

**Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa**

División de Ciencias Básicas e Ingeniería



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Desarrollo y caracterización de un modelo de
unión neuromuscular empleando técnicas de co
cultivos celulares

Tesis

Para Obtener el Grado de:
Maestro en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

Presenta:

Zúñiga Aguilar Esmeralda Sarai

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González
Dr. Rafael Godínez Fernández

INDICE

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Justificación	8
Hipótesis	9
• Objetivo General	9
• Objetivos Particulares	9
Capítulo 1. Antecedentes	
• 1.1 Anatomía y Fisiología de la unión neuromuscular	10
• 1.1.1 El receptor nicotínico de la acetilcolina	14
• 1.1.2 Patologías de las uniones neuromusculares	17
• 1.2 Electrofisiología Celular	18
• 1.3 Cultivos Celulares	21
• 1.4 Polimerización por Plasma	24
Capítulo 2. Metodología	
• Cultivos celulares	27
• Diferenciación celular	31
• Polimerización por plasma	32
• Cultivo celular sobre material polimerizado	33
• Sembrado del co cultivo celular	35
• Co cultivo celular sobre material polimerizado	36
• Técnicas electro fisiológicas de registro celular	36
• Técnicas inmunocitoquímicas	39

Capítulo 3. Resultados y Discusión

- Sembrado y crecimiento de los cultivos celulares 42
- Diferenciación celular de los cultivos celulares 45
- Recubrimiento de materiales 46
- Sembrado y crecimiento celular sobre material polimerizado 48
- Sembrado y crecimiento del co cultivo celular 52
- Sembrado y crecimiento del co cultivo celular sobre material polimerizado 57
- Registros intracelulares y fijación de voltaje. 59
- Técnicas de inmunocitoquímica y microscopía por fluorescencia 69

Capítulo 4. Conclusiones y Perspectivas de trabajo 81

Apéndice A	85
Apéndice B	93
Apéndice C	100
Referencias	103

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es implementar un modelo de unión neuromuscular para el estudio de los mecanismos involucrados en los procesos intra e intercelulares empleando co cultivos celulares. Con el fin de optimizar el crecimiento y desarrollo de las uniones neuromusculares, las células se cultivaron sobre dos superficies que han mostrado ser adecuadas en otros tipos de cultivos. Las líneas celulares que se emplearon fueron la línea de neuroblastoma NG108-15 y la línea muscular (mioblasto) C2C12, éstas fueron seleccionadas ya que se consideran modelos de motoneuronas y de células musculares esqueléticas respectivamente. Se cultivaron por separado ambas líneas celulares bajo condiciones idóneas para su crecimiento y proliferación sobre cajas de cultivo convencionales y sobre material recubierto con polipirrol sintetizado por polimerización en plasma. Las células se evaluaron de acuerdo a su morfología y características electrofisiológicas. Se aplicaron técnicas electrofisiológicas en ambos tipos celulares, como la de fijación de voltaje para la medición de las corrientes iónicas y de registro intracelular para la medición del potencial de membrana. Posteriormente se establecieron las condiciones de cultivo necesarias para el crecimiento de ambas líneas celulares en un mismo ambiente (co cultivo). Se sembraron en cajas de cultivo y sobre material recubierto con polipirrol. Para corroborar la presencia de los dos tipos celulares en el co cultivo, se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos específicos para la marcación de proteínas localizadas en los cuerpos neuronales y adquiriendo imágenes con microscopía de fluorescencia. Se concluye que se obtuvo la formación de uniones neuromusculares en co cultivo en las dos superficies empleadas, que permitirá estudiar los mecanismos involucrados en la función de la unión neuromuscular.

ABSTRACT

The aim of this work is to implement a neuromuscular model for the characterization of the neuromuscular junctions in cellular co cultures, trying to establish the mechanisms involved in the inter cellular and intra cellular processes. With the purpose of to optimize the growth and development of the neuromuscular unions, the cells were cultivated on two surfaces that have shown to be adapted in other types of cultures. We used the neuroblastoma cell line NG108-15 and myoblast cell line C2C12, these were selected on the basis of specialized literature. The lines cells were cultured by separated on dishes culture and material, both cellular lines under suitable conditions for their growth and proliferation were cultivated, We applicated electrophysiology techniques in both cellular types like the one voltaje clamp for the measurement of the ion currents and of intracellular registry for the measurement of the membrane potential. Later they settled down we applicated the necessary conditions of culture for the growth in a same atmosphere (co culture), they were seeded in boxes of culture and on material covered with polypyrrol synthesized by plasma polymerisation. In order to both corroborate the presence of cellular types in the co cellular culture, specific antibodies for proteins were applied to inmunocytochemical techniques, using and acquiring images with fluorescence microscopy. Techniques of cellular electrophysiology were applied, as voltage clamp and current clamp registry of both cellular types on boxes of culture and the material covered with polypyrrol, to verify the electrical functionality of the cells. In conclusion, we have the formation of neuromuscular cellular co culture in two surfaces, which it will allow to study the mechanisms involved in the function of the neuromuscular junction.

INTRODUCCION

Los estudios realizados en uniones neuromusculares pretenden correlacionar los aspectos estructurales de la formación sináptica con su papel fisiológico. Muchos de estos estudios han sido realizados utilizando preparaciones in vivo. Estos estudios in vivo, sin embargo, presentan limitaciones inherentes a la preparación biológica como la obtención de los datos morfológicos en el sitio de registro electrofisiológico [1].

Por lo que más recientemente se ha empleado el uso de cultivos de fragmentos de tejidos para la formación de uniones neuromusculares. Debido a que con ellos se puede tener una adecuada visibilidad de las formaciones neuromusculares y examinar más críticamente la correlación entre la estructura y la función. En la práctica esta es una tarea laboriosa. Así pues, se han reportado estudios de la formación de uniones neuromusculares en cultivo, pero las interpretaciones directas son difíciles debido a que los datos no son obtenidos de la misma sinapsis.

Como un paso hacia el estudio de mecanismos de inervación en el nivel de interacciones unicelulares, se ha determinado recientemente que el empleo de cultivos celulares primarios en monocapa de células extraídas de medula espinal y músculo esquelético logra formar uniones neuromusculares en cultivo [2].

Aunque el empleo de este tipo de cultivos es apropiado, presenta algunas desventajas, como la dificultad en el aislamiento de una sola población celular particularmente las de origen nervioso, el riesgo de contaminación de los cultivos es mayor y la duración de los cultivos primarios es menor.

Con el fin de evitar este tipo de problemas, se emplearon líneas celulares neuronales y musculares, que puedan en cultivo generar la formación de uniones neuromusculares. El empleo de líneas celulares nos ayuda a tener

un control del entorno celular, homogeneidad celular y un mejor conocimiento del tipo celular sobre el cual se está trabajando.

Tales cultivos deben de ser mantenidos en condiciones idóneas para su crecimiento. Críticamente la superficie de cultivo debe presentar las características adecuadas para que las células se adhieran y crezcan, por lo que se han hecho estudios para evaluar la adhesividad celular sobre diferentes tipos de superficies. Recientemente, se han empleado superficies modificadas por depósito de polímeros biocompatibles [4].

El procesamiento por plasma puede ser aplicado a estas superficies, ya que puede usarse para sintetizar materiales que modifiquen sólo las propiedades superficiales en entornos libres de contaminantes químicos o agentes patógenos. Además, debido a la alta energía cinética que adquieren las partículas cargadas en el plasma, los materiales que se sintetizan se adhieren fuertemente a la superficie del biomaterial [5].

Las superficies ricas en aminos tienen gran influencia en la adsorción de proteínas y en la adhesión celular, ya que proveen sitios para la inmovilización de biomoléculas. En la literatura se encuentran reportes de que el polipirrol sintetizado por plasma crea una capa superficial rica en grupos amina [3,4].

Como se puede ver de lo expuesto, la importancia de estudiar tejidos mixtos empleando la técnica de cultivo con líneas celulares y en diferentes tipos de andamios, es importante y es parte de la justificación de este trabajo.

JUSTIFICACIÓN

Los cultivos celulares son un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial que permite reproducir, de

forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen. Las áreas de aplicación potencial de los cultivos celulares se han ido ampliando de forma progresiva, por lo que constituyen ya una técnica habitual en muchos procedimientos de investigación.

Recientemente se ha introducido un nuevo modelo de estudio, para comprender los mecanismos de interacción celular con la introducción de los co cultivos celulares o mixtos.

Las aplicaciones de cultivos mixtos nos lleva a entender al comportamiento de dos tipos celulares en un mismo ambiente, por lo que estos han sido utilizados para el estudio de los mecanismos involucrados en las relaciones intra e intercelulares, además de ver los efectos de diferentes tipos de drogas utilizadas en el tratamiento de enfermedades que ataquen a uno u otro tipo celular así como de ambas.

Por lo que con este proyecto se desarrollará un modelo neuromuscular aplicando técnicas de sembrado celular de dos tipos de células sobre superficies tratadas con pirrol y sobre cajas de cultivo celular, y estudiar si las propiedades eléctricas, morfológicas y químicas de las células se conservan en presencia y ausencia del material.

HIPÓTESIS

Si las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células de una unión neuromuscular son reproducibles, entonces será posible encontrar estas uniones en co cultivos de células nerviosas y musculares.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo biológico que permita la formación de las uniones neuromusculares en co cultivos de células musculares esqueléticas y células neuronales colinérgicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención del cultivo neuronal.
- Obtención del cultivo muscular.
- Obtención del cultivo neuromuscular.
- Uso del polímero para el sembrado en cada tipo celular.
- Estudio de las propiedades eléctricas musculares.
- Estudio de las propiedades eléctricas nerviosas.
- Análisis morfológico de las uniones neuromusculares aplicando técnicas inmunocitoquímicas por microscopía de fluorescencia.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

La formación de sinapsis neuromuscular requiere una serie de pasos incluyendo la generación de neuronas y de sus células blanco (músculo), la dirección de axones a sus blancos (células musculares), la inducción de una terminal presináptica especializada y de una membrana postsináptica.

1.1 Anatomía y fisiología de la unión neuromuscular

La transmisión nerviosa tiene lugar en una estructura especializada del músculo esquelético llamada unión neuromuscular o placa motora terminal. El mecanismo de la transmisión neuromuscular consiste en la liberación de acetilcolina, y su unión a los receptores nicotínicos de la membrana postsináptica.

El músculo esquelético está innervado por nervios motores mielinizados. Se sabe que el interior de una fibra nerviosa motora tiene un potencial eléctrico de cerca de 70 mV más negativo que el exterior del nervio, y que si esta diferencia alcanza un valor umbral se genera un potencial de acción que viaja a lo largo del axón y finalmente causa la contracción del músculo que inerva. A medida que el axón de la neurona motora se aproxima a la placa terminal pierde su capa de mielina y se divide en numerosos filamentos no mielinizados, cada uno de los cuales inerva una fibra muscular. Sólo una fibra nerviosa llega a una placa terminal (no hay convergencia) sin embargo, puede haber considerable divergencia puesto que varias placas terminales pueden ser innervadas por un mismo nervio. El filamento nervioso no mielinizado se subdivide en botones terminales que se invaginan en los pliegues de la membrana muscular subyacente llamados hendiduras subneurales que incrementan el área de la superficie en la que actúa el transmisor sináptico. El espacio entre la terminal nerviosa y la fibra muscular se denomina hendidura sináptica, que tiene una amplitud de 20-30 nanómetros (nm). Los impulsos nerviosos son transmitidos por medio de un transmisor químico, la acetilcolina, que es

también el neurotransmisor de todas las fibras autonómicas preganglionares.

La acetilcolina se sintetiza en la mitocondria de la terminal nerviosa a partir de la acetilcoenzima A y la colina en una reacción catalizada por la enzima colina O-acetiltransferasa (colina acetilasa). La acetilcoenzima A es sintetizada en las mitocondrias y la colina es reciclada de la hendidura sináptica hacia la terminal nerviosa, tras la hidrólisis de la acetilcolina a colina y acetato, haciéndola disponible para la síntesis de nueva acetilcolina.



Fig. 1 Síntesis del Ach

Cuando el potencial de acción que viaja por el axón de una neurona motora llega a la terminal presináptica, se produce la apertura de los canales de Ca^{2+} –operados por voltaje– y de esta manera se eleva la concentración de Ca^{2+} en la terminal nerviosa. El Ca^{2+} que entra a la terminal nerviosa se combina con la calmodulina. La calmodulina es una proteína dependiente del Ca^{2+} , esencial para el proceso de la regulación de la exocitosis de acetilcolina en la terminal nerviosa. La calmodulina interactúa con una de las proteínas íntimamente relacionadas con el proceso de exocitosis, la sinapsina I [9], que en estado desfosforilado inmoviliza las vesículas al unirse con ellas. Las sinapsinas son un grupo de proteínas de la vesícula de acetilcolina, que las une al citoplasma y evita su movilización. La fosforilación de la sinapsina I por la proteína CaM-kinasa II (dependiente del calcio y la calmodulina) anula su afinidad por las vesículas sinápticas e induce el desplazamiento y fusión de las vesículas de acetilcolina hacia la membrana de la terminal nerviosa

produciéndose así la exocitosis de la acetilcolina hacia la hendidura sináptica (Fig 2).

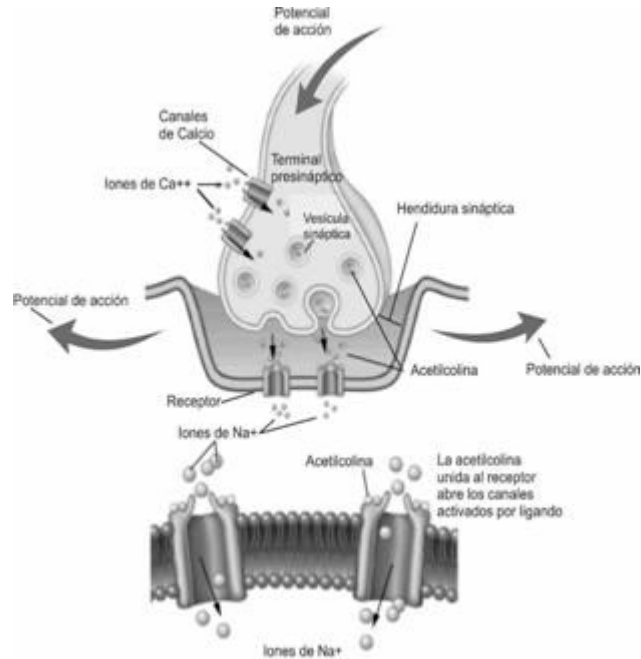


Fig.2 Función de la unión neuromuscular

Una vez que se libera, las moléculas de acetilcolina se unen a cada una de las dos subunidades de los receptores nicotínicos de la membrana postsináptica. La acetilcolina tiene un grupo amonio cuaternario de carga positiva, que es atraído por el sitio del receptor, de carga negativa. La compuerta de estos receptores es activada por un ligando, en este caso, la acetilcolina. Un ligando es una señal química que ocupa un lugar específico en el receptor. La activación del receptor por la acetilcolina da origen a un cambio conformacional de éste, que da lugar a la rápida apertura del canal iónico por el que entra Na^{+} y sale K^{+} . Al entrar el Na^{+} se despolariza la membrana de la célula muscular (Fig. 3). Esta despolarización local lleva a la activación de los canales de Na^{+} vecinos, que amplifican y propagan los potenciales de acción a toda la superficie de la fibra muscular y hacia los túbulos transversos donde existe una alta

densidad de canales de Ca^{2+} . La liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico produce la contracción muscular. La transducción de la señal eléctrica de la superficie de la membrana muscular a la liberación de Ca^{2+} intracelular del retículo sarcoplásmico se conoce como el acoplamiento excitación-contracción [10].

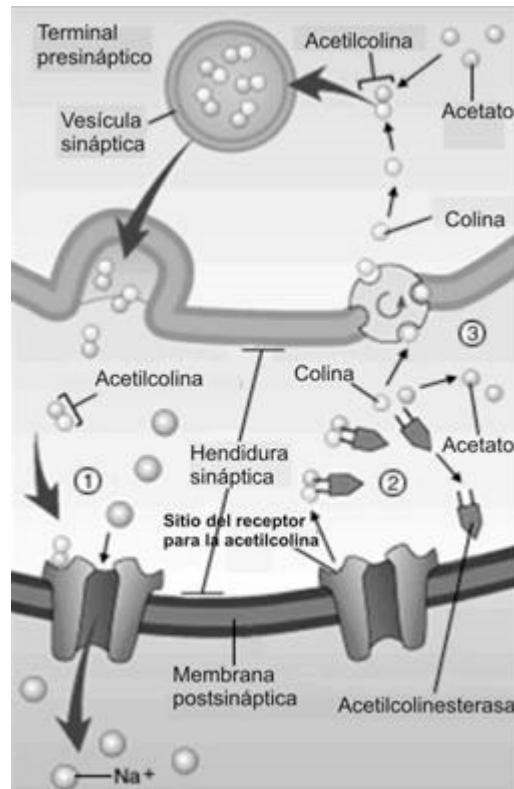


Fig. 3 Ciclo de la Ach en la Unión Neuromuscular

Cuando se libera, aproximadamente el 50% de la acetilcolina debe ser removida rápidamente para que ocurra la repolarización. La hidrólisis es llevada a cabo en menos de un milisegundo por la enzima acetilcolinesterasa, que se encuentra en la terminal nerviosa unida a la membrana postsináptica. La enzima desdobla la acetilcolina en ión acetato y colina; esta última no actúa como transmisor del impulso nervioso. La rápida actividad de la enzima impide que la acetilcolina reaccione más de una vez con el receptor y evita la acumulación de la acetilcolina en la unión neuromuscular. La disociación de la acetilcolina en sus

componentes ocasiona el cierre del canal. La acetilcolinesterasa está presente en todos los sitios donde la acetilcolina funciona como neurotransmisor [11].

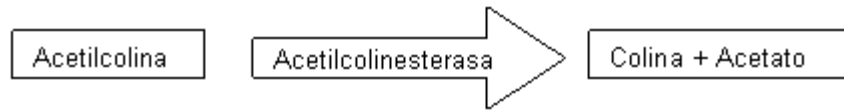


Fig.4 Hidrólisis del Ach

Entre los compuestos que pueden inhibir la síntesis y liberación de acetilcolina están el hemicolinio, que inhibe la síntesis de acetilcolina, la toxina botulínica que inhibe la liberación del neurotransmisor porque bloquea la fusión entre las vesículas del terminal sináptico y la membrana periférica, los antagonistas del calcio que al bloquear los canales de calcio a nivel presináptico evitan la liberación de acetilcolina, los aminoglicósidos que bloquean la liberación de acetilcolina por algún mecanismo de interacción con el proceso de exocitosis o por antagonismo del calcio.

1.1.1 El Receptor Nicotínico De La Acetilcolina

Se han identificado receptores de acetilcolina en músculo esquelético, el sistema nervioso central y periférico, y en los ganglios del sistema nervioso autónomo. Se conocen al menos tres tipos de receptores en la unión neuromuscular: los receptores presinápticos que se encuentran en la terminal nerviosa y dos receptores postsinápticos en el músculo, que según su ubicación se clasifican en intrasinápticos y extrasinápticos (también conocidos como unionales y extraunionales). Se acepta que los receptores preunionales son de tipo muscarínico y nicotínico. La densidad de los receptores es aproximadamente de 50 millones por cada placa motora.

Receptores extrasinápticos: Estos sufren una involución progresiva luego del nacimiento; desaparecen aproximadamente a los 20 meses,

siempre que no haya lesiones nerviosas, falta de movimiento o miopatías que determinen su permanencia por más tiempo. Los receptores extrasinápticos aun cuando no están usualmente presentes en el músculo de adultos normales, son importantes en la medida en que aparecen en los músculos que reciben una estimulación nerviosa menor que la normal. Estos receptores inmaduros están presentes también en infantes, neonatos y pacientes con déficit neuronal, son mucho más sensibles que los intrasinápticos a los agentes despolarizantes pero menos sensibles a los agentes no despolarizantes y por lo tanto estos pacientes pueden tener una respuesta anormal a estos relajantes.

Receptores presinápticos: Hay suficiente evidencia de la existencia de receptores nicotínicos en la membrana presináptica con morfología diferente a los receptores postsinápticos, pero en vez de proporcionar retroalimentación positiva y aumentar la cantidad de acetilcolina disponible para ser liberada, es probable que funcionen movilizando los depósitos y aumentando la síntesis del neurotransmisor. Por tanto, la acetilcolina aumenta su propia síntesis y movilización.

Fisiológicamente, el requerimiento de acetilcolina para la estimulación repetida sugiere que hay un gran exceso de neurotransmisor almacenado en la terminal nerviosa, suficiente quizá para 10^4 estímulos. En otras palabras, la cantidad de acetilcolina liberada durante el estímulo de alta frecuencia es más que suficiente para despolarizar la placa motora. Durante el bloqueo parcial esta reducción de la cantidad de neurotransmisor produce debilitamiento, o sea una progresiva reducción de la respuesta muscular con cada estímulo. [12,13,14].

RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA

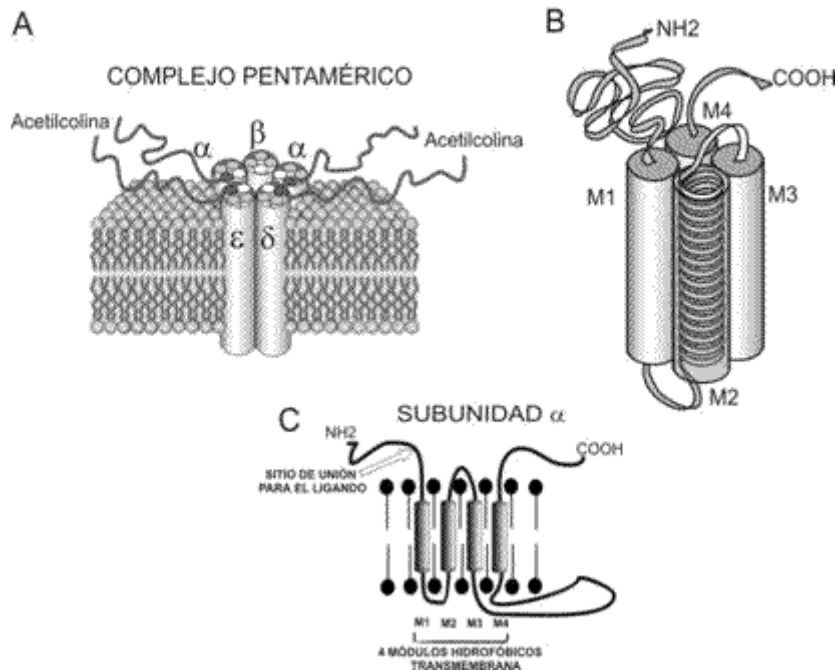


Fig.5 Composición de las unidades del receptor nicotínico de la acetilcolina en la superficie de la placa Terminal del músculo estriado

Receptores postsinápticos: El receptor nicotínico de la acetilcolina existe en 3 estados funcionales: cerrado, abierto y desensibilizado; en el estado abierto conduce iones y cuando está cerrado o desensibilizado no los conduce. Durante el ciclo de transición entre uno y otro estado los receptores, estando en estado de reposo, se unen a dos moléculas de acetilcolina y se isomerizan al estado abierto; si continua la unión con la acetilcolina u otro ligando agonista, se desensibilizan y el canal permanece cerrado. El papel de la desensibilización en la transmisión colinérgica en condiciones fisiológicas es incierto, pero es evidente bajo algunas condiciones patológicas y en la neurotransmisión con otros neurotransmisores [15].

La unión de las dos moléculas de acetilcolina con los dos sitios del receptor ocasiona un cambio en la conformación geométrica del receptor, que es responsable tanto de la selectividad por determinados iones como

de la apertura de la compuerta del canal después de la unión con el ligando [16]. Aunque el canal está cerrado en los estados de reposo y de desensibilización, la evidencia indica que la estructura en ambos estados es diferente, siendo más amplia la compuerta en el estado desensibilizado que en el de reposo [17]. La ausencia de acetilcolina en los sitios de unión hace que las cinco subunidades se acoden para cerrar el canal en la cara interna de la membrana, y la presencia de este ligando hace que las subunidades se rectifiquen para abrir paso a los iones de Na⁺ y K⁺.

1.1.2 Patologías de las uniones neuromusculares

Para que el impulso nervioso se transmita al músculo son precisos una serie de pasos a nivel de la placa motora: se debe liberar acetilcolina a la hendidura sináptica que debe unirse a los receptores nicotínicos de la membrana muscular. La Miastenia Gravis está mediada por la presencia de anticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico de acetilcolina (trastorno postsináptico). La causa del síndrome de Eaton-Lambert es la presencia de anticuerpos dirigidos contra canales de calcio dependientes de voltaje de la terminal presináptica impidiendo que se libere la acetilcolina (trastorno presináptico). La toxina botulínica también impide la liberación de acetilcolina [18].

<i>Autoinmunes</i>
Miastenia grave
Síndrome de Eaton-Lambert
<i>Congénitas</i>
Bien caracterizadas
Miastenia familiar infantil (deficiente resíntesis de acetilcolina)*
Pobreza de vesículas sinápticas
Déficit de acetilcolinesterasa*
Trastornos cinéticos y déficit de receptores de acetilcolina
Parcialmente caracterizadas
Miastenia de «cinturas» familiar*

* Herencia autosómica recesiva.

Tabla 1 Clasificación de las enfermedades de las uniones neuromusculares [18].

El estudio de los mecanismos implicados en la comunicación neuromuscular, así como el análisis de las patologías que dañan a las uniones neuromusculares, han sido logrados gracias a los estudios bioquímicos y electrofisiológicos de las células excitables.

1.2 Electrofisiología celular

El estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables ha sido vital para la comprensión de los mecanismos íntimos por los cuales las células inician y regulan la función celular comandada por la actividad eléctrica.

Ejemplos típicos de células excitables son las musculares, glandulares y nerviosas, en las cuales la actividad eléctrica induce la contracción, la liberación de hormonas y el procesamiento de información, respectivamente. El estudio de las propiedades eléctricas de las células se ha extendido a las células no excitables, en las cuales, a pesar de no presentar patrones eléctricos característicos de las células excitables (potenciales de acción), los cambios en su potencial de membrana juegan un papel relevante en la función celular.

Actividad eléctrica de las células excitables

En las membranas de casi todas las células del organismo hay potenciales eléctricos. Algunas células como las nerviosas y musculares son excitables, es decir capaces de generar impulsos eléctricos rápidamente cambiantes en sus membranas. Estos impulsos se pueden utilizar para transmitir señales a lo largo de las membranas nerviosas o musculares.

El Potencial de Reposo

El potencial de reposo es el voltaje a través de la membrana de una célula no estimulada. Las células excitables se caracterizan por que mantienen continuamente un potencial eléctrico diferente entre el interior y el exterior celular. Este potencial de reposo se encuentra en la mayoría de los casos en un rango entre los -50 a -90mv, el potencial de reposo de las grandes fibras musculares esta cerca de los -90mv, mucho más negativo que en el de liquido intersticial en el exterior de la fibra, la membrana en el estado de reposo es mas de 50 - 100 veces más permeable a los iones de potasio que a los iones de sodio.

Todas las membranas celulares poseen una bomba de sodio-potasio que impulsa sodio al exterior de la fibra y potasio hacia al interior de esta forma se mueve más cantidad de cargas positivas al exterior que al interior, produciéndose así una carga negativa al interior de la célula y una positiva al exterior de la misma [38].

EL Potencial de Acción

Las señales nerviosas se transmiten mediante potenciales de acción, que son cambios rápidos en el potencial de membrana, es una inversión del potencial de membrana con una duración de algunos milisegundos y puede llegar hasta +30mV. Obedece a la regla de todo o nada: un estímulo debe ser lo suficientemente grande como para despolarizar a la neurona por encima del valor umbral, si no se alcanza el umbral no hay disparo, si rebasa el umbral, el potencial de acción siempre tiene el mismo tamaño. Las neuronas no pueden excitarse durante la despolarización y son difíciles de excitar durante la repolarización.

Estos constituyen los períodos refractarios absolutos y relativos que limitan la velocidad máxima de disparo y restringen la propagación del PA a una sola dirección.

Partes del potencial de acción:

- 1.- Potencial en reposo (antes de que se dé el estímulo).
- 2.- Período de latencia (tiempo en que tarda en llegar el potencial al registro).
- 3.- Fase de despolarización (se hace positivo el potencial).
- 4.- Sobretiro o meseta (cuando el potencial está invertido).
- 5.- Fase de repolarización (se hace negativo el potencial de nuevo).
- 6.- Fase de hiperpolarización (se hace más negativo que el potencial en reposo).

Los potenciales de acción son producto de la apertura de los canales de Na^+ voltaje dependientes. Las características de los potenciales de acción, como disparo a un voltaje umbral y período refractario, es debido a los diferentes estados que sufre el canal de Na^+ que se enumera en el ciclo siguiente: 1 = reposo, 2 = activo, 3 = inactivo, 4 = reposo.

En el período refractario absoluto no hay respuesta, porque los canales de Na^+ están en estado inactivo. El proceso de repolarización es debido a la apertura tardía de canales de K^+ voltaje dependientes; además, de la inactivación de los canales de Na^+ .

- La hiperpolarización, es producto del cierre lento de los canales de K^+ voltaje dependientes.

Propagación de los potenciales de acción.

En el punto donde se aplicó el estímulo aparecen cargas de sentido opuesto, lo que genera corrientes iónicas. Esta zona activa comienza a atraer cargas de sentido contrario de las zonas vecinas (las que son llevadas por flujos iónicos); esto hace disminuir el potencial de membrana en el punto vecino y se genera otro potencial de acción. Por eso se dice que es una respuesta auto propagada; es como si el potencial de acción fuera el estímulo para el lugar vecino. La propagación del impulso se puede dar en cualquier sentido, incluso en ambos sentidos, es bidireccional en la fibra nerviosa [44] cuando estimulamos en alguna región del axón, aunque normalmente es unidireccional debido a que el potencial de acción se propaga del soma hacia la terminal nerviosa, la inactivación de los canales de Na⁺ garantiza que sea unidireccional la propagación normal del potencial de acción.

1.3 Cultivos Celulares

Algunos de los estudios que se han realizado para comprender los mecanismos implicados en la comunicación neuromuscular, se han hecho a partir de la disección por separado de músculo y nervio, por los que actualmente para facilitar el trabajo y reducir tiempos de experimentación se han aplicado los cultivos celulares como modelos de estudio, en este caso para estudiar los modelos neuromusculares se aplica el sembrado en conjunto de músculo y nervio, conocido como co cultivo neuromuscular.

La sinapsis neuromuscular, es una sinapsis en particular para el estudio de: la formación de sinapsis de geometría simple, desarrollo y regeneración sináptica, la formación sináptica en cultivos celulares.

Por lo que los cultivos celulares son un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial que

permite reproducir, de forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen. Las áreas de aplicación potencial de los cultivos celulares se han ido ampliando de forma progresiva, por lo que constituyen ya una técnica habitual en muchos procedimientos de investigación [19,20].

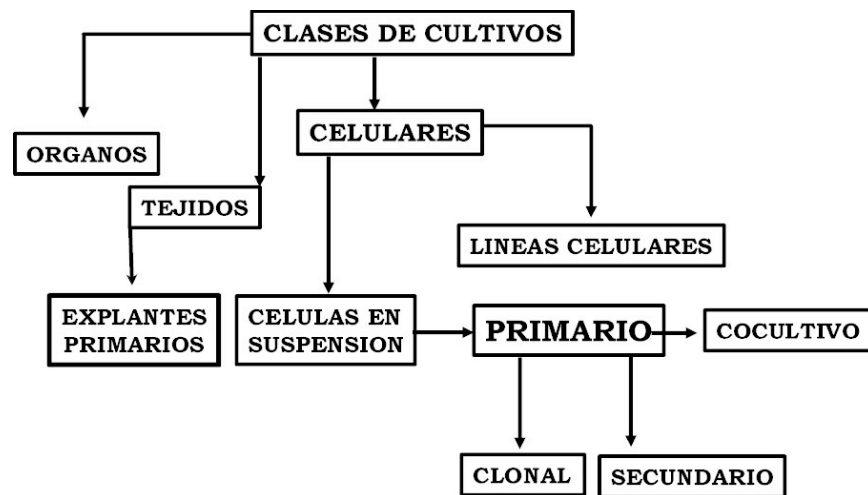


Figura 6. Tipos de cultivos celulares

Potencialmente todas las células son cultivables, pero cada una de ellas presenta peculiaridades y requerimientos específicos [21]. Ello hace que existan numerosos modelos diferenciados de cultivo celular (tabla 2). Según su estructura, se pueden diferenciar tres grandes grupos de cultivo celular: cultivo de órgano, cultivo de tejido y cultivo de células aisladas.

En el cultivo de órgano y de tejido, se mantienen la estructura y función intactas del órgano entero o de una parte del mismo, sin dissociar sus células [22,23]. Se dispone así de una población heterogénea de células que se puede mantener sólo durante un período de tiempo limitado [24]. El cultivo de células aisladas es un sistema biológico que logra la supervivencia fuera del organismo de células independientes, pero capaces de dividirse y mantener sus funciones in vitro. Esta última modalidad se denomina también cultivo en monocapa o suspensión y es la más utilizada

habitualmente [25-27]. Existe también la posibilidad de realizar un cultivo limitado en el tiempo de organelas subcelulares como las mitocondrias, retículo sarcoplasmático y ribosomas [28-30].

La posibilidad de realizar cultivos celulares es relativamente reciente. Harrison [30] y Carrel [31] describieron entre 1885 y 1900 las primeras técnicas de cultivo hístico al intentar mantener neuronas vivas fuera del organismo y delimitaron así sus principales normas de mantenimiento. En 1933, Gey [32] consiguió el primer cultivo de células tumorales. Las técnicas de separación enzimática de tejido se iniciaron en 1952 cuando Moscona [33] tripsinizó fragmentos de embrión de pollo y consiguió células aisladas capaces de crecer in vitro sobre placa de cultivo, técnica que, con mejoras, sigue aún usándose en nuestros días. En los últimos veinte años, y de forma clara- sin capacidad de reproducción o división celular que se pueden mantener en medios de cultivo de forma limitada y a las que se denominan células terminales. Tal es el caso de las neuronas o de las células miocárdicas. Otros tipos celulares como los fibroblastos, las células epiteliales y las tumorales se mantienen de forma más prolongada en los medios de cultivo. Espontáneamente, por clonación o por inducción mediante sustancias químicas o virus (SV-40), algunas células pueden transformarse y mantenerse indefinidamente en el medio de cultivo y dar lugar a líneas celulares permanentes [34,35].

En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co cultivos.

Principales modelos de cultivo celular

Células mesenquimatosas
Fibroblastos
Condrocitos
Células musculares esqueléticas y cardíacas
Adipocitos
Osteoblastos
Células endoteliales
Células neuroepiteliales y parenquimatosas
Células epidérmicas: queratinocitos y melanocitos
Neuronas corticales y medulares
Células de la glía
Células endocrinas
Hepatocitos
Células renales
Células bronquiales y pulmonares
Células hematopoyéticas
Medula ósea
Células linfoides
Células mieloides
Células eritroides
Células gonadales
Híbridomas
Células tumorales

Tabla 2. Principales modelos de cultivo celular

Los cultivos celulares han ayudado al estudio de las interacciones celulares como es el caso de las uniones neuromusculares. Estos estudios han permitido tener una comprensión detallada de los mecanismos químicos y eléctricos involucrados en la sinapsis en general y del control nervioso de las fibras musculares en particular. Asimismo, han permitido comprender los mecanismos involucrados en algunas patologías que afectan la unión neuromuscular y la acción de los fármacos empleados en su tratamiento. [38,39].

1.4 Polimerización

Las superficies de crecimiento celular son un punto importante para poder realizar diferentes tipos de estudios, por lo que estas superficies deben de brindar una buena adhesividad celular para ayudar a mantener la supervivencia celular, en base a esto se han aplicado técnicas de polimerización por plasma para depositar películas delgadas de monómeros que han presentado resultados favorables en el crecimiento celular y adhesión celular.

Así que la polimerización es un proceso químico por el cual, mediante calor, luz o un catalizador, se unen varias moléculas de un compuesto generalmente de carácter no saturado llamado monómero para formar una cadena de múltiples eslabones, moléculas de elevado peso molecular y de propiedades distintas, llamadas macromoléculas o polímeros.

Los **polímeros** son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.

La naturaleza química de los monómeros, su masa molecular y otras propiedades físicas, así como la estructura que presentan, determinan diferentes características para cada polímero. Por ejemplo, si un polímero presenta entrecruzamiento, el material será más difícil de fundir que si no presentara ninguno [43].

Los polímeros pueden ser de tres tipos:

- a. **Polímeros naturales:** provenientes directamente del reino vegetal o animal. Por ejemplo: celulosa, almidón, proteínas, caucho natural, ácidos nucleicos, etc.
- b. **Polímeros artificiales:** son el resultado de modificaciones mediante procesos químicos, de ciertos polímeros naturales. Ejemplo: nitrocelulosa, etonita, etc.
- c. **Polímeros sintéticos:** son los que se obtienen por procesos de polimerización controlados por el hombre a partir de materias primas de bajo peso molecular. Ejemplo: nylon, polietileno, cloruro de polivinilo, polimetano, etc.

Tipos de Reacciones de Polimerización

Hay dos reacciones generales de polimerización: la de adición y la condensación. En las polimerizaciones de adición, todos los átomos de monómero se convierten en partes del polímero.

En las reacciones de condensación, algunos de los átomos del monómero no forman parte del polímero, sino que son liberados como H_2O , CO_2 , ROH , etc. Algunos polímeros (ejemplo: polietilén glicol) pueden ser obtenidos por uno u otro tipo de reacción [43].

Polimerización por Adición

Las polimerizaciones por adición ocurren por un mecanismo en el que interviene la formación inicial de algunas especies reactivas, como radicales libres o iones. La adición de éstas especies reactivas a una molécula del monómero convierte a la molécula en un radical o Ion libre. Entonces procede la reacción en forma continua. Un ejemplo típico de polimerización por adición de un radical libre es la polimerización de cloruro de vinilo, $H:C = CHCl$, en cloruro de polivinilo (PVC).

Polimerización por Condensación

La polimerización por condensación es el proceso mediante el cual se combinan monómeros con pérdida simultánea de una pequeña molécula, como la del agua, la del monóxido de carbono, o cloruro de hidrógeno. Estos polímeros se llaman polímeros de condensación y sus productos de descomposición no son idénticos a los de las unidades respectivas del polímero [4,5].

CAPITULO 2. METODOLOGÍA

- ***CULTIVOS CELULARES***

Uno de los primeros pasos a seguir en el proyecto, es el sembrado de las líneas celulares que se eligieron, Las líneas celulares fueron seleccionadas de acuerdo a la literatura manejada, ya que se encontró que tanto las líneas celulares NG108-15 y la C2C12 han sido empleadas en el estudio de las uniones neuromusculares en co cultivos con células extraídas de tejidos musculares y de motoneuronas respectivamente [39]. La línea celular NG108-15 es una célula conocida como hibridoma la cual proviene de neuroblastoma de rata y glioma de ratón, además de ser una célula colinérgica, es decir, produce el neurotransmisor encargado de la producción de los potenciales de placa, la acetilcolina, la línea celular fue adquirida de ATCC No. HB-12317, la línea celular C2C12 es una célula muscular de ratón la cual se adquirió por donación del Lab. de Genética y Biología molecular del CINVESTAV-IPN.

El cultivo celular se realizó en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas. Por lo que las características que se cuidaron al momento de preparar el medio son: pH, osmolaridad, temperatura, viscosidad y tensión superficial.



Fig. 1 Preparación del medio de cultivo, se presenta sobre la parrilla de agitación magnética que nos permite homogenizar el medio para diluirlo completamente

La preparación del medio se hizo de forma manual a partir de un sobre de medio en polvo, por lo que se tuvieron que añadir algunos componentes necesarios para mantener las características antes mencionadas, el protocolo de preparación se muestra a detalle en el apéndice A.

Para su cultivo fue necesario elaborar los medios y suplementos requeridos para su manutención, todos los medios preparados fueron sometidos a pruebas de esterilidad, colocando 2 ml de cada medio preparado en platos de 35 mm y puestos en la incubadora para su seguimiento. Al pasar las pruebas de esterilidad los medios fueron empleados en el cultivo y sembrado de cada línea celular.

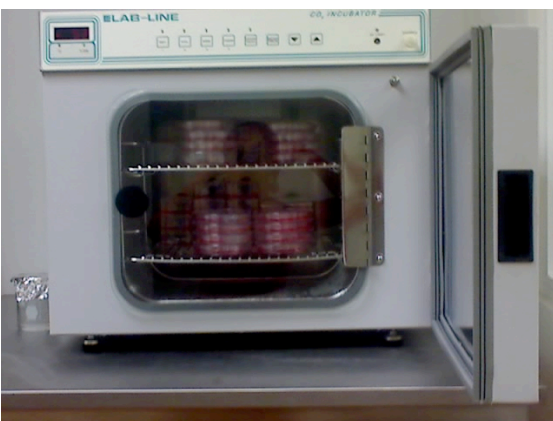


Fig 2. Incubadora de CO2. Todas las muestras de los medio fueron colocadas dentro de la incubadora para corroborar que no se había realizado ningún tipo de contaminación durante su preparación.

El sembrado de la línea celular NG108-15 se llevó a partir de la descongelación de un crio vial de 1.5 ml, el crio vial fue descongelado de manera rápida en baño térmico a 37°C ya que el contenido de los reactivos utilizados como el DMSO pueda dañar las células.

Una vez descongeladas las células fueron colocadas en un tubo FALCON para centrifuga de 15 ml y re suspendidas con 5 ml de medio fresco de cultivo, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm, para formar un botón celular en el fondo del tubo, una vez obtenido, el medio del tubo fue decantado y se re suspendieron las células en 5 ml de medio fresco de crecimiento.

Las células fueron colocadas en cajas de cultivo celular de 25 cm², y colocadas en la incubadora en condiciones optimas de atmosfera y temperatura (5%CO₂ y 37°C).

La línea celular C2C12 al ser donada, esta fue previamente sembrada en una caja de 25 cm² por el técnico del laboratorio, por lo que sólo fue colocada en la incubadora para guardar las condiciones de cultivo que tenía anteriormente.

El medio de cultivo de ambas líneas celular fue cambiado cada tercer día o hasta que las células lo viraran, el medio en general fue cambiado cada tercer día, con el objetivo de evitar que las células se estresen y esto provoque desprendimiento y muerte celular.



Fig.3 Cajas de cultivo. Las cajas de cultivo fueron mantenidas en condiciones adecuadas de temperatura y atmosfera (37°C, 5%CO₂) para asegurar un adecuado crecimiento celular

Al tener una confluencia celular del 80% en las cajas de cultivo de 25cm², las células son tripsinizadas con 2 ml de TRIPSINA + EDTA el cual es un quelante que rompe los enlaces proteínicos entre las células provocando que estas se desprendan de la superficie en la que estén adheridas.

Al desprenderse las células de la caja de cultivo estas fueron homogenizadas con 3 ml de medio fresco de cultivo y sembradas en una caja de 75 cm² con 8 ml de medio de cultivo.

El objetivo principal del crecimiento y sembrado celular es el de poder crear una reserva celular de la líneas celulares adquiridas, así que cuando se obtuvo una cantidad suficiente de células en crecimiento estas fueron sometidas a técnicas de crio preservación celular.

La técnica consistió en utilizar los medios de congelación mostrados en el APENDICE A, las células fueron tripsinizadas de las cajas de cultivo, la suspensión fue colocada en tubos de 15 mm para centrifuga y centrifugados a 1500 rpm, al obtener el botón celular este se homogenizó con el medio de congelación y colocado en crio viales de 2 ml.



Fig. 4. Crio preservación celular. Después de haber obtenido una considerable cantidad de células, estas deben de ser tratadas para ser conservadas a muy bajas temperaturas para poder ser utilizadas en experimentos posteriores. A la izquierda se observa el tanque de nitrógeno liquido, el cual conserva los crio viales de células a temperaturas de -80°C . A la derecha se encuentran los crio viales que almacenan las células.

Los crio viales fueron congelados a una temperatura de -20°C durante una semana y posteriormente llevados a una temperatura de -80°C , por lo que se colocaron en la fase gaseosa del nitrógeno por tres días y luego en nitrógeno liquido hasta nuevo uso.

El objetivo de realizar así la congelación es el de evitar que las células se dañen por cambios bruscos de temperatura, ya que la congelación debe realizarse de forma gradual.

▪ **DIFERENCIACION CELULAR**

Ya que se tuvo una buena reserva celular con que trabajar, se comenzó con la experimentación de las líneas celulares, las líneas celulares que se manejan presentan dos fases de crecimiento, la línea celular muscular C2C12 al momento de ser sembrada presenta una morfología esférica (miobolas) y posteriormente esta cambia su morfología, tornándose más alargada y aplanada (miotubos), siendo esta la morfología que se requiere para poder ser utilizada dentro de un modelo neuromuscular, pero para

los fines requeridos en este proyecto, la reproducción celular debe de ser anulada, en este caso se utilizó suero de caballo inactivado para lograr esto.

La línea neuronal NG108-15 al momento de ser sembrada, también presenta una forma esferoide, durante el proceso de adhesión y crecimiento, las células comienzan a presentar alargamiento de sus axones, por lo que para ser un adecuado modelo neuronal, esta debe de conservar esta morfología y sobre todo evitar la reproducción celular, para lograr esto se utilizó dibutiril AMPc.

Al conocer los detalles de cada línea celular para su especificación, las células fueron sometidas a este proceso; se sembraron células C2C12 y NG108-15 por separado en platos de cultivo de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo y colocados en la incubadora en condiciones optimas para su crecimiento (5% CO₂, 37°C).

Cuando las células se adhirieron a los platos de cultivo, el medio fue cambiado por 2 ml del medio de diferenciación (apéndice A), el medio fue cambiado a diario ya que al reducir la cantidad de nutrientes al cultivo, se corre el riesgo de tener una mayor muerte celular.

▪ **POLIMERIZACION POR PLASMA**

Una vez que se realizaron las pruebas de especificación de las células, se prosiguió a continuar con el proceso de polimerización del material en el cual se harían los sembrados celulares.

La técnica de polimerización que se utilizó, fue la de polimerización por plasma con descarga luminiscente, debido a que solo se necesitaba de recubrir el material con una capa muy delgada del polímero.

El material en el que se decidió realizar el nuevo sembrado celular, fue en cobre objetos de 10 mm, el polímero que se decidió utilizar fue poli-pirrol, ya que este ha presentado resultados bastante favorables en experimentos anteriores [4, 5, 43] en que fue utilizado como sustrato para el crecimiento celular.

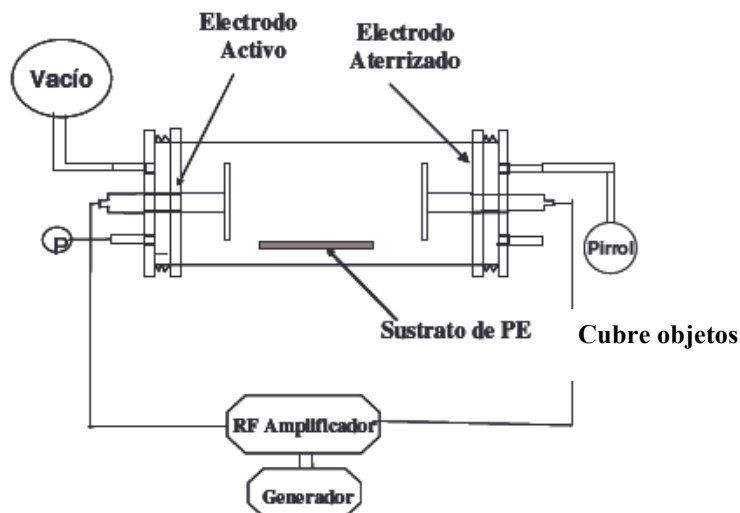


Fig.5 Esquema de la técnica de polimerización por plasma. Los cubre objetos fueron colocados en el interior del reactor para su polimerización, para esto se utilizó pirrol para recubrir los materiales de cultivo.

Los cubre objetos fueron colocados en el reactor de plasma, a una frecuencia de oscilación de 30 watts por 10 min, a una presión de vacío de 3×10^{-2} Torr, el detalle del proceso se muestra en el apéndice A.

Al obtener el recubrimiento de los materiales estos se guardaron y colocaron bajo luz UV para asegurar su esterilidad para usos en experimentos posteriores.

▪ **CULTIVO CELULAR SOBRE MATERIAL POLIMERIZADO**

Al tener listos los materiales se decidió probar el crecimiento celular sobre el material, se hizo un primer experimento colocando 2 cubre objetos

dentro de dos cajas de cultivo de 35 mm, después se colocaron 2 ml de células C2C12 y NG108-15 con medio de crecimiento, la caja fue incubada y monitoreada por medio del microscopio invertido.

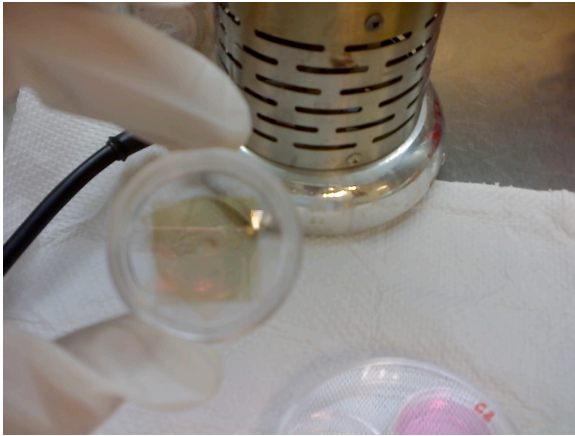


Fig.6 Cubre objetos polimerizado colocado dentro de una caja de cultivo de 35 mm, en donde se realizaron el sembrado celular

Al observar la adherencia celular sobre el material se decidió realizar otro sembrado celular sobre el material, ya que en el experimento anterior, se hizo sobre cajas tratadas, las células fueron vaciadas en toda la superficie de la caja, por lo que se decidió implementar otra técnica de cultivo, conocida como microcultivo.

Antes de realizar el microcultivo se realizaron pruebas sobre cubre objetos sin polimerizar colocados dentro de cajas de cultivo sin tratar, se pusieron muestras de 200 μ l, 400 μ l y 600 μ l sobre el cubre objetos y se tomó el tiempo en que la muestra se evaporaba dentro de la incubadora. La muestra que obtuvo mejores resultados fue la de 400 μ l.

Al tener la cantidad y el tiempo necesarios para poder realizar el cultivo, se colocaron 400 μ l de medio con células en el cubre objetos, y se incubo la caja a las condiciones optimas (5%CO₂ y 37°C).

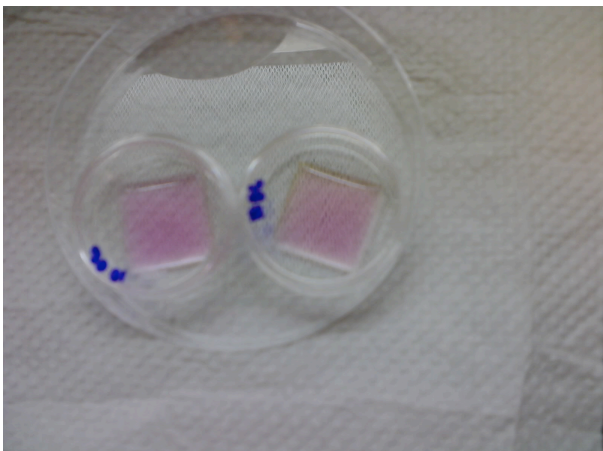


Fig. 7. Técnica de microcultivo utilizada sobre cubre objetos polimerizados por plasma y sin polimerizar, con el objetivo de asegurar la adhesión y crecimiento celular sobre el material de cultivo.

Al asegurar el crecimiento de las células solo en el material polimerizado, se realizó la especificación de las líneas celulares sobre el material. Se intercambia el medio de cultivo celular, por 400 μ l de medio de diferenciación, fueron incubadas y el medio fue cambiado a diario por las razones antes mencionadas.

▪ **SEMBRADO DEL CO CULTIVO CELULAR**

Ya que se realizaron los experimentos de crecimiento celular por separado, se optó por comenzar con el sembrado del co cultivo, para esto se realizó primero sobre cajas de cultivo celular, se sembraron células C2C12 y NG108-15 de la forma anteriormente mencionada para su crecimiento, se sembró un 60% de células C2C12 y un 40% de NG108-15.

Al presentar un buen crecimiento celular, el medio de cultivo fue cambiado con 2 ml de medio de diferenciación, las células fueron incubadas, el medio fue cambiado a diario y esto se realizó por 4 días.

Pasado el proceso de especificación y detención de la reproducción celular las células nerviosas NG108-15 fueron tripsinizadas con 0.5 ml de

Tripsina + EDTA, se homogenizaron con 1.5 ml de medio de diferenciación para la línea celular C2C12 y se sembraron en la caja que contenía la línea muscular C2C12, se incubaron en la condiciones ya mencionadas.

▪ **CO CULTIVO CELULAR SOBRE MATERIAL POLIMERIZADO**

Después se realizó el sembrado del co cultivo celular sobre el material polimerizado, se colocó un vidrio polimerizado en una caja de 35 mm sin tratar, se agregaron 400 µl células suspendidas en el medio, las células nerviosas fueron sembradas en caja de 35 mm.

Al adherirse y crecer la células en sus respectivas superficies, el medio se intercambia por el de diferenciación celular, se colocaron 400 µl de medio sobre el vidrio para diferenciar la línea C2C12, para la línea nerviosa se colocaron 2 ml de medio de diferenciación para dicha línea, el proceso duro 4 días, durante los cuales el medio fue cambiado a diario.

Pasado el tiempo de especificación de las líneas, las células nerviosas fueron tripsinizadas de la caja con 0.5 ml de tripsina + EDTA, la suspensión fue retirada y colocada en un tubo de 15 mm para ser centrifugado a 1500 rpm, se aplicaron 400 µl y se homogenizó, la solución fue colocada en el cubre objetos y se incubó bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas.

▪ **TECNICAS ELECTROFISIOLOGICAS DE REGISTRO CELULAR**

Una vez que se obtuvieron todos los cultivos celulares sobre cajas y material, se decidió empezar a realizar las pruebas electrofisiológicas para cada tipo celular, los protocolos que se siguieron así como todo el proceso de fabricación de pipetas y elaboración de soluciones electrolíticas se puede ver en el apéndice B.

El estudio detallado de las propiedades eléctricas de las células se ha desarrollado con el empleo de dos técnicas fundamentales: La técnica de fijación de corriente y la técnica de fijación de voltaje. Con la técnica de fijación de corriente se aplicaron pulsos rectangulares de corriente y se observaron los cambios asociados en el potencial de membrana de las células. Con la técnica de fijación de voltaje, se aplicaron pulsos rectangulares de voltaje y se observaron las corrientes de membrana inducidas. En ambas técnicas, fue indispensable la aplicación de pulsos rectangulares de diferente polaridad, duración y amplitud. En los protocolos de estimulación normalmente se introducen datos como el número de pulsos, la magnitud y polaridad del primer pulso, el incremento en amplitud de los pulsos subsiguientes y el intervalo de tiempo entre ellos. La n respuestas eléctricas inducidas en la célula por la n pulsos se almacenan en un archivo para su posterior análisis.

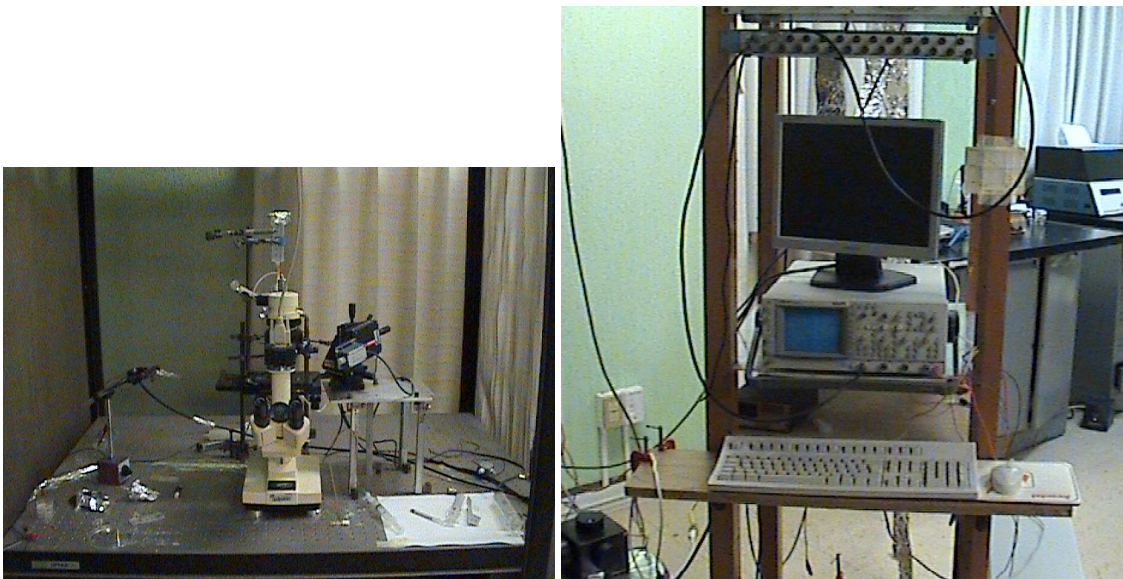


Fig. 8 Equipo de registro electrofisiológico. Izq. Microscopio y amplificador de registro, se colocan las cajas de cultivo sobre la placa del microscopio para poder hacer el registro de eléctrico de las células, el amplificador es manipulado por medio de un micro manipulador de control fino. Der. El despliegue de los datos se realiza por medio del programa P-Clamp.

- Fijación de Voltaje

En las células nerviosas NG108-15 se utilizó la técnica de fijación de voltaje (patch clamp) en su configuración de célula completa (whole cell), para medir las corrientes iónicas de Na^+ y K^+ , se utilizó el amplificador AXOPATCH 200A, con pipetas de vidrio de boro silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL W/FIL 3IN), las pipetas fueron estiradas con el estirador horizontal (SUTTER INSTRUMENTS, Model P-97), las micro pipetas deben de ser pulidas con calor por medio de la micro forja para obtener resistencias de $4 \text{ M}\Omega$, ya que estas deben de ser mayor diámetro y menor resistencia para lograr realizar los sellos con la membrana celular y así guardar una adecuada conductividad eléctrica con el interior celular. Se utilizó un micro electrodo de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl), la solución electrolítica que baño las células fue solución extracelular de mamífero, como solución conductora para la micro pipeta se utilizó solución intracelular, se utilizó un voltaje inicial de mantenimiento (V_r) de -80 mV , el pulso comando (V_c) se hizo aplicando pulsos de voltaje de 10 mv en 10 mV para obtener el voltaje de membrana V_r+V_c .

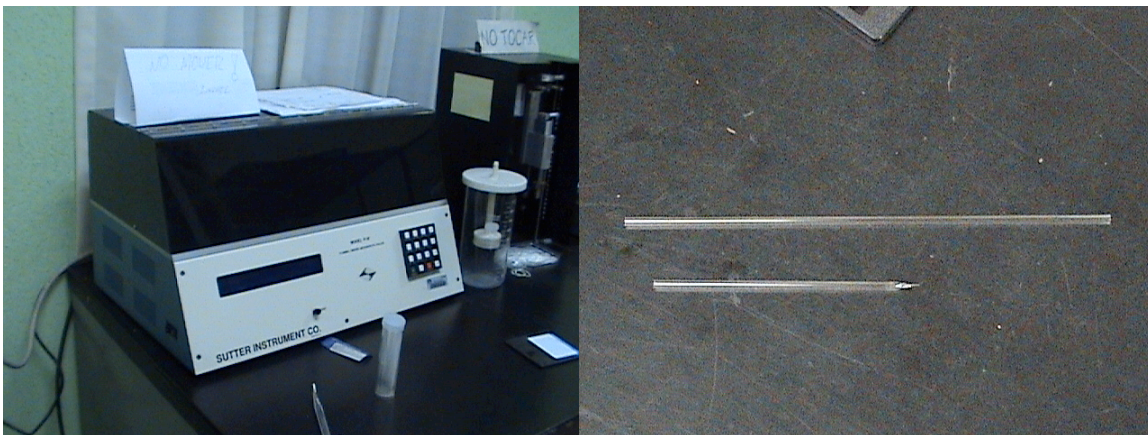


Fig.9. Fabricación de micro electrodos de registro. Izq. Estirador electrónico vertical o “puller”, el cual trabaja aplicando calor en la parte central de la pipeta y tensión a los extremos para formar las puntas de los micro electrodos. Der. Pipetas de vidrio de boro silicato utilizadas para la fabricación de micro electrodos como se muestra en la parte inferior de la misma imagen.

- **Registro Intracelular**

La técnica de registro intracelular permite la medición del potencial de membrana ya sea del reposo o bien durante la producción de potenciales de acción, Además, permite inyectar corriente al interior celular para modificar el potencial de membrana. Por lo que para esta técnica los microelectrodos tienen que ser más delgados con mayor resistencia.

Las células musculares y nerviosas se registraron utilizando la técnica de registro intracelular, para medir el potencial de membrana y potenciales de acción.

En la técnica de registro intracelular, se utilizó el amplificador DAGAN, las células fueron bañadas con solución extracelular de mamífero, se utilizaron pipetas de vidrio de boro silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL NO FIL 4IN), las pipetas fueron estiradas con el estirador horizontal (SUTER INSTRUMENTS, Model P-97), la resistencia fue de 60 M Ω o mayores, se debe tener cuidado en tener un cuello de pipeta corto para no tener resistencia lineal en lugar de puntual. Se utilizaron dos tipos de soluciones para el micro electrodo, una de cloruro de Potasio (KCl [3M]) y otra de acetato de potasio (KOOCC₃H₇ + KCl [3M]), los protocolos de estimulación se hicieron aplicando pulsos de corriente para modificar transitoriamente el potencial de membrana y medir los potenciales de acción.

▪ **TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA**

Es de importancia reconocer morfológicamente a las células de interés para ubicarlas sin ambigüedad en el campo óptico y luego cargarlas con las sondas fluorescentes. Con esta idea se hizo una detallada corroboración de la identificación entre neuronas y músculo de índole

morfológica, inmunocitoquímica y funcional de nuestros co cultivos celulares.

La inmunocitoquímica se ocupa de la localización microscópica de las proteínas presentes en los tejidos o células, tomando como base una reacción de antígeno anticuerpo.

El antígeno es la proteína o parte de la proteína que se quiere detectar en el tejido. El anticuerpo específico para ese antígeno que se añade a la muestra ha sido previamente conjugado con las sustancias que hacen posible su posterior detección al microscopio, como las sustancias fluorescentes, ferritina, peroxidasa o partículas de oro (en el caso de microscopía electrónica).

Para poder realizar las técnicas de inmunofluorescencia es necesario que las células sean fijadas al sustrato en donde fueron sembradas para poder ser manipuladas en experimentos futuros, en este caso se sembraron dos co cultivos celulares sobre cubreobjetos polimerizados por plasma, y tres cultivos celulares neuronales y un muscular sobre cubreobjetos sin polimerizar. A cada cubre objetos se le aplicaron 400 μ l de células suspendidas en medio cultivo, el co cultivo se realizó con forme a los protocolos de cultivo antes mencionados, al igual que la línea celular nerviosa y muscular.

Una vez que las células se adhirieron y crecieron, las células fueron adheridas con una solución de paraformalaldehído al 4% por 10 min, se siguió el protocolo establecido en el apéndice C previo a la aplicación de los anticuerpos primarios; los anticuerpos primarios que se utilizaron para el co cultivo fueron, receptor nicotínico α -3 hecho en conejo(α -3, Sta. Cruz C-18_SC1771) y Periferina hecho en ratón (Per, Chemicon MAB51527), como anticuerpos secundarios se utilizaron, fluoresceína de conejo hecho

en cabra (FITC, zymed 62-6111) y Texas red de ratón hecho en caballo (□R, Vector TI 5000).

Para los controles se ocuparon los cultivos celulares neuronales, a un cubre objetos con células neuronales se aplico como anticuerpo primario V-CHAT hecho en cabra y secundario FITC de cabra hecho en conejo, al siguiente cultivo neuronal se aplico SYN de ratón + □R de ratón hecho en caballo, para el ultima cube objetos se utilizó Periferina hecha en ratón + □R de ratón hecho en caballo.

Tipo celular	Anticuerpo Primario (Dilución)	Anticuerpo Secundario(Dilución)
Co cultivo	□-3(1:800)+Periferina(1:500)	□R(ratón(1:200))+FITC(conejo(1:400))
Neuronal	Periferina (1:500)	□R(ratón(1:200))
Neuronal	SYN(1:1000)	tR (ratón(1:400))
Neuronal	v-CHAT (1:800)	FITC (cabra (1:400))

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios aplicados a cada tipo celular utilizado

Una vez aplicados los anticuerpos primarios se dejan pasar 24 hrs para después aplicar los anticuerpos secundarios por 30 min, se montan los cubre objetos con glicerol sobre porta objetos para poder ser observados en el microscopio de fluorescencia.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

▪ **SEBRADO Y CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES**

Las pruebas de esterilidad de las muestras del medio preparado tuvieron una favorable evolución, durante su seguimiento ninguna de las muestras mostró algún tipo de contaminación, por lo que dicho medio pudo ser utilizado para suplementarlo y por lo tanto ser ocupado para el sembrado celular.

Como se mencionó en el capítulo de metodología, una de las características de la línea celular C2C12, es el de presentar dos fases de crecimiento y por lo tanto dos tipos morfológicos, al momento del sembrado las células se presentaron de forma esferoide, conocida como miobolas (ver figura 1), después de que éstas se han adherido a la superficie de la caja, las células se tornaron a una forma alargada y tendieron a acomodarse de forma lineal (ver Figura 2).

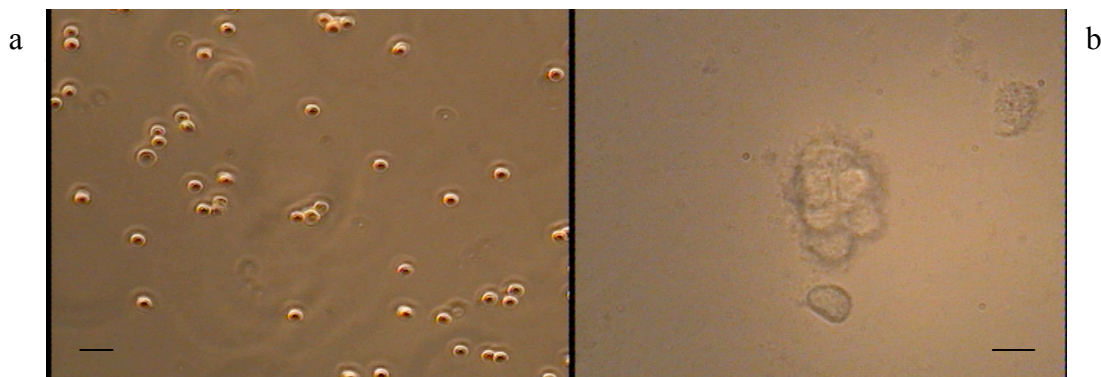


Fig 1 (a) Células musculares recién sembradas (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100), (b) células musculares después de 24 hrs de ser sembradas (contraste de fases, barra 20 micras, ampliación original x 400)

El crecimiento de la línea celular C2C12 fue de forma rápida, ya que el medio de cultivo fue suplementado con reactivos específicos sólo para el

crecimiento celular, tal como la L-Glutamina la cual ayudó a la célula a producir un mayor cantidad de CO₂, ya que esta es dependiente de los niveles intracelular de CO₂ para su adecuado crecimiento, por lo que se obtuvo una gran confluencia celular en poco tiempo. Para la crio preservación de la línea muscular obtuvimos 20 crio viales de reserva

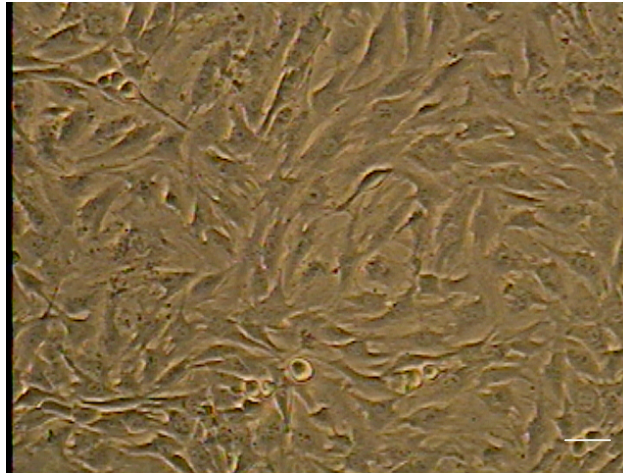


Fig.2 Miotubos. En esta imagen se puede ver que las células musculares han tomado ya una forma más alargada y han concluido casi por completo su proceso de cambio (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

La línea celular NG108-15 también presentó dos morfologías, al momento de ser sembradas estas presentaron una forma esferoide y conforme se fueron adhiriendo a la superficie de la caja de cultivo estas comenzaron a tornarse aplanadas con pocas terminaciones dendríticas (ver Figura 3).

El crecimiento de la línea celular NG108-15 fue favorable, al presentar la morfología característica de una célula nerviosa presentando un alargamiento en sus axones y presencia de terminales nerviosas (ver Figura 4), y así poder crear una reserva celular de 18 crio viales para experimentos futuros.

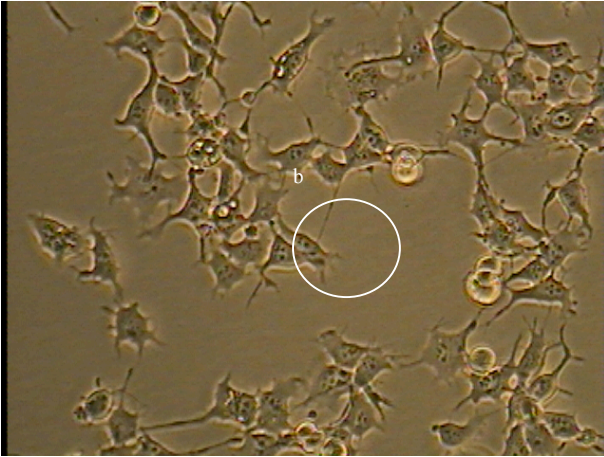


Fig. 3 Células nerviosas. Esta foto presenta un cultivo de 24 hrs en donde se puede ver que las células presentan aun dos fases, esferoide (a) y al ir evolucionando el cultivo se tornan a largadas y aplanadas (b). (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

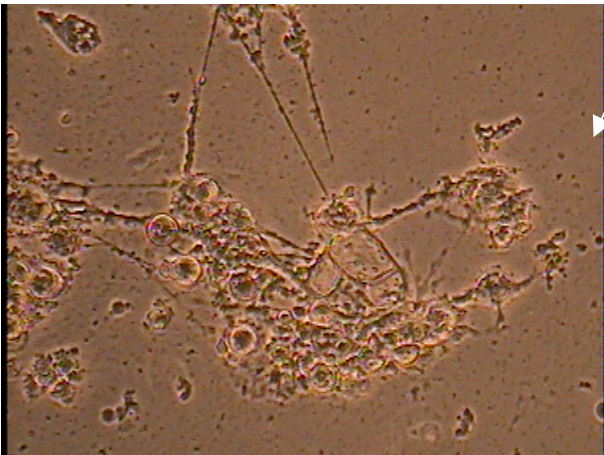


Fig. 4 Presencia de axones en las células nerviosas. Después de 3 días de cultivo las células nerviosas comienzan a generar axones para tener una forma más adecuada a una célula nerviosa. (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

Los resultados obtenidos para el crecimiento celular nos ayudaron a ver que la suplementación de los medios con L-Glutamina activó la proliferación celular de ambas células, actuando como fuente de energía.

- **DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LOS CULTIVOS CELULARES**

El proceso de especificación de las líneas celulares, evitó el crecimiento de las células y mantuvo la morfología celular requerida para su experimentación.

Para la línea celular NG108-15, los medios fueron suplementados con dibutilil AMP-c y se redujo la cantidad de suero bovino fetal, una ventaja de usar el AMPc es el de jugar un papel muy importante en los mecanismos de acción y procesos de transducción de señales en múltiples moléculas como son hormonas, **neurotransmisores**, citocinas y factores de crecimiento.

Como consecuencia de la gran variedad de moléculas que median su acción vía AMPc, este se encuentra implicado en procesos tan diversos como la **contracción muscular**, la exocitosis, procesos metabólicos, **neurotransmisión**, crecimiento, agregación plaquetaria, **diferenciación celular**, transformación de fibroblastos, síntesis de esteroides en los ovarios, movilización de la glucosa en el hígado o desarrollo embrionario.

Esto nos ayudó a que la línea celular nerviosa detuviera su proceso de reproducción y que se tuviera un aumento en el número de terminales dendríticas de las células, para el caso de la línea celular C2C12, el medio fue suplementado con una muy baja cantidad suero de caballo inactivado, con esto se detuvo la reproducción celular y a mantener la morfología en miotubos de la célula (ver figura 5).

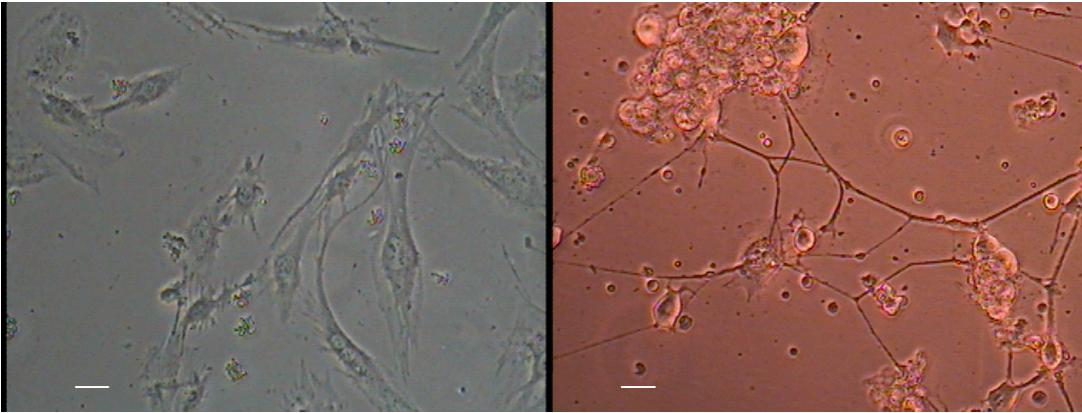


Fig.5 Diferenciación celular. Después de 2 o 3 días de cultivo, el medio es intercambiado por el medio de diferenciación, el cual ayuda a evitar que las células se sigan reproduciendo (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

Los suplementos utilizados en la especificación de las líneas celulares tales como dibutilil AMPc, y la baja concentración de suero, nos ayudó a llevar a las células a un proceso de diferenciación que se produce por la activación diferencial de algunos genes y la represión de otros, por lo que los suplementos provocaron que las células modificaran su estructura provocando que estas sufran una serie de cambios en sus características y se produzca un reajuste en sus relaciones mutuas.

▪ **RECUBRIMIENTO DE MATERIALES**

Se decidió polimerizar con pirrol vía plasma cubre objetos, este monómero ha demostrado en experimentos anteriores, que favorece la adherencia y crecimiento celular y que no altera de manera alguna estas características del cultivo [3, 4, 5].

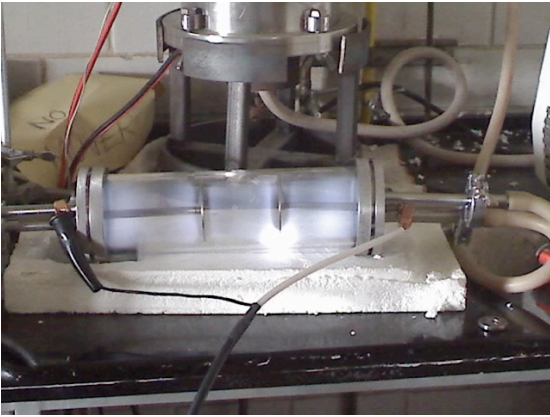


Fig.6 Reactor de Plasma. Los cubre objetos fueron colocados en el interior del reactor para su polimerización, para esto se utilizó pirrol para recubrir los materiales de cultivo.

A través de la polimerización por plasma de los cubre objetos, estos fueron recubiertos de manera homogénea por ambas caras, presentando una delgada capa del polímero sobre la superficie del vidrio (ver Figura 7). El material recubierto fue colocado en cajas estériles y almacenadas bajo luz ultravioleta para asegurar su esterilidad y así poder ser usados con seguridad en experimentos posteriores.

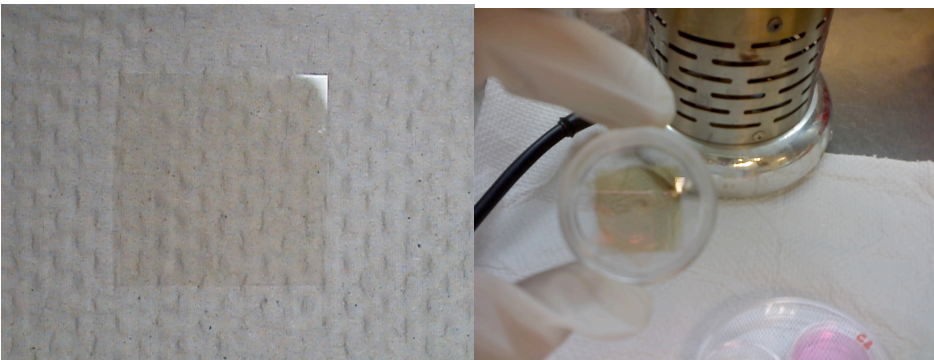


Fig. 7 Materiales polimerizados. Los materiales fueron recubiertos se tornaron en una coloración ámbar provocada por el recubrimiento de polímero

▪ **SEMBRADO Y CRECIMIENTO CELULAR SOBRE MATERIAL POLIMERIZADO**

El sembrado celular que se hizo sobre los materiales polimerizados se realizó de dos formas diferentes, la primera involucraba sembrar las células, dentro de una caja de cultivo en la cual está sumergido el material recubierto. La segunda consistió en sembrar directamente sobre el material recubierto delimitando el crecimiento solo al área del material.

Con la primera forma de sembrado, el crecimiento celular se dio tanto en el material recubierto como en la superficie de la caja de cultivo y fue difícil de evaluar cuanto crecía en el material (Figura 8 y 9). Para poder constatar el crecimiento celular sobre el material, éste fue removido de la caja de cultivo y colocado en una nueva caja, en donde se pudo ver que las células efectivamente habían crecido también sobre el material (Figura 9).

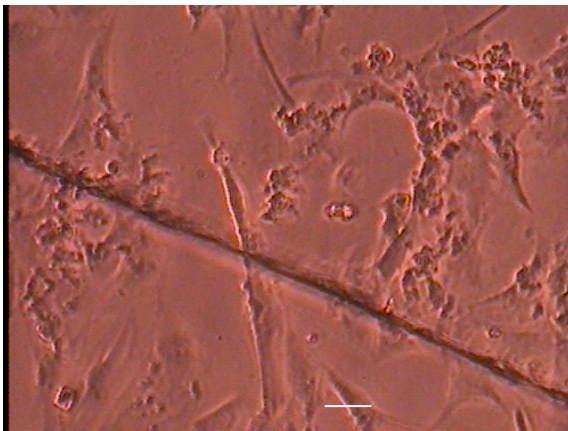


Fig. 8 Crecimiento celular sobre polímero. Aquí el cultivo se hizo en una caja tratada con colágeno en su superficie por lo que el crecimiento se hizo en la superficie de la caja y del polímero. Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

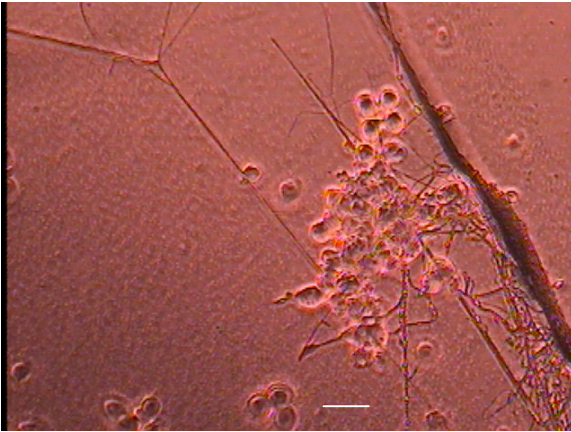


Fig.9 Células nerviosas sembradas sobre material polimerizado. Las células nerviosas al igual que las musculares fueron sembradas sobre el material polimerizado, en donde se observa su crecimiento. Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

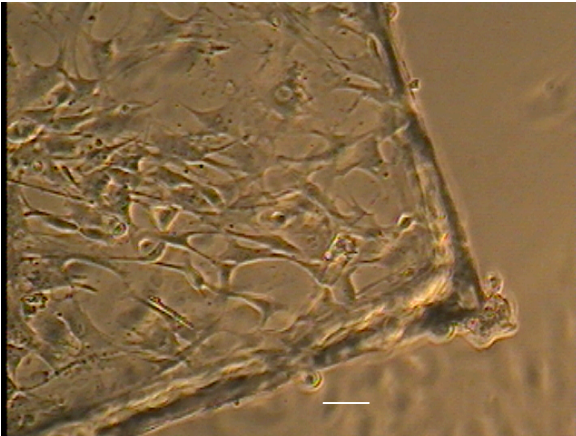


Fig. 10 Crecimiento celular muscular. El cubre objetos al ser cambiado a una nueva caja de cultivo nos permitió ver que las células crecieron sobre la superficie del material polimerizado. Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

En la segunda forma de sembrado se utilizó la técnica de micro cultivo, la cual se basa en colocar solo una pequeña cantidad de medio con células sobre el cubre objetos, en este caso el material fue colocado sobre cajas sin tratamiento de colágeno, y en cada cubre objeto se colocaron 400 μ l de medio con células, este cultivo fue cuidado a diario, ya que si no se tiene el cuidado debido, el cultivo se puede secar y por lo tanto perderse, el principal cuidado que se tuvo, es el control de la humedad en la incubadora (ver Figura 10). Con este tipo de cultivo nosotros aseguramos que el crecimiento de las células fuera solo sobre el material. La

adherencia y crecimiento celular sobre el material recubierto no se vio afectado por la presencia del polímero, ya que el material sirvió como un medio de crecimiento celular, que favoreció y no alteró la evolución del cultivo. Las dos formas de cultivo funcionaron igual con los dos tipos de células.

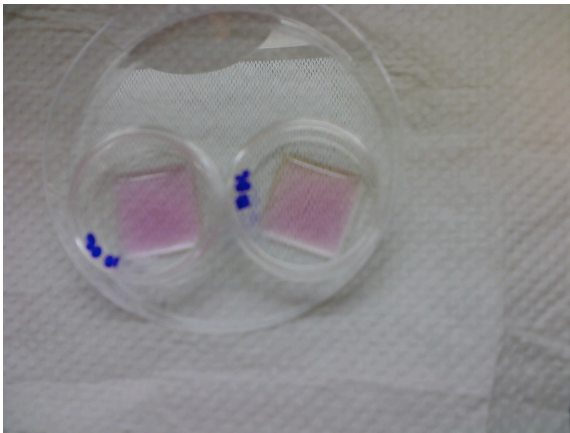


Fig. 10 Micro cultivo. Para asegurar el crecimiento de las células sobre el material, se cambió la técnica de sembrado, ahora solo se colocaron las células únicamente sobre el material polimerizado

Para la suspensión del crecimiento y la diferenciación celular sobre el material se siguieron los mismos protocolos utilizados en las cajas tratadas, en donde una vez que las células se adhirieron y crecieron sobre el material, se intercambié el medio de crecimiento, por el medio de diferenciación, aquí se aplicaron 400 μ l de medio, y se observó que la diferenciación celular no se vio afectada, y que mantuvo la adherencia de las células, aun cuando el nivel de nutrientes se redujo considerablemente para la diferenciación celular.

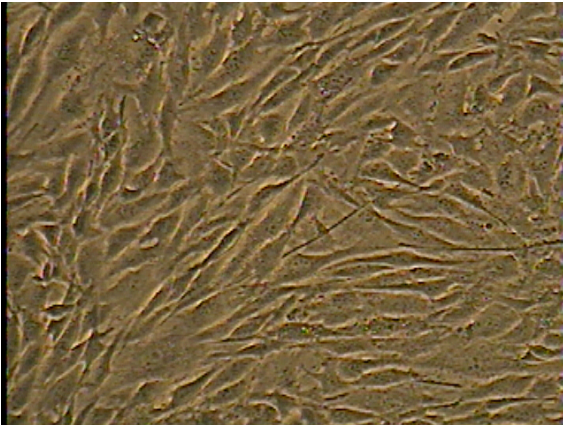


Fig.12 Miotubos en micro cultivo. Se muestran los miotubos después de 72hrs de diferenciación sobre el material polimerizado, esto se realizó con el fin de poder detener el proceso de crecimiento celular. Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)



Fig. 13 Células nerviosas diferenciadas sobre material polimerizado. Después de 3 días de cultivo el medio de crecimiento fue intercambiado por el medio para detener la proliferación celular, y cabe destacar que estas células fueron sembradas en el material y que este no modificó su morfología ni afectó su crecimiento. (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

La técnica de micro cultivo celular facilitó el monitoreo de la células sobre el material, a comparación del sembrado sobre la caja de cultivo, el micro cultivo nos ayudo a ver con mayor detalle el crecimiento y adherencia de las células sobre el material, ya que se delimitó el crecimiento solo a la superficie del cubre objetos y así evitar cualquier tipo de error de visualización al tomar las fotografías (Ver Figuras 12 y 13).

El crecimiento celular sobre el material polimerizado aplicando las dos técnicas de cultivo antes mencionadas, no presentó ningún tipo de

alteración morfológica durante su sembrado y crecimiento, además de presentar un mayor tiempo de adherencia de las células sobre la superficie del material después de varios días de ya sembradas.

▪ **SEMBRADO Y CRECIMIENTO DEL CO CULTIVO CELULAR**

La parte crucial en este proyecto es la de poder mantener dos líneas celulares distintas en un mismo ambiente de cultivo, por lo que en este paso se tuvo mayor control en el cuidado de las células ya que se debe sincronizar su crecimiento para que ambos tipos tengan los mismos días de cultivo y una vez iniciado el co cultivo utilizar un solo tipo de medio.

Para poder llevar a cabo este paso, las líneas celulares fueron sembradas en cajas de 35mm x 10mm y después de dos días, el 60% de la población celular muscular y 40% de la nerviosa, se diferenciaron por 5 días (ver Figura 14).

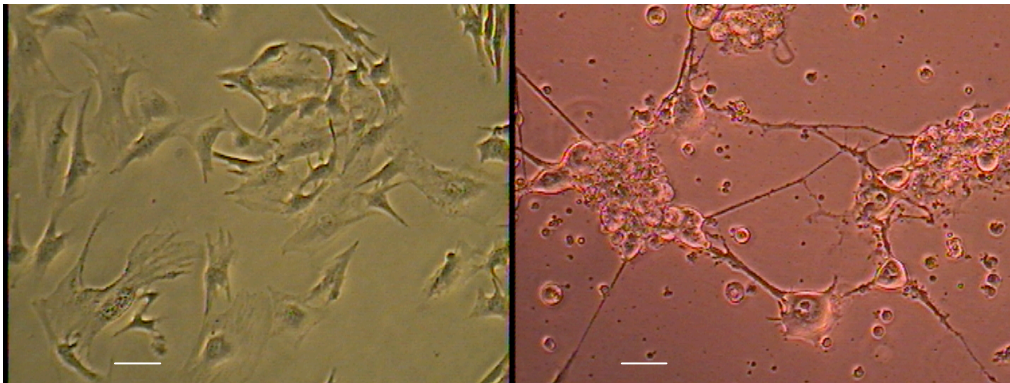


Fig.14 Tipos celulares. Las células musculares (izq.) y las células nerviosas (der.) durante el proceso de detención del crecimiento celular (diferenciación). (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

Una vez transcurrido este tiempo, se sembraron las células nerviosas con el músculo (ver Figura 15), y se observó que después de 24 hrs de sembradas, las células nerviosas generaron terminaciones sinápticas sobre el músculo (ver Figura 16).

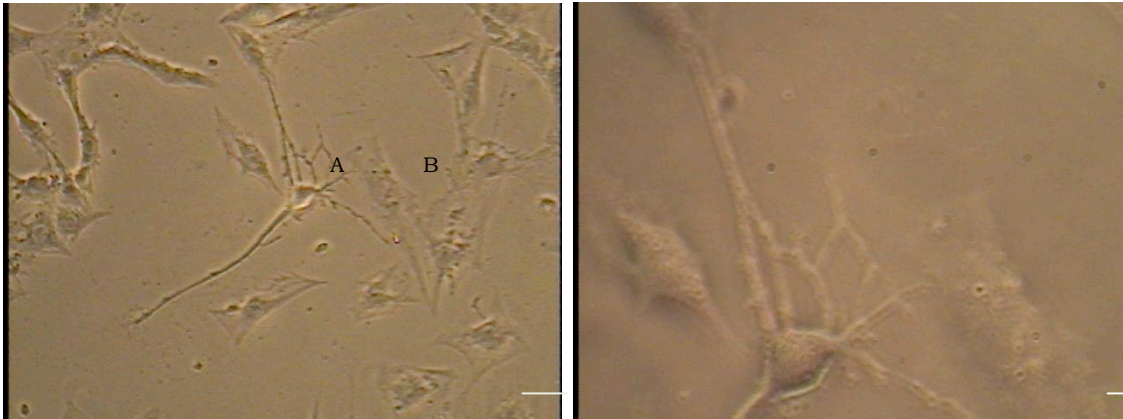


Fig. 15 Co cultivo. Las células nerviosas fueron sembradas en la misma caja de cultivo que contiene las células musculares. Las células nerviosas al haber sido recién sembradas, presentan su morfología esferoide, mientras que el músculo conserva su morfología aplanada y alargada (miotubos). (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)



Fig. 16 Co cultivo celular. La imagen muestra la presencia de una célula nerviosa (A) y una muscular (B) sembradas en el mismo ambiente de cultivo. (Contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100)

Estas terminaciones sinápticas se extendieron hasta tocar las superficie del músculo y hacer contacto sobre éste, la unión de ambas células se observó a diferentes resoluciones del microscopio invertido, en donde al enfocar el mismo punto de unión de las células, se pudo observar el punto exacto de contacto de ambas células, mejor conocido como unión neuromuscular como muestra las figuras 17 y 18.



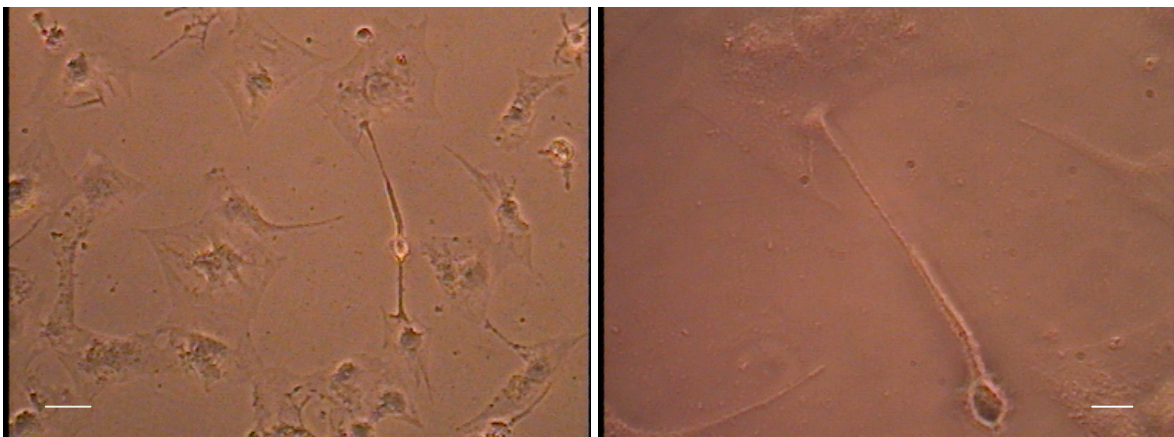
1

2



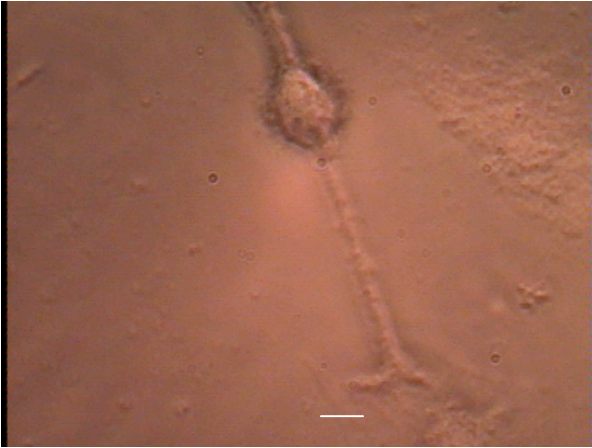
3

Fig. 17 Unión neuromuscular. Se presentan imágenes en contraste de fases de la unión neuromuscular captada con diferentes aumentos. (1) Se muestran ambos tipos celulares formando uniones neuromusculares (A-nervio, B-músculo) (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original $\times 100$). (2) acercamiento a la unión neuromuscular de 25x, y se ve como las terminales nerviosas se acercan a la superficie muscular (contraste de fases, barra 25 micras, ampliación original $\times 250$) (3) Esta imagen tomada a 40x nos permite ver un poco más a detalle las terminales sináptica en la superficie muscular (contraste de fases, barra 20 micras, ampliación original $\times 400$).



1

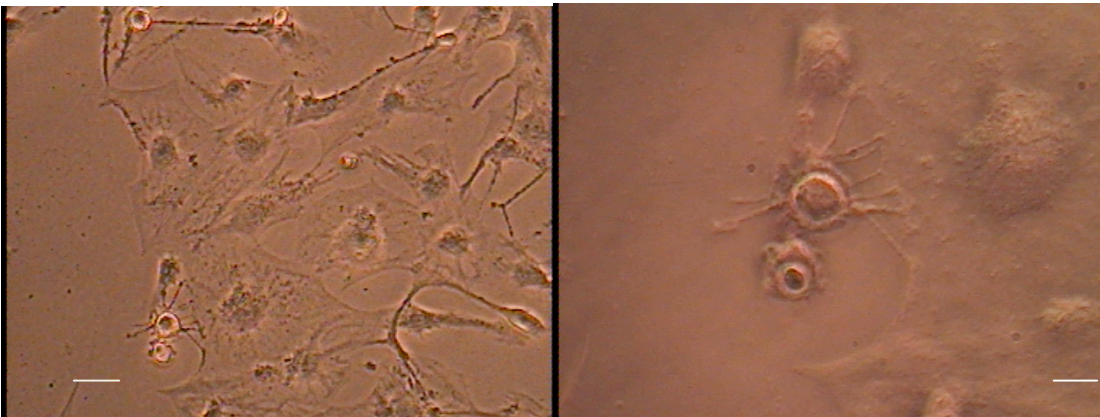
2



3

Fig. 18 Morfología de la unión neuromuscular. Imagen tomada a diferentes aumentos de una neurona con dos terminales sinápticas que hacen sinapsis neuromuscular sobre dos células musculares. (1) Se observan dos terminales nerviosas haciendo contacto con la superficie del músculo (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100). (2) Muestra la sinapsis neuromuscular de la terminal nerviosa superior de la neurona (contraste de fases, barra 25 micras, ampliación original x 250). (3) Muestra la terminal nerviosa inferior sobre la superficie del músculo (contraste de fases, Barra= 20 micras, ampliación original x 400).

El co cultivo celular en un mismo ambiente dio resultados favorables, ya que al poco tiempo de cultivo de las neuronas sobre el músculo presentaron terminales sinápticas, éstas se invaginaron en la superficie del músculo, por lo que el contacto del botón sináptico sobre la superficie del músculo se fotografió a diferentes resoluciones para observar a mayor detalle dicho contacto (ver Figura 19).



1

2



3

Fig 19 Co cultivo celular. Se muestra una célula nerviosa a diferentes aumentos que hace contacto neuromuscular sobre un aglomerado de células musculares. (1) Se observa la célula nerviosa con varias terminales sinápticas que se unieron al músculo (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100). (2) se realizó un acercamiento a la célula para observar la cantidad de terminales nerviosas que se encuentran unidas al músculo (contraste de fases, barra 25 micras, ampliación original x 250). (3) Se realiza un segundo acercamiento, y se observan las terminales sinápticas que se han unido al músculo (contraste de fases, barra 20 micras, ampliación original x 400).

La morfología del co cultivo se mantiene por 5 días, debido al bajo nivel nutricional provocado por el mantenimiento del cultivo con medio de diferenciación celular para músculo, el cual al contener suero de caballo inactivado provoca que las células nerviosas se despeguen o mueran después del tiempo mencionado.

- ***SEMBRADO Y CRECIMIENTO DEL CO CULTIVO CELULAR EN EL MATERIAL POLIMERIZADO***

Una vez que se sembró el co cultivo celular neuromuscular en las cajas de 35 mm y se observó que las células se adhirieron a la superficie de la caja y estas formaron las uniones neuromusculares, se decidió proseguir con el sembrado del co cultivo celular en el material polimerizado (ver Figura 20).

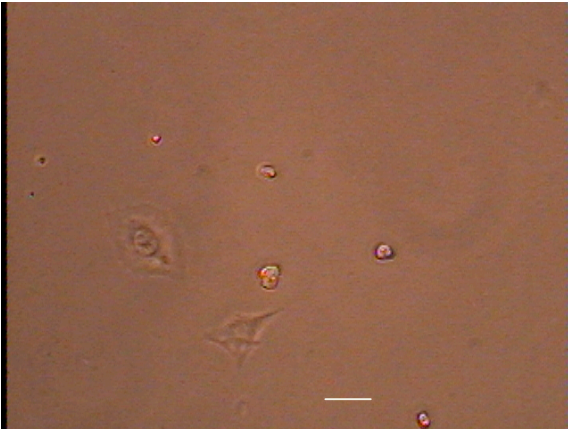


Fig. 20 Sembrado del co cultivo en el material. El sembrado celular se realizó bajo las mismas condiciones de cultivo sobre el material polimerizado, siguiendo la misma técnica de microcultivo (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original $\times 100$).

Las células se sembraron con las mismas condiciones de cultivo celular, sembrando primero las musculares en el material con la técnica de microcultivo, una vez adheridas se sembraron las células nerviosas, las células se observaron a las 24 hrs y se vio que las células nerviosas aun no se adherían sino hasta a las 36 hrs de cultivo, las células nerviosas se adherieron en aglomerados sobre las células musculares, que difirió de la morfología presentada en el experimento anterior (ver Figura 21).

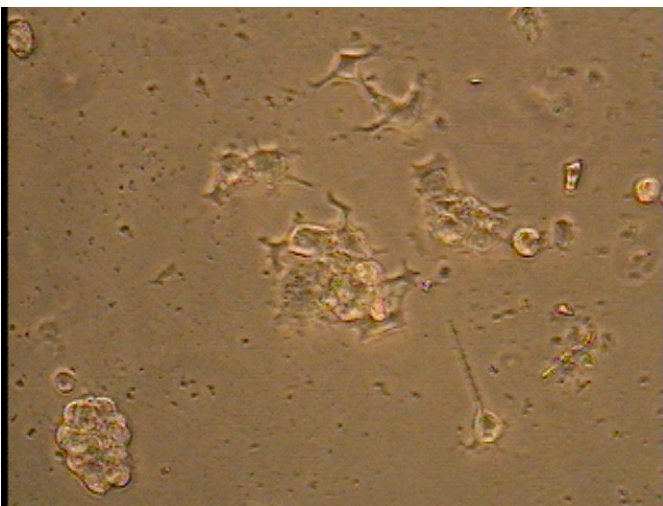


Fig. 21 Co cultivo celular en material polimerizado. En la imagen anterior se puede observar las células nerviosas y musculares en el material polimerizado, la adhesión de las células nerviosas tardo 36 hrs y la adhesión de estas se hizo en forma de aglomerados células sobre las células musculares, los cual difiere en la morfología del experimento anterior (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original $\times 100$).

Las células se siguieron monitoreando y se observó que seguían adheridas en aglomerados celulares sobre las células musculares (ver Figura 22), y que no existió cambio en esta morfología hasta el desprendimiento y muerte del co cultivo.

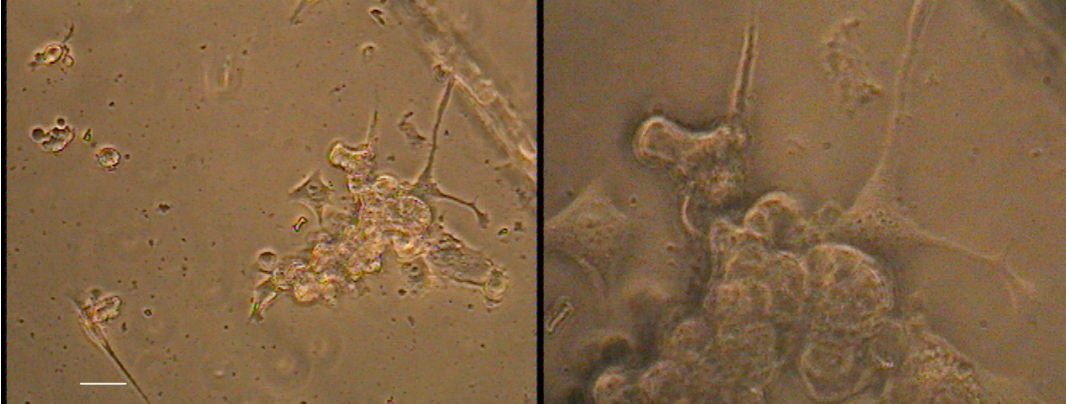


Fig. 22 Aglomerados celulares en el co cultivo celular. Izq. Las células nerviosas se ven aglomeradas en la parte superior de las células musculares, pero se puede ver que las células musculares hacen un buen anclaje para las células (contraste de fases, barra 50 micras, ampliación original x100). Der. Se realizó un acercamiento a los aglomerados celulares, se observa que las células nerviosas se encuentran ancladas sobre la superficie de las células musculares (contraste de fases, barra 25 micras, ampliación original x 250).

La morfología de las células nerviosas en el co cultivo celular sobre el polímero se vio afectada ya que estas no se dispersaron en la superficie de este y se adhirieron en forma esférica sobre la superficie de las células musculares, cabe señalar que las células musculares aumentaron su adherencia al material y se conservaron mas días (7 días) en co cultivo celular en comparación a lo realizado en cajas de cultivo.

- **REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS**

- **Medición de Corrientes Iónicas (Fijación de Voltaje)**

La solución extracelular ocupada para su registro, presento buenas características ya que no provocó daño celular ni aumento en el volumen

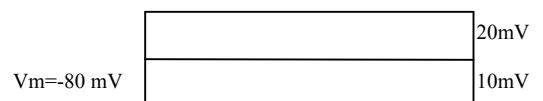
de la célula (hipertonicidad) y soportaban aproximadamente 45 min de experimentación.

La solución intracelular utilizada guardó una adecuada osmolaridad, permitiendo que se mantuviera una conductividad eléctrica con el interior celular y el electrodo, además las células no presentaron ningún tipo de daño, como aumento o disminución de su diámetro.

Las pipetas obtenidas para el registro tenían una resistencia apropiada que nos permitían realizar un buen sello con la membrana celular.

Se utilizó la línea celular NG108-15 sembradas en cajas de cultivo, las células previamente fueron tratadas con dibutilil AMPc durante 5 días para detener el proceso de división celular, posteriormente se realizó el registro por fijación de voltaje de las células para medir las corrientes iónicas presentes.

El registro se llevó a cabo utilizando el amplificador operacional AXOPATCH 200A, se comenzó con un voltaje de mantenimiento de -65 mV y posteriormente observando el comportamiento celular se decidió cambiar el voltaje de mantenimiento a -80mV para así descartar inactivación de canales voltaje dependientes. Posteriormente se aplicaron pulsos rectangulares de voltaje (pulsos comando) con incrementos de 10 mV entre cada pulso a partir del voltaje de membrana para modificar transitoriamente el potencial de membrana, y de esta manera evocar corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺.



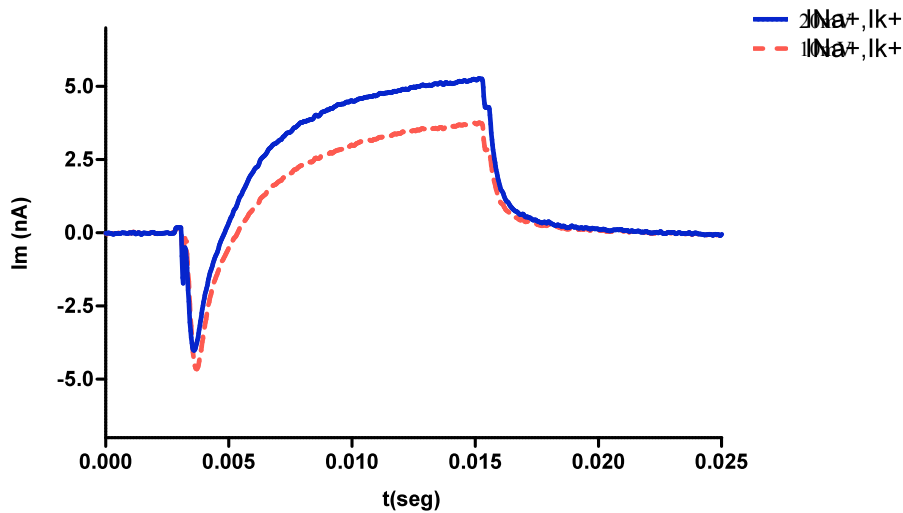
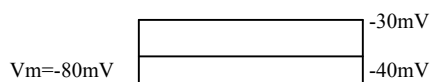


Fig. 23 Corrientes de Na⁺ y K⁺. Se muestra en la parte superior los pulsos comando utilizados para evocar corrientes iónicas dependientes de voltaje, se muestra la corriente de Na⁺ negativa y una positiva de K⁺ que se producen por la apertura de los canales iónicos.

La figura 23 muestra la apertura de los canales de sodio y potasio provocados por los pulsos comando de voltaje que despolarizan la membrana, se observa que la activación de los canales de sodio por voltaje es más rápida y que las corrientes de Na⁺ son negativas debido a que el Na⁺ entra a la célula obteniéndose valores de -5.0 nA y -4.0 nA, los canales de K⁺ se activan más lentamente por la despolarización de la membrana y las corrientes de K⁺ aparecen posteriormente y son positivas debido a que el K⁺ sale de la célula. En la figura la magnitud de la corriente saliente de K⁺ fue 4.0nA y 5.0nA.



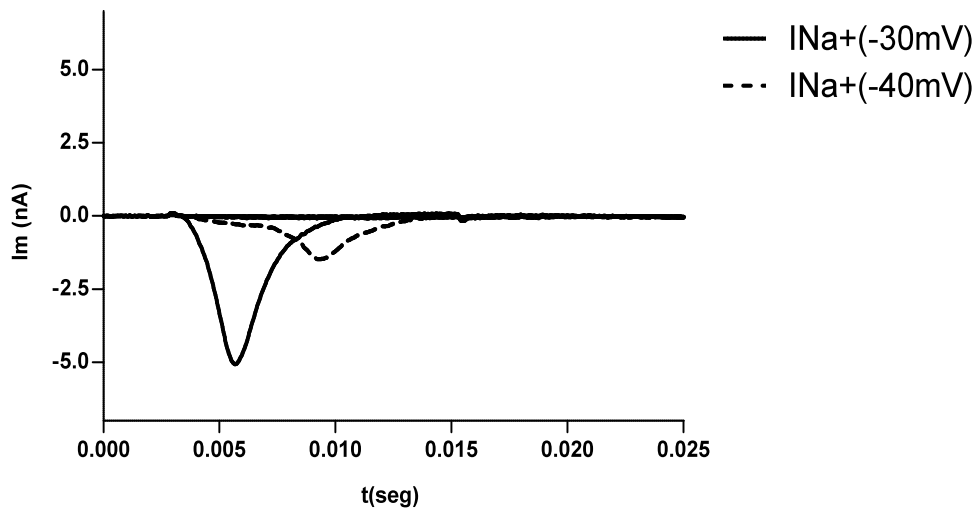
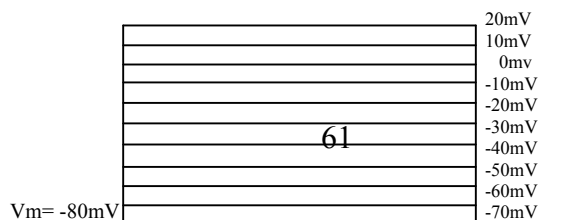


Fig. 24 Decaimiento de las Corrientes de Na^+ . Se observa el decaimiento de las corrientes de Na^+ debido a la inactivación de los canales.

En la figura 24 se observa la activación de los canales de Na^+ a partir de -40mV, obteniéndose una corriente de -1.24nA y ésta va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de despolarización de la membrana. La magnitud de la corriente al pico y la rapidez de la activación de la corriente de Na^+ se incrementan a mayor despolarización (-30 mV) del potencial de membrana.



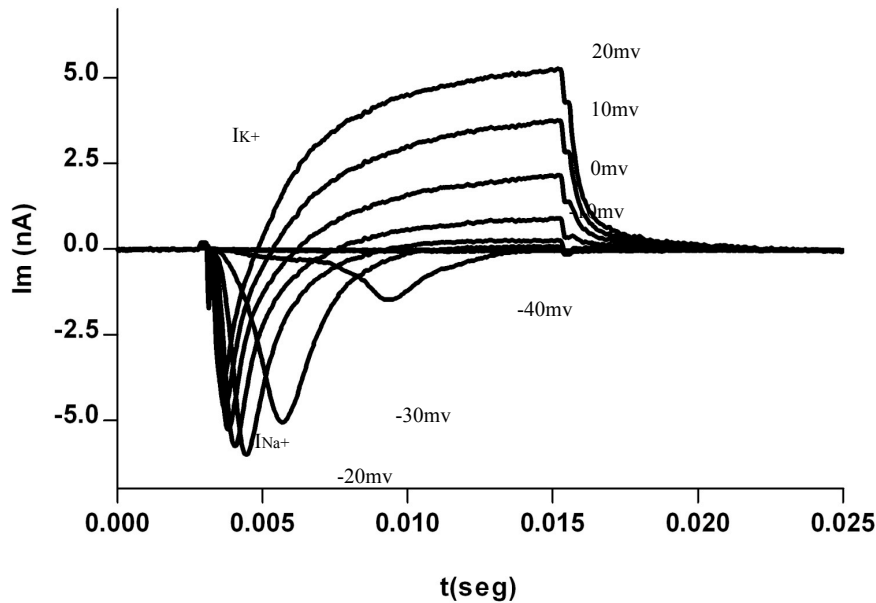


Fig.25. Corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺. El gráfico superior muestra los pulsos comando Vc de fijación de voltaje. Los números indican el voltaje al cual se mantuvo fijo el potencial de membrana. Los pulsos despolarizantes originan una corriente inicial de Na⁺ (I_{Na⁺}) negativa y una posterior de K⁺ (I_{K⁺}) positiva.

En la figura 25 se observa el experimento completo, se pueden ver las corrientes iónicas obtenidas con la técnica de fijación de voltaje, la presencia de corrientes de Na⁺ a partir de la activación de sus canales que es aproximadamente a -40 mV. La corriente al pico máxima que se obtuvo fue de -6.0nA a un potencial de membrana de -20 mV. También la magnitud de la corriente de K⁺ tardía incrementa con la despolarización de la membrana con una corriente máxima de 5.0 nA a un potencial de membrana de 20mV.

- *Medición de Potenciales de Acción (Registro Intracelular)*

Una vez obtenidas las corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺, proseguimos a medir los potenciales de acción presentes en la célula nerviosa NG108-15, se utilizó la técnica registro intracelular.

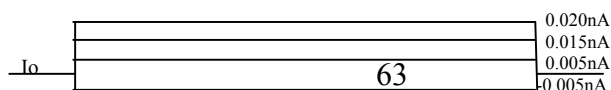
Para este experimento se utilizó la misma solución extra celular de mamífero que en fijación de voltaje para sumergir las células, estas no mostraron ningún daño o aumento de volumen al ser vistas al microscopio y soportaban un aproximado de 45 min de experimentación.

El registro intracelular se aplicó a la línea celular NG108-15 sembrada sobre cajas de cultivo y en material polimerizado, las pipetas del registro se obtuvieron con una resistencia de 50 a 60 MΩ.

El registro de los potenciales de acción de las células se hizo utilizando el amplificador DAGAN.

❖ Registro Intracelular en neuronas sembradas en cajas de cultivo.

Para la inducción de los potenciales de acción, se aplicaron pulsos de corriente a partir de -0.005 nA con incrementos de 0.01 nA de la misma duración. El potencial de acción se generó por un aumento en la conductancia a Na⁺ dependiente del voltaje seguida de un aumento en la conductancia al K⁺ dependiente del voltaje de acuerdo a lo observado con la técnica de fijación del voltaje.



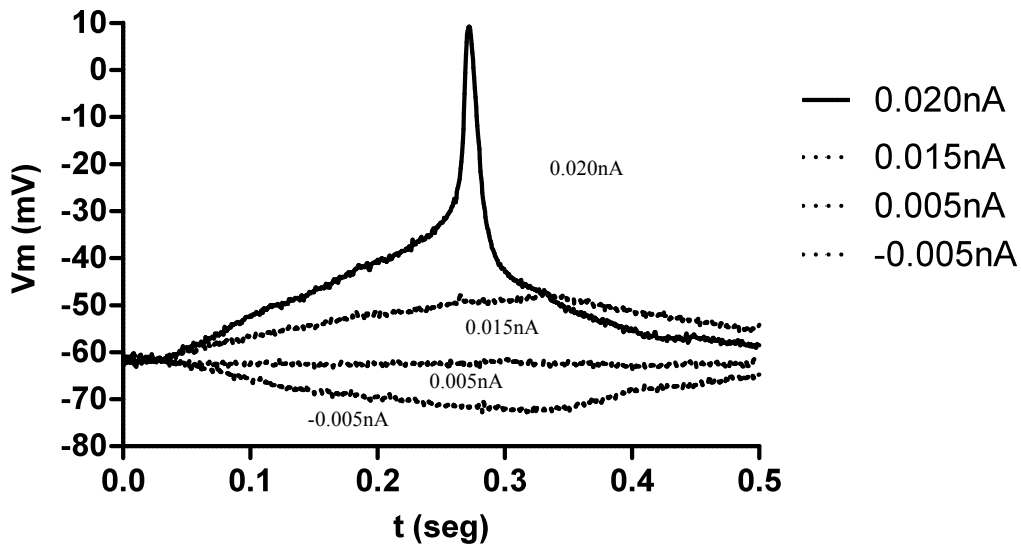
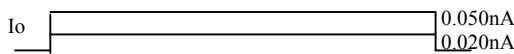


Fig. 26 Se muestran los potenciales sub umbrales provocados por pulsos de corriente de baja magnitud y que al aumentar llegan al voltaje umbral que provoca la aparición del potencial de acción.

En la Figura 26 se muestran los potenciales sub umbrales provocados por pulsos de corriente de baja magnitud para despolarizar la membrana, conforme aumenta la magnitud del pulso de corriente que se aplica se llega a un voltaje umbral en el cual se tiene la activación de los canales de Na^+ que provoca la aparición del primer potencial de acción, una vez que $V_m \approx V_{\text{Na}^+}$ se produce la repolarización de la membrana debida a la apertura de los canales de K^+ y a la inactivación los canales de Na^+ .



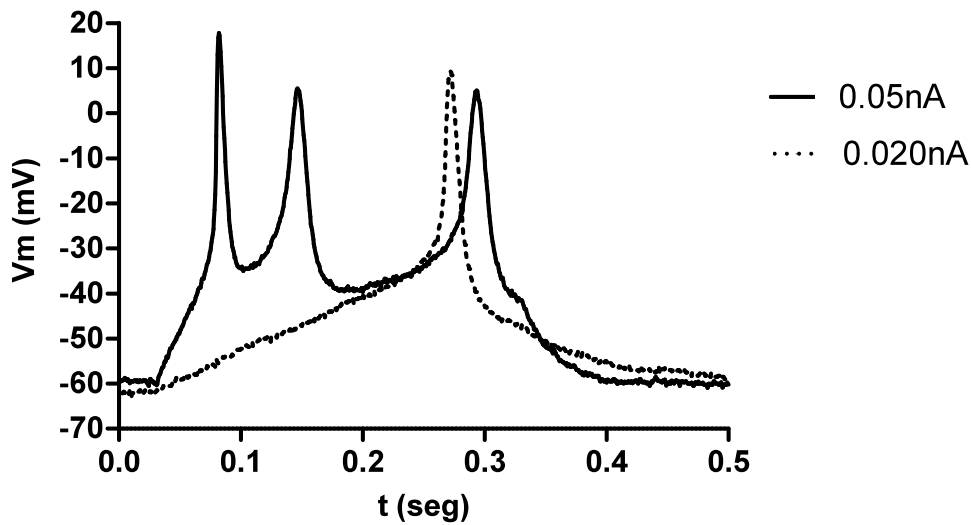


Fig. 27 Potenciales de acción. Aplicando pulsos de corriente modificamos el potencial de membrana transitoriamente, provocando un aumento en las conductancias para el Na^+ y el K^+ .

En la figura 27, en el primer pulso de estimulación de 0.02nA se obtiene un potencial de acción. Si se repite la acción, pero esta vez con un pulso más grande de 0.05 nA, aumenta el número de picos de potenciales de acción, se observa que el voltaje de repolarización de la membrana no es menor al voltaje umbral de la célula durante la inyección de corriente, provocando el disparo de varios potenciales de acción.

❖ Registro Intracelular en neuronas sembradas sobre material polimerizado

Los potenciales de acción se indujeron por de pulsos de corriente a partir de -0.2nA con incrementos de 0.1 nA de la misma duración.

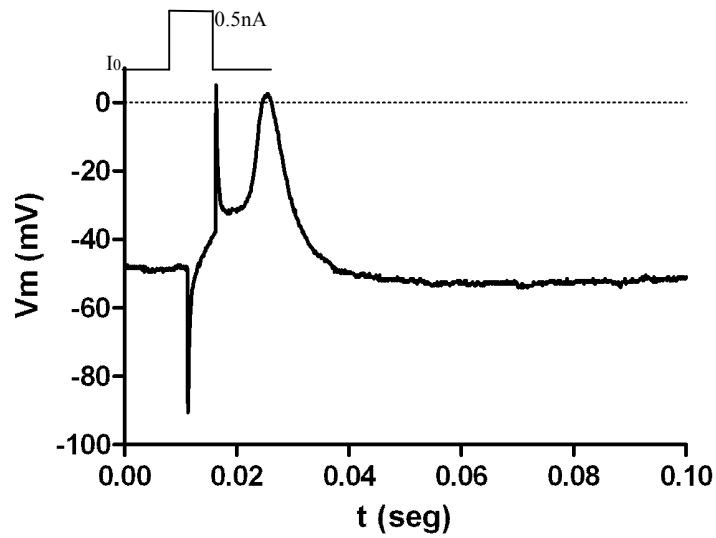


Fig. 28 Potencial de acción unitario. Se aplicó solo un pulso de corriente que alteró el potencial de membrana y provocó el disparo del potencial de acción.

En la figura 28 se indujo un potencial de acción por la aplicación de un pulso rectangular de corriente breve pero de magnitud lo suficientemente grande (supra umbral) para despolarizar la célula al voltaje umbral en el que se originan los potenciales de acción, se aplica un pulso de corriente de 5.0nA para asegurar la respuesta de la célula.

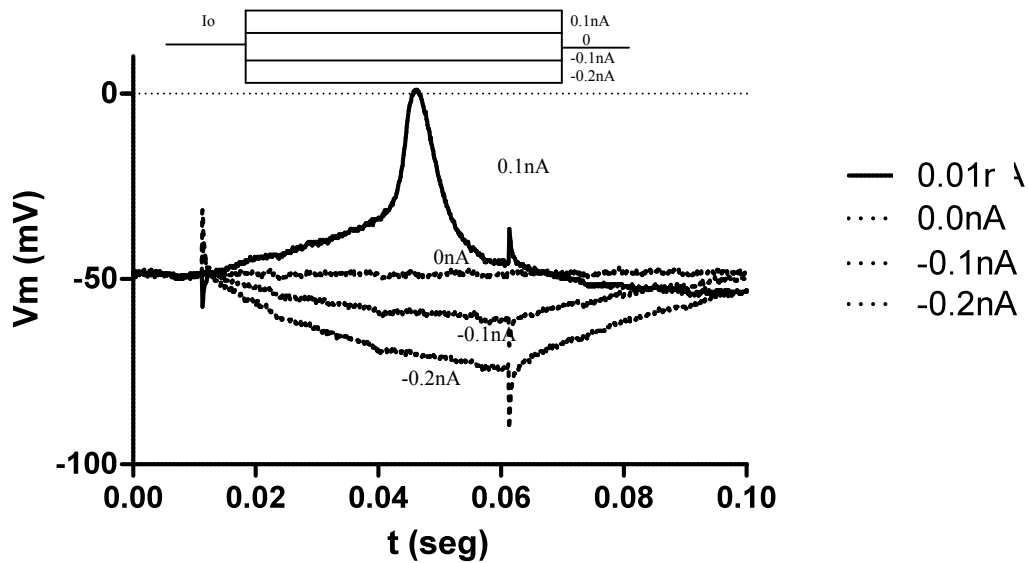


Fig. 29 Potenciales de Subumbrales. Se estimuló la célula con pulsos de corriente rectangular de baja intensidad para poder ver los potenciales subumbrales, el último alcanza el voltaje umbral que provoca el potencial de acción.

En figura 29 la célula fue estimulada con pulsos rectangulares de corriente de baja intensidad, para provocar la aparición de potenciales subumbrales o potenciales lineales. Al ir aumentando el estímulo eléctrico se fue provocando la despolarización de la membrana hasta llegar al voltaje umbral, la célula respondió con un potencial de acción.

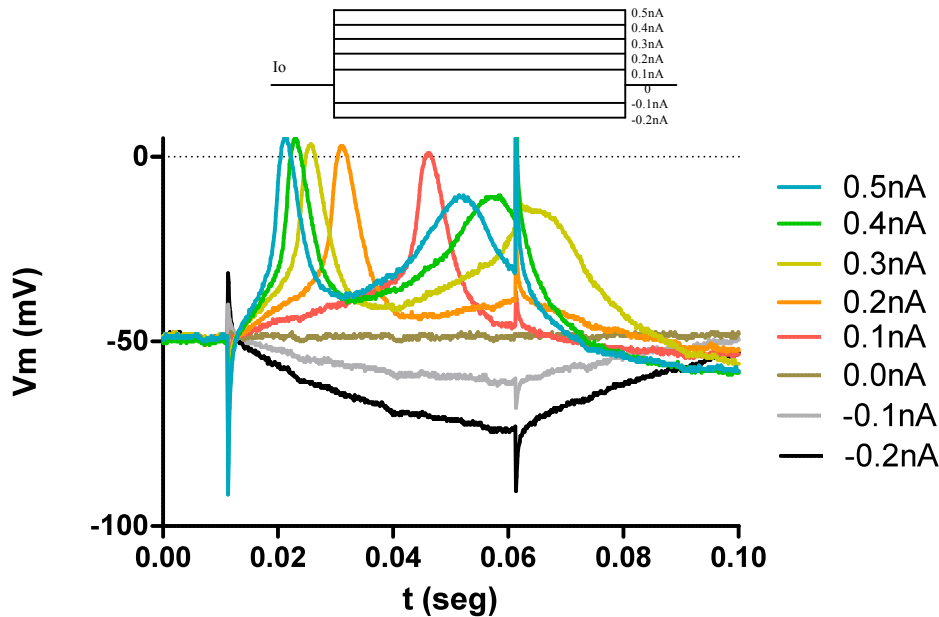


Fig. 30. Serie de Potenciales de Acción. Se presentan los potenciales de acción provocados por la aplicación de los pulsos comando que se muestran en la parte superior.

En la figura 30 se observan el conjunto completo de los potenciales de acción adquiridos al aplicar pulsos de corriente, se observan los potenciales subumbrales provocados por corrientes de polaridad opuesta (-0.2nA, -0.1nA) que son previos a la aparición del potencial de acción, éste potencial se genera a los +0.1 nA de corriente aplicada. Al aplicar un pulso de 0.5 nA se observa la generación de dos pulsos de acción continuos debido a que el potencial no es menor que el voltaje umbral hasta que termina el estímulo del impulso.

Los potenciales de acción registrados en células en cajas de cultivo y en polímero, tienen las mismas características y están presentes en ambos experimentos de registro, aunque la magnitud de los potenciales de acción registrados en la caja de cultivo es ligeramente mayor en comparación con los registros intracelulares hechos sobre el polímero, debido a que el inicio de los pulsos de corriente ocupados en las células sobre las cajas fue a partir de -0.005nA con incrementos de 0.01nA entre cada pulso, en el

registro de células sobre el polímero se inicio con pulsos a partir de -0.2nA con incrementos de 0.1nA .

- ***Registro Intracelular de células musculares***

El registro de las células musculares utilizando la técnica de registro intracelular, se realizó con el amplificador DAGAN, con micropipetas con resistencia de aproximadamente $50\text{M}\Omega$, presentó un voltaje de reposo de -70mv . Al ser estimuladas con pulsos de corriente para provocar un cambio en el potencial de membrana, y generar potenciales de acción, estas no los presentaron, lo cual es un resultado favorable en trabajo a futuro para el registro de los potenciales de placa, ya que para poder hacer esto es necesario que no existan potenciales de acción en el músculo.

- ***TECNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS Y MICROSCOPIA POR FLUORESCENCIA***

Las técnica inmunocitoquímicas aplicadas sobre las líneas celulares cultivadas sobre cubre objetos, aplicando anticuerpos específicos para cada tipo celular, tales como la sinaptofisina (syn), transportador vesicular de acetilcolina (Vchat) y periferina que se encuentran presentes en células de origen nerviosa, así como receptor nicotínico (α -3) ayudaron al reconocimiento específico de las células.

Los anticuerpos secundarios utilizados ayudaron a evidenciar la presencia de los anticuerpos primarios, para esto se utilizaron fluorocromos como el FITC (fluoresceína) que emite en verde y tR (Texas red) que emite en rojo.

Antes de realizar la microscopía por fluorescencia se identifica por microscopía convencional con luz blanca la parte del cultivo celular

neuronal al cual se le tomaran las imágenes marcadas por el fluorocromo (ver Figura 32).

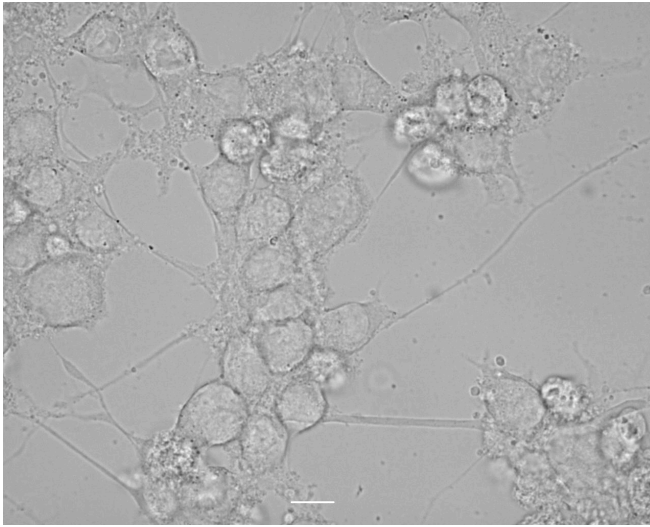


Fig. 32 Células nerviosas. Se verifico la presencia de células nerviosas en el cultivo para poder proseguir con la toma de imágenes por fluorescencia (transiluminación, barra 25micras, ampliación original x 400)

Al observar cada una de las muestras en el microscopio de fluorescencia, se observó que las células nerviosas que contenían Periferina + tR, se mostraban en color rojo debido al fluorocromo y al filtro utilizados (ver Figura 33).

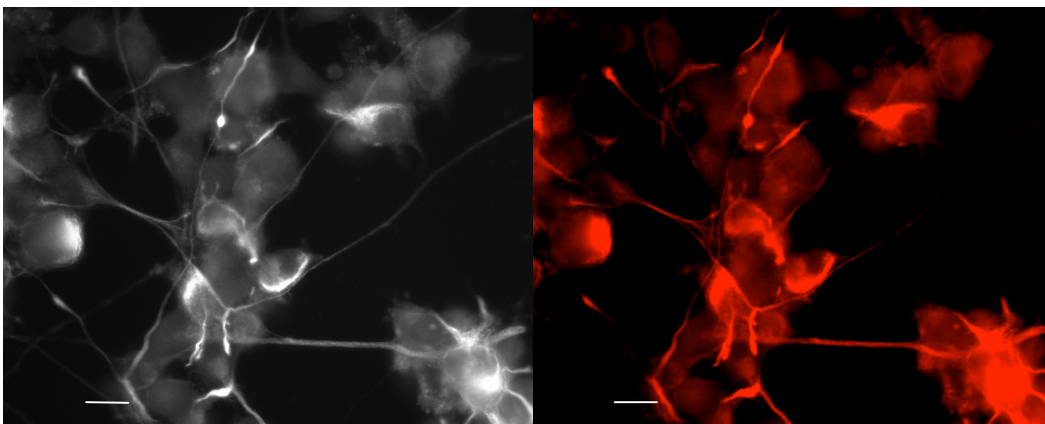


Fig. 33 Inmuno fluorescencia de células nerviosas NG-108-15. Izq. se muestran las células nerviosas capturadas en blanco y negro marcadas con el fluorocromo tR. Imagen de las células procesadas con colores artificiales para presenciar la tonalidad del marcador (Periferina-tR, barra 25micras, ampliación original x 400)

La figura 33 muestra las dos imágenes captadas por microscopía de fluorescencia, la primera imagen fue tomada con una cámara en blanco y

negro, la segunda fue teñida con color artificial para poder ver el color original del fluorocromo utilizado visto con el filtro.

Para poder ver más a detalle el marcaje superficial de las zonas iluminadas, se procedió a realizar un montaje de las imágenes capturadas, por una lado se tomo como fondo la imagen que se capturo con luz blanca y a esta se le sobre puso la imagen de fluorescencia (ver Figura 34).

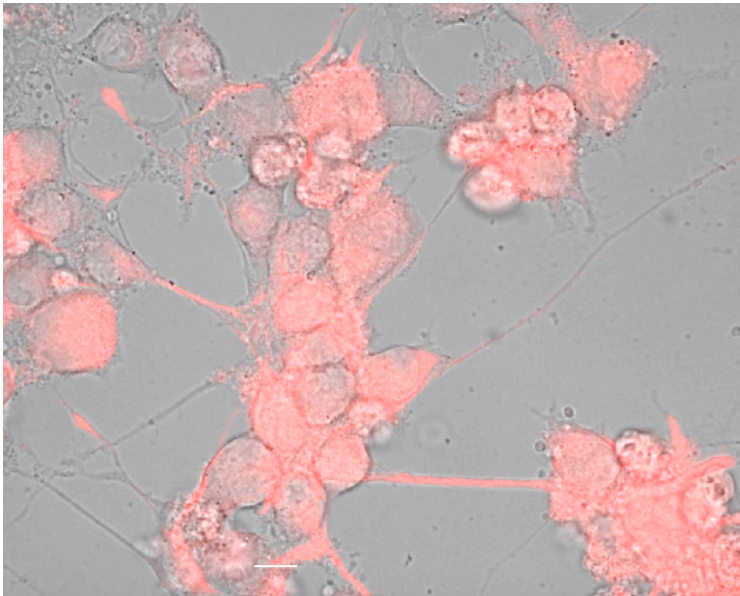


Fig. 34 Marcaje superficial de las células nerviosas. La imagen muestra en color rojo las zonas en las que el anticuerpo se unió (Periferina-tR, barra 20 micras, ampliación original x 400).

En la figura 34 se ve claramente la iluminación de las zonas que contienen la proteína a la cual fue dirigido el anticuerpo, la periferina se encuentra en los axones de las células nerviosas y superficie somática, se observa en la imagen que los axones teñidos con tR son iluminados y marcados al igual que los somas de la célula, en esta foto se hizo uso de colores artificiales debido a que la cámara que se usa para este tipo de microscopía es en blanco y negro, pero al verla al microscopio se muestra en tonalidades rojas.

Por lo que el marcaje de las células nerviosas con Periferina + tR nos permitió observar a detalle la presencia de esta proteína en la célula, ya que esta proteína se encuentra presente en células del sistema nervioso central y periférico, además que ésta es un buen indicador de la diferenciación celular de las neuronas.

En la siguiente muestra de células nerviosas se verificó la presencia de células, tomando imágenes con microscopía convencional con iluminación de luz blanca (ver Figura 35).

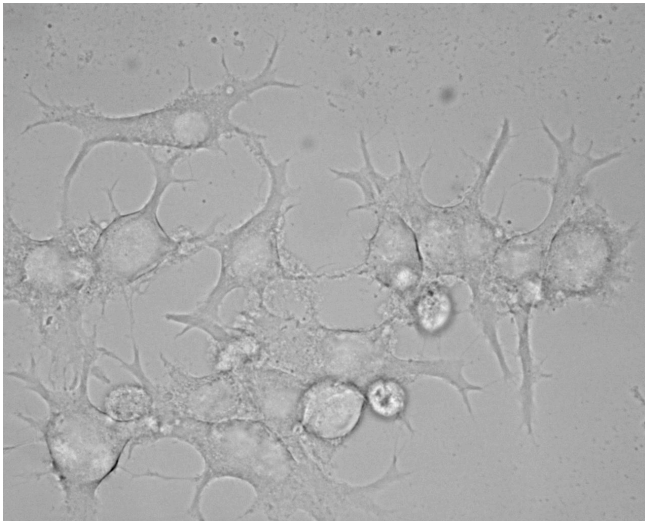


Fig. 35. Células nerviosas NG108-15 La imagen muestra las células nerviosa presentes en el cubreobjetos que fueron sometidas a los procesos de Inmunocitoquímica (transiluminación, barra 20 micras, ampliación original x 400).

La muestra con sinaptofisina + tR evidenciaba las terminales sinápticas de las células nerviosas en una tonalidad roja, la imagen de la izquierda captada en blanco y negro se observan la presencia del fluorocromo en las uniones sinápticas, la imagen de la derecha al aplicar color artificial acorde a la tonalidad en rojo provocada por el marcador tR, el cual responde a una longitud de onda determinada emitiendo una longitud de onda visible a través de un filtro que permite el paso de esta en tonalidad

roja, se ven marcadas las terminales sinápticas en donde se alojan las vesículas (ver Figura 36).

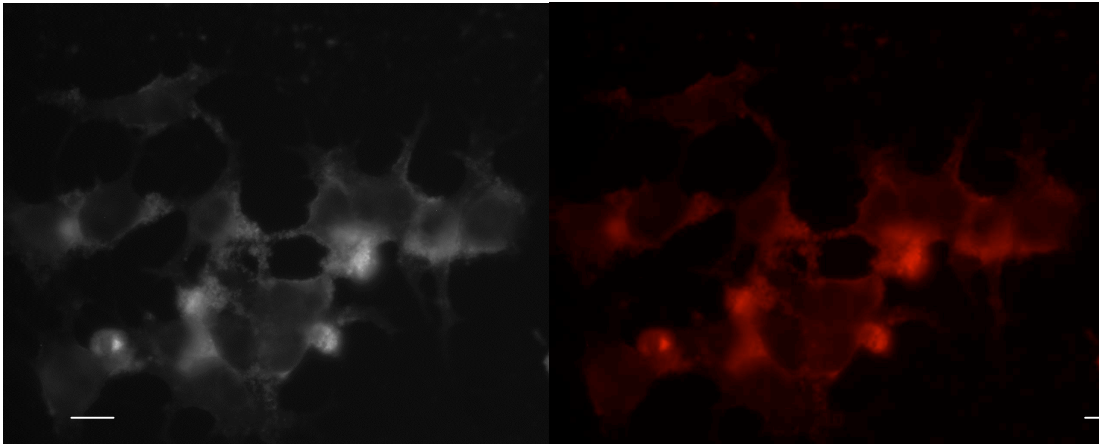


Fig. 36. Inmuno fluorescencia de vesículas sinápticas. Izq. Imagen adquirida con el filtro para la captación del fluorocromo en blanco y negro de las células nerviosas NG108-15 aplicando sinaptofisina. Der. Imagen aplicando color artificial para el reconocimiento del fluorocromo sobre el anticuerpo hacia el cual fue enviado en las vesículas sinápticas (Sinaptofisina-tR, barra 20 micras, ampliación original x 400).

Para ver las zonas marcadas por el anticuerpo se aplicó el montaje de imágenes, se utilizó como fondo la imagen adquirida con luz blanca y a esta se le sobre puso la imagen de fluorescencia (Ver Figura 37).

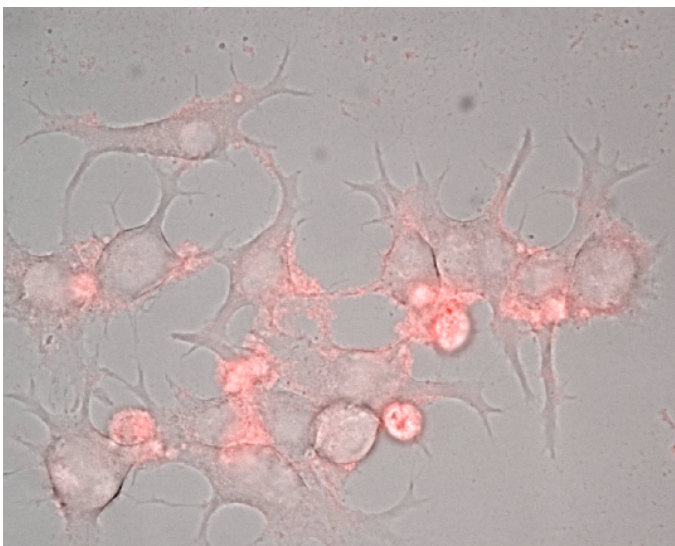


Fig. 37. Marcaje superficial con Sinaptofisina+ tR. Se muestran por sobre posición de imágenes las zonas marcadas por los anticuerpos (Sinaptofisina-tR, barra 20 micras, ampliación original x 400).

La figura 37 muestra la presencia de sinaptofisina en las sinapsis de las terminales nerviosas de las células, en la foto se observa el marcaje de las

uniones sinápticas de las células nerviosas, se observan más brillantes que en el resto de las imágenes lo cual es evidencia de la presencia de esta glicoproteína en las células nerviosas.

La captura de imágenes sin aplicar microscopía de fluorescencia se siguió utilizando para la verificación de las células en el material de cultivo (ver Figura 38).

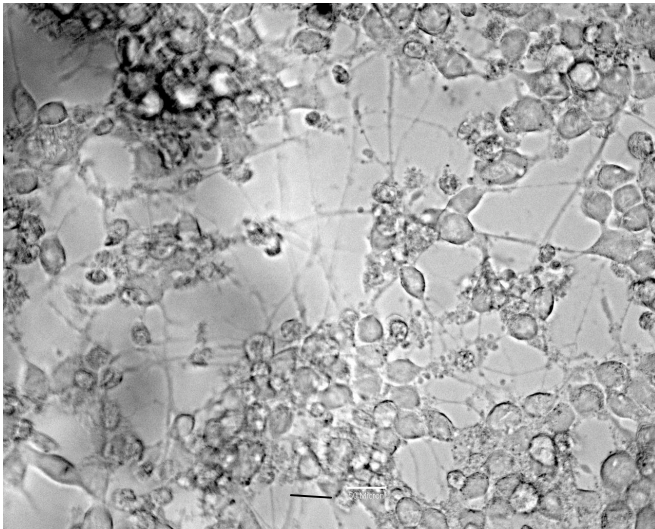


Fig. 38 Células NG108-15 sembradas sobre cubreobjetos. Las células fueron tomadas por microscopía con iluminación de luz blanca para poder corroborar la presencia de ellas en el cubreobjetos (Vchat-FITC, barra 25 micras, ampliación original x 250).

La muestra con Vchat + FITC muestra en una tonalidad verde los botones sinápticos que contienen las vesículas de acetilcolina (ver Figura 39).

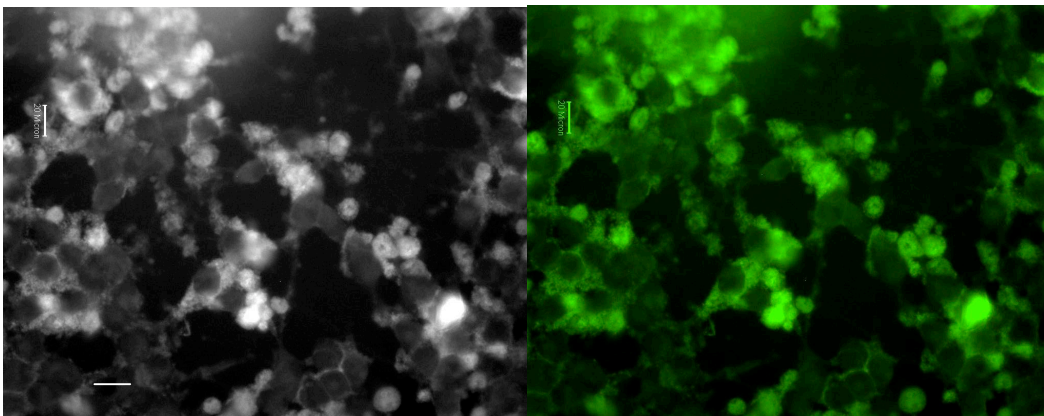


Fig. 39 Inmuno fluorescencia de los transportadores vesiculares de acetilcolina. Izq. Imagen tomada en blanco y negro de las células marcadas para Vchat. Der. Visualización del marcaje celular por el fluorocromo utilizando color falso para FITC (Vchat-FITC, barra 25 micras, ampliación original x 250).

Para observar el marcaje de las zonas marcadas con el anticuerpo se aplican las mismas técnicas de montaje de imágenes, se sigue utilizando la imagen de luz blanca como fondo y se monta la imagen teñida con color artificial (ver Figura 40).

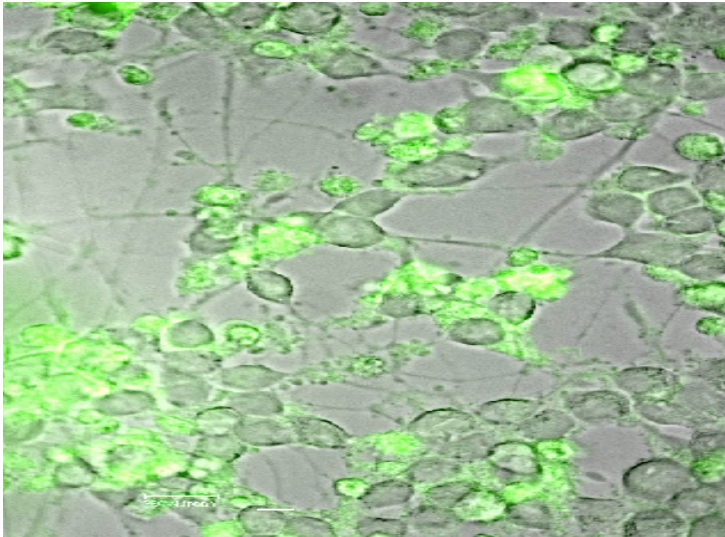


Fig. 40. Marcaje superficial con anticuerpos. Se observa el marcaje superficial de las zonas hacia las cuales fue dirigido el anticuerpo (Vchat-FITC, barra 25 micras, ampliación original x 250).

Al aplicar el anticuerpo hacia los transportadores de acetilcolina, se observa en ambas imágenes la presencia de estos, pero cabe mencionar que las células no se encuentran totalmente diferenciadas, es decir, no se presentan axones de gran longitud y por lo tanto las terminaciones sinápticas pueden ser aun muy pequeñas que se encuentra concentradas aun muy cerca del soma de la neurona, lo que es evidente por las iluminaciones de a superficie somática de la célula.

En el co cultivo se hizo la inspección por microscopía en campo claro de la superficie de crecimiento para verificar la presencia de células en el material y proseguir con la toma de imágenes por fluorescencia, además para corroborar el crecimiento neuronal en un medio de cultivo diferente al cual se mantenía durante su crecimiento en cultivo simple (ver Figura 41).

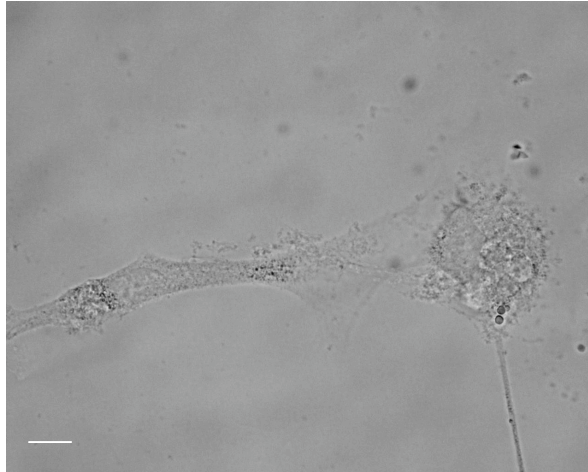


Fig. 41 Co cultivo celular en trans iluminación. El co cultivo celular fue marcado con periferina para poder observar la presencia de axones en la célula nerviosa y con receptor nicotínico α -3 para marcar la superficie de la célula nerviosa. (Periferina-tR, Alfa3-FITC, barra 20 micras, ampliación original x 400).

Se observó la presencia de dos tipos celulares músculo y nervio en el mismo campo visual, para poder verificar el adecuado crecimiento de las células neuronales con el medio de crecimiento celular de músculo se aplicaron dos marcadores de superficie para neuronas, observándose la presencia de periferina en tonalidad roja y receptor nicotínico α -3 en color verde de la célula nerviosa.

Para poder hacer la toma de imágenes en el co cultivo celular, se tomaron fotografías por separado, es decir primero se tomó la imagen con el filtro para FITC y poder evidenciar la presencia del marcador para receptor nicotínico dentro del cultivo, posterior a esto se tomó la imagen con el filtro para tR y poder ver el marcaje de los cuerpos de las células nerviosas (ver Figura 42).

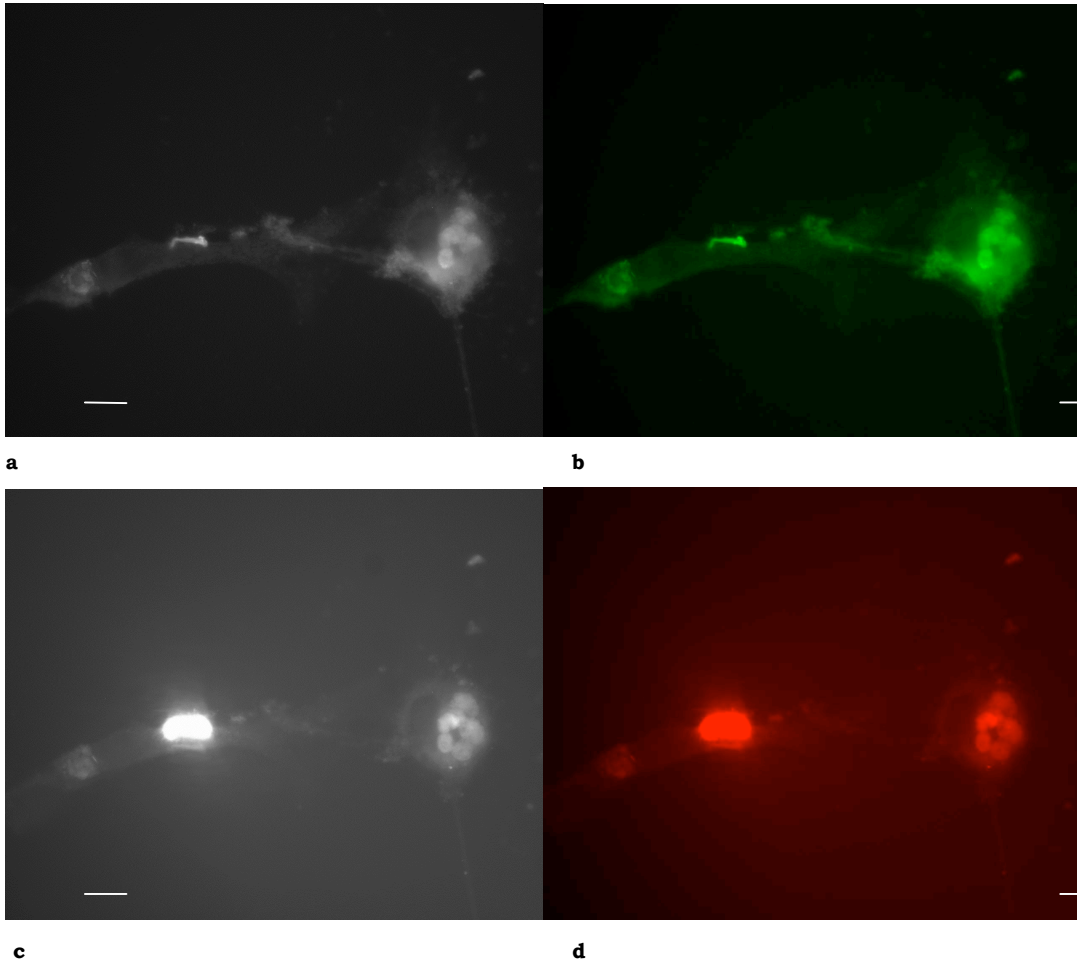


Fig. 42 Co cultivo celular en inmunofluorescencia. (a) Imagen tomada en blanco y negro aplicando el filtro para la captación del fluorocromo FITC, se observa que la superficie neuronal es más brillante que el resto de la imagen. (b) Al aplicar color falso para FITC observamos que la superficie del nervio es marcada en color verde. (c) Al aplicar periferina al nervio la célula brilla en su superficie somática. (d) Con el fluorocromo tR podemos ver la iluminación en rojo del soma neuronal . (Periferina-tR, Alfa3-FITC, barra 20 micras, ampliación original $\times 400$).

Para poder observar el marcaje de cada anticuerpo sobre la célula se realizó por separado el montaje de las imágenes para ver con detalle en cada una de ellas las partes a las que los anticuerpos se adhirieron (ver Figura 43).

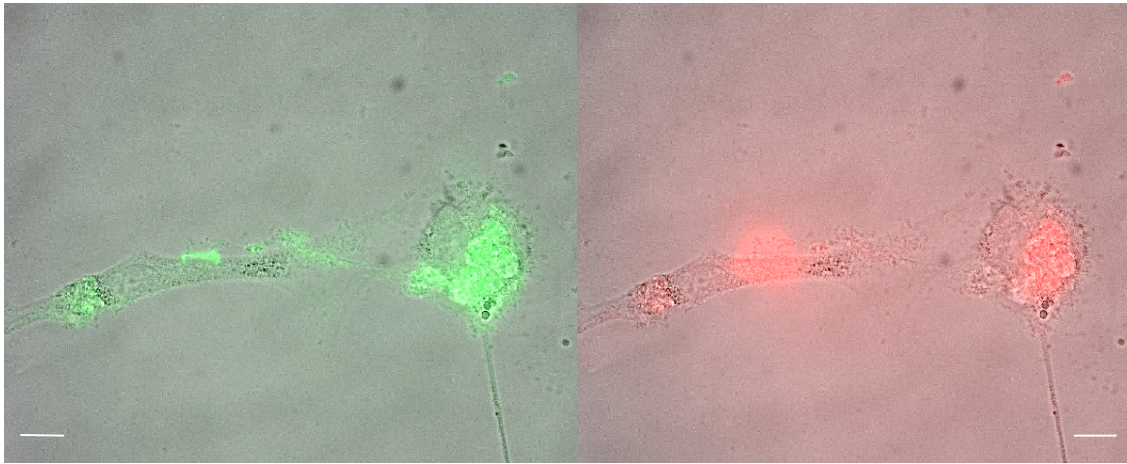


Fig. 43 Marcaje superficial por separado del co cultivo celular. Izq. Imagen de la superficie celular nerviosa marcada con recetor nicotínico (verde). Der. Imagen del soma de la célula nerviosa marcada con periferina (rojo). (Periferina-tR, Alfa3-FITC, barra 20 micras, ampliación original x 400).

La figura 43 nos ayudó a evidenciar la presencia de dos marcaciones celulares en el co cultivo celular, el receptor nicotínico α -3 nos ayudó a ver la superficie celular de las neuronas en donde se encuentran los receptores nicotínicos marcados con FITC, se puede observar que la periferina utilizada para marcar el cuerpo neuronal evidencia la presencia de células nerviosas en co cultivo celular, ya que se necesitaba observar que las células no hubieran perdido sus propiedades para expresar proteínas debido al proceso de cultivo al que fueron sometidas.

Para poder ver la presencia de células musculares en co cultivo, se revisaron que células no respondieron a la marcación por anticuerpos, Así que se seleccionó la célula que cumpliera con esta característica (ver figura 44)

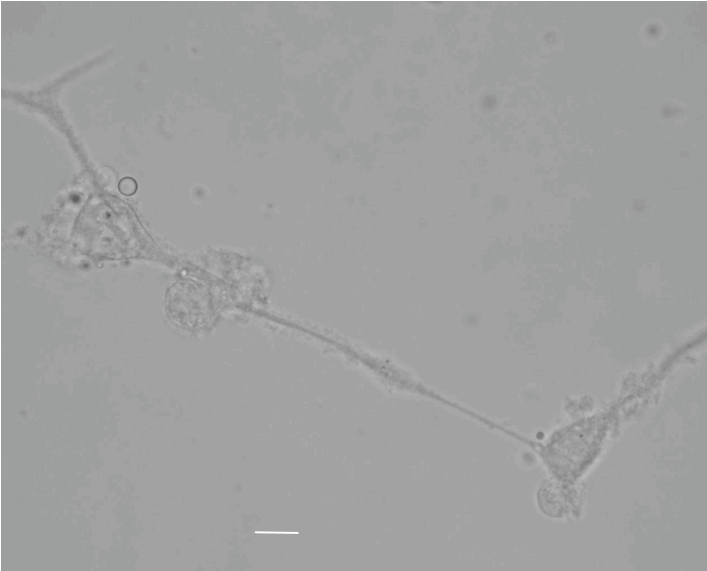


Fig. 44 Célula Muscular en co cultivo. Se captura la imagen en iluminación con luz blanca para poder ver la presencia del cuerpo celular (Periferina-tR, Alfa3-FITC, barra 20 micras, ampliación original x 400).

Una vez observada por iluminación de campo claro, proseguimos a aplicar uno de los filtros utilizados para ver la marcación de los cuerpos neuronales, en este caso se ocupa el filtro para tR que se ocupó para observar la presencia de periferina en neuronas, y ver si la célula muscular no era marcada por este (ver figura 45).

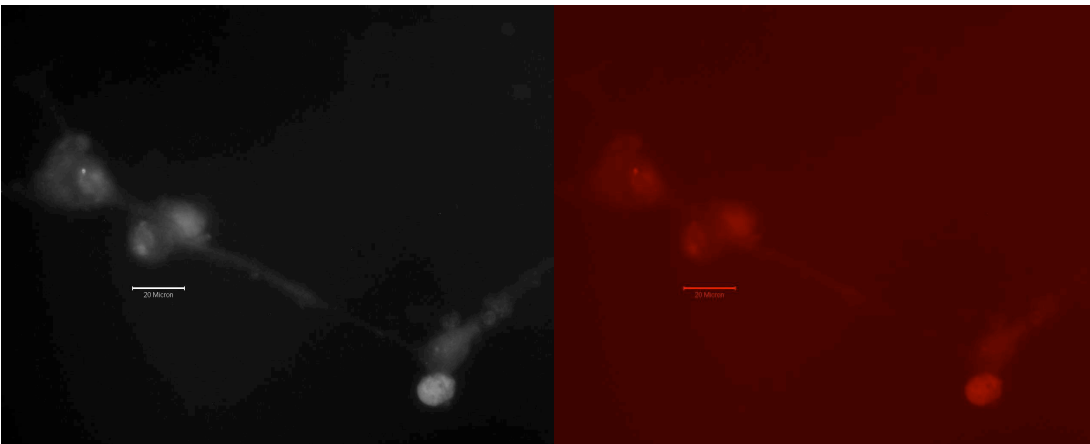


Fig. 45 Células musculares en co cultivo celular (40x). La imagen muestra la celulares musculares que al no tener periferina no son marcadas por el anticuerpo (Periferina-tR, Alfa3-FITC, barra 20 micras, ampliación original x 400).

La figura 45 muestra células musculares dentro del cultivo celular, las células al no responder a los anticuerpos aplicados, estas no son marcadas, ya que la periferina es una proteína que únicamente se encuentra en células nerviosas al igual que el receptor nicotínico alfa 3. Por lo que en el co cultivo neuromuscular solo se pueden observar con marcación superficial las células nerviosas.

CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE TRABAJO

La proliferación de las líneas celulares se llevó con éxito y en un corto lapso de tiempo se obtuvo una reserva celular de ambos tipos de células para su uso en experimentos futuros, lo cual se debió al uso de reactivos de apoyo para el crecimiento celular, como la L-glutamina que ayudó a la línea celular C2C12 y a la línea celular NG108-15 a que estas se reprodujera de forma rápida.

Ambas líneas celulares respondieron favorablemente a los procesos de diferenciación celular a las que fueron sometidas, haciendo uso de los protocolos establecidos en el apéndice A, el uso de suero de caballo en la línea celular C2C12 y dibutilil AMPc en la línea celular NG108-15 para su especificación, provocó que las células detuvieran su crecimiento y proceso de división celular, lo cual produjo que la morfología de estas se mantuviera y en el caso de las células nerviosas provocar el aumento de la longitud de los axones.

El material recubierto por plasma presentó buenas características durante el sembrado de las líneas celulares, ya que éste promovió el crecimiento y adhesión celular, esto debido a que el pirrol presenta una superficie rica en aminas que tienen gran influencia en la absorción de proteínas y adhesión celular, promoviendo sitios de inmovilización para biomoléculas, las características morfológicas de las células no se vieron afectadas por la presencia del material, así como los procesos de diferenciación de las células en el polipirrol.

Las técnicas de registro electrofisiológico de las células nerviosas presentaron resultados favorables, en fijación de voltaje se registraron corrientes iónicas de Na^+ y K^+ , y la presencia de potenciales de acción con registro intracelular, en el registro de las células nerviosas sobre el material polimerizado las células conservaron sus características eléctricas, viéndose la presencia de potenciales de acción durante la estimulación eléctrica de las células nerviosas, por lo tanto el pirrol además de ser un material rico en aminos en su superficie y promover la adhesión y crecimiento celular, este posee características de transporte de carga eléctrica sensibles a la humedad de su entorno que lo pueden convertir en un material biocompatible.

Al realizar el registro intracelular de las células musculares, estas no presentaron potenciales de acción, solo el potencial de membrana característico de las células musculares, por lo que no se realizó un registro de las propiedades eléctricas de las células sobre el material polimerizado y se prosiguió a realizar el sembrado del co cultivo celular.

El sembrado del co cultivo celular de las células nerviosas (NG108-15) y musculares (C2C12), crecieron satisfactoriamente sobre las cajas de cultivo celular por lo que, el protocolo de cultivo utilizado permitió la sobrevivencia de ambas líneas celulares en el mismo ambiente, la baja cantidad de nutrientes en el medio celular así como también la aplicación de sustancias como el dibutilil AMPc ayudó a mantener la morfología y detener la división celular, esto lo llevó a tener una vida media de 5 días debido al bajo nivel nutricional presente en el medio de cultivo, además que las células nerviosas comenzaron a desprenderse y morir primero que las células musculares debido a lo antes mencionado.

El sembrado del co cultivo celular en el material polimerizado aumento la adhesión de las células y prolongó la vida del co cultivo hasta por 7 días,

esto debido a que las aminas presentes en el material ayudaron a tener una mejor adhesión de las células sobre la superficie tratada en comparación con los cultivos en los que no hubo un tratamiento previo de las superficies de sembrado.

En las técnicas de inmunocitoquímica aplicadas sobre el co cultivo celular sobre el material polimerizado, reveló la presencia de dos tipos celulares (músculo y nervio) en el mismo ambiente de cultivo celular, evidenciado por el doble marcaje de las células nerviosas con periferina que se encuentra presente en células nerviosas originarias del sistema nervioso periférico, y se observa la presencia de receptores nicotínicos alfa-3 sobre la superficie neuronal, y las cuales no se adhirieron a las células musculares por lo que estas no fueron marcadas por los anticuerpos, lo cual tomamos como muestra de su presencia en el co cultivo, en el cultivo simple de neurona, se presentó la coloración de transportadores de acetilcolina, proteínas presentes en el axón y soma neuronal y de sinaptofisina presente en las terminaciones sinápticas. Por lo que las técnicas de cultivo empleadas en el co cultivo celular nos ayudaron a mantener dos tipos celulares (músculo y nervio) con el mismo protocolo de cultivo y que además el material no afectó sus propiedades de síntesis de proteínas.

Por lo que las técnicas de cultivo celular sobre cajas de cultivo nos llevaron a establecer los parámetros necesarios para poder realizar el sembrado de dos tipos celulares en el mismo ambiente, para posteriormente estudiar las propiedades eléctricas y morfológicas de las células sembradas en el material polimerizado, lo que nos ayudó a concluir de manera general que el polímero actúa como un buen transportador celular para el anclaje y crecimiento celular, el cual no altera las propiedades eléctricas y fisiológicas de los cultivos simples y del co cultivo celular.

Para un trabajo posterior emplearemos las técnicas aplicadas en este trabajo en conjunto con técnicas de cultivo primario celular, para poder hacer un estudio comparativo de ambos modelos neuromusculares.

La electrofisiología se realizará aplicando ambas técnicas de registro a la vez (fijación de voltaje y registro intracelular), se estimulara a la célula nerviosa para provocar un potencial de acción que provocará la liberación de acetilcolina y este a su vez la aparición de potenciales de placa en el músculo, en el caso del cultivo primario de músculo esquelético se utilizará un bloqueador para los potenciales de acción que se presenten en el músculo como la tetrodotoxina (TTX) la cual bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje, evitando así la producción de los potenciales de acción.

APENDICE A. Cultivos Celulares

Preparación de Medio D-MEM con alta Glucosa y Glutamina

No. De Catalogo: 12100-046

Dulbecco, Diffco

1. Preparación de 1.0 litro de Medio D-MEM a partir del polvo contenido en un sobre.
2. Adicionar aproximadamente 200ml de agua miliQ estéril en un vaso de precipitados estéril de 2.0 litros. Vaciar el contenido del sobre, enjuagándolo con agua miliQ estéril. Disolver el polvo suavemente con ayuda de un agitador magnético sobre una parrilla de agitación magnética, adicionando 500ml más de agua miliQ estéril.
3. Agregar 3.7g de NaHCO_3 y solubilizar.
4. Ajustar el pH a 7.2 con HCL1.0M. Aproximadamente se utilizan 3.0ml
5. Aforar a un 1.0 litro con agua miliQ estéril en un matraz aforado. Transferir a un vaso.
6. Adicionar 25.6ml de HEPES estéril 1.0 M (pH 7.4).
7. Para esterilizar utilizar un filtro de campana desechable con membrana de $0.22\mu\text{m}$ (MILLIPORE No. Cat. SCGPU05RE), enchufar el tubo de vacío a la boquilla del filtro. Pasar el contenido del vaso por el filtro.
8. Etiquetar el frasco con el tipo de medio, fecha y la persona que realizó la preparación

Preparación de HEPES 1M

1. Pesar la cantidad requerida de HEPES en una balanza de precisión, de acuerdo a la cantidad de solución que se quiera preparar. En este caso se utilizó 23.83 gr de HEPES en polvo para preparar 100ml de solución de HEPES 1M.

2. Disolver el HEPES en un vaso de precipitados de 250ml en agua desionizada estéril con ayuda de un agitador magnético en una parilla de agitación magnética.
3. Filtrar la solución con ayuda de filtros perinola para jeringas.
4. Envasar y refrigerar

Preparación de Glutamina 0.2M

No. Cat. G-1517

1. Pesar la cantidad requerida de Glutamina en una bascula de precisión, de acuerdo a la cantidad de solución que se quiera preparar. Para este caso se utilizaron 7.305 gr para preparar 250 ml de solución.
2. Disolver la Glutamina en un vaso de precipitados de 250ml en agua desionizada estéril con ayuda de un agitador magnético en un parilla de agitación magnética.
3. Filtrar la solución con ayuda de filtros de pirinola para jeringas.
4. Envasar y refrigerar

Suplementacion de Medios de Cultivo para crecimiento celular

❖ Medio de Cultivo para la línea celular C2C12 (200 ml)

- 1- Agregar en un frasco estéril con tapa 157ml de D-MEM con alta Glucosa y Glutamina (No. De Catalogo: 12100-046 Dulbecco, Diffco).
- 2- Agregar 40ml de Suero Bovino Fetal (FBS) (No. Cat. 16000, Gibco), homogenizar la solución.
- 3- Agregar 2ml de Anti-Anti (Antibiótico-Antimicótico) (No. Cat. 15240 Gibco), homogenizar la solución.
- 4- Agregar 835µl de L-Glutamina 0.2 M (No. Cat. G-1517), homogenizar la solución.
- 5- Refrigerar la solución preparada.

❖ Medio de Cultivo para la línea celular NG108-15 (200 ml)

- 1- Agregar en un frasco estéril con tapa 182ml de D-MEM con alta Glucosa y Glutamina (No. De Catalogo: 12100-046 Dulbecco, Diffco).
- 2- Agregar 20ml de Suero Bovino Fetal (FBS) (No. Cat. 16000, Gibco), homogenizar la solución.
- 3- Agregar 2ml de Anti-Anti (Antibiótico-Antimicótico) (No. Cat. 15240 Gibco), homogenizar la solución.
- 4- Agregar 1x de suplemento HAT (No. Cat. 21060, GIBCO 50x), homogenizar la solución.
- 5- Refrigerar la solución preparada.

Suplementacion de Medios de Cultivo para diferenciación celular

❖ Medio de Cultivo para la diferenciación de la línea celular C2C12 (200 ml)

- 1- Agregar en un frasco estéril con tapa 194ml de D-MEM con alta Glucosa y Glutamina (No. De Catalogo: 12100-046 Dulbecco, Diffco).
- 2- Agregar 4ml de Suero de Caballo inactivado (HS) (No. Cat. 16000, Gibco), homogenizar la solución.
- 3- Agregar 2ml de Anti-Anti (Antibiótico-Antimicótico) (No. Cat. 15240 Gibco), homogenizar la solución.
- 4- Refrigerar la solución preparada.

❖ Medio de Cultivo para la diferenciación de la línea celular NG108-15 (200 ml)

- 1- Agregar en un frasco estéril con tapa 194ml de D-MEM con alta Glucosa y Glutamina (No. De Catalogo: 12100-046 Dulbecco, Diffco).
- 2- Agregar 0.5x de Hipoxantina aminopterina timidina (HAT, Gibco 50x) y homogenizar.
- 3- Agregar 10ml de suero bovino fetal (FBS) (No. Cat. 16000, Gibco) y homogenizar.
- 4- Agregar 1Mm de N⁶, O² Dimetil adenosina 3':5' monofosfato ciclico (dibutiril AMP-c; SIGMA), homogenizar vigorosamente.
- 5- Refrigerar la solución preparada.

Sembrado celular a partir de un crio vial (Líneas celulares NG108-15 y C2C12)

- 1- Preparar las cajas de cultivo, rotulándolas con la fecha de descongelación, número de pasaje, nombre de la línea celular.
- 2- Substraer del tanque de crio preservación celular la línea celular que se requiera.
- 3- Colocar el crio vial en baño térmico a una temperatura de 37°C por aproximadamente 1-2 minutos.
- 4- Retirar el crio vial, limpiándolo con un paño humedecido con etanol al 70% y llevarlo a la campana de flujo laminar.
- 5- Colocar 8 ml de medio de cultivo en un tubo de 10 ml y vaciar el contenido del crio vial y homogenizar.
- 6- Llevar el tubo a la centrifuga y centrifugar a una velocidad de 1300 rpm por 5 minutos, para obtener en el fondo el botón celular.
- 7- Decantar el contenido del tubo en un vaso de precipitados, rellenar el tubo con 5 ml de medio de cultivo y homogenizar.

- 8- Tomar el contenido del tubo y transferirlo a la caja de cultivo, incubar a las condiciones de temperatura y atmósfera requeridas (37°C, 5% CO₂).
- 9- Examinar el cultivo microscópicamente después de 24 horas y subcultivar si es necesario.

- **Sub cultivo Celular**

- ❖ ***Sub cultivo Celular (Línea celular C2C12)***

- 1- Observar por medio de un microscopio invertido la confluencia celular y corroborar la ausencia de contaminación.
- 2- Remover de la caja de cultivo el medio, depositándolo en un vaso de precipitados especial para desechos, retirar totalmente el medio de cultivo de la caja ya que al quedar un poco del medio, el FBS inhibirá la acción de la tripsina+EDTA.
- 3- Lavar la superficie de la caja de cultivo con PBS+EDTA (No. Cat. 13151-014, GIBCO)
- 4- para romper los enlaces proteínicos y facilitar su desprendimiento de la superficie de la caja.
- 5- Colocar 1 ml de Tripsina+EDTA para una caja de 25cm², mover la caja de tal modo que la Tripsina+EDTA cubra toda la superficie de la caja,
- 6- Coloca la caja en la incubadora por aproximadamente 5 minutos o bien cuando a contra luz se observe la caja y se pueda ver que la capa de células se ha desprendido.
- 7- Resuspender las células con 5 ml de medio fresco previamente entibiado y homogenizar.
- 8- Colocar el contenido de la caja en una nueva caja de cultivo, por lo general de una caja se obtienen dos nuevas.

9- Colocar las cajas en la incubadora a condiciones adecuadas de atmósfera y temperatura (5% CO₂ y 37°C).

❖ ***Sub cultivo Celular (Línea celular NG108-15)***

- 1- Observar por medio de un microscopio invertido la confluencia celular y corroborar la ausencia de contaminación.
- 2- Remover de la caja de cultivo el medio, depositándolo en un vaso de precipitados especial para desechos, retirar totalmente el medio de cultivo de la caja ya que al quedar un poco del medio, el FBS inhibirá la acción de la tripsina+EDTA.
- 3- Colocar 1 ml de Tripsina+EDTA para una caja de 25cm², mover la caja de tal modo que la Tripsina+EDTA cubra toda la superficie de la caja,
- 4- Coloca la caja en la incubadora por aproximadamente 5 minutos o bien cuando a contra luz se observe la caja y se pueda ver que la capa de células se ha desprendido.
- 5- Resuspender las células con 5 ml de medio fresco previamente entibiado y homogenizar.
- 6- Colocar el contenido de la caja en una nueva caja de cultivo, por lo general de una caja se obtienen dos nuevas.
- 7- Colocar las cajas en la incubadora a condiciones adecuadas de atmósfera y temperatura (5% CO₂ y 37°C).

• **Crio preservación de líneas celulares**

❖ ***Crio preservación de la línea celular C2C12***

- 1- Observar por medio de un microscopio invertido la confluencia celular y corroborar la ausencia de contaminación.

- 2- Decantar el medio de la caja de cultivo colocándolo en un vaso de precipitados especial solo para deshechos, teniendo lejos del lugar donde se tenga el resto de los materiales.
- 3- Aplicar 1 ml de Tripsina a una caja de 25 cm², colocarla en la incubadora por 5 minutos o hasta que la superficie de las células se hayan desprendido.
- 4- Retirar las células desprendidas y colocarlas en un tubo con tapa de 10 ml.
- 5- Centrifugar el tubo por 5 minutos a una velocidad de 1300 rpm para obtener un botón de células en el fondo del tubo.
- 6- Decantar el sobrenadante de los tubos en el vaso de deshechos teniendo cuidado de hacerlo en un solo movimiento para evitar que se deshaga el botón de células.
- 7- Colocar 1.6 ml de medio de cultivo suplementado, 0.2 ml de DMSO (No. Cat. D2650, SIGMA) y 0.2 ml de FBS .
- 8- Resuspender el contenido rápidamente ya que el DMSO es tóxico para las células y puede llegar a dañarlas ya que este rompe la pared celular de las células.
- 9- Se coloca el contenido del tubo en un criovial de 2 ml el cual ha sido previamente rotulado (pasaje, fecha y línea celular), este se cubre con papel aluminio.
- 10- Se coloca por una semana en el revco en donde habrá un descenso gradual de la temperatura para posteriormente ser llevado a una fase gaseosa o líquida de congelación (nitrógeno líquido).

❖ ***Crio preservación de la línea celular NG108-15***

- 1- Observar por medio de un microscopio invertido la confluencia celular y corroborar la ausencia de contaminación.
- 2- Decantar el medio de la caja de cultivo colocándolo en un vaso de precipitados especial solo para deshechos, teniendo lejos del lugar

donde se tenga el resto de los materiales para evitar cualquier tipo de escurrimiento y contaminación.

- 3- Aplicar 1 ml de Tripsina a una caja de 25 cm², colocarla en la incubadora por 5 minutos o hasta que la superficie de las células se hayan desprendido.
- 4- Retirar las células desprendidas y colocarlas y un tubo con tapa de 10 ml.
- 5- Centrifugar el tubo por 5 minutos a una velocidad de 1300 rpm para obtener un botón células en el fondo del tubo.
- 6- Decantar el sobre nadante de los tubos en el vaso de deshechos teniendo cuidado de hacerlo en un solo movimiento para evitar que se deshaga el botón de células que se encuentra en el fondo.
- 7- Colocar en el tubo 1.8 ml de FBS, 0.2 ml de DMSO.
- 8- Re suspender el contenido rápidamente ya que el DMSO es toxico para las células y puede llegar a dañarlas ya que este rompe la pared celular de las células.
- 9- Se coloca el contenido del tubo en un crio vial de 2 ml el cual ha sido previamente rotulado (pasaje, fecha y línea celular), este se cubre con papel aluminio.
- 10- Se coloca por una semana en el revco en donde habrá un descenso gradual de la temperatura para posteriormente ser llevado a una fase gaseosa o liquida de congelación (nitrógeno líquido).

APENDICE B. Protocolos Registros Electrofisiológicos

▪ *Técnica de Fijación de Voltaje*

Materiales:

- Amplificador Operacional Axopatch 200A
- Micro manipulador.
- Set de adquisición
- Micro electrodo de Ag-AgCl
- Micro pipetas de Boro Silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL NO FIL 4IN)
- Programa de Adquisición P-Clamp

Procedimiento:

- 1- Retirar de la caja para cultivo el medio de cultivo celular.
- 2- Bañar con solución electrolítica la superficie de cultivo celular, en este caso se utilizó solución extracelular de mamífero.
- 3- Insertar uno de los extremos del micro electrodo en el interior celular, el otro extremo debe de estar conectado a un amplificador, en la configuración de seguidor de voltaje, a través de un electrodo de plata cubierto de cloruro de plata.
- 4- Con la ayuda de una jeringa montada a través de una sonda al micro electrodo romper la membrana celular aplicando succión por aire, con el objetivo de generar un sello y evitar cualquier corriente parasitaria en el registro, además de realizar una interfaz del

electrodo con el interior celular y lograr así un intercambio de la solución electrolítica.

- 5- Fijar el voltaje a -80 mV para evitar la inactivación parcial de canales voltaje dependientes.
- 6- Aplicar pulsos rectangulares de voltaje, el protocolo de pulsos dependerá de los canales iónicos que se pretende estudiar.
- 7- En nuestro caso, se aplicó un protocolo de pulsos de fijación del voltaje para observar las corrientes de Na⁺ y K⁺ voltaje dependientes.

▪ **Soluciones electrolíticas.**

Para realizar las pruebas electrofisiológicas de las líneas celulares es necesario crear las condiciones eléctricas adecuadas, es decir, se necesita tener un equilibrio osmótico entre el interior y exterior celular, por lo que las soluciones que se utilicen para las pruebas electrofisiológicas deben guardar dicho equilibrio, así que la relación de soluto estará dada de la siguiente manera:

Sol. Extracelular	KCl 4.5 mM	NaCl 152 mM	MgCl ₂ 1 mM	CaCl ₂ 2 mM	HEPES 5 mM	EGTA -
Sol. Intracelular	140 mM	10 mM	1 mM	1 mM	10 mM	11 mM

Así que tomando los pesos moleculares de cada soluto se obtienen los gramos necesarios para realizar las soluciones electrolíticas (1 Lt. de solución extracelular y 100 ml de solución intracelular):

Sol. Extracelular	KCl 0.335 gr	NaCl 8.882 gr	MgCl ₂ 0.203 gr	CaCl ₂ 0.221 gr	HEPES 1.191 gr	EGTA -
Sol. Intracelular	1.043 gr	0.0584 gr	0.020 gr	0.011 gr	0.238 gr	0.418 gr

Estas soluciones fueron las que se utilizaron en los registros de fijación del voltaje.

▪ **Microelectrodos.**

Materiales:

- Capilares de Boro Silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL NO FIL 4IN)
- Estirador o puller horizontal (SUTER INSTRUMENTS, Model P-97)
- Cánula y jeringa.
- Microscopio
- Pulidor de puntas.

Procedimiento:

1. Con ayuda de un “puller” o estirador electrónico horizontal, realizar el estiramiento de las pipetas, haciendo el ajuste de los parámetros de estiramiento requeridos, en este caso se ajustaron los parámetros de tal manera que se obtuvieran micro electrodos con una resistencia aproximada entre 2 y 4 MΩ.
2. Pulir con una micro forja la punta de las pipetas para mejorar la calidad del sello entre la punta del microelectrodo y la membrana celular.

3. Medir la resistencia de las micropipetas recordando que existe una relación entre esta variable y el diámetro (a menor diámetro mayor resistencia)
4. Las micropipetas se llenan con una cánula muy fina de solución intracelular estéril, la cual se introduce en el extremo de mayor diámetro de la micropipeta.
5. Posteriormente se procede a montar la micropipeta en un “holder” que contiene un alambre de Ag-AgCl.

▪ **Registro intracelular.**

Materiales:

- Amplificador DAGAN
- Micromanipulador.
- Set de adquisición
- Micropipetas de Boro Silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL NO FIL 4IN), las cuales se llenan con cloruro de potasio o acetato de potasio 3 M.
- Programa de Adquisición P-Clamp

Procedimiento:

- 1- Retirar de la caja para cultivo el medio de cultivo celular.
- 2- Bañar con solución electrolítica la superficie de cultivo celular, en este caso se utilizó solución extracelular de mamífero.
- 3- Insertar uno de los extremos del microelectrodo en el interior celular, el otro extremo debe de estar conectado a un amplificador, en la configuración de seguidor de voltaje, a través de un electrodo de plata cubierto de cloruro de plata.

- 4- Acercar poco a poco con ayuda del micromanipulador la punta de la micropipeta a la membrana celular, y atravesar la membrana con la punta.
- 5- Observar el potencial de reposo de la célula y si es necesario aplicar corriente de DC para modificar el potencial de reposo.
- 6- Estimular la membrana celular aplicando pulsos rectangulares de corriente, esto dependerá de lo que se quiera obtener a la salida, en nuestro caso la célula fue estimulada aplicando pulsos rectangulares de corriente despolarizante con el objetivo de observar los potenciales de acción.

- ***Soluciones electrolíticas para registro intracelular***

Preparación de KOOCCH₃ + KCl (3M)

Para la solución de KCl se siguió la siguiente relación:

74.557 → 1M

X → 3M X=223.671 gr

223.671 → 1000ml

X → 200ml X=44.73 gr de KCl para 200 ml de solución

Para la solución de KOOCCH₃:

98.146 → 1M

X → 3M X=294.438 gr

294.438 → 1000ml

X → 200ml X=58.89 gr de KOOCCH₃ para 200 ml de solución

De aquí para preparar 50 ml de KOOCCH₃ + KCl se siguió lo siguiente:

KOOCCH₃ → 95%

KCl → 5%

Así que se utilizaron 47.5 ml de KOOCCH₃ y 2.5 ml de KCl todo esto a una concentración de 3M

▪ ***Electrodos para registro intracelular.***

Materiales:

- Capilares de Boro Silicato (World Precision Instruments, glass 1BBL W/FIL 3IN)
- Estirador o puller horizontal (SUTER INSTRUMENTS, Model P-97)
- Cánula y jeringa.
- KCl o KOOCCH₃ (3M)

Procedimiento:

1. Con ayuda de un “puller” o estirador electrónico horizontal, realizar el estiramiento de las pipetas, haciendo el ajuste de los parámetros de estiramiento requeridos, en este caso se ajustaron los parámetros de tal manera que se obtuvieran micro electrodos con una resistencia aproximada entre 50 y 60 MΩ.
2. Medir la resistencia de las micropipetas recordando que existe una relación entre esta variable y el diámetro (a menor diámetro mayor resistencia). Este se hace por medio del amplificador DAGAN el cual contiene un medidor de resistencia, el que se mueve hasta eliminar el voltaje producido por el paso de corriente a través del microelectrodo.

3. Las micropipetas se llenan con una cánula muy fina de solución de acetato de potasio o cloruro de potasio (3M), la cual se introduce en el extremo de mayor diámetro de la micropipeta.
4. Posteriormente se procede a montar la micropipeta en un “holder” lleno con KCl o acetato de potasio que contiene una pastilla de Ag-AgCl.

APENDICE C. Inmunocitoquímica

▪ *Fijador Celular*

- 1.- Calentar 125ml de agua desionizada a 60°C.
- 2.- Agregar 10 gr de Paraformaldehido y unas gotas de NaOH, disolver y dejar enfriar.
- 3.- Agregar 125ml de Buffer de Fosfatos (PB) [0.2M].
- 4.- Sacar 5ml de esta solución y agregar 5ml de glutaraldehido al 25%.
- 5.- Ajustar el PH=7.4 y guardar a 4°C

▪ *Solución para Buffer de Fosfatos*

Se hace a partir de 2 stocks (A y B):

A) Solución de Fosfato de Sodio monobásico:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (monohidratado)[0.2M]

5.52gr → 200ml

B) Solución de Fosfato de Sodio dibásico

NaH_2PO_4 (anhídrido)[0.2M]

25.55gr → 900ml

Para obtener 1000ml de buffer a 0.2M se mezcla 190 ml de A con 810 ml de B. Para obtener PB[0.1M] se diluye 1:1 el pH=7.4

▪ **Preparación de TRITON y Dilución de Suero de Burro**

El TRITON debe de estar al 0.1% de concentración, para prepararlo a esta concentración se aplican 50 µl de TRITON en 50 ml de agua desionizada, la solución se tiene que estar homogenizando ya que el TRITON es muy espeso y puede tardar en disolverse.

Para preparar la disolución del suero de burro, se utilizó la siguiente relación:

Para 8 ml de suero de burro al 1%, se mezclaron 80 µl de Suero en 8 ml de PBS.

Para 8 ml de suero al 0.1%, se aplico 8 µl de suero en 8ml de PBS.

▪ **Dilución de Anticuerpos**

	Dilución	Suero Burro	Anticuerpo
V-CHAT	1:800	2 ml	2.5 µl
SYN	1:1000	1 ml	1.0 µl
□-3	1:500	2 ml	2.0 µl
Periferina	1:500	2 ml	4.0 µl
Texas Red	1:200	2 ml	4.0 µl
FITC	1:400	2ml	2.0 µl

▪ **Técnica de Inmunocitoquímica**

- 1.- Se fijan las células con 4% de PFA durante 10 min.
- 2.- Lavar 3 veces con PBS con 10 min de reposo entre cada lavado
- 3.- Permeabilizar la membrana con TRITON en PBS por 10 min.
- 4.- Lavar 3 veces con PBS con 10 min de reposo entre cada lavado.

- 5.- Bloquear con 1% de suero de caballo diluido en PBS por 30 min.
- 6.- Incubar con el anticuerpo primario en PBS con 0.1% de suero de burro a 4°C por 24 hrs.
- 7.- Lavar 3 veces con PBS con 10 min de reposo entre cada lavado.
- 8.- Aplicar el anticuerpo secundario en PBS con 0.1% de suero de burro por 30 min.
- 9.- Lavar 3 veces con PBS con 10 min de reposo entre cada lavado.
10. Montar en Glicerol.

REFERENCIAS

[1] Takahashi T., Nakajima Y., Hirosawa K., Nakajima S., and Onodera K. (1987). "Structure and Physiology of Developing Neuromuscular Synapses in Culture". *Journal Neuroscience* Vol. 7 (2):473-481

[2] Shimada Y., Fischman D. A., and Moscona A. A. (1969), "The development of nerve-muscle junctions in monolayer cultures of embryonic spinal cord and skeletal muscle cells". *The Journal of Cell Biology* Vol. 43 (2): 382-387

[3] Atala A., Bauer S., Soker S., Yoo J. (2006). "Tissue engineered autologous bladders for patients needing cytoplasty". *The Lancet* Vol. 367(9518): 1241-1246

[4] Morales J., Osorio C., Montiel R., Vázquez H., Olayo R., Olayo M. G., Cruz G. J., Pérez E. (2008). "Autoensamble de capas de polímeros iónicos sobre polietileno funcionalizado por plasma de pirrol". *Superficies y Vacío* Vol.21 (3):1-4

[5] Pérez-Tejada E., Gómez Quiroz L. E., Morales J., Gutiérrez M. C., Olayo M. G., Cruz G. J., Olayo R. (2007) "Cultivo de Hepatocitos sobre vidrio modificado con un polímero de pirrol sintetizado por plasma". *Superficies y Vacío* Vol. 21 (3): 10-14

[6] Williams D.F. (1989). "Challenges in materials for health applications". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater.*, 28, 662-667.

[7] Patrick C. W., Mikos A., McIntire L. V. (1998). "Frontiers in Tissue Engineering". *Elsevier Science* Vol. 32 (4):3

- [8] Dueñas A., Criollo W., Miranda de Bernal A., Piamba J. (1996). "Enfermedad perinatal y viabilidad celular renal postmortem *in vitro* en el Hospital Universitario del Valle, Cali". *Colombia Medica* Vol. 27:110-116
- [9] Hayes NV, Bennett AF, Baines AJ. (1991). "Selective Ca²⁺-dependent interaction of calmodulin with the head domain of synapsin". *Biochem. J.* Vol.275:93-97
- [10] Naguib, M *et al.* (2002). "Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction". *Anesthesiology* Vol 96: 202-231.
- [11] Puura A. (2001). "Speeding up the Course of the Neuromuscular" Block. *Acta Universitatis Tamperensis* 817, Academic Dissertation, Finlandia.
- [12] Bowman WC. (1993). "Physiology and pharmacology of neuromuscular transmission, with special reference to the possible consequences of prolonged blocked". *Intens Care Med* Vol.19:45-53
- [13] Marshall IG., Prior C. (1994). "Update on the acetylcholine receptor and the neuromuscular junction". *Ballière's Clin Anaesthesiol* Vol. 8:299
- [14] Wilson, GG, Karlin, A. (2001). "Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 98(3):1241-1248.
- [15] Corringer P.-J. *et al.* (2000). "Nicotinic receptors at the amino acid level". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* Vol.40:431- 458.

- [16] Stoelting, RK. (1991). "Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice." New York, JB Lippincott, 2^a edición:174.
- [17] Motamed, C., *et al.*(1997). "Rocuronium prevents succinylcholine-induced fasciculations". *Can J Anaesth* 1997 / 44: 12 / 1262-1268
- [18] Engel AG.(1986). "Acquired Autoimmune Myasthenia Gravis". En: Engel AG, Banker BQ, eds. *Myology. Basic and Clinical*. New York: McGraw Hill, 1986; 1925-1954.
- [19] Freshney RI.(1987). "Biology of the cell cultured". En: Freshney RI, ed. *Culture of animal cells*, 2nd ed, Nueva York: Alan R. Liss Inc 1987; 1-12.
- [20] Iturralde M, Coll J.(1984). "Cultivo de células animales". *Med Clin Cap*.82: 273-280.
- [21] Astermark J, Stenflo J. (1991). "The epidermal growth-factor-like domains of factor IX". *J Biol Chem* Vol. 266:438-443.
- [22] Nardone RM.(1987). "Cell culture techniques from donor to cell lines". *Biotechniques* Cap.5: 122-127
- [23] Kondo S, Hozumi Y, Aso K. (1990). "Long-term organ culture of rabbit skin: effect of EGF on epidermal structure in vitro". *J Invest Dermatol*. Vol.95:387-402.
- [24] Vanbrunt J. Artificial organs from culture. *Bio-Technology* 1991; 9: 136-137.
- [25] Douglas W.H.J., McAter J.A., Dell'Orco R.T., Phelps D. (1980). "Visualization of cellular aggregates cultured as a three-dimensional collagen sponge matrix". *In Vitro* Vol. 16: 306-312

[26] Penel C, Gerard C, Mauchamp J, Verrier B. (1989). "The thyroid cell monolayer in culture: a tight sodium absorbing epithelium". *Pflugers Arch* Vol. 414:509-515.

[27] Hayflick L, Moorhead P. (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains". *Exp Cell Res* Vol. 25:585-621.

[28] Michikawa M, Kobayashi T, Tsukagoshi H.(1991). "Early events of chemical transmission of newly formed neuromuscular junctions in monolayers of human muscle cell co cultered with fetal rat spinal cord explants". *Brain Res* Vol.538: 79-85.

[29] Wyskovsky W, Hohenegger M, Plank B, Hellamnn G, Klein S, Suko J.(1990). "Activation and inhibition of the calcium-release channel of isolated skeletal muscle heavy sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* Vol. 194: 549-559.

[30] Cardellach F, Taraschi TF, Ellingson JB, Stubbs CD, Rubin E, Hoek JB. (1991). "Maintenance of structural and functional characteristics of skeletal-muscle mitochondria and sarcoplasmic reticular membranas after chronic ethanol treatment". *Biochem. J.* Vol. 274:565-573.

[31] Harrison RF.(1907) "Observations on the living developing nerve fiber". *Proc Soc Exp Biol Med* Vol. 4: 140-145.

[32] Carrel A.(1981). "On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med* 1912; 15: 516 528. the adhesion and growth of cells." *J Cell Biol.* Vol. 88: 473-485.

[33] Taub M. (1990). "The use of defined media in cell and tissue culture. Toxic Vitro Vol.4: 213-225.

[34] Sato GH. (1975) "The role of serum in cell culture". En: Litwack G, ed. Biochemical actions of hormones. Nueva York: Academic Press, 1975: 391-396.

[35] Mather JP, Sato GH. (1979). "The use of hormone supplemented serum free media in primary cultures". Exp Cell Res Vol. 124:215-219.

[36] Barnes D, Sato G. (1981). "Serum-free cell culture: a unifying approach", Cell Press Vol. 22: 649-655.

[37] Jiang J., Choi R., Siow N., Lee H., Wan D. and Tsim K. (2003). "Muscle Induces Neuronal Expression of Acetylcholinesterase in Neuron-Muscle Co-culture", The Journal of Biological Chemistry Vol. 278:45435-45444

[38] Nirenberg M., Wilson S., Higashida H., Rotter A., Krueger K., Busis N., Ray R., Kenimer J. G., Adler M.(1983). "Modulation of Synapse Formation by Cyclic Adenosine Monophosphate". Science Vol. 222(4625):794-799

[39] Alessandri-Haber N., Paillart C., Arsac C., Gola M., Couraud F. and Crest M. (1999). "Specific Distribution of sodium channels in axons of rat embryo spinal motoneurons". Journal Physiology Vol. 518(1):203-214

[40] Das M., Rumsey J.W., Gregory C. A., Bhargava N., Kang J.F., Molnar P., Riedel L., Guo X. and Hickman J. J.(2007). "Embryonic motoneuron-skeletal muscle co-culture in a defined system". Neuroscience Vol.146:481-488

[41] Archival S. J., Krarup C., Shefner J., Li S., Madison R. A. (1991). "A collage-based nerve guide conduct for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and non human primates", J. of Comparative Neurology, Vol. 306:685-696

[42] Cruz G.J., Morales J., Olayo R. (1999). "Films obtained by plasma polymerization of pyrrole". Thin Solid Films Vol.342:119-126.

[43] Castellanos P., Godínez F., Jiménez J., Medina V.(1997) "Electrofisiología humana: Un enfoque para ingenieros", Universidad Autónoma Metropolitana Cap. 1:18-96.

El jurado designado por la Comisión de Posgrado en Ingeniería Biomédica
de la unida Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Esmeralda Sarai Zuñiga Aguilar

El día 22 de octubre de 2009

Jurado:

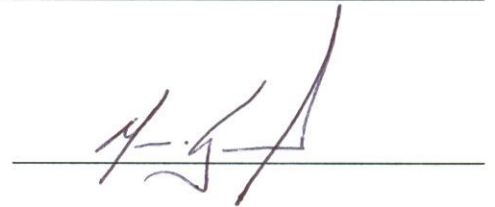
Presidente: José Clemente Ibarra Ponce de León



Secretario: Rafael Godínez Fernández



Vocal: Mario García Lorenzana



Asesor: Roberto Olayo González

