

Análisis morfométrico del proceso de diferenciación *in vitro* de neuronas del hipocampo.

Gisselle Correa^{1,2} y Marines Longart¹.

¹Unidad de Neurociencias, Centro de Biociencias y Medicina Molecular, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas y

²Decanato de Estudios Profesionales, Universidad Simón Bolívar. Sartenejas, Baruta, Venezuela.

Palabras clave: axones, dendritas, diferenciación, inmunofluorescencia, polaridad.

Resumen. Los cultivos neuronales del sistema nervioso central se han venido usando ampliamente para el estudio de los mecanismos que conducen el proceso de diferenciación neuronal, así como también se han empleado como modelos *in vitro* para evaluar drogas y desarrollar nuevas terapias, de allí la importancia profundizar en la caracterización de dicho proceso. En este estudio, se prepararon cultivos primarios de células del hipocampo para estudiar los tipos celulares desarrollados, el desarrollo de dendritas y axones, la densidad de vesículas sinápticas y el desarrollo de los conos de crecimiento. Mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos y marcadores no inmunológicos, se observaron los cambios experimentados por las estructuras de interés durante diferentes estadios temporales (1-21 días). Observamos una mayor proporción de neuronas sobre glías, desarrollo normal de las redes neuronales (conformadas por dendritas y axones), incremento en la longitud de dendritas y el establecimiento de sinapsis. Las vesículas sinápticas también experimentaron un incremento en su densidad a medida que aumentaba el tiempo de cultivo. Finalmente, se estudiaron los cambios morfológicos de los conos de crecimiento observándose que al inicio del cultivo en su mayoría se encontraban cerrados, pero a medida que maduraban las neuronas la proporción de conos de crecimiento abiertos aumentó. Este trabajo representa un avance en la caracterización morfométrica de los cultivos neuronales puesto que recoge de manera simultánea y cuantitativa los principales aspectos que marcan el proceso de diferenciación neuronal. En este estudio, la medición de estas características morfológicas hizo posible establecer parámetros cuantitativos que ayudarán a distinguir las principales etapas de la diferenciación neuronal.

Morphometric analysis of the differentiation process of hippocampal neurons *in vitro*.

Invest Clin 2010; 51(4): 501 - 518

Key words: axons, dendrites, differentiation, immunofluorescence, polarity.

Abstract. Neuronal cultures of the central nervous system are widely used to study the molecular mechanisms that rule the differentiation process. These cultures have also been used to evaluate drugs and to develop new therapies. From this we can infer the relevance of performing an extended characterization that involves the main aspects driving such process. To carry out such characterization in the present study we prepared primary cultures from hippocampal cells to study cell identity, development of neuronal processes (dendrites and axons), density of synaptic vesicles and development of growth cones. Using immunofluorescence techniques, specific antibodies and non-immunological probes, we studied the changes experienced by the structures under study during different temporal stages (1-21 days). We observed a major proportion of neurons over glia, normal development of neuronal networks (formed by dendrites and axons), increase in the length of dendrites and axons and establishment of synaptic connections. Synaptic vesicles also showed an increase in their densities as long as the time of the culture progressed. Finally, we studied the morphological changes of the growth cones and observed that those were mostly closed at the beginning of the culture period. As neurons matured we observed an increase in the proportion of open growth cones. This work represents an advance in the morphometric characterization of neuronal cultures, since it gathers the main aspects that outline the neuronal differentiation process. In this study, measurement of these morphological features made possible to establish quantitative markers that will allow establishing more precisely the different stages of neuronal differentiation.

Recibido: 30-10-09. Aceptado: 03-06-10.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales atractivos de los cultivos primarios de células nerviosas es la posibilidad de acceder de manera inmediata a neuronas vivas para su observación y manipulación. Adicionalmente, los cultivos neuronales de densidades determinadas (baja y mediana densidad) son menos complejos que los tejidos de los cuales provienen, convirtiéndolos en la preparación ideal para investigar aspectos importantes de la biología neuronal (1-5). Las líneas celulares

clonales se han usado como modelos para el estudio de la fisiología neuronal, sin embargo, éstas células deben ser estimuladas con factores neurotróficos y cultivadas en las condiciones adecuadas para simular el comportamiento fisiológico de células nerviosas como la generación de procesos (dendritas y axones) y la formación de conexiones neuronales (6), lo que presenta limitaciones al establecer una comparación directa entre el comportamiento de las células nerviosas *in vivo* y estos modelos. Por otra parte, aspectos de la biología neuronal como son la

diferenciación, tráfico y localización subcelular de proteínas, así como ensayos con drogas de potencial terapéutico son estudiados mayormente en cultivos primarios de células del sistema nervioso, razones que justifican el amplio uso de estos cultivos.

En principio, los cultivos neuronales primarios pueden prepararse de cualquier región del cerebro, sin embargo, el hipocampo representa una de las regiones del cerebro más utilizada debido a que su población neuronal es bastante homogénea. La población neuronal del hipocampo está representada por las neuronas piramidales las cuales a su vez representan de 85% a 90% de la población total de neuronas del SNC (7, 8). Adicionalmente, las neuronas piramidales en cultivo expresan muchas de las características fenotípicas propias de estas células, como son el desarrollo de un axón simple, una larga dendrita apical y numerosas dendritas basales más cortas (8, 9); en general estas células mantienen su identidad en cultivos *in vitro*, lo que hace a estos cultivos excelentes modelos para el estudio del funcionamiento del SNC (9-12).

Investigaciones sobre el desarrollo de células individuales del tejido nervioso requieren del estudio de la distribución diferencial de marcadores específicos. Las condiciones de cultivo *in vitro* permiten el crecimiento de células a baja o mediana densidad, para facilitar la observación de neuronas individuales (7, 9, 13, 14). El estudio de estas células en cultivos homogéneos y de densidad controlada, hace posible monitorear los cambios experimentados durante el período de cultivo.

La interpretación del funcionamiento del sistema nervioso tanto en condiciones normales como patológicas es un tema controversial y de gran interés científico. Sin embargo, la gran diversidad y complejidad de las estructuras y los procesos involucrados en su funcionamiento han hecho difícil un total entendimiento de su fisiología. No

obstante, gracias a la implementación de los cultivos celulares se ha facilitado enormemente el estudio de las estructuras, ofreciendo una mayor comprensión de este complejo sistema (2-5, 15-19).

El desarrollo de todo tejido involucra procesos de proliferación, migración, adhesión, diferenciación y sobrevivencia, eventos delimitados espacial y temporalmente durante el desarrollo *in vivo*. Dichos procesos, sumados a la regeneración del tejido nervioso se encuentran influenciados por la acción conjunta de factores neurotróficos que activan cascadas de señalización celular que conducen a la proliferación y eventual diferenciación del tejido (1, 20-22). El efecto de los factores neurotróficos involucrados en su desarrollo y en el proceso de diferenciación ha sido y continúa siendo estudiado en cultivos homogéneos de distintos tipos neuronales. Estos cultivos no sólo están siendo empleados para el estudio de la regulación de procesos celulares que conllevan a la degeneración del tejido nervioso, sino también para el desarrollo de terapias de trasplante para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (19, 23, 24).

En el presente trabajo se planteó el establecimiento de cultivos primarios de células del hipocampo de ratas, para el estudio de la morfología de las neuronas, así como los cambios experimentados por éstas, a medida que avanzaba el proceso de maduración neuronal. Específicamente, se estudió la proporción de tipos celulares originados (neuronas y glia), el desarrollo de las neuritas (dendritas y axones), la acumulación de vesículas sinápticas y los cambios experimentados por los conos de crecimiento, durante el desarrollo de dichos cultivos. Otros autores han analizado algunas de estas características de manera independiente. Sin embargo, en el presente estudio se presenta una descripción más integral del desarrollo neuronal ya que se estudian y cuantifican las características morfológicas y la expre-

sión de marcadores celulares, lo que permite una mejor descripción del desarrollo anatómico funcional de estas neuronas.

En el presente trabajo se estudian y cuantifican, de manera conjunta, parte de las características morfológicas y su comportamiento durante el desarrollo *in vitro*, permitiendo establecer una relación entre el tiempo de aparición de estos marcadores, sus parámetros morfométricos y la maduración de la neurona; representando así una buena descripción integral del desarrollo anatómico-funcional neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la preparación de los cultivos neuronales se utilizaron embriones de rata Sprague-Dawley de 19 días (E19). Los embriones se removieron por cesárea después de sacrificar a la madre por exposición a CO₂ y decapitación. Los animales se mantuvieron y sacrificaron según regulaciones del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Se tomaron precauciones para reducir el número de animales así como su sufrimiento.

Disociación, cultivo y mantenimiento de las células del hipocampo

Todos los reactivos empleados en esta sección, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron de Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY). Los cultivos neuronales de hipocampo se prepararon a partir de embriones de rata E19 según protocolos previamente descritos (26, 27).

En general, se extrajeron los hipocampos y se transfirieron al medio de disección [Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) suplementada con 10 mM HEPES pH 7,4 y una mezcla de Penicilina-Streptomina (100 U/mL-100 µg/mL)]. Después de 3 lavados con el medio de disección, los hipocampos se transfirieron a una solución de Tripsina al 0,25% en HBSS y se incubaron

a 37°C durante 15 minutos. Se lavaron nuevamente y se disociaron mediante trituración mecánica en 2 mL del medio de cultivo (medio Neurobasal™, suplementado con B27, 0,5 mM Glutamina, 0,0125 mM Glutamato y Penicilina-Streptomina). Las células resultantes se resuspendieron a una concentración final de 5×10^4 cel/mL en medio de cultivo y se colocaron en placas de 24 pozos (0,5 mL/pozo); que contenían cubreobjetos de vidrios previamente tratados con una mezcla de Poli-D-Lisina (0,0375 mg/mL, Fisher CB40210) y lamina (0,0021 mg/mL, Fisher CB40232). Las células se mantuvieron en incubadora (37°C, CO₂ 5%, el resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire) hasta su uso. Cada 3 días se reemplazó la mitad del volumen del medio de cultivo, por medio fresco sin glutamato.

Caracterización morfológica por inmunofluorescencia

Para el marcaje de los conos de crecimiento se realizó la fijación del cultivo mediante un protocolo de fijación para citoesqueleto, para ello las células se incubaron en una solución de fijación-permeabilización (formaldehído al 3,7%, glutaraldehído al 0,075%, Tritón X-100 al 1%, en PBS), durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron en la solución de fijación (formaldehído al 3,7%, glutaraldehído al 0,075%, en PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron en la solución de permeabilización (Tritón X-100 al 1%, en PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con NaBH₄ al 1% en PBS, durante 5 minutos. Para el marcaje de neuronas, glías, dendritas, axones y vesículas sinápticas las células se fijaron con PFA-PBS al 4%, por 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron varios lavados con PBS en un tiempo total de 20

minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,25% en PBS, por 10 minutos a temperatura ambiente. A partir de este momento los tratamientos fueron similares para los distintos tipos de marcaje. Se procedió al bloqueo con suero normal de cabra al 10% (NGS, Sigma, Saint Louis, MO) en PBS y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Seguidamente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en NGS al 2% en PBS y se dejaron a 4°C durante toda la noche. Después de varios lavados con PBS, se agregaron los anticuerpos secundarios en NGS (2%) en PBS, por 1h a temperatura ambiente, en caso de usar pruebas fluorescentes estas se incluyeron junto con el anticuerpo secundario. Después de lavar con PBS se montaron en el medio para fluorescencia Mowiol-Dabco [(glicerol al 25%, Mowiol al 10% (Calbiochem, San Diego, CA) 6 mL de H₂O destilada, 0,2 M Tris, pH 6,8; DABCO al 2,5% (Sigma)].

Anticuerpos y pruebas fluorescentes no inmunológicas

Para la cuantificación de neuronas y células gliales se realizaron experimentos de triple marcaje, para ello se marcaron los núcleos celulares con la prueba fluorescente DAPI (1:10000, Molecular Probes-Invitrogen, Eugene, OR), las neuronas con MAP2 (1:5000, anticuerpo policlonal preparado en conejo, Millipore, Billerica, MA) y células gliales con GFAP (1:1000, anticuerpo monoclonal preparado en ratón, Sigma). El desarrollo de las dendritas y la determinación de su longitud se realizaron mediante el marcaje con MAP2 (1:5000, anticuerpo policlonal preparado en conejo, Millipore). El desarrollo de los axones se analizó con el anticuerpo SMI35 (1:5000, anticuerpo monoclonal preparado en ratón, Covance, Princeton, NJ). Para determinar la distribución de las vesículas sinápticas sobre las dendritas y su densidad en áreas de estos procesos (usados como referenciales) se realizó do-

ble marcaje con sinaptofisina (1:500, anticuerpo monoclonal preparado en ratón, Sigma) y MAP2 (1:5000). Para el estudio de los conos de crecimiento se realizó el doble marcaje con MAP2 (1:5000) y la prueba fluorescente Faloidina-Rodamina (1:40, Molecular Probes-Invitrogen), la cual marca los filamentos de actina enriquecidos en los conos de crecimiento. Los anticuerpos secundarios fueron anti-ratón o anti-conejo Alexa 488 (1:200, Molecular Probes-Invitrogen) y anti-ratón o anti-conejo Alexa 594 (1:600, Molecular Probes-Invitrogen).

Adquisición de imágenes

Las células se observaron periódicamente para seguir el desarrollo y asegurar la homogeneidad de los cultivos. Para ello se obtuvieron imágenes en un microscopio invertido Axiovert 100 (Zeiss) equipado para contraste de interferencia diferencial (DIC) e inmunofluorescencia. Los objetivos fueron: Plan-Neofluar 10 X A.N 0,3; Plan Achromat 32X A.N 0,4 y Plan-Apochromat 100X A.N 1,4 (para inmersión en aceite). Las células se fotografiaron con una cámara digital (Nikon, Cool pix 900) adaptada al microscopio, este microscopio se utilizó para los primeros experimentos de doble marcaje fluorescente usando los filtros XF25 Vivid Classic (excitación 494 nm, emisión 518 nm) y 488015 (excitación BP 546/12 nm, emisión LP 590 nm). Adicionalmente, para los experimentos de triple marcaje fluorescente se usó el microscopio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss-Germany), equipado con los filtros 488049 (excitación G365 nm, emisión 445/50 nm), 489038 (excitación 470/40 nm emisión 525/50) y el 488020 (excitación 546/12 nm emisión 575-640). Las células se fotografiaron con una cámara digital (Nikon modelo Cool pix 5400) adaptada al microscopio, utilizando los objetivos Plan Neofluar 40X A.N 0,6 y Plan Apochromat 100X A.N 1,4 (para inmersión en aceite). Las fotogra-

fías obtenidas fueron analizadas con la ayuda del Software ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos).

Cuantificación

El proceso de extracción y cultivo de las neuronas del hipocampo se realizó a partir de 4 disecciones independientes, con réplicas por cada período y prueba. Cada condición se fotografió en diez campos aleatorios para realizar los análisis correspondientes. La proporción de los distintos tipos celulares se determinó mediante la cuantificación de las imágenes provenientes del triple marcaje de los núcleos celulares marcados con DAPI, células con marcaje positivo para MAP2 y células con marcaje positivo para GFAP. Para ello se utilizó la superposición de imágenes obtenidas a un aumento de 40X.

La longitud promedio de dendritas por célula se obtuvo mediante la división de la longitud total de estos procesos marcados con MAP2 entre el total de neuronas contadas. El mismo criterio se utilizó para determinar la longitud de los procesos axonales, la cual sólo se pudo realizar en los estadios iniciales del cultivo. Para ambos casos, se utilizó una correlación de $\mu\text{m}/\text{píxel}$ en el programa ImageJ a partir de una escala preestablecida. Adicionalmente se determinó el número promedio de dendritas por célula, para lo cual se contó el número total de dendritas y se dividió por el número total de neuronas analizadas.

Para la determinación de la densidad de vesículas sinápticas sobre las dendritas y con la ayuda del doble marcaje con los anticuerpos Sinaptofisina y MAP2, se cuantificó la cantidad de vesículas presentes en 10 áreas de $5 \mu\text{m}^2$ de procesos dendríticos. Estas áreas fueron escogidas de manera aleatoria, por cada campo fotografiado y se utilizó la escala preestablecida mediante una correlación de $\mu\text{m}/\text{píxel}$ en el programa ImageJ.

Por último, para estudiar la morfología de los conos de crecimiento, mediante la determinación de la proporción de conos abiertos y cerrados, se realizó un doble marcaje con Anti-MAP2 para los procesos neuronales y el trazador no inmunológico Faloidina-Rodamina.

Todas las cuantificaciones se realizaron de manera independiente por cada marcaje, para cada disección y período de tiempo, los resultados mostrados representan el promedio con su error estándar ($X \pm \text{SEM}$). La cuantificación se realizó a partir de cuatro experimentos independientes, con dos réplicas cada uno.

RESULTADOS

Establecimiento de cultivos primarios y estudio del desarrollo de la morfología neuronal *in vitro*

A partir del extracto celular de neuronas del hipocampo de los embriones se logró obtener un cultivo celular homogéneo, de mediana densidad, en donde se pueden observar células de manera independiente. Como se puede observar en las micrografías obtenidas por DIC (Fig. 1), las células en cultivo muestran un crecimiento progresivo de las neuritas, así como también un aumento en la complejidad de la red neuronal. Sin embargo, en todos los períodos se pueden observar células individuales, lo que garantiza la precisión de las observaciones con el marcaje inmunofluorescente. Las neuronas se mantuvieron en buen estado hasta 21 días en cultivo, posterior a este tiempo se comenzó a observar un deterioro del cuerpo celular y la fragmentación de los procesos, razón por la cual no se emplearon cultivos posteriores a este periodo.

Tipos celulares presentes en los cultivos

La extracción del hipocampo y la disociación de las células de manera mecánica no permiten seleccionar el tipo celular a

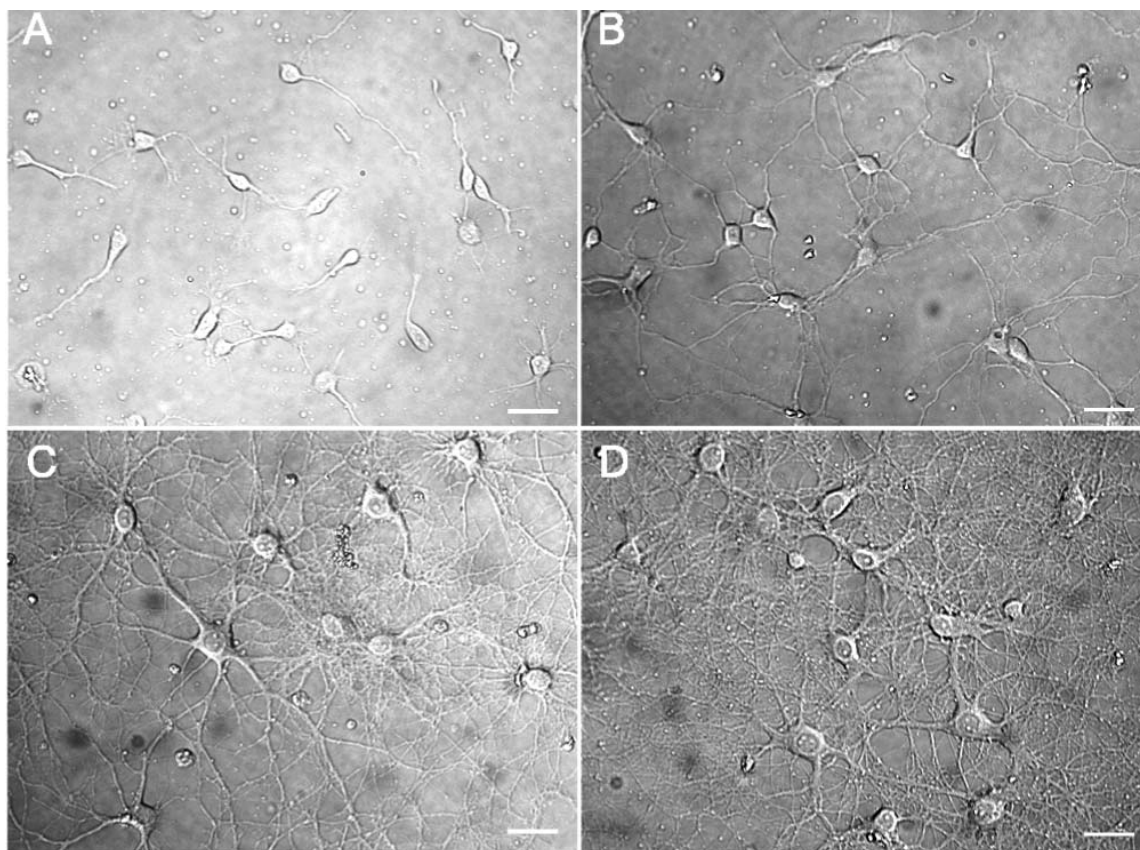


Fig. 1. Imágenes representativas del cultivo primario de neuronas del hipocampo obtenidas por contraste de interferencia diferencial. A) 24 horas. B) 72 horas. C) 15 días. D) 21 días. Escala = 30 μm .

cultivar. Por tal motivo, se utilizaron condiciones de cultivo, sustrato y un medio de cultivo, los cuales favorecen el crecimiento selectivo de neuronas (26, 27). En cuanto a la proporción de los diferentes tipos celulares se observó una tendencia hacia el aumento del porcentaje de neuronas el cual osciló entre $46,9 \pm 4,40\%$ y $68,51 \pm 5,81\%$; mientras que, el porcentaje de células positivas para GFAP experimentó variaciones entre $11,83 \pm 7,51\%$ y $26,93 \pm 10,25\%$. La proporción de células positivas para MAP2 experimentó el pico más alto a las 24 horas, con un leve decrecimiento a las 48 horas, a partir del día 3 la proporción de neuronas se recuperó ($57,66 \pm 11,23\%$), estabilizándose a partir del día 7, sin embargo es importante señalar que a pesar que se observó que estas variaciones no fueron lineales es-

tas no son significativas, lo que se concluye luego de la aplicación de un t-test entre ambos estadios, con el cual se obtuvo un p-valor igual a 0,3118 ($P > 0,05$). Para las células positivas para GFAP, a excepción del día 3 donde se observa el pico más alto ($26,93 \pm 10,25\%$), la proporción de células gliales fue bastante estable (Fig. 2). Es importante señalar que los porcentajes de células positivas para MAP2 y GFAP no suman el 100%, quedando una población celular entre 17,47 y 37,73% que no fue marcada por estos anticuerpos.

Longitud y número de los procesos neuronales por célula

Para el estudio de los procesos neuronales (dendritas y axones), se determinó el número promedio de dendritas por célula y

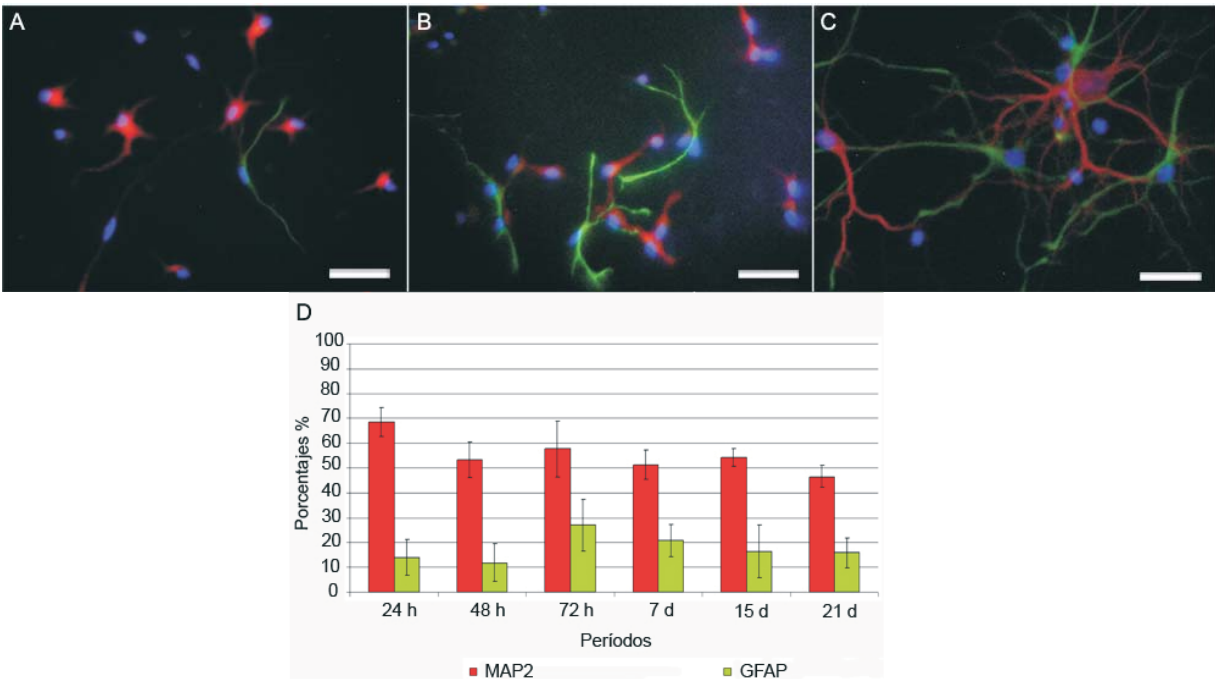


Fig. 2. Imágenes representativas de experimentos de triple marcaje con los anticuerpos MAP2, GFAP y la prueba fluorescente DAPI. A) 48 horas. B) 72 horas. C) 21 días. D) Cuantificación de de células neuronales (MAP2+) y gliales (GFAP+). Las barras representan el porcentaje con el error estándar de los dos tipos celulares. Los porcentajes se obtuvieron a partir de cuatro experimentos independientes, con dos réplicas cada uno. Escala = 50 μ m.

la longitud de los axones y las dendritas; para ello se realizó un doble marcaje inmunológico utilizando los anticuerpos MAP2 (dendritas) y SMI35 (axones). En los marcajes realizados en cultivos de 24-48 horas en la mayoría de las neuronas se observó que uno de los procesos presentaba una doble expresión de los marcadores axonales (verde) y dendríticos (rojo) (cabezas de flecha, Fig. 3A-ab). A las 72 horas, se comenzó a observar de manera más marcada el marcador axonal mientras que comenzó a disminuir la expresión del marcador dendrítico y a los 7 días el marcaje de los axones fue completamente distinto del dendrítico. Paralelamente, se midió la longitud de las dendritas y se observó un aumento de esta a medida que se incrementaba el tiempo de cultivo; los valores de la longitud de dendritas variaron de $93,90 \pm 5,01 \mu\text{m}$ (24 h) a $499,32 \pm 35,27 \mu\text{m}$ (21 d) por célula, ob-

servándose el mayor valor a los 15 días ($575,57 \pm 72,91 \%$) (Fig. 3B). Por su parte, la cantidad de dendritas fluctuó de 3 a 6 dendritas por célula a lo largo del período de cultivo. Con respecto al desarrollo de los axones la longitud de los mismos sólo se pudo determinar durante los períodos iniciales del cultivo (24-72 h). Esta longitud mostró también un aumento de $30 \mu\text{m}$ (24 h) a $300 \mu\text{m}$ (72 h) por célula. En los cultivos de 7 a 21 días se imposibilitó la medición precisa de los axones debido al incremento de la complejidad de la red axonal en estas etapas del desarrollo *in vitro*.

Densidad de vesículas sinápticas

La determinación de la densidad de vesículas sinápticas sobre los procesos dendríticos, fue monitoreada a través del desarrollo de los cultivos. Se observó una tendencia homogénea donde se evidencia un aumento

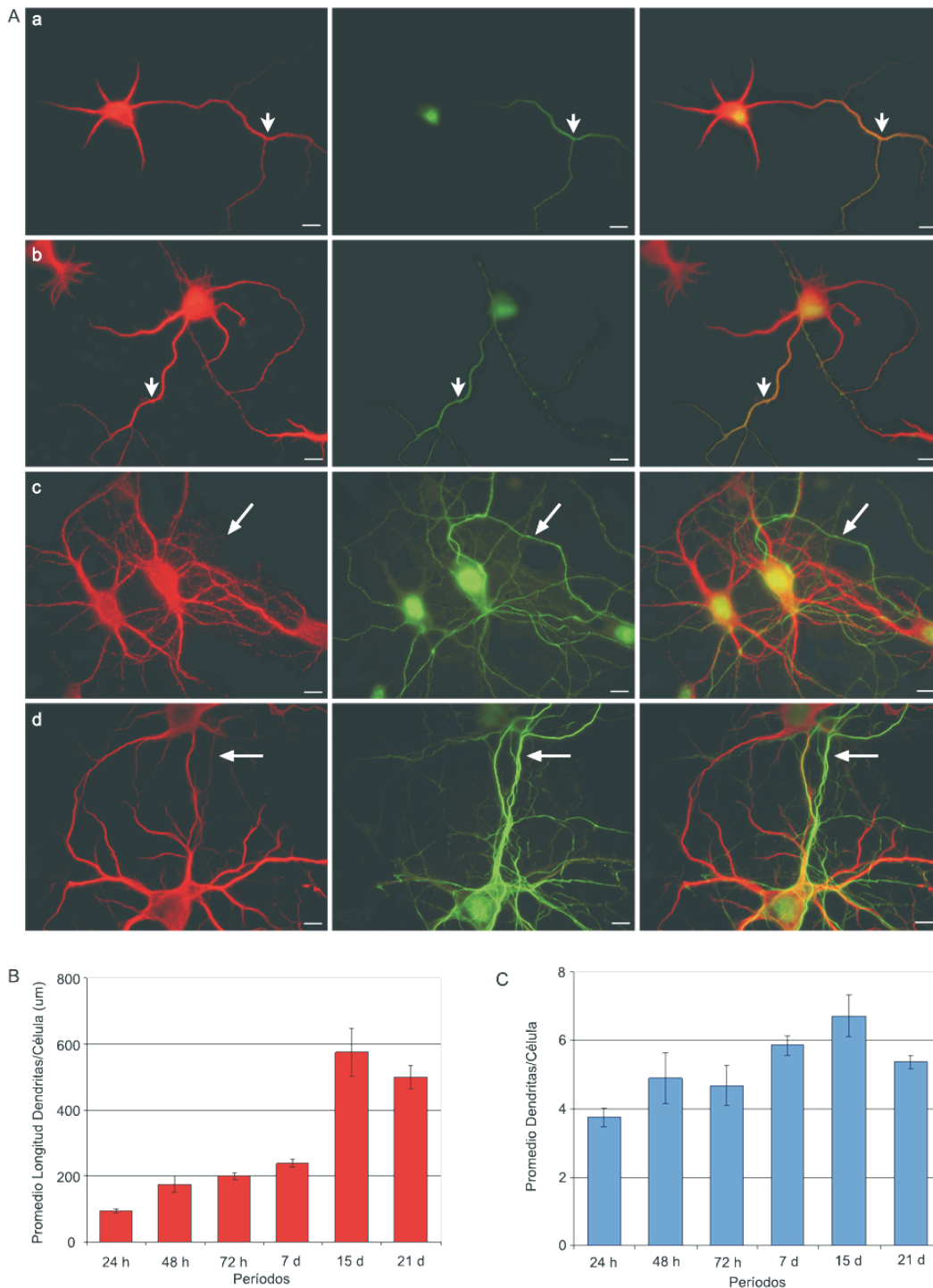


Fig. 3. A) Imágenes representativas del doble marcaje con MAP2 (rojo) y SMI35 (verde). Se muestra la pre-polarización o ambigüedad en la definición de axones y dendritas (cabezas de flecha) y la definición de la polarización o definición de axones (Flechas). a) 48 horas b) 72 horas c) 7 días d) 21 días. B) Longitud promedio de dendritas por célula. C) Número promedio de dendritas por célula. La cuantificación se realizó a partir de cuatro experimentos independientes, con dos réplicas cada uno. Escala = 10 µm.

gradual de las vesículas sinápticas, a medida que transcurría el tiempo de cultivo (Fig. 4A). La cuantificación de la densidad de vesículas entre 24 y 48 horas no llegó a superar la unidad, esto se debe a que en estos períodos pocas veces no se pudo observar vesícula alguna. A partir de los 3 días, la densidad de vesículas en el área mencionada aumentó de 2 a 4 vesículas por $5 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4B).

Cambios en la morfología de los conos de crecimiento durante el cultivo

Se realizó la observación de la morfología de los conos de crecimiento durante el tiempo de cultivo (1-21 días) para determinar si existía relación entre los cambios morfológicos de dichas estructuras, con la maduración del cultivo.

Como característica morfológica considerada en esta determinación fue el esta-

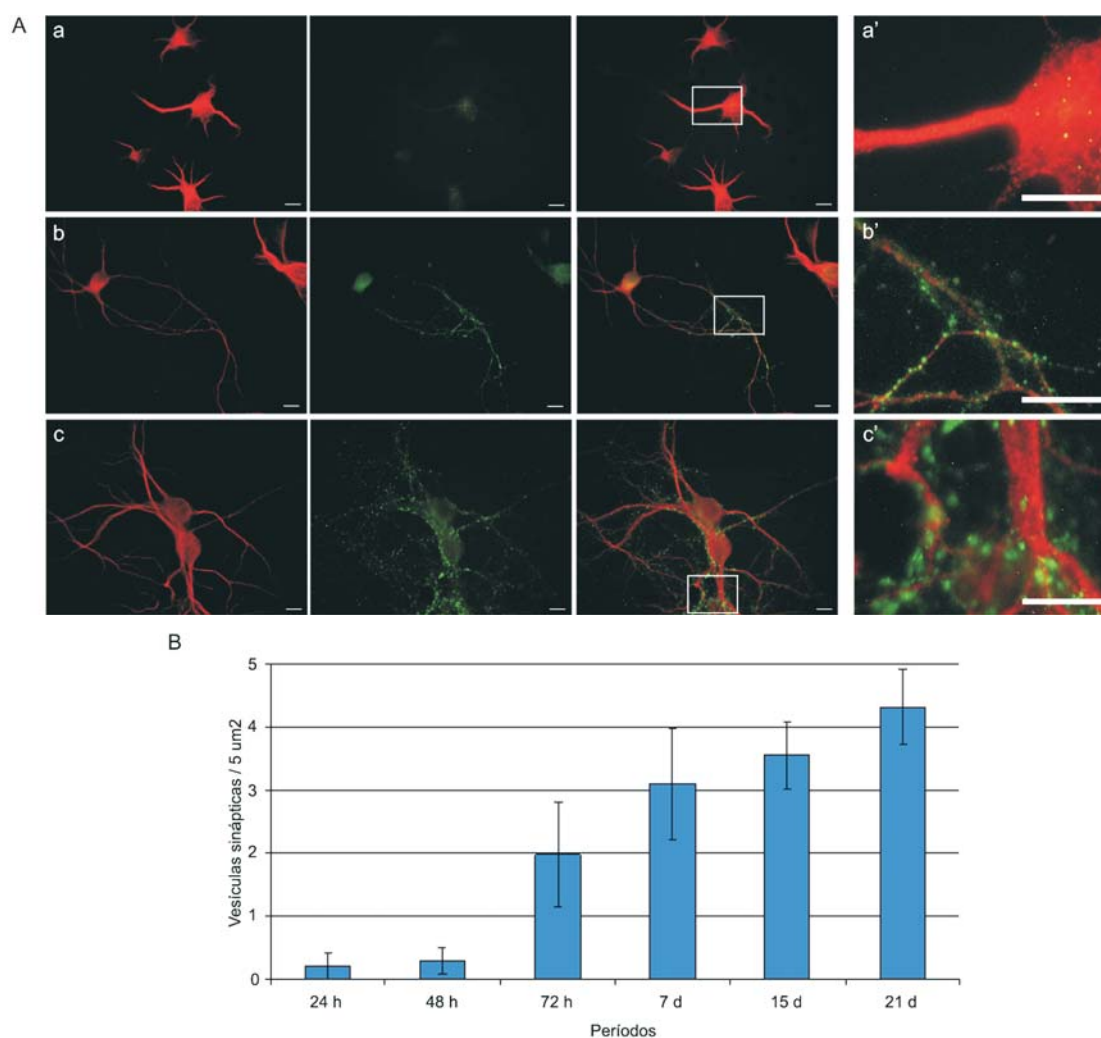


Fig. 4. Fotografías del doble marcaje MAP2 (rojo)-Sinaptofisina (verde) para medir la cantidad de vesículas sinápticas presentes en $5 \mu\text{m}^2$ de procesos dendríticos. Gráfica de la cantidad de vesículas sinápticas presentes en $5 \mu\text{m}^2$. A) Doble marcaje del cultivo, a) 24 horas a') aumento de la zona marcada, b) 72 horas b') aumento de la zona marcada, c) 15 días c') Aumento de la zona marcada. B) Gráfica la cantidad de vesículas sinápticas presentes en $5 \mu\text{m}^2$. La cuantificación se realizó a partir de cuatro experimentos independientes, con dos réplicas cada uno. Escala = $10 \mu\text{m}$.

do de los conos de crecimiento (abiertos y cerrados). La proporción de los conos de crecimiento cerrados disminuyó de manera progresiva a medida que avanzaba el tiempo de cultivo, esta osciló entre $79,98 \pm 4,64$ (24 horas) y $23,78 \pm 1,07$ (21 días). Por otra parte, la proporción de conos de crecimiento abiertos aumentó considerablemen-

te en el mismo tiempo de cultivo, observándose valores entre $20,03 \pm 4,64$ (24 horas) y $76,23 \pm 1,07$ (21 días) (Fig. 5).

DISCUSIÓN

En la presente investigación se estudiaron las principales características morfo-

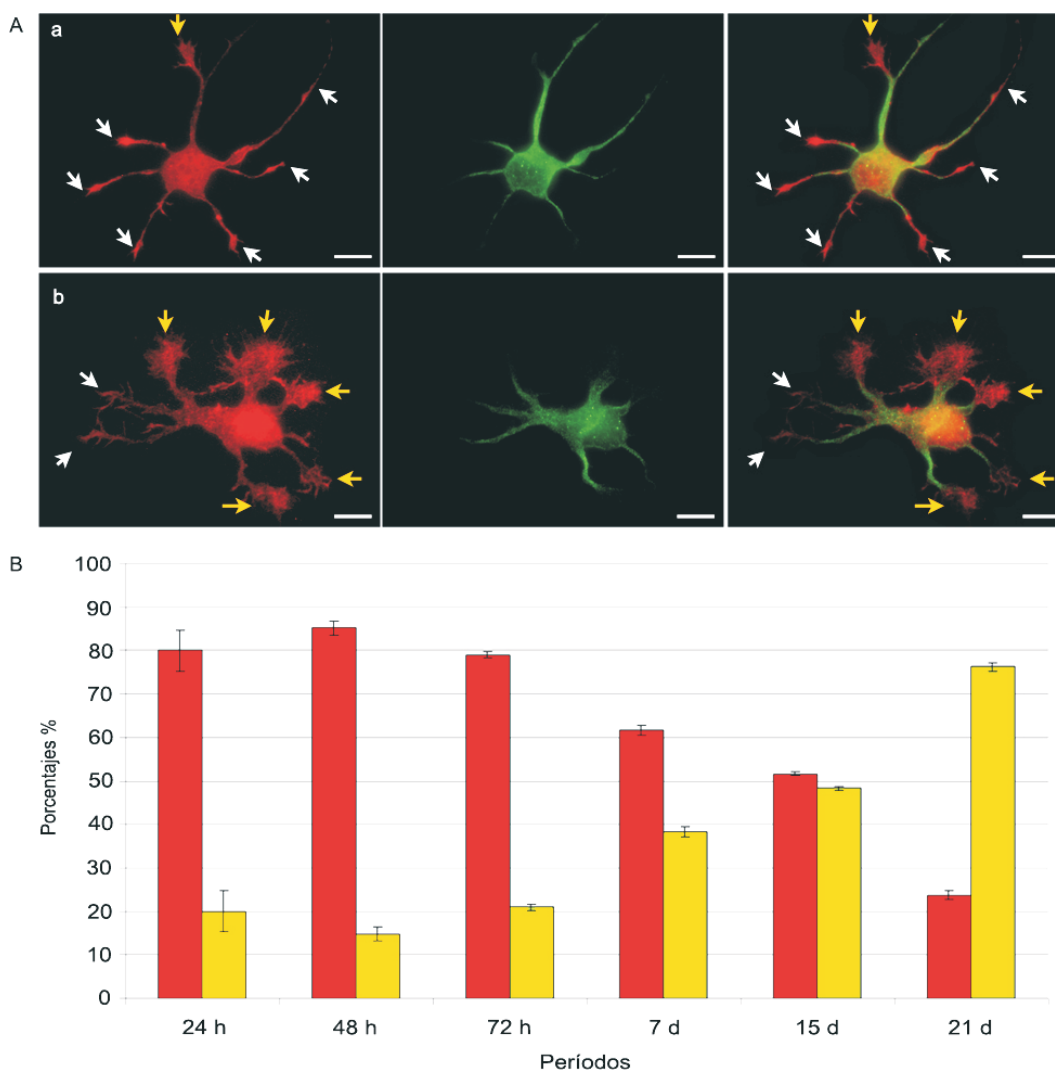


Fig. 5. Fotografías del doble marcaje MAP2 (verde)-Faloidina-Rodamina (rojo) para observar morfología diferencial de los conos de crecimiento según la edad del cultivo. Se observa el cambio en las proporciones de conos de crecimiento abiertos (Flechas amarillas) y cerrados (Flechas blancas). A) Doble marcaje del cultivo, a) 24 horas, b) 15 días. B) Gráfica mostrando el porcentaje de conos de crecimiento abiertos y cerrados en los diferentes estadios temporales. Las barras rojas representan la proporción de conos de crecimiento cerrados y las amarillas, la proporción de conos de crecimiento abiertos. La cuantificación se realizó a partir de cuatro experimentos independientes, con dos réplicas cada uno. Escala = 10 μ m.

lógicas del desarrollo neuronal, empleando neuronas del hipocampo cultivadas a mediana densidad. Este estudio contempló, además del estudio cualitativo, un análisis cuantitativo de dichas características cuyos resultados podrían usarse como referencia morfométrica del proceso de maduración neuronal *in vitro*. Para relacionar los cambios morfométricos con la maduración funcional del cultivo, se realizaron las observaciones correspondientes mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Estudios similares que muestran aspectos importantes del desarrollo neuronal, han sido descritos previamente (9, 25, 26), sin embargo aquí proveemos un análisis más completo y cuantitativo de las principales variaciones de la morfología neuronal.

Para establecer modelos de crecimiento y funcionamiento celular *in vitro* que tengan relevancia fisiológica deben incorporarse al sistema de cultivo los componentes del ambiente *in vivo*; estos comprenden principalmente el sustrato y componentes de los medios de cultivo (vitaminas, factores de crecimiento, etc.) (29). El medio de cultivo Neurobasal™, libre de suero y suplementado con B27 (MNB27), fue uno de los factores determinante para la selectividad del cultivo, tanto en nuestro sistema como en el de otros (9, 25). En nuestro estudio, las neuronas desarrollaron la morfología característica con extensión y ramificaciones de neuritas, establecimiento de las sinapsis y aumento de la complejidad de las redes neuronales. Este desarrollo ocurre de manera adecuada gracias, en gran parte, a los sustratos empleados. Con respecto a esto último, podemos mencionar que la glicoproteína laminina favorece la adhesión, diferenciación, la sobrevivencia y el desarrollo de las neuritas (30), mientras que la poli-D-lisina, además de aumentar la adhesión celular a diferentes superficies (plásticas y de vidrio), favorece la absorción de

proteínas presentes en la matriz extracelular (29).

En este tipo de cultivos, es de principal interés obtener neuronas de manera homogénea y mayoritaria, para la preservación de las principales características funcionales. En los cultivos establecidos en este estudio, se observó en general, una mayor proporción de neuronas en los diferentes períodos de tiempo. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente de cultivos primarios de células del hipocampo (25), y esa menor proporción de células gliales fue atribuida al uso de Poli-D-Lisina como sustrato.

Los medios libres de suero son especialmente útiles para el control de concentraciones críticas de factores de crecimiento, hormonas y algunos aminoácidos, necesarios para la selección celular del cultivo (27), dado que la presencia de suero ocasionaría que las neuronas crezcan a concentraciones mayores a 300 células/mm² lo que no permitiría una observación de células individuales, además de una amplia proliferación de células gliales. El Medio Neurobasal™ es un medio comercial para cultivo neuronal, por su parte el MNB27 presenta condiciones que favorecen el desarrollo de células neuronales por encima del desarrollo glial, tales como concentraciones óptimas de algunos aminoácidos, sulfato de zinc, vitamina B12, entre otros, en comparación con otros medios de cultivo como DMEM y DMEM/F12 (27).

Aun cuando las condiciones de nuestros cultivos eran muy similares a las descritas previamente (9, 25), las proporciones de células no neuronales obtenidas en el presente estudio fueron más altas que las reportadas. No obstante, la población neuronal cuantificada por nosotros representó más de la mitad de la población celular total, constituyendo así la mayoría de la población celular (dependiendo del estadio

temporal) lo que permitió realizar las observaciones planteadas.

Estas diferencias pueden explicarse dado el delicado equilibrio de aminoácidos, factores de crecimiento y otras moléculas, factores de los cuales dependen estos cultivos, a pesar de haber utilizado los procedimientos, medios y suplementos recomendados, diferencias entre las especies de ratas usadas, reactivos de diferentes casas comerciales o números de lote pudieran explicar las diferencias reportadas en este estudio. Es importante señalar que, similar a estudios previos, estos cultivos se mantuvieron en ausencia de inhibidores mitóticos ya que su inclusión comprometía el buen estado de las neuronas. Además, la presencia de glía en los cultivos puede resultar beneficiosa si se tiene en consideración que las neuronas no están aisladas en el cerebro, las células gliales tienen una función crítica en el establecimiento de la histoarquitectura neuronal (31, 32). Otro aspecto importante de nuestro estudio fue la presencia de una proporción de células (15-38%) las cuales no reaccionaron positivamente a los anticuerpos para GFAP o MAP2. En este sentido, es oportuno mencionar que el anticuerpo para GFAP sólo reconoce a los astrocitos tipo I y II y a las glías radiales más no a las glías del tipo de los oligodendrocitos (33-35). Resultados preliminares de experimentos actualmente en curso parecieran indicar que esa población celular, no identificada en nuestro estudio, está representada por oligodendrocitos y sus precursores (García, 2009, comunicación personal).

Nuestras observaciones con respecto a la polaridad de la neurona, mostraron que durante los primeros dos días de cultivo, ésta estaba comenzando a definirse; en este período observamos ambigüedad en el marcaje de dendritas y axones. A partir del tercer día observamos que el marcaje de MAP2 se hizo exclusivo para el árbol dendrítico mientras que el de SMI35 lo hizo para el

axón, observaciones similares han sido reportadas ampliamente en la literatura (9, 36, 37).

La proteína MAP2, se encuentra exclusivamente asociada al árbol dendrítico de las neuronas más no a los procesos axonales (26, 38-40). El SMI35, por su parte, reconoce neurofilamentos fosforilados presentes sólo en los axones (9, 40, 41). La composición molecular de los microtúbulos dendríticos y axónicos muestra diferencias así como también en sus neurofilamentos, de esta manera es posible diferenciar las estructuras dendríticas y axonales (42, 43). Igualmente, otros autores reportan que la composición molecular del citoesqueleto axonal y dendrítico es similar en los primeros estadios del cultivo (40).

Otro aspecto estudiado fue el crecimiento de las neuritas, a partir de las primeras 24 horas se desarrollaron normalmente (Fig. 3). En la primera semana se observó una longitud para las dendritas, medidas desde el cuerpo celular, superior a las 200 μm , durante la segunda semana la longitud de dichas estructuras se incrementó a valores cercanos a las 600 μm . En este sentido se ha reportado que el crecimiento de las dendritas a partir del cuerpo celular, de manera radial, oscila alrededor de 300 μm en la primera semana de cultivo (9). Para la tercera semana de cultivo (21 días) observamos una tendencia leve a la disminución de la longitud de las dendritas, esto quizás se debe a la pérdida de estabilidad en las moléculas que conforman el citoesqueleto de estas estructuras mostrando un marcaje que evidencia estructuras con menor longitud que el estadio anterior. Este resultado no pareciera implicar una retracción de los procesos neuronales o pérdida de fragmentos, más bien pareciera estar relacionado a una menor afinidad por parte de las proteínas presentes en la neurita hacia el anticuerpo utilizado para su visualización. Una de las razones alegadas a este fenómeno es

el desarrollo de microglías que liberan citoquinas que resultan neurotóxicas lo que conlleva a un menor rendimiento del cultivo neuronal (9).

Además de la polaridad neuronal y del aumento de la longitud de las neuritas, observamos un incremento gradual del número de dendritas por célula con respecto a un único axón (Fig. 3). De la misma manera observamos que tanto las dendritas como el axón de cada célula muestran una ramificación de sus estructuras en pro de la formación de complejas redes sinápticas, resultados similares han sido ampliamente reportados en la literatura (9, 41, 44).

Otro importante aspecto estudiado para medir la maduración neuronal, fue el seguimiento de la aparición de las vesículas sinápticas, en vista de que el cambio en la densidad de estas vesículas y su distribución sobre las estructuras celulares durante el cultivo agregaría información sobre la madurez funcional de las neuronas. Al inicio del cultivo (1-2 días) la densidad de vesículas (Número de vesículas/ $5\mu\text{m}^2$) fue menor a 1 y cuando se observaban era principalmente alrededor del soma, mientras que en estadios mayores del cultivo (15-21 días) se observó un incremento gradual en densidad de vesículas en los contactos sinápticos sobre las dendritas. Estas observaciones concuerdan con resultados previos, en los cuales las vesículas sinápticas se encontraban en mayor densidad en los extremos de los axones en contacto con dendritas o somas de otras neuronas a medida que avanzaba el proceso de maduración neuronal (45, 46). La acumulación de las vesículas acá observadas, debería corresponder a las conexiones pre-sinápticas de los axones que han realizado contacto efectivo con dendritas y somas de neuronas postsinápticas, lo cual se ha sido descrito en otros estudios (45, 47).

Teniendo esto en cuenta, la observación de sinaptofisina en los cultivos neuro-

nales permite correlacionar el incremento en la densidad de vesículas con la maduración funcional de estas neuronas, cuya característica distintiva es la acumulación de vesículas sobre los procesos celulares (48, 49). Los axones y las dendritas en cultivo muestran la formación de sinapsis que exhiben una polaridad sináptica normal, los axones son predominantemente pre-sinápticos mientras que las dendritas son post-sinápticas (45, 50). El mecanismo mediante el cual se forman y se mantienen las sinapsis durante el desarrollo de las redes neuronales es de suma importancia en el estudio del funcionamiento de las células del sistema nervioso (45). Según lo anterior se puede concluir que mediante el reconocimiento de ciertas proteínas sinápticas con la utilización de anticuerpos específicos, se puede cuantificar el cambio de densidad de vesículas sinápticas en las células del cultivo, lo que permite inferir el cambio de actividad sináptica durante el desarrollo de éstas células, así como la maduración funcional de la neurona.

Finalmente, se estudiaron los cambios que experimentaron los conos de crecimiento durante el desarrollo *in vitro*. El marcador utilizado para la observación de estas estructuras, Faloidina-Rodamina, pertenece a una familia de marcadores fluorescentes que presentan afinidad con los filamentos de actina presentes en los conos de crecimiento. En este estudio se observó que al principio del cultivo la mayoría de los conos estaban cerrados y a medida que maduraba el cultivo esta situación se revertía con una disminución del porcentaje de conos cerrados y el concomitante aumento en la proporción de conos abiertos. Nuestros resultados concuerdan con publicaciones previas (51-56), en las que reportan que luego de las primeras 24 horas de cultivo se observa, en las células establecidas en el sustrato, el inicio del desarrollo de las neuritas unido a la presencia de conos pequeños y

abundantes, condición que cambia con la maduración del cultivo y el consecuente aumento de sus neuritas, observando entonces mayor cantidad de conos abiertos. El fenómeno de apertura y cierre de los conos de crecimiento podría deberse a una respuesta a los movimientos realizados por estas estructuras para permitir la elongación de las neuritas (51, 52).

De esto último podríamos inferir que los conos cuando están cerrados pudieran experimentar cambios a nivel de la membrana celular para favorecer el crecimiento de las neuritas. A medida que la necesidad de dicho crecimiento aumenta la membrana del cono sería capaz de expandirse para incrementar las superficies de contacto funcional y el movimiento en búsqueda de blancos para las conexiones neuronales, lo cual sería posible sólo con la apertura de los conos.

De lo descrito aquí deriva la gran importancia de estudiar los conos de crecimiento y su morfología, estas estructuras están compuestas por una red de filamentos de F-actina en su zona apical y áreas globulares de G-actina en la base, ambas estructuras presentan polaridad que determinan la orientación del cono (53). En la periferia de los conos existe una organización dinámica de los filamentos de actina resultando en dos estructuras claramente diferenciables denominadas lamelipodia y filopodia, conformando la *región P* (53). La translocación de las moléculas de actina producto de la despolarización y/o desensamblaje de la G-actina resulta en el movimiento característico de los conos de crecimiento llamado flujo retrogrado de la actina, que permite el desplazamiento hacia delante de la neurita o la retracción de la misma (51, 53).

Durante el desarrollo del cultivo neuronal los conos de crecimiento guían el crecimiento de las neuritas hacia el blanco apropiado, adicionalmente éstos son precursores de los terminales sinápticos y de la

neurosecreción, además de producir profundos cambios estructurales para el posterior reconocimiento funcional de estas estructuras (54). Durante estos procesos el cono de crecimiento se convierte en un terminal estable capaz de estimular o inhibir señalización química celular (51). El movimiento de los conos se caracteriza por cambios en la región periférica *región P* y por movimientos en forma de olas retrogradas organizadas, con una tasa de movimiento de 3-6 $\mu\text{m}/\text{min}$ (51). En cuanto a los cambios morfológicos de los conos, producto de los movimientos descritos anteriormente, en pro de la formación de redes neuronales, otros reportan que su morfología responde a señales de atracción y repulsión generadas por las proteínas presentes en la matriz extracelular (54). También se propone que la elongación de las neuritas no sólo depende del alargamiento del citoesqueleto sino también de la inserción de membrana recién sintetizada en el cono (55). Dicha expansión de la membrana está acompañada por la fusión de vesículas sinápticas con la superficie de la membrana plasmática, lo cual contribuye también con la elongación de las neuritas (56).

Para concluir, podríamos mencionar que el presente trabajo representa un avance en la caracterización morfométrica de los cultivos neuronales, puesto que recoge de manera simultánea y cuantitativa los principales aspectos que marcan el proceso de diferenciación neuronal. En este estudio, la medición de estas características morfológicas hizo posible establecer parámetros cuantitativos que ayudarán a identificar de manera más precisa las diferentes etapas del proceso de diferenciación neuronal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Lic. Lisbeth García y al Sr. Jorge Núñez por su colaboración con las técnicas quirúrgicas y la

diseción. También a la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, por su apoyo en la consecución de los fondos para esta investigación.

REFERENCIAS

1. **Avellana-Adalid V, Nait-Oumesmar B, Lachapelle F, Baron-Van Evercooren A.** Expansion of rat oligodendrocyte progenitors into proliferative "oligospheres" that retain differentiation potential. *J Neurosci Res* 1996; 45(5):558-570.
2. **Zhang QL, Boscolo P, Niu PY, Wang F, Shi YT, Zhang L, Wang LP, Wang J, Di Gioacchino M, Conti P, Li QY, Niu Q.** How do rat cortical cells cultured with aluminum die: necrosis or apoptosis? *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21(1): 107-115.
3. **Shaikh S, Nicholson LF.** Advanced glycation end products induce *in vitro* cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res* 2008; 86(9):2071-2082.
4. **Molina-Holgado F, Gaeta A, Francis PT, Williams RJ, Hider RC.** Neuroprotective actions of deferiprone in cultured cortical neurones and SHSY-5Y cells. *J Neurochem* 2008; 105:2466-2476.
5. **Walton RM, Wolfe JH.** *in vitro* growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. *J Neurosci Methods* 2008;169(1):158-167.
6. **Longart M, Garcia L, Castillo C, Martinez JC, Medina R, Forsyth P, Malave C.** Sciatic nerve conditioned medium depleted of pro-NGF modulates sodium currents and neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience* 2009; 159(2):550-558.
7. **Jareb M, Banker G.** Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 1997; 17(23): 8955-8963.
8. **Campana AD, Sanchez F, Gamboa C, Gomez-Villalobos Mde J, De La Cruz F, Zamudio S, Flores G.** Dendritic morphology on neurons from prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice exposed to repeated low dose of malathion. *Synapse* 2008; 62(4):283-290.
9. **Kaech S, Banker G.** Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2406-2415.
10. **Freund TF, Buzsaki G.** Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6(4):347-470.
11. **Barmack NH, Yakhnitsa V.** Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J Neurosci* 2008; 28(5):1140-1152.
12. **Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE.** Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* 2008; 319(5870):1640-1642.
13. **Misonou H, Trimmer JS.** A primary culture system for biochemical analyses of neuronal proteins. *J Neurosci Methods* 2005; 144(2):165-173.
14. **Kato K, Sekino Y, Takahashi H, Yasuda H, Shirao T.** Increase in AMPA receptor-mediated miniature EPSC amplitude after chronic NMDA receptor blockade in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 2007; 418(1):4-8.
15. **Brewer GJ.** Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 1995; 42(5):674-683.
16. **Czesak M, Burns AM, Lenicov FR, Albert PR.** Characterization of rat rostral raphe primary cultures: multiplex quantification of serotonergic markers. *J Neurosci Methods* 2007; 164(1):59-67.
17. **Narayan PJ, Gibbons HM, Mee EW, Faull RL, Dragunow M.** High throughput quantification of cells with complex morphology in mixed cultures. *J Neurosci Methods* 2007; 164(2):339-349.
18. **Jun SB, Hynd MR, Dowell-Mesfin N, Smith KL, Turner JN, Shain W, Kim, SJ.** Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-L-lysine on microelectrode arrays. *J Neurosci Methods* 2007; 160(2):317-326.
19. **Turner PR, Bourne K, Garama D, Carne A, Abraham WC, Tate WP.** Production,

- purification and functional validation of human secreted amyloid precursor proteins for use as neuropharmacological reagents. *J Neurosci Methods* 2007; 164(1):68-74.
20. **Jelsma TN, Aguayo AJ.** Trophic factors. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4(5):717-725.
 21. **Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Vellinga AC, Meerman JH, Fitzsimons CP, de Kloet ER, Vreugdenhil E.** Temporal and functional dynamics of the transcriptome during nerve growth factor-induced differentiation. *J Neurochem* 2008; 105(6):2388-2403.
 22. **Insua MF, Simon MV, Garelli A, de Los Santos B, Rotstein NP, Politi LE.** Trophic factors and neuronal interactions regulate the cell cycle and Pax6 expression in Muller stem cells. *J Neurosci Res* 2008; 86(7):1459-1471.
 23. **Reynolds BA, Weiss S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052):1707-1710.
 24. **Zhang SC, Ge B, Duncan ID.** Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(7):4089-4094.
 25. **Banker GA, Cowan WM.** Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 1977; 126(3):397-342.
 26. **Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A.** Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 2004; 472(2):156-172.
 27. **Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ.** Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 1993; 35(5):567-576.
 28. **LoGiudice L, Sterling P, Matthews G.** Mobility and turnover of vesicles at the synaptic ribbon. *J Neurosci* 2008; 28(12):3150-3158.
 29. **Lochter A, Taylor J, Braunewell KH, Holm J, Schachner M.** Control of neuronal morphology *in vitro*: interplay between adhesive substrate forces and molecular instruction. *J Neurosci Res* 1995; 42(2):145-158.
 30. **Lein PJ, Banker GA, Higgins D.** Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 1992; 69(2):191-197.
 31. **Hatten ME, Liem RK.** Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons *in vitro*. *J Cell Biol* 1981; 90(3):622-630.
 32. **Arroyo EJ, Bermingham JR Jr, Rosenfeld MG, Scherer SS.** Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci* 1998; 18(19):7891-7902.
 33. **Lee YB, Du S, Rhim H, Lee EB, Markelonis GJ, Oh TH.** Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes *in vitro* induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. *Brain Res* 2000; 864(2):220-229.
 34. **Gotz M, Barde YA.** Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 2005; 46(3):369-372.
 35. **Miller FD, Gauthier AS.** Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 2007; 54(3):357-369.
 36. **Arimura N, Kaibuchi K.** Key regulators in neuronal polarity. *Neuron* 2005; 48(6):881-884.
 37. **Jacobson C, Schnapp B, Banker GA.** A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* 2006; 49(6):797-804.
 38. **Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M.** MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 1984; 315(2):314-318.
 39. **De Camilli P, Miller PE, Navone F, Theurkauf WE, Vallee RB.** Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 1984; 11(4):817-846.
 40. **Matus A, Bernhardt R, Bodmer R, Alaimo D.** Microtubule-associated protein 2 and tubulin are differently distributed in the

- dendrites of developing neurons. *Neuroscience* 1986; 17(2):371-389.
41. **Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, Meyn L, Teusch N, Wu X, Brakebusch C, Bamburg JR, Bradke F.** Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 2007; 27(48):13117-13129.
 42. **Bernhardt R, Matus A.** Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 1984; 226(2):203-221.
 43. **Caminos E, Garcia-Pino E, Martinez-Galan JR, Juiz JM.** The potassium channel KCNQ5/Kv7.5 is localized in synaptic endings of auditory brainstem nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 2007; 505(4):363-378.
 44. **Arimura N, Kaibuchi K.** Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(3):194-205.
 45. **Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G.** The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* 1991; 11(6):1617-1626.
 46. **Becher A, Drenkhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G.** The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J Neurosci* 1999; 19(6):1922-1931.
 47. **Rao A, Cha EM, Craig AM.** Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 2000; 20(22):8344-8353.
 48. **Buckby LE, Mummery R, Crompton MR, Beesley PW, Empson RM.** Comparison of neuroplastin and synaptic marker protein expression in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 150(1):1-7.
 49. **Suyama S, Hikima T, Sakagami H, Ishizuka T, Yawo H.** Synaptic vesicle dynamics in the mossy fiber-CA3 presynaptic terminals of mouse hippocampus. *Neurosci Res* 2007; 59(4):481-490.
 50. **Nakayama K, Kiyosue K, Taguchi T.** Diminished neuronal activity increases neuron-neuron connectivity underlying silent synapse formation and the rapid conversion of silent to functional synapses. *J Neurosci* 2005; 25(16):4040-4051.
 51. **Forscher P, Smith SJ.** Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 1988; 107(4):1505-1516.
 52. **Goslin K, Birgbauer E, Banker G, Solomon F.** The role of cytoskeleton in organizing growth cones: a microfilament-associated growth cone component depends upon microtubules for its localization. *J Cell Biol* 1989; 109(4 Pt 1):1621-1631.
 53. **Ishikawa R, Kohama K.** Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *J Pharmacol Sci* 2007; 105(1):6-11.
 54. **Kimura K, Mizoguchi A, Ide C.** Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(4):429-433.
 55. **Gordon-Weeks PR.** Assembly of microtubules in growth cones: the role of microtubule-associated proteins. *The Nerve Growth Cone*. New York: Raven Press, 1992, pp 55-64.
 56. **Pfenninger KH, Laurino L, Peretti D, Wang X, Rosso S, Morfini G, Cáceres A, Quiroga S.** Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 7):1209-1217.