



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS  
DE  
HIPOTALAMO DE RATON



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
UNAM

T E S I S  
Que para Obtener el Título de :  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
JOSE LUIS REDONDO MEDA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Joseph, a quien agradezco su orientación y generosa ayuda.

1. INTRODUCCION	1
1.1 Anatomía, bioquímica y fisiología del hipotálamo	1
1.2 Técnicas de cultivo	4
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGIA	11
3.1 Radioinmunoanálisis	11
3.1.1 Preparación del anticuerpo contra TRH	11
a) Preparación del conjugado	11
b) Procedimiento de inmunización	12
3.1.2 Iodación de TRH	12
3.1.3 Curvas de titulación	13
3.1.4 Curva estándar	13
3.1.5 Radioinmunoanálisis de TRH	13
3.1.6 Radioinmunoanálisis de LHRH	14
3.1.7 Radioinmunoanálisis de somatostatina	15
3.2 Cultivo de células dispersas	15
3.2.1 Cruza de ratones	15
3.2.2 Disección	15
3.2.3 Dispersión	16
3.2.4 Siembra	16
3.2.5 Cambios de medio del cultivo	17
3.2.6 Técnicas citológicas para determinar las condiciones de los cultivos	17
3.2.7 Técnicas bioquímicas para determinar las condiciones de los cultivos	18
a) Radioinmunoanálisis	18
b) Determinación de proteínas	20
3.3 Determinación de TRH en el hipotálamo de ratón	21

4. RESULTADOS	23
4.1 <i>Radioinmunoanálisis</i>	23
4.1.1 Iodación de TRH	23
4.1.2 Caracterización del anticuerpo contra TRH	23
a) Curvas de titulación	23
b) Curvas estándar	24
4.1.3 Interferencia del medio de cultivo con la curva estándar de TRH, LHRH y somatostatina	24
4.1.4 Precipitación de la unión antígeno-anticuerpo	24
4.2 <i>Cultivo de células dispersas</i>	24
4.2.1 Disección	25
4.2.2 Dispersión	25
4.2.3 Siembra	25
4.2.4 Desarrollo del cultivo	25
4.3 <i>Cuantificación de neuropéptidos y proteínas en el cultivo</i>	27
4.4 <i>Determinación de los niveles de TRH en el hipotálamo de ratón</i>	29
5. DISCUSION Y CONCLUSIONES	31
6. REFERENCIAS	37
7. APENDICES	47
APENDICE A. ABREVIATURAS	47
APENDICE B. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO	49
APENDICE C. SUSTANCIAS COMERCIALES EMPLEADAS	51
APENDICE D. EQUIPO EMPLEADO	53
FIGURAS	54

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Anatomía, bioquímica y fisiología del hipotálamo

El hipotálamo es una de las cuatro estructuras que constituyen el diencéfalo y forma la pared inferior y el piso del tercer ventrículo. El hipotálamo posee fibras aferentes y eferentes que lo conectan con el resto del sistema nervioso central. Comprende varios núcleos que se extienden desde la región del quiasma óptico hasta los cuerpos mamilares (1). Los núcleos hipotalámicos son grupos de células nerviosas cuyas funciones específicas aún no se han determinado. La mayoría de estos núcleos tienen terminaciones nerviosas en la región de la eminencia media, aunque dos de ellos (supraóptico y para ventricular) tienen la mayor parte de sus terminaciones en la pituitaria posterior o neurohipófisis, y relativamente pocas terminaciones en la eminencia media. Dichas terminaciones vierten su contenido en un plexo capilar, que por medio de un sistema porta llega hasta la pituitaria anterior o adenohipófisis, donde se une con otro plexo capilar secundario (2).

En la actualidad es bien conocida la importancia de la regulación de muchas de las funciones del organismo por medio del eje hipotálamo-hipófisis. Desde 1947 (3) se sugirió un control neurohormonal del hipotálamo sobre la hipófisis y se postuló la existencia de factores químicos hipotalámicos específicos para cada hormona hipofisiaria. Inicialmente se les dio el nombre

de "factores de liberación" porque se observó que liberaban una hormona de la hipófisis. Sin embargo, hoy se sabe que también hay factores que inhiben la liberación de su hormona blanco específica, además de que algunos se han localizado en otras áreas del sistema nervioso central, por lo que se ha preferido llamarles neurohormonas o neuropéptidos debido a su naturaleza peptídica (4). Actualmente se sabe que son sintetizados en los núcleos del hipotálamo, transportados y liberados por células neurosecretoras a nivel del plexo capilar de la eminencia media.

Hasta la fecha se han identificado más de veinte péptidos neuroactivos en el sistema nervioso central y periférico, aunque se supone que existen muchos más (4). En nuestro caso nos concretaremos a los péptidos hipotalámicos que controlan la liberación de hormonas adenohipofisarias, como son: TRH o factor liberador de la tirotropina, LHRH o factor liberador de la hormona luteinizante y de la folículo estimulante, y somatostatina o factor inhibidor de la liberación de la hormona del crecimiento.

El TRH fue el primer factor que se identificó y cuya secuencia se conoció: pyroglu-his-pro NH<sub>2</sub> (5 y 6) con base en la actividad biológica detectada en extractos hipotalámicos purificados, capaces de liberar *in vivo* e *in vitro* tirotropina o TSH (7 y 8). En el hipotálamo el TRH se encuentra con mayor concentración en la eminencia media (9 y 10), y también está presente en todos los núcleos hipotalámicos, incluyendo el dorsomediano, ventromediano, paraventricular y periventricular (9 y 11). El TRH se detecta fuera del hipotálamo en casi todas las regiones estudiadas, y en cantidades relativamente altas en el área preóptica y en el septum (9). También se ha localizado TRH en la médula espinal, y fuera del sistema nervioso en el páncreas (12). Esta hormona produce la secreción y aumento de niveles de TSH, que a su vez libera triiodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>) de la tiroides (13 a 15). Se acepta en general que el sitio de retroalimentación negativa en que actúan las hormonas tiroideas es a nivel de la hipófisis (16), pues se ha encontrado que la administración de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> bloquea la liberación de TSH inducida por TRH (17). Sin embargo, aunque se ha postulado que pudiera haber un sitio de retroalimentación a nivel hipotalámico, la evidencia es escasa (18).

Por ser el TRH un péptido pequeño, se pensó que se sintetizaba por vía enzimática (19), pero estudios posteriores demostraron que en realidad es por síntesis ribosomal (20). La liberación del TRH responde a diferentes neurotransmisores, entre los que se encuentran noradrenalina, histamina, serotonina y dopamina (10).

El LHRH es el factor liberador de la hormona luteinizante y de la foliculo estimulante y fue caracterizado después que el TRH, con la siguiente secuencia: pyroglu-his-trp-ser-tyr-gly-leu-arg-pro-gly NH<sub>2</sub> (21). Al igual que en el caso del TRH, la eminencia media contiene una alta concentración de LHRH. Está en controversia la localización de los cuerpos celulares así como las conexiones de las neuronas de LHRH, aunque los principales núcleos de síntesis de este péptido son el supraóptico y paraventricular. También se encuentran muchos cuerpos celulares en el hipotálamo medio basal (22).

El LHRH produce la liberación de la hormona luteinizante y de la foliculo estimulante en la hipófisis, las que a su vez producen liberación de esteroides en las gónadas. Los esteroides sexuales son responsables de los niveles hormonales en el ciclo estral así como de la retroalimentación del sistema, la cual puede ser positiva o negativa, tanto a nivel hipofisiario como hipotalámico (23). Los esteroides actúan en el cerebro interaccionando con receptores específicos y produciendo así alteraciones en la síntesis de proteínas. Además hay evidencia de que actúan directamente sobre la actividad neuronal y la sinapsis (24). Los receptores de esteroides en el cerebro se han revelado por autorradiografía (25).

La somatostatina fue el primer factor inhibidor que se conoció y fue aislada por su capacidad para inhibir la liberación de la hormona del crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro* (26). Es un tetradecapéptido con la siguiente secuencia: H-ala-gly-cys-lys-asn-phe-phe-trp-lys-thr-phe-thr-ser-cys-OH (27). La somatostatina se ha encontrado en varios núcleos del hipotálamo; fuera de este, en sitios como el complejo amigdaloides y la corteza cerebral, e incluso se ha detectado fuera del sistema nervioso en el páncreas (28). Este péptido también inhibe la secreción de TSH producida por TRH en la hipófisis (29), y se le han encontrado otros efectos inhibidores sobre la insulina, el glucagón y la gastrina. Parece existir también, además de

la somatostatina un factor estimulador de la hormona del crecimiento, aunque no se ha identificado. La acción de la hormona del crecimiento en la estimulación de este parece estar mediada por compuestos de bajo peso molecular llamados somatomedinas, las cuales además podrían participar en la retroalimentación del sistema.

## 1.2 Técnicas de cultivo

La técnica de cultivo de tejidos tiene sus orígenes hacia finales del siglo pasado y principios de este. En 1907 Ross Harrison (30) cultivó explantes de epitelio neural de anfibio en un ambiente controlado y descartó la idea que prevalecía de que las fibras nerviosas se formaban por anastomosis entre células. Estos experimentos significaban uno de los primeros empleos del cultivo de tejidos para estudiar el sistema nervioso y ejemplificaban la potencialidad inherente a esta técnica.

El estudio del desarrollo y la función del sistema nervioso, en algún momento debe enfocarse al desarrollo y función de células individuales. Esto resulta sumamente difícil *in vivo*, pues se tienen interactuando poblaciones celulares distintas; sin embargo, *in vitro* el cultivo de tejidos permite estudiar tipos celulares individuales en un ambiente controlado que minimiza o elimina las múltiples interacciones presentes en el animal completo (31).

El cultivo de tejido nervioso básicamente puede ser de líneas continuas o de células primarias y ambos presentan ventajas y desventajas. El cultivo que utiliza líneas continuas se obtiene de tumores de neuroblastos que retienen la capacidad de dividirse y diferenciarse *in vitro* y ofrece ventajas prácticas de disponibilidad de material en gran cantidad, obtención de líneas celulares homogéneas provenientes de una célula parental, y la posibilidad de seleccionar fenotipos característicos. Este tipo de cultivo presenta otras ventajas prácticas como el fácil mantenimiento y la ausencia de dispersión; sin embargo, también tiene algunas desventajas, de las cuales la principal, por la que para ciertos fines no puede utilizarse, es que por ser células anormales tumorales es peligroso inferir resultados y generalizarlos al sistema nervioso.

El cultivo de células primarias puede ser de explante (fragmentos de tejido de  $1 \text{ mm}^3$  aproximadamente) o de células dispersas. Puede usarse tejido nervioso de diversos organismos que sobrevivirá en cultivo un cierto tiempo, dependiendo principalmente del grado de dispersión -si esta existe-, del tipo neuronal cultivado, del medio de cultivo, del sustrato y de la edad del animal donador. El cultivo de explante conserva en gran medida la relación celular original y sufre poco daño por no ser disperso, pero suele ocurrir muerte celular en la parte interna por falta de nutrientes, además de que para ciertos estudios, como los electrofisiológicos y de interacciones bioquímicas, resulta difícil tener neuronas aisladas (32). En este sentido se ha podido estudiar la biosíntesis de TRH utilizando cultivo de explante de hipotálamo de mamífero (33).

El cultivo de células dispersas ofrece ventajas importantes sobre el de explante, ya que a pesar de que se pierde la estructura original del tejido, y de que este sufre daño al ser dispersado, se logra obtener cultivos viables por cierto tiempo en los cuales se puede tener un control del tipo o tipos celulares presentes. En la literatura hay varios trabajos que utilizan células dispersas de tejido nervioso central y/o periférico donde se obtienen resultados exitosos. Así, uno de los trabajos más completos es el que ha hecho el grupo de P.H. Patterson, donde utilizando ganglio simpático de rata detectan catecolaminas en el cultivo y hacen estudios de cambio de metabolismo (34 a 37). También se han hecho estudios utilizando sistema nervioso central y/o periférico analizando marcadores celulares específicos (38 a 41).

Es importante referirnos ahora a las variantes empleadas en la metodología del cultivo de células dispersas de hipotálamo principalmente, pues fue de una revisión bibliográfica exhaustiva de donde partimos para tener ciertas bases de la metodología que se debía seguir. En orden cronológico lo primero que hay que resolver es el tipo de animal que se va a usar y su edad. Pueden utilizarse fetos, animales recién nacidos o adultos, pero aparentemente el tejido fetal es más capaz de adaptarse a las condiciones drásticas del cultivo por la plasticidad que posee, ya que hay todavía neuroblastos dividiéndose en etapas tempranas. Se han publicado trabajos sobre cultivos exitosos de tejido fetal o de animales recién nacidos, pero hay po-

cos acerca de cultivos de tejido de animales adultos que logren mantenerse a largo plazo. Con base en esto consideramos más conveniente utilizar tejido embrionario.

La ontogenia del hipotálamo del ratón ha sido descrita (42). Esta estructura es ya distinguible en el décimo día de gestación y en el duodécimo día muestra ya un progreso en su desarrollo; a partir del decimotercer día empieza a haber organización de capas celulares y para el decimosexto día la mayoría de los núcleos hipotalámicos están casi totalmente formados, aunque aparentemente no se da la formación de sinapsis hasta el nacimiento (43).

En cuanto a la aparición de los péptidos hipotalámicos en el desarrollo, se ha detectado TRH *in vivo* desde el decimotercer día de gestación, tanto en el hipotálamo como en el resto del cerebro del ratón (43); también se ha encontrado TRH antes del nacimiento en varias regiones del cerebro de la rata, incluyendo el hipotálamo (44). En cuanto al LHRH no hay estudios de su aparición en el embrión del ratón, pero sí se ha detectado en la rata desde antes del nacimiento (45).

Una vez seleccionado el tejido, es necesario dispersarlo, lo cual puede hacerse mecánica o enzimáticamente, y la utilización de una u otra forma aparentemente depende de la dureza del tejido. Así, generalmente, cuando el tejido es embrionario, es suficiente una dispersión mecánica, pero si el tejido es de animales recién nacidos o adultos, la dureza hace necesario casi siempre la dispersión enzimática. Hay que aclarar que la forma enzimática generalmente va acompañada de una dispersión mecánica leve. En la mayoría de los trabajos se hace dispersión enzimática y se utilizan una o varias enzimas; así, en ocasiones se dispersa únicamente con tripsina (46 a 50), o con mezclas de tripsina, colagenasa, viocasa, hialuronidasa, DNAasa, RNAasa y papaína (34 y 51 a 54). La dispersión mecánica se usa menos que la enzimática, y puede hacerse principalmente pasando el tejido por agujas hipodérmicas con diámetro decreciente (55) o mediante pipetas Pasteur y filtrando luego con una gasa (56 a 58).

Los medios de cultivo utilizados son generalmente sintéticos con sustancias nutritivas adicionales y la frecuencia de cambio es muy variable, desde una

vez a la semana hasta todos los días, según sea el trabajo de que se trate. Pueden usarse también medios sintéticos sin suero, lo cual en ocasiones mejora notablemente las condiciones de cultivo (50 y 51).

Generalmente se emplean cajas de plástico pequeñas con algún sustrato que permita la adhesión de las células a la caja. Existen sustratos naturales o sintéticos como poli-D-lisina, poli-L-lisina, gelatina, colágena fresca, poliornitina, mezclas de estas o sustratos de células no neuronales (37). En ocasiones no se utiliza sustrato y las células crecen directamente sobre el plástico (55 y 58).

En los cultivos primarios de células dispersas, generalmente se tiene una sobrepoblación de células no neuronales que hay que controlar y esto se hace por diversos métodos. Pueden usarse agentes antimitóticos que interfieren con la síntesis de DNA, como la fluorodeoxiuridina, la citosina arabinósida o la aminopterina (32). Puede también eliminarse o controlarse las células no neuronales por manipulaciones del medio de cultivo. A este respecto se ha informado que al eliminar el bicarbonato de sodio del medio, y por consiguiente el bióxido de carbono, desaparecen casi por completo las células gliales (34). También puede controlarse o favorecerse la existencia de neuronas o células no neuronales por cambios de sustrato, pues se ha encontrado que, por ejemplo, la colágena favorece la proliferación de glía, mientras que la poli-L-lisina la inhibe y favorece la proliferación de neuronas (59).

Existen otras técnicas tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no presentan las características del cultivo de células dispersas. Entre estas técnicas se pueden citar las siguientes: *in vitro* se han desarrollado principalmente preparaciones de rebanadas, sinaptosomas y cultivo de tejidos no dispersos. Las rebanadas de tejido preservan en gran parte la estructura interna celular y permiten identificar varios tipos neuronales por su contexto anatómico, además de que facilitan el acceso a neuronas individuales para estudios electrofisiológicos, cambios de medio o aplicación de drogas (60). Los sinaptosomas se han utilizado extensivamente para estudios puramente bioquímicos de terminaciones nerviosas y son un arma valiosa para conocer los mecanismos de liberación de neurotransmisores (61 y 62). Sin embargo, estas

dos técnicas únicamente se pueden usar por periodos de incubación cortos y por lo tanto no permiten estudiar procesos más complejos y duraderos como la regulación celular. La técnica de cultivo de tejidos no dispersos sí ha ce posible estudiar fenómenos con tiempos largos de incubación, además de que el medio ambiente celular puede estar completamente definido; sin embargo, frecuentemente se ha presentado necrosis en el interior por no estar el tejido disperso (32 y 63).

Las técnicas *in vivo* tienen en cambio el problema de que se desconoce la causa directa ante un cierto estímulo o el tipo celular involucrado en el mismo, ya que lo que se observa es la resultante final de todos los procesos participantes (64).

## 2. OBJETIVOS

Como se puede deducir de la introducción, el estudio de células dispersas de hipotálamo resulta el mejor modelo para analizar la regulación de los péptidos secretados en el eje neuroendócrino hipotálamo-hipófisis. Esto se debe a que cumple con las siguientes características: ofrece fácil acceso a las neuronas peptidérgicas que nos interesan y permite controlar directamente la composición del medio extracelular o de cultivo, lo que hace posible saber si cierto efecto es directo ante determinado estímulo.

El objetivo fundamental de este trabajo es desarrollar un sistema de estudio válido tanto citológica como bioquímicamente. Para ello, idealmente habría que contar con un sistema *in vitro* donde se controlaran los tipos celulares existentes, que de preferencia hubiera un enriquecimiento neuronal, y que, además, fuera reproducible, viable y que se pudiese mantener a largo plazo. Una vez establecido esto, será posible estudiar la regulación del metabolismo de la neurona peptidérgica.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Radioinmunoanálisis

##### 3.1.1 Preparación del anticuerpo contra TRH

Se preparó anticuerpo contra TRH según la técnica descrita por Bassiri y Utiger (65). Se trabajó con un conjugado de TRH y albúmina bovina sérica (BSA), debido a que compuestos de bajo peso molecular como el TRH solo presentan respuesta inmunogénica al ser unidos a una proteína acarreadora de gran tamaño (66). Como agente acoplante se utilizaron sales de diazonio, que unen grupos aromáticos como histidina y tirosina (66), el primero presente en el TRH.

##### a) Preparación del conjugado

Se elaboró bencidina bis-diazotizada (BDB) de la siguiente manera: se disolvió bencidina-HCl (0.23 g) en 45 ml de ácido clorhídrico 0.2 N y se agregaron 5 ml de nitrito de sodio (175 mg en agua bidestilada), con lo que se formó una reacción amarillo-naranja, la cual se mantuvo durante sesenta minutos a 4°C, con agitación. Se guardaron alícuotas de 1 ml a -20°C.

Para la unión de TRH con BSA se mezcló 1 ml de BDB con 1 ml de solución amortiguadora de boratos 0.16 M, cloruro de sodio 0.15 M, a pH 9. A esta

mezcla se le agregaron 50 mg de BSA y 5 mg de TRH disueltos en 10 ml de la misma solución amortiguadora, con lo que apareció un color pardo-rojizo en la reacción, la cual se dejó continuar por dos horas a 4°C, con agitación. Esta mezcla se dializa a 4°C durante siete días, contra agua destilada, cambiándola diariamente, y, por último, se dializa un día contra cloruro de sodio 0.15 M y se guardan alícuotas a -20°C para la inmunización.

#### b) Procedimiento de inmunización

Se inyectaron cinco conejos blancos Nueva Zelanda. La primera inyección fue con la mezcla del conjugado y adyuvante completo de Freud (1:1) y las posteriores con adyuvante incompleto de Freud. Se aplicó intradérmicamente 1 ml de la mezcla a cada conejo, rasurando y esterilizando previamente la región, alternando el dorso y la parte ventral. Se llevaron a cabo un total de quince inyecciones, una cada tres semanas. Diez días después de la quinta inyección se extrajo por primera vez 1 ml de sangre de la oreja de cada conejo, con objeto de determinar la cantidad de anticuerpos presentes. Para esta determinación se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente, se guardó doce horas a 4°C, se centrifugó durante quince minutos a 1 800 g para separar el suero y se guardaron alícuotas de 50 µl a -20°C para su futuro uso.

Los radioinmunoanálisis de TRH que aquí se muestran se hicieron con anticuerpos preparados de forma idéntica y obtenidos a partir del último sangrado de los animales, aplicando anestesia y extrayendo la sangre por la vena cava inferior.

#### 3.1.2 Iodación de TRH

El TRH fue iodado según el método de cloramina T (67), utilizando las cantidades señaladas por Bassiri y Utiger (65). Se usan 5 µg de TRH disueltos en 50 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, a pH 7.5. A esta solución se le agregan 0.5 mCi de  $^{125}\text{I}$  y 20 µl de una solución de 20 mg/10 ml de cloramina T y a los quince segundos se detiene la reacción con 100 µl (5 mg/10 ml) de metabisulfito. A continuación se agrega la mezcla de iodación a una columna de cromatografía de Sefadex G-10, previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 por ciento de BSA,

a pH 7.4. La columna se eluye colectándose 25 gotas por tubo. Posteriormente se prueba la inmunorreactividad de las fracciones correspondientes a los picos de radiactividad, para lo cual se utiliza lo siguiente : tres tubos con cuentas totales, tres tubos de unión no específica (NSB) y tres tubos llamados Bo. Los totales llevan 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -TRH a razón de 20 000 cpm por tubo; los NSB llevan también 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -TRH además de 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 por ciento de BSA, 0.15 M de cloruro de sodio, a pH 7.4; por último, los Bo llevan 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -TRH, 150  $\mu$ l de la misma solución amortiguadora y 50  $\mu$ l de anticuerpo contra TRH a una dilución final de 1/25 000. Todos los tubos se agitan en vórtex y se incuban a 4°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugan por quince minutos a 1 800 g, a los que previamente se añadió 1 ml de etanol absoluto a 4°C, el cual precipita las proteínas entre las que se encuentra el antígeno con el anticuerpo pegado. A continuación se extrae el sobrenadante y se mide la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

### 3.1.3 Curvas de titulación

Las curvas de titulación se hacen a fin de determinar a qué concentración del anticuerpo hay un 50 por ciento de unión con el antígeno (B/T). El sistema consiste en 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -TRH y 50  $\mu$ l del suero en diluciones decrecientes de 1/50 a 1/32 000 (tubos Bo), además de los tubos totales y NSB con el contenido ya mencionado. Todos los tubos se incuban a 4°C durante 48 horas y después se separan las fracciones unidas y libres por centrifugación con etanol, durante quince minutos a 1 800 g. Lo anterior se hizo para cada suero obtenido de cada conejo.

### 3.1.4 Curva estándar

Con objeto de determinar la sensibilidad del suero de los conejos, se hizo una curva estándar en la que se incubaron 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -TRH, 50  $\mu$ l de dicho suero y 50  $\mu$ l de TRH no radiactivo a concentraciones entre 5 y 2 500 pg por tubo. También se emplearon tubos totales y NSB.

### 3.1.5 Radioinmunoanálisis de TRH

Esta técnica se utiliza para cuantificar el TRH presente tanto en el medio

de cultivo como en las células. Para determinar la concentración de TRH en el cultivo se hace una curva estándar en la que se usa anticuerpo contra TRH a una dilución final de 1/25 000 (50  $\mu$ l),  $^{125}$ I-TRH iodado según el método ya descrito (50  $\mu$ l), diluciones de TRH de 5 a 2 500 pg (50  $\mu$ l) y, por último, 100  $\mu$ l de solución amortiguadora (fosfatos 0.05 M, 0.25 por ciento de BSA, 0.15 M de cloruro de sodio, a pH 7.4) o medio de cultivo acidificado (1/20 con ácido clorhídrico 1 N). Se emplea medio de cultivo acidificado como el que se encuentra en las muestras para determinar el efecto que este tiene sobre la reacción antígeno-anticuerpo, lo que se vería como un desplazamiento de la curva estándar. El medio debe acidificarse para evitar la degradación enzimática. La reacción descrita se incubó a 4°C por 48 horas y se separan las fracciones unidas y libres centrifugando durante quince minutos a 1 800 g, ya sea con etanol en una proporción de 80 a 90 por ciento del volumen, o bien con Pansorbin (suspensión de *Staphylococcus aureus* inactivado, cuya membrana contiene proteína A, que une inmunoglobulinas). Se probaron ambos métodos con objeto de determinar cuál de los dos actuaba mejor en la precipitación. A continuación se registra la radiactividad del precipitado en el contador gamma.

### 3.1.6 Radioinmunoanálisis de LHRH

En este caso se utilizó un anticuerpo donado por el Dr. Neet (68). La técnica empleada es muy similar a la del caso anterior de TRH: se incubaron 50  $\mu$ l de anticuerpo contra LHRH a una dilución final de 1/100 000, 50  $\mu$ l de  $^{125}$ I-LHRH (iodado de la misma forma que el TRH) a razón de 20 000 cpm por tubo, 50  $\mu$ l de diluciones seriadas de LHRH de 0.5 a 1 000 pg y, por último, 100  $\mu$ l de solución amortiguadora (fosfatos 0.05 M, 0.1 por ciento de gelatina, 0.15 M de cloruro de sodio, a pH 7.4) o bien 100  $\mu$ l de medio acidificado, con objeto de determinar la posible interferencia de este con la curva estándar. Se incubó la reacción a 4°C durante 48 horas y se separan las fracciones unidas y libres centrifugando durante quince minutos a 1 800 g, ya sea con etanol en una proporción de 80 a 90 por ciento del volumen, o bien con Pansorbin. En este caso también se quiere determinar cuál de los dos actúa mejor en la precipitación.

### 3.1.7 Radioinmunoanálisis de somatostatina

Se desarrolló en forma similar a los dos anteriores, usando el anticuerpo del Dr. Ellebaum (69). Se incubaron 50  $\mu$ l de anticuerpo contra somatostatina con dilución final de 1/16 000, 50  $\mu$ l de  $^{125}$ I-somatostatina comercial a razón de 20 000 cpm por tubo, 50  $\mu$ l de somatostatina en diluciones de 7.8 a 2 000 pg y, por último, 50  $\mu$ l de solución amortiguadora (fosfatos 0.05 M, 0.1 por ciento de gelatina, 0.25 por ciento de BSA, 0.08 M de cloruro de sodio, 0.02 por ciento de azida de sodio y 0.025 M de EDTA, a pH 7.5) o bien 50  $\mu$ l de medio acidificado, con objeto de determinar la posible interferencia de este con la curva estándar. Se mantiene la reacción durante 48 horas a 4°C y se precipita centrifugando a 1 800 g con etanol o con Pansorbín.

## 3.2 Cultivo de células dispersas

### 3.2.1 Cruza de ratones

Debido a que se utilizaron embriones como fuente de tejido para el cultivo, se realizaron las cruza pertinentes. Se usaron cien ratones CD-1 machos y hembras. Para la cruza se dejan toda la noche tres o cuatro hembras en la jaula de un macho. Se reconocen las hembras preñadas por presentar una especie de tapón claramente visible en la vagina, y después se colocan en jaulas separadas. La operación de cruza se realizó de tres a cuatro veces por semana y se obtuvo un promedio de una hembra preñada por jaula, hasta un total de 60 hembras.

### 3.2.2 Disección

Se llevaron a cabo 30 cultivos en total. Generalmente se emplearon en cada uno diez embriones de doce o trece días de gestación, que es cuando se detecta por primera vez TRH, según lo publicado (43). Ocasionalmente se utilizaron embriones mayores, de hasta dieciséis días de gestación. Para obtenerlos se disloca cervicalmente la hembra embarazada, se sumerge en solución antiséptica (benzal-etanol, 1:1) y se extraen los fetos, los que a su vez son sumergidos en solución salina amortiguadora estéril (cloruro de sodio 0.15 M, fosfatos 0.15 M, a pH 7.4). Cabe aclarar que toda la técnica del

cultivo, incluyendo la disección, se debe realizar en completa esterilidad, es decir, con todo el material estéril desechable o sometido a autoclave y en una campana de flujo laminar. A continuación se extrae cada embrión de la solución salina y se corta la cabeza de cada uno a la altura de la mandíbula; así se expone la parte ventral del encéfalo y se disecciona el área correspondiente al hipotálamo. Para esto se corta anteriormente al quiasma óptico y lateralmente a lo largo del tercer ventrículo, con lo que se extrae un fragmento aproximadamente triangular de 1 mm de profundidad, cuya base corresponde a la comisura anterior y el vértice a los cuerpos mamilares.

### 3.2.3 Dispersión

Debido a que se trabajó con tejido embrionario, se prefirió la dispersión mecánica a la enzimática por el daño que aparentemente causa la tripsina a las proteínas de superficie, y su posible repercusión en los contactos que las células tengan que establecer entre sí posteriormente. Los hipotálamos disecados se colocan en un Medio Mínimo Esencial libre de calcio, para lo cual se encontró que la relación óptima es de 100  $\mu$ l por hipotálamo. El objeto de utilizar medio sin calcio es evitar la agregación de tejido que este produciría y ayudar así a una mejor dispersión del tejido. Posteriormente se dispersa mecánicamente, ya sea usando pipetas Pasteur con punta cada vez más angosta o jeringas hipodérmicas estériles de vidrio con agujas de diámetro decreciente (1.5, 1.25, 1 y 0.6 mm), pasando el tejido seis veces por cada una. En el segundo caso, después de pasar por cada aguja se deja sedimentar por gravedad, se extrae cuidadosamente el sobrenadante y se colecta en un tubo estéril de 15 ml. Enseguida de la última dispersión se reúnen todos los sobrenadantes, se centrifuga a 1 000 g por unos segundos, se extrae el sobrenadante (se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  acidificado con ácido clorhídrico 1 N para su futuro estudio por radioinmunoanálisis) y el precipitado de células dispersas se resuspende en el medio final de incubación.

### 3.2.4 Siembra

Para cultivar las células se emplearon los nutrientes que se enlistan en el apéndice B. Asimismo se utilizaron dos tipos de cajas estériles de plástico. Para las observaciones citológicas se usaron cajas de petri de 20 por 35 mm, mientras que para las determinaciones bioquímicas se emplearon gene

ralmente multicajas más chicas, con 24 cavidades de 16 por 20 mm cada una. Las cajas grandes llevan en ocasiones cubreobjetos de vidrio para poder realizar posteriormente preparaciones histológicas. En todos los casos las cajas o cubreobjetos se cubren con una solución de poli-D-lisina (50 000) a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , la cual funciona como sustrato para la adhesión de las células (70). Las cajas se cubren con el sustrato generalmente un día antes de emplearse, y diez minutos antes de sembrar las células se lavan dos veces con agua tridestilada desionizada estéril y una vez con medio de cultivo sin suero.

La densidad celular de la siembra se calcula con un hemocitómetro, empleando el método de exclusión de azul tripano, que tiñe solamente células muertas. Así, se mezclan 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células y 10  $\mu\text{l}$  del colorante, se hace el conteo celular por ml, y se calcula el número de células correspondiente al volumen total. De esta manera se siembran aproximadamente de 1 a  $5 \times 10^5$  células o un hipotálamo en 2 ml de medio, en el caso de las cajas individuales grandes. En el caso de las multicajas de 24 cavidades, se siembran aproximadamente la mitad de células, es decir,  $0.5 \times 10^5$  o medio hipotálamo en 1 ml de medio.

Una vez hecha la siembra en esterilidad absoluta, se incuban las células en una atmósfera húmeda, con 8 por ciento de bióxido de carbono y 72 por ciento de aire.

### 3.2.5 Cambios de medio del cultivo

Se cambió el medio de cultivo cada cuatro días, sustituyéndose la mitad por medio fresco. El medio que se extrae se guarda a  $-20^\circ\text{C}$ , acidificado como se mencionó, para su futuro estudio por radioinmunoanálisis. En los casos en que se presentó sobrepoblación de células no neuronales, se agregó el agente antimitótico citosina arabinósida, a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.6 Técnicas citológicas para determinar las condiciones de los cultivos

Se tomaron fotografías de los cultivos vivos empleando un microscopio invertido de contraste de fases. En cada cambio de medio se hicieron observaciones sistemáticas de los cultivos y de algunos se tomaron fotografías du

rante todo su desarrollo, a fin de tener control de las condiciones de los mismos y poder conocer también el momento propicio para agregar el agente antimitótico. Las mencionadas fotografías se realizaron con película blanco y negro, aplicando el cálculo automático de exposición presente en la cámara integrada al microscopio.

También se tomaron fotografías de preparaciones fijas utilizando un microscopio óptico de contraste de fases y película blanco y negro, calculando también la exposición automáticamente por medio de la cámara integrada al microscopio. Se hicieron las preparaciones empleando la técnica de fijación con osmio que se muestra a continuación:

- Primero se lava la cajita de cultivo recién sacada de la incubadora con solución salina amortiguadora para eliminar los remanentes del medio de cultivo.
- A continuación se lava durante 45 minutos, a 4°C, con solución de Karnovsky, a pH 7.2.
- Se elimina esta solución y se agrega una amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M, a 4°C y a pH 7.3, también durante 45 minutos.
- Se fija y tiñe el tejido con tetróxido de osmio al 2 por ciento, a 4°C, durante una hora.
- Se hace un lavado rápido con agua bidestilada para eliminar el resto de tetróxido de osmio.
- Se deshidrata el tejido con alcoholes etílicos graduales de 70, 80, 96 y 100 por ciento, cada uno durante quince minutos y el último por treinta minutos.
- Se acaba de deshidratar con xilol durante cinco o diez minutos.
- Por último, se monta la preparación en bálsamo de Canadá y se observa al microscopio.

### 3.2.7 Técnicas bioquímicas para determinar las condiciones de los cultivos

#### a) Radioinmunoanálisis

Se midieron los contenidos de los péptidos TRH, LHRH y somatostatina por radioinmunoanálisis. Siguiendo la técnica explicada en páginas anteriores, se hicieron curvas estándar para cada péptido y para cada experimento, con

objeto de poder determinar la cantidad presente en las muestras problema, las cuales provienen de dos fuentes:

- La mitad del medio de cultivo que se extrae en cada cambio se acidifica. Este medio debe contener, entre otras cosas, los péptidos secretados por las neuronas, que son los que se quieren medir por esta técnica. En cada radioinmunoanálisis se incuban 50  $\mu$ l de la hormona radiactiva en cuestión, 50  $\mu$ l del anticuerpo deseado a la dilución ya establecida, 50  $\mu$ l de solución amortiguadora según sea el caso y, por último, 100  $\mu$ l de la muestra problema (todo por duplicado). A continuación se agita en vórtex y se incuban durante 48 horas a 4°C, tanto las muestras como la curva estándar. Transcurrido este tiempo se agrega a cada tubo 1 ml de etanol absoluto a 4°C, se agita en vórtex y se centrifuga a 1 800 g durante quince minutos para precipitar la unión antígeno-anticuerpo. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se registra la radiactividad del precipitado en un contador gamma.
- También se midió el contenido de TRH en las células de la siguiente manera: en cada cambio de medio se saca de la incubadora una o dos cajas a las que se extrae el líquido, se lava dos veces con solución salina amortiguadora y se guarda a -20°C con 300  $\mu$ l de ácido acético 20 por ciento. Cuando se tienen varias cajas acumuladas se colocan sobre hielo y se agregan a cada una 600  $\mu$ l de metanol absoluto, se raspa con un émbolo de plástico hasta despegar el tejido y se homogeneiza el contenido. Luego se agregan 950  $\mu$ l de metanol absoluto, se raspa un poco y se homogeneiza de nuevo. De esta forma se tienen dos homogeneizados de cada caja, los que se unen y se guardan a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifuga a 8 000 g por cinco minutos (a 4°C), se extrae el sobrenadante (donde se encuentran los péptidos pequeños como el TRH) y se evapora por aproximadamente tres horas. A continuación se guardan los tubos ya evaporados a -20°C.

Quando se tienen acumulados suficientes tubos se analizan por radioinmunoanálisis de la siguiente manera: se agregan a los tubos evaporados 130  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 por ciento de BSA, 0.15 M de cloruro de sodio, a pH 7.4, para resuspender el contenido. Se

separan estos 130  $\mu$ l en dos porciones de 50  $\mu$ l cada una (el resto se elimina) y se emplean como duplicado, agregándose 50  $\mu$ l de  $^{125}$ I-TRH a razón de 20 000 cpm por tubo, 50  $\mu$ l de anticuerpo contra TRH a una dilución final de 1/25 000 y 100  $\mu$ l de la misma solución amortiguadora. Posteriormente se agita en vórtex y se incuba durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se precipita la unión antígeno-anticuerpo por centrifugación con 1 ml de etanol absoluto a 4°C, durante quince minutos a 1 800 g. Por último se elimina el sobrenadante y se cuenta la radiactividad del precipitado.

Cabé aclarar que esta técnica de determinación de TRH en las células se hace de forma igual tanto para los cultivos hechos en cajas grandes individuales, como para los hechos en multicajas de 24 cavidades.

#### b) Determinación de proteínas

Se midió el contenido de proteínas de los precipitados resultantes, después de la extracción celular, por el método de Lowry *et al* (71), de la siguiente manera:

Se hace una curva estándar con diluciones por duplicado de BSA con concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 250  $\mu$ g/ml, y se ajusta el volumen con agua bidestilada para que todos contengan 100  $\mu$ l. A continuación se agregan 100  $\mu$ l de hidróxido de sodio 1 M y se incuba durante aproximadamente doce horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añaden 900  $\mu$ l de una mezcla 1:1:98 de sulfato cúprico (1 por ciento), tartrato de sodio y potasio (2 por ciento) y carbonato de sodio (2 por ciento). Después de diez minutos se agregan 100  $\mu$ l de reactivo Folin 1 N y transcurridos treinta minutos se lee densidad óptica (absorbancia) a 660 nm en un espectrofotómetro.

Las muestras se tratan de la misma forma empezando por agregar a cada una 100  $\mu$ l de hidróxido de sodio 1 M e incubando durante doce horas a temperatura ambiente. El resto de la técnica es igual que la de la curva estándar y para calcular la concentración de proteínas de las muestras se emplea como referencia la curva estándar.

### 3.3 Determinación de TRH en el hipotálamo de ratón

Se disecaron hipotálamos de ratones, desde embriones de doce días de gestación hasta animales de veinte días de nacidos. El tejido se mantuvo en lotes de dos o tres hipotálamos con 300  $\mu$ l de ácido acético 20 por ciento y 300  $\mu$ l de metanol absoluto, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez reunidas todas las muestras, se sonicaron con 700  $\mu$ l adicionales de metanol absoluto y se incubaron durante doce horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se centrifugan durante cinco minutos a 8 000 g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente se evapora el sobrenadante para concentrar las sustancias presentes en él, entre las que se encuentra el TRH. Después de evaporar se guardan los tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mide la cantidad de TRH presente por radioinmunoanálisis, tal como se explicó anteriormente para el caso de las células cultivadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Radioinmunoanálisis

#### 4.1.1 Iodación de TRH

Al probar la inmunorreactividad de los picos de radiactividad, se encontró que el primer pico corresponde a  $^{125}\text{I}$ -TRH y el segundo a  $^{125}\text{I}$  que no se unió al TRH, como se observa en la figura 1. Se guardaron las fracciones 5 a 12 a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su futuro uso.

#### 4.1.2 Caracterización del anticuerpo contra TRH

##### a) Curvas de titulación

A partir de la quinta inyección únicamente el conejo número uno mostraba formación de anticuerpos, y después de la decimosegunda inyección seguía presentándolos. En la figura 2 se muestran las curvas obtenidas con los sueros de cada conejo inmunizado y, como puede observarse, solo el conejo uno presentó anticuerpos. A una concentración final de  $1/2\ 000$  hay un porcentaje de unión de 30 por ciento (B/T). La aparición de anticuerpos en este conejo se observó solo a partir del cuarto mes y, como se aprecia en la figura 3, el título se mantiene constante.

#### b) Curva estándar

Solamente se realizó curva estándar del suero del conejo uno, pues únicamente este presentó anticuerpos. Los resultados se expresan en la figura 4, que muestra una buena sensibilidad del anticuerpo al antígeno frío, a una dilución de 1/2 000. A concentraciones crecientes de TRH frío hay un desplazamiento de cuentas de  $^{125}\text{I}$ -TRH, y se observa un 10 por ciento a 5 pg y un 50 por ciento a 75 pg en el suero obtenido después de la décima inyección.

#### 4.1.3 Interferencia del medio de cultivo con la curva estándar de TRH, LHRH y somatostatina

Se encontró para los radioinmunoanálisis de los tres péptidos que no hay desplazamiento de la curva estándar al emplear medio de cultivo acidificado (figuras 5a, b y c). Como se observa en las figuras, se obtienen curvas casi idénticas, lo que indica que no hay interferencia del medio en el ensayo. Se encontró paralelismo entre diluciones de extractos hipotalámicos de ratones adultos (estándar interno) y la curva estándar, como se observa en la figura 5a.

#### 4.1.4 Precipitación de la unión antígeno-anticuerpo

Como se observa en la figura 5d, se encontró que, en nuestras condiciones de trabajo, el etanol funciona mejor que el Pansorbin en la precipitación del antígeno unido al anticuerpo (para TRH, LHRH y somatostatina). Además, ya que el Pansorbin presenta en ocasiones ciertos problemas al ser lavado (posiblemente debido a la existencia de proteína A disuelta en el medio, que une inmunoglobulinas y permanecen en solución), se optó por emplear etanol como agente precipitante.

#### 4.2 Cultivo de células dispersas

Fue necesario optimizar cada etapa de la metodología del cultivo con base en la bibliografía y en las experiencias obtenidas a lo largo del trabajo.

#### 4.2.1 Disección

Se emplearon embriones de ratón de doce a dieciséis días de gestación y se observó que los cultivos hechos con embriones más jóvenes presentaban mayor densidad neuronal y mejor sobrevivencia, lo que está de acuerdo con lo que se encuentra en la literatura (46).

#### 4.2.2 Dispersión

De las dos técnicas de dispersión empleadas, se encontró que en el caso de las pipetas Pasteur hubo pérdida de tejido en el interior de las mismas y formación de mucha espuma. Resultó más eficiente el método de jeringas hipodérmicas con agujas de diámetro decreciente porque hubo mayor viabilidad (80 a 90 por ciento) que en la otra técnica (60 a 70 por ciento).

#### 4.2.3 Siembra

Inicialmente se empleó medio Dulbecco adicionando únicamente suero bovino fetal y antibiótico-antimicótico en las concentraciones ya descritas (54). Sin embargo, al observar que en ocasiones durante la primera semana había pérdida de células, así como decremento tanto en proteínas (figura 6) como en el contenido celular de TRH (figura 7), se decidió enriquecer el medio con L-glutamina y glucosa adicionales, además de insulina bovina, ya que esta parece ayudar al crecimiento de las prolongaciones celulares (72). Se observó mayor densidad neuronal en la segunda semana en los cultivos que contenían glucosa, L-glutamina e insulina.

#### 4.2.4 Desarrollo del cultivo

Las células dispersas de hipotálamo se observan en el día cero como se muestra en la figura 8a, todas redondas y sin prolongaciones. Conforme se establecen las células y pasan los primeros días, empiezan a mostrar características morfológicas diversas. Las células neuronales empiezan a formar procesos (figura 8b) y crecen sobre células planas adheridas a la caja, entre las que se encuentran diferentes tipos de glía y fibroblastos (figura 8c). En ocasiones se forman agregados celulares cuando la dispersión es incompleta (figura 8d).

Se observó que cuando el cultivo se efectuaba en cajas no recubiertas con sustrato (poli-D-lisina), a los pocos días había muy pocas células con aspecto neuronal y en el fondo de las cajas se encontraban algunas células planas (figuras 9a y b). Sin embargo, al emplear sustrato hubo mayor adhesión tanto de células planas en el fondo de las cajas, como de células neuronales en la parte superior (figuras 9c y d).

Pese a que la poli-D-lisina se ha descrito como un sustrato que inhibe la proliferación glial y favorece la neuronal (59), se encontró que a partir del sexto día las células no neuronales se multiplicaban en forma tal que, en ocasiones, no se podían apreciar las neuronas fácilmente (figuras 10a y b). Esto hizo que se tuviese que emplear citosina arabinósida, ya que de acuerdo con lo publicado inhibe la proliferación de células no neuronales (49). Se agregó la citosina una sola vez, en los días sexto, octavo o undécimo y se dejó por 24 o 48 horas. Se encontró que era mejor dejarla únicamente 24 horas, es decir, agregarla un día antes del cambio de medio, y emplearla cuando fuera evidente la sobrepoblación de células no neuronales (a partir del octavo día, dependiendo del cultivo en cuestión), como se observa en las figuras 10c y d.

Se encontró que la densidad celular de siembra influye mucho en el posterior desarrollo del cultivo. Así, se comprobó lo expuesto en la literatura (51 y 56), acerca de que la densidad óptima de siembra, en estas condiciones de trabajo, es de  $1 \text{ a } 5 \times 10^5$  células por caja grande y de  $0.5 \times 10^5$  células por caja chica, con 2 y 1 ml, respectivamente (figuras 11a y b). No obstante, al sembrar con densidad mayor se observa un exceso de células sobre todo no neuronales (figura 11c), lo que probablemente provoca muerte celular y enmascaramiento neuronal. De igual forma, con menor densidad no se pueden formar contactos sinápticos adecuados, y al haber muy pocas células, el cultivo no progresa y degenera (figura 11d).

A continuación se presentan dos secuencias completas del desarrollo del cultivo; una de ellas es de células vivas observadas en un microscopio invertido de contraste de fases (figuras 12a, b, c y d) y la otra es de preparaciones fijas con tinción y fijación de osmio (figuras 13a, b, c y d). Como puede observarse, las fotografías de preparaciones fijas son más nítidas,

puesto que se puede enfocar con facilidad. Sin embargo, el hecho de tomar fotografías de cultivos vivos presenta la desventaja de que no se puede enfocar bien, sobre todo al usar multicajas con poco volumen, ya que el menisco formado por el líquido impide buena formación de contraste de fases. A pesar de esta desventaja, se puede seguir el desarrollo de una sola caja, con lo que se tiene mayor certeza en las observaciones.

En ocasiones se presenta muerte celular en el cultivo, con la consiguiente acumulación de detritus, como se puede ver en las figuras 14a y b.

#### *4.3 Cuantificación de neuropéptidos y proteínas en el cultivo*

Por medio de radioinmunoanálisis específicos para TRH, LHRH y somatostatina se determinó la presencia de dichos péptidos liberados en el medio de cultivo. Los resultados se muestran en las figuras 7, 15 y 16 y, como puede apreciarse, cada péptido sigue un comportamiento diferente. Mientras que la cantidad de TRH que se detecta en el medio no parece variar notablemente con el tiempo (figura 7), el LHRH muestra un aumento gradual reproducible cuando se emplea citosina arabinósida (figura 15). Los datos que se encuentran representados en estas dos figuras son el resumen de ocho cultivos, con un promedio de diez cajas cada uno.

Como se explicó en la metodología, en los días cuatro, ocho, doce, etc. se sustituye 1 ml del medio de cultivo por 1 ml de medio fresco (en el caso de las cajas grandes), y 0.5 ml en el caso de las cajas chicas. Esto significa que en el cultivo queda aproximadamente la mitad del medio donde estuvieron las células. El propósito de dejarlo radica en lo que se ha descrito como "medio de condicionamiento" (73 y 74), es decir, que las mismas células secretan factores que les permiten crecer mejor. Por tanto, los valores detectados en un tiempo dado representan lo que se liberó en ese lapso (por ejemplo, entre el cuarto y el octavo día), más la mitad de lo que se acumuló del periodo anterior. Así, se calculó lo que en las figuras 7 y 15 se expresa como "contenido neto" con la siguiente fórmula: concentración del día anterior entre dos, más la concentración real determinada en el día siguiente. En realidad, esta cantidad constituye la resultante de lo que fue liberado, acumulado y, en algunos casos, degradado. Por ejemplo, en el

caso del LHRH parece haber una liberación progresiva con el tiempo (cuando se agrega citosina arabinósida), lo que probablemente represente una mayor actividad biosintética. En cambio, para el TRH hay poca variación en el contenido neto en los tres primeros cambios de medio, habiendo después pérdida considerable. Esto pudiera darnos un índice de que o bien la liberación de este péptido es mínima, o de que hay más liberación pero está contrarrestada con una degradación importante.

En el caso de la somatostatina (figura 16) parece más evidente que pueda existir degradación o menor liberación y/o síntesis, al observarse un fuerte decremento entre los días cuarto y octavo, aunque después hay una recuperación y aumentan los niveles de este péptido.

Esta diferencia en el comportamiento de los tres péptidos no se debe a que en algún caso se dañe el cultivo, ya que los tres péptidos se analizan en las mismas muestras y, si se observa la figura 17, donde aparece el comportamiento de los péptidos en el mismo cultivo, se puede corroborar esta divergencia.

Debido a que para determinar el contenido celular de los péptidos hay que sacrificar por lo menos una caja de cultivo en cada cambio, solo se ha cuantificado el de TRH. Como se ve en la figura 7, hay una pérdida considerable del cuarto al octavo día, que se asemeja al decremento observado en proteínas (figura 6) y, en ocasiones, coincide con pérdida celular observada al microscopio. Estos datos permiten en conjunto concluir que en la primera semana hay muerte celular, como ya ha sido sugerido (58), pero que posteriormente el cultivo se estabiliza, recobrando sus funciones.

Citológicamente hubo crecimiento considerable a partir del décimo día, por lo que se empleó citosina arabinósida. Cuando no se adiciona esta droga el crecimiento celular es tal (figuras 10a y b) que puede eventualmente matar a las neuronas, como se ha descrito en la literatura (32). Sin embargo, si bien la citosina detuvo dicho crecimiento, no hubo efecto en los niveles de TRH en el medio de cultivo (figura 7), y mejoró notablemente el comportamiento de las neuronas de LHRH, posiblemente por haberse controlado el crecimiento de células no neuronales (figura 15). Este mejoramiento se refleja

en niveles más altos de LHRH.

A partir del duodécimo día, se observa un decremento en los niveles de TRH, tanto en el medio como en las células, y en ocasiones hubo pérdida total de células en la tercera semana, coincidiendo con los niveles bajos del péptido. Como se recordará, el sustrato que se emplea es la poli-D-lisina y parece ser que a tiempos largos de cultivo disminuye su adhesividad, ya que la pérdida observada es de todas las células, no solo de neuronas, lo que podría explicar dicha pérdida. Será necesario usar otros sustratos como colágena en caso de que se quiera mantener los cultivos por más tiempo.

En cuanto al comportamiento de las proteínas a lo largo del cultivo, se encontró que en la primera semana, como generalmente la citosina arabinósida no ha sido agregada, hay mayor cantidad de proteínas en la curva que presenta la droga. Sin embargo, a partir de la segunda semana se empieza a notar su efecto, y al final de la tercera semana ya hay una diferencia considerable, encontrándose más proteínas al estar ausente la citosina. Posteriormente, en el día 24, se igualan las dos curvas en un nivel relativamente bajo, lo que coincide con la muerte o pérdida celular observada en esta época. Todo lo anterior se muestra en la figura 6, que representa el promedio de doce cultivos.

#### *4.4 Determinación de los niveles de TRH en el hipotálamo de ratón*

Como se muestra en la figura 18, hay un aumento progresivo de TRH por hipotálamo, relacionado con el desarrollo y el crecimiento del animal. Del día doce de gestación hasta el nacimiento hay poco aumento (solo de 15 pg), mientras que a partir del nacimiento se disparan los niveles (como se puede apreciar en el cambio de escala en la gráfica) y llega a haber aproximadamente 1 000 pg en el sexto día de vida, aunque después parece disminuir un poco.

## 5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se explicó en el capítulo de resultados, obtuvimos un cultivo de células viables capaces de producir los péptidos hipotalámicos TRH, LHRH y somatostatina, los que fueron detectados en el medio de cultivo de células que sobrevivieron hasta tres semanas en condiciones *in vitro*.

A continuación se comparan estos resultados con los consultados en la literatura acerca de cultivos similares. A diferencia de varios grupos (53, 54 y 57) que han cultivado células hipotalámicas sin poder medir exitosamente dichos péptidos, nosotros detectamos los tres péptidos en el medio de cultivo y el TRH en las células.

El protocolo inicial se basó fundamentalmente en los trabajos de Tixier-Vidal y colaboradores (42, 43, 56 y 57), quienes encontraron TRH en concentraciones de 2 y 8 pg en células cultivadas durante diez días provenientes de embriones de ratón de doce y quince días, respectivamente. En cuanto al trabajo que aquí se reseña, se midió mucha mayor cantidad de TRH en las células (1 000 pg, como se muestra en la figura 7). El grupo de Tixier-Vidal solamente determinó TRH intracelular a los diez días de incubación, tiempo en el cual nosotros encontramos un punto de inflexión en la curva, con niveles relativamente bajos. En cuanto a los resultados de niveles de TRH presentes en hipotálamos de embriones de doce y quince días de gestación (fi-

gura 18), son iguales en ambos casos: 2 y 15 pg por hipotálamo, respectivamente. Sin embargo, nosotros encontramos que después del nacimiento hay un aumento muy pronunciado, llegando a haber 1 000 pg en el sexto día de vida, lo cual podría coincidir con los niveles que se observan en el cultivo y quizá reflejar un indicio de que la neurona en cierta forma prosigue *in vitro* su desarrollo como *in vivo*. No obstante, por el momento esto es especulativo y será necesario establecer más parámetros que respalden tal hipótesis.

Respecto a los niveles de TRH presentes en el medio de cultivo, ningún grupo ha podido medirlos y Tixier-Vidal menciona en sus trabajos que no puede hacerlo por tener interferencia de su medio de cultivo con el radioinmunoanálisis, lo que podría deberse a que emplea un medio diferente del nuestro. Así, hay varias causas por las que su grupo encuentra muy poca cantidad de TRH en las células y no lo puede medir en el medio: a) no emplea ningún agente antimitótico de control de células no neuronales, lo que aunado a que siembra a una densidad mucho mayor que la nuestra, pudiera causar sobrepoblación de células no neuronales en detrimento de las neuronas; b) no usa sustrato en las cajas de cultivo, lo que causa pérdida celular según nuestras observaciones; c) su medio de cultivo no tiene insulina, glucosa y glutamina a las concentraciones que nosotros empleamos, y parece que estos aditivos mejoran las condiciones de las neuronas. No teniendo por el momento otros parámetros como el contenido de DNA y marcadores neuronales específicos como la toxina tetánica (40 y 41), no nos es posible definir mejor las discrepancias encontradas.

En cuanto a los otros dos péptidos que se detectaron en el medio de cultivo, existen los siguientes antecedentes: el grupo de Lavrie (53) logró medir LHRH, además de vasopresina y  $\beta$ -endorfina en su medio de cultivo; sin embargo, encontró niveles muy bajos de LHRH y solo registró al inicio y a los tres días de incubación, habiendo en este último alrededor de 30 pg por ml de medio en comparación con 3 000 pg por ml que encontramos nosotros. A este respecto creemos que la diferencia pudiera deberse a que sus métodos de dispersión son demasiado bruscos, empleando enzimas durante un periodo largo. Este grupo no pudo determinar LHRH ni vasopresina intracelulares, lo que podría deberse a la forma en que extrae las células (con EDTA y carbo-

nato de sodio), lo cual podría causar degradación de los péptidos, a diferencia de una extracción con ácido que evita en gran medida esa degradación, razón por la que la escogimos.

El grupo de Vaccaro y colaboradores (54) no pudo medir LHRH intracelular, quizá por problemas similares a los mencionados anteriormente.

Otros grupos que trabajan con hipotálamos de animales recién nacidos o de algunos días de edad (46 y 48) no informan de niveles de péptidos y, aunque aseguran tener neuronas, se ha publicado (31, 32 y 46) que es difícil preservar cultivos de células neuronales partiendo de tejido posnatal. Además, en algunos trabajos se presenta como un hecho la existencia de neuronas sin poderlo comprobar con algún parámetro, sino únicamente mediante fotografías. Además del parámetro citológico, consideramos el bioquímico y funcional (niveles de péptidos) para poder asegurar la existencia de neuronas y tener índices del buen desarrollo del cultivo.

Por tanto, nuestros resultados en cuanto a contenido y detección de péptidos hipotalámicos son inéditos y constituyen un aporte que permitirá posteriormente estudiar la regulación del metabolismo de dichos péptidos.

En cuanto a la apariencia citológica de nuestros cultivos, se encontró -como se menciona en casi todos los trabajos similares (42, 46, 48, 52, 53, 56 y 57)- que la mayoría de las neuronas son bipolares y no crecen uniformemente en toda la caja, sino en agrupaciones. Nosotros observamos básicamente dos tipos celulares consistentes en células planas (especialmente glía y fibroblastos) sobre las que crecen neuronas, como también se indica en la literatura.

Ahora bien, aún hay ciertos problemas que se deben resolver. Así, encontramos que en el desarrollo de los cultivos el principal problema es la falta de reproductibilidad y homogeneidad entre ellos. De los 30 cultivos que se realizaron, aproximadamente dos terceras partes mostraron buen comportamiento con base en parámetros citológicos y en contenido de neuropéptidos, mientras que el resto no fue muy exitoso por razones como pérdida celular, sobrepoblación glial (al no emplearse citosina arabinósida) y niveles bajos

o ausencia de neuropéptidos. No obstante, se encontró que generalmente las observaciones citológicas coincidían con la cantidad de neuropéptidos detectados. Así, por ejemplo, cuando en una observación no había neuronas, posteriormente se detectaban por radioinmunoanálisis muy pocos neuropéptidos o ninguno y viceversa, cuando había neuronas se encontraban casi siempre neuropéptidos en abundancia. Esto indicaría que las neuronas son directamente responsables de los niveles de neuropéptidos y que posiblemente no hay otro tipo celular interfiriendo con ellas.

La falta de reproductibilidad observada en ocasiones puede deberse a que ciertos parámetros son difíciles de reproducir y en cierto sentido son aleatorios, por lo que pueden convertirse en las siguientes variables: a) la zona de donde se obtiene el tejido, que por ser embrionario no está bien definida y por tanto puede haber errores en la disección; b) la dispersión, que aunque se trata de hacer siempre igual, no puede lograrse completamente, pues depende de la manipulación y fuerza mecánica con que se trabaje la jeringa; c) dependiendo de la densidad con que se siembre, es decir, la relación volumen-tejido, quedarán las células con cierta distancia entre sí, lo cual va a ser fundamental para el tipo y cantidad de contactos que se establezcan, principalmente entre las neuronas, como de hecho ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso central (75). Aunque se encontró que la relación óptima de volumen-tejido es de cien  $\mu$ l de medio libre de calcio por hipotálamo y de medio hipotálamo por ml de medio de cultivo, la cantidad de tejido inicial y la proporción de diferentes células no siempre es igual por pérdida durante el proceso o la etapa de gestación, lo que podría ocasionar que los contactos celulares no siempre fueran los mismos.

Como se ha señalado, en nuestros cultivos, durante la primera semana hubo disminución notable en los niveles intracelulares de TRH, así como gran descenso de los niveles de somatostatina en el medio de cultivo y descenso limitado de TRH en dicho medio. Esto se podría atribuir a que el cultivo se encuentra en un periodo de adaptación a las condiciones drásticas establecidas, habiendo muerte celular durante este periodo, además de que ese comportamiento ya ha sido mencionado en la literatura (58). El hecho de que la cantidad de LHRH no descienda en este lapso de tiempo, en presencia de citosina arabinósida, pudiera atribuirse a que no necesariamente se está se-

cretando de las mismas neuronas, sino que, como ha sido sugerido, cada péptido tenga un tipo neuronal característico (4). Durante la segunda semana los tres péptidos se mantienen estables o aumentan en cantidad, cuando aparentemente el cultivo ya se ha adaptado a las condiciones drásticas. Hacia finales de la tercera semana se observa que generalmente las células se pierden, aunado esto a un decremento considerable de TRH intracelular y en el medio y a un decremento de los niveles de LHRH en ausencia de citosina arabinósida.

En lo que se refiere al efecto de esta droga, como se había mencionado, durante la primera semana no es aparente, pero a partir de la segunda sí lo es y el efecto de detener el crecimiento de las células no neuronales se refleja en el aumento o recuperación de los niveles de TRH y en la diferencia tan notable de los niveles de LHRH, ya que al haber mayor cantidad en presencia de citosina arabinósida se puede interpretar como que la limitación de las células no neuronales favorece a las neuronas LHRHérgicas, pues pueden liberar su contenido más fácilmente, o bien por no haber competencia por sustrato. En cuanto a los efectos de la citosina arabinósida, se ha publicado que no daña a las neuronas a concentraciones bajas como las que empleamos nosotros, sino que por el contrario mejora notablemente el desarrollo de las neuronas en cultivo (54 y 76). No hay que olvidar que esta droga controla -no elimina- la población de células no neuronales; su eliminación posiblemente sería perjudicial puesto que se ha demostrado con trabajos de medio condicionado que las células gliales ayudan en alguna forma a la nutrición de las neuronas (73 y 74). Por otro lado, no podrían emplearse agentes antimitóticos como la colchicina para controlar la población no neuronal, pues este agente despolimeriza los microtúbulos y hay fuertes evidencias (77 y 78) de que el transporte axonal de los neuropéptidos hacia las terminales nerviosas es precisamente por medio de microtúbulos.

La determinación de los niveles de DNA en el desarrollo de un cultivo puede ser un instrumento útil para conocer la cantidad de células al transcurrir el tiempo. Así, se ha encontrado que en cultivos de neuronas puras, durante la primera semana aumentan los niveles de DNA y se estabilizan al final de esta (59), mientras que en cultivos de células gliales semipuras el contenido de DNA baja durante el mismo lapso (58), lo que se interpreta co

mo periodo de adaptación. A este respecto, en el laboratorio se ha tratado de medir los niveles de DNA durante el desarrollo del cultivo, pero la sensibilidad de la técnica empleada no entró en los niveles de DNA que parece haber en nuestras condiciones de cultivo.

En ocasiones se observó que al final de la tercera semana en nuestros cultivos se pierden las células, lo que muy posiblemente se debe a que se despega la poli-D-lisina de las cajas. A este respecto Whatley y colaboradores (52) han publicado que logran obtener cultivos por mayor tiempo al emplear como sustrato una monocapa de células no neuronales, más que al utilizar poli-D-lisina sola. Ya que el objetivo del proyecto global a largo plazo es estudiar la regulación del metabolismo de los péptidos hipotalámicos, será conveniente hacer los estudios entre la primera y la segunda semanas o, en caso de necesitarse cultivos más largos, se podrá cambiar a otros sustratos como colágena o monocapa. Será necesario también examinar otros parámetros para determinar el periodo crítico donde convenga más estudiar los procesos de regulación que interesan.

En resumen, se puede concluir que el objetivo planteado en este trabajo se cumplió en gran medida, al lograr obtener un cultivo de células dispersas de hipotálamo capaces de sobrevivir hasta tres semanas *in vitro* y producir los neuropéptidos de interés. Quedan claros los problemas aún por resolver, como es probar nuevos sustratos que permitan mayor longevidad y quizá mayor reproductibilidad. Sin embargo, con las condiciones establecidas se puede utilizar esta técnica en la segunda semana para realizar estudios de liberación, síntesis o degradación de TRH, LHRH y somatostatina, lo que podrá constituir un aporte valioso a la neurobiología, rama de la biología relativamente nueva y prácticamente desconocida.

## 6. REFERENCIAS

1. Truex, R. C. and M. B. Carpenter. 1969. *Human Neuroanatomy*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. pp. 39-41 y 488-497.
2. Lee, J. and J. Laycock. 1978. *Essential Endocrinology*. Oxford University Press. London. pp. 3-19.
3. Green, J. D. and G. W. Harris. 1947. The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J. Endocrinol.* 5: 136-146.
4. Hökfelt, T. *et al.* 1980. Peptidergic neurons. *Nature.* 284: 514-521.
5. Boler, J. *et al.* 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 705-710.
6. Nair, R. M. G. *et al.* 1970. Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry.* 9: 1103-1106.
7. Guillemin, R. *et al.* 1963. *In vitro* secretion of thyrotropin (TSH): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF). *Endocrinology.* 73: 564-572.

8. Schally, A. V., C. Y. Bowers and T. W. Redding. 1966. Purification of thyrotropic hormone-releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology*. 78: 726-732.
9. Brownstein, M. J. *et al.* 1974. Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science*. 185: 267-269.
10. Joseph-Bravo, P. *et al.* 1979. Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. 104: 801-806.
11. Hökfelt, T. *et al.* 1975. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur. J. Pharmacol.* 34: 389-392.
12. Spindel, E. and R. J. Wurtman. 1980. TRH immunoreactivity in the rat brain gerions, spinal cord and pancreas: validation by high-pressure liquid chromatography and thin-layer chromatography. *Brain Research*. 201: 279-288.
13. Fleischer, N. *et al.* 1972. Synthetic thyrotropin releasing factor as a test of pituitary thyrotropin reserve. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 34: 617-624.
14. Bowers, C. Y. *et al.* 1971. Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 1033-1041.
15. Blackwell, R. E. and R. Guillemin. 1973. Hypothalamic control of adeno-hypophysial secretions. *Ann. Rev. Physiol.* 35: 357-390.
16. Bowers, C. Y. *et al.* 1967. Interactions of L-thyroxine or L-triiodothyronine and thyrotropin-releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice. *Endocrinology*. 81: 741-747.

17. Fukuda, H., N. Yasuda and M. A. Greer. 1975. Acute effects of thyroxine, triiodothyronine, and iodine on thyrotropin secretion. *Endocrinology*. 97: 924-931.
18. Montoya, E., M. J. Seibel and J. F. Wilber. 1975. Thyrotropin-releasing hormone secretory physiology: studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology*. 96: 1413-1418.
19. Mitnick, M. and S. Reichlin. 1972. Enzymatic synthesis of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by hypothalamic "TRH synthetase". *Endocrinology*. 91: 1145-1153.
20. McKelvy, J. F. 1977. Biosynthesis of hypothalamic peptides. In: *Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation*. J. C. Porter (ed.). Plenum Press. New York. pp. 77-98.
21. Matsuo, H. *et al.* 1971. Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1334-1339.
22. Martin, J. B., S. Reichlin and G. M. Brown. 1977. *Clinical Neuroendocrinology*. F. A. Davis Company. Philadelphia. pp. 13-44.
23. Guillemin, R. 1980. Hypothalamic hormones: releasing and inhibiting factors. In: *Neuroendocrinology*. D. T. Krieger and J. C. Hughes (eds.). Massachusetts. pp. 23-32.
24. Kelly, M. J. *et al.* 1977. The specificity of the response of preoptic-septal area neurons to estrogen: 17  $\alpha$ -estradiol versus 17  $\beta$ -estradiol and the response of extrahypothalamic neurons. *Exp. Brain. Res.* 30: 43-52.
25. Pfaff, D. and M. Keiner. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151: 121-158.

26. Martin, J. B. 1976. Brain regulation of growth hormone secretion. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. L. Martini and W. F. Ganong (eds.). Vol. 4. Raven Press. New York. pp. 129-168.
27. Brazeau, P. *et al.* 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 179: 77-79.
28. Patel, Y. C., G. C. Weir and S. Reichlin. 1975. Anatomic distribution of somatostatin (SRIF) in brain and pancreatic islets as studied by radioimmunoassay (RIA). Proceedings 57 th. Annual Meeting Endocrine Society. pp. 154.
29. Vale, W. *et al.* 1974. Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology*. 95: 968-977.
30. Harrison, R. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1: 116-118.
31. Patrick, J., S. Heinemann and D. Schubert. 1978. Biology of cultured nerve and muscle. *Ann. Rev. Neurosci.* 1: 417-443.
32. Guiller, E. L. *et al.* 1975. Expression of neuronal characteristics in culture: some pros and cons of primary cultures and continuous cell lines. Golgi Centennial Symposium, Proceedings. M. Santini (ed.). Raven Press. New York. pp. 603-624.
33. McKelvy, J. F. 1974. Biochemical neuroendocrinology. I. Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone (TRH) by organ cultures of mammalian hypothalamus. *Brain Research*. 65: 489-502.
34. Mains, R. E. and P. H. Patterson. 1973. Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. *J. Cell. Biol.* 59: 329-345.

35. Mains, R. E. and P. H. Patterson. 1973. Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. II. Initial studies on catecholamine metabolism. *J. Cell. Biol.* 59: 346-360.
36. Mains, R. E. and P. H. Patterson. 1973. Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. III. changes in metabolism with age in culture. *J. Cell. Biol.* 59: 361-366.
37. Hawrot, E. and P. H. Patterson. 1979. Long-term culture of dissociated sympathetic neurons. *Meth. Enzymol.* 58: 574-584.
38. Varon, S. 1977. Neural cell isolation and identification. In: *Cell, tissue, and organ cultures in neurobiology*. S. Fedoroff and L. Hertz (eds.). Academic Press. New York. pp. 237-261.
39. Hooghe-Peters, E. L., B. J. Fowlkes and R. J. Hooghe. 1979. A new neuronal marker identified by phosphorylcholine-binding myeloma proteins. *Nature.* 281: 376-378.
40. Mirsky, R. *et al.* 1978. Tetanus toxin: a cell surface marker for neurons in culture. *Brain Research.* 148: 251-259.
41. Raff, M. C. *et al.* 1979. Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells. *Brain Research.* 174: 283-308.
42. Tixier-Vidal, A., A. Nemeskeri and A. Faivre-Bauman. 1978. Primary cultures of dispersed fetal hypothalamic cells. Ultrastructural and functional features of differentiation. In: *Colloques internationaux du CNRS. Biologie Cellulaire des Processus Neurosécrétoires Hypothalamiques*. J. D. Vincent and C. Kordon (eds.). Paris. pp. 777-801.
43. Faivre-Bauman, A. *et al.* 1978. Ontogenesis of thyroliberin in the mouse hypothalamus. *Brain Research.* 154: 382-387.

44. Schaeffer, J. M. and M. J. Brownstein. 1980. Ontogeny of TRH-like material in several regions of the rat brain. *Brain Research*. 182: 207-210.
45. Daikoku, S., H. Kawano and H. Matsumura. 1978. *In vivo* and *in vitro* studies on the appearance of LHRH neurons in the hypothalamus of perinatal rats. *Cell. Tiss. Res.* 194: 433-445.
46. Wilkinson, M. *et al.* 1974. Hypothalamic neurons in dissociated cell culture. *Brain Research*. 82: 129-138.
47. Dichter, M. A. 1978. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Research*. 149: 279-293.
48. Knigge, K. M. *et al.* 1977. Identification of catecholamine and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-containing neurons in primary cultures of dispersed cells of the basal hypothalamus. *Brain Research*. 120: 393-405.
49. Lowe, I. P. *et al.* 1980. Primary dispersed cell cultures of female rat hypothalamus in the early postnatal period. *Peptides*. 1: 211-219.
50. Skaper, S. D., R. Alder and S. Varon. 1979. A procedure for purifying neuron-like cells in cultures from central nervous tissue with a defined medium. *Dev. Neurosci.* 2: 233-237.
51. Brunner, G. *et al.* 1982. Selective cell culture of brain cells by serum-free, hormone-supplemented media: a comparative morphological study. *Dev. Brain. Res.* 2: 563-575.
52. Whatley, S. A., C. Hall and L. Lim. 1981. Hypothalamic neurons in dissociated cell culture: the mechanism of increased survival times in the presence of non-neuronal cells. *J. Neurochem.* 36: 2052-2056.

53. Denizeau, F. *et al.* 1981. Attempts to demonstrate peptide localization and secretion in primary cell cultures of fetal rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 32: 96-102.
54. Vaccaro, D. E., S. E. Leeman and A. Messer. 1980. Primary cultures of dispersed hypothalamic cells from fetal rats: morphology, electrical activity, and peptide content. *J. Neurobiol.* 11: 417-424.
55. Sotelo, J. *et al.* 1980. Method for preparing cultures of central neurons: cytochemical and immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 653-657.
56. Benda, P. *et al.* 1975. Dissociated cell culture from fetal mouse hypothalamus. Patterns of organization and ultrastructural features. *Exp. Brain. Res.* 23: 29-47.
57. Faivre-Bauman, A. *et al.* 1980. Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of fetal mouse brain cells. Ontogenic aspects. *Brain Research*. 185: 289-304.
58. Hansson, E. *et al.* 1980. Brain primary culture-A characterization. *Brain Research*. 188: 233-246.
59. Pettmann, B., J. C. Louis and M. Sensenbrenner. 1979. Morphological and biochemical maturation of neurones cultured in the absence of glial cells. *Nature*. 281: 378-380.
60. Charli, J. L. *et al.* 1978. Histamine-induced release of thyrotropin releasing hormone from hypothalamic slices. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 401-403.
61. Joseph-Bravo, P. *et al.* 1979. Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Research*. 166: 321-329.

62. Barnea, A. *et al.* 1978. Demonstration of a temperature-dependent association of thyrotropin releasing hormone,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone, and luteinizing hormone releasing hormone with subneuronal particles in hypothalamic synaptosomes. *J. Neurochem.* 31: 1125-1134.
63. Sachs, H. *et al.* 1971. Supraoptic neurosecretory neurons of the guinea pig in organ culture. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2782-2786.
64. Levine, J. E. and V. D. Ramírez. 1980. *In vivo* release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid primed rats. *Endocrinology.* 107: 1782-1790.
65. Bassiri, R. M. and R. D. Utiger. 1972. The preparation and specificity of antibody to thyrotropin releasing hormone. *Endocrinology.* 90: 722-727.
66. Odell, W. D. and W. H. Daughaday. 1971. *Principles of competitive protein-binding assays.* J. B. Lippincott Company. U. S. A. pp. 33 y 134-157.
67. Greenwood, F. C., W. M. Hunter and J. S. Glover. 1963. The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123.
68. Nett, T. M. *et al.* 1973. A radioimmunoassay for gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 36: 880-885.
69. Epelbaum, J. *et al.* 1977. Subcellular distribution of radioimmunoassayable somatostatin in rat brain. *Brain Research.* 126: 309-323.
70. McKeehan, W. L. and R. G. Ham, 1976. Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers. *J. Cell. Biol.* 71: 727-734.

71. Lowry, O. H. *et al.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
72. Snyder, E. Y. and S. U. Kim. 1980. Insulin: it is a nerve survival factor? *Brain Research.* 196: 565-571.
73. Sensenbrenner, M. *et al.* 1980. Effect of conditioned media on nerve cell differentiation. *Experientia.* 36: 660-662.
74. Lim, R. and K. Mitsunobu. 1974. Brain cells in culture: morphological transformation by a protein. *Science.* 185: 63-66.
75. Patterson, P. H. and D. Purves. 1982. *Readings in developmental neurobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 1-4, 39-43, 105-109, 163-167 y 217-221.
76. Seil, F. J., A. L. Leiman and W. R. Woodward. 1980. Cytosine arabinoside effects on developing cerebellum in tissue culture. *Brain Research.* 186: 393-408.
77. Gainer, H., Y. Sarne and M. J. Brownstein. 1977. Biosynthesis and axonal transport of rat neurohypophysial proteins and peptides. *J. Cell. Biol.* 73: 366-381.
78. Gilbert, R. F. T. *et al.* 1980. Axonal transport of neuropeptides in the cervical vagus nerve of the rat. *J. Neurochem.* 34: 108-113.

## APENDICE A. ABREVIATURAS

Bo	Fracción que carece de hormona no radiactiva o fría.
BDB	Bencidina bis-diazotizada.
BSA	Albúmina bovina sérica.
%B/T	Porcentaje de unión sobre el total.
EDTA	Acido etilén diamino tetracético.
LHRH	Factor liberador de la hormona luteinizante y de la foliculo estimulante.
NSB	Fracción de unión no específica.
TRH	Factor liberador de la tirotropina.
TSH	Tirotropina.
T <sub>3</sub>	Triiodotironina.
T <sub>4</sub>	Tiroxina.

## APENDICE B. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Medio comercial Dulbecco Eagle Modificado:

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración (mg/l)</u>
<b>Sales inorgánicas</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97.67
NaCl	6 400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125.00
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina.HCl	84.00
L-Cisteína.2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina HCl.H <sub>2</sub> O	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina.HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina (sal de disodio)	104.20
L-Valina	94.00

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración (mg/l)</u>
Vitaminas	
D-Ca pantotenato	4.00
Clorhidro de colina	4.00
Acido fólico	4.00
i-Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Pirodoxal HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina HCl	4.00
Otros componentes	
Glucosa	1 000.00
Rojo fenol (indicador de pH)	15.00
Piruvato de sodio	110.00

Además de los componentes mencionados en la tabla anterior, se agregaron las siguientes sustancias:

<u>Sustancia</u>	<u>Concentración final</u>
Suero bovino fetal	10 %
Insulina bovina	0.08 u/ml de medio
Bicarbonato de sodio	0.37 %
Mezcla de: Penicilina (10 000 u/ml)	
Estreptomicina (10 000 µg/ml)	
Fungizona (25 µg/ml)	50 o 100 u/ml de medio
L-Glutamina	0.29 %
Glucosa	0.6 %

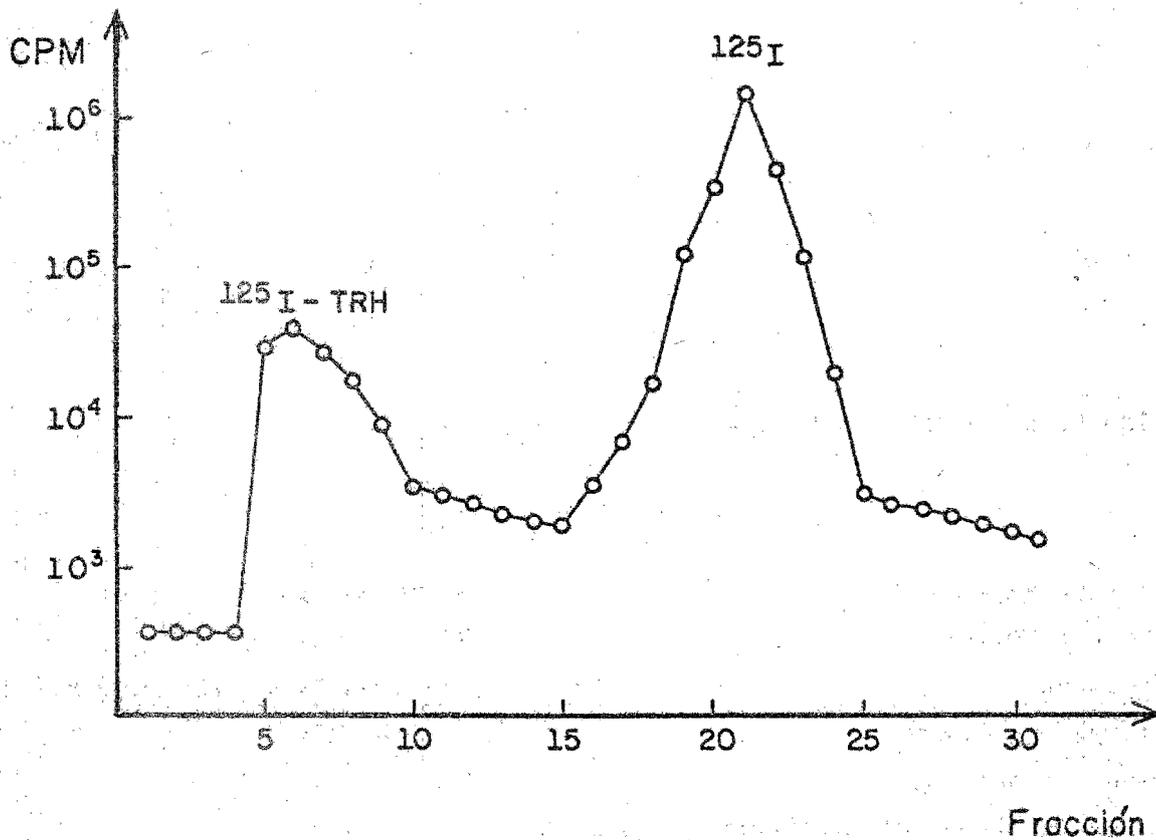
## APENDICE C. SUSTANCIAS COMERCIALES EMPLEADAS

Acido acético	J. T. Baker
Acido bórico	J. T. Baker
Acido clorhídrico	J. T. Baker
Acido etilén diamino tetracético	Sigma Chemical Company
Adyuvante completo de Freud	DIFCO Laboratories
Adyuvante incompleto de Freud	DIFCO Laboratories
Albúmina bovina sérica	Sigma Chemical Company
Alcohol etílico	J. T. Baker
Alcohol metílico	J. T. Baker
Azida de sodio	J. T. Baker
Azul tripano	Sigma Chemical Company
Bálsamo de Canadá	Sigma Chemical Company
Bencidina-HCl	Sigma Chemical Company
Bicarbonato de sodio	J. T. Baker
Carbonato de sodio	J. T. Baker
Citosina arabinósida	Sigma Chemical Company
Cloramina T	Sigma Chemical Company
Cloruro de sodio	J. T. Baker
Fosfato de sodio dibásico	J. T. Baker
Fosfato de sodio monobásico	J. T. Baker
Gelatina	Sigma Chemical Company
Glucosa	Sigma Chemical Company

Hidróxido de sodio	J. T. Baker
Insulina bovina	Sigma Chemical Company
$^{125}\text{I}$	New England Nuclear
L-Glutamina	Sigma Chemical Company
LHRH	Peninsula Laboratories, Inc.
Medio Dulbecco Eagle Modificado	GIBCO Laboratories
Medio Mínimo Esencial (libre de calcio)	GIBCO Laboratories
Metabisulfito de sodio	Mallinckrodt Chemical Works
Mezcla de antibióticos-antimicótico	GIBCO Laboratories
Nitrito de sodio	J. T. Baker
Pansorbin	Calbiochem-Behring, Corp.
Poli-D-lisina	Sigma Chemical Company
Reactivo Folin	Sigma Chemical Company
Somatostatina	Peninsula Laboratories, Inc.
$^{125}\text{I}$ -Somatostatina	New England Nuclear
Suero bovino fetal	GIBCO Laboratories
Sulfato cúprico	J. T. Baker
Tartrato de sodio y potasio	J. T. Baker
Tetróxido de osmio	Sigma Chemical Company
TRH	Peninsula Laboratories, Inc.
Xilol	J. T. Baker

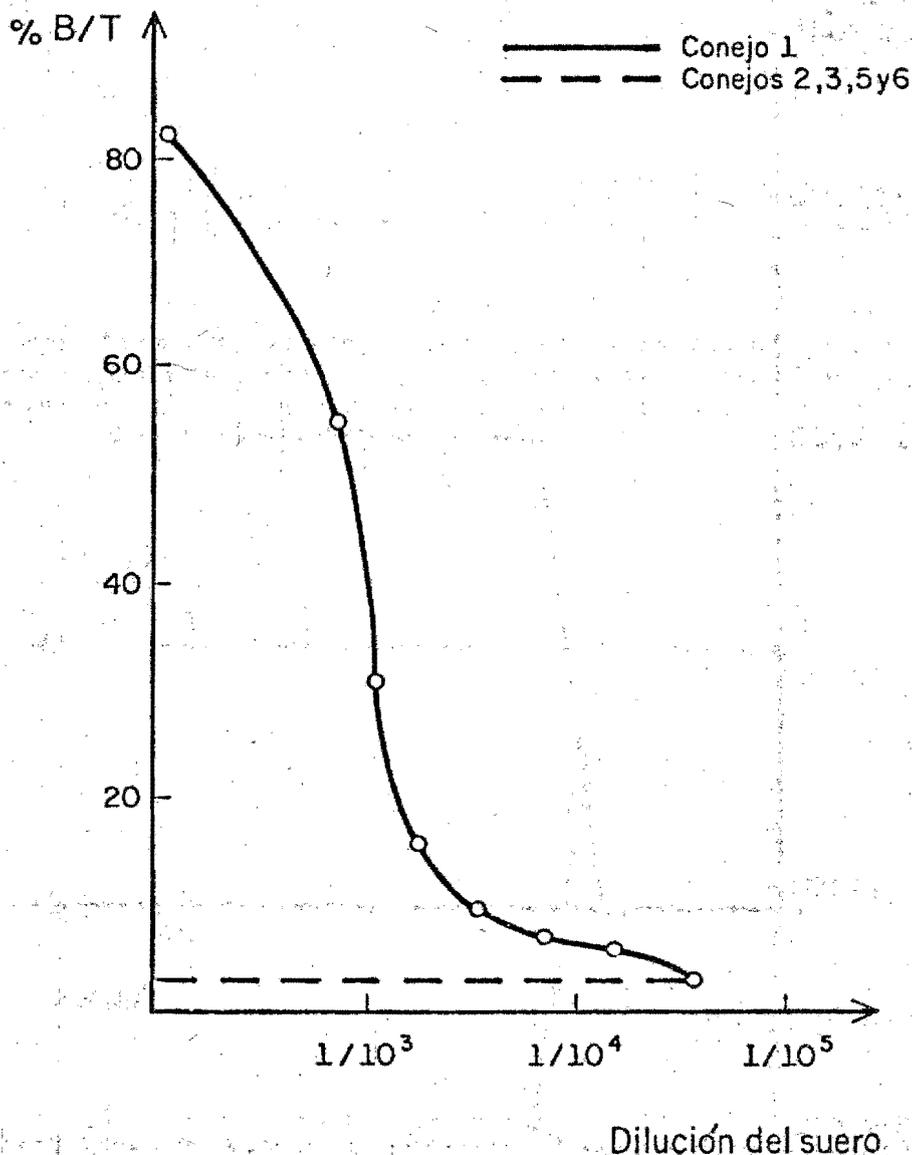
#### APENDICE D. EQUIPO EMPLEADO

Agitador magnético	Tri-R Magnetic Stirrer
Agitador vórtex	Vortex-Genie TM
Autoclave	American Cyclomatic Control
Balanza analítica	Mettler H54AR
Balanza granataria	Ohaus Harvard Trip
Cámara integrada al microscopio invertido	Contax RTS
Campana de flujo laminar	VECO GHFL-A
Centrífuga	Beckman J-6B
Centrífuga	Beckman Microfuge B
Centrífuga	Roto Uni BHG
Colector de fracciones	Gilson FC 80-K
Congelador (-20°C)	IEM De Luxe
Contador para radiaciones gamma	Gamma 5500
Evaporador	Savant RH 40-11
Espectrofotómetro	Spectronic 710
Incubadora (37°C)	NAPCO 5100
Microscopio invertido	Zeiss IM35
Microscopio óptico	Zeiss 61581
Potenciómetro	Fisher 320
Refrigerador (4°C)	IEM De Luxe
Sonicador	Sonicrep 150
Ultracongelador (-70°C)	Kelvinator Series 100



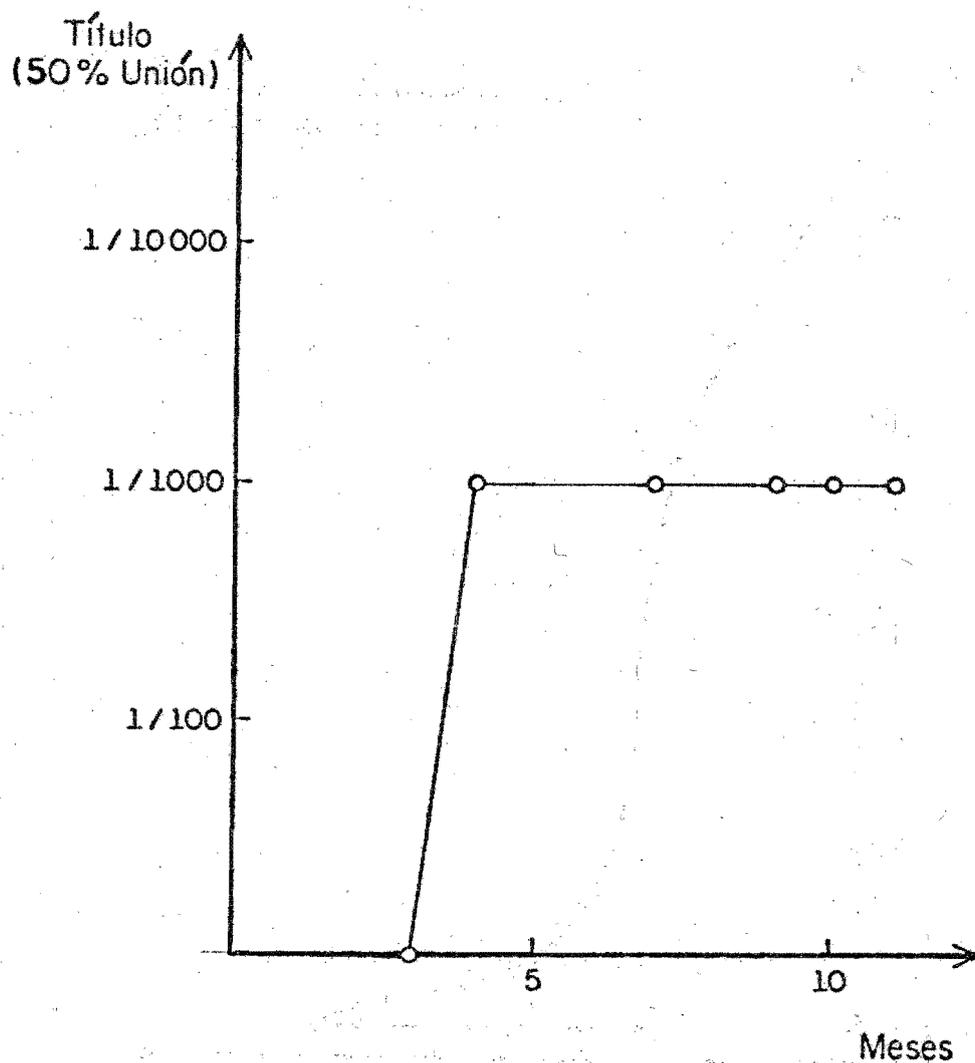
Se colectaron fracciones de 25 gotas (2.5 ml aproximadamente) y se registró la radiactividad de 5  $\mu$ l en un contador gamma. Se probó la inmunorreactividad de las fracciones 5 a 12 y 19 a 21 incubando triplicados de Bo, totales y NSB, como se explica en el texto. Se precipitó con etanol por centrifugación a 1800 g, durante quince minutos. Se empleó solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 % de BSA, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4.

Figura 1. Perfil cromatográfico obtenido al pasar la mezcla de iodación de TRH por una columna de Sephadex G-10



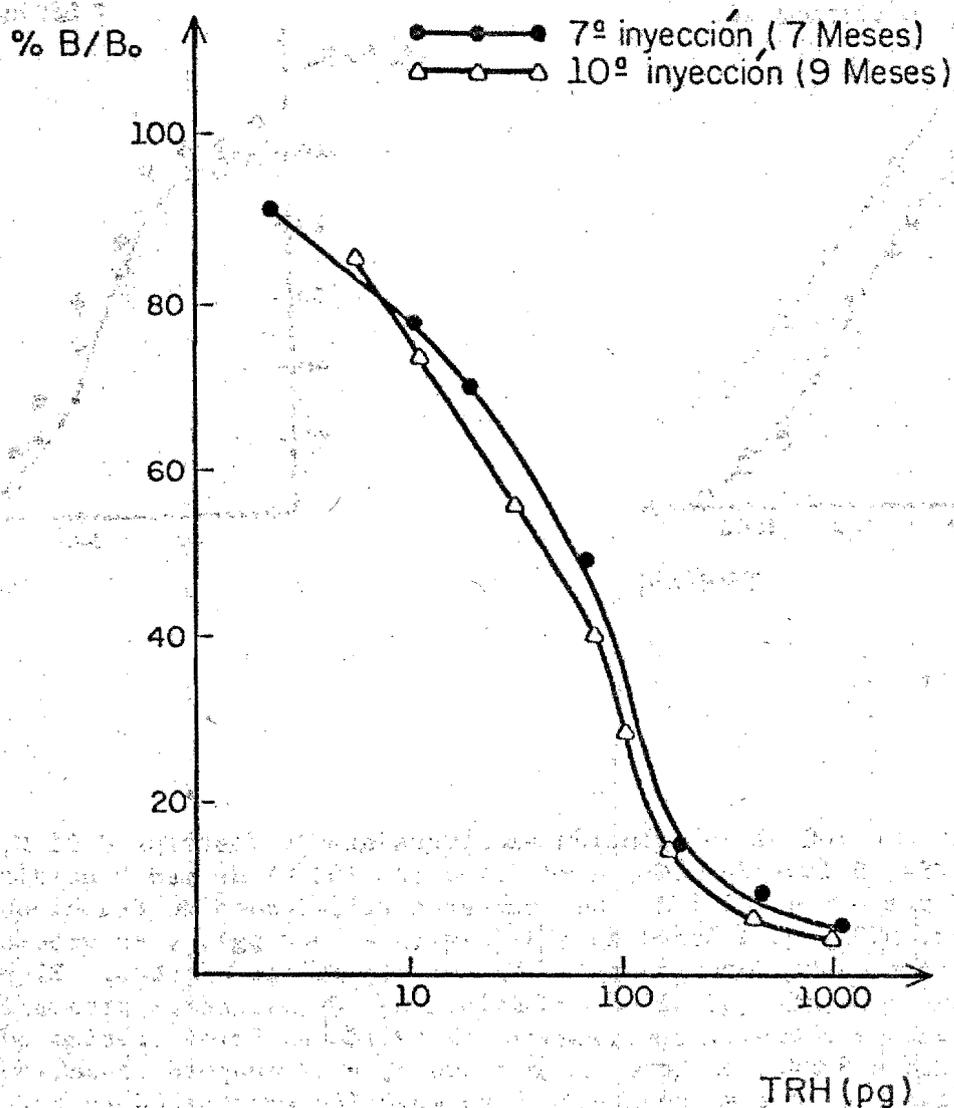
Se incubaron triplicados de  $B_0$ , totales (T) y NSB, y se precipitó con etanol por centrifugación al 800 g durante quince minutos. Aunque típicamente el título de un anticuerpo es el 50 % de B/T, interesa tener mayor sensibilidad. Así, se observa un 30 % de unión a una dilución final de 1/2 000, solamente para el conejo 1. El porcentaje de B/T se calcula con la siguiente fórmula:  $(B_0 - NSB) / T \times 100$ . Se empleó solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 % de BSA, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4.

Figura 2. Curvas de titulación del anticuerpo contra TRH



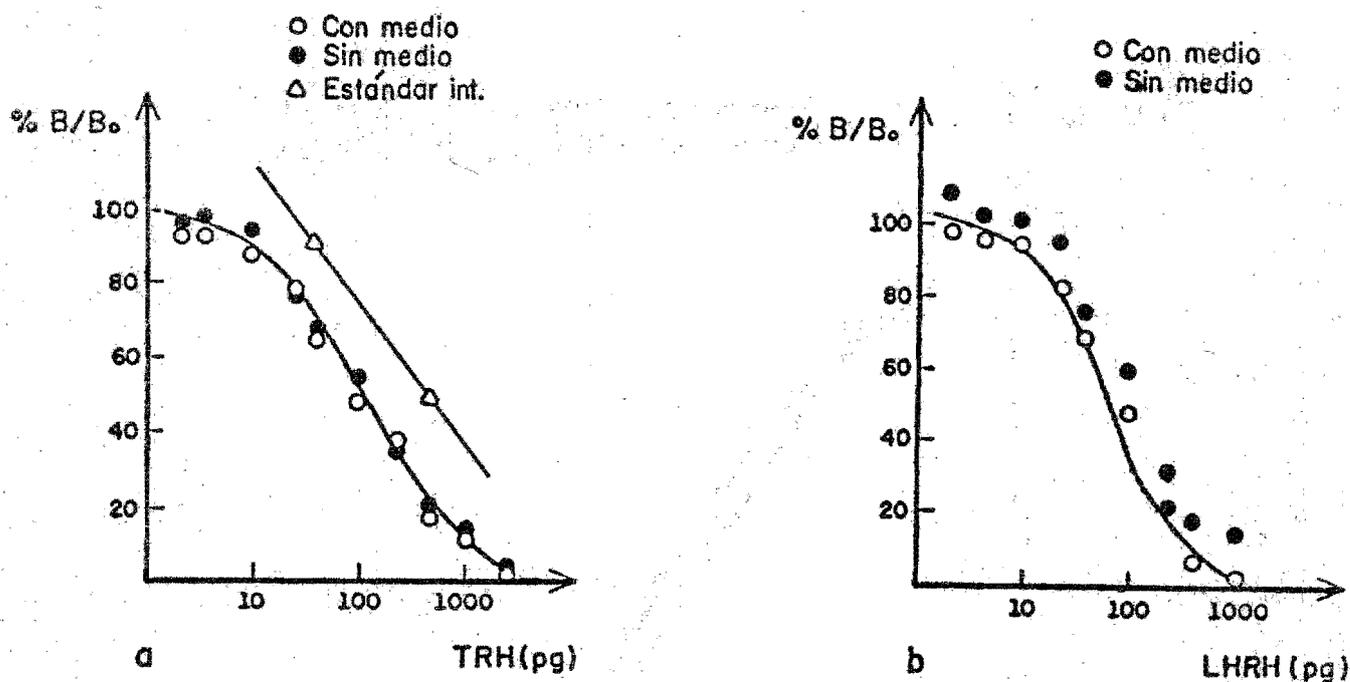
El título se define como la dilución necesaria de suero para producir un 50 % de desplazamiento (B/T). Se inyectó intradérmicamente el conjugado TRH-BDB-BSA en emulsión con adyuvante de Freud, cada tres semanas.

Figura 3. Título del anticuerpo contra TRH del conejo 1 a lo largo del tiempo.



Se incubaron por triplicado fracciones  $B_0$ , totales (T), NSB y diluciones de TRH frío (5 a 2 500 pg), y se precipitó con etanol por centrifugación a 1 800  $g$ , durante quince minutos. Se observa desplazamiento de cpm de  $^{125}I$ -TRH por concentraciones crecientes de TRH frío (B). El anticuerpo se empleó a una dilución final de 1/2 000, lo que da un 30 % de unión. El porcentaje de B/ $B_0$  se calcula con la siguiente fórmula:  $(\bar{B} - \overline{NSB}) / (\overline{B_0} - \overline{NSB}) \times 100$ . Se usó solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 % de BSA, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4.

Figura 4. Curvas estándar obtenidas a partir de la séptima y de la décima inyección

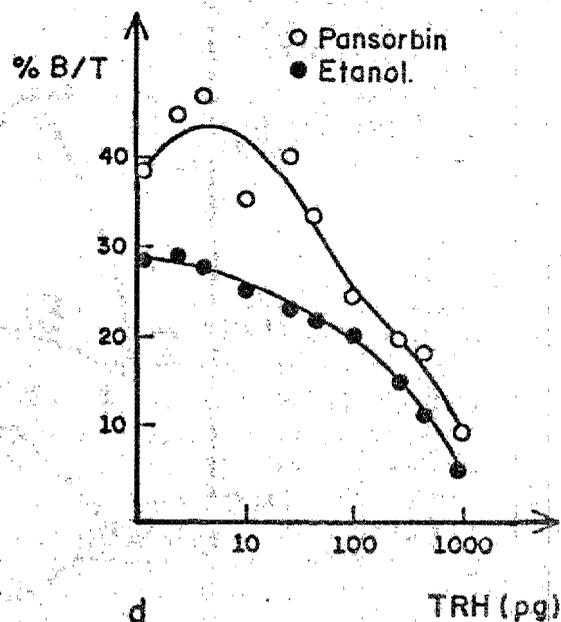
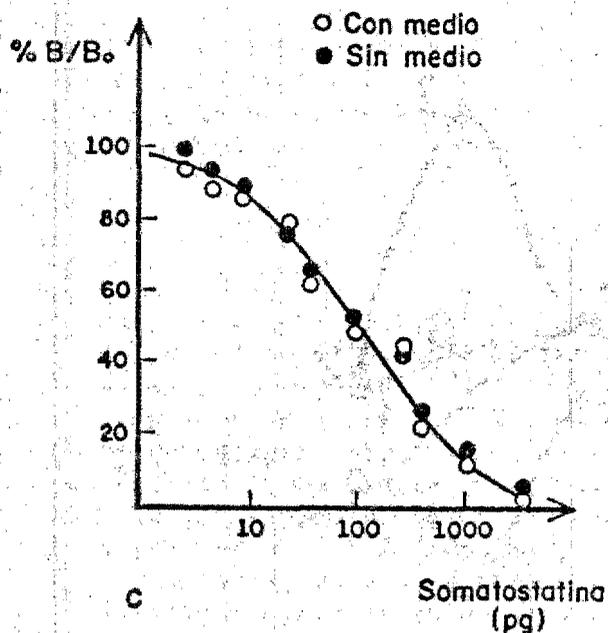


Se hicieron con 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.25 % de BSA, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4 o con 100  $\mu$ l de medio acidificado en 1/20 parte con HCl 1 N. Se incubaron triplicados de fracciones B<sub>0</sub>, totales, NSB y diluciones de TRH frío (5 a 2 500 pg), y se precipitó con etanol por centrifugación a 1 800 g durante quince minutos. El estándar interno muestra 50  $\mu$ l en dos diluciones de extractos hipotalámicos de ratones adultos. Se homogeneizó el tejido en ácido acético 20 %, se centrifugó a 8 000 g durante cinco minutos, y se evaporó el sobrenadante, el que a su vez se resuspendió en solución amortiguadora para hacer las diluciones. Los puntos del estándar interno corresponden a 0.5 y 0.05 de hipotálamo. El porcentaje de B/B<sub>0</sub> se calculó como se muestra en la figura 4.

Figura 5a. Curvas estándar de TRH

Se hicieron con 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.1% de gelatina, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4 o con 100  $\mu$ l de medio de cultivo acidificado. Se incubaron triplicados de fracciones B<sub>0</sub>, totales, NSB y diluciones de LHRH frío (0.5 a 1 000 pg), y se precipitó con etanol por centrifugación a 1 800 g durante quince minutos.

Figura 5b. Curvas estándar de LHRH

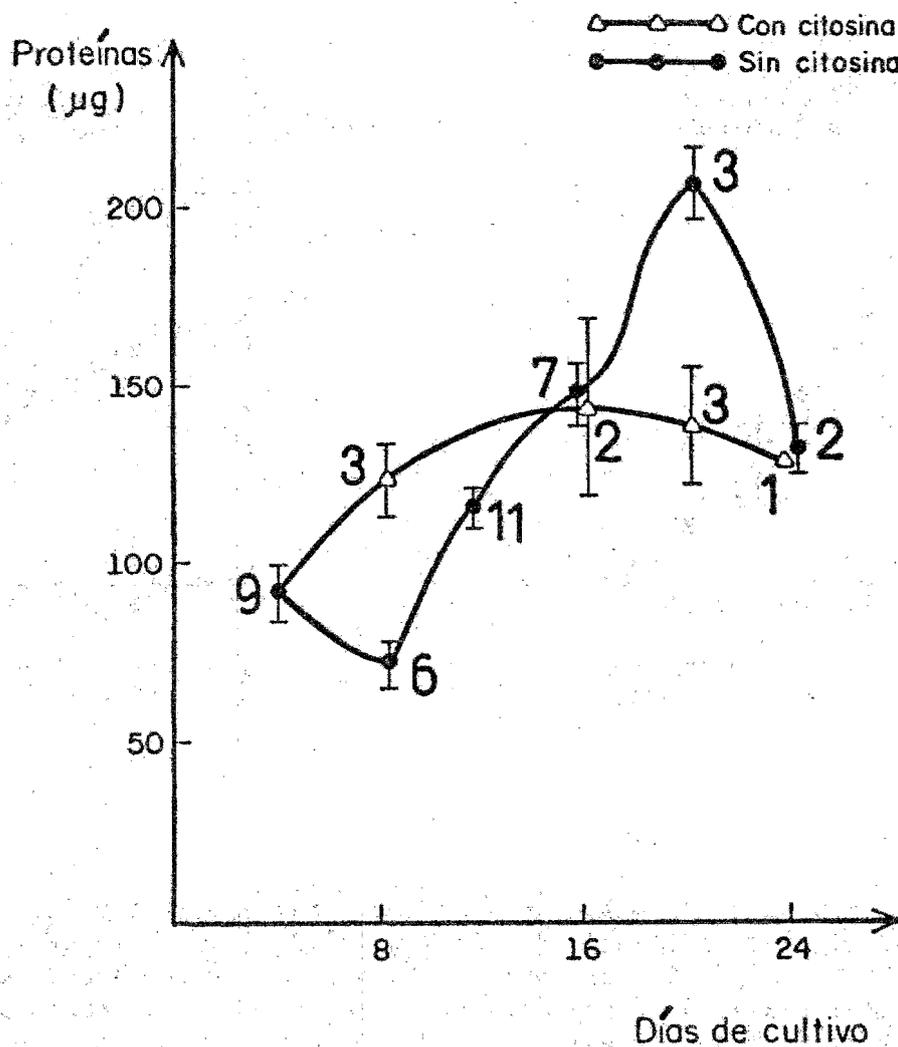


Se hicieron con 50  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 0.1 % de gelatina, 0.25 % de BSA, 0.08 M de NaCl, 0.02 % de azida de sodio, 0.025 M de EDTA, a pH 7.5 o con 50  $\mu$ l de medio de cultivo acidificado. Se incubaron triplicados de fracciones B<sub>0</sub>, totales, NSB y diluciones de somatostatina fría (7.8 a 2 000 pg), y se precipitó con etanol por centrifugación a 1 800 g durante quince minutos.

Figura 5c. Curvas estándar de somatostatina.

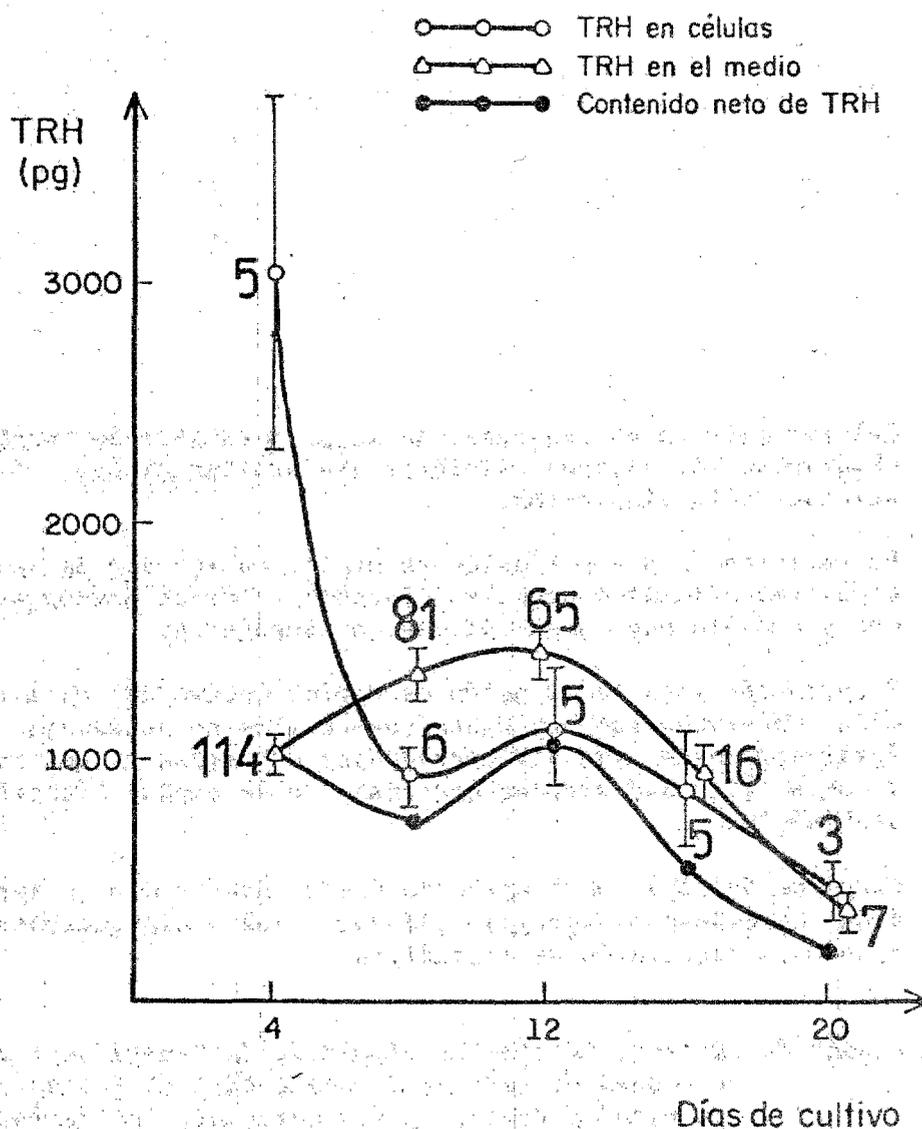
Se precipitó con etanol en proporción de 80 a 90 % o con Pansorbin. Para las curvas de cada péptido se emplearon las soluciones amortiguadoras mencionadas en las figuras 5a, b y c.

Figura 5d. Curvas estándar de TRH representativas de las encontradas para LHRH y somatostatina.



Se midió la cantidad de proteínas (Lowry *et al.*, 71) en los precipitados resultantes de la extracción celular de TRH, como se indica en el texto. Se realizó una curva estándar con diluciones por duplicado de BSA: 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Junto a los puntos se muestran números que representan la cantidad de determinaciones o cajas por día. La validación estadística está dada por la media  $\pm$  el error estándar (e.e.), donde e.e. = desviación estándar / raíz cuadrada del número de muestras. Las curvas representan el promedio de doce cultivos.

Figura 6. Niveles de proteínas por ml determinados en las células del cultivo a diferentes días, en presencia o en ausencia de citosina arabinósida

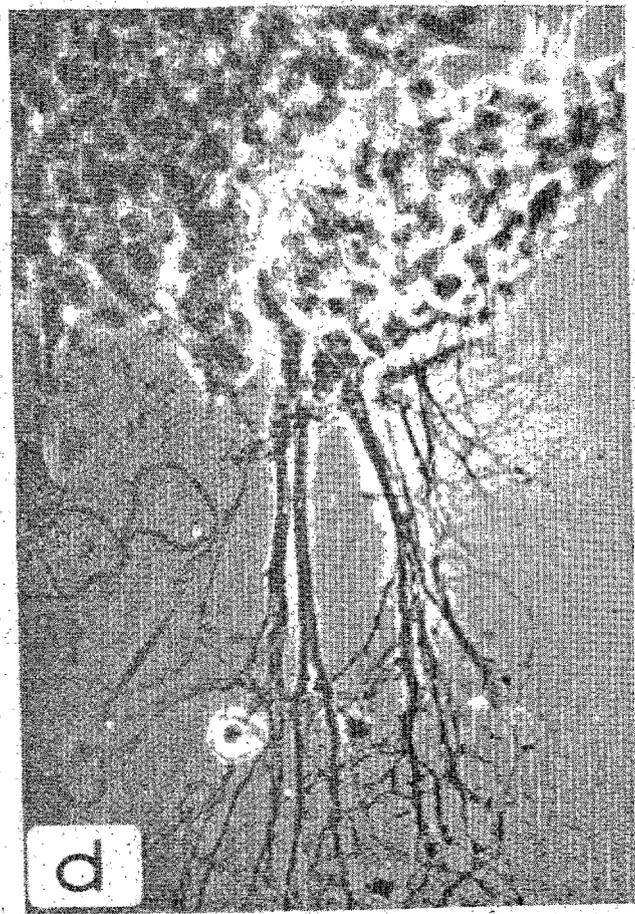
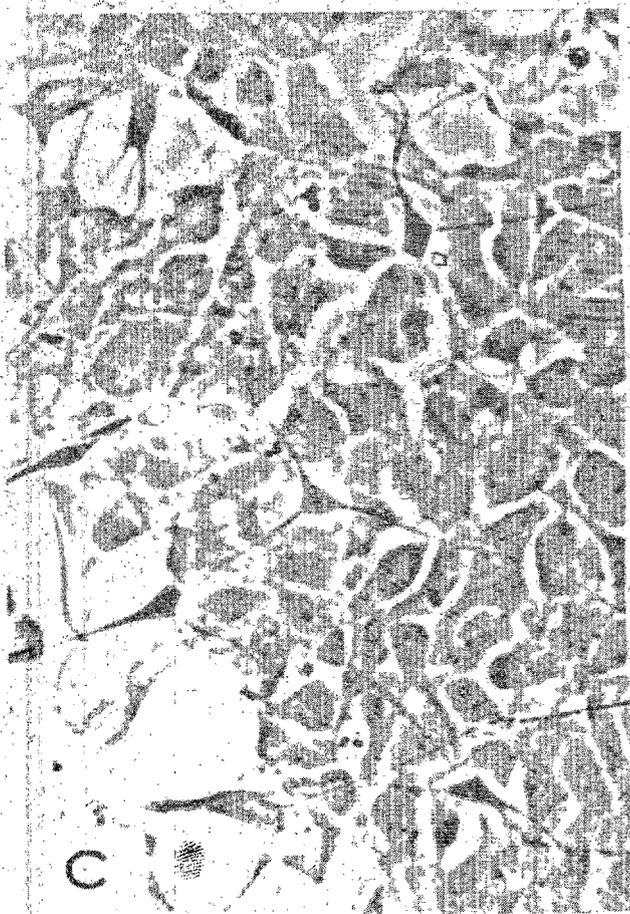
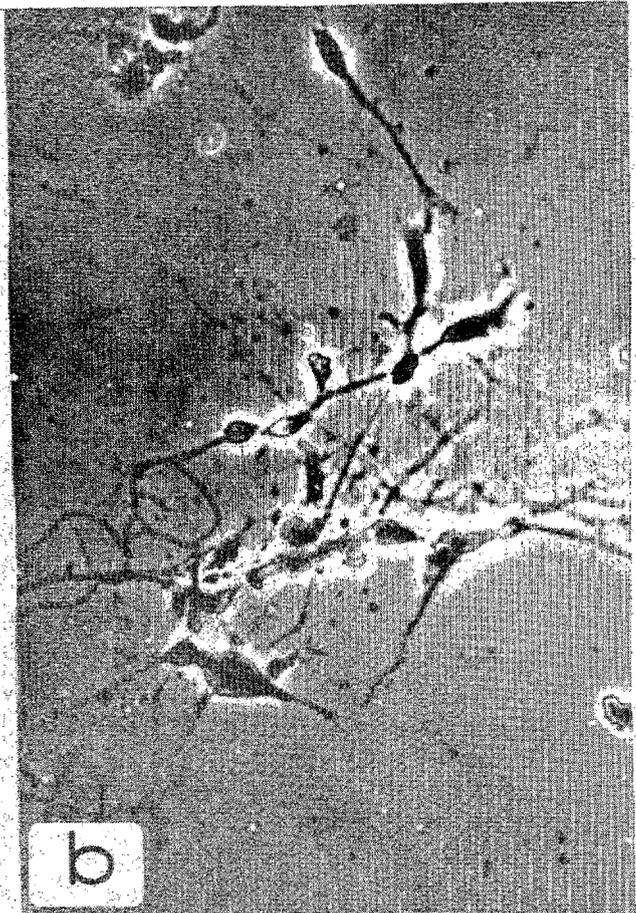
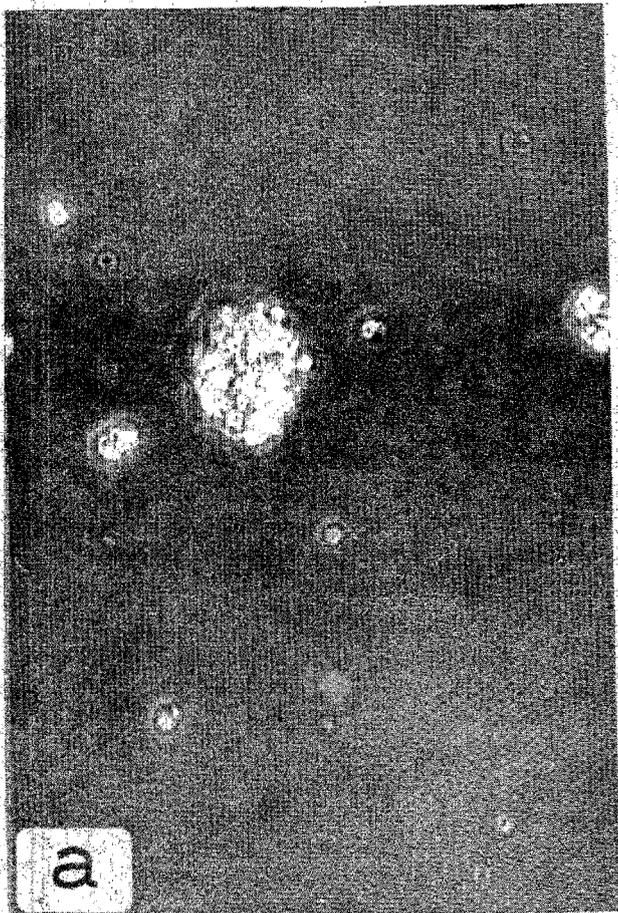


Se cambió el medio cada cuatro días, sustituyéndose 1 ml (acidificado en 1/20 parte con HCl 1 N) por medio frasco. El contenido neto de TRH en el medio de cultivo representa un descuento de la cantidad acumulada anteriormente y se calcula con la siguiente fórmula: concentración del día anterior / 2 + concentración del siguiente día. Junto a los puntos aparecen números que representan el total de muestras obtenidas de ocho cultivos, con un promedio de diez cajas por cultivo. La validación estadística se da por la media  $\pm$  el error estándar (e.e.).

Figura 7. Cuantificación de TRH por radioinmunoanálisis en las células y en el medio de cultivo, a diferentes días

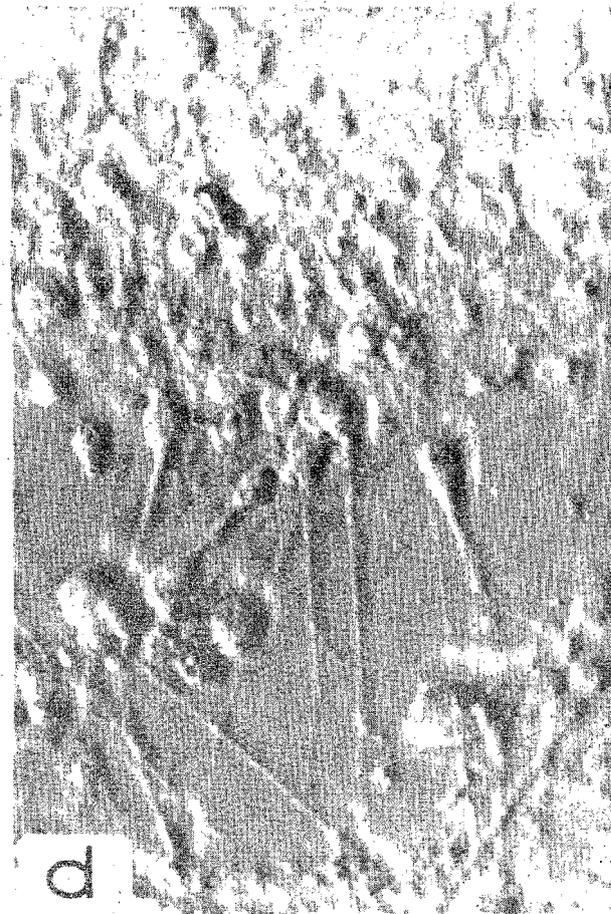
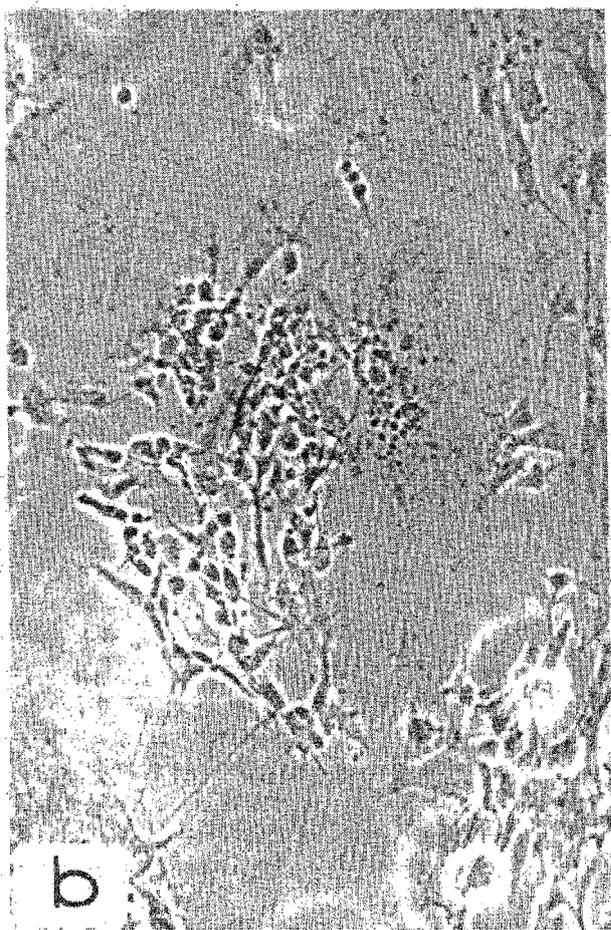
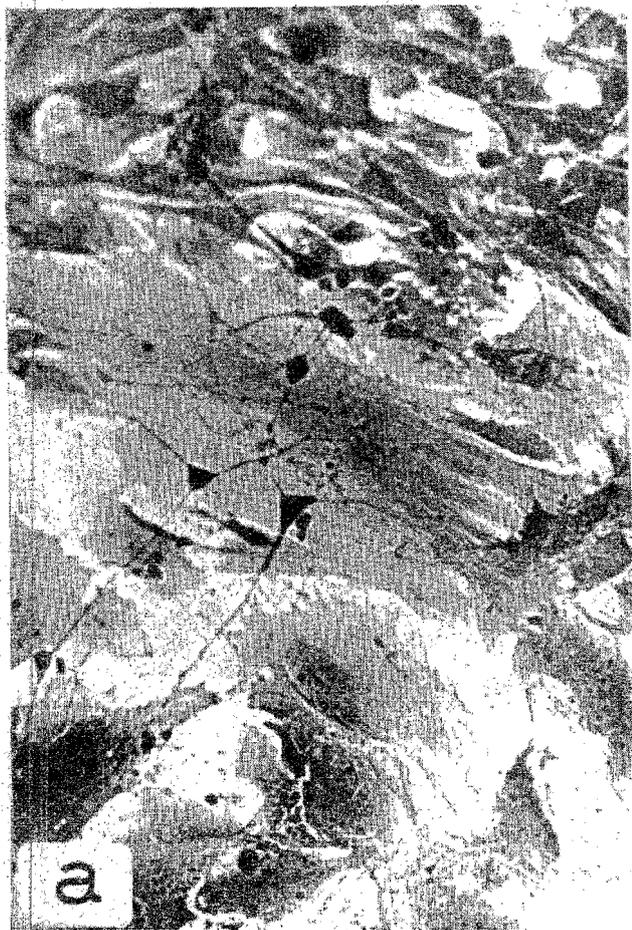
- a) Cultivo vivo en el día cero, en la primera hora de incubación. Obsérvanse los cuerpos celulares sin prolongaciones, como resultado de la dispersión.
- b) Preparación fija con tinción de osmio. Cuarto día de incubación. Las células neuronales empiezan a formar prolongaciones y todavía hay pocas células no neuronales.
- c) Preparación fija con tinción de osmio. Octavo día de incubación. Obsérvase que hay bastantes células no neuronales (principalmente glía y fibroblastos) adheridas al sustrato, y sobre ellas hay algunas neuronas. No se empleó citosina arabinósida.
- d) Preparación fija con tinción de osmio. Cuarto día de incubación. Obsérvase el agregado celular y sus prolongaciones, cuando la dispersión es incompleta.

*Figura 8. Cultivos de células dispersas de hipotálamos de embriones de ratones de trece días de gestación. Fotografías tomadas a 400 aumentos, con contraste de fases.*



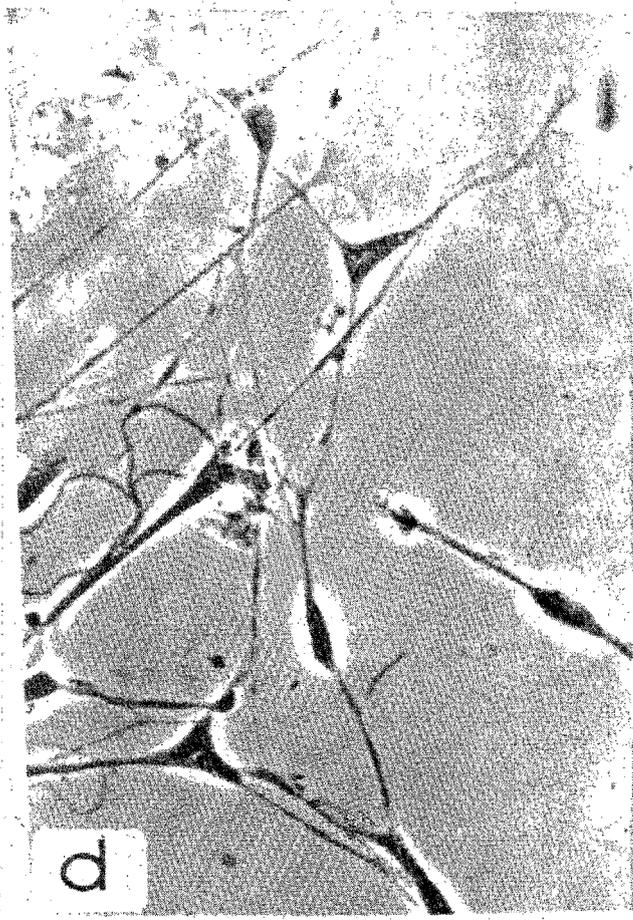
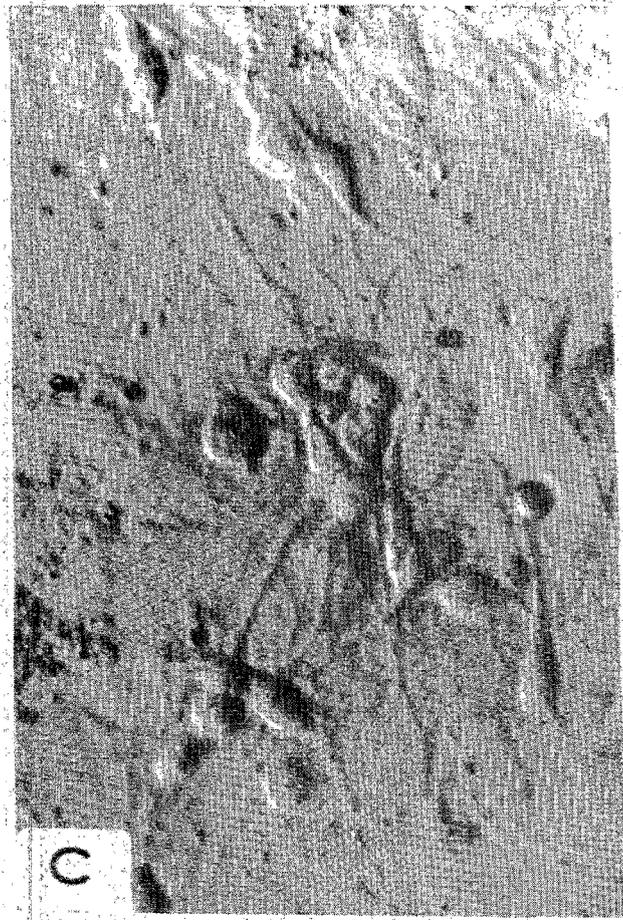
- a) y b) Preparaciones fijas con tinción de osmio. Undécimo día de incubación. Se emplearon embriones de doce días de gestación. No se empleó sustrato (poli-D-lisina) ni citosina arabinósida. Se observan pocas células de aspecto neuronal (aproximadamente 30% del área) y zonas sin células.
- c) Preparación fija con tinción de osmio. Cuarto día de incubación. Se utilizaron embriones de trece días de gestación. Se empleó poli-D-lisina como sustrato. Aparecen más células con aspecto neuronal (aproximadamente 70% del área).
- d) Cultivo vivo de seis días de incubación, hecho con embriones de quince días de gestación. También posee poli-D-lisina y pueden observarse bastantes células con aspecto neuronal (aproximadamente 70 % del área).

*Figura 9. Cultivos de células dispersas de hipotálamos de embriones de ratón. Fotografías tomadas con contraste de fases, a 400 aumentos*



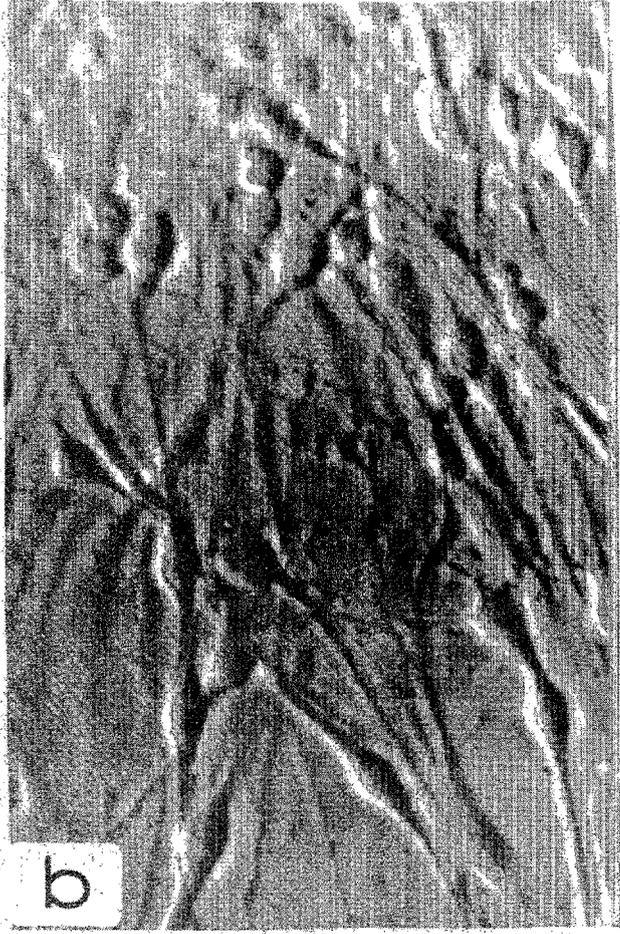
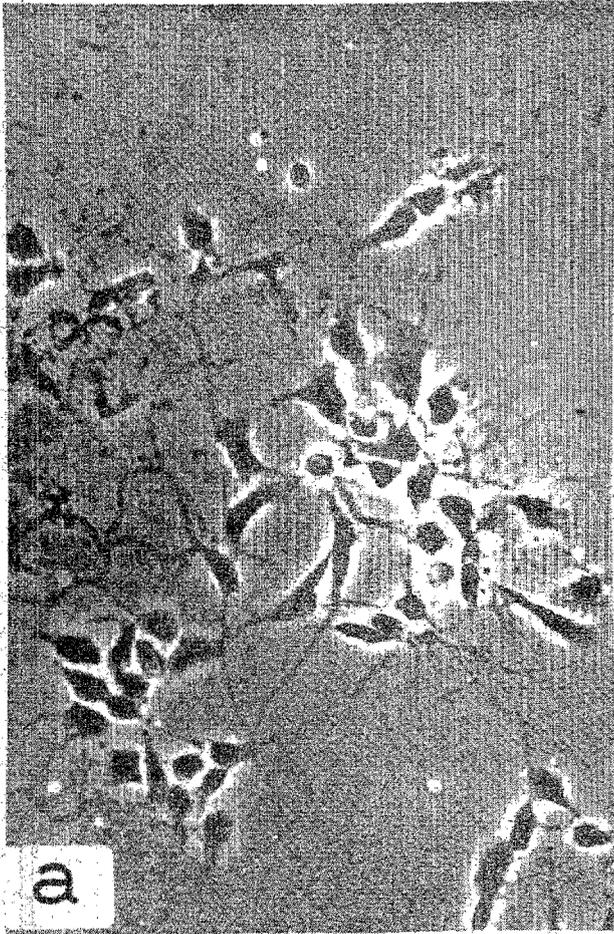
- a) Preparación fija con tinción de osmio. Octavo día de incubación. Se emplearon embriones de trece días de gestación. Obsérvese que en ausencia de citosina arabinósida las células no neuronales cubren completamente el sustrato.
- b) Preparación fija con tinción de osmio. Duodécimo día de incubación. Se usaron embriones de trece días de gestación. También se observan muchas células no neuronales y una sola neurona, al no emplearse el agente antimitótico.
- c) Cultivo vivo de nueve días de incubación, hecho con embriones de quince días de gestación. En presencia de citosina arabinósida desciende la cantidad de células no neuronales y se aprecian mejor las neuronas.
- d) Preparación fija con tinción de osmio. Duodécimo día de incubación. Se emplearon embriones de trece días de gestación. En presencia de citosina arabinósida no se observan en el fondo de la caja células no neuronales, pero sí hay células con aspecto neuronal.

*Figura 10. Cultivos de células dispersas de hipotálamos de embriones de ratón. Fotografías tomadas con contraste de fases, a 1 000 aumentos (a) y a 400 aumentos (b, c y d)*



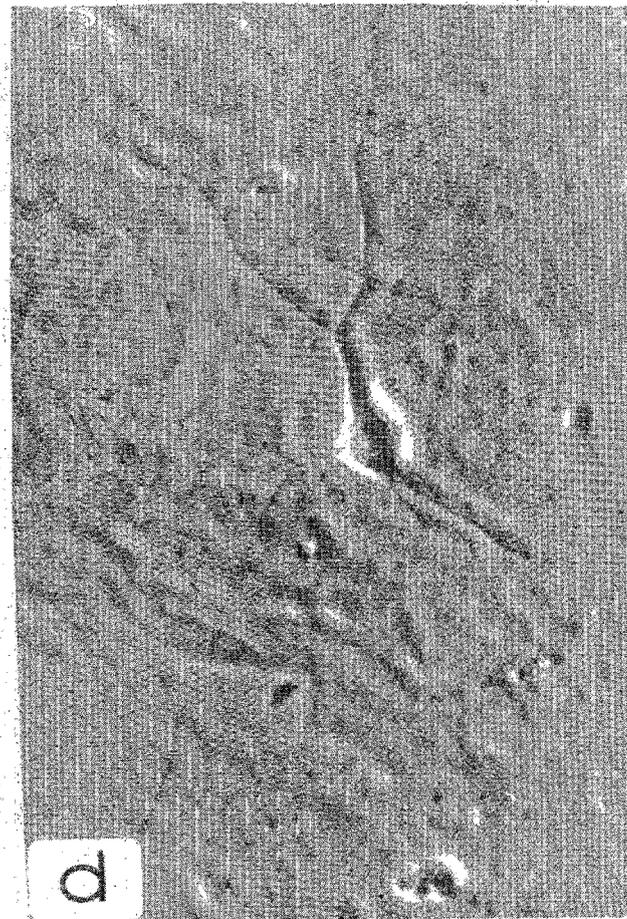
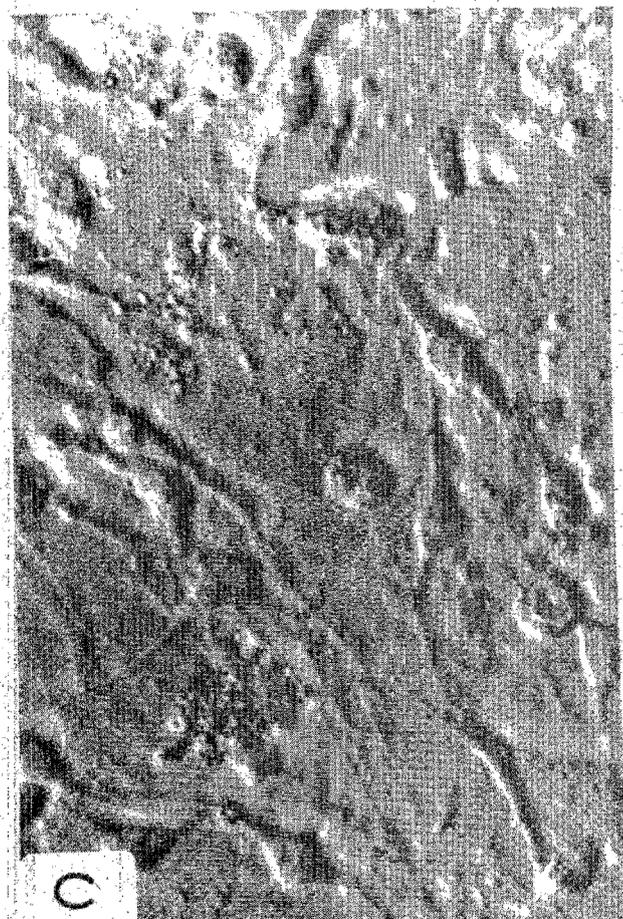
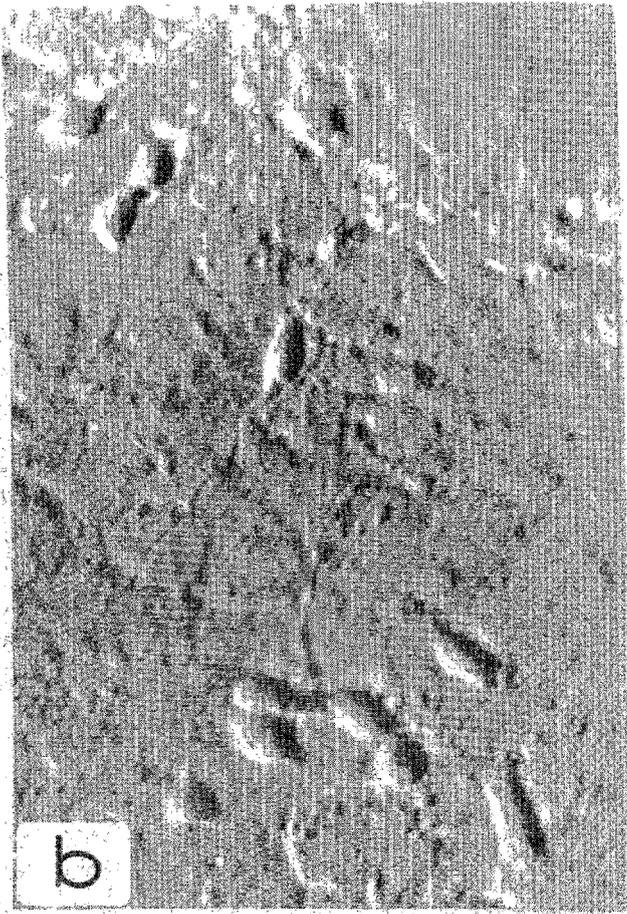
- a) Preparación fija con tinción de osmio. Cuarto día de incubación. Se emplearon embriones de trece días de gestación. Se consideró densidad óptima de  $1 \text{ a } 5 \times 10^5$  células en 2 ml de medio (caja grande).
- b) Cultivo vivo de nueve días de incubación y embriones de quince días de gestación. En este caso se consideró densidad óptima  $0.5 \times 10^5$  células en 1 ml de medio (caja chica).
- c) Cultivo vivo de nueve días de incubación y embriones de quince días de gestación. Se sembró a mayor densidad que la óptima ( $1.5 \times 10^5$  células en 1 ml) y a pesar de la presencia de citosina arabinósida se observa un exceso de células, que por consiguiente deben ser neuronas.
- d) Preparación fija con tinción de osmio. Se usaron embriones de trece días de gestación. Se sembró a menor densidad que la óptima ( $0.5 \times 10^5$  células en 2 ml) y por consiguiente se observan muy pocas células, a pesar de estar ausente la citosina arabinósida.

Figura 11. Cultivos de células dispersas de hipotálamos de embriones de ratón. Fotografías tomadas con contraste de fases, a 400 aumentos



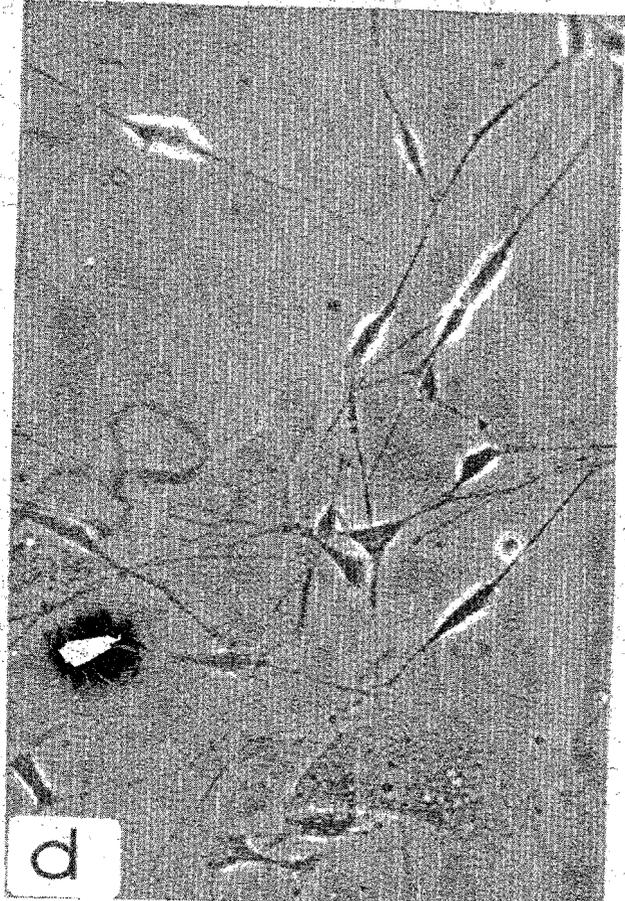
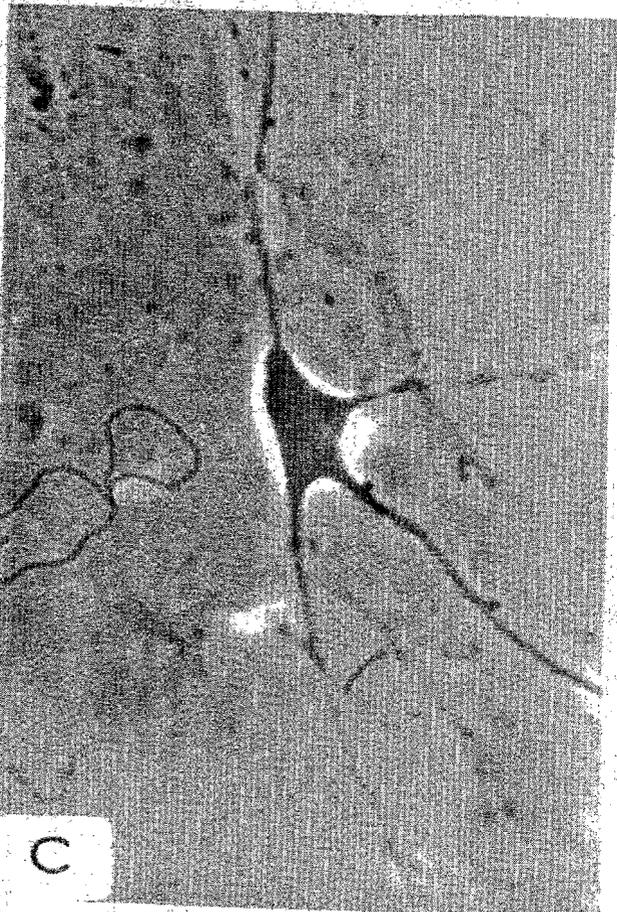
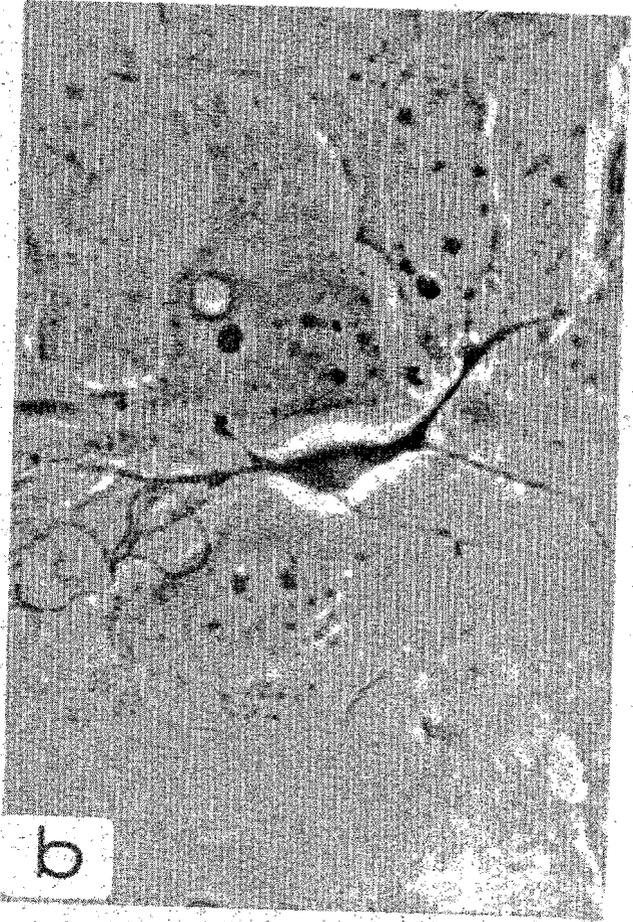
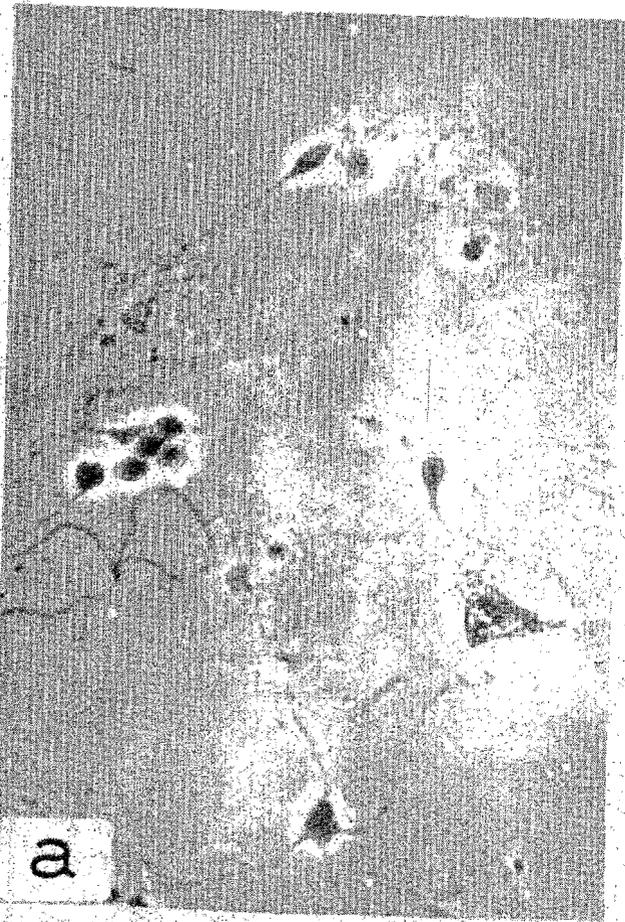
- a) Tres días de cultivo. Puede observarse en el centro una neurona bipolar.
- b) Seis días de cultivo. Pueden apreciarse más células.
- c) Nueve días de cultivo. Hay un aumento del número de células con aspecto neuronal, pero pocas no neuronales, debido seguramente a la presencia de citosina arabinósida.
- d) Quince días de cultivo. Empieza a haber degeneración y como consecuencia disminuye el número de células.

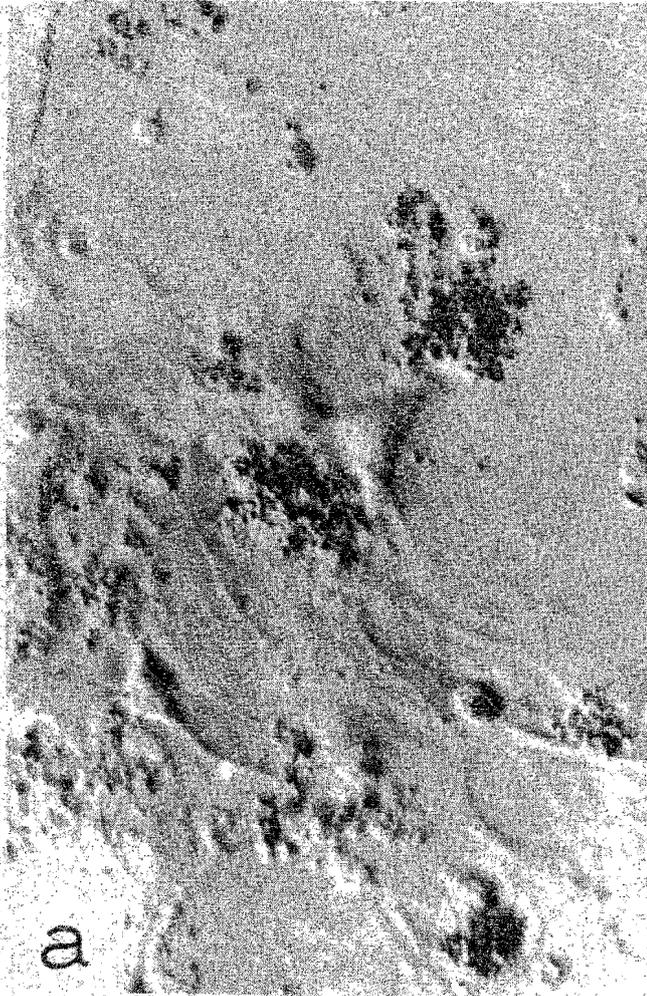
Figura 12. Secuencia completa del desarrollo de un cultivo de células dispersas de hipotálamos de embriones de quince días de gestación. Fotografías tomadas con contraste de fases, a 400 aumentos



- a) Cuatro días de cultivo, a 400 aumentos. Obsérvese que todavía hay pocas células.
- b) Ocho días de cultivo, a 1 000 aumentos. Acercamiento de una neurona creciendo sobre células no neuronales.
- c) Diez días de cultivo, a 1 000 aumentos. Acercamiento de una neurona multipolar.
- d) Doce días de cultivo, a 250 aumentos. Obsérvese mayor cantidad de células con apariencia neuronal y pocas no neuronales, debido a la presencia de citosina arabinósida.

*Figura 13. Secuencia completa del desarrollo de un cultivo por medio de preparaciones fijas con tinción de osmio. Se realizó con embriones de trece días de gestación. Fotografías tomadas con contraste de fases*





a

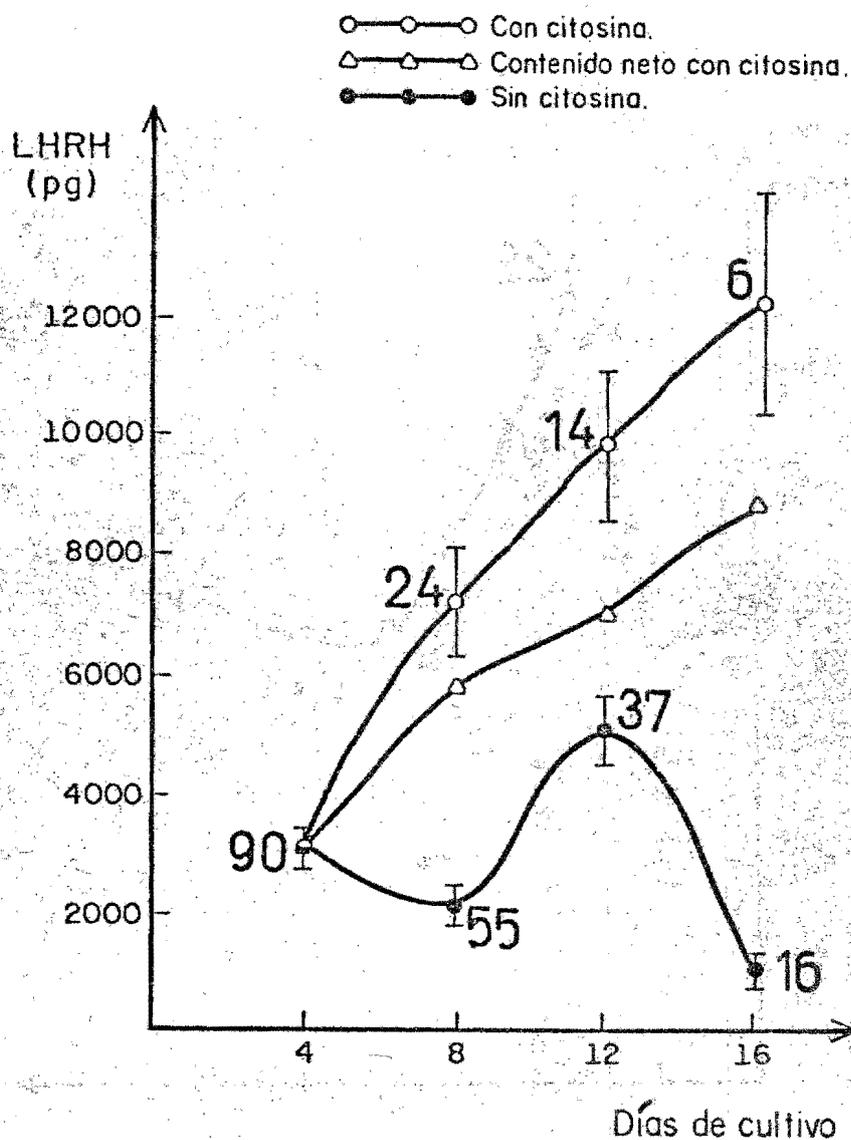
Seis días de cultivo.



b

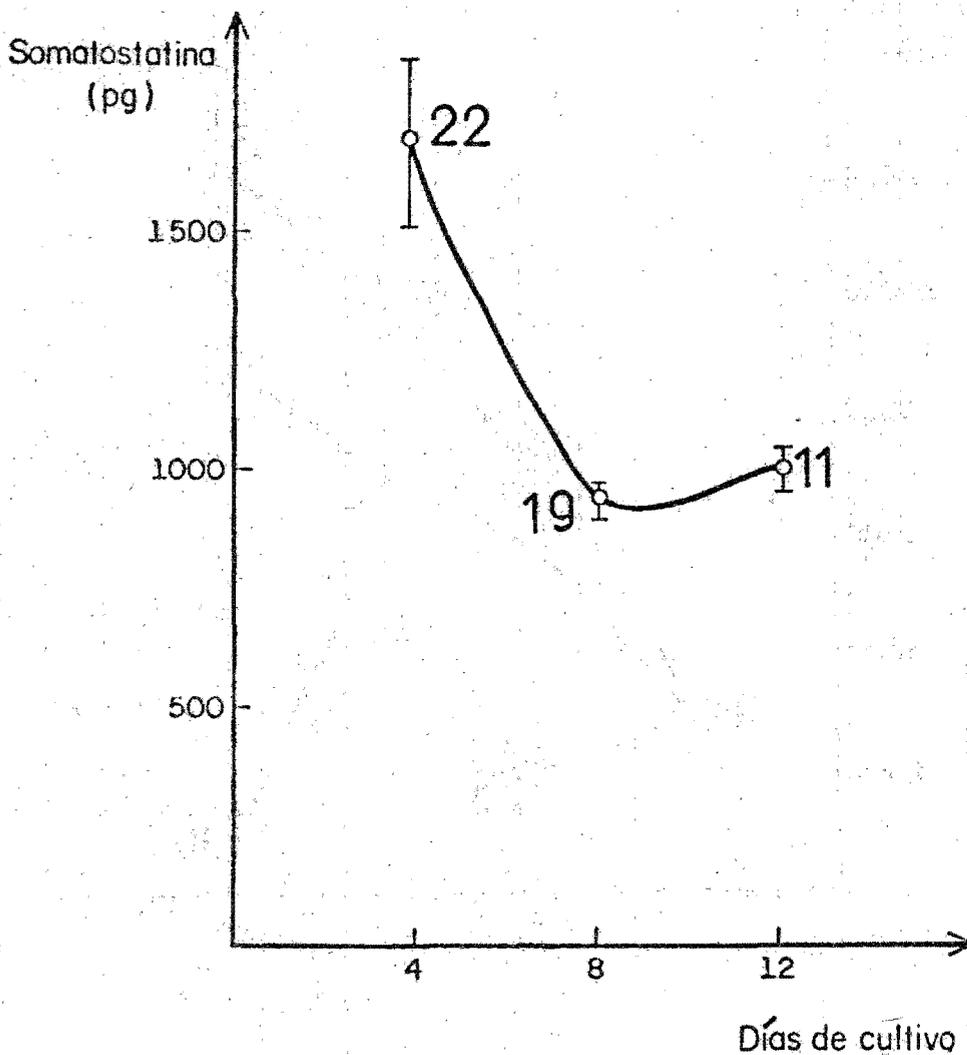
Nueve días de cultivo.

Figura 14. Cultivos vivos de células dispersas de hipotálamos de ratones de quince días de gestación. Fotografías tomadas con contraste de fases a 400 aumentos. Se observa detritus acumulado como resultado de muerte celular.



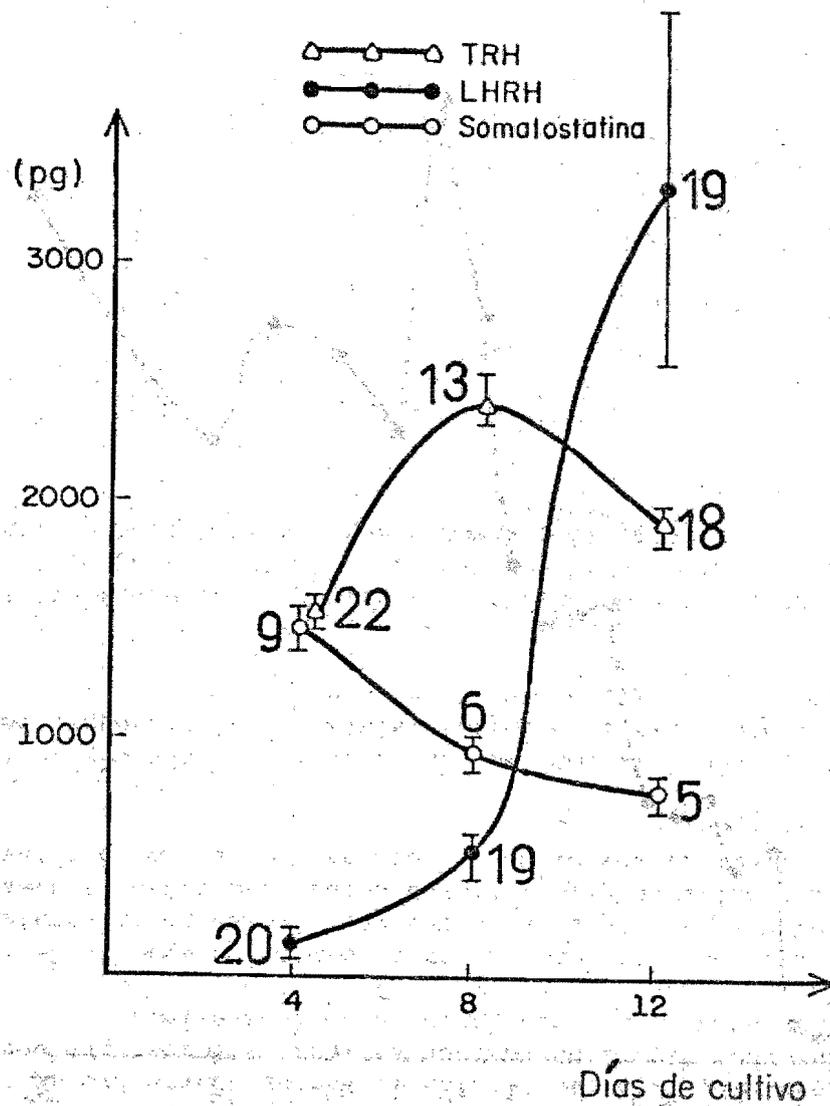
El contenido neto se calculó como se explica en la leyenda de la figura 7. Junto a los puntos aparecen números que representan el total de muestras obtenidas de ocho cultivos, con un promedio de diez cajas por cultivo. La validación estadística está dada por la media  $\pm$  el error estándar (e.e.).

Figura 15. Cuantificación de LHRH en el medio de cultivo por radioinmunoanálisis, en presencia y en ausencia de citosina arabinósida.



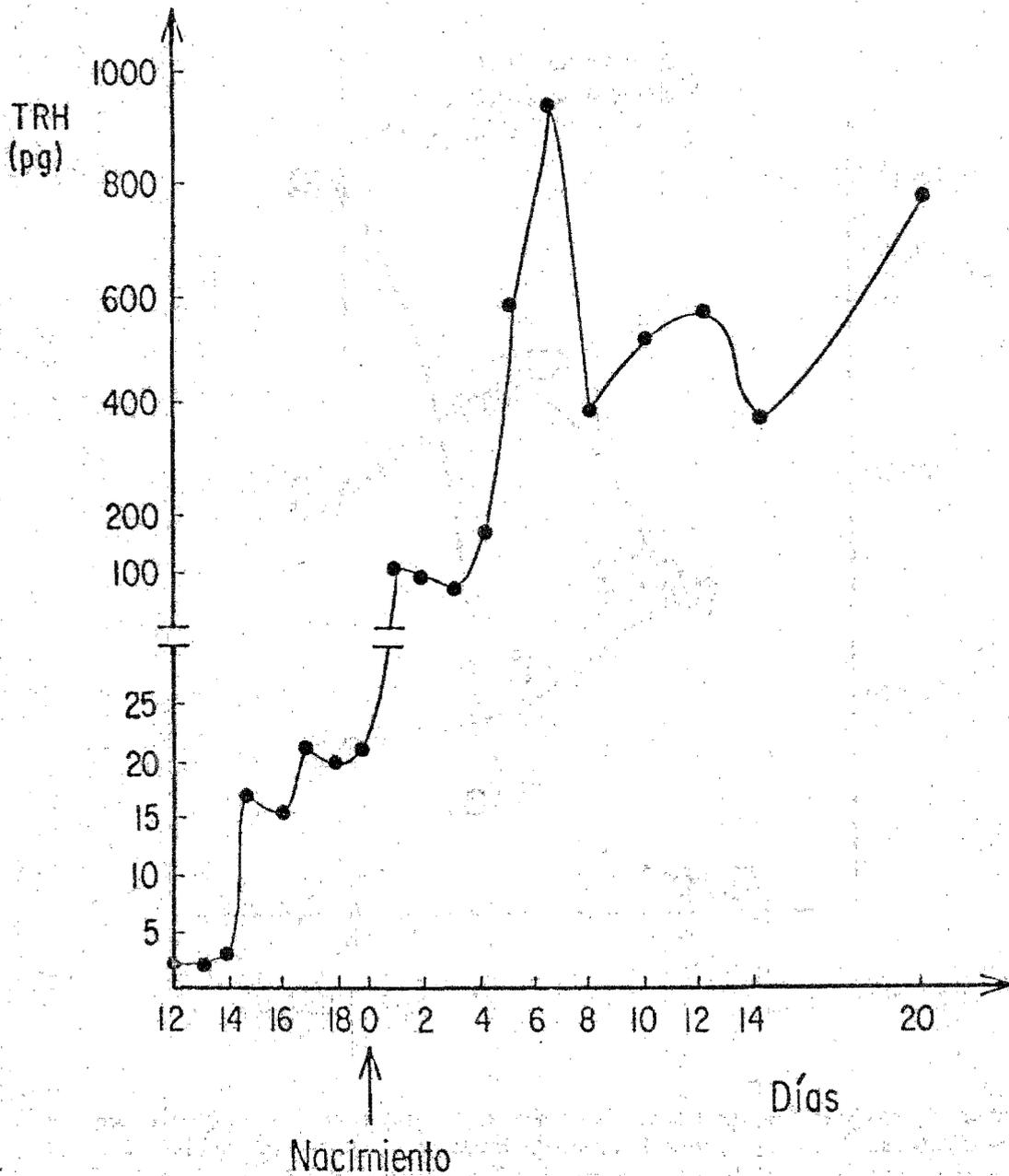
Junto a los puntos aparecen números que representan el total de muestras obtenidas de cuatro cultivos, con un promedio de diez cajas por cultivo. La validación estadística está dada por la media  $\pm$  el error estándar (e.e.).

Figura 16. Cuantificación de somatostatina en el medio de cultivo por radioinmunoanálisis



Junto a los puntos aparecen números que representan el total de muestras medidas en cada día, para cada péptido. La validación estadística está dada por la media  $\pm$  el error estándar (e.e.).

Figura 17. Cuantificación de TRH, LHRH y somatostatina en el medio de un solo cultivo por radioinmunoanálisis



Los resultados expresan el contenido total de TRH por hipotálamo. Se disecaron los hipotálamos y se sonicaron con ácido acético al 20 % y metanol absoluto. Se precipitó el tejido por centrifugación a 8 000 g, durante cinco minutos y el sobrenadante se evaporó y resuspendió en solución amortiguadora (fosfatos 0.05 M, 0.25 % de BSA, 0.15 M de NaCl, a pH 7.4).

Figura 18. Cuantificación de TRH en hipotálamos de ratones en el desarrollo y en la etapa posnatal (por radioinmunoanálisis)