

Estandarización de las condiciones óptimas de cultivos primarios neuronales de hipocampo de ratón

Campos-Bustos E.¹, Frausto-Cárdenas K.P.¹, García-Rivera U. D.¹, Herrera-Guzmán K.², Palomino-Cantero V.¹, Zaisar Munguía G.F.¹, Alba-Betancourt C.³, Basurto-Islas G.⁴

¹Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

²Lic. en Biología Experimental, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

³Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. c.albabetancourt@ugto.mx

⁴Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Universidad de Guanajuato. gustavo.basurto@ugto.mx

Resumen

El hipocampo es una estructura cerebral compleja que se encuentra dentro del lóbulo temporal. Tiene un papel importante en el aprendizaje y la memoria, además de ser una estructura plástica y vulnerable que puede dañarse por una variedad de estímulos. En investigación, se ha utilizado el cultivo de neuronas de hipocampo de murinos como modelo de estudio del sistema nervioso. En este proyecto se identificó y realizó la disección del hipocampo en condiciones de esterilidad, y se estandarizaron las condiciones óptimas de cultivos primarios de neuronas. Debido a la complejidad en la identificación del hipocampo, fue necesario primero aprender su localización en ratones neonatos de 7 días, en los cuales el proceso de mielinización está por completarse. Finalmente, los cultivos primarios fueron exitosos y se lograron mantener por 7 días.

Palabras clave: cultivos neuronales, hipocampo.

Introducción

Los cultivos primarios de células poseen una amplia variedad de ventajas como material de estudio, tanto para aplicaciones directas como para la investigación básica, cubriendo el campo de diagnóstico y científico. Los cultivos de células eucariotas comprenden, por su complejidad, un proceso en condiciones externas a su entorno natural, pero con un ambiente controlado, que permiten el estudio de la fisiología y metabolismo. (Cipro & Groh, 2014; Delenclos et al., 2019; Philippeos et al., 2012; Ravi et al., 2015). Del mismo modo, la habilidad de poder cultivar neuronas ha favorecido el avance en el estudio del sistema nervioso. (Gordon et al., 2013). En principio, pueden realizarse cultivos primarios de neuronas de cualquier región del cerebro o la médula espinal; sin embargo, se prefiere el realizarlos del hipocampo, debido a que la población neuronal es más sencilla. (Kaech & Banker, 2006). Dichos cultivos se han utilizado para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, Huntington, entre otros. Para la comprensión del proceso patogénico de una enfermedad, los modelos celulares han sido de suma importancia, por lo que, determinar condiciones óptimas para éstos, los convierten en herramientas indispensables para la realización eficiente de un estudio relacionado.

Manejo de animales

Para la realización de un cultivo primario de neuronas de hipocampo es importante describir el modelo de estudio. El mantenimiento de los animales de laboratorio es importante ya que es necesario mantener un entorno adecuado para su buen desarrollo. Primero, es necesario considerar el medio ambiente donde se desarrollará, a su vez, este se divide en dos partes: microambiente y macroambiente. Se conoce como microambiente al entorno principal con el que el animal tiene contacto directo como la jaula o el contenedor donde se mantendrá durante su desarrollo. En esta jaula se pueden considerar varios factores como la temperatura, humedad, iluminación, ventilación, entre otros. Por otro lado, el macroambiente es el lugar donde se mantendrá la jaula, ya sea en un cuarto con condiciones ambientales reguladas o al medio ambiente.

Es importante considerar ambos factores, sin embargo, si se genera un cambio notorio en las condiciones microambientales puede afectar metabólica o fisiológicamente al animal resultando en diferentes valores en los resultados obtenidos de la investigación. (Broderson et al., 1976; Schoeb et al., 1982; Vesell et al., 1976)

Según la (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio., 2001), el alimento proporcionado a los animales debe ser de una fórmula nutricional constante y con certificado que contenga especificaciones nutrimentales. El agua suministrada al animal debe ser potable y de libre acceso en todo momento.

En el caso del ratón, su composición nutrimental para que este tenga un buen crecimiento, gestación, lactación y mantenimiento, debe ser como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Composición nutrimental del alimento del ratón

Nutriente/ %	Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas	Vitamina C	Consumo diario de alimento	Consumo diario de agua
	17 – 24	4–11	3 – 6	5 – 7	-	3 – 6 g	3 – 7 ml

Aspectos éticos

El científico que trabaja con animales de laboratorio debe tener respeto por la vida y el sufrimiento al que estos animales pueden ser sometidos debido a la experimentación. Un objetivo primordial será el minimizar el sufrimiento o estrés que el animal pueda sufrir.

El principio de las tres Rs se considera un método práctico para aplicar cuando en una investigación se considera el uso de animales de laboratorio para un fin científico. Este método se publicó en 1959 por (Russell & Burch, 1960).

- Reemplazo, se opta por un método alternativo donde se evite el uso de animales
- Refinamiento, de los métodos comúnmente usados para reducir y/o evitar el mayor sufrimiento de los animales
- Reducción, utilizar estrategias para obtener suficiente información mediante el uso de la menor cantidad de animales sin aumentar el sufrimiento de los animales. (Russell & Burch, 1960)

Es importante tomar en cuenta estos principios, reconocer y adoptar dichas actitudes para el uso de los animales en la experimentación ya que se debe cumplir la condición de respetar la vida, el dolor o el sufrimiento de los animales de laboratorio usados en cada una de las investigaciones, la responsabilidad final con frecuencia recae en el investigador principal que esté realizando el procedimiento científico.

Sacrificio

Se debe considerar un método que no cause sufrimiento alguno al animal. Se pueden considerar el uso de un método químico para la práctica de eutanasia, en este caso existen agentes inhalatorios que son gases anestésicos y no anestésicos; y los agentes no inhalatorios que son tranquilizantes. Un ejemplo de un tranquilizante es la estroquina que causa la muerte de forma muy rápida por asfixia.

Para llevar a cabo la eutanasia por un agente inhalatorio, se necesita de una cámara diseñada especialmente para que el agente se disperse uniformemente y así que el animal se exponga a una alta concentración de este gas, esta cámara se conoce como: cámara de inducción. Algo que se debe tener en cuenta al momento de seleccionar una agente, es que no sean irritantes ya que pueden causar un estrés al animal y por ende mucho sufrimiento.

El agente más utilizado es el Dióxido de Carbono, que al usarlo a concentraciones mayores del 60% actúa tanto agente anestésico produciendo la pérdida de conciencia (Sivula & Suckow, 2017).

En el caso de los roedores pequeños, puede optarse por métodos físicos de eutanasia, para lo cual se requiere que quien los realice tenga amplia experiencia y habilidad, para evitar el mayor sufrimiento posible. Uno de estos métodos físicos es la dislocación cervical, cuyo objetivo consiste en separar la primera vértebra cervical del cráneo, interrumpiendo funciones cerebrales esenciales que resultan en la muerte del animal. (Sivula & Suckow, 2017)

Hipocampo: estructura y funcionalidad

Una de las estructuras más investigadas del cerebro es el hipocampo. Diversos estudios en neurobiología con modelos animales han demostrado que el hipocampo funge un papel importante en la memoria a largo plazo. Varias teorías han entrelazado el papel fundamental de la memoria con un marco espaciotemporal dentro del cual se desarrollan las diversas funciones sensoriales. Un fundamento sólido fue el descubrimiento de células de lugar constitutivas del hipocampo en roedores y, en estudios más detallados, se ha demostrado más aporte a la información sobre la actividad neuronal del hipocampo, tales casos son dirección de movimiento, velocidad de movimiento, identificación olfativa, detección de coincidencia o no coincidencia, entre otros. La conexión de todos estos procesos desarrollados por el hipocampo, el sentido subjetivo del ser humano tanto del tiempo como del espacio son construcciones entrelazadas de la mente. Las funciones relacionadas al hipocampo comprenden un sistema funcional con las demás regiones del cerebro, puesto que no se asignan funciones solamente específicas del hipocampo (Hölscher, 2003; Knierim, 2015; Nadel, 2021).

Visto desde un punto estructural, el hipocampo de los roedores es una estructura continua que cambia su posición dorsal craneal a una ubicación lateroventral en las partes más caudales donde eventualmente alcanza la superficie ventral del cerebro (Allen Institute for Brain Science, 2004). En contraste, el hipocampo humano tiene una posición basal en el telencéfalo, encontrándose en la parte media del lóbulo temporal, siendo este de más difícil acceso (Rodríguez Sáez, 2012). En roedores, es posible encontrar esta estructura más superficialmente con una forma parecida a una banana (Figura 1); su lado convexo apuntando caudalmente, donde el extremo superior está cubierto por las cortezas retroespinal, motora y somatosensorial, y en el extremo inferior, por la corteza temporal. Debido a esta disposición, la apariencia del hipocampo en secciones coronales parece diferente dependiendo de la posición en la que se lleva a cabo el corte (Schröder et al., 2020). A pesar de esta diferencia en la topografía cerebral, a nivel histológico el hipocampo en humanos y ratones es parcialmente similar.

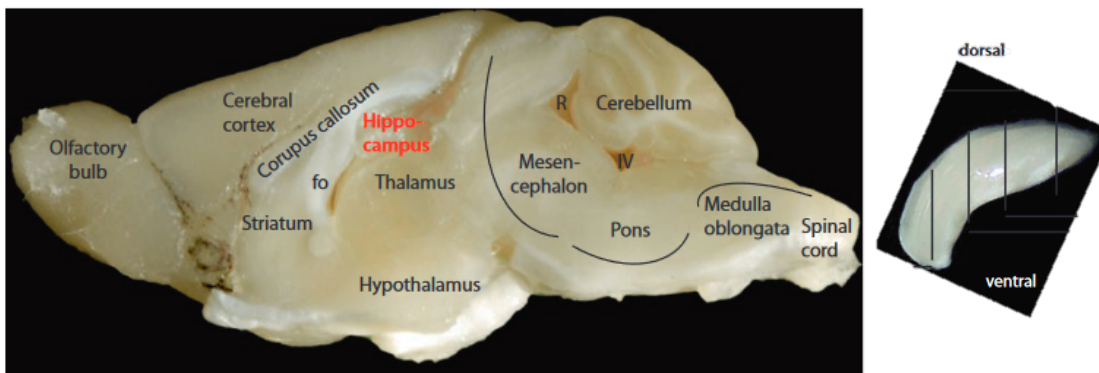


FIGURA 1. Vista de la mitad de un cerebro de ratón C57BL/6 luego de hacerle un corte sagital. Se resalta la ubicación del hipocampo con letras rojas. En la imagen superior izquierda se observa la mitad del hipocampo disectado con forma de una banana. Imagen recuperada de (Schröder et al., 2020)

La clasificación de los componentes del hipocampo varía durante el desarrollo embrionario, pero una vez alcanzada la madurez del individuo, se pueden identificar 4 regiones de acuerdo con Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1982), cada una de las cuales posee subdivisiones de acuerdo con el tipo de células que los conforman:

- **Hipocampo propio.** Está subdividido en regiones interconectadas, las cuales comprenden el cuerno de Amón, el cual a su vez se divide en 3 regiones desde la más distal hasta la más proximal en: CA1, CA2 y CA3 (Magdariaga Hernández et al., 2018), las cuales forman lo que se asemeja al inicio de un espiral. Las 3 regiones están conformadas por células piramidales (Rodríguez Sáez, 2012), las cuales se encuentran dispuestas de manera tal que el tejido es estratificado en 4 capas (Figura 2)(Schröder et al., 2020): 1) statum

oriens (SO) en el que se posicionan los axones de las células piramidales correspondientes a la siguiente región que es el 2) stratum pyramidale (SP). Luego se encuentra el 3) stratum radiatum (SR) formado en su mayoría por dendritas apicales del SP, seguido por 4) stratum lacunosum moleculare (SLM) en el que se ubican las ramificaciones más distales de las dendritas de neuronas piramidales. En el área del CA3, entre SR y SP se localiza un estrato carente de células conformado por dendritas apicales de las neuronas piramidales en el que se forman conexiones con el giro dentado (GD), que es la siguiente región a considerar (Rodríguez Sáez, 2012; Schröder et al., 2020).

- **Giro dentado.** Es una estructura de tres capas (Schröder et al., 2020): 1) stratum granulare (SG) contiene el cuerpo celular de las neuronas (pericario), las cuales extienden sus dendritas formando el 2) stratum moleculare (SM) que también alberga algunas interneuronas y células gliales. Finalmente, la capa más profunda, 3) el hilus (Hi) se caracteriza por estar compuesto de varios tipos celulares, y entre este y el SG se encuentra una capa (mossy fiber layer) compuesta por precursores neuronales con actividad neurogénica en la vida adulta (Figura 2B) (Rodríguez Sáez, 2012; Schröder et al., 2020)

- **Complejo subicular (subiculum).** Es considerado una especie de continuación de la región CA1, por lo que muchos autores no lo consideran como un componente que pueda tomarse en cuenta de manera independiente (Knierim, 2015), sin embargo, ciertos estudios indican que el subículo y la región CA1 difieren en un empaquetamiento mucho más suelto de neuronas piramidales (Schröder et al., 2020). Se tiene poca información para ratones, pero se habla de una estructura de tres capas: 1) una capa molecular (que es continua con SLM y SR de la región CA1) hacia la que se extienden las dendritas apicales de las neuronas piramidales, 2) una capa de células piramidales en el que se disponen dendritas basales y 3) una capa conformada por varios tipos de neuronas (Schröder et al., 2020).

- **Corteza entorrinal.** Se puede subdividir en 2 subcampos: lateral y medial (Schröder et al., 2020), que en conjunto forman 6 capas corticales. Las capas pueden diferenciarse debido al tamaño de las células; en las capas 2 y 3, las células son de tamaño pequeño y extienden sus axones hacia el hipocampo, mientras que las capas 5 y 6 contienen células grandes que se extienden hacia afuera del hipocampo. Las capas restantes son acelulares (Rodríguez Sáez, 2012). Este segmento del hipocampo recibe información sensorial de varias áreas cerebrocorticales y su funcionamiento contribuye a la formación de la memoria y las emociones.

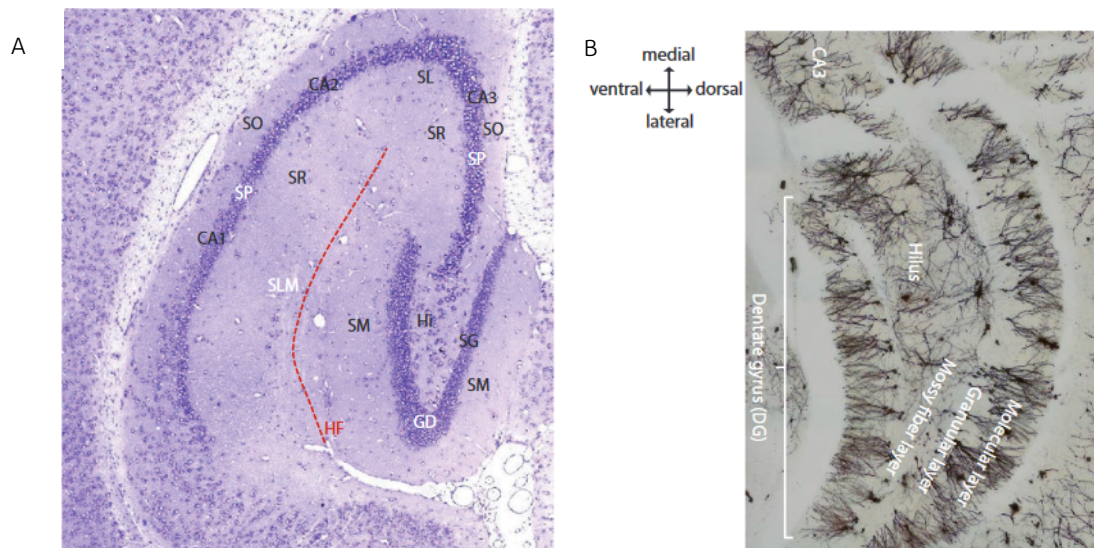


FIGURA 2. A) Corte horizontal del hipocampo del ratón (C57BL/6) que indica las diferentes capas del Cornu Ammonis (CA) y el Gyrus Dentatus (GD). CA: de externo a interno, stratum oriens (SO), stratum pyramidale (SP), stratum radiatum (SR), lacunosum-moleculare (SLM), stratum lucidum (SL), stratum granulare (SG), hilus (H), fisura hipocampal (HF). B) Sección coronal del giro dentado (DG) del ratón (C57BL/6). Por la técnica de impregnación de plata. El árbol dendrítico de las células granulares DG en la capa molecular se vuelve muy visible. Los cuerpos de las células se encuentran en la capa granular, y sus axones se extienden hacia la capa compuesta por precursores neuronales (mossy fiber layer). Imágenes recuperadas de (Schröder et al., 2020).

Materiales y métodos

Sacrificio de animales

Se utilizaron ratones BalbC de 7 a 10 días de nacidos, los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. Brevemente, el cráneo es colocado de manera firme en una superficie plana y el tronco del animal es jalado en dirección opuesta de manera rápida y firme, para poder separar la vértebra cervical del cráneo. (Sivula & Suckow, 2017)

Obtención del cerebro

Una vez sacrificado el ratón, es decapitado y el cráneo expuesto al cortar la piel de la parte superior de la cabeza, la cual se dobla alrededor de la misma para ayudar a sostenerla. Con unas tijeras de disección de punta fina, se realiza un corte en la base del cráneo, justo en la zona de la médula espinal para empezar a cortarlo hacia la derecha y posteriormente, a la izquierda. El cráneo es levantado de la parte posterior, con pinzas se terminan de separar los nervios y pedúnculos que estén conectados al cerebro. Con pinzas de disección de puntas anguladas, el cerebro es recuperado y colocado sobre una caja de Petri que contiene hielo y proceder a la disección.

Disección del hipocampo

En este trabajo realizamos dos métodos de disección haciendo cortes coronales y sagitales. El corte coronal divide al cerebro en dos partes: la posterior y la anterior y se realiza a través de la línea longitudinal. Realizando el corte coronal se puede observar el hipocampo de una manera más prominente y, por lo tanto, se logra una fácil identificación, como puede observarse en la Figura 3.

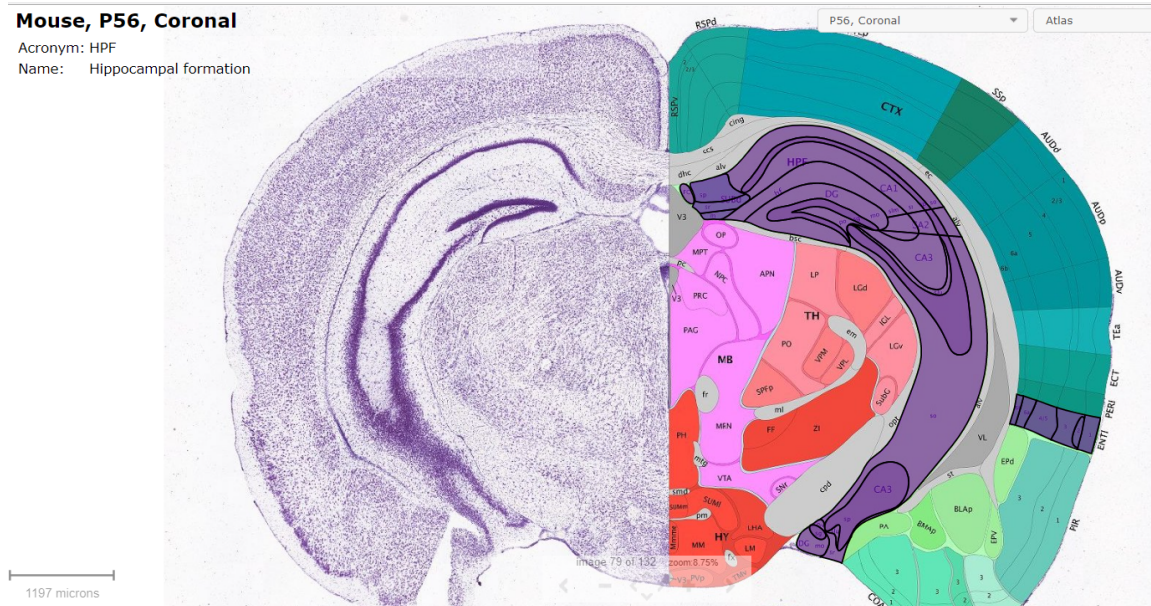


FIGURA 3. Imagen representativa de un corte coronal en donde se observa la localización del hipocampo. A) Tinción de Nissl que identifica cuerpos celulares de neuronas (somas). B) Identificación de diferentes estructuras cerebrales del ratón, en las que se resalta el hipocampo, marcado de color morado. (Allen Institute for Brain Science, 2004)

Por otro lado, el corte sagital divide al cerebro en la parte derecha y la izquierda, estos cortes realizan en líneas paralelas a la línea medial, en la figura 4 se muestra una imagen representativa de su localización.

Mouse, P56, Sagittal

Acronym: HPF
Name: Hippocampal formation

P56, Sagittal Atlas

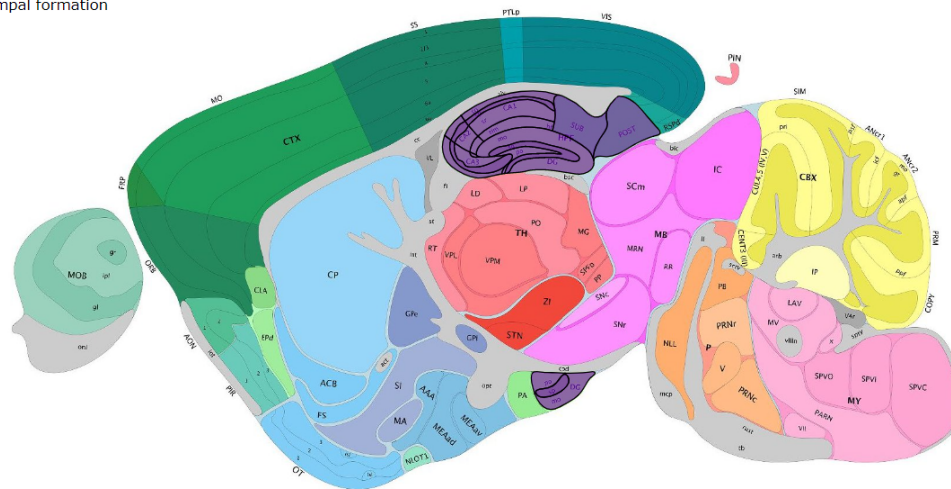


FIGURA 4. Imagen representativa de un corte sagital en donde se observa la localización del hipocampo, ubicado en la parte superior media, marcado de color morado. (Allen Institute for Brain Science, 2004).

Cultivos neuronales

- Los cerebros se removieron, como se ha explicado previamente, y se colocaron en una caja de Petri estéril de 60-mm de diámetro conteniendo solución balanceada de Hank que no contenga calcio ni magnesio (HBSS), la cual fue amortiguada con HEPES (10mM), además de 10pg/ml de sulfato de gentamicina (para evitar contaminación).
- Se separó el hipocampo, y se colocó en una caja de Petri estéril con HBSS y gentamicina para prepararlas para disociarse, cortándolo en pequeños pedazos con ayuda de una navaja estéril.
- Los pedazos de hipocampo fueron transferidos a un tubo cónico estéril de 15ml. El HBSS fue retirado y el hipocampo disectado de manera mecánica.
- Las células disociadas se contaron en un hemocitómetro, descartando el 20% de ese número final para tener en cuenta cualquier muerte celular que pueda ocurrir después del proceso de cultivo.
- Las células se colocaron en cajas de Petri estériles, previamente cubiertas con poli-L-lisina (0.5 ug/mL en buffer de boratos). Se utilizaron cajas de 35mm en las que se cultivaron 4×10^5 células/placa en 3ml de medio de cultivo, así como placas de 15mm en las que se cultivaron 6×10^4 células/placa en 1.5ml de medio.
- Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ durante 7 a 10 días. El medio de cultivo fue renovado cada 72 horas.

Resultados

Se obtuvieron los cerebros de los ratones de 7 a 10 días de nacidos, de los cuales se identificaron los bulbos olfatorios y el cerebelo. Se ubicó el cerebro de tal manera que los bulbos olfatorios quedaron en la parte superior y el cerebelo en la parte inferior (Figura 5A). Con la ayuda de dos bisturís posicionados de manera opuesta, se realizaron cortes coronales para retirar estas estructuras, quedando la zona media del cerebro, en la cual se procedió a realizar la localización y disección del hipocampo (Figura 5B, C). El cuerpo calloso es una estructura mielinizada que sirvió de referencia para la mejor localización del hipocampo (Figura 5C).



FIGURA 5. A) Imagen representativa de un cerebro de ratón, observado desde una vista superior, los bulbos olfatorios están colocados en la parte superior de la imagen, y el cerebelo en la parte inferior. B) Corte coronal de la parte media del cerebro, en el que se señala la localización del hipocampo con la punta de una aguja. C) Localización específica del hipocampo en el corte coronal de cerebro de ratón, tomando como referencia el cuerpo calloso.

En el caso de los cortes sagitales, no fue tan exitosa la localización del hipocampo, como puede observarse en la Figura 6.



FIGURA 6. Imagen representativa de un corte sagital de cerebro de ratón, posterior a la disección del hipocampo.

Con relación a la obtención de los cultivos primarios, se tuvo contaminación por hongos en algunas de las cajas, como puede observarse en la Figura 7.



Figura 7. Presencia de hifas en placa de cultivo primario. Observación con microscopía de luz a 40X.

A los 3 días de observación del cultivo (Figura 8A) se observó la presencia de células escasas y sin procesos. Sin embargo, se obtuvo la presencia de células con algunos procesos a los 7 días (Figura 8B) de cultivo, las cuales fueron observadas con azul de tripano.

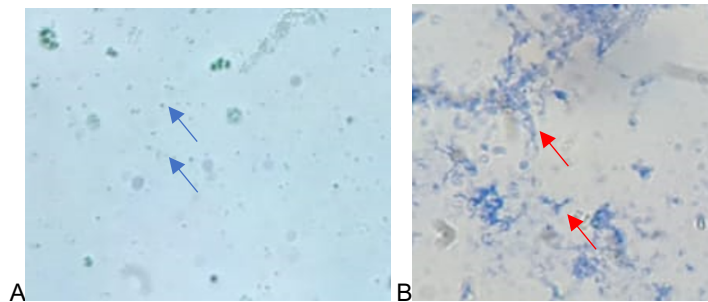


Figura 8. Imágenes representativas de los cultivos primarios de hipocampo de ratón. A) Células presentes a los 3 días de cultivo. B) Células presentes a los 7 días de cultivo. Imágenes tomadas con microscopio simple de luz a 40X y posterior magnificación de 2X.

Discusión

Los cultivos primarios de neuronas obtenidos a partir de estructuras cerebrales de roedores son ampliamente utilizados para el estudio de las propiedades fisiológicas básicas de las neuronas, y representan una técnica muy útil para comprender mecanismos de neurotoxicidad. (Catlin et al., 2016)

La utilización de los cultivos primarios, a diferencia de las líneas celulares, es preferible debido a que no provienen de células tumorales lo que favorece que se puedan evaluar las propiedades neuronales más cercano a lo que ocurre *in vivo*. Debido a la presencia de diferentes tipos celulares, provenientes de los tejidos animales, es necesario separar el tipo celular de interés para garantizar la “pureza” del cultivo primario; esto puede lograrse por técnicas de inmunohistoquímica con marcadores específicos de cada línea celular. En el caso de los cultivos primarios de neuronas, es necesario evitar el crecimiento, en la medida de lo posible, tanto de astrocitos como de oligodendrocitos. (Gordon et al., 2013)

Los medios de cultivo libres de suero son muy útiles cuando se necesita controlar factores de crecimiento, hormonas, etc., además de que en los medios de cultivo que son suplementados con suero, las células gliales continúan proliferando. En ese sentido, la utilización de inhibidores de mitosis, resultan ser muy tóxicos para el crecimiento de neuronas (Wallace & Johnson, 1989), por lo que en este trabajo se optó por la utilización de un suplemento, el B27, que evita la utilización de suero, y con ello, disminuye la proporción en el crecimiento de este tipo de células gliales. (Brewer et al., 1993)

Con respecto al crecimiento de las neuronas del hipocampo, siguen una serie de etapas una vez establecidas en la placa de cultivo: durante los primeros dos días en cultivo puede comenzar el crecimiento de lámina neuronal alrededor del cuerpo celular, de la cual comenzarán a emerger neuritas, eventualmente. El crecimiento de conos de las neuritas tarda en aparecer alrededor de 12 a 36 horas posterior a la aparición de la lámina. (Kaech & Banker, 2006) La observación de las células de nuestro cultivo a los 3 días, de mostró la presencia de algunos cuerpos celulares, sin procesos observables.

Después de 3 a 4 días en cultivo, las neuritas comenzarán a crecer y podrán formar sinapsis. Para la completa observación de este proceso, es preferible utilizar cultivos de 1 a 4 semanas de haberse establecido, ya que el pico del crecimiento y formación de sinapsis ocurre entre la 2da y 3er semana de cultivo. (Kaech & Banker, 2006). A los 7 días de nuestro cultivo ya pudieron observarse algunos procesos entre las células cultivadas.

Uno de los principales problemas en la realización de los cultivos primarios es la contaminación por hongos. Tanto los hongos como las esporas se encuentran de manera ubicua en el ambiente y pueden contaminar los cultivos por medio de la vía aérea. Los sistemas de calefacción o de aire acondicionado, así como partículas de polen provenientes del ambiente o impregnadas en las batas del personal del laboratorio, puede favorecer la contaminación por este tipo de agentes. (Tissue Culture Facility. Contamination Risks and Comments, 2022)

Durante la observación de nuestros cultivos, algunas de las placas presentaron el crecimiento de hifas, lo que pudo evitar que tuviéramos un adecuado crecimiento de las células obtenidas de los hipocampos de ratón.

En las primeras etapas de la contaminación, los hongos no causan un cambio en el pH del medio de cultivo, debido a que no tienen aún un efecto tóxico sobre las células de mamífero. Las esporas que dan lugar al crecimiento de hifas o micelio no son tan fáciles de detectar en los cultivos. (Tissue Culture Facility. Contamination Risks and Comments, 2022)

En los cultivos que obtuvimos en este proyecto, el crecimiento de hongos fue más evidente cuando las condiciones de disección y obtención del hipocampo se realizaron en una mesa de trabajo que no era de acero inoxidable, a pesar de la utilización de material estéril y la limpieza de la zona de disección.

Conclusión

Fue posible la correcta identificación del hipocampo y su posterior disección en ratones de 7 a 10 días de nacidos, etapa en la cual aún es complicado la observación de esta estructura para un ojo no entrenado. Se establecieron las condiciones para el cultivo primario de células de hipocampo, identificando los puntos en los que se pudo tener el problema de contaminación por hongos.

Referencias

- Allen Institute for Brain Science. (2004). Allen Mouse Brain Atlas. www.Mouse.Brain-Map.Org.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), 567–576. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>
- Broderson, J. R., Lindsey, J. R., & Crawford, J. E. (1976). The Role of Environmental Ammonia in Respiratory Mycoplasmosis of Rats.
- Catlin, R., Taylor, A., Ditchek, L., Burnett, S., Khan, S., Todd, O., Adams, M., Touhey, E., Wynkoop, A., & Ryan, J. (2016). ARTICLE Using Cultured Mammalian Neurons to Study Cellular Processes and Neurodegeneration: A Suite of Undergraduate Lab Exercises. In *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education* (Vol. 14, Issue 2). www.thermofisher.com
- Cipro, S., & Groh, T. (2014). Cell cultures. *Ceskoslovenska Patologie*, 50(1), 30–32.
- Delenclos, M., Burgess, J. D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T. F., Vekrellis, K., & McLean, P. J. (2019). Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 150(5), 566–576. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>
- Gordon, J., Amini, S., & White, M. K. (2013). General Overview of Neuronal Cell Culture. *Methods in Molecular Biology*, 1078, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_1
- Hölscher, C. (2003). Time, Space and Hippocampal Functions. *Reviews in the Neurosciences*, 14(3). <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2003.14.3.253>
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Magdariaga Hernández, L., Castro Bosch, M. de las N., González Gámez, S., Magdariaga Hernández, L., Castro Bosch, M. de las N., & González Gámez, S. (2018). Transformaciones histológicas de la fascia dentada de ratones y ratas en los primeros días posnatales. *MEDISAN*, 22(9), 947–960. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192018000900947&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Nadel, L. (2021). The hippocampal formation and action at a distance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2119670118>

- Paxinos, G., & Watson, C. (1982). WITHDRAWN: Plates and Figures. In *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (pp. 13–153). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-547620-1.50010-2>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to Cell Culture (pp. 1–13). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. P. (2015). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Rodríguez Sáez, S. (2012). Activación de la neurogénesis en el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1960). The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1(13), 500–500. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
- Schoeb, T. R., Davidson, M. K., & Lindsey, J. R. (1982). Intracage ammonia promotes growth of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of rats. *Infection and Immunity*, 38(1), 212–217. <https://doi.org/10.1128/iai.38.1.212-217.1982>
- Schröder, H., Moser, N., & Huggenberger, S. (2020). The Mouse Hippocampus. In *Neuroanatomy of the Mouse* (pp. 267–288). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5_11
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio., Diario Oficial de la Federación (2001).
- Sivula, C. P., & Suckow, M. A. (2017). Euthanasia. In *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing* (pp. 827–840). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315152189-35>
- Tissue Culture Facility. Contamination Risks and Comments. (2022). Lineberger Comprehensive Cancer Center.
- Vesell, E. S., Lang, C. M., White, W. J., Passananti, G. T., Hill, R. N., Clemens, T. L., Liu, D. K., & Johnson, W. D. (1976). Environmental and genetic factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Federation Proceedings*, 35(5), 1125–1132.
- Wallace', T. L., & Johnson, E. M. (1989). Cytosine Arabinoside Kills Postmitotic Neurons: Evidence That Deoxycytidine May Have a Role in Neuronal Survival That Is Independent of DNA Synthesis.