



Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales

Evolution of culturemedium in the study of neural stem cells

Evet Angel Hernández González,¹ Enrique Juárez Aguilar.²

Recibido: 16/02/2009 - Acepatado: 01/06/2009

RESUMEN

Desde su creación a principios del siglo XX los medios de cultivo han jugado un papel importante en el estudio de las células vivas bajo condiciones *in vitro*. En este nuevo siglo, los medios de cultivo se han perfeccionado hasta el grado de conocer con exactitud su composición sin la necesidad de suplementarlos con suero de animales. Debido a la ausencia del suero estos medios son conocidos por el nombre genérico de “medio libre de suero” (MLS). Actualmente, los MLS son la base para el estudio de un sin fin de tipos celulares, probando ser medios eficientes para el desarrollo, proliferación y diferenciación celular. Después de una serie de cambios a través de los años, los MLS ha servido también para el estudio de las llamadas “células madre”. Específicamente, el MLS ha jugado un papel muy importante en el estudio de las células madre neuronales, descubiertas recientemente y con las cuales se derribó el antiguo dogma de la estática cerebral, según el cual el cerebro del organismo adulto era incapaz de auto-regenerarse. El descubrimiento de estas células ha abierto la posibilidad del desarrollo de nuevas terapias celulares para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer y Parkinson. En el desarrollo de estas terapias, los MLS juegan un papel preponderante. De esta manera, el objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el conocimiento actual de los medios de cultivo libres de suero y su optimización para el aislamiento y la propagación de las células madre neuronales.

Palabras Clave: Medio de cultivo, medio libre de suero, células madre neuronales.

ABSTRACT

Since its development at beginnings of 20th Century, cell culture media has played a relevant roll in the *in vitro* cell study. In this new century, media cell culture has been improved, knowing their exact formulation, without animal sera supplementation. Due to the absence of animal serum in these media, they are called “serum free medium” (SFM). Nowadays, SFM are essential for the study of several cellular types, supporting cellular proliferation and differentiation. After a series of changes throughout years, SFM have been used for study of the so-called “stem cells”. Specifically, SFM has played an important roll in the study of the neural stem cells, whose discovery in the adult destroyed the dogma of the static brain. The discovery of neural stem cells have opened the possibility of cell therapies development for several neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson. In the cell therapies development, the SFM play a relevant roll. In this way, this paper will review the scientific literature about SFM and its possible improvement for the isolation and propagation of neural stem cells.

Key words: Cell culture medium, serum free media, neural stem cells.

¹Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana. Facultad de Bioanálisis-Xalapa.

²Laboratorio de Cultivo Celular, Departamento de Biomedicina. Instituto de Ciencias de la Salud. Universidad Veracruzana.

Correspondencia:

Enrique Juárez Aguilar
Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, Col. Industrial Las Animas
CP 91190, Xalapa, Ver.
Tel. 01 (228) 8 41 89 00 Ext. 13758
Correo electrónico: enjuarez@uv.mx

CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es una técnica que se basa en la obtención de células individuales en suspensión a partir de un tejido, ya sea por métodos mecánicos o enzimáticos y su posterior incubación en un medio de cultivo líquido o sólido.¹ Esta tecnología fue ideada por Harrison en 1907 como un método para el estudio de la fisiología celular bajo condiciones controladas (citado en 1).² Con el objetivo de mantener vivas a las células, los primeros medios de cultivo contenían extractos de tejidos y fluidos de animal, tales como suero y linfa. En estos medios, se logró cultivar células de médula espinal de rana, ya que por ser animales de sangre fría, no requerían temperaturas elevadas (mayores de 35 °C) para sobrevivir. La eficiencia de este sistema permitió demostrar que los axones son extensiones de las células nerviosas.² Estudios posteriores realizados por Carrel en 1912 demostraron la utilidad del cultivo celular en el estudio de células de mamíferos.³ A partir de entonces, el estudio de las células permitió el análisis de diversos procesos que hasta entonces eran difíciles de observar, tales como la división y el metabolismo celular. Del mismo modo, el impulso de estas técnicas estimuló el desarrollo de nuevos medios de cultivo con una composición nutricional más definida.

MEDIOS DE CULTIVO CON SUERO

Con el impulso del cultivo celular *in vitro*, Eagle en 1955 desarrolla un medio de cultivo con una composición definida.⁴ El medio basal de Eagle (Eagle's basal medium) está compuesto de aminoácidos, proteínas y vitaminas en proporciones conocidas. La introducción de este medio optimizó las condiciones de cultivo y favoreció un mejor análisis de la célula. En la práctica, este medio se suplementa con suero de origen animal para favorecer la proliferación y supervivencia celular.

Ventajas y Desventajas

A partir del medio basal de Eagle, un gran número de cultivos fueron desarrollados de acuerdo a las necesidades específicas del tipo celular estudiado. Sin embargo, en todos ellos la inclusión de suero animal en su composición continuaba siendo imprescindible. La inclusión del suero animal en estos medios más definidos aceleró el crecimiento de las células, con aumento de la población total. La prolongación del tiempo de cultivo debido al uso de estos medios favoreció la adaptación de las células a estas condiciones y algunas de ellas adquirieron la capacidad de proliferar indefinidamente, logrando con ello el establecimiento de las primeras líneas celulares, las cuales se constituyeron posteriormente en excelentes modelos para el estudio de la biología celular.

Por otra parte, el uso de suero animal en el medio de cultivo no sólo favorecía la proliferación y la supervivencia de las células en cultivo, si no que la composición indefinida del mismo constituía una seria desventaja. El suero animal contiene hormonas, proteínas, factores estimulantes e inhibidores del crecimiento, los cuales pueden tener un efecto no deseado sobre las células en estudio. Más aún, dado que la concentración de los componentes del suero animal puede variar entre lotes, la respuesta celular no siempre es la misma. La variación en la concentración entre diferentes lotes no permite en algunos casos la estandarización experimental entre diferentes laboratorios. Así, con objeto de disminuir la variación en la respuesta celular debido a diferencias entre lotes de suero, los laboratorios adquieren grandes cantidades de un mismo lote. Sin embargo, esta práctica implica un costo económico elevado; mientras que la corta caducidad del suero limita la cantidad almacenada.

Por otra parte, la abundancia de nutrientes en el suero no sólo permite el crecimiento celular, sino que favorece el crecimiento de bacterias, hongos, parásitos y virus, lo que en ocasiones puede llevar a la contaminación y pérdida del cultivo. Afortunadamente, el peligro de contaminación en los cultivos se redujo importantemente mediante la adición de antibióticos de amplio espectro y la optimización de la técnica aséptica.

Otro inconveniente en el uso de suero en el medio de cultivo lo constituye el riesgo de transmisión de enfermedades. En este sentido, la industria biotecnológica ha limitado el uso de suero de origen animal en la producción de células con fines terapéuticos para su uso en humanos, aunque para algunos procesos éste sigue siendo imprescindible. La obtención del suero animal tiene además, implicaciones éticas, ya que su obtención requiere del uso o sacrificio de animales y es en muchas ocasiones rechazada por grupos protectores de los derechos de los animales. Debido a todo lo anterior la disposición del suero animal puede verse afectado por enfermedades, economía, razones políticas y éticas.

MEDIOS LIBRES DE SUERO (MLS)

Tomando en cuenta las desventajas del medio suplementado con suero, el desarrollo de medios de cultivo libre de este suplemento se incrementó. Entre los primeros MLS desarrollados se encuentra el creado para la línea celular GH3 de células cancerígenas de la pituitaria de ratas⁵, la serie de medios MCDB⁶ y el medio basal DMEM/F12.⁷

Ventajas y Desventajas

La ausencia de suero en el MLS para diversos tipos celulares trajo ciertas ventajas para su estudio. Dado que la composición

de este medio es completamente definida es posible analizar el efecto de estas sustancias sin la interferencia de compuestos desconocidos. Así, el uso de estos medios permitió realizar una selección más adecuada de la población celular, así como regular su proliferación y su diferenciación, mediante la adición o eliminación de compuestos.

De la misma manera en que el desarrollo de los MLS trajo ventajas de mucha utilidad en el estudio de las células, también presentó algunas desventajas. Así, se sabe que las células cultivadas en MLS crecen a menor velocidad y tienden a formar líneas celulares más lentamente debido a la carencia de los factores proliferativos presentes en el suero animal.^{1,8} Así mismo, la eliminación del suero en el medio de cultivo requirió del uso de reactivos de mayor pureza, así como de agua de mayor calidad y de equipo especializado para su preparación. Todo ello impactó grandemente el precio en la producción de MLS. La preparación de MLS específico de un tipo celular también influye en el costo final del mismo. A pesar de estas desventajas, la utilización del MLS en el estudio de las células, facilita grandemente la comprensión de un sinnúmero de funciones biológicas.

MEDIOS DE CULTIVOS PARA CÉLULAS NEURONALES

Inicio del cultivo de células neuronales

El desarrollo del primer medio libre de suero para las células GH₃, y de su capacidad de mantener a estas células viables con la ayuda de suplementos como hormonas y transferrina demostró que el efecto del suero sobre las células podía ser sustituido por compuestos específicos.⁵ Tras esta conclusión y con el objeto de definir un MLS específico para células neuronales, se probaron una gran cantidad de hormonas para determinar su efecto sobre las células. Después de estos experimentos se concluyó que la mayoría de las hormonas analizadas no tenían un efecto sobre la proliferación y sobrevivencia celular, mientras que hormonas tales como la insulina y la hidrocortisona eran indispensables para estos procesos. Estudios posteriores analizaron no sólo el estudio de hormonas si no de factores de crecimiento y factores accesorios.⁹ Con estos avances, el MLS originalmente utilizado para las células GH₃ fue empleado para crecimiento de nuevas líneas celulares tales como la M2R de melanoma de rata, la HeLa de cáncer cervical humano⁹, la B-16 de melanoma de rata¹⁰, la PCC.4 aza-1 y la F₉ de carcinoma de embrión de rata.¹¹

De esta manera, fue claro que la incorporación de nuevos compuestos relacionados con el metabolismo celular podía mejorar la capacidad proliferativa y de sobrevivencia de los MLS. Así mismo, se observó que el efecto de las sustancias

adicionadas al medio no era el mismo sobre los diferentes tipos celulares. En el caso del cultivo de células nerviosas, a la composición inicial del medio para células GH₃ se fueron agregando nuevos suplementos hasta obtener una mezcla compuesta por el factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés), la insulina, la transferrina, el selenito de sodio, la putrescina y la progesterona. Este medio fue probado exitosamente en células de neuroblastomas de ratas¹² y en oligodendrocitos.¹³

Célula madre, Células madre neuronales y neuroesferas

Las células troncales se caracterizan por poseer una alta capacidad proliferativa, por su capacidad de autoregenerarse y por producir varias progenies celulares. Debido a esta última capacidad, actualmente existe una gran expectación en el estudio de estas células debido a las implicaciones en el desarrollo de terapias para enfermedades degenerativas en el ser humano. Inicialmente, estas células se estudiaron en la medula ósea, donde se observaba una regeneración constante de células del sistema hematopoyético. Estudios posteriores, demostraron la existencia de células semejantes en otros órganos como hígado^{1,14,15}, piel^{16,17} y córnea^{18,9}, por mencionar algunos ejemplos, pero no en el cerebro.

Hasta hace algunos años el cerebro se consideró como un órgano estático, es decir, incapaz de regenerarse. Según esta idea, la formación de neuronas era exclusiva del estado embrionario y no existía capacidad regenerativa en el estado adulto después de la pérdida natural o por daño tisular. A finales del siglo XIX se realizan los primeros estudios en cerebro que sugieren la generación de nuevas neuronas; sin embargo, estos estudios no demostraron la presencia de células en estado mitótico, por lo que se concluyó que en el cerebro no existía proliferación celular. En 1962, Altman realiza experimentos de marcaje con [³H]-timidina y encuentra células con retención de la marca radiactiva, sugiriendo con ello la existencia de proliferación celular; sin embargo, la inespecificidad de esta técnica para distinguir la marca de [³H]-timidina en el núcleo de las neuronas y el núcleo de las células glia no permitió establecer un argumento sólido para demostrar la formación de nuevas células, dejando abierta la posibilidad de la neurogénesis.²⁰ Siguieron experimentos de otros investigadores en los que tampoco se pudo comprobar que las nuevas células fuesen neuronas. No fue sino hasta 1981 que Nottebohm y cols. demuestran una relación directa entre el aprendizaje de nuevas melodías por parte de canarios y la formación de nuevas neuronas.²¹ Es así que en los años 80 se desarrollan una serie de experimentos en los que mediante el marcaje con timidina se demuestra la formación de nuevas neuronas y la formación de

nuevas uniones sinápticas entre estas.^{22,23,24} Despues de estudios posteriores y gracias al desarrollo del microscopio electrónico y de nuevas técnicas de marcaje inmunocitoquímico se concluye que la existencia de nuevas neuronas en el cerebro adulto es una realidad, destruyendo con ello el dogma de la estática cerebral.^{25,26}

A partir de entonces la investigación cerebral se ha incrementado; en 1992, Reynolds y Weiss^{27,28} demuestran la existencia de células neuronales sensibles al EGF y en 1996,²⁹ la existencia de "células madre" en cerebro de ratón adulto. Actualmente, se tienen identificadas varias zonas del cerebro con actividad proliferativa; sin embargo dos de ellas se consideran generadoras de nuevas neuronas: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

Las células madre neuronales pueden ser cultivadas *in vitro*, donde generan cuerpos esféricos constituidos por varias poblaciones celulares, dentro de las cuales se encuentran precursores de astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, además de las mismas células madre; estas estructuras son conocidas como "neuroesferas". El cultivo de neuroesferas se ha convertido en el ensayo estándar para el análisis del efecto de factores sobre la diferenciación neuronal y constituye la base de muchos estudios usados para entender la biología celular y molecular de las células madre en el sistema nervioso central (SNC).

Cultivo de células madre neuronales

El cultivo de células neuronales se lleva a cabo a partir de tejidos cerebrales de embrión o adulto, en un medio libre de suero preparado a partir de una mezcla en proporción 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y de medio nutritivo F-12 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y suplementado con insulina, putrescina, transferrina, selenito de sodio y algunos factores de crecimiento como el EGF y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés)^{12,30,13}; las concentraciones y la actividad biológica reportada de los componentes en el MLS se resume en el cuadro número 1. Aparte de las condiciones nutricionales, el cultivo debe contar con las condiciones ambientales necesarias, por lo que se requiere de una concentración de CO₂ al 5%, una temperatura de 35 °C, un pH de 7.4 y una baja densidad celular (5 x 10⁴ células/cm²).¹ Este medio permite la proliferación y expansión de las células neuronales en un promedio de 7 a 10 días después de los cuales se observan neuroesferas de un diámetro entre 100 y 200 nm, compuestas de aproximadamente 10,000 células.³¹ Se ha comprobado que las neuroesferas pueden mantenerse viables por un período mayor de 2 años en un estado indiferenciado con cambio rutinario del medio.³² Más aún, el cultivo de neuroesferas bajo estas condiciones permite la transferencia por más de 23 veces de los cultivos a lo largo de 6 meses.³³

Cuadro 1. Concentraciones y Actividad Biológica de los Componentes del MLS

Suplemento	Concentración	Actividad Biológica reportada
• Transferrina	100 mg/ml	Esta es una proteína encargada del transporte y de almacenamiento temporal del hierro, éste a su vez interviene en muchos procesos metabólicos que impactan el funcionamiento de las células cerebrales: transporte de electrones mitocondriales, la síntesis y degradación de neurotransmisores, la síntesis proteica y la organogénesis, también evita la formación de nuevos radicales libre a partir de otras moléculas. En general se puede deducir que la transferrina juega un papel importante en la supervivencia de las células ya que es la encargada de ingresar el hierro en ellas. ^{65,66,67,68}
• Insulina	25 mg/ml	La entrada de la glucosa al interior de las células se da por canales, estos están indirectamente bajo control de la insulina. Por lo tanto, la presencia de insulina es indispensable para la producción de energía al facilitar la entrada de glucosa en el metabolismo de las neuronas.
• Progesterona	20 nM	Se sabe que esta hormona actúa como una sustancia mielinizante de nervios periféricos y se encuentra relacionada con el desarrollo y regeneración del sistema nervioso periférico. En cultivo parece tener un efecto neuroprotector. ^{12,69}
• Selenito de Sodio	30 nM	La estrés oxidativo es un desequilibrio de la homeostasis que ocasiona la muerte celular, para contrarrestarlo las células sintetizan enzimas. La síntesis de algunas de estas enzimas requieren del selenito de sodio. <i>In vivo</i> parece estar relacionado con la regulación de la función del sistema inmune. ^{12,48,70}
• Putrescina	60 nM	Tiene un papel neuro-terapéutico en los daños neuronales, es necesaria para el crecimiento de las células y también se ha visto que puede causar muerte celular en altas concentraciones. ^{12,71}
• EGF	20 ng/ml	Es un polipéptido que ejerce una variedad amplia de efectos biológicos incluyendo la promoción de la proliferación y de la diferenciación de células, debido a que activa el transporte de RNA y la síntesis de proteínas. ²⁰
• FGF	20 ng/ml	Mitógeno de células neuro-ectodérmicas. ¹

NUEVOS SUPLEMENTOS PARA EL CULTIVO DE NEUROESFERAS EN MLS

Se ha observado que el SNC es especialmente vulnerable al estrés oxidativo, debido al alto grado de utilización de oxígeno y a que las membranas contienen una gran proporción de ácidos grasos poli-insaturados propensos a la oxidación, haciéndolo más susceptible al daño por peroxidación. Además, el bajo nivel de moléculas antioxidantes en el cerebro aumenta el riesgo de daño por estrés oxidativo.³⁴ De esta manera, el cultivo de células nerviosas ha requerido el desarrollo de suplementos que tienen como base a los antioxidantes.

Actualmente existen en el mercado una amplia variedad de suplementos para el cultivo de células nerviosas entre los que podemos mencionar al suplemento B27 (invitrogen), el suplemento N2 (invitrogen) y el suplemento G5 (invitrogen). La composición y función de cada uno de estos suplementos se resumen en el cuadro número 2. La adición de estos suplementos al medio libre de suero aumenta la supervivencia y crecimiento de los cultivos de neuronas de ratón en estado embrionario y adulto.³⁵ Específicamente, el suplemento B27 se utiliza para el mantenimiento y crecimiento de neuronas de ratones en estado embrionario y en adultos, lo que reduce la formación de radicales libres y la apoptosis. Este suplemento está constituido por 5 antioxidantes: vitamina E, acetato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa y glutation.

Cuadro 2. Función de Suplementos sobre el Cultivo de Células Neuronales

Suplemento	Función	Composición
N-2	En el crecimiento y diferenciación de neuronas post-mítoticas y en el cultivo de células neuronales tumorales.	Transferrina humana 10000 mg/l Insulina 500 mg/l Progesterona 0.63 mg/l Putrescina 1611 mg/l Selenito 0.52 mg/l
G-5	En el crecimiento y diferenciación de células madre neuronales en neuronas y células gliales y para el cultivo de líneas tumorales de origen astrocítico. Se puede utilizar en combinación con B27.	Biotin 100 mg/l FGF básico 0.5 mg/l EGF 0.1 mg/l Transferrina humana 5000 mg/l Insulina 500 mg/l Hidrocortisona 0.36 mg/l Selenito 0.52 mg/l
B-27	En el crecimiento y viabilidad a largo plazo de neuronas del hipocampo y otras neuronas del SNC.	Vitamina E, acetato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa, glutation, y vitamina A

El suplemento N2 se usa en el crecimiento y la expresión de neuroblastomas y para la supervivencia y la expresión de neuronas después de la mitosis; está compuesto por transferrina humana, insulina, progesterona, putrescina y selenito, estos dos últimos con capacidad antioxidante. El suplemento G5 se ocupa principalmente para el crecimiento y expresión de células glia de cultivos primarios o líneas celulares de tumores de

células glia (gliomas); está compuesto por la vitamina biotina, algunas proteínas como el FGF básico (bFGF, por sus siglas en inglés), EGF, transferrina humana, insulina y otros componentes como hidrocortisona y selenito, este último con actividad antioxidante.³⁶

CANDIDATOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MLS PARA NEUROESFERAS

De esta manera, es claro que la adición de nuevos componentes al medio libre de suero es una práctica constante en el estudio de la biología celular como una manera de mejorar las condiciones de cultivo y de asemejar lo más posible estas condiciones a las del organismo. En un intento por mejorar las condiciones de cultivo se han probado proteínas³⁷, reactivos químicos³⁸, toxinas³⁹, antioxidantes y factores de crecimiento.³⁶ Como parte de la presente revisión, a continuación se describen algunos compuestos que debido a sus propiedades biológicas y a su uso en otros tipos celulares consideramos podrían ser candidatos para optimización del MLS utilizado en el aislamiento de las células madre neuronales.

Albúmina

Entre las proteínas que se han utilizado para el mejoramiento de las condiciones de cultivo, la albúmina ocupa un lugar predominante. Esta proteína ha sido utilizada en medios de cultivo para el mantenimiento de adipocitos⁴⁰, queratinocitos⁴¹, células epiteliales de córnea⁴², células mieloides y linfoides^{43,44,45}, fibroblastos⁴⁶, y neuronas. En estas últimas, la albúmina aumenta la supervivencia y actúa como un antioxidante. Del mismo modo, esta proteína actúa como activador de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), la encargada en convertir al piruvato en acetil coenzima, para iniciar el ciclo de krebs.^{47,48} En las neuronas la PDH aumenta la oxidación de la glucosa y el lactato generando al glutamato como producto final, el cual parece estar involucrado en el aumento de la supervivencia neuronal.⁴⁹ De esta manera, parece ejercer su efecto sobre la supervivencia de células nerviosas mediante el mantenimiento del equilibrio de óxido reducción.

Coenzima Q10

Existen otros compuestos que por su capacidad antioxidante podrían considerarse excelentes candidatos para suplementar el medio libre de suero para el cultivo de células nerviosas. Entre éstos podemos citar a la Coenzima Q10, que se sintetiza naturalmente en el cuerpo; se ha probado en cultivos de células endoteliales en donde tiene un efecto sobre la proliferación y la diferenciación de estas células.⁵⁰ Incluso, la coenzima Q10 tiene un efecto antioxidante sobre cultivo de neuronas y sirve para

obtener energía para su crecimiento y mantenimiento.⁵¹

Enzima Acetil L-Carnitina

La enzima Acetil L-Carnitina a diferencia de las anteriores no se ha estudiado en otros modelos, pero en cultivos de neuronas ésta tiene un efecto neuroprotector (antioxidante).^{52,53} En neuronas, esta enzima tiene un efecto positivo en la expresión de la acetil colin transferasa en neuronas motoras^{54,55,56,57}, en los niveles y la actividad del factor de crecimiento nervioso^{55,56} y la supervivencia de las células.^{58,52,59}

2-Mercaptoetanol

Un agente reductor ampliamente utilizado en el cultivo de diversos tipos celulares es el 2-mercaptoetanol o β -mercaptoetanol. Este agente se encuentra actualmente como constituyente de diferentes medios de cultivo como el medio RDSF que se utiliza para el cultivo de células mielómicas y células hibridomas⁶⁰; también se ha investigado su efecto en cultivos de células osteoprogenitoras humanas⁶¹, donde se determinó que tenía un efecto proliferativo y sobre la diferenciación. Más aún, la adición de 2-Mercaptoetanol aumenta de 6 a 200 veces la supervivencia celular y en 12 veces la expresión de acetil colin transferasa^{62,63,64,38}, en cultivos primarios de neuronas del estriatum de ratón de 16 días.

PERSPECTIVAS

Tomando en cuenta lo anterior, es claro que el futuro de los medios libres de suero para el cultivo de células neuronales está en el mejoramiento continuo de los mismos, ya sea con el uso de sustancias antioxidantes o de nuevas sustancias que optimicen las condiciones de proliferación y diferenciación celular. La optimización de las condiciones de cultivo de las células madre neuronales favorecerá el desarrollo de terapias celulares para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Freshney R. Ian. *Culture of animal cells a manual of basic technique*; 4^a Ed. New York Wiley-Liss. 2000. 1-6, 105-120.
2. Harrison, R. G. Observation on the living developing nerve fibers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1907; 4: 662-669.
3. Carrel, A. On The experimental life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 1912; 15: 516-528.
4. Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. 1955; 122: 501-504.
5. Hayashi I, Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*. 1976; 259: 132-134.
6. Wu R, Sato GH. Replacement of serum in cell culture by hormones: A study of hormonal regulation of cell growth and specific gene expression. *J Toxicol Environ Health*. 1978; 4: 427-448.
7. Barnes D, Sato G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem*. 1980; 102: 255-270.
8. Romijn HJ. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol Cell*. 1988; 63: 263-268.
9. Hutchings SE, Sato GH. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 901-904.
10. Poskitt PK, Poskitt TR, Wallace JH. Release into culture medium of membrane-associated, tumor-specific antigen by B-16 melanoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1976; 152: 76-80.
11. Rizzino A, Sato G. Growth of embryonal carcinoma cells in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75: 1844-1848.
12. Bottenstein JE, Sato GH. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 514-517.
13. Bottenstein JE. Growth requirements in vitro of oligodendrocyte cell lines and neonatal rat brain oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83: 1955-1959.
14. Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2005; 37: 276-279.
15. Asada N, Tanaka Y, Hayashido Y, Toratani S, Kan M, Kitamoto M, Nakanishi T, Kajiyama G, Chayama K, Okamoto T. Expression of fibroblast growth factor receptor genes in human hepatoma-derived cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2003; 39: 321-328.
16. Mitrani E, Nadel G, Hasson E, Harari E, Shimoni Y. Epithelial-Mesenchymal interactions allow for epidermal cells to display an in vivo-like phenotype in vitro. *Differentiation*. 2005; 73: 79-87.
17. Krasna M, Planinsek F, Knezevic M, Arnez ZM, Jeras M. Evaluation of a fibrin-based skin substitute prepared in a defined keratinocyte medium. *Int J Pharm*. 2005; 291: 31-37.
18. Webb SF, Davies S, Evans-Gowing R, Duncan G. A new method to obtain epithelial and stromal explants from human corneo-scleral discs for the routine culture of corneal epithelial and fibroblast cells. *Methods Cell Sci*. 2003; 25: 167-176.
19. Carrington LM, Boulton M. Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor regulation of epithelial and stromal corneal wound healing. *J Cataract Refract Surg*. 2005; 31: 412-423.
20. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962; 135: 1127-1128.
21. Nottebohm F. A Brain for all seasons: Cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science*. 1981; 214: 1368-1370.
22. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal. Production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 2390-2394.
23. Paton, J. A. And Nottebohm, F. N. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984; 225: 1046-1048.
24. Burd GD, Nottebohm F. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol*. 1985; 240: 143-152.
25. Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1: 67-73.
26. Sadananda M. Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: Implications of the paradigm shift. *Curr. Sci.* 2004; 87: 297-307.
27. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A Multipotent EGF-Responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 1992; 2: 4565-4574.
28. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255: 1707-1710.
29. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a

- stem cell. *Dev Biol.* 1996; 175: 1-13.
30. Kumar RK, O'Grady R, Li W, Smith LW, Rhodes GC. Primary culture of adult mouse lung fibroblasts in serum-free medium: Responses to growth factors. *Exp Cell Res.* 1991; 193: 398-404.
 31. Gritti A, Galli R, Vescovi AL. Culture of stem cells of central nervous system Cap 4. En: *Protocols for neural stem cell culture.* 3a Ed. New Jersey. Fedoroff y Richardson. Humana Press. 2001.
 32. Feng CZ, Yung H, Chiang, MD. Long-term nonpassaged EGF-responsive neural precursor cells are stem cells. *Wound Rep. Reg.* 1998; 6: 337-348.
 33. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris.* 2002; 96: 81-90.
 34. Roediger B, Armati PJ. Oxidative stress induces axonal beading in cultured human brain tissue. *Neurobiol Dis.* 2003; 13: 222-229.
 35. Svendsen CN, Fawcett JW, Bentlage C, Dunnett SB. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res.* 1995; 102: 407-414.
 36. Bottenstein, JE and Harvey. *Cell culture in the neurosciences.* New York/London. Plenum Press. 1985.
 37. Tabernero A, Medina A., Sánchez-Abarca LI, Medina JM. Albumin strongly activates pyruvate dehydrogenase-catalyzed reaction in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Ars Pharmaceutica.* 1996; 37: 771-779.
 38. Ni Li, Wen Y, Peng X, Jonakait GM. Antioxidants N-Acetylcysteine (NAC) And 2-mercaptoethanol (2-ME) affect the survival and differentiative potential of cholinergic precursors from the embryonic septal nuclei and basal forebrain: Involvement of Ras signaling. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001;130: 207-216.
 39. Shindler KS, Roth KA. Cholera toxin binds to differentiating neurons in the developing murine basal ganglia. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 92: 199-210.
 40. Juarez-Aguilar E, Castro-Munozledo F. 22-Kda and 20-Kda hGH isoforms Show differential effects when assayed in 3T3-F442A And 3T3-F442A/C4 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 217: 28-33.
 41. Oku H, Yamashita M, Iwasaki H, Chinen I. Further optimization of culture method for rat keratinocytes: Titration of glucose and sodium chloride in vitro. *Cell Dev Biol Anim.* 1999; 35:67-74.
 42. Castro-Munozledo F, Valencia-Garcia C, Kuri-Harcuch W. Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 2234-2244.
 43. Tanno Y, Denburg JA. Long term growth of factor-producing lymphoid and myeloid cells in serum-free medium. *Cell Struct Funct.* 1986; 11: 209-217.
 44. Iscove NN, Melchers F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J Exp Med.* 1978; 147: 923-933.
 45. Kristensen F, Walker C, Walti M, De Weck AL. Development of a serum-free defined culture medium for lymphoblast transformation tests of mouse spleen and thymus cells. *Scand J Immunol.* 1982; 16: 209-216.
 46. Kumar S. Growth of neural cell cultures in a chemically defined serum-free culture medium. *Neurochem Res.* 1983); 8: 847-52.
 47. Vicario C, Tabernero A, Medina JM. Regulation of lactate metabolism by albumin in rat neurons and astrocytes from primary culture. *Pediatr Res.* 1993; 34: 709-715.
 48. Bauer I, Oliver G. Rössler, Gerald Thiel. Sodium selenite protects immortalized hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Proceedings of the Annual Spring Meeting. German Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 2004.
 49. Tabernero A, Granda B, Medina A, Sanchez-Abarca LI, Lavado E, Medina JM. Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J Neurochem.* 2002; 81: 881-891.
 50. Glatthaar-Saalmuller B, Fallier-Becker P, Weiser M. Influence of homeopathically processed coenzyme Q10 on proliferation and re-differentiation of endothelial cells. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2004; 11: 267-273.
 51. Menke T, Gille G, Reber F, Janetzky B, Andler W, Funk RH, Reichmann H. Coenzyme Q10 reduces the toxicity of rotenone in neuronal cultures by preserving the mitochondrial membrane potential. *Biofactors.* 2003; 18: 65-72.
 52. Rampello L, Giannmona G, Aleppo G, Favit A, Fiore L. Trophic action of Acetyl-L-Carnitine in neuronal cultures. *Acta Neurol (Napoli).* 1992; 14: 15-21.
 53. Forloni G, Angeretti N, Smiroldo S. Neuroprotective activity of Acetyl-L-Carnitine: studies in vitro. *J Neurosci Res.* 1994; 37: 92-96.
 54. Imperato A, Ramacci MT, Angelucci L. Acetyl-L-Carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats. *Neurosci Lett.* 1989; 107: 251-255.
 55. De Simone R, Ramacci MT, Aloe L. Effect of Acetyl-L-Carnitine on forebrain cholinergic neurons of developing rats. *Int J Dev Neurosci.* 1991; 9: 39-46.
 56. Tagliatela G, Navarra D, Cruciani R, Ramacci MT, Alema GS, Angelucci L. Acetyl-L-Carnitine treatment increases nerve growth factor levels and choline acetyltransferase activity in the central nervous system of aged rats. *Exp Gerontol.* 1994; 29: 55-66.
 57. Bigini P, Larini S, Pasquali C, Muzio V, Mennini T. Acetyl-L-Carnitine shows neuroprotective and neurotrophic activity in primary culture of rat embryo moto neurons. *Neurosci Lett.* 2002; 329: 334-338.
 58. Formenti A, Arrigoni E, Sansone V, Arrigoni Martelli E, Mancia M. Effects of Acetyl-L-Carnitine on the survival of adult rat sensory neurons in primary cultures. *Int J Dev Neurosci.* 1992;10: 207-214.
 59. Ishii T, Shimpou Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-Apoptotic effect of Acetyl-L-Carnitine and L-Carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol.* 2000; 83: 119-124.
 60. Okamoto T, Tani R, Yabumoto M, Sakamoto A, Takada K, Sato GH, Sato JD. Effects of insulin and transferrin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium. *J Immunol Methods.* 1996; 195: 7-14.
 61. Inui K, Oreffo RO, Triffitt JT. Effects of β-Mercaptoethanol on the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Cell Biol Int.* 1997; 21: 419-425.
 62. Ishii K, Katayama M, Hori K, Yodoi J, Nakanishi T. Effects of 2-Mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci Lett.* 1993; 163:159-162.
 63. Grill RJ Jr, Pixley SK. 2-Mercaptoethanol is a survival factor for olfactory, cortical and hippocampal neurons in short-term dissociated cell culture. *Brain Res.* 1993; 613:168-172.
 64. Katayama M, Ishii K. 2-Mercaptoethanol-Independent survival of fetal mouse brain neurons cultured in a medium of human serum. *Brain Res.* 1994; 656:409-412.
 65. Burdo JR, Antonetti DA, Wolpert EB, Connor JR. Mechanisms and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system. *Euroscience.* 2003; 121: 883-90.
 66. Ferrer Viant D, Jorge Fonseca C, Cutiño Clavel I, García Rodríguez RE, Arce Gómez DL. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *MEDISAN 1999;* 3: 5-11.
 67. Leimberg JM, Konijn AM, Fibach E. Developing Human Erythroid Cells Grown In Transferrin-Free Medium Utilize Iron Originating From Extracellular Ferritin. *Am J Hematol.* 2003; 73: 211-222.
 68. Lok C.N., T.T. Loh Regulation of transferrin function and expression: Review and update. *Biol Signals and Recept.* 1998;7: 157-178
 69. Guennoun R, Schumacher M, Robert F, Delespierre B, Gouezou M, Eychenne B, Akwa Y, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: expression of functional 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci.* 1997; 9: 2236-2247.
 70. Savaskan NE, Bräuer AU., Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos

- A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate induced excitotoxicity. *FASEB J.* 2002; 17: 112-114.
71. Ponce MT, Guinazu ME, Tizio R. Improved in vitro embryo development of stenospermic grape by putrescine. *Biocell.* 2002; 26: 263-266.