

46

2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCION DE UN CULTIVO PRIMARIO DE HIPOFISIS ANTERIOR DE RATA HEMBRA DE 14 DIAS DE EDAD EN UN MEDIO DEFINIDO: PARTICIPACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO (FGF) EN LA SUPERVIVENCIA Y FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS GONADOTROPAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARTHA ELENA CRUZ SOTO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

ASESOR: MA. EUGENIA MENDOZA G.



FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: OBTENCION DE UN CULTIVO PRIMARIO DE HIPOFISIS ANTERIOR DE RATA HEMBRA DE 14 DIAS DE EDAD EN UN MEDIO DEFINIDO: PARTICIPACION DEL FGF (FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO) EN LA SUPERVIVENCIA Y FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS GONADOTROPAS

realizado por CRUZ SOTO MARTHA ELENA

con número de cuenta 8635712-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario DRA. MARIA EUGENIA DEL CARMEN MENDOZA GARRIDO *Mendo*
 Propietario DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA *no tiene de la*
 Propietario DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA *Marcia Hiriart*
 Suplente DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES *Marcela Aguil*
 Suplente DR. RENE DE JESUS GONZALEZ *René de Jesús*



COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

A LA MEMORIA DE MI MADRE:

MARIA DE LOURDES SOTO

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
1.- GLANDULA PITUITARIA	
Adenohipófisis	
Células gonadotropas	
La hormona liberadora de gonadotropinas GnRH	
Gonadotropinas	
2.- DESARROLLO DE LA RATA.....	11
3.- FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO BASICO (bFGF).....	14
Acciones del factor de crecimiento fibroblástico en hipófisis	
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	
4.- MEDIOS DEFINIDOS.....	22
5.- CULTIVOS CELULARES.....	23
Cultivo celular primario	
Líneas celulares	
6.- MATRIZ EXTRACELULAR.....	25
Sustrato	
Poliisina	
Colágena	
Fibronectina	
II. JUSTIFICACION.....	28
III. HIPOTESIS.....	29

IV. OBJETIVOS	30
V. MATERIALES Y METODOS	32
Preparación de la caja de cultivo	
Medio definido de cultivo	
Medio enriquecido con suero bovino fetal	
Cultivo primario de células gonadotropas	
Prueba de exclusión celular	
Prueba de viabilidad celular con el método de sales de tetrazolio	
Experimento con GnRH	
Radioinmunoanálisis	
Inmunocitoquímica FSH	
VI. RESULTADOS	43
Medio definido	
Sustrato	
Efecto del factor de crecimiento fibroblástico en la función secretora de las células gonadotropas	
Morfología de las células de hipófisis anterior en cultivo	
Prueba de viabilidad celular con el método de sales de tetrazolio	
Medición de las células inmunorreactivas	
VII. DISCUSION	58
VIII. CONCLUSIONES	64
APENDICE A: Soluciones y medios de cultivo	66
APENDICE B: Soluciones radioinmunoanálisis	70
APENDICE C: Soluciones inmunocitoquímica	75
BIBLIOGRAFIA	80

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Camerino Cruz Cleris, a quien admiro, respeto y adoro, por todo el amor, apoyo y paciencia.

A mi querida madre María de Lourdes Soto Galicia, *pensé que te habías ido, ahora sé que sólo te has desplazado, puedo notar que las estrellas han perdido su lugar y no has dejado un momento sin estar junto a mí.*

A mi hermano Carlos Angel Cruz Soto, *hace 22 años intentaron apagar tu luz, mi alma aun no ha dejado de llorarte, y desde entonces eres tú quien cada amanecer brilla con luz infinita.*

A mis queridísimos hermanos: Eloy, Lourdes, Eugenia, Carmen y Guadalupe. Gracias por su infinito cariño y gran apoyo para la impresión de este trabajo.

Al resto de mi familia: mis 9 sobrinos, tías y cuñados. En especial a Daniel García por su particular contribución a este trabajo.

A David Valdespino Sicardo *now I know that there are no victories in all our histories without love.*

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Ciencias por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

A la doctora María Eugenia Mendoza Garrido mi profesora, directora de tesis y amiga. Te agradezco haberme iniciado en la investigación y compartir tu gran experiencia e ideas conmigo durante estos cuatro años de intenso trabajo.

A la doctora Marta Romano por todo su apoyo, ya que este trabajo no habría sido posible sin el equipo de su laboratorio, el cual forma parte del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I.P.N.

A todas las personas del CINVESTAV: Q.F.B. Elizabeth Becerra, Dr. Carlos Argüello y Dr. Tsutsumi quienes me orientaron en la técnica de la inmunocitoquímica. A los técnicos del bioterio, Rafael Arroyo y Demetrio. A Luz María Buendía por su trabajo secretarial. A Claudia Toral y David Valdespino por su apoyo con el equipo de cómputo en la realización de las gráficas y el texto de mi trabajo. A José Luna por la orientación para realizar las fotografías de este trabajo. A Ignacio Araoz Martínez por la elaboración de los esquemas de este trabajo. A los técnicos del laboratorio, Jesús y Armando. A mis compañeros y amigos de laboratorio: Claudia, Ceyde, Carmen, Pati, Dolores, Manuel, Mario y Raúl.

A mis profesores: Homero Céspedes Vite, Rafael Zárate, José Barrera Gil, Emigdio Alcántara, María Eugenia Mendoza, Alfredo Rodal, Miguel Cervantes, Catherine Rousselet y los que no menciono pero aun recuerdo.

A mis sinodales: Dra. María Luisa Fanjul, Dra. Marcia Hiriart, Dra. Marcela Aguilar y Dr. René Cárdenas. Gracias por su tiempo y consejos.

A mis queridos amigos y colegas: Samantha Karam, Patricia Amaya, Sergio Mendoza, Octavio Rojas, Carlos Ruiz, Juan Carlos Molinero, Mario Alberto Suárez, Carlos Ugarte, Esperanza Gómez y muy especialmente a Araceli Estévez Nava.

A mi prima, amiga y colega Magali Zacarías Soto.

I. INTRODUCCION

1.- GLANDULA PITUITARIA

Por debajo del hipotálamo se encuentra la hipófisis o glándula pituitaria, es una glándula endócrina de capital importancia en el funcionamiento del cuerpo humano. El tejido de la hipófisis forma una masa compacta contenida en una depresión del hueso esfenoides conocida como " silla turca". Es una glándula doble y cada porción, con el mismo origen embriológico, funciona de manera diferente. A partir del diencefalo del embrión, se extiende hacia abajo una prolongación hueca digitiforme del infundíbulo (futuro hipotálamo). Al mismo tiempo crece hacia arriba, desde el estomodeo (futura boca del embrión) una bolsa del ectodermo (capa germinativa externa del embrión), llamada bolsa de Rathke. Estas dos estructuras embrionarias se unen para formar la hipófisis del adulto. Se reconocen dos regiones principales en esta glándula, la adenohipófisis, procedente de la bolsa de Rathke y la neurohipófisis formada a partir del tejido cerebral (Figura 1).

La adenohipófisis es irrigada por el sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Figura 2): la sangre que baña a la eminencia media (región donde se encuentran los axones terminales de las neuronas secretoras del hipotálamo) pasa directamente a través de este sistema a la adenohipófisis, lo anterior permite que los factores hipotalámicos que regulan las secreciones de la hipófisis lleguen directamente, sin diluirse, en la circulación periférica. (Noback *et al*, 1975; Romer/Parsons, 1981)

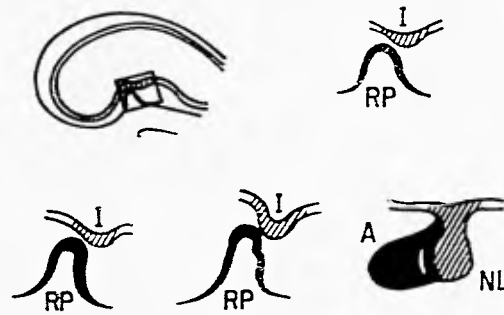


Figura 1. Desarrollo de la hipófisis entre la 4a . y 8a. semanas de gestación en el humano. A: lóbulo anterior; I: infundíbulo; NL: lóbulo neural y RP: bolsa de Rathke. Fuente: Dubois et al. p. 2 (1995).

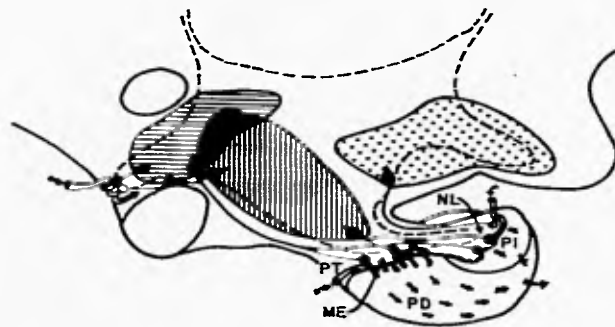


Figura 2. Relación entre la hipófisis y el hipotálamo. Las flechas indican la dirección de la corriente sanguínea. ME: eminencia media; NL: lóbulo neural; PD: pars distalis; PI: pars intermedia y PT: pars tuberalis. Fuente: Chester, *et al.* p. 287 (1987).

La hipófisis está dividida de la siguiente forma (Chester *et al.* 1987):

ADENOHIPOFISIS.- *Pars tuberalis*

(LOBULO *Pars distalis*

ANTERIOR) *Pars intermedia*

LOBULO POSTERIOR

NEUROHIPOFISIS.- *Lobulo neural*

Infundíbulo: *Tronco infundibular*

Eminencia media

ADENOHIPOFISIS

La adenohipófisis que se origina del ectodermo oral, presenta células poligonales en cordones rodeados por un sistema capilar sinusoidal. La mayoría de las células presentan gránulos secretores que contienen hormonas, se les conoce como células cromófilas; otras células que también contienen hormonas son más pequeñas, y no se colorean, por tal razón se les denomina cromófobas. Las células cromófilas han sido divididas en basófilas y acidófilas según su afinidad a colorantes básicos o ácidos, respectivamente. Gracias a estos estudios histológicos se ha podido caracterizar la población celular de la hipófisis anterior, sus células son tirotropas, corticotropas y gonadotropas del grupo de las basófilas; mamotropas y somatotropas del grupo de las acidófilas.

Todas éstas secretan hormonas que gobiernan la función de otras

glándulas o tejidos periféricos: la hormona estimulante de la tiroides (TSH) que como su nombre lo indica estimula a la glándula tiroides; la prolactina (PRL), estimula mamas, glándulas reproductoras y sistema inmune; la hormona adrenocorticotropa (ACTH), estimula las glándulas suprarrenales; la hormona del crecimiento (GH), estimula los tejidos periféricos; la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), estimulan las gónadas (Dubois, 1995; Goodman, 1988).

En la hipófisis se describe la presencia de unas células de tipo granular llamadas células folículo estelares (FS), (Denef, C. 1989). Estas células tienen ciertas funciones de acuerdo a sus características morfológicas. Función de soporte en lobulillos. Además actúan como fagocitos, y reguladoras de la microcirculación en las cavidades intersticiales. Por último se les ha asignado un papel metabólico (Katayama y cols., 1992) y están envueltas en la regulación de la síntesis de matriz extracelular y juegan el papel de restauradoras de las células granulares de la hipófisis. Son el tipo celular predominante en la bolsa de Rathke (Gospodarowicz y Ferrara 1989). Los trabajos de Ferrara *et al* en 1987, demostraron que las células folículo estelares producen el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

CELULAS GONADOTROPAS

Las células gonadotropas son grandes y redondas, presentan gránulos de aproximadamente 200 nm, mientras algunas otras muestran gránulos de mayor tamaño 400-500 nm. (Noback, 1975; Dubois, 1990) Los dos tipos de gránulos son secretores, los cuales contienen las

gonadotropinas LH y/o FSH. Por otra parte, se sabe que en la hipófisis durante el período entre los 13 y 15 días de vida postnatal, existen dos tipos de gonadotropas: a) células pequeñas similares a la población celular infantil que contienen pocos gránulos pleiomórficos, y b) células de mayor tamaño semejantes a las células de adulto. Childs *et al.* En 1981 denominaron a esta etapa como de *transición*.

Otro trabajo de Childs, *et al.* (1992), describe células gonadotropas de diferentes tamaños durante el ciclo estral de la rata hembra adulta, cuya proporción varía en función del estímulo de las hormonas esteroideas.

Existe un grupo de gonadotropas pequeñas semejantes a aquellos de las ratas inmaduras (neonatales); se menciona que estas gonadotropas pueden funcionar como de reserva. Otro tipo son gonadotropas de tamaño medio con gránulos bien definidos y el tercer tipo lo forman gonadotropas con gránulos grandes y pequeños, separados en vacuolas.

LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS GnRH

La GnRH es un decapeptido hipotalámico secretado por neuronas, es una hormona trófica que estimula la biosíntesis y secreción de LH y FSH, ya que las células gonadotropas presentan receptores de superficie para esta hormona (Figura 3), (Smith y Neill, 1987).

La concentración de los receptores de GnRH está regulada negativamente por testosterona y progesterona, mientras que la regulación positiva es llevada a cabo por el estradiol.

Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LH-RH)
pyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Figura 3. Secuencia de la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH (LHRH). Fuente: Chester, *et al.* p. 368 (1987).

La GnRH *in vivo* e *in vitro* regula sus propios receptores, aumentando o disminuyendo su concentración mediante su secreción pulsátil o continua, respectivamente (Clayton, 1988).

El cDNA del receptor de GnRH ha sido clonado y se ha encontrado que codifica una variante única del séptimo dominio de estructura transmembranal, la cual, es característica de los receptores de hormonas peptídicas que actúan a través de proteínas G. La unión de GnRH con sus receptores conduce la estimulación de una gran cantidad de actividades de fosfolipasa en la membrana plasmática. La intercomunicación entre estas vías ocasiona la modulación diferencial de inositol 1,4,5 - trifosfato (InsP3) y de las señales de diacilglicerol, con los requerimientos específicos para estos segundos mensajeros durante la fase inicial y las subsecuentes de la respuesta de calcio citoplasmático inducida por GnRH.

La ocupación de receptor de GnRH activa a la fosfolipasa C de membrana para hidrolizar polifosfoinosítidos, dando lugar a la formación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacil glicerol, el cual, activa a la proteína cinasa C (Figura 4), (Stanko *et al.* 1994).

Estudios en gonadotropas han demostrado que la producción agonista-estimulada de InsP3 está asociada a cambios complejos espacio-temporales en la concentración de calcio interno. Estas células también expresan canales de calcio voltaje-dependientes y disparan potenciales de acción. Diversos estudios relacionados con la modulación de la excitabilidad inducida por GnRH en las gonadotropas, han dado pistas del mecanismo por el cual, los cambios en la actividad eléctrica de la membrana son integrados con la liberación de calcio intracelular mediados por InsP3.

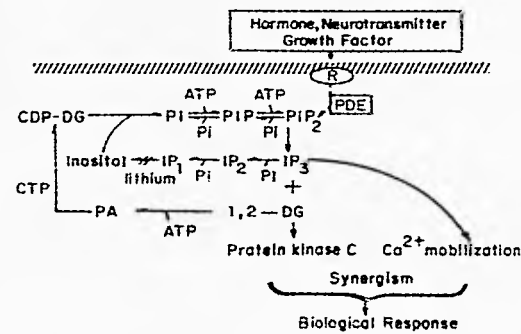


Figura 4. Transducción de la señal de GnRH, mediante la reorganización del fosfatidil inositol (PI). Al unirse la GnRH a su receptor, éste complejo induce la activación de la fosfolipasa C (PDE), dando como resultado la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) para generar diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP₃). Siendo estos últimos considerados como segundos mensajeros. El IP₃ moviliza calcio del retículo endoplásmico generando un incremento del mismo en el citoplasma. Posteriormente, se mantiene el calcio citoplasmático elevado por la entrada del ion a través de canales de calcio voltage-dependientes del medio extracelular. Durante la reorganización de PI el DG se fosforila, dando lugar al ácido fosfatídico (PA), el cual facilita, a su vez, la entrada de calcio. Fuente: Naor y Childs. p.168 (1986).

Los trabajos de Dubois, *et al.* (1990), han demostrado *in vitro*, que una dosis baja de GnRH desde el inicio del cultivo promueve la diferenciación de las gonadotropas de rata entre los días 11 y 12 del período de gestación en un medio definido.

GONADOTROPINAS

La LH y FSH son hormonas de tipo glucoproteico. Contienen azúcares unidos covalentemente a residuos de asparagina en la cadena polipeptídica. Presentan dos unidades peptídicas denominadas alfa y beta, las cuales no presentan unión covalente. Ninguna de estas subunidades son biológicamente activas por separado, es necesaria la presencia del complejo alfa-beta.

Los órganos blanco de la FSH son las gónadas, en los ovarios estimula el crecimiento de los folículos y la secreción de estrógenos por las células de la granulosa y éstas proliferan como respuesta a la estimulación por FSH y estrógenos. En los testículos actúa sobre las células de Sertoli y promueve la maduración de los espermatozoides (Goodman, 1988).

En lo que respecta a la LH, en el ovario estimula la ovulación del folículo maduro, la formación del cuerpo lúteo y la síntesis de estrógenos y progesterona por este último. Sus receptores se encuentran en las células de la teca interna del ovario. En el testículo estimula las células intersticiales de Leydig para sintetizar y secretar testosterona.

Childs, *et al.* en 1992, demostró que en la rata hembra adulto, durante el ciclo estral, se presentan células gonadotropas de tres tamaños diferentes

y que algunas de las gonadotropas que pertenecen al grupo de las pequeñas, responden a GnRH *in vitro*, aumentando de tamaño y cambiando su patrón de almacenaje hormonal de monohormonal (LH o FSH) a bihormonal (LH y FSH).

2.- DESARROLLO DE LA RATA

De acuerdo a los trabajos de Andrews *et al.* (1981), los primeros días de vida postnatal de la rata se pueden dividir de la siguiente forma:

El período neonatal se refiere a la fase del desarrollo, la cual, se extiende desde el día del nacimiento al día número 7. El período infantil corresponde a la fase del desarrollo que comprende del día 7 al día 21. Mientras que la etapa juvenil está comprendida entre los días 21 y 32 (Andrews y Ojeda, 1981).

Los trabajos de Ojeda, *et al.* en 1977, mostraron que los niveles séricos de LH y FSH están elevados en las etapas tempranas del desarrollo de la rata hembra y estos niveles se relacionan con una mayor respuesta hacia la GnRH. Mientras que los trabajos de Döhler y Wuttke en 1974/75 muestran que los niveles séricos de FSH en la rata hembra presentan un aumento considerable entre los 13 y los 15 días de edad; de igual manera para la LH, en comparación con otras edades (Figuras 5 y 6).

Los altos niveles de gonadotropinas circulantes caracterizan el período infantil de la rata hembra (Smith y Ojeda, 1986).

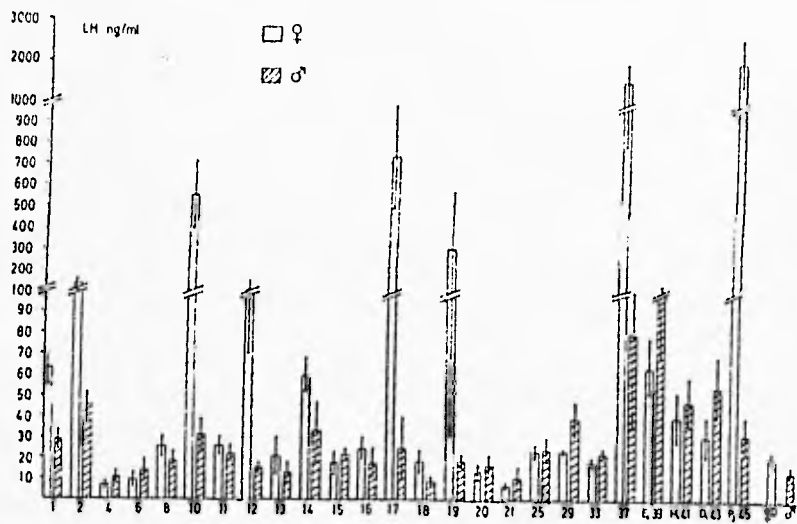


Figura 5. Niveles séricos de la hormona luteinizante (LH) en ratas hembra y macho, del nacimiento hasta los 3 meses de edad. Fuente: Döhler y Wuttke p. 1004 (1975).

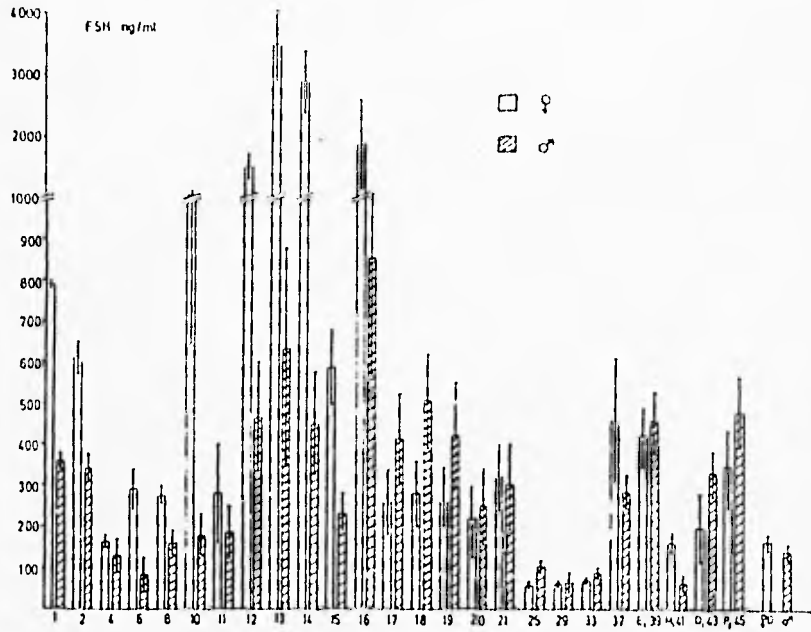


Figura 6. Niveles séricos de la hormona folículo estimulante (FSH) en ratas hembra y macho, desde el nacimiento hasta los 3 meses de edad. Fuente: Döhler y Wuttke p. 1005 (1975).

De la misma manera se sabe que estas hormonas interactúan en el ovario infantil, promoviendo la secreción de estradiol en forma similar a aquella que se produce en los animales adultos (Andrews, *et al.* 1981).

Durante el desarrollo postnatal, el incremento más rápido en el contenido de los receptores FSH del ovario, coincide con el tiempo durante el cual, los niveles séricos de gonadotropinas, especialmente el de FSH, están más elevados.

3.- FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO BASICO

En 1939 se realizaron extractos de cerebro, los cuales demostraron que contenían factores que promovían la proliferación de fibroblastos *in vitro* (Trowell, O. 1934; Hoffman, R. 1940). Siguiendo esta idea Gospodarowicz *et al.* en 1987 extrajeron y purificaron un mitógeno polipeptídico de las células de la línea 3T3 de la hipófisis bovina y posteriormente las aislaron del cerebro, este polipéptido fue nombrado factor de crecimiento fibroblástico. Posteriormente fue caracterizado como un polipéptido básico, el cual, posee actividad mitogénica para células derivadas del mesodermo y del neuroectodermo.

Ahora se conoce a la familia de los factores de crecimiento fibroblástico que son polipéptidos con sitios de unión para heparina y consta de siete miembros conocidos FGF 1 a 7 (Ledoux, D., 1992):

- 1 acid FGF (aFGF)
- 2 basic FGF (bFGF)
- 3 hst

4 int 2

5 FGF 5

6 FGF 6

7 FGF 7 o KGF

Los más abundantes son el ácido y el básico. Este último ya unido al receptor de alta afinidad, ejerce su acción biológica a través de su actividad intrínseca de tirosina cinasa. En ausencia del receptor de baja afinidad el bFGF no liga a su receptor de alta afinidad y no es activo. La heparina exógena puede facilitar la unión al receptor de alta afinidad para activar al bFGF (Klagsbrun, M. y Baird, A. 1991).

La unión a los receptores por los factores de crecimiento induce la dimerización del receptor, transfosforilación y una asociación subsecuente con moléculas citoplásmicas de señal ocasionando la síntesis de ADN y puede inducir la diferenciación (Li-Y 1994).

El bFGF es una cadena peptídica sencilla con un peso molecular de 22 KDa en el cerebro de rata, compuesta por 156 amino ácidos (Figura 7). Gracias al selectivo método de purificación de cromatografía por afinidad heparín-sefarosa se sabe que posee dos sitios potenciales de unión para heparina: residuos 18-22 y 107-110 (Iberg y Klagsbrun, 1990). En 1986 Gospodarowicz, *et al.* encontraron que la heparina protege al bFGF de desnaturalización e inactivación.

El bFGF es un potente mitógeno para las células derivadas del mesodermo, también se sabe que estabiliza el fenotipo de células en cultivo y alarga la vida del mismo (Gospodarowicz, *et al.* 1986).



Figura 7. Estructura del bFGF, donde se muestran los dominios funcionales——; péptidos de unión al receptor—;residuos básicos del 105 al 128----- de la cadena (10. La estructura de este factor consiste en 12 cadenas antiparalelas arregladas con un patrón de simetría interna triplegada. Las cadenas están numeradas secuencialmente del 1 al 12. Fuente: Zhu, *et al.* p. 93 (1991).

Las células que responden al factor de crecimiento fibroblástico básico presentan receptores de superficie celular específicos, los cuales, tienen una densidad aproximada de 10^3 - 10^4 receptores / célula. El bFGF no se une a receptores de otros factores de crecimiento, ni otros factores de crecimiento se unen al receptor del bFGF.

El bFGF se une a receptores de alta y baja afinidad llamados proteoglicanos heparín-sulfatados (HSPG). Presentes en la superficie celular y matriz extracelular. Esta unión puede explicarse en cuatro pasos (Figura 8):

- 1.- El bFGF es exportado hacia la matriz extracelular por la célula.
- 2.- Es secuestrado como un complejo con HSPG y está disponible a los receptores de superficie de baja afinidad, por procesos aun desconocidos.
- 3.- De esta asociación a HSPG se puede donar el factor de crecimiento a uno o varios receptores de alta afinidad.
- 4.- El bFGF es internalizado a la célula por los receptores para iniciar la respuesta celular.

Por otro lado, Ruoslahti y Yamaguchi en 1991 extendieron esta observación a los demás factores de crecimiento en la que la mayoría de los proteoglicanos funcionan como moduladores de los factores de crecimiento.

ACCIONES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO EN HIPOFISIS

Existen algunos trabajos del bFGF en hipófisis, Baird, *et al.* (1986), muestran que la adición de FGF a cultivos primarios de adenohipófisis

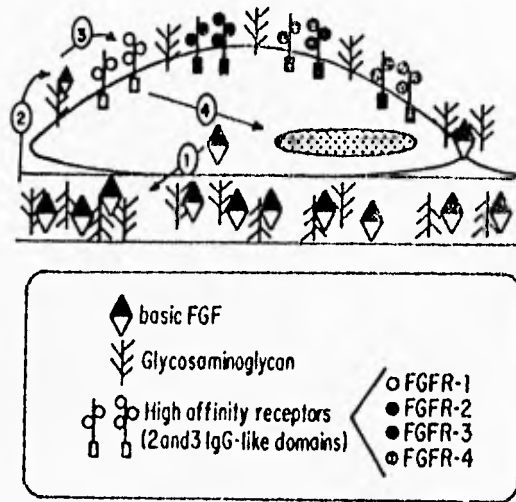


Figura 8. Receptores de alta y baja afinidad del bFGF 1. El bFGF es exportado al exterior de la célula 2. Se une a la matriz extracelular para estar disponible a los receptores de superficie de baja afinidad (HSPG) 3. Esta asociación permite que el bFGF pueda unirse a sus receptores de alta afinidad 4. El bFGF es internalizado a la célula para iniciar la respuesta. Fuente: Klagsbrun, *et al.* p. 229 (1991).

modifica la respuesta al TRF (factor de liberación de tirotrópina) en forma dosis-dependiente y aumentando la secreción de prolactina.

Schechter en 1992 demuestra que a una cepa de ratas Fischer 344, las cuales son sensibles al estradiol, se les indujeron tumores hipofisarios con el esteroide y las células gonadotropas resultaron inmunorreactivas al FGF.

Los trabajos de Gospodarowicz y Ferrara (1989) manifiestan que aparte de estimular la proliferación y diferenciación de las células hipofisarias, el bFGF puede actuar como regulador parácrino de la secreción hormonal de la hipófisis.

De igual forma puede incrementar la liberación de prolactina y disminuir la liberación de la hormona del crecimiento en la línea celular hipofisaria Ch₄C₁ (Schonbrunn, 1980). Por otra parte, también modifica la respuesta de cultivos primarios de hipófisis anterior hacia TRH, así se incrementan la sensibilidad de las células hacia TRH, la cantidad de prolactina y de TSH liberado (Baird, *et al.* 1985). Finalmente, las células folículoestelares de la hipófisis pueden ejercer un papel regulador en la liberación de hormonas hipofisarias a través de mecanismos parácrinos (Allaerts y Denef 1986).

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO EGF

El factor de crecimiento epidérmico es una cadena polipeptídica sencilla de 53 aminoácidos y con un peso de 6 KDa aproximadamente (Brändli, *et al.* 1991). Fue aislado por primera vez de glándulas salivales de ratón (Cohen 1962). Es un potente mitógeno y estimula el crecimiento de varios tipos celulares, incrementa la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Miyake, *et*

et al. 1985). Este factor de crecimiento tiene un homólogo estructural, el TGF (transforming growth factor). Los factores de crecimiento de tipo polipeptídico tienen la capacidad de transformar el fenotipo de células normales, de ahí se deriva su nombre de factores transformadores de crecimiento. Estos factores han sido clasificados, dependiendo de sus propiedades físicas y biológicas, TGF α y TGF β . El primero de estos compete con el factor de crecimiento epidérmico en la unión con sus receptores (Marquardt, *et al.* 1983). Está presente en la hipófisis del humano y se localiza en las células gonadotropas y tirotropas (Chaidarun, *et al.* 1994). Han sido encontrados sitios específicos de unión al EGF en el lóbulo anterior de la hipófisis de la rata y en su mayoría están restringidos a los lactotropos y somatotropos, este autor sugiere un papel fisiológico en la activación del receptor del EGF en el control de PRL y la secreción de GH. Igualmente, este factor de crecimiento potencia el tamaño relativo de la población de lactotropos clásicos en ratas de 10 días de edad. Cuando es agregado a células GH₃ altera la morfología celular de una apariencia esférica a una forma aplanada y elongada, acompañado por un aumento en el tamaño celular (Missale, *et al.* 1991).

Estudios recientes de Félix, R. *et al.* (1995), han demostrado que el factor de crecimiento epidérmico es un potente regulador de prolactina (PRL) y de la producción de hormona del crecimiento (GH) en células GH₃.

Toral, *et al.* en 1996, encontró que el EGF promueve la extensión del citoplasma de las gonadotropas en cultivos primarios sobre matriz de colágena-fibronectina (Figura 9).



Figura 9. Microfotografía que muestra células gonadotropas cultivadas con medio definido más EGF, sobre una matriz de colágena-fibronectina. a: Células inmunorreactivas a la FSH con el método de la avidina-biotina peroxidasa (células oscuras). b: Células inmunorreactivas a la LH con el método de la fosfatasa alcalina (células oscuras) X625. Fuente: Toral, *et al.* 1996.

Trabajos de Casper, *et al.* (1994), han mostrado que el EGF estimula la liberación del bFGF de astrocitos en cultivo. Finalmente, se sabe que ambos factores de crecimiento tienen una distribución sobrelapada, pero no idéntica, en el sistema nervioso central.

4.- MEDIOS DEFINIDOS

Por el año de 1911 Lewis y Lewis mantenían extractos de tejidos en soluciones salinas y encontraron que la supervivencia aumentaba conforme agregaban glucosa y algunos amino ácidos. Para 1913 Carrel descubrió que la adición de un extracto embrionario incrementaba dramáticamente el crecimiento de extractos de tejidos. Por muchas décadas los investigadores empezaron a modificar el método de Carrel tratando de reemplazar el extracto embrionario por componentes conocidos como hormonas, amino ácidos y vitaminas. En 1946 White desarrolló el primer medio definido, éste contenía los requerimientos nutrimentales conocidos para animales, plantas y microorganismos, como glucosa, sales, amino ácidos y vitaminas. En 1950 Morgan, *et al.*, desarrollaron un medio definido más complejo el medio 199. De aquí en adelante se desarrollaron otros medios que promovían el crecimiento de diferentes tipos celulares.

El medio de cultivo es la herramienta para mantener células *in vitro* y de esta manera poder estudiar procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Un medio de cultivo debe satisfacer los requerimientos de una solución salina balanceada isosmolar, algunos carbohidratos, amino ácidos, proteínas de transporte de fierro, vitaminas, elementos traza como el selenio, algunas hormonas y factores de crecimiento. Las condiciones óptimas de pH, oscilan entre valores de 6.5 y

7.9, con una proporción de 5% / 95% de bióxido de carbono y aire, respectivamente, con humedad del 80 al 95%. Es necesario suplementar el medio con antibióticos para reducir la vulnerabilidad de los cultivos a infecciones bacterianas. Para la mayoría de los cultivos celulares el suero bovino fetal (sbf), uno de los más comunes, es necesario para mantener el crecimiento celular, adicionado entre 5% y 50%. Es rico en hormonas y factores de crecimiento. Por otra parte puede ser una desventaja, puesto que se desconocen todos sus componentes (Bottenstein, J. 1983; Ham, R. y McKeethan, W. 1979; Rizzino, A., Sato, G. 1979).

Trabajos de Bottenstein y Sato (1979) comparan las diferencias morfológicas de las células en medios definidos (carentes de muchas de las sustancias presentes en el suero) con las células crecidas en medios enriquecidos con sbf: las células crecidas en presencia de suero son aplanadas y exhiben cierto arreglo. Mientras que las células crecidas en ausencia de suero se ven en forma de huso, redondas y no muestran ningún tipo de arreglo.

5.- CULTIVOS CELULARES

In vivo las células animales así como las vegetales existen organizadas de tal forma que están perfectamente controlados su diferenciación y crecimiento. Muestras de células provenientes de organismos intactos pueden ser aisladas y desarrolladas *in vitro*; sin embargo el medio ambiente extracelular debe ser cuidadosamente seleccionado para mantener la viabilidad de las células y favorecer su crecimiento, es necesario preparar un medio de cultivo que contenga una mezcla adecuada de nutrimentos y

factores de crecimiento. A este procedimiento se le llama cultivo celular (Smith y Wood, 1991).

CULTIVO CELULAR PRIMARIO

Este es establecido por medio de la siembra de células tomadas directamente de un tejido a un medio de cultivo. El tejido primeramente es fragmentado en pequeñas porciones mantenidas en una solución fisiológica estéril. Posteriormente, los fragmentos son sometidos a la acción de enzimas proteolíticas, como la tripsina, para disgregar el tejido en células individuales.

La mayoría de las células en un cultivo primario requieren de un sustrato adecuado para su crecimiento y éstas son llamadas células dependientes de anclaje (Smith y Wood, 1991).

LINEAS CELULARES

Existe otro tipo de células, las llamadas transformadas. Estas adquieren la capacidad de crecer indefinidamente, perder su sensibilidad a estímulos relacionados con control de crecimiento y perder su dependencia de anclaje. A este conjunto de células transformadas se les denomina líneas celulares (Smith y Wood, 1991).

6.- MATRIZ EXTRACELULAR

Las membranas basales son depositadas por células endoteliales, epiteliales y algunas células mesenquimatosas, que son producidas como la primera matriz extracelular durante el desarrollo embrionario temprano. Estas matrices tienen la estructura típica de una hoja delgada o de película, que observadas a microscopía electrónica revelan una densa nube de electrones llamada lámina densa y una nube clara llamada lámina lúcida. Estas proveen soporte mecánico a las células residentes, funcionan como una barrera semipermeable entre los compartimientos de los tejidos y actúan como reguladoras del anclaje celular, migración y diferenciación (Schittny, J.C., 1989).

SUSTRATO

El sustrato es una capa adherente. Un sustrato apropiado es esencial para el buen crecimiento y diferenciación de todas las células con capacidad adherente. Puede estar constituido por moléculas derivadas de suero o componentes de la matriz extracelular derivados de las células. Sobre este sustrato las células pueden proliferar, migrar, formar agregados y diferenciarse. Muchos tipos de sustrato dependen del tipo celular en cuestión y éstos pueden incluir diferentes tipos de colágena, polilisina, elastina, glicosaminglicanos, proteoglicanos y glucoproteínas como la fibronectina (Bottenstein, 1983).

POLILISINA

Una gran variedad de polímeros son utilizados en la adhesión celular, uno de los más comunes es la polilisina. Sus isómeros L y D son igualmente efectivos. Un polímero de 10 amino ácidos de longitud es suficiente para funcionar como sustrato. Los isómeros D son los más usuales, ya que evitan la interferencia con otros amino ácidos L biológicamente activos producidos por la degradación del polímero (McKeehan, W.L., 1976).

COLAGENA

La colágena, el mayor constituyente de la matriz extracelular, es usada como sustrato en el cultivo de una gran variedad de células y para cubrir superficies como vasos de cultivo, portaobjetos, cajas de Petri, etcétera.

Esta proteína con un peso aproximado de 300 000 media el anclaje celular por mecanismos directos e indirectos. Los directos se refieren al anclaje no covalente de la membrana celular a la matriz extracelular de la colágena. Los mecanismos indirectos se refieren al anclaje de células y su interacción con proteínas como fibronectina, laminina y condronectina.

La colágena ha sido especialmente utilizada en el cultivo de células crecidas en la ausencia de suero (Morris, R.J. *et al.* 1987. Ethier, S. 1986).

FIBRONECTINA

La fibronectina (FN) es una glucoproteína dimérica ampliamente distribuida en forma soluble en el plasma y otros fluidos corporales.

Muchos tipos celulares sintetizan y secretan FN, pero la mayoría circulante es producida por los hepatocitos.

La FN tiene muchas funciones adhesivas, por ejemplo en las uniones célula-célula, adherencia celular al plástico o membranas basales y la estabilización de los coágulos. Cada cadena polipeptídica de la FN puede ser dividida en dominios funcionales, como son: dominio de unión celular, dominio de unión a la colágena, dominio de unión a la heparina, por mencionar algunos. La FN promueve el anclaje y la subsecuente extensión de muchas células en el plástico (Proctor, R.A., 1987. Mosher, D.F., 1984. Hynes, R., 1985. Yamada, K. M., 1989).

II. JUSTIFICACION

No se conoce el papel del FGF durante los procesos de maduración de las células gonadotropas, por tal razón decidimos estudiar su efecto en una población de células en proceso de maduración (a los 14 días de vida postnatal).

Tomando en cuenta lo anterior, se propone que en la etapa infantil de la rata hembra el FGF, participa en la proliferación de las células gonadotropas y en el incremento de la liberación de gonadotropinas.

III. HIPOTESIS

Si a los 14 días de vida postnatal la rata hembra presenta un tipo de célula gonadotropa pequeña semejante a las observadas en la etapa neonatal (primera semana) y otro tipo de células de mayor tamaño semejantes a las observadas en la etapa adulta (*etapa de transición*), entonces esto puede deberse a que se encuentran en el período activo de maduración.

Si las células folículo estelares FS producen el bFGF y se sabe que este factor de crecimiento tiene capacidad reguladora de la diferenciación, se puede proponer que éste sea uno de los causantes de la maduración de las células gonadotropas.

IV. OBJETIVOS

GENERAL: Estudiar la participación del bFGF en el desarrollo *in vitro* de las células gonadotropas de rata hembra de 14 días de edad que corresponde a la *etapa de transición* .

PARTICULARES:

1 Diseñar un medio definido (libre de suero) para el cultivo de células hipofisarias.

1a. Comparar la morfología celular en cultivos primarios de células de hipófisis anterior de ratas hembra de 14 días de edad, en medio definido y en medio enriquecido con SBF (situación control).

1b. Probar diferentes sustratos y combinaciones de los mismos para obtener la mejor adhesión celular de células crecidas en medio definido.

2 Estudiar la funcionalidad de las células gonadotropas, determinando la secreción de LH y FSH espontánea y estimulada con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de las células cultivadas en las condiciones control (suero bovino fetal) y experimental (medio definido).

3 Estudiar la actividad del bFGF en la morfología y funcionalidad de las células gonadotropas.

4 Investigar si las células gonadotropas requieren de GnRH para su desarrollo en medio definido.

5 Analizar los cambios morfológicos de las células gonadotropas cultivadas con la mezcla de FGF-EGF.

V. MATERIALES Y METODOS

PREPARACION DE LA CAJA DE CULTIVO

Un día antes de la elaboración del cultivo se aplicaba el primer sustrato a una caja de cultivo de 24 pozos (COSTAR, USA) y se dividían de modo que se tuvieran los lotes deseados para las condiciones experimentales y de control en mismo número de pozos. La caja se mantenía en condiciones estándares de cultivo (Figura 10).

Al día siguiente se aspiraba el primer sustrato y se colocaba el segundo (Bottenstein y Sato, 1980) y se incubaba por 1 hr. Si el primer sustrato era polilisina (D-polilisina 1 mg/ml BOEHRINGER MANNHEIM, FRG) era necesario hacer enjuagues con agua estéril; cuando era colágena (Colágena S TIPO 1 3 mg/ml BOEHRINGER MANNHEIM, FRG) era necesario dejarla secar antes de que se agregara el segundo sustrato: fibronectina (Fibronectina 1 mg/ml BOEHRINGER MANNHEIM, FRG). Pasados 60 min se aspiraba la fibronectina que no se había adherido al primer sustrato y se añadían los medios (1 ml/pozo). De esta manera se tenían diferentes lotes experimentales:

- a) Medio definido
 - b) Medio definido + bFGF 10 ng/ml (SIGMA, USA)
 - c) Medio definido + bFGF + EGF (SIGMA, USA)
- Y el lote control:
- d) Medio con sbf

En los experimentos en los cuales queríamos determinar la participación de GnRH en el desarrollo del cultivo, se repetían las condiciones a, b, c, d y se agregaba GnRH 2.5 pg/ml (SIGMA, USA).

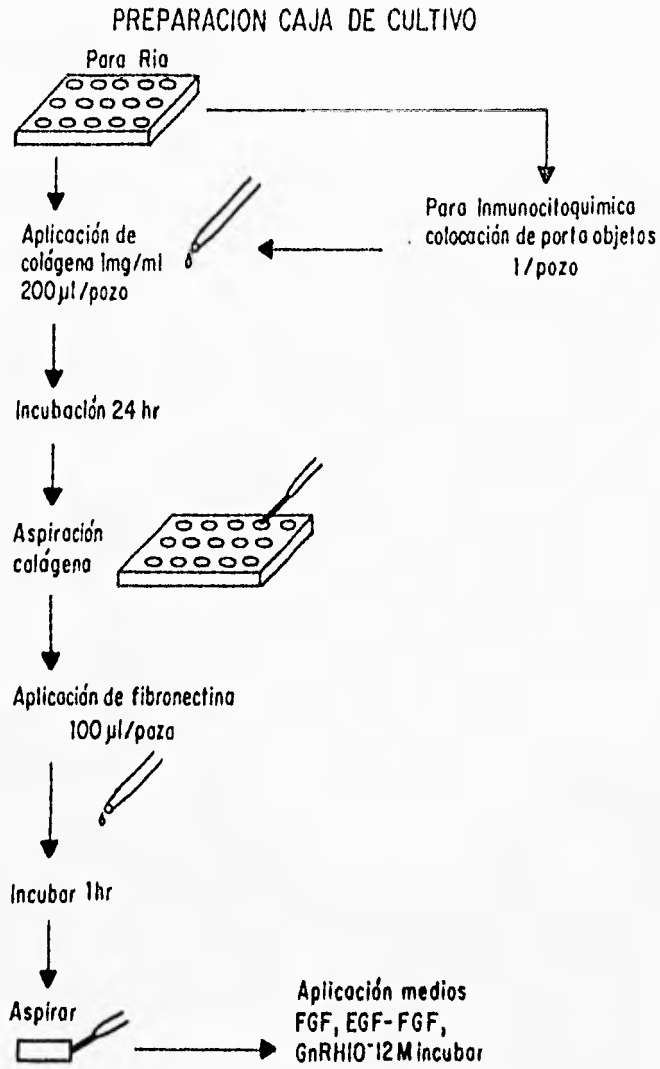


Figura 10. Diagrama que muestra la preparación de la caja de cultivo 24 hr antes del mismo.

MEDIO DEFINIDO DE CULTIVO pH 7.4

Se utilizó medio 199 (GIBCO, USA) al cual se le añadía: 5 ng/ml de triiodotironina (T3), (SIGMA, USA); insulina 5 µgr/ml (BOEHRINGER, MANNHEIM, FRG); transferrina 5 µgr/ml (SIGMA, USA); 60 ng/ml de progesterona (SIGMA, USA); 6 ng/ml de corticosterona (SIGMA, USA); 16 µg/ml de putrescina (SIGMA, USA); 1 mg/ml de albúmina bovina (fracción V SIGMA, USA); 2.9 µg/ml de selenito de sodio (SIGMA, USA); 2.4 mg/ml de heparina (GIBCO, USA); penicilina 10,000 UI/ml-estreptomicina 10,000 g/ml (GIBCO, USA); HEPES (N-[2-Hydroxyethyl(piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 10 mM (SIGMA, USA) y bicarbonato de sodio (BAKER ANALYZED, USA).

MEDIO ENRIQUECIDO CON SBF pH 7.4

Medio 199 (GIBCO, USA); penicilina 10,000 UI/ml-estreptomicina 10,000 µg/ml (GIBCO, USA); 10% de suero bovino fetal (BOEHRINGER MANNHEIM, FRG); HEPES 10 mM (SIGMA, USA) y bicarbonato de sodio (BAKER ANALYZED, USA).

CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS GONADOTROPAS

(Basada en la metodología de Mendoza, *et al.* 1993).

Se utilizaron ratas hembras Wistar de 14 días de edad, las hipófisis se obtuvieron decapitando a los animales previamente anestesiados con cloroformo, las cuales, se mantuvieron en solución libre de calcio y magnesio* estéril. Se procedió a hacer tres lavados en la misma solución.

Se separaron los lóbulos intermedio y posterior. Los lóbulos anteriores fueron cortados en pequeños trozos en la mencionada solución salina. Se realizó una centrifugación suave a 800 rpm durante 5 min (Centrífuga BECKMAN TJ-6), se desechó el sobrenadante (solución libre de calcio y magnesio) y la pastilla que contenía las adenohipófisis fragmentadas se sometió a una digestión enzimática con tripsina al 0.25% (1:250 GIBCO, USA) en un baño (PRECISION-SCIENTIFIC) a 37 °C por 15 min. A esta solución se agregó inhibidor de tripsina* 100 µ/ml (GIBCO, USA) para bloquear el efecto de la misma y se realizaba una centrifugación a 800 rpm durante 5 min.

El sobrenadante era desechado, la pastilla se resuspendía y el tejido era disgregado mecánicamente pasando los fragmentos a través de una pipeta Pasteur con medio definido. La suspensión celular era filtrada con una malla de nylon para separar los restos de tejido de las células y posteriormente se sembraban 200 µl por pozo de esta suspensión, aproximadamente 2×10^5 células/ml provenientes de 20 hipófisis.

La caja de cultivo se mantenía en condiciones estándares de cultivo a 37 °C, una atmósfera húmeda conteniendo 95.6% de aire y 4.4% de CO₂, en una incubadora Steri-Cult 200 Incubator (FORMA SCIENTIFIC, USA).

Utilizando un microscopio invertido se hacían observaciones a las 24 hr y se aplicaba una dosis más de bFGF 10 ng/ml (SIGMA, USA) al lote correspondiente. Se realizaba otra observación a las 48 hr (figura 11).

* Véase Apéndice A

PRUEBA DE EXCLUSION CELULAR CON AZUL DE TRIPANO

Se tomaron 90 μ l de la suspensión celular y se agregó azul de tripano 10 μ l (SIGMA, USA), se realizaba un conteo de las células vivas considerando a aquellas teñidas con azul de tripano como muertas.

PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON EL METODO DE SALES DE TETRAZOLIO MTT (Vector, USA)

El método del ensayo colorimétrico basado en las sales de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-bromo difenil tetrazolio 5mg/ml) es utilizado en la cuantificación de células vivas metabólicamente activas. El MTT (amarillo) es metabolizado por deshidrogenasas mitocondriales dando lugar al formazán (púrpura), lo cual, sólo ocurre en células vivas. Los cristales de formazán se solubilizan dando lugar a una solución coloreada que es cuantificada por un lector ELISA.

A las 48 hr del cultivo se agregaban 10 μ l por pozo de la solución MTT. A las 4 hr se agregaban 100 μ l de la solución solubilizadora (SDS, 10% in HCl, 0.01 mol/l) y se dejaba incubar a 37 °C en un ambiente húmedo por 24 hr. Posteriormente se realizaba la lectura con un filtro de 630 nm. La actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales expresada como el incremento en absorbancia a 630 nm, será directamente proporcional al número de células vivas.

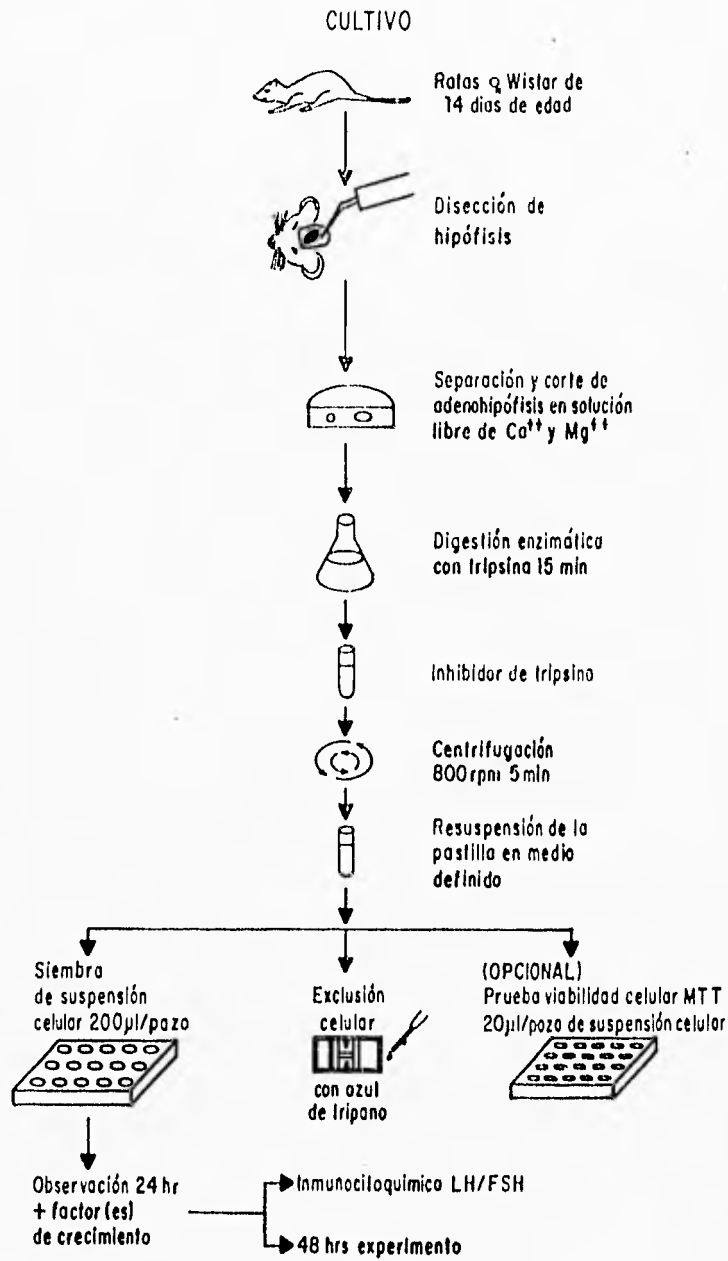


Figura 11. Diagrama de la elaboración del cultivo primario de adenohipófisis.

EXPERIMENTO CON GnRH

A las 48 hr del cultivo se preparó un medio de cultivo fresco: 100 ml de medio 199 + HEPES y bicarbonato pH 7.4. Se retiró el medio de los pozos y se hizo un lavado con medio fresco. En la segunda aplicación de medio se agregó la GnRH con una concentración de 2×10^{-9} M (dosis media 50), (BOEHRINGER MANNHEIM, FRG). Para conocer la secreción basal o espontánea, un grupo de células sólo recibieron el solvente (agua). Se dejó incubar 60 min y al final de este período se retiró el medio y se colocó en tubos de centrifuga (Part # 8560 12mm X 75mm Test Tubes), para ser centrifugado a 800 rpm por 7 min. Se cambió el sobrenadante a tubos limpios y se congelaron a -40 °C para su posterior análisis (Figura 12).

RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

La cuantificación de gonadotropinas por radioinmunoanálisis se realizó gracias a los reactivos gentilmente donados por el NIDDK-NIH. Se utilizaba un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra las cadenas alfa y beta de las hormonas LH de rata (NIDDK-anti-rLH-S-11, con la curva estándar NIDDK-rLH-RP-3) y FSH de rata (NIDDK-anti-rFSH-S-11, con la curva estándar NIDDK-rFSH-RP-2). Los coeficientes intra e inter ensayo fueron 5.42% y 37% para LH; 3% y 133% para FSH, respectivamente. Se utilizó un segundo anticuerpo hecho en cabra contra inmunoglobulinas G de conejo.

* Véase Apéndice B

EXPERIMENTO

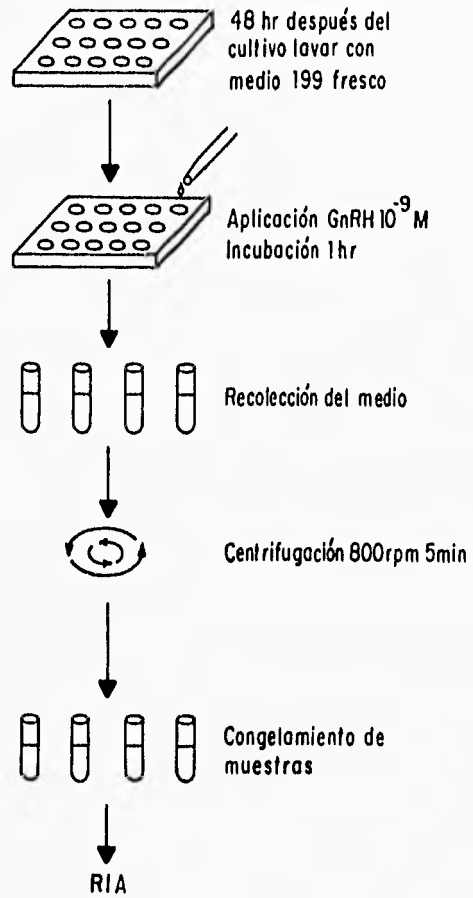


Figura 12. Diagrama del experimento 48 hr después del cultivo primario.

Se utilizó un contador de radiaciones Gama, Cobra II auto-gamma. Resolución 23.9% (I^{129}) y con una eficiencia de 81.77 (I^{125}) (Packard, USA).

INMUNOCITOQUIMICA DE FSH

Después de haber tomado el medio de los pozos, las células adheridas en los portaobjetos, se lavaban con amortiguador PBS pH 7.4*. En seguida se fijaban con paraformaldehido* (SIGMA, USA) al 4% en PBS + calcio (GIBCO, USA) por 1 hr a T/A. Se retiraba el fijador y se lavaba con PBS dos veces. Se observaban las células al microscopio para notar la calidad de la fijación. En seguida se agregaba una solución de glicina 250 mM* (SIGMA, USA) en PBS por 15 min. Se lavaba una vez con PBS y se agregaba una solución de tritón* 60 μ l, PBS, y suero normal de cabra 450 μ l (según kit VECTOR), dejándolo por 1 hr. Después de retirar la solución anterior y sin enjuagar se incubaba con el anticuerpo primario anti- β FSH* (donación NIADDK) diluido 1:30 000 en PBS, y suero normal de cabra 150 μ l, unos pozos se procesaron con la misma solución pero sin anticuerpo, durante toda la noche a temperatura ambiente para tenerlos como control negativo.

Al terminarse el periodo de incubación con el primer anticuerpo se hacia un lavado con amortiguador TBS (Tris[hydroxymethyl]-aminomethanohydrocloruro) pH 7.4 y se agregaba la solución del anticuerpo biotinilado* (VECTOR, USA), TBS y suero normal de cabra 100 μ l por 60 min. Se enjuagaba una vez con TBS. Se incubaba con los reactivos A y B (avidina peroxidasa VECTOR, USA) en TBS por 30 min. Estos deberían ser preparados media hora antes de ser usados. Se hacia un lavado con TBS. Se incubaba durante 10 min en una solución de

diaminobencidina*, TBS y peróxido de hidrógeno 20 μ l, se retiraba esta solución y se agregaba agua. Se deshidratava con alcoholes graduales y se contrateñía con azul de metileno (SIGMA, USA). Se montaba sobre portaobjetos de vidrio con resina polymount. Los portaobjetos se observaban en un microscopio invertido (Zeiss West, Germany).

El análisis estadístico de los datos se realizó por medio de ANOVA y con la prueba de Tukey-Kramer. Utilizando el programa InStat2. Los resultados se muestran como la $X \pm EEM$ de por lo menos 3 experimentos

* Véase Apéndice C

VI. RESULTADOS

MEDIO DEFINIDO

El medio definido que fue utilizado por primera vez se elaboró siguiendo las indicaciones para preparar un medio definido de neuronas (Bottenstein, 1979), donde los elementos principales son insulina, transferrina, progesterona, putrescina y selenito de sodio; adicionados a medio Dulbecco's modified Eagle's medium/medio F12 (50:50 v/v). En cuanto a las gonadotropas nos encontramos que estas células no se mantenían en la mezcla de DMEM/F12, ya que no pueden prescindir de insulina pues se presenta muerte celular a las 24 hr. Se decidió probar el medio 199, que aunque tiene menor cantidad de nutrimentos, resultó ser el medio más adecuado para la supervivencia de las células. Aunque funcionalmente presentaban secreción basal muy elevada, ausencia de respuesta a la GnRH, así como muy pobre adhesión al sustrato. Al medio definido se le añadió corticosterona, T3, bFGF y heparina mejorando notablemente la secreción espontánea, es decir, que disminuyó a los niveles que se observan con sbf (control) (Figuras 13 y 14).

SUSTRATO

Otro de los problemas a resolver fue el sustrato o matriz sintética en el cual se adherirían las células. Los grupos de Childs y de Deneff utilizan polilisina en sus cultivos obteniendo buenos resultados, pero no utilizaban un medio definido. En un principio se utilizó polilisina, pero sólo unas

cuantas células se adherían al sustrato. Se pensó en una combinación de sustratos. Se eligió la fibronectina como segundo sustrato. Cuando se hacían lavados con medio fresco las células se perdían y no había respuesta al estímulo con la GnRH. Finalmente, se probó colágena con fibronectina, resultando ser un sustrato más adecuado y se evitó la pérdida celular. Se puede observar la adhesión celular en las Figuras 15 a 18 que muestran cultivos de 48 hr, sobre matriz de colágena-fibronectina, en medio definido, medio definido + FGF, medio definido, la mezcla EGF-FGF y sbf.

EFFECTO DEL FGF EN LA FUNCIÓN SECRETORA DE LAS CELULAS GONADOTROPAS

La participación del factor de crecimiento fibroblástico, en la función secretora de las células gonadotropas, pudo ser analizada y comparada con el control sbf por medio de radioinmunoanálisis. En la Figura 13 se observa la concentración de LH en el medio de incubación correspondiente a la secreción espontánea y a la estimulada con GnRH 2 nM de las células cultivadas en medio control, sbf, y en el medio definido con y sin FGF, así como los cultivos que recibieron el tratamiento con la dosis baja 2 pM de GnRH durante toda la fase de cultivo.

Se puede observar que en el cultivo control (SBF) la secreción estimulada aumentó en un 168% con respecto a la secreción basal. En el caso de las células cultivadas en el medio definido no se presentó incremento en la secreción con el estímulo agudo con la GnRH, pero si las células eran tratadas con FGF respondían al estímulo de manera

significativa, 78%, aún cuando no alcanzan los niveles observados en las células control.

El tratamiento durante el período de cultivo con la GnRH 2.5 pM no favoreció que las células cultivadas en medio definido respondieran a la estimulación aguda con la GnRH como lo esperábamos tomando en cuenta los trabajos de Dubois, *et al.* (1990), pero en cambio se presentó un incremento significativo, 74%, de la secreción espontánea en estas células con respecto a las no tratadas. Las células con el tratamiento con FGF y GnRH presentaron un incremento del 49% en la secreción espontánea de LH con respecto a las que sólo recibieron el FGF y la repuesta al estímulo agudo con la GnRH fue significativa, 39%, aunque de menor magnitud que la observada sin el tratamiento crónico con la GnRH. En la Figura 14 se muestran los resultados que se obtuvieron en relación a la secreción de FSH de las células cultivadas en los medios definidos y con sbf, en las condiciones expuestas para la Figura 13. La respuesta aguda (GnRH 10^{-9} M) a la GnRH en el caso de la secreción de FSH sólo se pudo observar en las células cultivadas con sbf. Con respecto a la secreción de FSH por las células cultivadas en el medio definido con y sin tratamiento de FGF se presenta un aumento en los cultivos con el tratamiento crónico (durante todo el período de cultivo) de la GnRH.

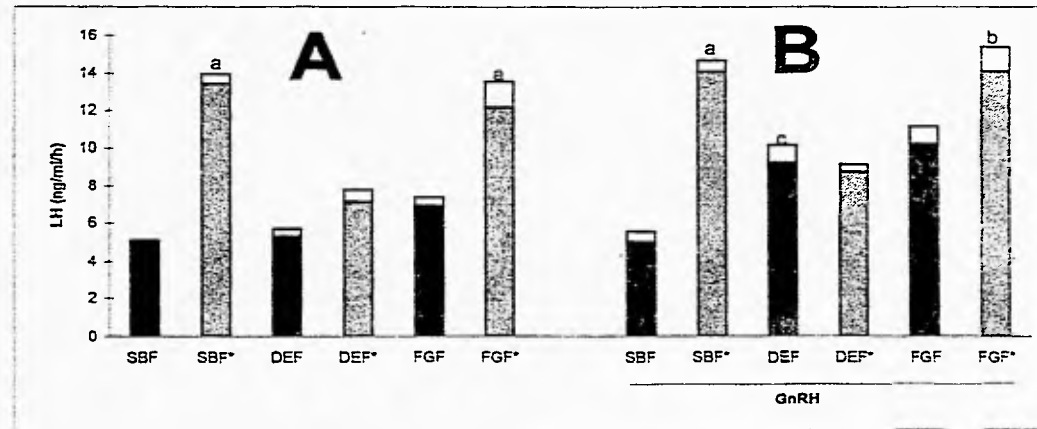


Figura 13. **A:** Secreción espontánea (barra sólida) y estimulada* con GnRH 10^{-9} M (barra punteada) de LH, en las diferentes condiciones de cultivo: SBF (suero bovino fetal) lote control; DEF (medio definido) y FGF (medio definido con factor de crecimiento fibroblástico). **B:** Secreción de la LH en las mencionadas condiciones y con una baja concentración de GnRH (10^{-12} M) durante el período de cultivo, a<0.001, b<0.05 secreción espontánea contra la estimulada, c<0.05 secreción espontánea contra la misma, pero ésta última tratada con GnRH durante el período de cultivo.

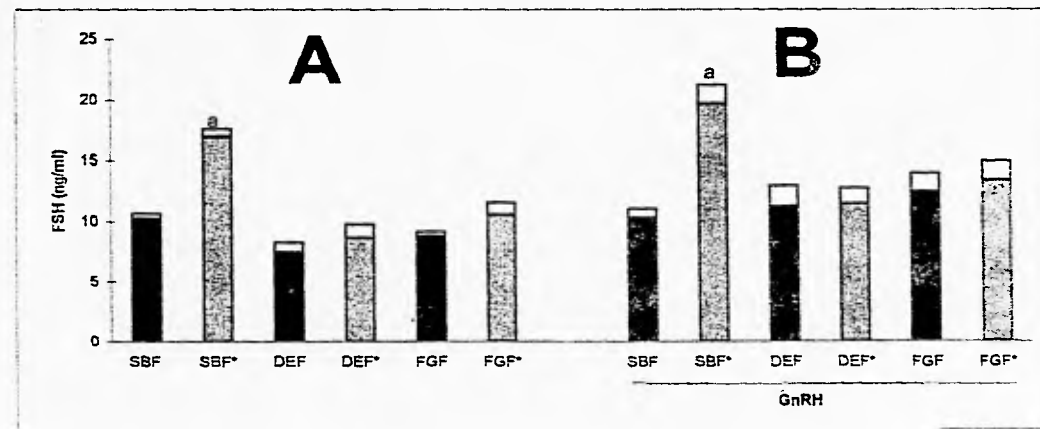


Figura 14. **A:** Secreción espontánea (barra sólida) y estimulada* con GnRH 10^{-9} M (barra punteada) de FSH, en las diferentes condiciones de cultivo: SBF (suero bovino fetal) lote control; DEF (medio definido) y FGF (medio definido con factor de crecimiento fibroblástico). **B:** Secreción de la FSH en las mencionadas condiciones y con una baja concentración de GnRH (10^{-12} M) durante el período de cultivo, a <0.001 durante el período de cultivo.

MORFOLOGIA DE LAS CELULAS DE HIPOFISIS ANTERIOR EN CULTIVO

Las células cultivadas en medio definido (Figura 15) forman cúmulos, y se observan redondeadas. Existen células positivas a la peroxidasa indicándonos que producen FSH. Se observan unas cuantas células negativas. Las células positivas son notoriamente más grandes que las que no lo son. Entre las células positivas existen variaciones de diámetro.

En cuanto a las células cultivadas en medio definido con factor de crecimiento fibroblástico (Figura 16), tenemos que se forman cúmulos y que el cambio en la morfología de éstos con respecto a los del medio definido sólo es mínimo. Las células presentan un citoplasma ligeramente más extendido sobre la matriz. Las gonadotropas (células positivas) tienden a estar en la región más expuesta de los cúmulos.

Algunas de las células crecidas en medio definido con la mezcla EGF-FGF (Figura 17), presentan el citoplasma más alargado, son células de tipo poligonal y positivas a la FSH (peroxidasa).

Se presentan células fusiformes aisladas, células redondeadas y células negativas de forma aplanada y de menor tamaño que las positivas dispuestas en el fondo del cúmulo.

Las células crecidas en medio adicionado con suero bovino fetal, (Figura 18), (situación control), presentan un citoplasma mucho más expandido con respecto a los lotes anteriores, las células positivas también forman cúmulos y se presentan en la parte más externa de los mismos. Claramente se observan células productoras de FSH. Existen células aisladas y aplanadas en menor número que las observadas en las células cultivadas con la mezcla.

Por las observaciones anteriores notamos que no hay cúmulos exclusivos de células positivas, existe una mezcla de células positivas con negativas, pero notamos que las células gonadotropas (positivas) se acomodan en la superficie más expuesta de los cúmulos.

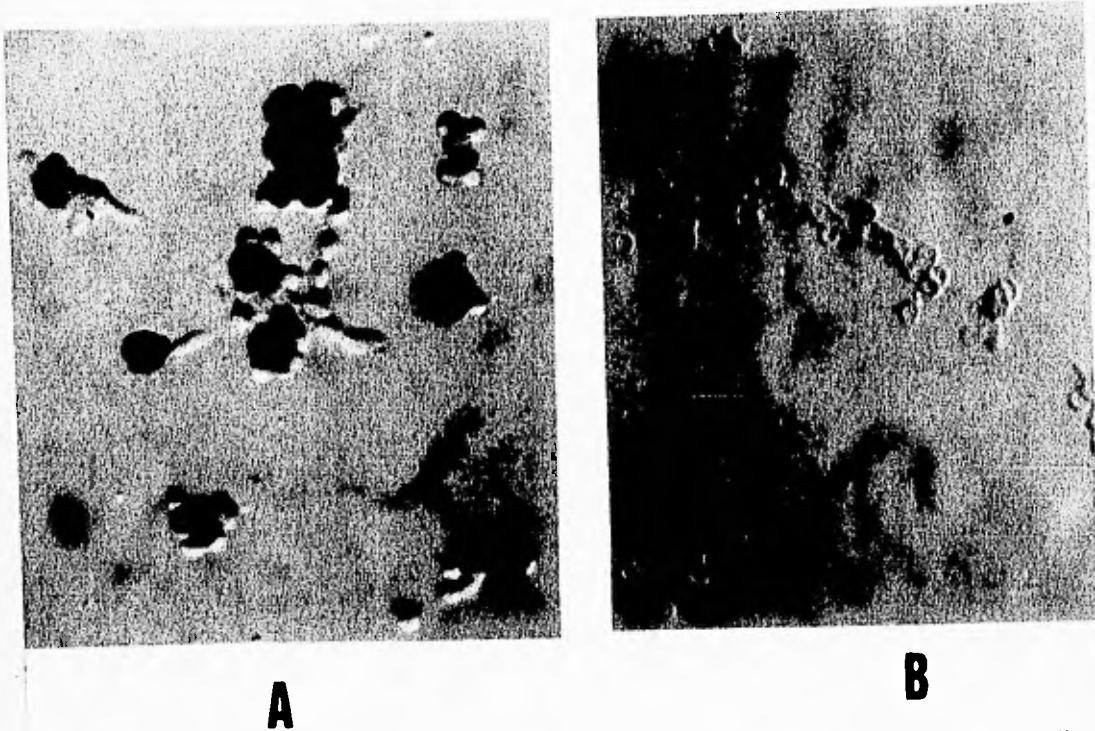


Figura 15. **A:** Microfotografía que muestra células crecidas en medio definido. Se observan células inmunorreactivas a la FSH por medio de la técnica de la avidina-biotina peroxidasa (color café). **B:** Microfotografía del control negativo (sin anticuerpo) de las células en las mismas condiciones de cultivo. X625

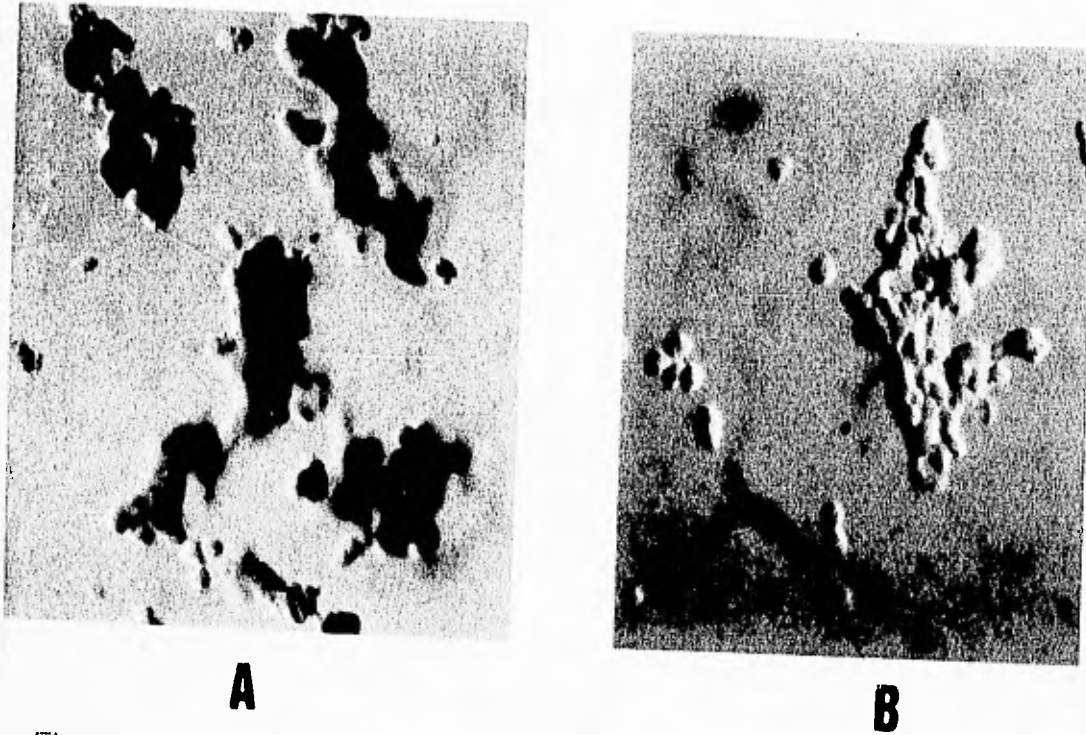


Figura 16. **A:** Microfotografía que presenta células cultivadas en medio definido y factor de crecimiento fibroblástico. Se observan células inmunorreactivas a la FSH. **B:** Microfotografía del control negativo. X625

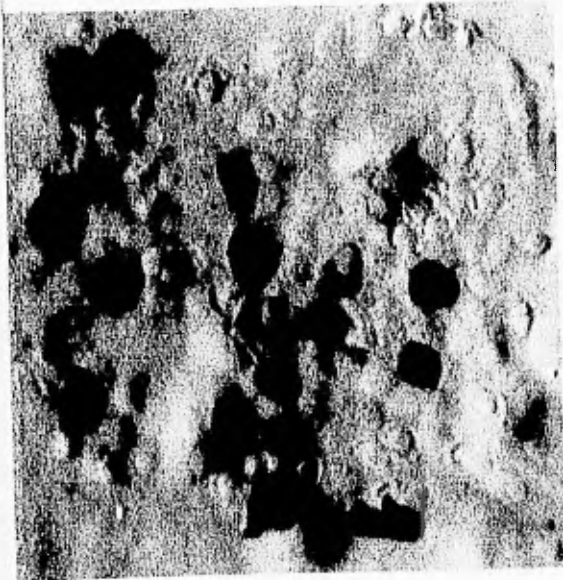


A



B

Figura 17. **A:** Microfotografía donde se muestran células cultivadas en medio definido y EGF-FGF (MIX), observándose células inmunorreactivas a la FSH. **B:** Control negativo. X625



A



B

Figura 18. **A:** Microfotografía que muestra células cultivadas en medio adicionado con suero bovino fetal. Se presentan células inmunorreactivas a la FSH. **B:** Control negativo. X625

PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR CON EL METODO DE LAS SALES DE TETRAZOLIO

Después de constatar que nuestros cultivos presentaban entre el 90 y 95% de células vivas con las pruebas de exclusión celular con azul de tripano, se realizaron pruebas de viabilidad celular con el método del MTT (sales de tetrazolio) para comprobar que el medio definido permitiera la supervivencia celular (Tabla Num. 1). En estas pruebas se incluyeron las variables (heparina y GnRH para verificar si había algún cambio en la viabilidad celular).

En la tabla Num. 1 podemos ver que las células cultivadas en medio definido solo (DEF) y las cultivadas en medio definido con factor de crecimiento fibroblástico (FGF) tienen alta viabilidad, puesto que de ser lo contrario los valores de absorbancia serían de cero. Estas dos condiciones son significativamente menores al ser comparadas con la condición control de suero bovino fetal ($P < 0.001$). Sucede lo mismo cuando se aplica heparina al medio. Pero al comparar los valores (DEF y FGF) sin y con heparina, con ésta última no son significativos. Con respecto a los valores del tratamiento sin y con GnRH a bajas concentraciones, tenemos que los grupos DEF y FGF son significativos cuando son comparados con los valores de suero bovino fetal ($P < 0.001$) no habiendo diferencias entre los grupos.

Los resultados anteriores nos indican que: el medio definido es un medio viable para el cultivo de las células gonadotropas. Las células están vivas y los altos valores de absorbancia de las células control se deben a que en esta situación se tiene una mejor adhesión a la matriz y se cuenta con la gran cantidad de sustancias presentes en el suero que median el

crecimiento celular óptimo. Suponemos que en esta condición (sbf) hay un incremento en la población de las células foliculoestelares y los fibroblastos que contribuyen al aumento de los valores de absorbancia.

	MTT		
	DEF	FGF	SBF CONTROL
Sin Heparina	0.132 +0.010	0.130 +0.012	0.154 +0.013
Con Heparina	0.140 +0.011	0.134 +0.008	0.157 +0.013
Sin GnRH 10-12M	0.116 +0.007	0.118 +0.006	0.151 +0.003
Con GnRH 10-12M	0.121 +0.007	0.114 +0.005	0.149 +0.004

Tabla 1. De la prueba de viabilidad celular con el método de sales de tetrazolio (MTT) en diferentes condiciones. Los valores corresponden al promedio de la absorbancia y su correspondiente desviación estandar. DEF: células cultivadas en medio definido; FGF: células cultivadas en medio definido y factor de crecimiento fibroblástico; SBF: células cultivadas en medio enriquecido con suero bovino fetal. Se utilizó un filtro de 630nm $P < 0.001$.

MEDICION DE LAS CELULAS INMUNORREACTIVAS

También se realizó una medición de las células cultivadas en diferentes condiciones con un programa computacional llamado VIDS (figura 19), tenemos diámetros celulares que van desde 4 μm hasta 27 μm . Los tamaños de las células crecidas en medio definido se concentraron en un rango de 6 μm a 13 μm , siendo de 8 μm a 11 μm los tamaños representativos de esta condición. Con respecto a las células cultivadas en medio definido más FGF los diámetros varían de 4 μm a 11 μm , siendo de 6 μm a 9 μm los tamaños representativos. Las células cultivadas con la mezcla de EGF y FGF tiene tamaños entre 4 μm y 11 μm , encontrándose en mayor cantidad células de 6 μm y 7 μm . Las células crecidas en medio adicionado con suero bovino fetal (10%) presentaron un mayor tamaño entre 8 μm y 27 μm , siendo los más representativos entre 10 μm y 21 μm , dentro de este intervalo el 20% tienen tamaños de 18 μm y 19 μm .

La comparación de los tamaños de los tres grupos experimentales con el grupo control es significativa ($P < 0.001$). Estos resultados corroboran lo observado en las fotografías, que las células control se encuentran con el citoplasma más expandido, en cambio las células de los grupos experimentales se observan redondeadas.

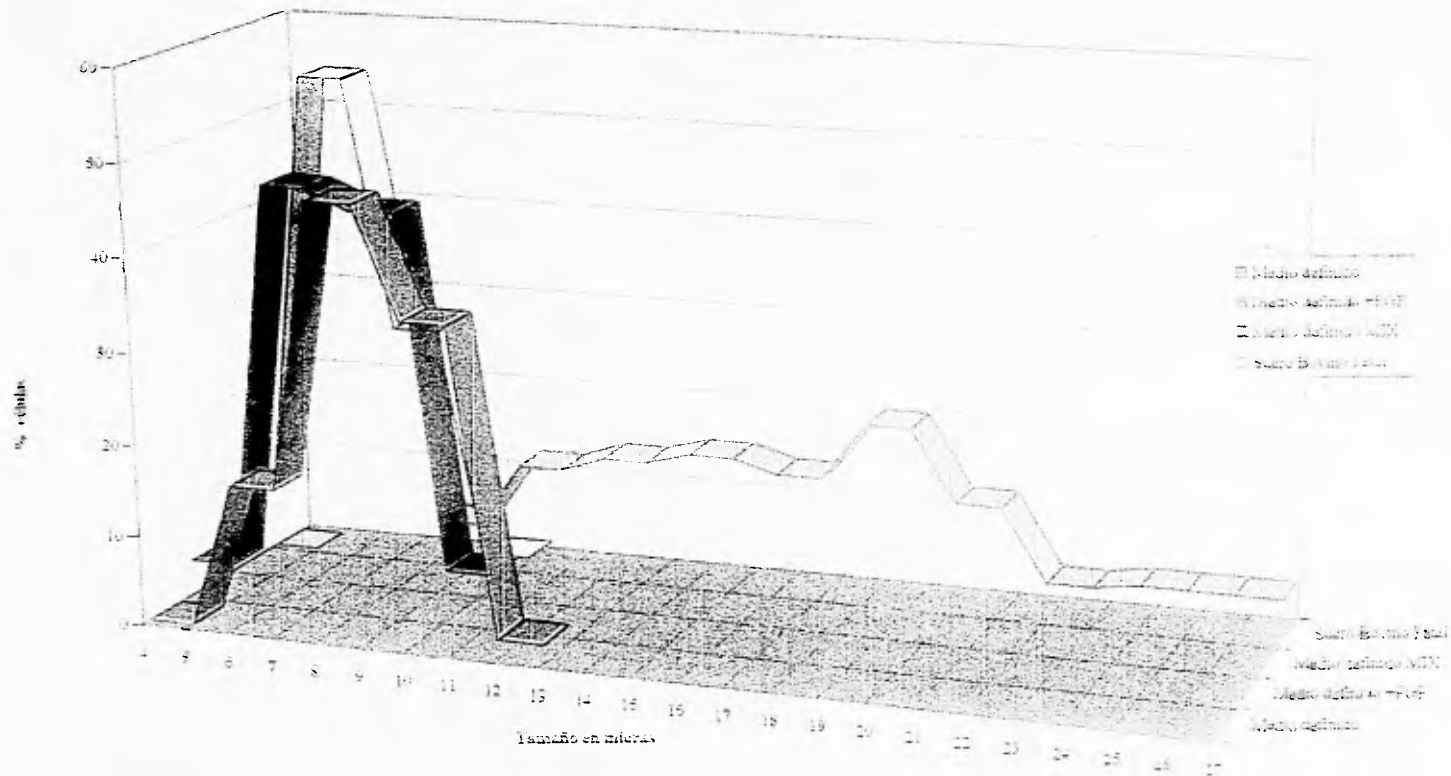


Figura 19. Gráfica que muestra la diferencia de tamaños de las células gonadotropas en cultivo bajo las condiciones de: medio definido, medio definido y FGF, medio definido y EGF-FGF (mix) y medio con sbf.

VII. DISCUSION

Este trabajo, inicialmente, tuvo dos propósitos: el primero fue la caracterización de un medio definido (libre de suero) para cultivos primarios de células gonadotropas y el segundo analizar la participación del factor de crecimiento fibroblástico en el desarrollo de las gonadotropas. En la búsqueda del medio definido se probaron diferentes medios sintéticos de cultivo, así como diferentes hormonas, nutrimentos y acarreadores. El medio definido con el cuál obtuvimos los mejores cultivos es el descrito en materiales y métodos. Si tomamos en cuenta que la fórmula original fue de un medio para cultivo de neuronas, podemos decir que nuestro medio es adecuado para el cultivo de gonadotropas en proceso de maduración, puesto que nos fue posible hacer análisis funcionales y morfológicos. Aunado al uso de un medio definido se planteó el problema de falta de elementos de la matriz extracelular que permitieran la adhesión de las células al sustrato adicionado al plato de cultivo. De acuerdo con los trabajos de Deneff, *et al.* (1978) y de Childs, *et al.* (1981) un sustrato de polilisina permitía un buen anclaje de las células a la superficie de cultivo. Nuestra experiencia fue que las células no se anclaron lo suficiente como para permitir cambios de medio.

Tomando en cuenta que la fibronectina es un componente de la matriz que está presente en los sueros, decidimos utilizarla como sustrato. Observamos que la condición de adhesión celular mejoró sin que tuviéramos una situación satisfactoria. En seguida utilizamos otro de los componentes de la matriz, que es la colágena (tipo 1), así como la mezcla colágena-fibronectina. Con esta última matriz sintética obtuvimos cultivos, en los cuales, aun cuando las células se observaron redondeadas por la

poca expansión del citoplasma, estaban adheridas, permitiéndonos hacer cambios de medio y diferenciar a través de una reacción de inmunocitoquímica a las células gonadotropas del resto de la población presente en el cultivo primario. En un principio se realizó inmunocitoquímica contra la FSH, técnica que tomó mucho tiempo ajustar al sistema. Finalmente, se realizaron inmunocitoquímicas para LH (fosfatasa alcalina) y dobles tinciones, de las cuales no fue posible obtener buenas imágenes por falta de tiempo, puesto que contábamos con una gran cantidad de tinción endógena.

Como ya fue expuesto, el segundo objetivo del trabajo consistió en analizar la participación del FGF en el desarrollo de las células hipofisarias y en particular, las células gonadotropas. Revisando los trabajos de Gospodarowicz, *et al.* (1986), encontramos que la heparina participaba en la función del FGF de dos formas: protegiendo de la actividad enzimática y como componente de la matriz, permitiendo la unión del FGF a la misma, cuyo paso es indispensable para su acción, por lo cual, se añadió al medio definido, haciéndolo aun más específico para nuestro sistema.

Desde el punto de vista morfológico suponíamos que el FGF promovía una expansión del citoplasma sobre el sustrato. Lo anterior lo sustentaron los trabajos de Baird, *et al.* (1986), quienes encontraron que el FGF promovió la extensión de las neuritas de neuronas del hipocampo en un medio definido. En el caso de las células hipofisarias el estímulo con FGF no modificó substancialmente la capacidad de adhesión por medio de la extensión del citoplasma, como puede verse en las imágenes de los cultivos con medio definido y medio definido más FGF.

Creemos que las células requieren de diferentes sustancias presentes en el suero para extender su citoplasma. Algunas de éstas

pueden ser otros factores de crecimiento. Para tratar de resolver el problema de la extensión citoplásmica, tomamos en cuenta las observaciones de Toral, *et al.* en 1996, que nos mostraron que el factor de crecimiento epidérmico EGF promovía la expansión de las células hipofisarias cultivadas en medio definido sobre las matrices sintéticas colágena y colágena-fibronectina. Cuando añadimos la mezcla FGF-EGF a nuestros cultivos observamos que ciertas células de los cúmulos, así como algunas de las aisladas, mostraban forma hexagonal. En cuanto a las células gonadotropas éstas mantuvieron su forma redondeada aún en presencia del EGF. Sólo se observaron de manera aislada cúmulos con células gonadotropas aplanadas. Con frecuencia, la localización de las gonadotropas en los cúmulos era por encima de una primera capa de células no inmunorreactivas a la FSH. Aun en los cúmulos de los cultivos desarrollados con SBF, se llegó a observar esta imagen. Esta observación permite suponer la presencia de complejos de unión entre las células gonadotropas y las otras estirpes celulares. Uno de los tipos celulares que probablemente se encuentra en estos cúmulos son las células folículo estelares, siendo éstas productoras de IL-6, estimulando la secreción de LH Yamaguchi, *et al.* (1990) y activina, estimulando la secreción de FSH Roberts, *et al.* (1990), mismas que actúan sobre las gonadotropas, así como con el FGF.

Funcionalmente, tuvimos como antecedente que alrededor de los 14 días de vida postnatal de la rata, los niveles séricos de LH y FSH aumentaban y de forma muy considerable para la FSH. De acuerdo a nuestras observaciones acerca de la actividad secretora de las células gonadotropas cultivadas en el medio definido y matriz de colágena-fibronectina, las células no incrementaron su secreción de LH y FSH bajo

estímulo con GnRH en medio definido. La situación cambió cuando se añadió al medio FGF, las células fueron capaces ante este tratamiento, de responder al estímulo con GnRH secretando más LH, *no así para la FSH*. Para explicar lo anterior nos hemos apoyado en el trabajo de Childs, *et al.* (1981), donde se expuso que en el *período infantil* de la rata las células gonadotropas son fundamentalmente *monohormonales*. Nuestros resultados muestran una secreción diferencial para ambas hormonas, patrón totalmente diferente al observado en los cultivos de células obtenidos de animales adultos, en donde la mayoría de las células gonadotropas son bihormonales. Lo anterior permite suponer la existencia de dos poblaciones de células gonadotropas (LH y FSH, respectivamente) con sensibilidad diferente al FGF.

Ya que no habíamos obtenido respuesta a la GnRH por parte de las células gonadotropas cultivadas en el medio definido y tomando en cuenta que la GnRH es inductora de sus propios receptores Clayton, (1982), así como el hecho de que los primordios de hipófisis responden a la GnRH acelerando el proceso de diferenciación de las células gonadotropas, decidimos administrar la hormona en concentraciones picomolares, durante el período de cultivo de 48 hr. En nuestros cultivos la presencia de GnRH, no modificó la falta de respuesta al estímulo hormonal para ambas gonadotropinas por las células cultivadas en el medio definido. En cambio, se presentó un aumento considerable de la secreción espontánea. Lo anterior puede deberse al efecto estimulador de la GnRH en la síntesis de las gonadotropinas Stanko, *et al.* 1994.

Finalmente, se permitió el desarrollo de las gonadotropas en medio definido y el FGF mantiene la funcionalidad celular, siendo hasta ahora

todos los datos bien fundamentados que podemos expresar de nuestra estrecha y muy grata relación con las gonadotropas.

VIII. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta los antecedentes de este trabajo, observamos que fue enfocado hacia qué factor o factores propiciaban el incremento en los niveles séricos de LH y FSH en la etapa infantil de la rata hembra de 14 días edad y también qué factor o factores promovían la diferenciación de las gonadotropas en la etapa de *transición*.

Con los resultados obtenidos aún no podemos explicar este fenómeno, que parece ser de mayor complejidad. Cuando se comenzó con la elaboración del presente trabajo de tesis se conocía este riesgo. De ninguna manera consideramos los resultados como negativos, al contrario. Fue un proyecto nuevo, muy extenso y requirió de mucho trabajo. Por tal razón, lo que ahora sabemos acerca del factor de crecimiento fibroblástico, nos ha llevado a interesarnos más en este trabajo e incluso a poder subdividirlo y formar un proyecto aún más amplio.

Los objetivos señalados han sido cumplidos en su totalidad, por ejemplo, en el diseño del medio definido y el análisis de la participación del FGF en la supervivencia y funcionalidad de las gonadotropas en cultivo.

Esta investigación nos ha revelado cosas muy interesantes: ya se tiene caracterizado el medio definido para cultivos primarios de células de adenohipófisis no embrionarias, el cual, se seguirá utilizando para evaluar la participación de sustancias presentes en el suero. Se ha adaptado la inmunocitoquímica a nuestro sistema, puesto que la técnica original fue ampliamente modificada. El FGF como todos los factores de crecimiento

juega papeles importantes en el desarrollo de los mamíferos; con los resultados obtenidos no creemos que este factor sea el único responsable de los cambios morfológicos y funcionales de la etapa de *transición* de las gonadotropas, creemos que un grupo de factores y otras sustancias llevan a cabo este proceso.

Las células gonadotropas no requieren de bajas concentraciones de GnRH para su desarrollo y sabemos, gracias a nuestra experiencia, que la mezcla de factores de crecimiento es necesaria para el desarrollo morfológico y funcional de las células de hipófisis anterior en un medio definido.

Consideramos la necesidad de continuar con este proyecto, que con el tiempo y muchas horas más de trabajo, nos dará a la luz todo lo que aún nos falta por conocer.

APENDICE A

SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO 199 pH 7.4

200 ml de agua deionizada

2.2 gr de medio 199 GIBCO, USA

0.075 gr de bicarbonato de sodio BAKER ANALYZED, USA

0.477 gr de HEPES SIGMA, USA

MEDIO DEFINIDO

100 ml de medio 199 pH 7.4

1 ml de penicilina 10,000 UI/ml-estreptomicina 10,000 µg/ml
GIBCO, USA

2.9 µg/ml de selenito de sodio SIGMA, USA

5 ng/ml de triiodotironina SIGMA, USA

5 µg/ml de insulina BOEHRINGER MANNHEIM, FRG

5 µg/ml de transferrina SIGMA, USA

60 ng/ml de progesterona SIGMA, USA

6 ng/ml de corticosterona SIGMA, USA

16 $\mu\text{g/ml}$ de putrescina SIGMA, USA

1 mg/ml de albúmina bovina SIGMA, USA

2.4 mg/ml de heparina GIBCO, USA

MEDIO ENRIQUECIDO CON SUERO BOVINO FETAL (SBF)

45 ml de medio 199 pH 7.4

5 ml de SBF (10%) BOEHRINGER MANNHEIM, FRG

0.5 ml de penicilina 10,000 UI/ml-estreptomicina 10,000 $\mu\text{g/ml}$
GIBCO, USA

SOLUCION LIBRE DE CALCIO Y MAGNESIO

2 gr de cloruro de sodio BAKER ANALYZED, USA

0.1 gr de cloruro de potasio BAKER ANALYZED, USA

0.087 gr de bicarbonato de sodio BAKER ANALYZED, USA

0.25 gr de glucosa SIGMA, USA

250 ml de agua deionizada

5 μl de rojo de fenol SIGMA, USA

SOLUCION DE TRIPSINA

0.025 gr de tripsina (1:250) GIBCO, USA
10 ml solución libre de calcio y magnesio

SOLUCION DE INHIBIDOR DE TRIPSINA

2 mg de inhibidor de tripsina GIBCO, USA
20 ml de medio 199 pH 7.4

EXPERIMENTO

100 ml de medio 199 pH 7.4
0.019 gr de bicarbonato de sodio BAKER ANALYZED, USA
0.119 gr de HEPES SIGMA, USA

SOLUCION MADRE DE GnRH

0.001 mg de GnRH SIGMA, USA
1 ml de agua deionizada (A)
De la solución A tomar:

50 μ l

Agregar 150 μ l de agua deionizada (B)

Tomar 10 μ l de B y llevarlos a un volumen final de 2 ml
con agua deionizada (C: GnRH 10-9M).

Agregar 20 μ l de C a los pozos correspondientes

APENDICE B

RADIOINMUNOANALISIS

(RIA)

Esta técnica es utilizada para cuantificar la funcionalidad de cultivos de células secretoras de hormonas.

Consiste en la unión entre un antígeno y un anticuerpo en presencia de diferentes masas totales de antígeno. La distribución del antígeno entre las fases ligadas y libres está directamente relacionada con la cantidad total de antígeno presente. Cuando la reacción se inicia el complejo antígeno anticuerpo (Ag-Ac) es muy estable y la reacción es reversiblemente más débil. Conforme la reacción continúa las concentraciones de antígeno y anticuerpo libres disminuyen, del mismo modo la concentración del complejo Ag-Ac se incrementa. El equilibrio de la reacción es alcanzado cuando el número de moléculas de Ag y Ac libres reaccionando al mismo tiempo para formar el complejo Ag-Ac es idéntico al número de complejos disociados en este mismo tiempo (Chard, 1978).

METODOLOGIA DEL RIA

Se toma la muestra del cultivo y se deja descongelar a temperatura ambiente. Esta prueba puede realizarse para cuantificar LH o FSH.

El radioinmunoanálisis es una prueba que se realiza por duplicado, por lo tanto, tubos 1 y 2, representarán las cuentas totales de la hormona marcada, es decir, estos tubos sólo tendrán 100 μ l de lodo 125.

Tubos 3 y 4 representarán el Bo (blanco), y se prepara con 100 μ l de amortiguador del ensayo diluyente*, 100 μ l de anticuerpo* y 100 μ l de hormona marcada.

Tubos 5 y 6 representarán la unión inespecífica y se prepara con 100 μ l de amortiguador fosfosalino*, 100 μ l de amortiguador del ensayo diluyente* y 100 μ l de hormona marcada.

Tubos del 7 al 20** representan la curva estándar:

Para *LH*: (concentración tubo 2 a 8 25 ng/ml; 12.5 ng/ml; 6.25 ng/ml; 3.125 ng/ml; 1.563 ng/ml; 0.781 ng/ml y 0.39 ng/ml, respectivamente) al tubo que contiene la fracción se agregan 2.5 ml de amortiguador fosfosalino*, se numerará como el tubo 1, se numerarán 7 tubos más para tener 8, a estos 7 tubos se les aplicará 1 ml de amortiguador fosfosalino*, se pasará 1 ml del tubo 1 al 2, agítese. Tómese 1 ml del tubo 2 y pasar al 3, agítese y así hasta llegar al tubo 8. El estándar num. 1 no se utiliza.

Para *FSH*: (concentración tubo 1 a 7 250 ng/ml; 125 ng/ml; 62.5 ng/ml; 31.25 ng/ml; 15.63 ng/ml; 7.81 ng/ml y 3.91 ng/ml, respectivamente) al tubo que contiene la fracción se agrega 1 ml de amortiguador fosfosalino*, este será el tubo número 1, se numerarán 6 tubos más para tener 7. Se aplicarán a estos tubos 500 μ l de amortiguador fosfosalino*, pasarán 500 μ

l del tubo 1 al 2, agitándolo. Se pasarán 500 μ l del tubo 2 al 3, agitándolo; y así sucesivamente hasta llegar al tubo 7.

De esta manera tendremos que los tubos 7 y 8** tendrán 100 microlitros del estandar (2 LH), (1 FSH) y los tubos 19 y 20 los tendrán del estandar (8 LH), (7 FSH). Además a cada tubo se aplicarán 100 μ l de anticuerpo* y 100 μ l de hormona marcada.

Los siguientes tubos corresponderán a las muestras del cultivo (problema) y su número varía según el número de pozos utilizados. Constarán de 100 μ l de medio descongelado (previamente agitado), 100 μ l de anticuerpo* y 100 μ l de hormona marcada.

A la mitad de los tubos problema deberán ir dos tubos de Bo y dos tubos que serán el estandar interno y externo*, el cual, constará de 100 μ l de la fracción, 100 μ l de anticuerpo* y 100 μ l de hormona marcada.

Al final de la segunda mitad de los tubos problema irán dos tubos de Bo , dos tubos de estandar interno y externo, dos tubos de unión inespecífica y los dos últimos de cuentas totales.

Pasadas de 18 a 24 hrs se aplicarán 100 μ l del segundo anticuerpo* (preparado el mismo día) Se agitarán todos los tubos excepto las cuentas totales. Después de 12 a 18 hrs se parará el radioinmunoanálisis, esto se hace de la siguiente manera:

Se aplica a todos los tubos, excepto a las cuentas totales, 1 ml de agua a 4 °C, sin agitarlos deberán pasarse a gradillas de centrifuga y centrifugar a 3,000 rpm durante 30 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se aspirará el sobrenadante y contarán todos los tubos (las cuentas totales no se aspiran) al contador de emisiones gama (COBRA II AUTO-GAMMA PACKARD, USA).

SOLUCIONES RIA*AMORTIGUADOR FOSFOSALINO 0.01M pH 7.6**

0.16 gr de fosfato de sodio monobásico BAKER ANALYZED, USA
0.125 gr de fosfato de sodio dibásico BAKER ANALYZED, USA
9 gr de cloruro de sodio BAKER ANALYZED, USA
1 gr de azida de sodio BAKER ANALYZED, USA
1 l de agua deionizada.

SOLUCION DE EDTA 0.1M pH 7.2

3.72 gr de sal disódica BAKER ANALYZED, USA
0.4 gr de hidróxido de sodio BAKER ANALYZED, USA
100 ml de agua deionizada

AMORTIGUADOR DEL ENSAYO DILUYENTE

200 mg de albúmina bovina fracción V SIGMA, USA
90 ml de amortiguador fosfosalino pH7.6
10 ml de solución de EDTA pH 7.2

5 mg de gamma-globulina de conejo SIGMA, USA
Reactivos donados por THE NATIONAL HORMONE AND PITUITARY
PROGRAM, NIADDK.

Curva estandar

Se tiene una alícuota de 25 μ l de estandar de LH, la cual se lleva a un volumen de 1.6 ml con amortiguador fosfosalino.

La fracción de 25 μ l de estandar de FSH, se lleva a un volumen de 1 ml con amortiguador fosfosalino.

Estandar interno y externo

Se toma una fracción de curva estandar de 25 μ l de LH o FSH, se lleva a un volumen de 8 ml con amortiguador fosfosalino, se hacen alícuotas de 500 μ l.

Primer anticuerpo

Una fracción de 10 μ l de anti-LH se lleva a un volumen de 10 ml con amortiguador de ensayo diluyente.

Segundo anticuerpo

Aplicado después de 18 hrs de comenzado el RIA. Una fracción de 1 ml Anti-rabbit IgG (SIGMA, USA) se lleva a un volumen de 10 ml con amortiguador fosfosalino.

APENDICE C

INMUNOCITOQUIMICA

Inmunocitoquímica FSH (Peroxidasa Rabbit IgG Vectastain Abc Kit Vector, USA)

Complejo Avidin-Biotin Peroxidasa.

La avidina es una glicoproteína con gran afinidad hacia la vitamina de bajo peso molecular biotina. La unión de la avidina con la biotina, semejante a la interacción antígeno-anticuerpo, es esencialmente irreversible, por esta razón, se ha implementado un procedimiento para la localización de antígenos. Esta técnica emplea un anticuerpo primario, seguido por un anticuerpo secundario biotinilado (Vectastain, ABC kit).

El objetivo primario de la inmunocitoquímica es identificar células o tipos celulares responsables de la producción y liberación de hormonas (Bullock, 1982; Polak,).

Esta técnica consiste en que:

Un anticuerpo primario es aplicado al tejido previamente fijado. Posteriormente es localizado con una inmunoglobulina G (IgG) biotinilada de cabra anti-conejo. La avidina se combina con la peroxidasa biotinilada y el complejo es formado 30 min antes de su uso en la tinción. El complejo avidin-biotin-peroxidasa (ABC) se adiciona al tejido. Finalmente, la peroxidasa en el complejo ABC es localizada con una solución que tiene

como sustrato la diaminobenzidina (DAB) y peróxido de hidrógeno. El producto de la reacción es la diaminobenzidina precipitada (Childs, 1982 - 83.)

SOLUCIONES INMUNOCITOQUIMICA

AMORTIGUADOR PBS pH 7.4

100 ml de PBS GIBCO, USA

AMORTIGUADOR TBS pH 7.4

300 ml de agua deionizada

6.06 gr de trizma HCl MICROLAB, USA

1.4 gr de trizma base SIGMA, USA

1.89 gr de cloruro de sodio BAKER ANALYZED, USA

Filtrar

FIJADOR AL 4%

20 ml de agua deionizada a 60 °C en agitación
1 gr de paraformaldehido SIGMA, USA
20 µl de hidróxido de sodio 2.52% SIGMA, USA.
Enfriar
5 ml de PBS 5X con calcio GIBCO, USA
Filtrar

Anterior a este fijador se hicieron pruebas con el fijador de **Zamboni** (Nakane, 1971), el cual resultó ser muy agresivo para las células gonadotropas y por su alta concentración se formaban cristales que impedían la observación de las células. Se preparaba de la siguiente forma:

20 gr de parformaldehido
150 ml de ácido pícrico saturado a 60 °C en agitación
Filtrar y aforar a 1 l con PBS

SOLUCION DE GLICINA

0.469 gr de glicina SIGMA, USA
25 ml de amortiguador PBS pH 7.4 GIBCO, USA

SOLUCION SUERO NORMAL DE CABRA

14.550 ml de amortiguador TBS pH 7.4
450 μ l de suero normal de cabra (SNC) VECTOR, USA
60 μ l de tritón BAKER ANALYZED, USA

SOLUCION ANTICUERPO PRIMARIO

(antirat- β FSH 1:30 000, hecho en conejo, donación NIADDK)
56 μ l de anti- β FSH
29.832 ml de amortiguador PBS pH 7.4
150 μ l de SNC VECTOR, USA

SOLUCION DE CONTROL

10 ml de amortiguador TBS pH 7.4
50 μ l de SNC VECTOR, USA

SOLUCION ANTICUERPO BIOTINILADO

20 μ l de anticuerpo biotilado VECTOR, USA

100 μ l de SNC VECTOR, USA

10 ml de amortiguador TBS pH 7.4

SOLUCION ABC

100 μ l de reactivo A (Avidina DH) VECTOR, USA

100 μ l de reactivo B (Peroxidasa H biotilada) VECTOR, USA

10 ml de amortiguador TBS pH 7.4

SOLUCION SUSTRATO DE PEROXIDASA

10 mg de 3'3-diaminobenzidina (DAB) ALDRICH, USA

50 ml de amortiguador TBS pH 7.4

Agregar 20 μ l de peróxido de hidrógeno SIGMA, USA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Allaerts W y Denef C: Modulation of Hormone Secretion by Folliculostellate Cells in Rat Anterior Pituitary Cell Aggregates. Program of the First Congress of Neuroendocrinology, San Francisco, CA. Abstract: 83; 1986
- Andrews W W y Ojeda S R: A Quantitative Analysis of the Maturation of Steroid Negative Feedbacks Controlling Gonadotropin Release in the Female Rat: The Infantile-Juvenile Periods. Transition from an Androgenic to a Predominantly Estrogenic Control. Endocrinology 1981; 108 (4): 1313
- Andrews W W, Heiman M, Porter S R y Ojeda S R: The Infantile Female Rat: *In vivo* Ovarian and Adrenal Steroidogenic Responses to Exogenous Administration or to Endogenously Induced Elevations of Gonadotropins and ACTH. Biol Reprod 1981; 24: 597-608
- Baird A, Klagsbrun M: A Dual Receptor System is Required for basic Fibroblast Growth Factor Activity. Cell 1991; 67: 229-231
- Baird A, Mormède P, Ying S J, Wehrenberg W B, Ueno N, Ling N, Guillemin R: A Non Mitogenic Pituitary Function of Fibroblast Growth Factor: Regulation of Thyrotropin and Prolactin Secretion. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 5545-5549
- Baird A, Walicke P: Fibroblast Growth Factor Promotes Survival of

Dissociated Hippocampal Neurons and Enhances Neurite Extension. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 3012-3016

- Bottenstein J E, Sato G H: Fibronectin and Polylysine Requirement for Proliferation of Neuroblastoma Cells in Defined Medium. Exp Cell Res 1980; 129: 361-366
- Bottenstein J E: Growth Requirements of Neural Cells *in vitro*. Adv Cell Neurobiol 1983; 4: 333-379
- Bottenstein J, Sato G: Growth of a Rat Neuroblastoma Cell Line in Serum-Free Supplemented Medium. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76 (1): 514-517
- Brändli A, Adamson E D y Simons K: Transcytosis of Epidermal Growth Factor. J Biological Chem 1991; 266 (13): 8560-8566
- Bullock G R, Petrusz P: Techniques in Immunocytochemistry. V1. Acad Press, 1982
- Carrel A: J Exp Med 1913; 17: 14-19 sic**
- Casper D, Roboz G J, Blum M: Epidermal Growth Factor and basic Fibroblast Growth Factor Have Independent Actions on Mesencephalic Dopamine Neurons in Culture. J Neurochem 1994; 62: 2166-2177
- Clayton R N: Gonadotropin-Releasing Hormone Modulation of its Own

Pituitary Receptors: Evidence for Biphasic Regulation. Endocrinology 1982; 111 (1): 152-161

- Clayton R N: Mechanism of GnRH Action in Gonadotrophs. Human Reprod. 1988 3 (4): 479-483

- Chaidarun S S, Eggo M C, Sheppard M C, Stewart P: Expression of Epidermal Growth Factor (EGF), its Receptor and Related Oncoprotein erbB-2 in Human Pituitary Tumors and Response to EGF *in vitro*. Endocrinology 1994; 135 (5): 2012-2021

- Chaidarun S S, Eggo M C, Stewart P, Barber P C, Sheppard M C: Role of Growth Factors and Estrogen as Modulators of Growth, Differentiation and Expression of Gonadotropin Subunit Genes in Primary Cultured Sheep Pituitary Cells. Endocrinology 1994; 134 (2): 935-944

- Chard T: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. V6, part 2: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. North Holland Pu. Co. 1978

- Chester-Jones I., Ingleton P M., Phillips J G: Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology. Chapter 9. Raven Press, 1987

- Childs G V, Unabia G, Lloyd J: Recruitment and Maturation of Small Subsets of Luteinizing Hormone Gonadotropes During the Estrous Cycle. Endocrinology 1992; 130 (1): 335-344

- Childs G, Ellison D, Foster L, Ramaley J A: Postnatal Maturation of Gonadotropes in the Male Rat Pituitary. Endocrinology 1981; 109 (5): 1683-1692
- Childs G, Unabia G: Application of the ABC Method to the Light Microscopic Localization of Pituitary Hormones. J Histochem and Cytochem USA 1982; 30 (7): 713-716
- Childs G: The Application of Avidin-Biotin Peroxidase Complex Technique to the Localization of Anterior Pituitary Hormones on Plastic Sections and Cell Monolayers. Techniques in Immunocytochemistry V2. Acad Press, 1983
- Deneff C: Pituitary Basophils from Immature Male and Female Rats: Distribution of Gonadotrophs and Thyrotrophs as Studied by Unit Gravity Sedimentation. Endocrinology 1978; 103 (3): 724-735
- Deneff C: Regulatory Activity and Topological Distribution of Folliculo Stellate Cells in Rat Anterior Pituitary Cell Aggregates. Neuroendocrinology 1989; 49: 409-418
- Döhler K D, Wuttke W: Serum LH, FSH, Prolactin and Progesterone from Birth to Puberty in Female and Male Rats. Endocrinology 1974; 94 (4): 1003-1008
- Döhler K D, Wuttke W: Changes with Age in Levels of Serum Gonadotropins, Prolactin and Gonadal Steroids in Prepubertal Male and

Female Rats. Endocrinology 1975; 97: 898-907

- Dubois P M, Begeot M, Hemming F J; Aubert M L: Différenciation des Cellules Antéhypophysaires en Culture. Annales d' Endocrinologie Paris 1987; 48: 367-377
- Dubois P M: Dossier Thématique: La Cellule Gonadotrope Antéhypophysaire. Annales d' Endocrinologie Paris 1990; 51: 47-53
- Dubois P y ElAmraoui A: Embriology of the Pituitary Gland. Trends Endocrinol Metab 1995; 6 (1): 1-7
- Elhier S: In Vitro 1986; 22: 485-490 sic***
- Félix R, Meza U y Cota G: Induction of Classical Lactotropes by Epidermal Growth Factor in Rat Pituitary Cell Cultures. Endocrinology 1995; 136 (3): 939-946
- Ferrara N, Mitchell R: Pituitary Follicular Cells Produce basic Fibroblast Growth Factor. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84 (16): 5773-5777
- Goodman H M: Basic Medical Endocrinology. Raven Press. USA, 1988
- Gospodarowicz D y Ferrara N: Fibroblast Growth Factor and the Control of Pituitary and Gonad Development and Function. J Steroid Biochem 1989; 32 (1B): 183-191

- Gospodarowicz D y Ferrara N: Fibroblast Growth Factor and the Control of Pituitary and Gonad Development and Function. J Steroid Biochem 1989; 32 (1B): 183-191
- Gospodarowicz D, Cheng J: Heparin Protects basic and acidic Fibroblast Growth Factors from Inactivation. J Cell Phy 1986; 128 (3): 475-484
- Gospodarowicz D, Ferrara N: Structural Characterization and Biological Function of Fibroblast Growth Factor. Endocrine Rev 1987; 8 (2): 95-114
- Gospodarowicz D: Fibroblast and Epidermal Growth Factors: Their uses *in vivo* and *in vitro* in Studies on Cell Functions and Cell Transplantation. Molec and Cell Biochem 1979; 25 (2): 79-110
- Ham R G, McKeenan W L: Media and Growth Requirements. Meth Enzimol Cell Culture 1979; 58: 44-93
- Hoffman R S: Growth 1940; 4: 361-376 *sic**
- Hynes R: Ann Rev Cell Biol 1985; 1: 67-90 *sic******
- Iberg N, Klagsbrun M: High Molecular Weight Forms of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Growth Factors: from Genes to Clinical Application. Edited by Vicki R. Sara Raven Press N. Y., 1990
- Katayama T, Shiota K, Sugino H, Takahashi M: Paracrine Effect of

Folliculo Stellate Cells on the Growth Factor Like Action of Activin A in Anterior Pituitary Cultures. Endocrinol Japon 1992; 39 (3): 289-297

- Ledoux D: Prog Growth factor Res 1992; 4 (2): 107-120 *sic**
- Lewis M R, Lewis W H: Anat Rec 1911; 5: 277-293 *sic***
- Li-Y: Cell Transformation. Mol Cell Biol 1994; 111: 7660-7669
- Marquardt H, Hunkapiller M N, Hood L E, Rtwardzik D, De Larco J E, Stephenson J R y Todaro G J: Transforming Growth Factors Produced by Retrovirus-Transformed Rodent Fibroblasts and Human Melanoma Cells: Amino Acid Sequence Homology with Epidermal Growth Factor. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 4684-4688
- McKeehan W L, Ham R G: J Cell Biol 1976; 71: 727-734 *sic*****
- Mendoza M E, Menjivar M, Garza-Flores J, Romano M: Comparative Effects of Short Term Treatment with Norethisterone and Sex Steroids on Gonadotropin Secretion in Rat Pituitary Cell Cultures. J Steroid Biochem Molec Biol 1993; 46 (5): 579-583
- Missale C, Spano P: Epidermal Growth Factor Induces the Functional Expressions of Dopamine Receptors in the GH3 Cell Line. Endocrinology 1991; 127: 13-20
- Miyake A, Tasaka C, Otsuka S, Kohmura H, Nakimoto H, Aono T:

Epidermal Growth Factor Stimulates Secretion of Rat Pituitary Luteinizing Hormone *in vitro*. Acta Endocrinol 1985; 108: 175-178

- Morgan J F et al: Proc Soc Exp Biol Med 1950; 73: 1-8 sic**
- Morris R J et al: Analyt Biochem 1987; 166: 1-13 sic***
- Mosher D F: Ann Rev Med 1984; 35: 561-575 sic*****
- Nakane P: Application of Peroxidase-Labeled Antibodies to the Intracellular Localization of Hormones. 3rd Symposium In Vitro Methods in Reproductive Cell Biology, 1971
- Naor y Childs: Binding and Activation of GnRH Receptors in Pituitary and Gonadal Cells. International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology. Edited by Bourne, G H: V 103: 147-188 . Academic Press 1986
- Noback C R., Demarest R J: The Human Nervous System. Basic Principles of Neurobiology. 2nd Edition. McGraw-Hill Book Company. USA., 1975
- Ojeda S R, Jameson H E y McCann S M: Developmental Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in the Female Rat: Ovarian Adrenal Influence During the Infantile Period. Endocrinology 1977; 100 (2): 440
- Ojeda S R, Urbansk H F, Costa M E, Hill D F y Moholt-Siebert M:

Involvement of Transforming Growth Factor α in the Release of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone from the Developing Female Hypothalamus. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9698-9702

- Polak J: Immunocytochemistry. Chapter 12: Immunocytochemistry of Pituitary Hormones. Wright PSG. 1980
- Proctor R A: Rev Inf Dis 1987; 9: 317-321 sic*****
- Roberts V J: Inhibin/Activin Proteins in Rat Pituitary and Brain. Neuroendocrine Regulation of Reproduction. Part III: Neuroendocrine Regulation of Gonadotrophs. Chapter 25. Edited by Yen S SC y Vale W W 269-277. Serono Symposia, USA. 1990
- Romer/Parsons: Anatomía Comparada. Capítulos 5 y 16. 5a Ed. Interamericana, 1981
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y: Proteoglycans as Modulators of Growth Factor Activities. Cell 1991; 64: 867-869
- Schectcher J E: Is Cellular Disruption the Mechanism of Release of basic Fibroblast Growth Factor from Anterior Pituitary Gonadotropes. Tiss and Cell 1992; 24 (6): 791-802
- Schonbrunn A. EGF and TRF Act Similarly on a Clonal Pituitary Cell Strain. J Cell Biol 1989; 85: 786-797

- Schttiny J C, Yurchenco P D: Basement Membranes: Molecular Organization and Function in Development and Disease. Curr Opin Cell Biol 1989; 1: 983-988
- Smith and Wood: Molecular and Cell Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Chapter 10: Cell Culture and Biotechnology. Chapman and Hall. USA, 1991
- Smith P, Neill D: Simultaneous Measurement of Hormone Release and Secretagogue Binding by Individual Pituitary Cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84 (15): 5501-5505
- Smith S S y Ojeda SR: Neonatal Release of Gonadotropins is Essential for Development of Ovarian Follicle-Stimulating Hormone Receptors. Biol Reprod 1986; 34: 219-227
- Stanko S, Stojilkovic J, Reinhart K, Catt J: Gonadotropin Releasing Hormone Receptors: Structure and Signal Transduction Pathways. Endocrine Rev 1994; 15 (4): 462-499
- Toral C: Participación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la adhesión y secreción de gonadotropinas por células anterohipofisarias de ratas hembra de 14 días de edad cultivadas en medio definido. Tesis de Licenciatura. Director: Dra. Marfa Eugenia Mendoza Garrido. Universidad Iberoamericana. México, D.F. 1996
- Trowell O A et al: J Exp Biol 1939; 16: 60-70 *sic**

- Vankelecom H, Denef C: Immunocytochemical Evidence that S-100-Positive Cells of the Mouse Anterior Pituitary Contain Interleukin-6 Immunoreactivity. J Histochem Cytochem 1993; 41 (2): 151-156
 - White P R: Growth 1946; 10: 231-289 sic**
 - Yamada K M: Fibronectins: Structure, Functions and Receptors. Curr Opin Cell Biol 1989; 1: 956-963
 - Yamaguchi M, Matsuzaki M, Hirota K, Miyake A y Tanizawa O: Interleukin 6 Possibly Induced by Interleukin 1 β in the Pituitary Gland Stimulates the Release of Gonadotropins and Prolactin. Acta Endocrinologica 1990; 122 (2): 201-205
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox G M, Arakawa T, Hsu B T y Rees D C: Three-Dimensional Structure of acidic and basic Fibroblast Growth Factors. Science 1991; 251: 90-93
- *Burguess W H, Marciag T: The heparin - binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Annu Rev Biochem 1989; 58: 575-606
 - **Rizzino A, Sato G: Defined Media and the Determination of Nutritional and Hormonal Requirements of Mammalian Cells in Culture. Nutr Rev 1979; 37 (12): 369-378
 - ***Collagens: Boehringer Mannheim Biochemica

- ****Bottenstein y Sato, 1979
- *****Fibronectin: Boehringer Mannheim Biochemica