterales del nervio ciático sino la rama principal.

- **Protocolo para obtener cultivos de células PC12 a partir de cultivos establecidos en el laboratorio. tomado de Villegas y col. 1995**

1. Con una pipeta Pasteur de punta curva se succiona el medio de cultivo viejo y se descarta.
2. Con una pipeta nueva de 5ml se agregan 4ml de DMEM-USO, tomando en cuenta que no se debe tocar la boca del frasco de cultivo.

3. Con otra pipeta Pasteur y una propipeta automática se procede a desprender las células de la pared del frasco de cultivo T-25, mediante aspiración y expiración del líquido en el frasco. Finalmente se aspira la mezcla de células más medio de cultivo y se coloca en tubo cónico de 15ml.
4. Con una pipeta Wilson de 200 μ l se procede a agitar suavemente y a tomar 50 μ l de la suspensión de células, para realizar una dilución 2:1 con azul Tripán.
5. Una vez realizada la dilución, se carga la muestra en un hemocitómetro y se procede a contar en un microscopio de luz la cantidad de células presentes en la muestra.
6. Finalmente, con el número total de células contadas, se procede a realizar los cálculos necesarios para sembrar las células PC12 a razón de 8000 células por pozo en placas de 48 pozos.

Capítulo IV

Resultados y Análisis de los Resultados

1. Prueba de los Medios Condicionados por Nervio ciático sobre células PC12

Una vez preparados los medios condicionados se procedió a probar dichos medios para observar su efecto sobre las células PC12, obteniendo así los siguientes resultados a las 24 horas de haber iniciado el ensayo:

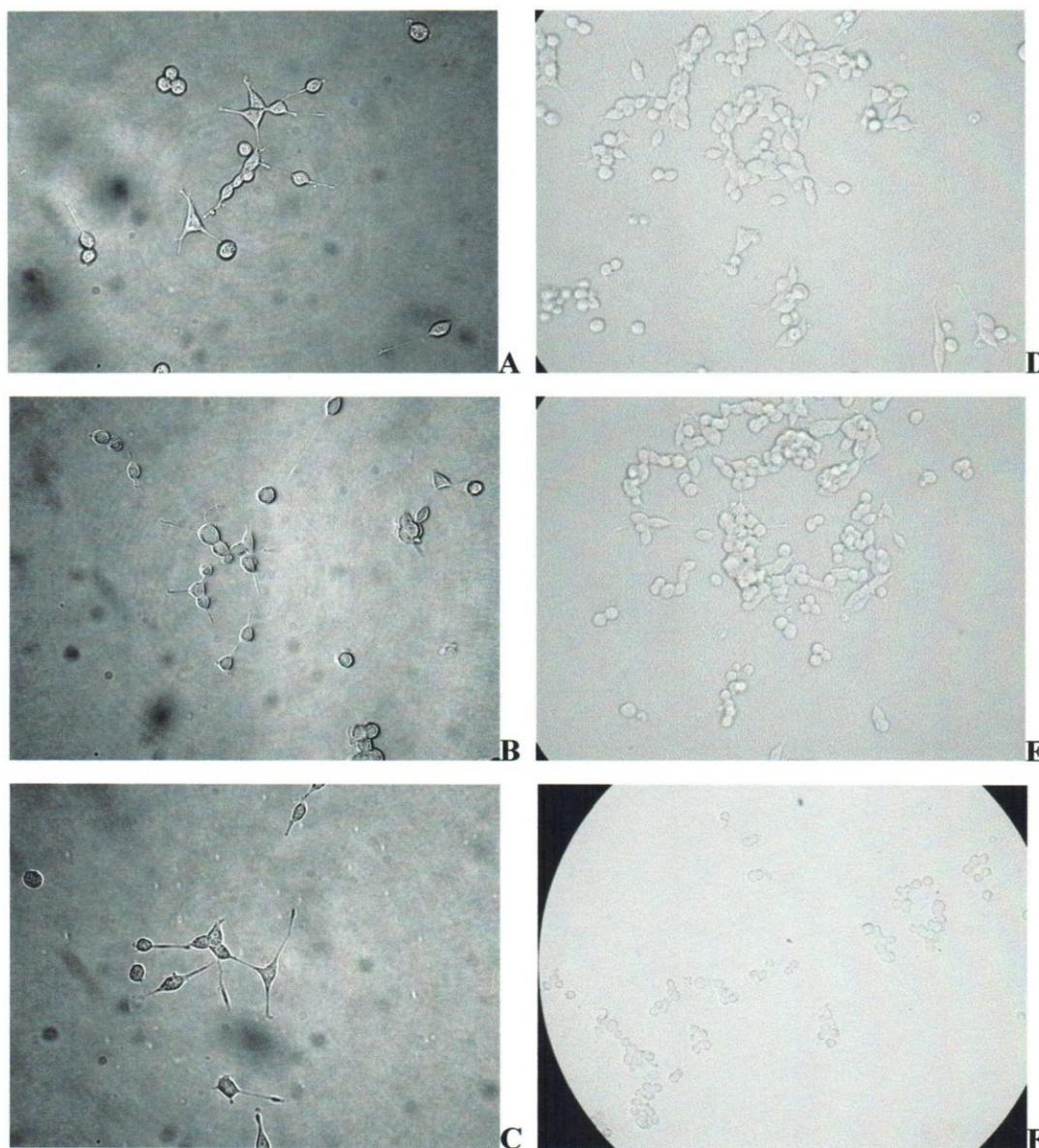


Fig.4 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 24 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control.

Las figuras presentadas anteriormente ofrecen una muestra clara del efecto neuritogénico que producen los medios condicionados por nervio ciático a las 24 horas de haber realizado el ensayo.

Si se compara el efecto de cada uno de los medios condicionados con la microfotografía de luz que muestra las células control, es evidente que los medios producen cambios significativos en la morfología de las células a las primeras 24 horas de haber realizado el experimento.

A nivel estadístico si se comparan los porcentajes de diferenciación de las células, se puede observar el resultado presentado a continuación:

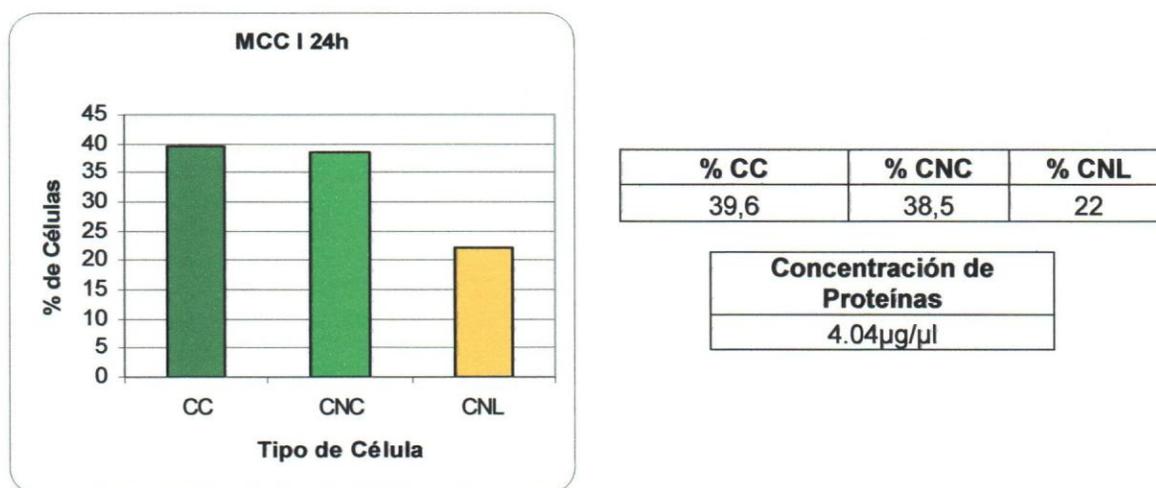
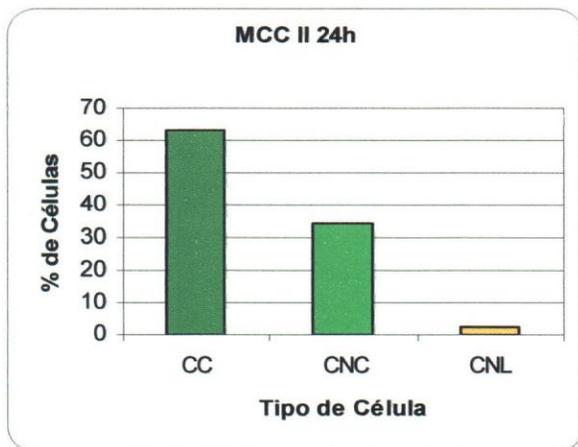


Fig. 5 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen muestra el efecto producido por el medio condicionado, a nivel de porcentajes y es evidente que la tendencia va dirigida hacia cambios morfológicos significativos en las células PC12, produciendo así células con neuritas cortas en prácticamente igual porcentaje al de células tipo control, resultado que se podría explicar mediante la alta concentración de proteínas presentes en el medio.

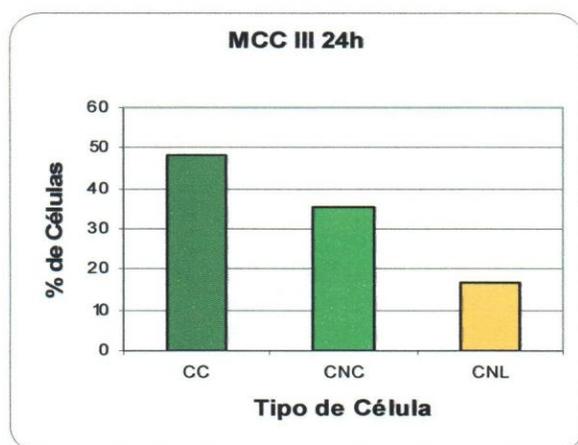


% CC	% CNC	% CNL
63,3	34,4	2,3

Concentración de Proteínas
4.20µg/µl

Fig. 6 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen presenta los porcentajes de diferenciación de células PC12 correspondientes al efecto producido por el MCC II, evidenciándose resultados similares a los de la figura 5, en los que existe un mayor número de células de morfología similar a la célula control, no descartándose un 34.4% de células diferenciadas con neuritas cortas; hecho que a los efectos de este experimento es atribuido a la alta concentración de proteínas en el medio condicionado; sin embargo los resultados no son significativos en términos de diferenciación.



% CC	% CNC	% CNL
48,4	35,2	16,5

Concentración de Proteínas
3.20µg/µl

Fig. 7 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura 7 muestra resultados que corresponden con las referencias mostradas por las gráficas anteriores, hecho que confirma una vez más que el medio condicionado por nervio ciático posee actividad a las 24 horas de estar ejerciendo efectos sobre las células PC12, sin embargo dicha actividad no es lo suficientemente alta como para producir mayores porcentajes de diferenciación en comparación con las células control.

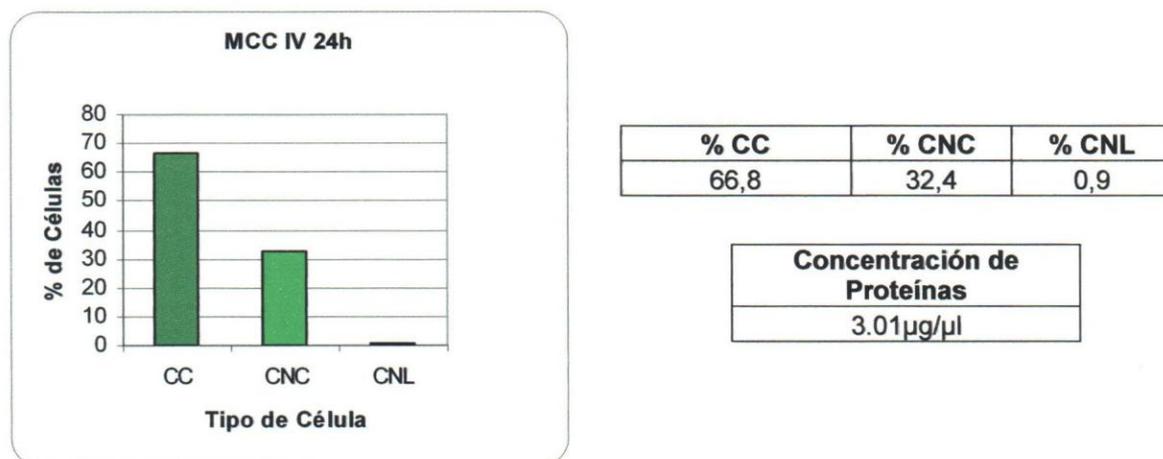
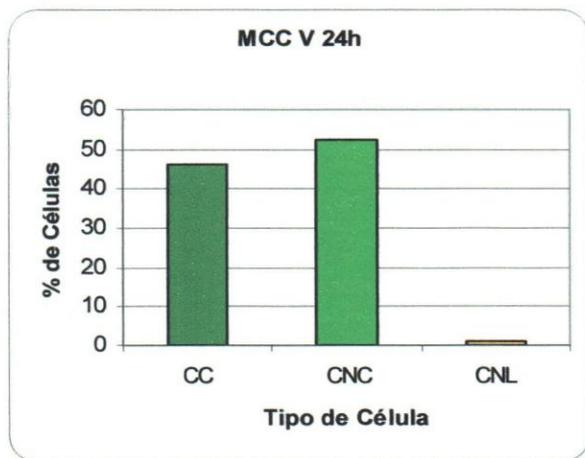


Fig. 8 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

El efecto del medio condicionado por nervio ciático IV presentado en la figura 8, continúa mostrando el mismo efecto, de las gráficas previas; es decir; se mantiene la tendencia del medio condicionado por nervio ciático de producir bajo efecto sobre las células PC12 cultivadas; hecho que puede ser claramente observado en la tabla de porcentajes que se muestra a la derecha de la figura, la cual muestra un porcentaje del 66.8 de células tipo control, valor que duplica al de células diferenciadas con neuritas cortas.

Es importante resaltar que a pesar del efecto observado, la concentración de proteínas por µl de medio condicionado es lo suficientemente alta como para producir diferenciación.



% CC	% CNC	% CNL
46,4	52,5	1,1

Concentración de Proteínas
3.16µg/µl

Fig. 9 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Finalmente el último medio condicionado por nervio ciático probado sobre células PC12, muestra un comportamiento un tanto diferente a lo que se venía mostrando puesto que se puede evidenciar un 52.5% de células diferenciadas con neuritas cortas, valor que supera al de células control; siendo este comportamiento poco usual en este momento del experimento; por ello podría considerarse como un error experimental.

En tal sentido, es posible que este ensayo sea considerado poco significativo para los efectos de análisis de datos y conclusiones de este trabajo de investigación.

Ahora bien, una vez transcurridas las 24 horas de prueba de los medios condicionados, se procedió a esperar hasta cumplidas las 48 horas de inicio del cultivo de manera tal que se obtuvieran los resultados correspondientes dicho tiempo de experimentación.

De esta forma, se obtuvieron los siguientes resultados:

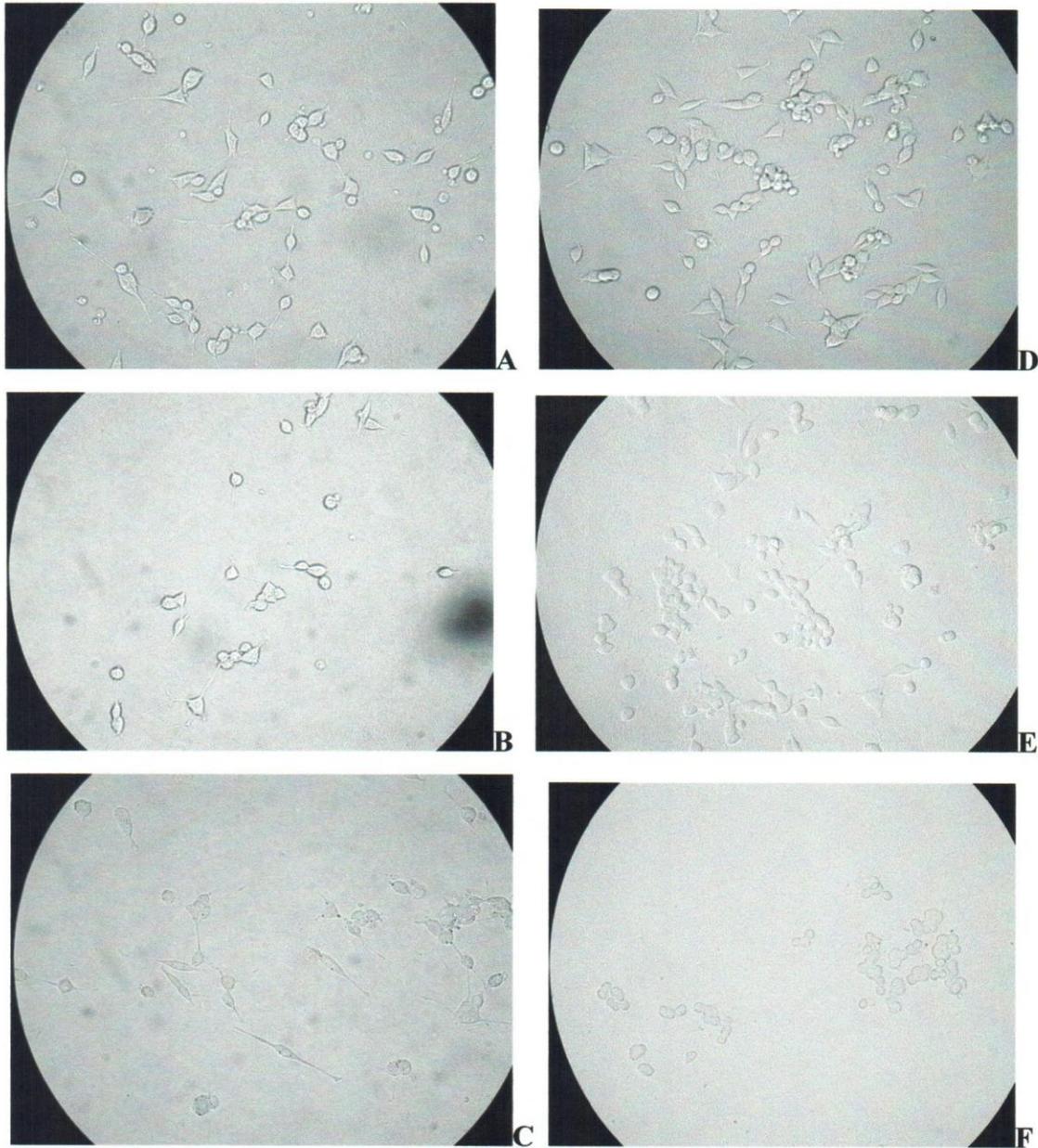


Fig. 10 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 48 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control.

Las imágenes muestran a simple vista una mayor diferenciación de las células PC12, cuando son sometidas a los efectos de medio condicionado por nervio ciático de rata adulta durante 48h. Una vez obtenidas las fotos se procedió a contar el número de células por campo y a realizar los cálculos estadísticos correspondientes, obteniendo como resultado las gráficas que a continuación serán presentadas.

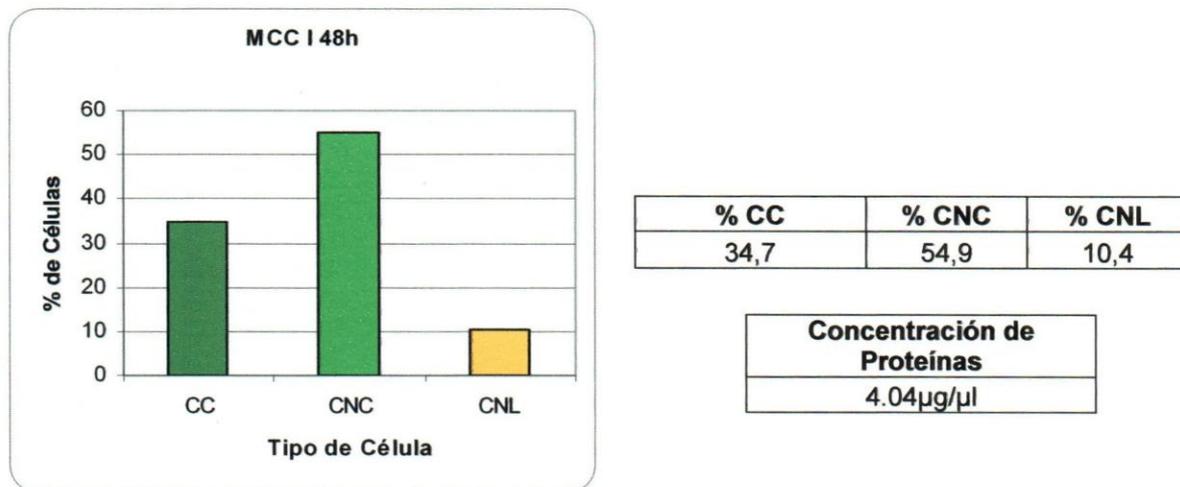
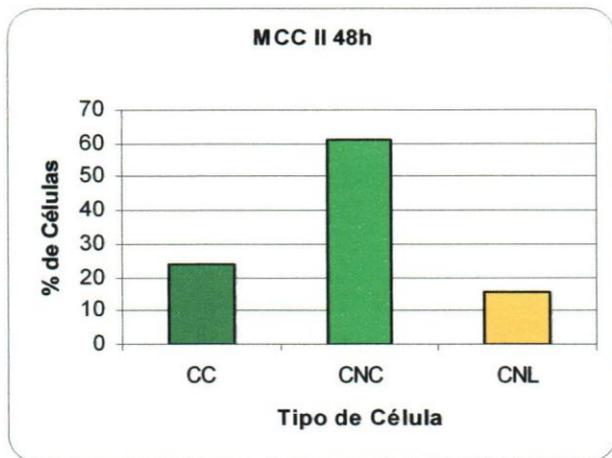


Fig. 11 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura 11 muestra un cambio en comparación con el efecto de los medios condicionados por nervio ciático a las 24 horas de estar en contacto con las células PC12, es evidente que la relación en este caso se invierte y ahora el porcentaje mayor corresponde a las células diferenciadas con neuritas cortas; hecho que indica que el efecto de dichos medios, como lo sugieren los antecedentes de la investigación comienza a hacerse más evidente a partir de las 48 hora de estudio.

De igual forma es importante destacar que el MCC de doce días de cultivo, no sólo es capaz de producir efectos neuritogénicos sobre las células PC12 produciendo neuritas cortas sino también neuritas largas, hecho que se puede observar claramente en el significativo 10% señalado en la tabla a la derecha de la gráfica.



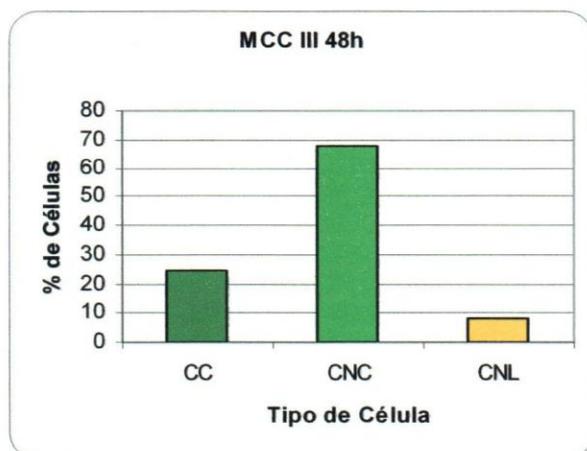
% CC	% CNC	% CNL
23,7	61,1	15,3

Concentración de Proteínas
4.20µg/µl

Fig. 12 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

En este caso la tendencia sigue siendo la misma que en el caso anterior, observándose una gran diferencia entre los porcentajes de células tipo control con respecto a las células con neuritas cortas. Es importante resaltar que se continúa manteniendo un porcentaje significativo de células con neuritas largas, resultado que puede ser justificado mediante la alta de concentración de proteínas presentes en el medio.

Una vez más entonces, se puede observar que el efecto del medio condicionado comienza a hacerse más evidente aproximadamente a las 48h de haberse iniciado el cultivo.



% CC	% CNC	% CNL
24,6	67,6	7,8

Concentración de Proteínas
3.20µg/µl

Fig. 13 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura muestra un incremento sustancial del porcentaje de células con neuritas cortas, con respecto a las células cuya morfología es similar al control; ratificando así una vez más lo ya expuesto en las figuras anteriores correspondientes al efecto a las 48 horas del MCC.

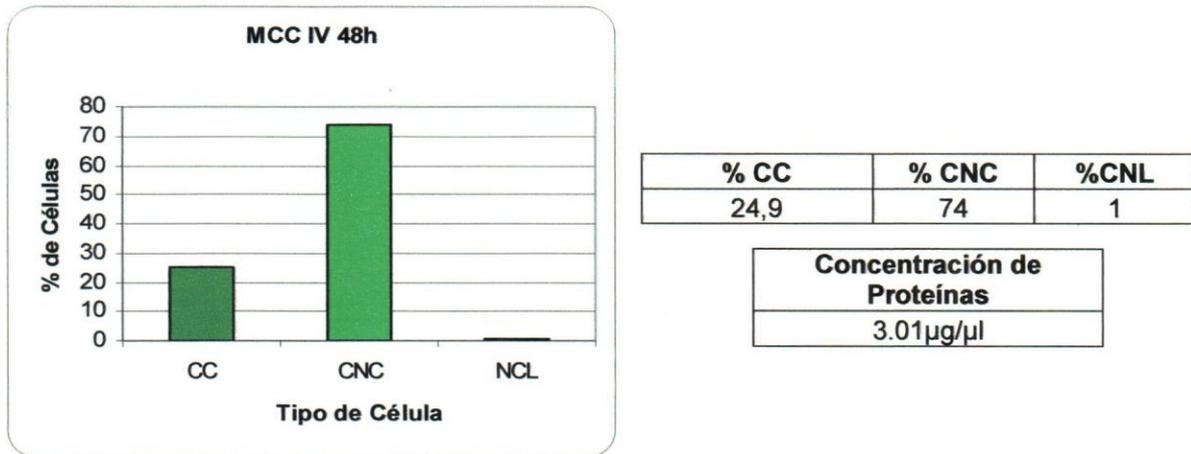
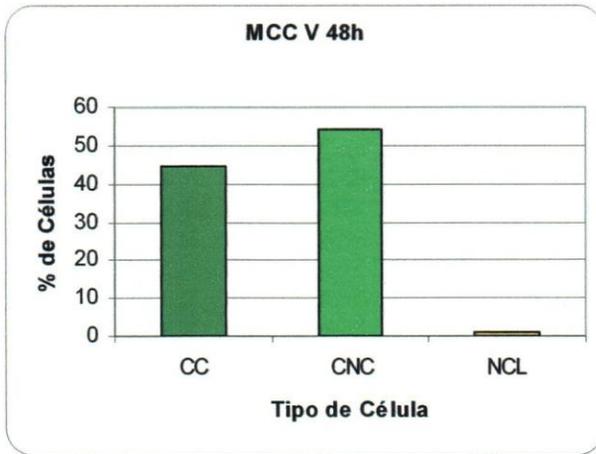


Fig. 14 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Nuevamente la tendencia del medio condicionado por nervio ciático va dirigida a estimular a las células PC12 provocando así la formación de neuritas cortas en un mayor porcentaje; sin embargo el medio condicionado presenta la actividad trófica suficiente como para permitir la extensión de neuritas largas.

Recordemos además que la concentración de proteínas es lo suficientemente significativa como para así explicar dicho efecto neurotrófico que ejerce sobre las células PC12 en cultivo durante 48 horas.



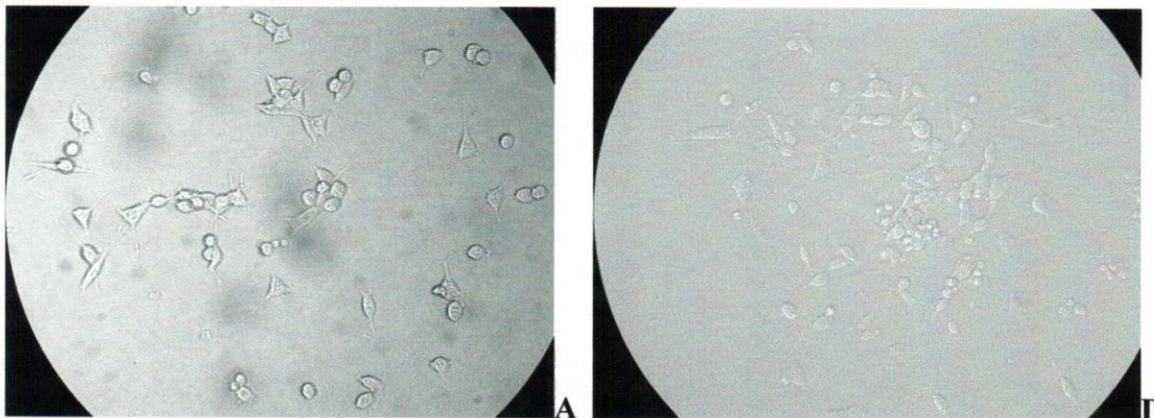
% CC	% CNC	% CNL
44,6	54,1	1,3

Concentración de Proteínas
3.16µg/µl

Fig. 15 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

En este caso sigue existiendo la misma línea diferenciadora del medio condicionado, pero en menor proporción si comparamos con los medios anteriores, pues es evidente que con este medio aún se mantiene gran porcentaje de células tipo control; sin descartar el importante 1.3% de células con neuritas largas.

Finalmente se procedió a continuar con el cultivo hasta así completar un máximo de 72 horas contadas a partir de su momento de inicio, obteniéndose como resultados las imágenes a continuación:



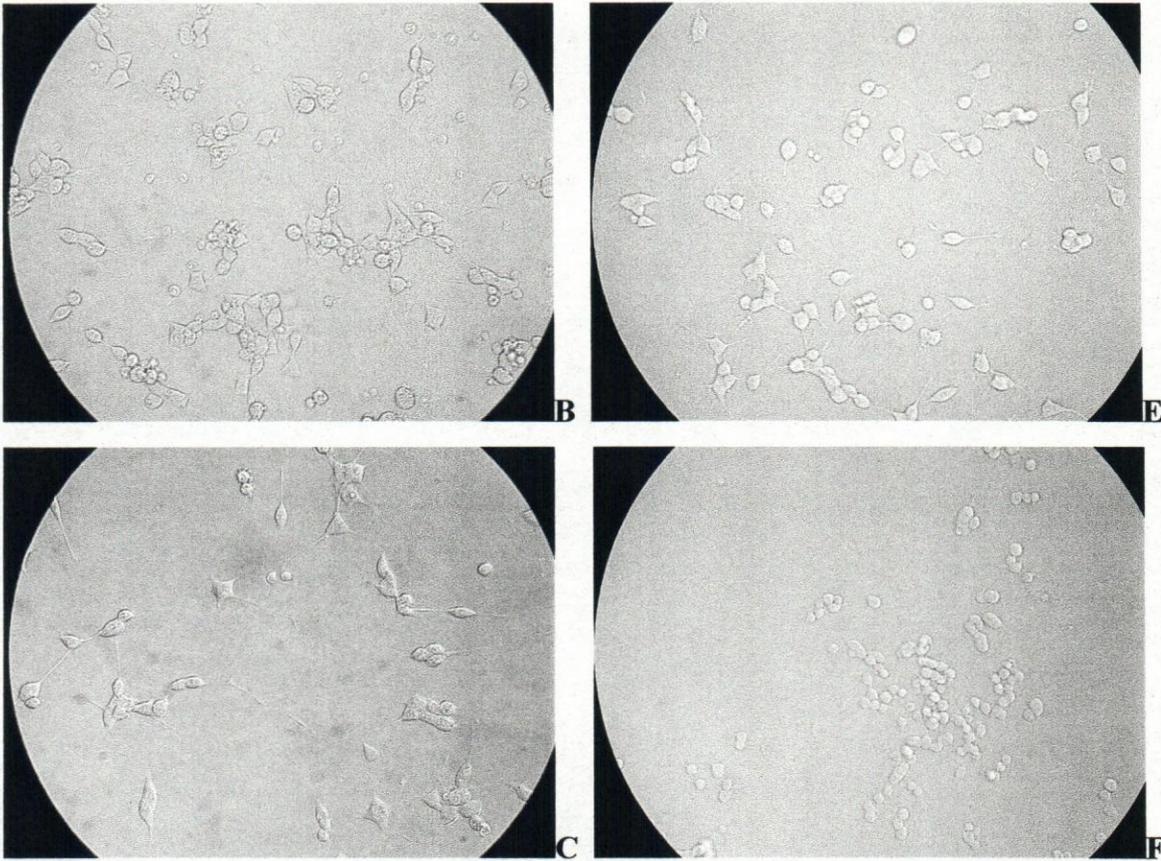
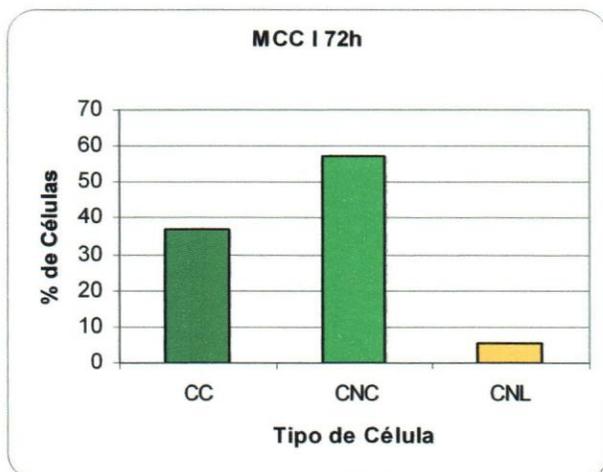


Fig. 16 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por nervio ciático preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 72 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCC I, (B) Efecto MCC II, (C) Efecto MCC III, (D) Efecto MCC IV, (E) Efecto MCC V, (F) células control.

A simple vista en función de las microfotografías presentadas, se podría decir que el efecto del medio condicionado por nervio ciático a las 72 horas está en su máxima expresión, puesto que dichas imágenes muestran células con neuritas mucho más largas si comparamos con el efecto a las 24 y a las 48 horas de tratamiento.

Asimismo, como se ha venido haciendo hasta este punto del trabajo; a continuación se presentarán las graficas correspondientes a los porcentajes de diferenciación celular a las 72 horas de tratamiento.

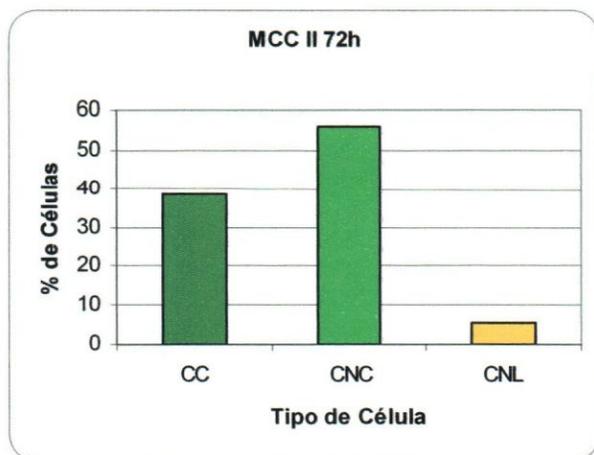


% CC	% CNC	% CNL
36,9	57,5	5,6

Concentración de Proteínas
4.04µg/µl

Fig. 17 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático I, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Es evidente que en esta etapa del tratamiento se puede observar que la proporción de células diferenciadas con respecto a las células tipo control sigue siendo en términos generales la misma, sin embargo cabe resaltar que se ha producido un incremento considerable en el porcentaje de células diferenciadas con neuritas largas, hecho que permite ratificar que el medio condicionado por nervio ciático a la 72 horas de tratamiento está produciendo su máximo efecto.



CC	CNC	CNL
38,4	56	5,7

Concentración de Proteínas
4.20µg/µl

Fig. 18 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático II, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura muestra a términos generales el mismo comportamiento que la imagen anterior puesto que la figura que ahora se está trabajando podría considerarse una réplica de la anterior por ser los resultados prácticamente iguales.

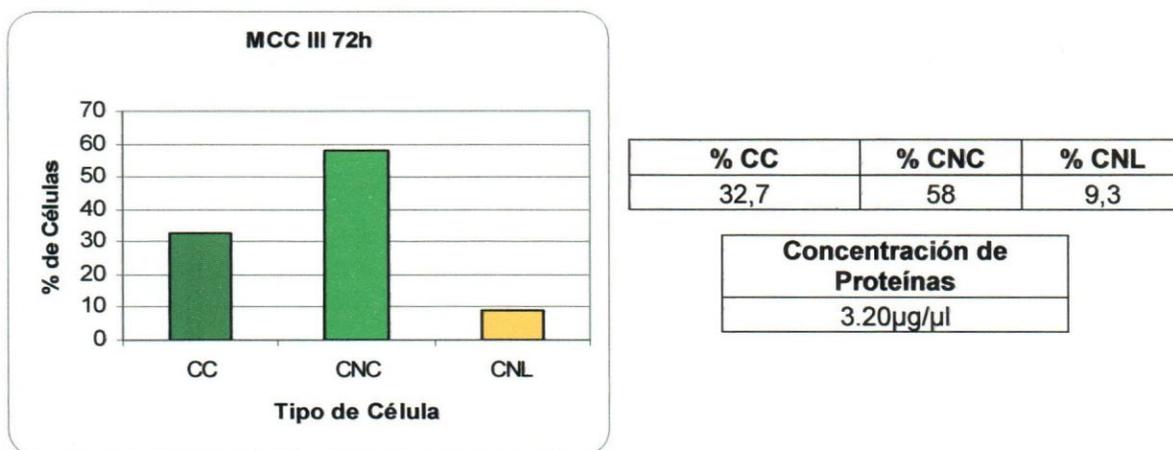


Fig. 19 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático III, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen muestra nuevamente una relación porcentual proporcional a lo que se ha venido planteando hasta el momento, con respecto al efecto del MCC, sin embargo es importante resaltar que en este caso se ha producido un incremento de casi el doble en el porcentaje de células con neuritas largas; hecho que lleva a pensar que es probable que se deba a altas concentraciones de proteínas en el medio.

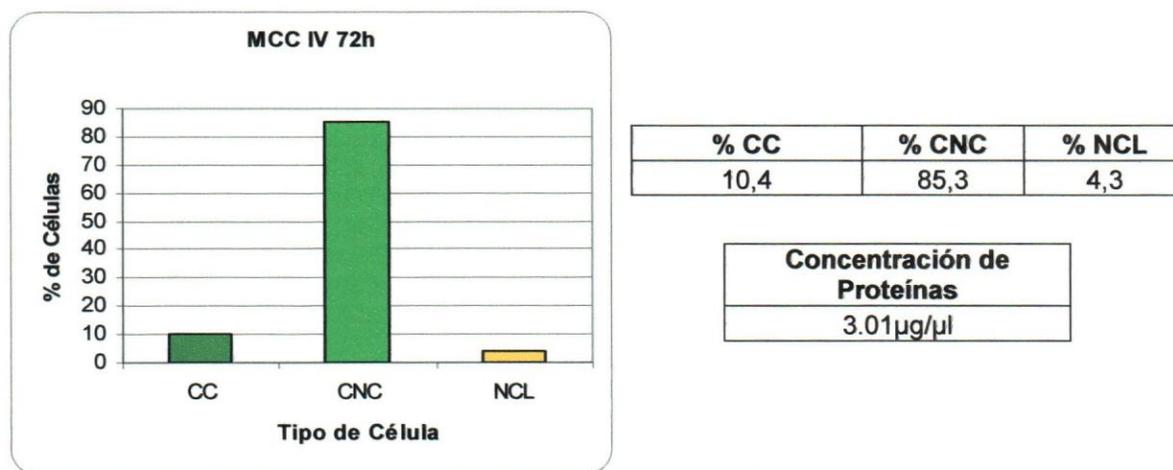


Fig. 20 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático IV, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

El medio condicionado que se ha graficado en la figura 20, muestra un incremento sustancial del porcentaje de células con neuritas cortas de manera que dicho valor es casi ocho veces mayor que las células tipo control; por lo que podría decir que es un medio sumamente activo; sin dejar a un lado el no menos importante 4.3% de la células con neuritas largas.

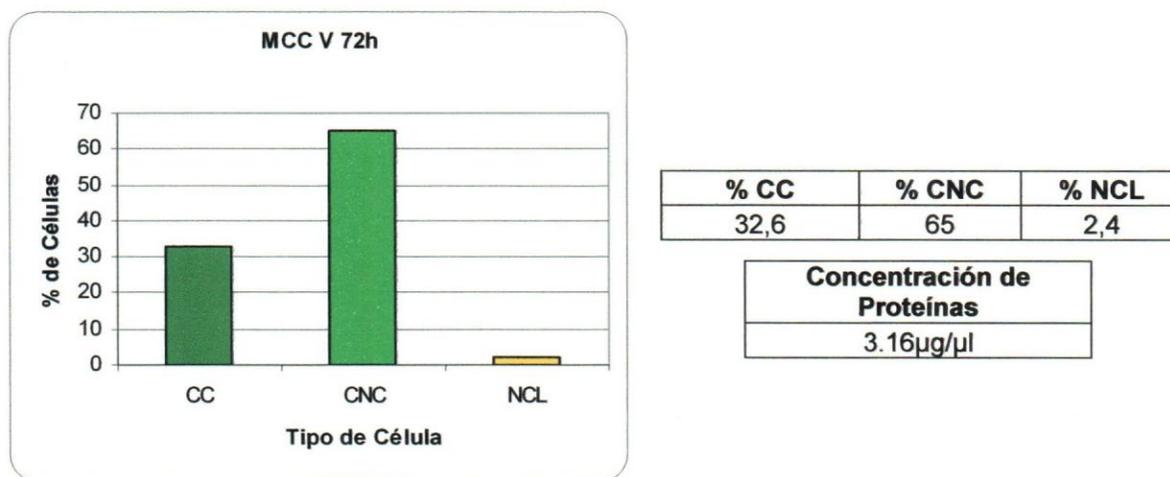


Fig. 21 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por nervio ciático V, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Finalmente, no muy diferente a lo que se ha venido mostrando hasta ahora del efecto del MCC a las 72 horas de tratamiento, se puede notar que el medio es sumamente activo mostrando un porcentaje de diferenciación del doble si se compara con el valor porcentual de las células tipo control. Además existe un 2.4% de células con neuritas largas que si bien no es un porcentaje grande en comparación con el de los medios condicionados anteriores, sigue siendo un número importante.

2. Prueba de los Medios Condicionados por Células de Schwann sobre células PC12

Se realizó la preparación de los medios condicionados por células de Schwann siguiendo la metodología expuesta en el marco metodológico de este trabajo. Posteriormente se procedió a probar dichos medios condicionados sobre células PC12 obteniéndose así los siguientes resultados:

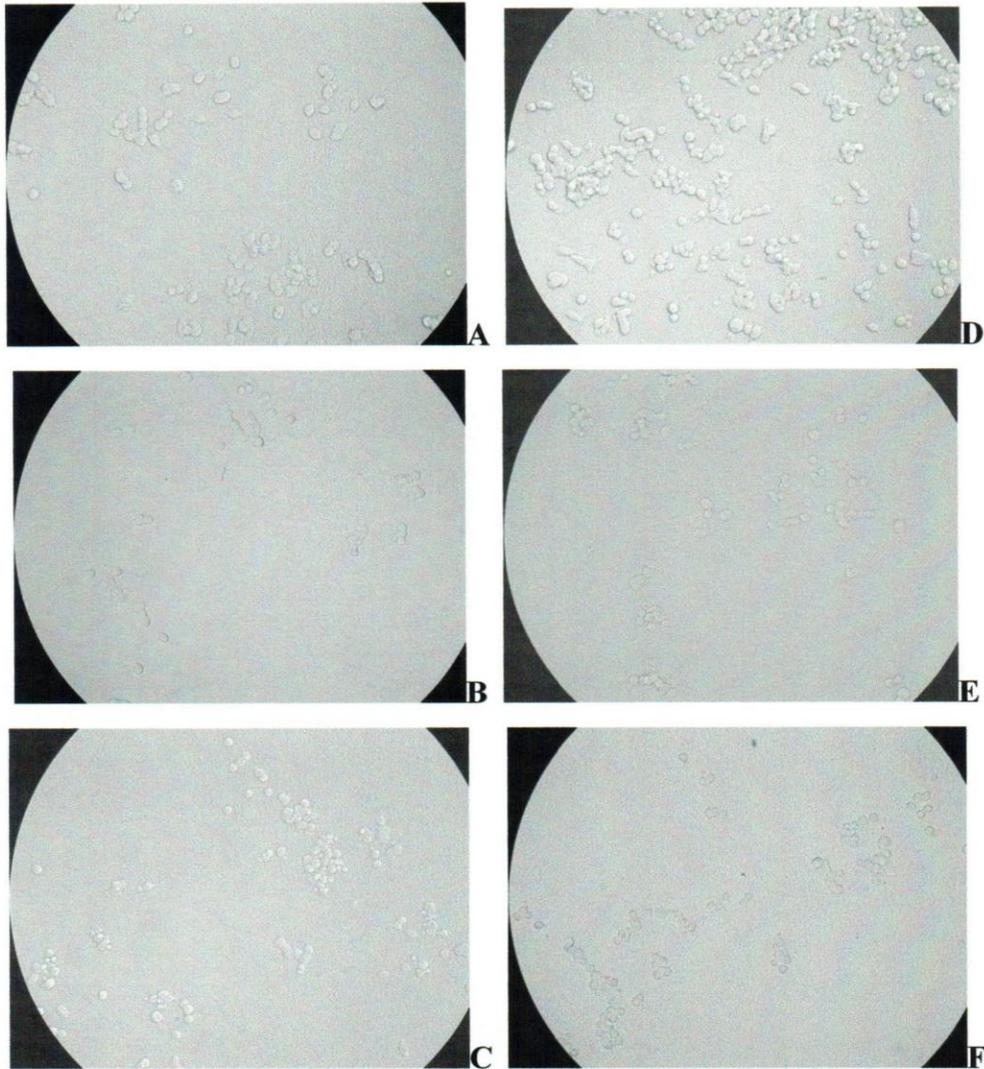
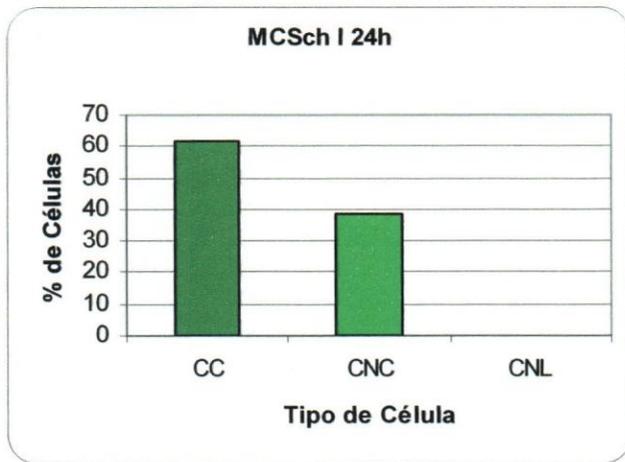


Fig. 22 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 24 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCSch I, (B) Efecto MCSch II, (C) Efecto MCSch III, (D) Efecto MCSch IV, (E) Efecto MCSch V, (F) células control.

Las imágenes anteriormente presentadas muestran una clara diferencia con respecto a los medios condicionados por nervio ciático a las 24 horas de tratamiento, y dicha divergencia no es más que el hecho que el medio condicionado por células de Schwann a las 24 horas producen bajos niveles de diferenciación; hecho que explica la morfología tipo control de las células en las microfotografías de la figura 22.

Ahora bien, a continuación serán presentadas las gráficas que explican en forma detalla el efecto de los MCSch a las 24 horas de haberse iniciado el tratamiento.



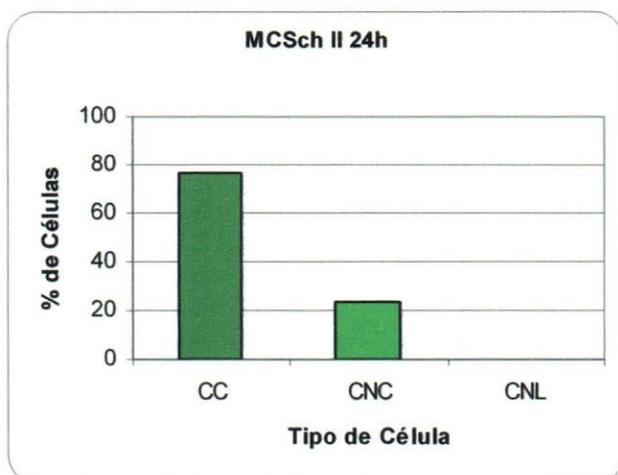
% CC	% CNC	% CNL
61,7	38,3	0

Concentración de Proteínas
3,265µg/µl

Fig. 23 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen muestra un cambio importante puesto que es evidente que el porcentaje de células tipo control es sumamente alto en comparación con el MCC a las 24h, además de ello se puede notar que no existe diferenciación de células con neuritas largas cuando de MCSch se refiere, esto sugiere que la concentración de proteínas no es suficiente como para producir células con este tipo de morfología.

Además cabe resaltar que se considera que el tejido conjuntivo juega un papel indispensable en el proceso de diferenciación, puesto que las células fundamentales de dicho tejido; es decir, los fibroblastos se encuentran en menor proporción que en el MCC debido a que el epineuro debe ser retirado del nervio para preparar el cultivo de células de Schwann como lo plantea la metodología ya expuesta.



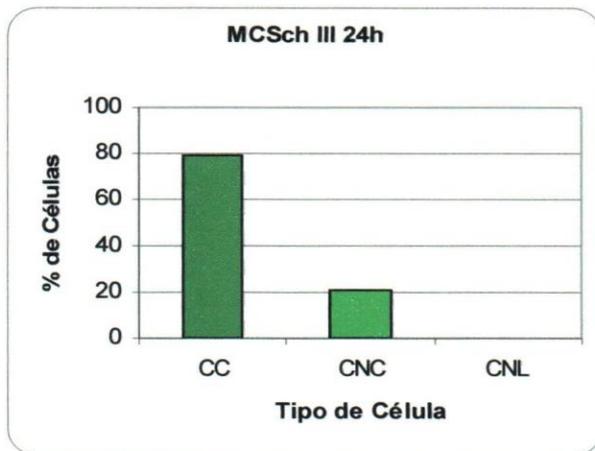
% CC	% CNC	% CNL
76,4	23,6	0

Concentración de Proteínas
1,705µg/µl

Fig. 24 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura 24 presenta resultados muy similares a los resultados expuestos en la gráfica 23, ya que es evidente que aún se sigue manteniendo la tendencia del medio a condicionado hacia provocar una baja estimulación sobre las células PC12, produciéndose así altísimos porcentaje de células cuya morfología es similar a la control.

Además es importante resaltar que la concentración de proteínas de este medio condicionado es sumamente baja, lo que lleva pensar que la ausencia de fibroblastos disminuye la cantidad de proteínas y por ende también se ve disminuido el efecto.



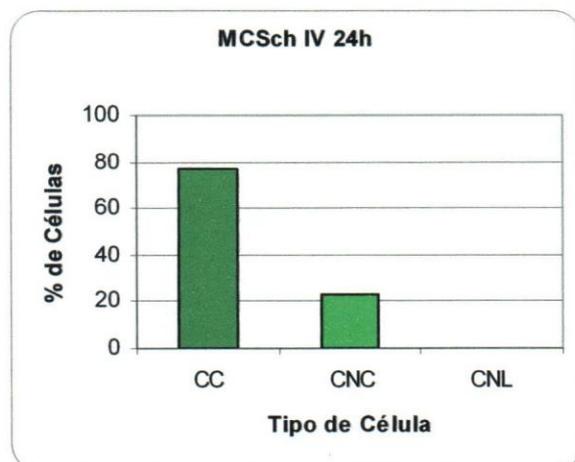
% CC	% CNC	% CNL
78,7	21,3	0

Concentración de Proteínas
1,19µg/µl

Fig. 25 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Los datos muestran un comportamiento casi igual de las células PC12 cuando son sometidas a los efectos del medio condicionado por células de Schwann, si se compara con los medios MCSch presentados anteriormente es por ello que una vez más confirmamos que el MCSch no reproduce el efecto del MCC a las 24h.

No podemos dejar a un lado la no diferenciación de células con neuritas largas en el caso del MCSch, la cual aunque siempre se muestra en bajo porcentaje; es característica del MCC.



% CC	% CNC	% CNL
76,7	23,3	0

Concentración de Proteínas
0,36µg/µl

Fig. 26 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Nuevamente se pueden observar los mismos resultados que en el caso anterior, lo que lleva a decir que la tendencia sigue siendo la misma para el MCSch a las 24 hora de ensayado; hecho que quizás puede ser explicado como se dijo anteriormente con evidentemente bajas concentraciones de proteínas en los medios.

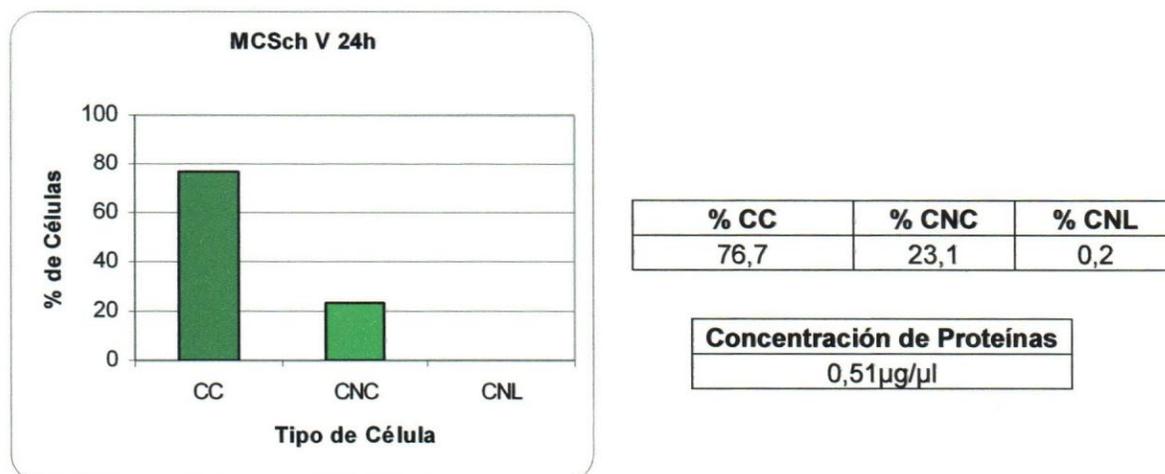


Fig. 27 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 24 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Finalmente los resultados según se puede observar en la fig 27 ratifican una vez más lo expuesto en el resto de los MCSch, mostrando así altos porcentajes de células tipo control un porcentaje de células con neuritas cortas cercano al 20% y un porcentaje nulo de células con neuritas largas.

Ahora bien, posteriormente a la prueba del MCSch durante 24h se procedió a continuar dicho ensayo por 24 horas más hasta cumplidas entonces las 48 horas de tratamiento obteniéndose así lo siguientes resultados:

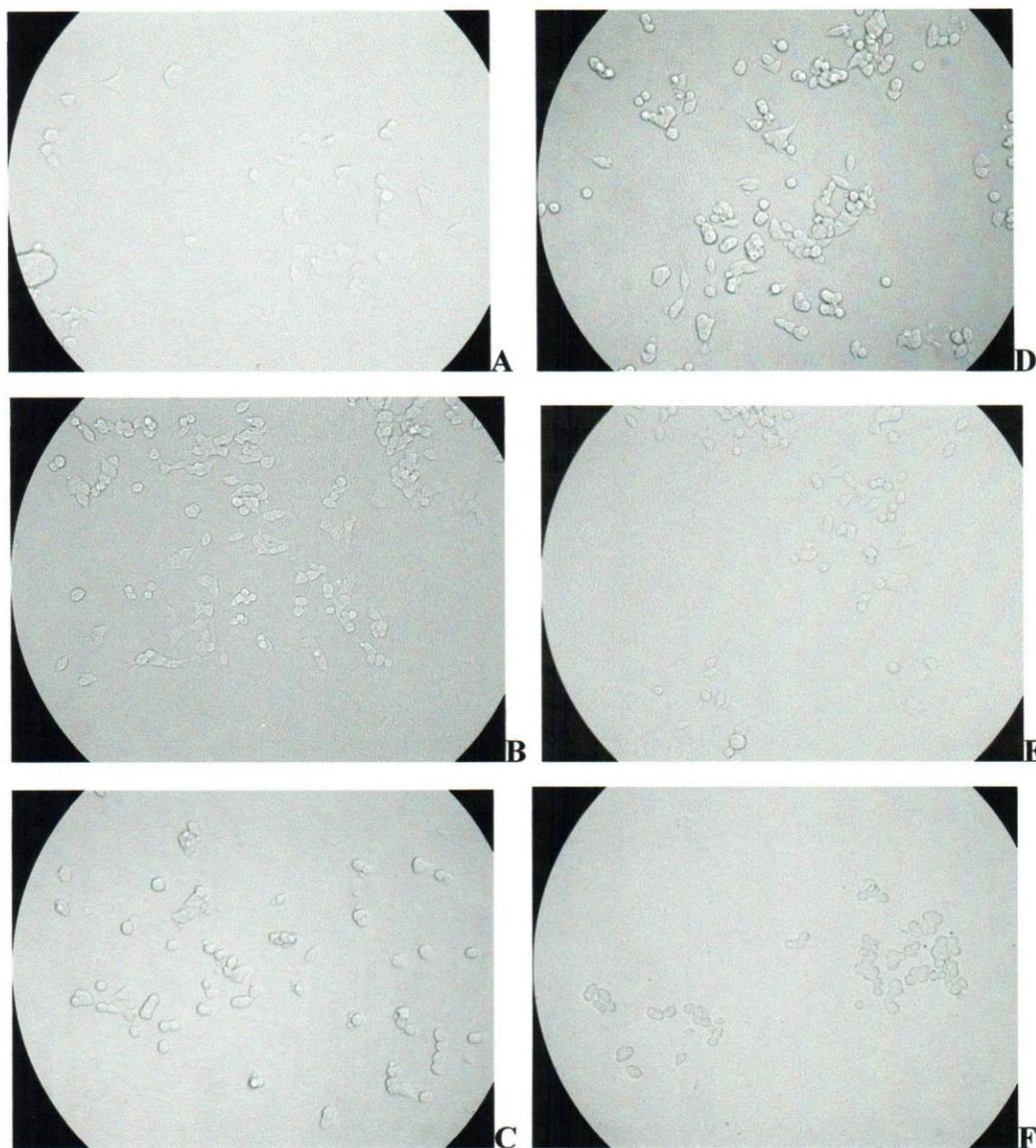
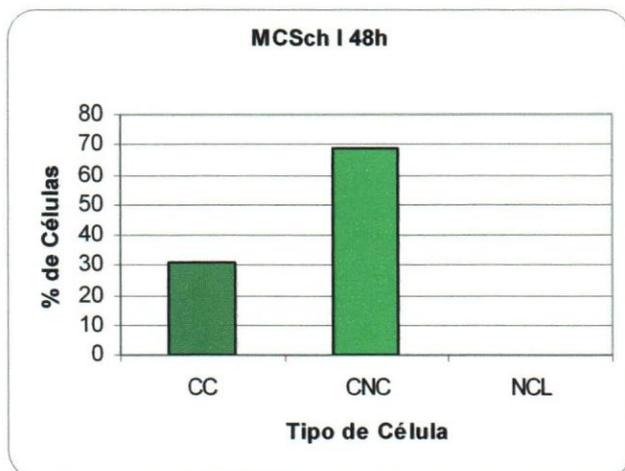


Fig. 28 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 48 horas de haber realizado el ensayo. **(A)** Efecto del MCSch I, **(B)** Efecto MCSch II, **(C)** Efecto MCSch III, **(D)** Efecto MCSch IV, **(E)** Efecto MCSch V, **(F)** células control.

La figura 28 muestra las microfotografía tomadas en el laboratorio de los ensayos realizados para probar el efecto del MCSch sobre células PC12, evidenciándose el mismo resultado si se compara con la prueba realizada durante 24 horas. Ahora bien, a continuación se muestran las gráficas que explican este comportamiento:



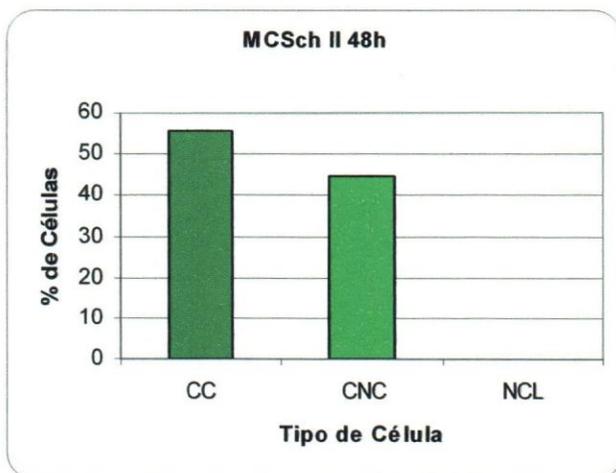
% CC	% CNC	% NCL
31,1	68,6	0,3

Concentración de Proteínas
3,265µg/µl

Fig. 29 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % NCL a porcentaje de células con neuritas largas.

La figura muestra un comportamiento típico de un MCC, recordemos que el nervio ciático está compuesto entre otras cosas por células de Schwann, la cuales desde el inicio de la investigación fueron consideradas como las responsables de reproducir el efecto del MCC; sin embargo, si comparamos este efecto con los resultados del MCC a las 48 horas, es evidente que en el caso del MCSch dicho efecto neuritogénico se ve disminuido. Este hecho podría deberse como fue mencionado anteriormente a la ausencia de los fibroblastos constituyentes del tejido conectivo retirado del nervio para realizar el cultivo.

Es importante destacar y como lo explicaremos a continuación, el efecto de este medio condicionado difiere un poco del resto, por lo que es posible que las variaciones en las concentraciones de proteínas puedan producir estos resultados.

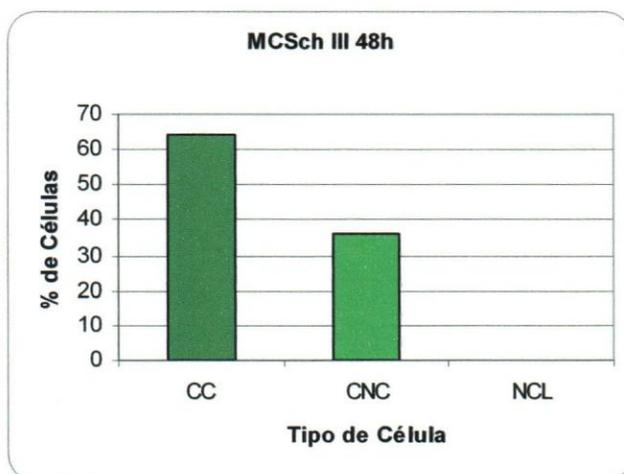


% CC	% CNC	% NCL
55,4	44,4	0,1

Concentración de Proteínas
1,705µg/µl

Fig. 30 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente y observando la figura 30, es evidente que el efecto del MCSch en comparación con el MCC no reproduce el mismo efecto del segundo medio mencionado; por lo que se insiste en pensar que la ausencia de los fibroblastos juega un rol crítico dentro del efecto de los medios sobre las células PC12.



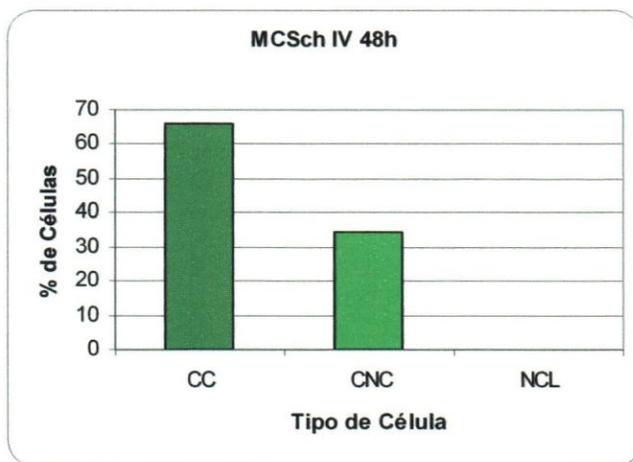
% CC	% CNC	% NCL
63,9	36,1	0

Concentración de Proteínas
1,19µg/µl

Fig. 31 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Nuevamente se puede observar la gran diferencia que existe entre las células tipo control y las células diferenciadas con neuritas cortas a nivel porcentual, las CC prácticamente duplican a las células con neuritas cortas, además de no producir células con

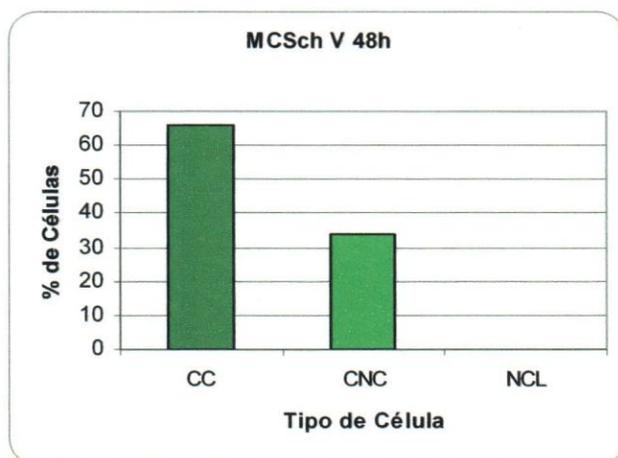
neuritas largas. Una vez más se confirma lo dicho en las gráficas anteriores. Nótese además de las proporciones la baja concentración de proteínas presentes en el medio condicionado.



% CC	% CNC	% NCL
65,8	34,2	0

Concentración de Proteínas
0,36µg/µl

Fig. 32 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.



% CC	% CNC	% NCL
66,2	33,8	0

Concentración de Proteínas
0,51µg/µl

Fig. 33 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 48 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Finalmente tanto la figura 32 como la figura 33 muestran un efecto completamente disminuido del MCSch sobre las células PC12 por lo quizás se podría decir que la eficiencia de dichos medios al igual que el resto de los medios condicionados es baja comparada con la del MCC. Además es importante resaltar que ambos medios poseen

concentraciones de proteínas inferiores a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, valores que son considerados sumamente bajos como para producir una diferenciación eficiente.

Luego de esperar los resultados durante 48 horas se decidió esperar 24 hora más por lo que se observó el efecto del MCSch a las 72 obteniendo así los siguientes resultados:

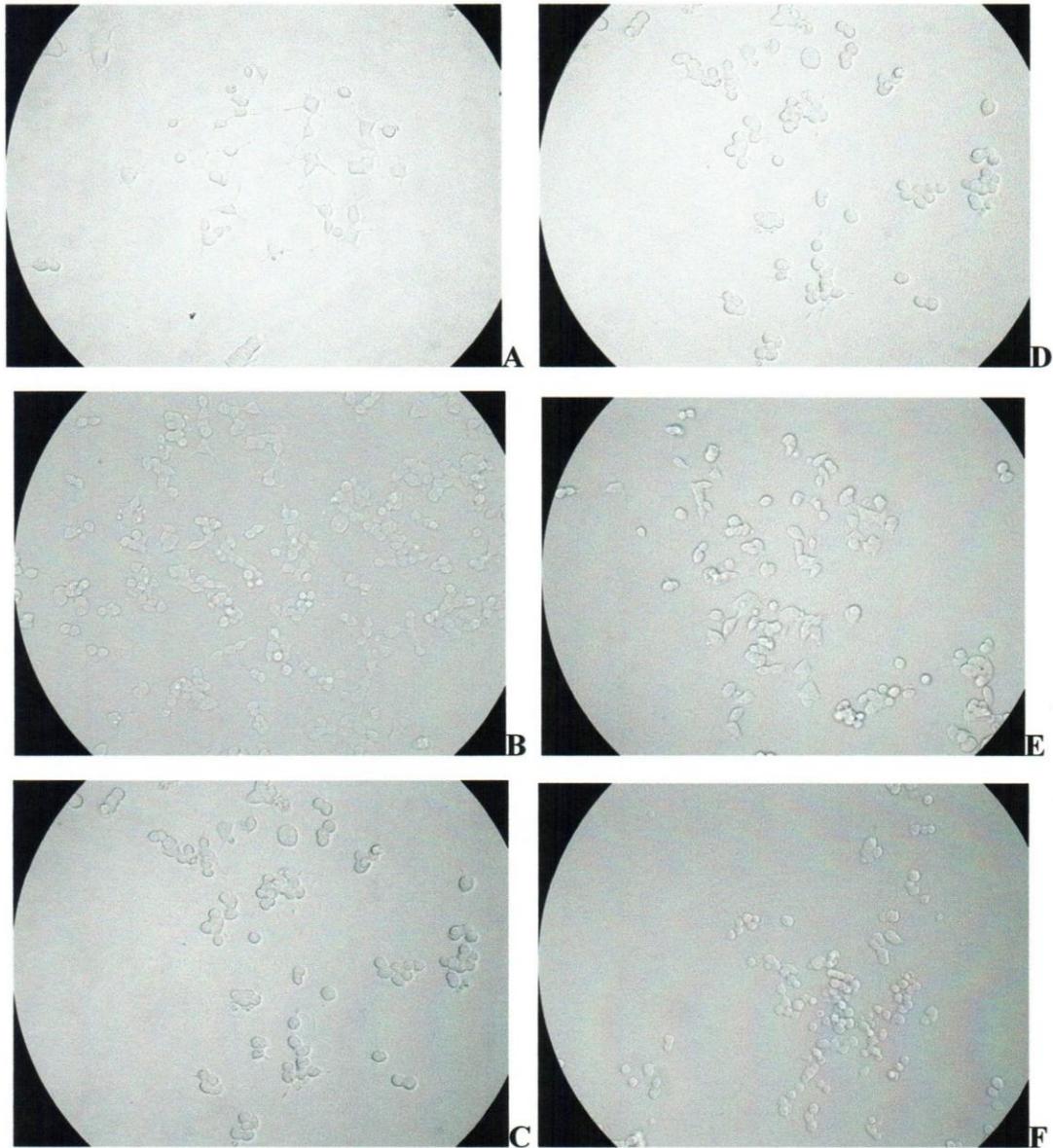


Fig. 34 Las microfotografías presentadas muestran el efecto de los medios condicionados por células de Schwann preparados en el laboratorio sobre las células PC12 en cultivo, a las 72 horas de haber realizado el ensayo. (A) Efecto del MCSch I, (B) Efecto MCSch II, (C) Efecto MCSch III, (D) Efecto MCSch IV, (E) Efecto MCSch V, (F) células control.

Finalmente la imágenes del ensayo del MCSch a las 72h muestran algunas variaciones las cuales podrían considerarse significativas; sin embargo la tendencia con respecto al efecto diferenciador continúa siendo disminuido en comparación con el medio condicionado por nervio ciático del mismo tiempo de cultivo.

Las gráficas que se muestran a continuación son el reflejo de la información tomada de las microfotografías presentadas en la figura 34.

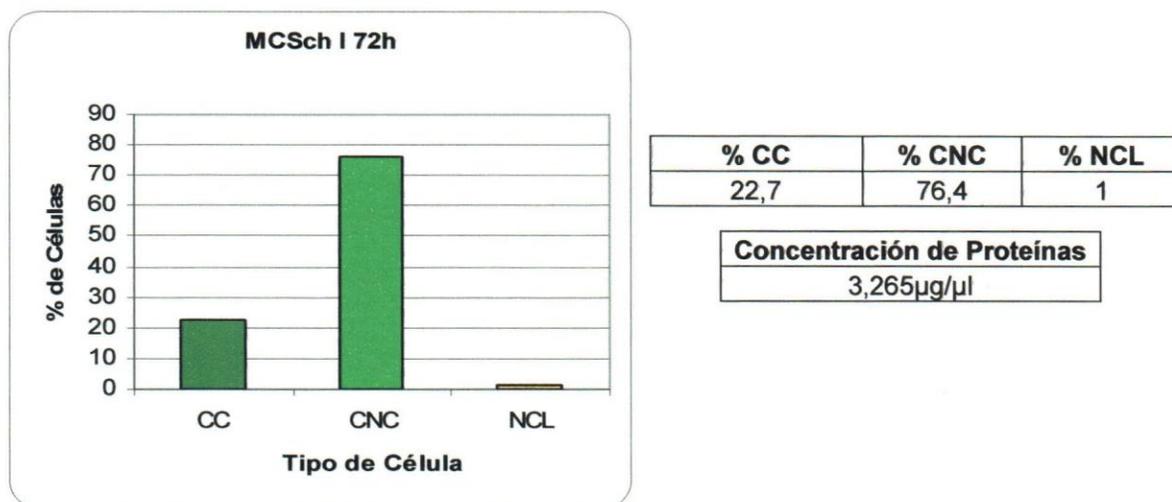


Fig. 35 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann I, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % NCL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen presenta cambios en comparación con la gráfica correspondiente al mismo medio condicionado a las 24 y 48 horas de cultivo, de manera que ahora la información es invertida. Es evidente que un porcentaje significativo del total de las células, corresponde a CNC; lo cual es una proporción contraria a lo que se venía estudiando hasta ahora.

Este hecho podría deberse a que la concentración de proteínas para este medio condicionado determinada por espectrofotometría fue de 3.265µg/µl, valor cercano a los que se ha acostumbrado a ver para los medios condicionados por nervio ciático. No podemos dejar a un lado que la razón por la que se obtuvo para este medio condicionado

tan alta concentración de proteínas, es la contaminación de fibroblastos que siempre marcó la pauta en los cultivos de células de Schwann.

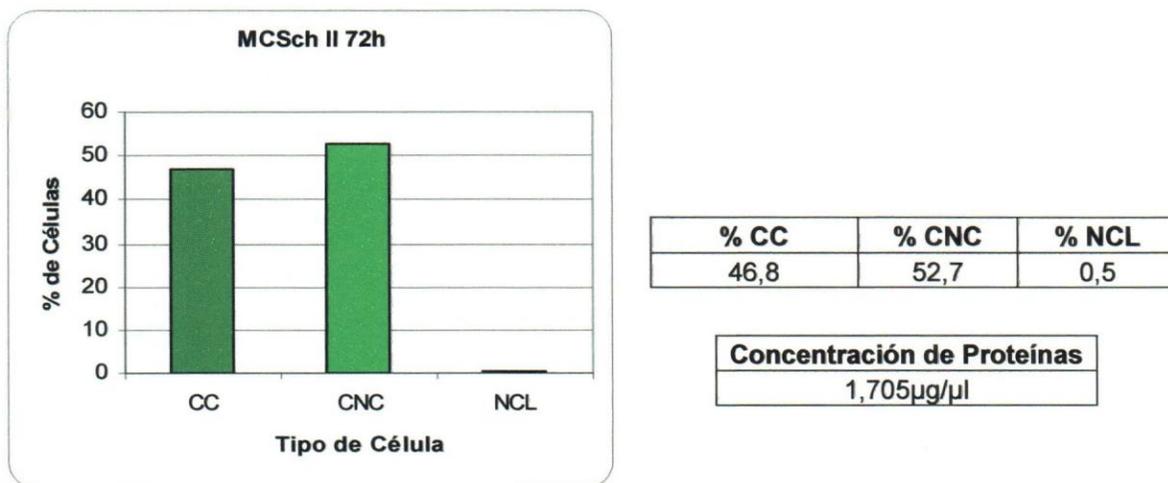
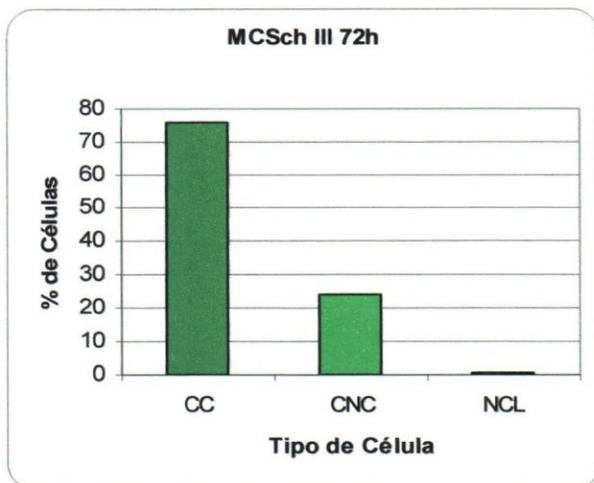


Fig. 36 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann II, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % NCL a porcentaje de células con neuritas largas.

De igual forma y como se explicó para el caso de la gráfica anterior, los resultados siguen en la misma línea; sin embargo en este caso la distancia entre los puntos porcentuales de CC y CNC es muy corta lo que quizás podría ser indicativo de que este resultado se acerca más al real que es el que se muestra en los tres medios condicionados restantes.

En este caso el contenido de proteínas corresponde a 1.7µg/µl, valor que se considera lo suficientemente bajo como para producir la corta distancia entre los puntos porcentuales de CC y CNC.

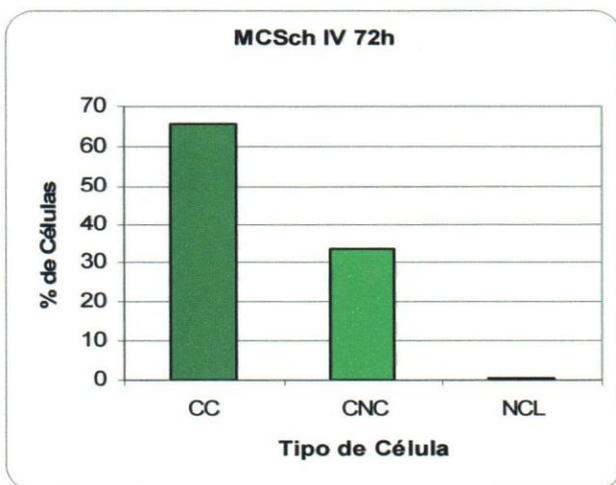


% CC	% CNC	% NCL
75,6	23,9	0,5

Concentración de Proteínas
1,19µg/µl

Fig. 37 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann III, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % NCL a porcentaje de células con neuritas largas.

La imagen mostrada presenta los resultados obtenidos del MCSch III a las 72h, los cuales coinciden con la tendencia que se venía siguiendo a las 24 y 48 hora de cultivo; es decir, coincide con una baja diferenciación de células PC12 cuando son sometidas al efecto de dicho medio. Además cabe resaltar que la concentración de proteínas en este caso fue de 1.19µg/µl, el cual se considera es lo suficientemente bajo como para que el efecto esté disminuido.



% CC	% CNC	% NCL
65,7	33,7	0,6

Concentración de Proteínas
0,36µg/µl

Fig. 38 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann IV, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % NCL a porcentaje de células con neuritas largas.

La gráfica anterior continúa ratificando que la baja concentración de proteínas, siendo en este caso $0.36\mu\text{g}/\mu\text{l}$, representando así un elemento crítico para la diferenciación celular; es por ello entonces, que se pueden observar diferencias significativas en cuanto a los valores en porcentaje de las CC, CNC y CNL.

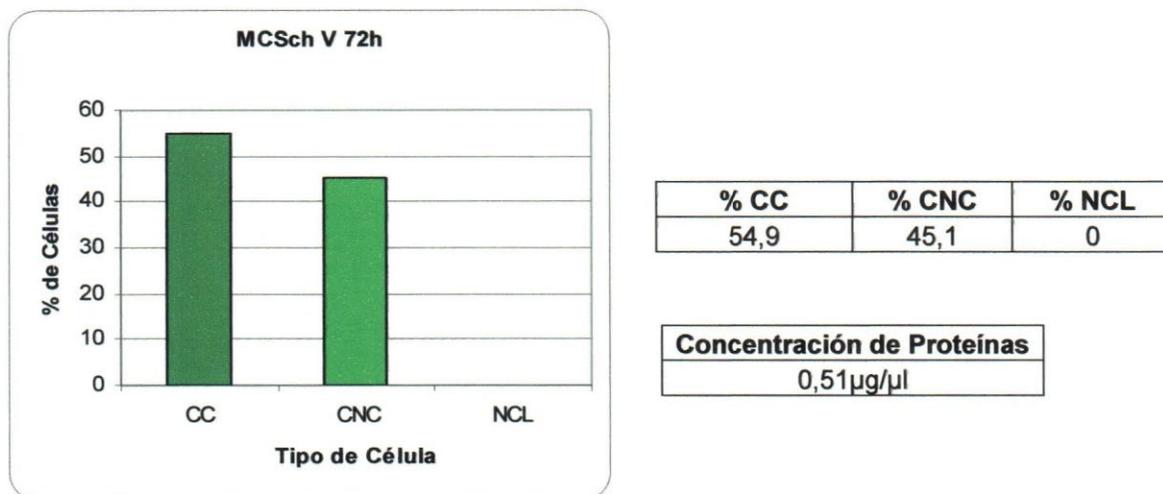


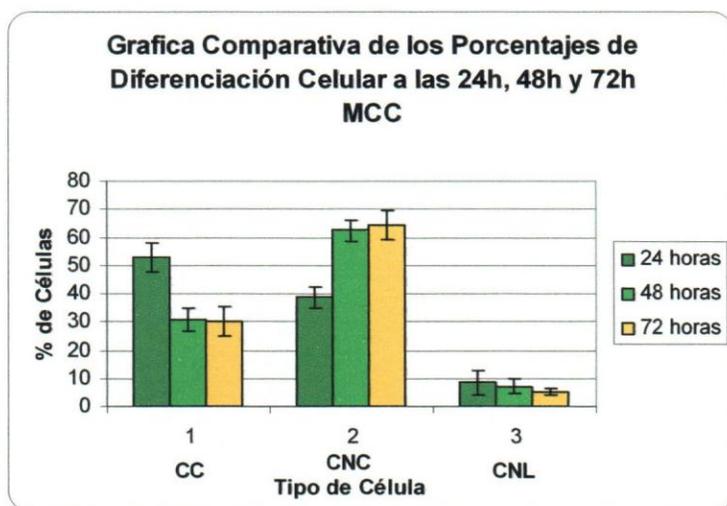
Fig. 39 Gráfica de los porcentajes de diferenciación de células PC12 al ser sometidas al efecto del medio condicionado por células de Schwann V, a las 72 horas de tratamiento. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Finalmente y observando los resultados presentados en la gráfica previa, es indiscutible que el efecto del MCSch se ve disminuido en comparación el MCC, atribuyéndose además de a la disminución de fibroblastos, a las bajas concentraciones de proteínas en el medio como consecuencia de dicha disminución. En este caso la concentración fue de $0.51\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Es importante acotar que una vez culminado el ensayo, se procedió a probar dos medios condicionado preparados siguiendo el protocolo expuesto en el marco metodológico en el que se cortaba únicamente el eje principal del nervio ciático con el fin de tratar de disminuir la contaminación por fibroblastos en los cultivos y en consecuencia verificar si realmente la célula de Schwann era la única responsable del efecto.

Como resultado de este ensayo, se obtuvieron a términos generales las mismas proporciones de los cultivos de células de Schwann preparados a partir de cortes del nervio ciático completo, por lo que este método no se considera efectivo para disminuir la cantidad de fibroblastos y así obtener cultivos lo más puro posibles.

Finalmente se decidió realizar gráficas comparativas de los resultados obtenidos a partir de los medios condicionados probados, obteniéndose lo siguiente:



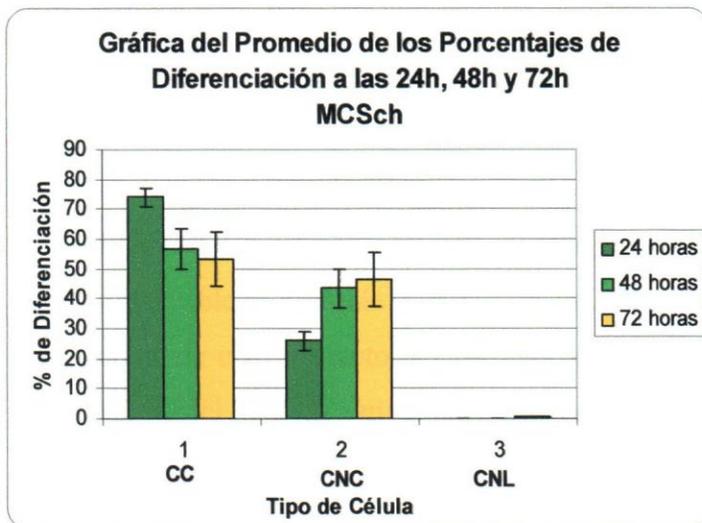
	% CC	% CNC	% CNL
24 h	52,9 ± 5.20	38,6 ± 3.61	8,56 ± 4.46
48h	30,5 ± 4.05	62,34 ± 3.80	7,16 ± 2.73
72h	30,2 ± 5.08	64,36 ± 5.46	5,46 ± 1.13

Fig. 40 Gráfica del promedio de los porcentajes de diferenciación celular a las 24, 48 y 72 horas de haber iniciado el ensayo sobre células PC12. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

La gráfica muestra en promedio cuál fue el efecto de los medios condicionados por nervio ciático sobre las células PC12, evidenciándose claramente que a las 24 horas de cultivo el medio aún no ha comenzado a producir cambios morfológicos significativos en las células, por ello el mayor porcentaje de células contabilizadas por campo fue el de células tipo control.

Por su parte a las 48 horas de haber iniciado el cultivo, los valores se invierten produciendo así mayor porcentaje de células con neuritas cortas en comparación con el control y sólo un 7.16% de células con neuritas largas, siendo esta una cifra que no deja de ser significativa.

Finalmente a la 72 horas la tendencia en la misma que a las 48, sólo con una pequeña disminución en el porcentaje de CNL. Todo este resultado se ha atribuido con este trabajo a la combinación de células de Schwann y Fibroblastos, la cuales en conjunto aparentemente aportan proteínas al medio que son las responsables del efecto diferenciador.



	% CC	% CNC	% CNL
24h	74,0 ± 3.11	25,9 ± 3.12	0,04 ± 0.04
48h	56,4 ± 6.64	43,4 ± 6.58	0,08 ± 0.06
72h	53,1 ± 9.03	46,3 ± 8.97	0,5 ± 0.16

Fig. 41 Gráfica del promedio de los porcentajes de diferenciación celular a las 24, 48 y 72 hora de haber iniciado el ensayo sobre células PC12. Nótese que % CC corresponde a porcentaje de células control, % CNC a porcentaje de células con neuritas cortas y % CNL a porcentaje de células con neuritas largas.

Si se compara el efecto de los de los medios condicionados por células de Schwann mediante esta gráfica, se puede observar que las concentraciones de células diferenciadas es más bajo que las de células control, siendo además los porcentajes de células con neuritas largas prácticamente nulos.

Ahora bien este resultado, como se ha podido decir en página previas es atribuido a la no presencia de suficiente cantidad de fibroblastos por campo estudiado; puesto que hay que recordar que para preparar lo medios es necesario retirar el epineuro el cual está constituido por fibroblatos, productores de factores tróficos indispensables para producir un real y eficiente efecto diferenciador.

- Mendonça, P., Vieira, C., Sholl, A. y Giestal, A. de. E. (2002). Sciatic Conditioned Medium Increases Survival, Proliferation and Differentiation of Retinal Cells in Culture. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 20, 11-20.
- Muñetón, C. C., Garavito, Z. V. y Hurtado, H. (1998). Cultivo de Células de Schwann, un Modelo del Microambiente del Sistema Nervioso. *Biomédica*, 18(1), 45-54.
- Myrna, A. y Dent, R. (2003). Daño y Reparación del Sistema Nervioso. *Ciencia Ergo Sum*, 10(1), 68-79.
- Ramos, V. M. (1981). *El sistema nervioso humano*. Honduras: Girándula
- Villegas, G., Haustein, A. T. y Villegas, R. (1995). Neuronal Differentiation of PC12 and Chick Embryo Ganglion Cells Induced by a Sciatic Nerve Conditioned Medium: Characterization of the Neurotrophic Activity. *Brain Research*, 685, 77-90.
- Villegas, R., Villegas, G., Longart, M., Hernández, M., Maqueira, B., Buonanno, A., García, R. y Castillo, C. (2000). Neuregulin Found in Culture-Sciatic Nerve Conditioned Medium Causes Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *Brain Research*, 852, 305-318.
- Villegas, R., Villegas, G., Núñez, J., Hernández, M. y Castillo, C. (2005). Neuron-Like Differentiation of PC12 Cells Treated With Media Conditioned by Either Sciatic Nerves, Optic Nerves, or Schwann Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2), 449-459.