

Desarrollo de cultivo primario derivado de sistema nervioso central de ratas neonatas Wistar para la obtención de secretomas y co-cultivo.

Sosa Pérez, Franco Nahuel¹; Acosta, Cristian¹

¹ Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas, Laboratorio de Estudios Neurobiológicos - Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos".

Correo electrónico de contacto: sosaperez.franco@gmail.com

Recibido: 8 de setiembre de 2025 – Aceptado: 8 de octubre de 2025

Palabras clave: Neuronas, Viabilidad, Postnatal, Corteza, Médula.

Keywords: Neurons, Viability, Postnatal, Cortex, Spinal.

Introducción: Uno de los principales aspectos pobremente conocidos del dolor de origen periférico es el modo en que este es regulado por los diferentes niveles dentro del sistema nervioso central (Yeziarski & Hansson, 2018). Una estrategia experimental para estudiar y comprender mejor esta problemática es a través del desarrollo de cultivos primarios de los tejidos involucrados, tales como corteza cerebral, tálamo y médula espinal. También a través de la caracterización y el uso de sus secretomas, es decir, el conjunto de moléculas sintetizadas y liberadas por las células en cultivo, lo cual incluye proteínas, factores tróficos y neurotransmisores, como así también moléculas provenientes del catabolismo, o de desecho. La idea es evaluar cómo estos secretomas afectan a las neuronas sensitivas primarias que median la nocicepción. Estos cultivos permiten recrear, en condiciones controladas, un microambiente celular que conserva las características fenotípicas y funcionales de las poblaciones neuronales y gliales del tejido de origen (Messina, Peralta, & Acosta, 2022).

Nuestro trabajo se centró en establecer un modelo experimental que posibilite mantener cultivos primarios viables, fenotípicamente diversos y con suficiente estabilidad temporal, tanto para la recolección del secretoma como para el estudio de la evolución de las neuronas in vitro. Esto abre las puertas a la creación de cultivos que permiten estudiar de forma directa las interacciones entre diferentes tipos de células neuronales y gliales, especialmente en el caso de los co-cultivos de médula espinal y neuronas que proyectan a la misma, tales como las nociceptivas primarias contenidas en el ganglio de la raíz dorsal (Joseph, Choudhury, & Macdermott, 2010).

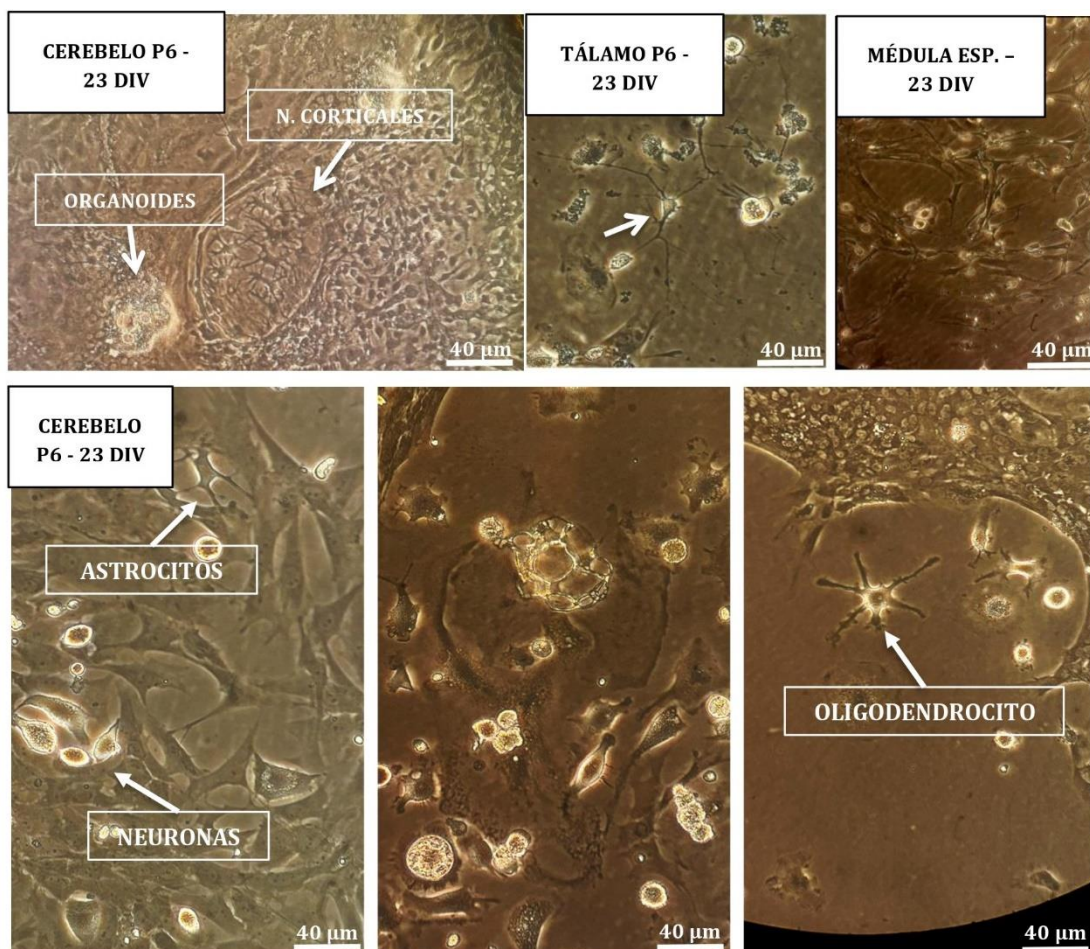
Objetivos: Nuestro principal objetivo fue desarrollar técnicas que permitan mantener cultivos primarios con células fenotípicamente diversas y viables, provenientes de ratas Wistar en etapa posnatal temprana. Se buscó establecer un protocolo reproducible que asegurara la supervivencia de neuronas y neuroglia durante un periodo prolongado, con el fin de recolectar su secretoma periódicamente.

Además, otro objetivo planteado fue la caracterización morfológica y fenotípica de las células presentes en los cultivos mediante técnicas de inmunocitoquímica y Western Blotting. De esta manera, buscamos confirmar la diversidad celular y validar que los secretomas recolectados reflejaran el funcionamiento conjunto de poblaciones neuronales y gliales, y no de un tipo celular aislado.

Materiales y métodos: Para la obtención de los cultivos se usaron ratas de la cepa Wistar de edad postnatal 5 (P5) y 6 (P6). Elegimos estas edades tempranas porque ofrecen un balance adecuado entre plasticidad celular y viabilidad (supervivencia y diferenciación fenotípica) en condiciones in vitro. Los tejidos de interés (tálamo, cerebelo, corteza cerebral y médula espinal) fueron identificados y disecados, tratados con tripsina (0,5% p/v) seguido de incubación con colagenasa tipo I (0.125% p/v) y centrifugados. A continuación, los pellets fueron disociados mecánicamente en la presencia de DMEM/F12 (ambos medios de cultivo con gran cantidad de vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y no esenciales, como otros metabolitos adicionales) suplementado con 5% FBS (suero fetal bovino) que proporciona nutrientes, factores de crecimiento, hormonas y otros componentes que promueven la proliferación, el crecimiento y aumentan la viabilidad de células in vitro. Las células fueron sembradas en placas de Petri de 35 mm de diámetro previamente recubiertas con colágeno (10 ng/mm²), lo que favoreció la adhesión celular. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Luego de una semana, sustituimos el DMEM/F12/FBS por medio definido DMEM/F12/B27, con el fin de reducir la proliferación excesiva de neuroglia y favorecer el crecimiento, viabilidad y supervivencia de las neuronas a largo plazo en un ambiente libre de suero. Sus secretomas fueron recolectados desde este punto una vez cada dos días y congelados a -20°C hasta su uso.

Resultados: Logramos generar y mantener cultivos viables de corteza cerebral, talámo, cerebelo y médula espinal de ratas de edad posnatal 6, con una duración de hasta 23 días. Sin embargo, los cultivos obtenidos a partir de ratas P5 no tuvieron éxito, lo que sugiere la existencia de diferencias asociadas al desarrollo y maduración de las neuronas entre ambas edades postnatales (Luhmann, 2021).

Los cultivos de ratas P6 presentaron una gran diversidad celular, identificada morfológicamente (figura adjunta) y además usando marcadores fenotípicos a través de inmunocitoquímica y western blot. Confirmamos la presencia de neuronas mediante la marcación con PGP9.5 y β -tubulina III, mientras que las células gliales se caracterizaron con GFAP.



Por otro lado, logramos recolectar secretomas de los cultivos de corteza cerebral y médula espinal en el rango de 9 a 23 días luego de la siembra. Estos secretomas serán usados posteriormente para evaluar el efecto que tienen en otros cultivos de distintos tejidos, como por ejemplo, del ganglio de la raíz dorsal.

Conclusión: Los resultados de este estudio nos permitieron determinar que la edad óptima para establecer cultivos primarios de tejidos de sistema nervioso central es posnatal 6 (P6), mientras que, por razones aún desconocidas, los cultivos derivados de ratas P5 no alcanzaron la viabilidad necesaria.

Proporcionamos evidencia de un nuevo método para establecer cultivos bidimensionales, fenotípicamente enriquecidos, viables y con características semejantes al tejido de origen, que pueden emplearse para recolectar secretomas y, eventualmente generar co-cultivos con otras células, como las neuronas sensoriales primarias. Esto abre la posibilidad de estudiar de forma directa las interacciones entre el sistema nervioso central y periférico, aportando nuevos conocimientos que podrían orientar el diseño de terapias innovadoras para el tratamiento del dolor crónico y otras patologías neurológicas.



Bibliografía

1. Joseph, D. J., Choudhury, P., & Macdermott, A. B. (2010). An in vitro assay system for studying synapse formation between nociceptive dorsal root ganglion and dorsal horn neurons. *J Neurosci Methods*, 189(2), 197-204.
2. Luhmann, H. J. (2021). Neurophysiology of the Developing Cerebral Cortex: What We Have Learned and What We Need to Know. *Front Cell Neurosci*, 15, 814012.
3. Messina, D. N., Peralta, E. D., & Acosta, C. G. (2022). Glial-derived neurotrophic factor regulates the expression of TREK2 in rat primary sensory neurons leading to attenuation of axotomy-induced neuropathic pain. *Exp Neurol*, 357, 114190.
4. Yezierski, R. P., & Hansson, P. (2018). Inflammatory and Neuropathic Pain From Bench to Bedside: What Went Wrong? *J Pain*, 19(6), 571-588.