

79

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“Optimización de la microdissección del núcleo paraventricular hipotalámico de rata en etapa neonatal.”

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIOLOGA

PRESENTA:

ARLENE ISKRA GARCÍA VÁZQUEZ

DIRECTOR TESIS:
DR. JEAN LOUIS CHARLI CABALONGA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2002.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Optimización de la microdissección del núcleo paraventricular hipotalámico de rata en etapa neonatal".

realizado por García Vázquez Arlene Iskra

con número de cuenta 9522096-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jean Louis Charli Casalonga.

Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Propietario Dra. Rosa María Uribe Villegas.

Suplente Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Suplente Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología


Dr. Eberto Novelo Maldonado



DEPARTAMENTO

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Jean Louis Charli Casalonga, con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN-223599, IN-216500)

AGRADEZCO:

Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga por toda la asesoría y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo, por el apoyo e interés mostrado.

A la Dra. Rosa María Uribe Villegas por su análisis y sugerencias para mejorar este trabajo y enriquecer la discusión del mismo.

A todos los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y revisión crítica del trabajo escrito.

A Q.I. Fidelia Romero Arteaga por su asistencia técnica brindada durante todo el proyecto.

Al Q. Miguel Cisneros por la realización de los radioinmunoensayos.

Al M.C. Eugenio Lopez Bustos, miembro de la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM, por el diseño de los oligos usados.

A Sergio Gonzalez Trujillo por el cuidado y suministro de los animales.

A Manuel Villa por su apoyo técnico en el laboratorio.

A PAEA, PROBETEL y a la Dirección General de Auntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo económico brindado, sin el cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Índice.

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	5
I.- El hipotálamo.....	5
II.- Control neuroendócrino.....	8
III.- La hormona liberadora de tirotrópina (TRH).....	9
Biosíntesis de la TRH.....	11
Localización y distribución de la TRH.....	11
Papel fisiológico de la TRH.....	12
IV.- Núcleo paraventricular hipotalámico (NPV).....	13
V.- Desarrollo de las neuronas del NPV.....	17
VI.- Diferenciación fenotípica.....	19
VII.-Neurotrofinas.....	21
Distribución de las neurotrofinas y sus receptores en el SNC.....	23
VIII.- Antecedentes	24
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVOS.....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	46
I.- Disección del NPV.....	46
Tejido congelado.....	49
Tejido fresco.....	54
II.-Efecto del BDNF sobre el nivel del ARNm de TRH y de la TRH.....	55
Método de dispersión.....	55
Análisis morfológico.....	55
Efecto de la densidad celular sobre los niveles del ARNm de TRH.....	58
Efecto del BDNF sobre los niveles del ARNm de TRH.....	58
Efectos del BDNF sobre los niveles de la TRH intracelular.....	60

DISCUSIÓN.....	63
I.-Diseción del NPV neontal.....	63
II.-Efecto del BDNF sobre el fenotipo TRHérgico.....	67
CONCLUSIONES.....	73
PERSPECTIVAS.....	73
REFERENCIAS.....	74

Resumen

El hipotálamo controla la función de la hipófisis vía los sistemas neurosecretores magno y parvocelular. La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es el principal factor hipotalámico involucrado en la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias: tirotropina (TSH), prolactina (PRL) y en algunos casos patológicos de la hormona de crecimiento (GH). La TRH está presente en altas concentraciones dentro del hipotálamo, principalmente en la región hipofisiotrópica. Muchas de las neuronas TRHérgicas están localizadas en la subdivisión parvocelular del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV). En adición al NPV, la TRH está presente en varios núcleos hipotalámicos, entre los que se puede mencionar al hipotálamo lateral, que está localizado muy cerca del NPV.

No se conocen bien cuáles son los procesos moleculares y celulares que llevan a determinar la expresión del fenotipo peptidérgico, en particular del TRHérgico, en las neuronas postmitóticas hipofisiotrópicas del NPV hipotalámico. Se ha visto que las neurotrofinas pueden inducir la expresión de ciertos neuropéptidos. Hay cuatro tipos de neurotrofinas: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y 4 (NT4). Existen varios ejemplos de los efectos del BDNF sobre la expresión del fenotipo peptidérgico en el sistema nervioso central (SNC). La adición de BDNF a cultivos fetales incrementa la expresión de somatostatina (SS) en el núcleo periventricular; y del ARNm de TRH en cultivos hipotalámicos primarios, pero sólo en las neuronas que expresan el receptor para esta neurotrofina: el TrkB. En cultivos postnatales, el BDNF incrementa la expresión de las hormonas vasopresina-arginina (AVP) y oxitocina (OX), en las neuronas del NPV y del núcleo supraóptico (NSO). Por otra parte, se sabe que en el NPV el ARNm del TrkB se expresa al día embrionario 16 (E16), justo antes de la aparición del ARNm de TRH (en E18). Lo anterior llevó a suponer que el BDNF pudiera estar

involucrado en la determinación del fenotipo TRHérgico de las neuronas hipofisiotróficas del NPV, aun falta demostrarlo.

Dado que el efecto de las neurotrofinas sobre la diferenciación del fenotipo peptidérgico es dependiente del tipo de neurotrofina, del péptido y de la subpoblación celular, y a que existen varios núcleos hipotalámicos con neuronas TRHérgicas; se decidió determinar los efectos del BDNF sobre la expresión del fenotipo TRHérgico en las neuronas postmitóticas del NPV. Para esto se optimizó la microdissección de éste núcleo en ratas de P0-P1. La microdissección se hizo primero a partir de tejido congelado, posteriormente se aplicó la experiencia adquirida en la disección del NPV en tejido congelado a la disección de este núcleo a partir de tejido fresco.

Para cumplir con el objetivo general se evaluó el efecto del BDNF sobre la expresión del ARNm de TRH y de su proteína, en cultivos de hipotálamo neonatal.

Los resultados obtenidos sugieren que con la estrategia de microdissección seguida en este proyecto, a partir de tejido congelado, se logró determinar una región en el hipotálamo neonatal en la que se puede localizar con alta probabilidad al NPV. Se vió que el BDNF aumenta la expresión del ARNm de TRH al 4 día in vitro (DIV) y la cantidad de la TRH intracelular al 12 DIV en el hipotálamo neonatal. Las neuronas del hipotálamo neonatal responden a los efectos del BDNF, de manera similar a las neuronas del hipotálamo fetal, esto nos permitirá en el futuro analizar la respuesta de las neuronas del NPV al BDNF.

Introducción.

I.- El hipotálamo.

El mantenimiento de la homeostasis representa un componente importante en la adaptación biológica de los organismos (Schmidt-Nielsen, 1986). Esta regulación homeostática depende de varias regiones del cerebro capaces de leer, interpretar e integrar un amplio rango de señales que describen el estado general del organismo y de su entorno inmediato. Como resultado de la información recibida, el cerebro responde a través de señales sinápticas y humorales para, por ejemplo, ajustar la conducta alimentaria, el gasto energético y el metabolismo, a las necesidades del organismo (Williams et al., 2000). En los organismos superiores, el fenómeno homeostático es controlado por el sistema neuroendócrino, en el cual, el sistema nervioso y el endócrino están relacionados física y funcionalmente por el hipotálamo (Schmidt-Nielsen, 1986).

El hipotálamo ocupa la parte ventral del diencefalo a ambos lados del tercer ventrículo; se encuentra inmediatamente encima de la hipófisis y ventral al tálamo; forma las paredes y el piso del tercer ventrículo (Schmidt-Nielsen, 1986) (Figura 1). Hacia la parte más rostral, el hipotálamo se encuentra limitado por el quiasma óptico, el área preóptica y la lamina terminalis; su límite caudal está definido por los núcleos mamilares (Kandel y Schwartz, 1991; Simerly, 1995). Se han reconocido tres zonas longitudinales en el hipotálamo: la periventricular, la media y la lateral.

La parte periventricular está adyacente al revestimiento ependimal del tercer ventrículo; en esta zona se encuentran las neuronas que proyectan a la hipófisis y que están involucradas en la regulación neuroendócrina. La zona media está inmediatamente adyacente a la zona periventricular; sus neuronas proyectan a varias partes del telencefalo, del diencefalo, del tallo cerebral y del hipotálamo (zonas periventricular y lateral).

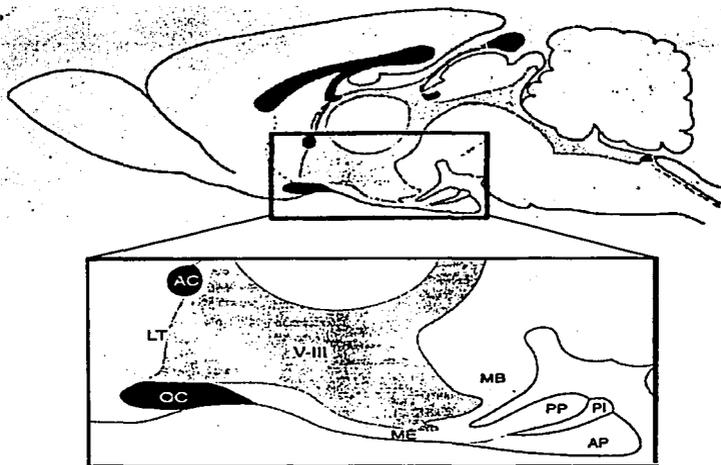


Figura 1. Localización del hipotálamo en el diencefalo de la rata. Esquema superior: corte parasagital del cerebro. En gris se observa el sistema ventricular y en negro la materia blanca. Esquema inferior, ampliación del recuadro en el que se muestra al hipotálamo. El piso del tercer ventrículo (V-III) está formado por el quiasma óptico (OC) y la eminencia media (ME). El límite rostral del hipotálamo está definido por la lamina terminalis (LT) y el límite caudal por los cuerpos mamilares (MB). PP, hipófisis posterior; AP, hipófisis anterior; PI, pares intermedios de la hipófisis.

Las neuronas de la zona lateral tienen fibras que proyectan a la médula espinal y a la corteza cerebral. Basada en la organización de los grupos celulares de la zona media, se ha dividido al hipotálamo dentro de cuatro regiones rostro-caudal; la región preóptica, la anterior o supraóptica, la tuberal y la mamilar (Simerly, 1995).

El hipotálamo tiene un papel muy importante en la integración de los sistemas endócrino, visceral y somatomotor. Este papel regulador es reflejado en su organización estructural y en sus extensas conexiones recíprocas con el sistema límbico, con otras áreas del cerebro y con los órganos periféricos (Bleier y Byne, 1985). Sus conexiones eferentes y aferentes, le permiten integrar una variedad de procesos fisiológicos y conductuales convirtiendo la información sináptica en señales humorales, influenciando las actividades de las principales regiones del cerebro y de la médula espinal y coordinando diversas funciones autonómicas, endócrinas, conductuales y ritmos circádicos. El hipotálamo también responde a las señales del sistema nervioso periférico (SNP), por retroalimentación (positiva y/o negativa) lo que le permite responder a las señales de los sistemas que él controla (Card et al., 1999).

El hipotálamo es considerado el centro de control de varias funciones nerviosas entre las que se puede mencionar el control de la temperatura corporal y la ingesta de comida y agua (Schmidt-Nielsen, 1986). En los mamíferos además, el hipotálamo regula el sistema cardiovascular, las vísceras abdominales, las conductas agresivo-defensivas, la expresión de la conducta materna y sexual (Simerly, 1995); también se le ha involucrado en el control del ciclo de sueño-vigilia (Card et al., 1999). En adición, el hipotálamo también ejerce control sobre el sistema endócrino, el cual es reflejado en su estrecha relación física y funcional con la hipófisis, considerada como la glándula maestra del sistema endócrino (Schmidt-Nielsen, 1986).

II.- Control neuroendócrino.

El hipotálamo influencia la función de los lóbulos anterior y posterior de la glándula hipófisis vía dos sistemas neurosecretores: 1) el sistema magnocelular de los núcleos paraventricular (NPV) y supraóptico; y 2) el sistema parvocelular del NPV y de otros núcleos. El lóbulo posterior o neurohipófisis es controlado vía las conexiones neuronales del sistema magnocelular. El lóbulo anterior o adenohipófisis, es controlado mediante el sistema parvocelular a través del sistema portal adenohipofisiario (Schmidt-Nielsen, 1986; Armstrong, 1985).

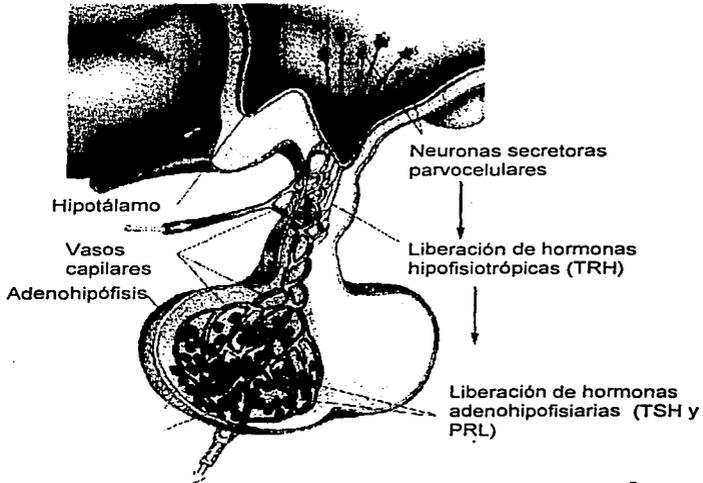
Las células magnocelulares sintetizan las neurohormonas arginina-vasopresina (AVP) y oxitocina (OX), que son transportadas a las terminales nerviosas que inervan la neurohipófisis, cerca de sus capilares fenestrados, formando el sistema hipotálamo-neurohipofisial (Armstrong, 1985; Card et al., 1999). Estas neurohormonas son liberadas al torrente sanguíneo bajo diferentes estímulos (parto, lactancia, náuseas, alteración de la presión sanguínea, etc.) para actuar sobre sus órganos blanco. La AVP ejerce sus efectos en los riñones para regular el volumen y la concentración de sales de los vasos sanguíneos. La OX causa la contracción del músculo liso en el útero para facilitar la salida del producto, así como la expulsión de leche de las glándulas mamarias durante la lactancia (Schmid-Nielsen, 1986; Armstrong, 1985).

Las neuronas parvocelulares, también conocidas como el sistema tuberohipofisial (Armstrong, 1985), influyen la secreción de las hormonas adenohipofisarias, vía la liberación de factores hipofisiotrópicos de sus terminales axónicas en la eminencia media (órgano circumventricular, que se extiende del piso del hipotálamo hasta la adenohipófisis). La adenohipófisis está físicamente separada del cerebro pero funcionalmente unida al hipotálamo a través de un sistema especializado de vasos capilares llamado sistema portahipofisiario. El control neuroendócrino es logrado vía los vasos del pléxus portal, los cuales conectan a la eminencia media con la adenohipófisis. Los axones de las neuronas parvocelulares terminan en contacto con el pléxus portal, liberando sus factores

hipofisiotrópicos dentro de la vasculatura fenestrada. Estos factores viajan a través del plexus portal a la adenohipófisis donde ejercen sus efectos reguladores (Card et al., 1999). Son varias las neurohormonas hipotalámicas que están involucradas en el control de la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias, las cuales son transportadas al torrente sanguíneo para actuar sobre receptores específicos en sus células blanco y efectuar su función reguladora (Akil et al., 1999).

III.- La hormona liberadora de tirotrópina (TRH).

La TRH (pGlu-His-Pro-NH₂) fue el primer factor hipofisiotrópico en ser definido químicamente y sintetizado. Fue aislado e identificado de manera independiente por R. Guillemin y A.V. Schally a partir de extractos hipotalámicos de oveja y cerdo respectivamente (Griffiths y Bennett, 1983; Lee et al., 1988). Desde principios de la década de 1950, se había reconocido que el hipotálamo tiene una importante influencia en la regulación del eje hipófisis-tiroides (Jackson, 1983). La TRH es la hormona hipotalámica más importante involucrada en la regulación de la síntesis y secreción de la tirotrópina (TSH) de la adenohipófisis (Haiseneder et al., 1992; Akil et al., 1999); también induce la síntesis y liberación de prolactina (PRL) y de la hormona de crecimiento (GH), esta última sólo en condiciones de trastornos metabólicos o endócrinos (O'Leary y O'Connor, 1995). Liberada de la eminencia media del hipotálamo, la TRH es transportada a la adenohipófisis vía el sistema portal hipofisario. En la adenohipófisis actúa sobre los tirótrofos causando la liberación de la TSH. La TSH actúa sobre la glándula tiroides para estimular la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, que al ser liberadas al torrente sanguíneo, actúan sobre múltiples genes blancos en las células periféricas y centrales regulando la transcripción de varios genes (Akil et al., 1999) (Figura 2).



Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH)

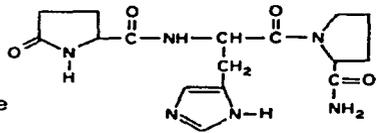


Figura 2. Representación anatómica de la interacción del hipotálamo con la adenohipófisis. Las neuronas parvocelulares proyectan sus terminales hacia la eminencia media, en donde secretan a las hormonas hipofisiotrópicas, como la TRH, en los capilares portahipofisiarios. Estas hormonas llegan a la adenohipófisis donde controlan la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisiarias, como la TSH y la PRL. A la derecha se muestra la estructura química de la TRH.

Biosíntesis de la TRH.

El gen de la TRH ha sido caracterizado en particular en la rata y en el humano. En estos organismos, el gen tiene un 73.3% de identidad cuando se compara las secuencias completas y un 89.2% de identidad en su región codificante. La unidad de transcripción es de 2.6 kb y contiene tres exones separados por dos intrones. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida, el exón 2 codifica para el péptido señal y un pequeño fragmento de la secuencia amino terminal, el exón 3 codifica para la mayoría del péptido y la región 3' no traducida (Lee et al., 1988; Yamada et al., 1990). La TRH es sintetizada como un precursor de 26000 Da. En la rata, este precursor tiene repetida 5 veces la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueada por residuos básicos. La hidrólisis secuencial de estos residuos por una convertasa y una carboxipeptidasa produce Gln-His-Pro-Gly; la glutaminil ciclasa convierte el residuo Gln a piro-Glu y la peptidilglicina α -amidasa monooxigenasa convierte el pGlu-His-Pro-Glu a pGlu-His-ProNH₂ (TRH) (Joseph-Bravo et al., 1998).

Localización y distribución de la TRH.

La TRH está presente en altas concentraciones dentro del hipotálamo, particularmente en la región hipofisiotrópica, denominada así por su papel en el mantenimiento y regulación de la actividad de la adenohipófisis (Bleir y Byne, 1985). Muchas de las neuronas TRHérgicas hipotalámicas están localizadas en el NPV, en la subdivisión parvocelular de este núcleo. La TRH localizada en la eminencia media, proviene principalmente de estas neuronas parvocelulares, principalmente de la región media y periventricular del NPV. También existen células TRHérgicas en la porción magnocelular del NPV, pero en muy baja proporción (Fliers et al., 1998; Akil et al., 1999)

En adición al NPV, hay varios núcleos hipotalámicos que contienen células TRHérgicas; sin embargo, al no proyectar a la eminencia media, probablemente no estén involucradas directamente en la regulación hipofisiotrópica (Lechan y Toni, 1992). Estudios inmunocitoquímicos realizados entre 1970 y 1980 en el

hipotálamo de la rata, demostraron la existencia de neuronas que contienen TRH en las porciones dorsal y ventral de los núcleos dorsomediales (NDH), en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) y en el área perifornical (Fliers et al., 1998). Existen también células TRHérgicas en el área hipotalámica lateral (HL), en el núcleo arcuato (ARC), en el área preóptica incluyendo los núcleos mediales, laterales, periventriculares y el dimórfico sexual, en el núcleo ventromedial (NVH), en el área hipotalámica anterior e hipotálamo posterior, en los núcleos dorsales y ventrales premilares y en los núcleos mamilares. Aunque las células que contienen TRH fuera del NPV, constituyen una porción sustancial del TRH hipotalámico, poco se sabe sobre sus proyecciones eferentes y/o aferentes y de su papel fisiológico (Lechan y Jackson, 1986).

La distribución de la TRH no está limitada al hipotálamo. Usando un antisuero producido contra una secuencia presente en el precursor de la TRH, se demostró la existencia de neuronas inmunoreactivas al pro-TRH en el telencéfalo y el tallo cerebral de la rata (Lechan et al., 1986; 1987). Otras regiones extrahipotalámicas que contienen células con TRH son: el bulbo olfatorio, los núcleos reticulares del tálamo y muchas otras regiones del sistema nervioso central (SNC), que no están involucradas con la regulación neuroendócrina de la adenohipófisis. En 1974 varios grupos demostraron la presencia de la TRH en el tracto gastrointestinal, en la placenta, en la retina y otras regiones periféricas (Griffiths y Bennett, 1983; Lee et al., 1988).

Papel fisiológico de la TRH.

La amplia distribución de la TRH en el SNC y en el SNP sugiere que su función puede ir más allá de su papel como regulador de la secreción adenohipofisial (Lee et al., 1988). Los papeles fisiológicos que se le han atribuido a la TRH en el SNC son como neurotransmisor o neuromodulador (Jackson, 1983). A la TRH se le han atribuido efectos analépticos en el séptum, el putámen caudado y en los núcleos ventromediales hipotalámicos. Adicionalmente, se ha visto que la TRH tiene efectos termorreguladores, atenúa los efectos hipotérmicos

del pentobarbital y del etanol, reduce la narcosis producida por éste último. En el hipocampo, la TRH se ha relacionado con la facilitación de la memoria y con efectos anticonvulsivos; en la amígdala, se le ha relacionado con la depresión y la ansiedad (ver referencias en Lechan y Toni, 1992).

IV.- Núcleo paraventricular hipotalámico (NPV).

El NPV es una formación prominente del diencefalo, ubicada en la zona periventricular de la región anterior del hipotálamo, dentro del área tirotrópica o hipofisiotrópica (Lechan y Toni, 1992; Liposits, 1993). El NPV es un núcleo de forma triangular, localizado en el margen dorsal del tercer ventrículo, extendiéndose bilateralmente entre este ventrículo y el fórnix. En la rata adulta, la extensión rostro-caudal del NPV es de aproximadamente 1-1.1 mm (Armstrong, 1985) y en los neonatos de 0.4-0.5 mm (este dato fue determinado experimentalmente en el laboratorio y concuerda con lo determinado por Paxinos et al., 1994).

El NPV está formado por dos grandes divisiones celulares, determinadas con base en el tamaño de sus neuronas: 1) la división magnocelular, formada por neuronas de tamaño grande, cuyas terminales nerviosas proyectan principalmente a la neurohipófisis; 2) la división parvocelular, formada por neuronas de tamaño medio y pequeño que están adyacentes a la pared ependimal del tercer ventrículo. La mayoría de las neuronas de ésta división proyectan a la eminencia media (EM), sin embargo, varias de ellas proyectan a otras regiones extrahipotalámicas (Akil et al., 1999) (Figura 3). Se tienen datos aproximados del número de neuronas que forman el NPV; se ha determinado aproximadamente 6,000 neuronas para la división magnocelular y 10,000 para la división parvocelular (Kiss et al., 1991).

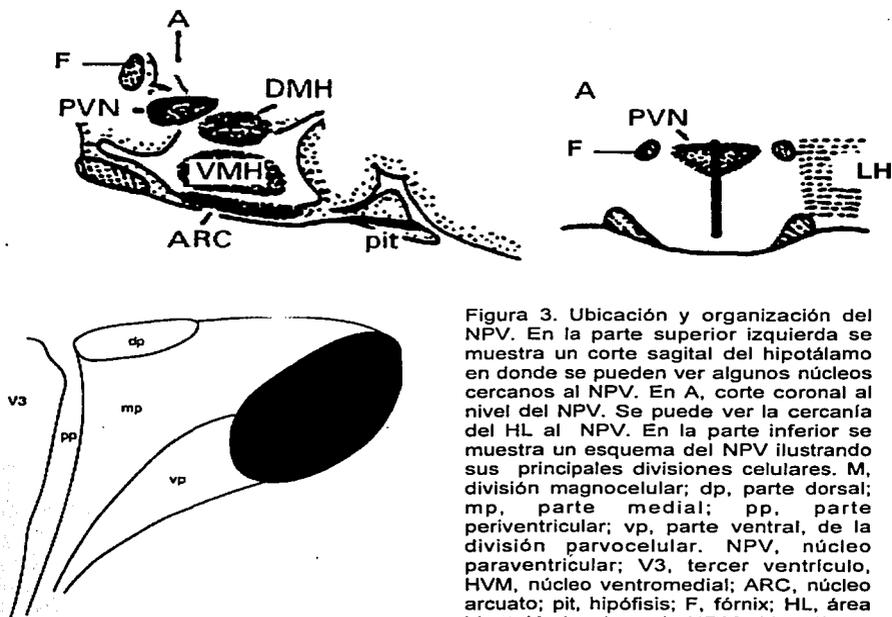


Figura 3. Ubicación y organización del NPV. En la parte superior izquierda se muestra un corte sagital del hipotálamo en donde se pueden ver algunos núcleos cercanos al NPV. En A, corte coronal al nivel del NPV. Se puede ver la cercanía del HL al NPV. En la parte inferior se muestra un esquema del NPV ilustrando sus principales divisiones celulares. M, división magnocelular; dp, parte dorsal; mp, parte medial; pp, parte periventricular; vp, parte ventral, de la división parvocelular. NPV, núcleo paraventricular; V3, tercer ventrículo; HVM, núcleo ventromedial; ARC, núcleo arcuato; pit, hipófisis; F, fórnix; HL, área hipotalámica lateral; NDM, hipotálamo dorsomedial.

El NPV es un sitio donde convergen numerosas rutas neuronales involucradas en la regulación del balance energético, funcionando como un centro integrativo de información sensorial, capaz de mandar señales humorales y neuronales a diferentes órganos y estructuras blanco para regular varios procesos fisiológicos en el organismo. Esto puede ser resultado de sus extensivas conexiones con otras estructuras dentro y fuera del hipotálamo (Williams et al., 2000).

Las neuronas del NPV, proyectan a 4 sitios principales: 1) a la neurohipófisis; 2) a la eminencia media; 3) al tallo cerebral y a la médula espinal y 4) hacia otras áreas del cerebro, como los órganos subfornicales, la glándula pineal, los órganos subcomisurales y el área postrema. Cerca de 1000 neuronas parvocelulares del NPV proyectan a regiones autónomas, como la materia gris periacueductal, los núcleos dorsales del rafe, los núcleos del locus coeruleus, los núcleos motores del vago y los del tracto solitario (Figura 4).

El NPV recibe inervaciones de varios núcleos hipotalámicos, como el NSQ, el ARC, el NDH y los núcleos premamilares. Además del hipotálamo, varias regiones del cerebro inervan al NPV, como el romboencéfalo, que es la primera aferencia de impulsos catecolaminérgicos que lleva información visceral al NPV; el mesencéfalo, que es la principal aferencia de fibras serotoninérgicas, y diferentes estructuras límbicas (Liposits, 1993). Todas estas conexiones le permiten recibir información acerca de los cambios en el medio interno del organismo (Armstrong, 1985; Lechan y Toni, 1992; Liposits, 1993; Akil, et al., 1999) (Figura 5).

Las células del NPV expresan una gran variedad de neurohormonas y neurotransmisores. Hay cerca de 20 sustancias que son sintetizadas en el NPV y que tienen diferentes funciones como mensajeros químicos dentro y fuera del cerebro. Las neuronas parvocelulares del NPV son químicamente diferentes, éstas sintetizan péptidos como angiotensina II, péptido natriurético, bombesina, AVP,

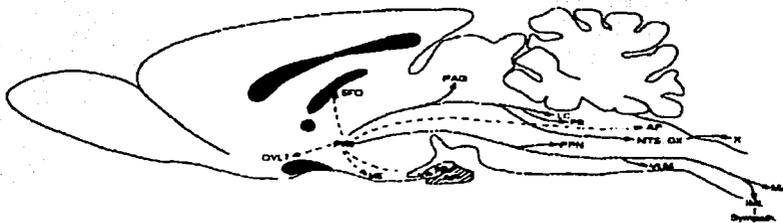


Figura 4. Principales proyecciones eferentes del NPV. AP, área postrema; PP y AP, neuro y adenohipófisis; DX, núcleo dorsal del vago; ME, eminencia media; MZ, zona marginal; OVLT órgano vasculoso de la lámina terminalis; LC, locus coeruleus; NTS, núcleos del tracto solitario; PAG, materia gris periacueductal; PB, núcleos parabranciales; NPV, núcleo paraventricular; SFO, órgano subforminal.



Figura 5. Principales aferencias al NPV. A1, primer grupo celular noradrenérgico; ARC, núcleo arcuato; BNST, núcleo basal del estriado terminalis; C1, primer grupo celular adrenérgico; DM, núcleo dorsomedial; LC, locus coeruleus; NTS, núcleos del tracto solitario; PM, núcleos premamilares; PB, núcleo parabrancial; RN, núcleo del rafe; SCN, núcleo supraóptico; SFO, órgano subforminal.

colecistocina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), tirosina hidroxilasa (TH), ácido γ -amino butírico (GABA), encefalinas, galanina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GH-RH), neurotensina, somatostatina (SS), TRH, transcrito relacionado a la cocaína y a la amfetamina (CART) entre otros (Armstrong, 1985; Liposits, 1993).

Se ha mostrado que muchas neuronas en el NPV expresan más de un péptido. Hay un número sustancial de hormonas y neurotransmisores que son coexpresados con las hormonas "clásicas" (TRH, CRH, AVP, OX) del NPV. Algunos de éstos son expresados bajo condiciones basales y otros sólo bajo diferentes paradigmas experimentales. Sin embargo, se creía que las neuronas TRHérgicas no sintetizaban a otros péptidos. Recientemente, se mostró que sólo un pequeño porcentaje de las neuronas que expresan TRH en el NPV expresan también CRH o neurotensina (Lechan y Toni, 1992) o galanina o encefalina (Akil et al., 1999). Adicionalmente, por estudios de doble hibridación in situ, se mostró que el CART, un péptido involucrado en la regulación de la ingesta de alimentos, es coexpresado con la TRH en las neuronas de las subdivisiones anterior y medial parvocelular del NPV (Broberger, 1999).

V.- Desarrollo de las neuronas del NPV.

El hipotálamo se desarrolla de la vesícula diencefálica del tubo neural. Durante el desarrollo del SNC, la vesícula diencefálica se divide en 4 regiones llamadas neurómeros denominados D1 a D4 (numerados en sentido antero-posterior). Es a partir del neurómero D1 que se desarrolla el hipotálamo (Figdor y Stern, 1993). Las paredes de la vesícula diencefálica están formadas por epitelio germinal; la diferenciación de este epitelio, correspondiente a la pared del tercer ventrículo, da origen a las diferentes estructuras del hipotálamo. Estas estructuras empiezan a surgir en un sentido lateral a medial o de afuera hacia adentro. En las ratas las células del hipotálamo lateral son las primeras que se forman entre los días 13 embrionario (E13) y E16 (Altman y Bayer, 1978b; Card 1999); al día E13

empiezan a aparecer las neuronas magnocelulares del NPV. Estas células al inicio de su diferenciación pueden estar presentes alrededor del neuroepitelio, pero son distinguibles sólo hasta el día E16 y muy fácilmente reconocidas hasta el día E17 (Altman y Bayer,1978a) (el tiempo de aparición de otras estructuras hipotalámicas puede ser revisado en Altman y Bayer,1978a). En la rata, el NPV al día E17 es morfológicamente identificable en la pared del tercer ventrículo, aunque es hasta E18 cuando puede ser distinguido con claridad del tejido que lo rodea. Al nacimiento la morfología del NPV corresponde ya a la morfología del NPV de la rata adulta (Hyypä,1969). Mediante la administración de timina tritiada a ratas gestantes, se ha podido determinar que entre los días E13 y E15, ocurre la última división mitótica de las neuronas del NPV, detectándose el último pico de generación de estas neuronas en el día E14 (Altman y Bayer,1978b; Ifft,1972).

Por medio de estudios de inmunocitoquímica usados para identificar el fenotipo neuronal y de timina tritiada, se ha podido determinar que las neuronas TRHérgicas y las CRHérgicas del NPV de la rata nacen (referido como la última división mitótica) entre los días E13 y E15, encontrándose su pico de generación en el día E14. El nacimiento de las neuronas TRHérgicas de otros núcleos hipotalámicos empieza antes, entre el día E12 y acaba hasta el día E16 (Markakis y Swanson,1997).

En la rata, las neuronas TRHérgicas son detectadas por hibridación in situ en el NPV a partir del día E16. En otros núcleos hipotalámicos, como el hipotálamo lateral, la detección del ARNm de TRH ocurre más temprano en la etapa embrionaria, al día E14. Aunque la detección del ARNm de TRH se da en E16, es hasta el E17 cuando por inmunohistoquímica, son detectables células positivas para TRH. Los valores máximos de TRH y de su ARNm son obtenidos entre la segunda y tercera semana después del nacimiento (Pérez-Martínez et al., no publicado) (Figura 6).

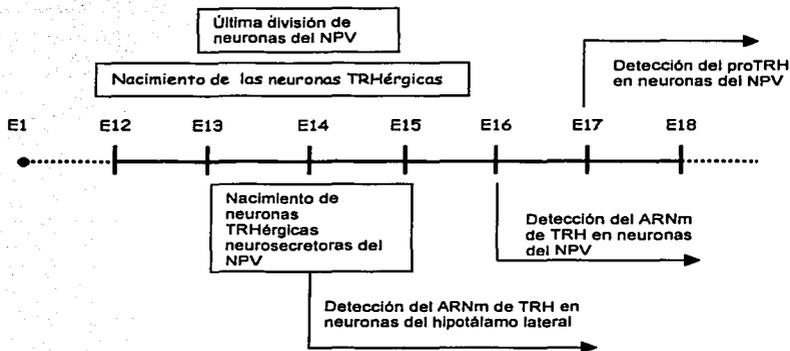


Figura 6. Cronología de la ontogenia de las neuronas TRH del NPV en la rata (Tomado de González-Sánchez JA, 2001)

VI.- Diferenciación fenotípica.

Podemos referirnos al fenotipo, como el conjunto de características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que adquieren las neuronas durante el desarrollo. Para el caso de las neuronas peptidérgicas está definido por la aparición o síntesis del péptido (Strand, 1999; Burbach, 2000).

La identidad del neuropéptido o neurotransmisor que una neurona va a sintetizar como molécula de señalización química y las estructuras que va tener como blanco, son determinadas durante el desarrollo, en particular, durante la fase terminal del proceso de diferenciación. Este proceso, es dirigido por rutas genéticas que involucran la participación de varios factores de transcripción. Las interacciones que se puedan establecer entre estos factores de transcripción (y posiblemente otros genes adicionales) determinan el tipo de péptido o neurotransmisor que una neurona va a expresar (Burbach, 2000). Se han identificado varios factores de transcripción pertenecientes a las familias bHLH,

POU y Pax, involucrados en la adquisición del fenotipo peptidérgico. Los factores de transcripción Brn2 y Otp, pertenecientes a la familia de genes homeobox, Sim1 y Arnt2, de la familia de los PAX, están involucrados en la adquisición del fenotipo peptidérgico de las neuronas magnocelulares y parvocelulares del NPV hipotalámico. Estudios realizados en ratones con una mutación nula del gen Brn (Brn2 \mathcal{T}), demostraron la participación de este factor en la migración y la diferenciación fenotípica de las neuronas magnocelulares del NPV. En los ratones Brn2 \mathcal{T} , estas neuronas no existen al nacimiento y en consecuencia no se establece el sistema hipotalámico-neurohipofisial. La inactivación de los otros factores de transcripción Otp, Sim1 y Arnt2 produce el mismo efecto. Para el caso específico de las neuronas TRHérgicas y somatostatinérgicas, se sabe que se requieren uno o más de estos factores de transcripción (Burbach, 2000) (Figura 7).

Sin embargo, hay otros factores de tipo epigenético que también están actuando durante el desarrollo y que pueden influenciar los cambios morfológicos, fisiológicos y químicos en las neuronas postmitóticas (Petit et al., 2002). Se ha observado que la actividad eléctrica (Nawa et al., 1994), las aferencias (Petit, et al., 2002), la composición de la matriz extracelular (Niquet et al., 2000) y factores difusibles, en particular factores tróficos (Petit et al., 2002), pueden inducir la expresión de un fenotipo particular. Por ejemplo, en las neuronas de la corteza visual, las inervaciones aferentes son capaces de inducir el fenotipo hacia la expresión del neuropéptido Y (NPY). En el hipocampo, la actividad neuronal modula la expresión de NPY y de la SS (Nawa et al., 1994; Petit et al., 2002).

Estudios extensivos en el SNP han establecido que la expresión de los neurotransmisores y neuropéptidos está regulada espacial y temporalmente durante el desarrollo y que esta expresión está influenciada por factores tróficos sintetizados por varios tipos celulares incluyendo las células de tipo glial y las células blanco (Korsching, 1993). En el SNC las neurotrofinas también aceleran la expresión de varios neuropéptidos, de manera dependiente del tipo de neurotrofina, de la región y del tipo de neuropéptido in vivo e in vitro (Nawa et al., 1994; Loudes et al., 2000; Petit et al., 2002).

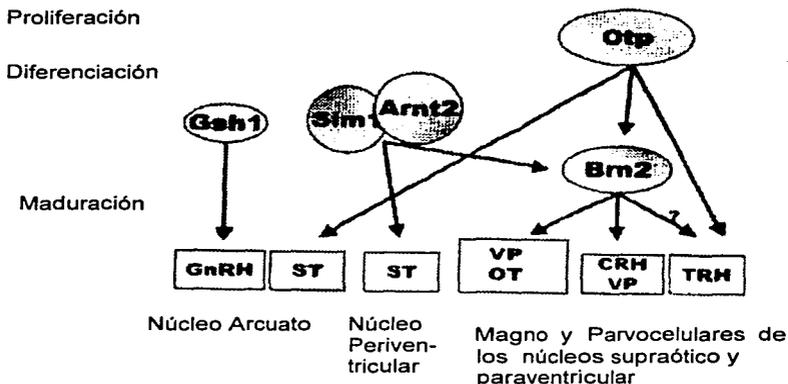


Figura 7. Rutas genéticas en el desarrollo de las neuronas peptidérgicas del hipotálamo. Se muestran los factores de transcripción que han sido involucrados a partir del análisis del fenotipo de ratones con mutaciones nulas de estos factores de transcripción.

VII.- Neurotrofinas.

Las neurotrofinas son proteínas que forman una familia multifuncional de factores tróficos, constituida por 6 factores estructuralmente relacionados: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3, 4 (5) (Korsching, 1993) y 6 (Katoh-Semba et al., 1997) (NT3, NT4 (NT5) y NT6). Entre las principales funciones de las neurotrofinas están el aumento de la diferenciación del fenotipo peptidérgico (Carnahan y Nawa, 1993), la sobrevivencia, mantenimiento, migración y crecimiento de las neuronas en el SNC y el SNP (Katoh-Semba et al., 1997). Estos factores neurotróficos inducen una gran variedad de cambios en las células: en las propiedades de transporte, en la actividad metabólica, en el tráfico realizado a través de la membrana celular

(Saltiel y Decker, 1994); también están involucrados en la modulación y la maduración de las conexiones sinápticas (Stoop y Mu-ming Poo, 1996).

Las neurotrofinas ejercen sus efectos mediante la unión a dos tipos de receptores, uno de baja afinidad conocido como receptor neurotrófico de baja afinidad (p75LNTR) que reconoce a todas las neurotrofinas con una afinidad similar (de concentración nanomolar) y mediante la familia de los receptores de tirosina cinasa (Trk) que reconocen a las neurotrofinas con alta afinidad (de concentración picomolar). Hay tres miembros de esta familia de receptores, el TrkA, que reconoce a NGF, el TrkB que reconoce a BDNF y NT4 (NT5) y el TrkC que reconoce a NT3. La unión de sus ligandos a estos receptores desencadena toda una ruta de señalización intracelular que lleva a la regulación de la expresión de múltiples genes (Jonson, 1999).

Existen varios ejemplos del papel en la sobrevivencia y diferenciación neuronal (en particular del fenotipo de neurotransmisión) que tienen las neurotrofinas durante el desarrollo del sistema nervioso. En el SNP, el NGF controla la expresión de la sustancia P en cultivos de neuronas sensoriales (Nawa et al., 1994). En el SNC, el BDNF mantiene la sobrevivencia y diferenciación de las neuronas colinérgicas del séptum, de las dopaminérgicas del mesencéfalo ventral y de la sustancia nigra (Berg-von der Emde et al., 1995), de las neuronas GABAérgicas del estriado, de las neuronas del ganglio retinal y de la raíz dorsal (Katoh-Semba et al., 1997). La neurotrofina NT3 tiene efectos tróficos sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en adición a otras influencias en otros núcleos del hipotálamo en desarrollo (Berg-von der Emde et al., 1995). En el hipocampo el BDNF y la NT3 son capaces de regular la expresión de NPY (Petit et al., 2002). La administración intraventricular del BDNF a ratas neonatales, incrementa los niveles de expresión del NPY en el tálamo, el estriado y en la neocorteza, donde también tiene efectos sobre la expresión de la SS y de la sustancia P (Nawa, 1994).

Se sabe poco sobre las poblaciones neuronales que pueden responder a las neurotrofinas en el hipotálamo (que contiene una gran variedad de fenotipos peptidérgicos) y sobre los factores neurotróficos que las neuronas hipotalámicas puedan requerir para su sobrevivencia, para el establecimiento y el mantenimiento de su función. La adición de BDNF o NT3 a cultivos hipotalámicos fetales, aumenta selectivamente la diferenciación morfológica y funcional de neuronas somatostatinérgicas de los núcleos periventriculares y dopaminérgicas del ARC respectivamente (Berg-von der Emde, 1995; Loudes et al., 2000; Petit et al., 2002). El BDNF también está involucrado en la determinación del fenotipo de la AVP y OX en las neuronas hipotalámicas del NPV y del NSO en ratas postnatales (P6-P8) (Kusano et al., 1999).

Distribución de las neurotrofinas y sus receptores en el SNC.

Las neurotrofinas y sus receptores se expresan ampliamente en el SNC en la rata adulta. Es posible encontrar al ARNm del NGF, BDNF y NT3 principalmente en el hipocampo (Friedman et al., 1991). El BDNF y su receptor están abundantemente expresados en el SNC, localizados en particular en el hipocampo y en la corteza cerebral. El ARNm del BDNF además se encuentra en los núcleos piriformes, en la amígdala y el cerebelo (Nawa et al., 1994).

La expresión de estas neurotrofinas es regulada durante el desarrollo. Los transcritos del NGF, BDNF y NT3 se pueden detectar en la rata desde el día E11 y entre el E11 y E12 hay un incremento en sus niveles de expresión, alcanzando los niveles más altos en el hipocampo. En el hipotálamo la expresión del ARNm del BDNF se inicia en las etapas tardías del desarrollo embrionario, cuando las neuronas peptidérgicas son detectadas inicialmente (Kato-Semba et al, 1997). Durante la etapa postnatal en el hipotálamo el ARNm del BDNF se expresa abundantemente, principalmente en los núcleos ventromediales y en el área preóptica, mientras el ARNm del NGF se expresa en bajos niveles y no es detectable el ARNm de NT3 (Nawa et al., 1994; Berg-von der Emde et al., 1995).

En el hipotálamo del ratón se ha detectado mediante "Northern blot" el ARNm de TrkB a partir del día E9 y por hibridación in situ se puede observar a partir del día E10 en el proencéfalo, en la parte caudal del mesencéfalo, en el romboencéfalo, en la médula espinal y en las células que formarán los ganglios de la raíz dorsal (Klein et al., 1990). En el ratón el ARNm de TrkB y el péptido del BDNF están colocalizados a nivel celular (Conner et al., 1997; Yan et al., 1997). Durante el desarrollo fetal, en la rata el ARNm de TrkB se detecta en la región medial del hipotálamo y en la eminencia media y por hibridación in situ se observó que el ARNm de TrkC se expresa en los núcleos dorsales y ventromediales del hipotálamo y en la eminencia media. Ésto lleva a suponer que las neurotrofinas y en particular el BDNF, tienen un papel importante en la determinación del fenotipo peptidérgico en las neuronas hipotálamicas (Kato-Semba et al, 1997).

VIII.- Antecedentes

Efectos del BDNF sobre la expresión del ARNm de TRH.

En el NPV de la rata adulta se puede detectar los ARNm del BDNF y de su receptor TrkB^{TK+} (Merlio et al., 1992; Kernie et al., 2000); se ha demostrado que el ARNm del receptor TrkB^{TK+} está localizado en las neuronas TRHérgicas (Ubieta et al., no publicado). Estudios realizados recientemente en el laboratorio mostraron que existe una relación espacio-temporal entre la expresión del ARNm de TrkB^{TK+} y las neuronas que expresan el ARNm de TRH en el hipotálamo durante la etapa prenatal; en las células del NPV el ARNm de TrkB^{TK+} se expresa antes que el ARNm de TRH, esto sugiere que el BDNF puede estar participando en la inducción de la expresión del ARNm de TRH en esta etapa del desarrollo (Gonzales, 2001, Tesis de Maestría, UNAM). In vivo, son expresados los ARNm y las proteínas de BDNF y NT3 en el hipotálamo fetal (Loudes et al., 1999).

La evidencia de los efectos del BDNF sobre la diferenciación del fenotipo peptidérgico en diferentes subpoblaciones neuronales; la presencia del ARNm de TrkB^{TK+} y de TrkC, del BDNF y de la NT3 en el hipotálamo de la rata durante la

etapa embrionaria, sugería que estas neurotrofinas podían participar en la determinación del fenotipo peptidérgico, en particular el TRHérgico. Para confirmar ésto, se analizó en el laboratorio el efecto de éstas neurotrofinas sobre los niveles del ARNm de TRH en cultivos de hipotálamo fetal. La adición del BDNF, pero no la de NT3, al cultivo de células hipotalámicas incrementó los niveles del ARNm de TRH a los 4 días in vitro (DIV). Se demostró que este efecto no se debe a un efecto del BDNF sobre la sobrevivencia, sino a un incremento de la cantidad de ARNm de TRH por célula. Por doble hibridación in situ, se observó que sólo las neuronas TRHérgicas que contienen al receptor $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ responden a los efectos del BDNF. Además, se vio que las neuronas TRHérgicas hipotalámicas son heterogéneas en cuanto a la expresión del receptor de BDNF. El efecto del BDNF sobre las neuronas TRHérgicas se observó mejor cuando las células fueron mantenidas a baja densidad (75,000 células por cm^2), probablemente porque a alta densidad celular es preponderante el efecto de las neurotrofinas endógenas. También se mostró que el BDNF endógeno puede incrementar los niveles del ARNm del TRH en las neuronas $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ (Guerra et al., 2001).

Justificación.

En el NPV se localizan las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas, es decir, que tienen un papel crítico en la regulación de la función de la adenohipófisis, considerada como la glándula maestra del sistema endócrino. Al inervar a la eminencia media estas neuronas tienen una importante función neuroendócrina (Schmidt-Nielsen, 1986). Para entender como se establecen los procesos de síntesis de la TRH en las neuronas TRHérgicas postmitóticas del NPV, en el laboratorio se ha usado como estrategia experimental cultivos primarios de hipotálamo fetal. Sin embargo, estos cultivos presentan múltiples poblaciones celulares, varios tipos gliales, células endoteliales y diferentes tipos neuronales, con una gran variedad de fenotipos, de las cuales sólo una pequeña porción corresponden a neuronas TRHérgicas. Una alternativa de estudio seguida en el laboratorio ha sido aislar a las células TRHérgicas del resto de la población celular hipotalámica a partir de cultivos primarios transfectados con un vector de expresión que contiene al promotor de la TRH (Balkan et al, 1998) fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie et al, 1994; Wang et al., 2000). Las células TRHérgicas transfectadas se vuelven fluorescentes lo que permite su purificación por citometría de flujo (FACS). Sin embargo, con este protocolo se generan células TRHérgicas que provienen de varios núcleos hipotalámicos, siendo altamente probable que su fenotipo varíe según el tipo neuronal, por lo que la información que se obtenga del análisis de sus fenotipos sea una mezcla de varios de ellos y no solo del fenotipo TRHérgico de las neuronas del NPV.

Por las razones mencionadas, se entiende la importancia de contar con una estrategia que permita aislar a las células del NPV del resto de la población hipotalámica, permitiendo hacer estudios de diferenciación peptidérgica exclusivamente en esta subpoblación celular. De esta forma, se podría determinar el efecto de las neurotrofinas, en particular del BDNF, en el proceso de diferenciación terminal de las neuronas TRHérgicas del NPV. Para facilitar la disección del NPV, se decidió inicialmente utilizar ratas neonatales en lugar de fetales.

Objetivos.

General:

Definir si en las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo neonatal, el nivel del ARNm de la TRH es regulable por BDNF.

Particulares:

1. Optimizar la microdissección del NPV neonatal a partir de tejido fresco.
2. Determinar si el BDNF regula el nivel del ARNm de la TRH y el TRH (proteína) en cultivos de hipotálamo neonatal.

Estrategia Experimental.

Para cumplir con el primer objetivo particular, primero se optimizó la microdissección del NPV a partir de tejido congelado, por la facilidad en la manipulación del tejido y en el reconocimiento de estructuras que sirvan como referencias anatómicas para ubicar la región donde se localice con mayor probabilidad el NPV. Con ésto se pretendió obtener experiencia en la microdissección para posteriormente trasladar esta experiencia a la microdissección del NPV en tejido fresco.

a) Microdissección del NPV a partir de tejido congelado. Antes de iniciar la microdissección se determinó la posición del NPV neonatal, haciendo cortes coronales del cerebro congelado al nivel del hipotálamo (de acuerdo con el Atlas de Paxinos et al., 1994), en un criostato (Bright Instrument Company Ltd, UK) a -18°C . Se utilizaron dos cerebros; un cerebro se cortó hasta el nivel de inicio del NPV y el otro fue cortado hasta el nivel donde termina este núcleo. Para verificar que se hubiera llegado al nivel del NPV se tomó un corte y se tiñó con azul de toluidina al 1%. Se observó en un microscopio compuesto (Olympus Vanox) en campo claro y se identificó al NPV en la rebanada, de acuerdo con el atlas de Paxinos et al., 1994. Con base en lo anterior, se determinó la longitud que ocupa el NPV neonatal (aproximadamente $400\text{-}500\ \mu\text{m}$) a lo largo del hipotálamo, así como sus límites antero-posteriores. Una vez identificada la zona del cerebro donde se localiza el NPV neonatal (Figura 8), este núcleo se disectó manualmente y se comprobó que la disección fuera correcta, de la siguiente manera: si el NPV estaba bien disectado, el nivel de un ARNm que se exprese principalmente en el NPV tendría que ser más alto en este núcleo que en el hipotálamo; y el nivel de un ARNm que no se exprese en el NPV (pero si en una región hipotalámica cercana) tendría que ser menor en el NPV que en el hipotálamo.

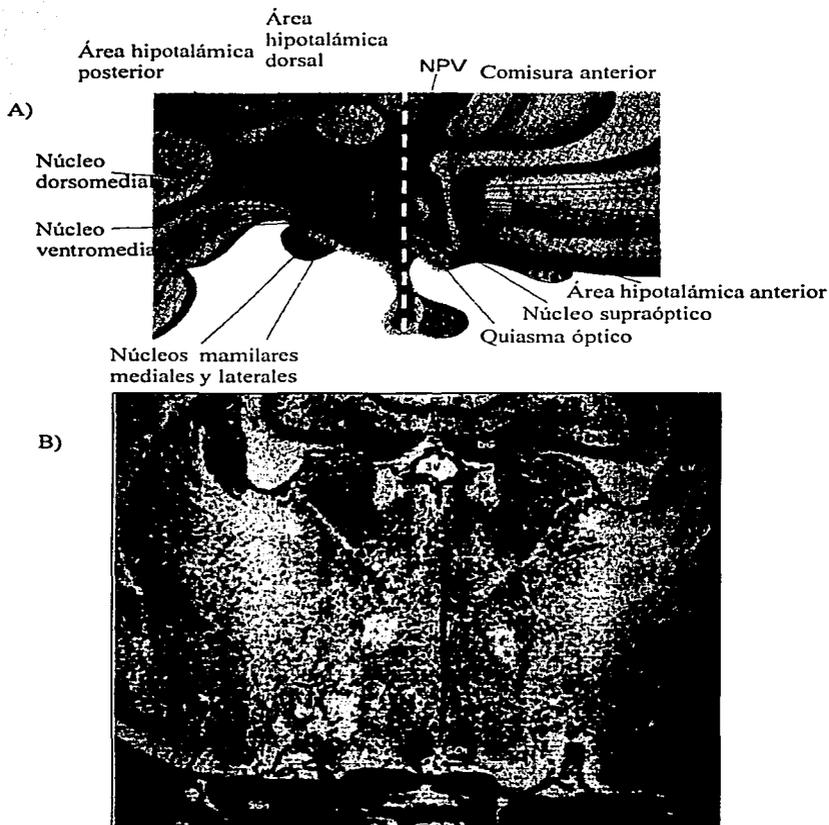


Figura 8. Posición del NPV neonatal. A) Vista lateral que muestra la localización de los principales núcleos hipotalámicos. La línea punteada indica el nivel al cual se obtuvieron las rebanadas para hacer las disecciones del NPV. B) Corte coronal del cerebro de rata al día P1, al nivel del NPV, teñido con hematoxilina. Se indican algunas referencias anatómicas importantes para ubicar al NPV: F, fórnix; 3V, tercer ventrículo; LH, hipotálamo lateral; SCh, núcleo supraquiasmático; SON, núcleo supraóptico.

Para determinar la precisión de la microdissección del NPV, se seleccionaron marcadores moleculares que estuvieran presentes, al día del nacimiento (P0) o al día 1 (P1), sólo en el NPV o sólo en el HL, que por tener neuronas TRHérgicas y por su cercanía al NPV, representa una fuente importante de contaminación e incertidumbre para la disección. Con base en la información obtenida de la literatura, se seleccionaron los siguientes marcadores; para el NPV: el receptor de glucocorticoides (GR), considerado como marcador positivo; y para el HL: la prepro-orexina (PPO), considerado como marcador negativo para el NPV. La PPO durante P0-P15 es exclusiva del HL (Sakurai et al., 1998), mientras que el GR se presenta abundante y únicamente en el NPV durante P0-P5 (Su-Jin Yi et al, 1994). La TRH, no es un marcador exclusivo del NPV, pero este núcleo está altamente enriquecido con neuronas TRHérgicas, en comparación con otros núcleos hipotalámicos. Por tal motivo, los niveles de expresión del ARNm de la TRH, en el NPV disectado también fueron usados como un indicador de la precisión de la disección, ya que se esperaba un incremento en los niveles de expresión de este mensajero en el NPV comparado con el hipotálamo. La precisión de la microdissección se determinó con base en el incremento de la expresión del ARNm de GR y de TRH o en la disminución de la expresión del ARNm de PPO, en los tejidos disectados que probablemente contenían al NPV. El nivel de expresión de estos mensajeros se determinó mediante un análisis semicuantitativo por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para corregir las variaciones en la eficiencia de la reacción de amplificación entre un muestra y otra, se uso como control interno a la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), cuyo producto de amplificación por PCR fue usado para normalizar la amplificación de los otros marcadores.

b) Microdissección del NPV a partir de tejido fresco. Dado que el propósito final de este proyecto sobre la disección del NPV es poder cultivar sus células, se requiere optimizar la microdissección del NPV a partir de tejido fresco. Para lo cual se aprovechó la experiencia obtenida en la disección del tejido congelado y se

analizó la calidad de la disección, realizada de la misma forma que la utilizada para el tejido congelado.

Para realizar el segundo objetivo particular, se requiere cultivar las neuronas en medio libre de suero y a baja densidad celular, para limitar el efecto de los factores de crecimiento aportados por el suero o endógenos. Por lo tanto primero se determinó si era posible mantener las células neonatales vivas en medio sin suero a baja densidad celular y si expresaban las características morfológicas de neuronas diferenciadas y el péptido. Una vez comprobado esto, se analizó el efecto del BDNF sobre la expresión del ARNm de TRH y del péptido.

Materiales y Métodos

Animales y disección del NPV y del hipotálamo.

Se utilizaron ratas Wistar de P0-P1. Las ratas fueron decapitadas, se les quitó el cráneo y se les extrajo el cerebro. Las disecciones se hicieron a partir de tejido congelado o fresco.

1) Tejido congelado. Los cerebros fueron congelados en hielo seco, cubiertos con Parafilm y papel aluminio y se almacenaron a -70°C hasta ser procesados.

Disección del NPV. Para sacar una rebana que contuviera al NPV, los cerebros congelados fueron pegados con una gota de agua sobre una caja de Petri. El corte anterior de la rebanada se hizo 1 mm (aproximadamente) antes del término de la apertura del quiasma óptico y a 0.5 mm de éste, hacia la parte caudal, se hizo el corte posterior. Una vez obtenida la rebanada, se puso sobre una caja de Petri llena de hielo seco pulverizado. La ubicación del NPV en la rebanada se determinó dividiendo imaginariamente al tercer ventrículo en tres partes, considerando al segundo tercio la región donde se localiza el NPV. Con un sacabocados (neuropunch) de 1 mm de diámetro se extrajo el tejido de ésta región. El tejido disectado se depositó en un tubo de microcentrifuga y fue mantenido en hielo seco o a -70°C hasta el momento de la purificación del ARN total.

Disección del hipotálamo. El hipotálamo fue disectado, tomando como límites el inicio anterior del quiasma óptico y el límite posterior de los cuerpos mamilares. Se tomó a la comisura anterior como límite para determinar la profundidad de la rebanada. Los hipotálamos disectados se pasaron a un tubo de microcentrifuga y fueron mantenidos en hielo seco o a -70°C hasta el momento de la purificación del ARN total.

2) Tejido fresco. Para disectar el NPV de tejido fresco, los cerebros fueron depositados sobre un molde, a temperatura ambiente, de cerebro de rata adulta. Este molde tiene ranuras con una separación, entre cada una, de 1 mm lo que permite obtener rebanadas de 1 mm de grueso. Las rebanadas fueron obtenidas cortando a 1 mm (aproximadamente) antes del término de la apertura del quiasma óptico y a 1 mm de éste, hacia la parte caudal, se hizo el corte posterior. La ubicación del NPV en la rebanada y la extracción del mismo se hicieron de la misma forma que en el tejido congelado. El tejido se depositó en un tubo de microcentrífuga sobre hielo seco y fue mantenido ahí o a -70°C hasta el momento de la purificación del ARN total.

Purificación de ARN total.

NPV. El tejido disectado como se describió anteriormente, fue mantenido sobre hielo seco hasta el momento de la homogenización. El ARN total fue purificado utilizando el reactivo de extracción de ARN total, STAT-60 (Tel-Test, INC). STAT-60 es un reactivo que contiene fenol y tiocianato de guanidina en una monofase. El protocolo para purificar ARN total fue el siguiente:

Homogenización y purificación. El NPV congelado fue homogenizado manualmente en un homogenizador de vidrio (Bellco Glass Inc), a temperatura ambiente, con 1 ml del reactivo STAT-60 (a 4°C). El homogenizado se dejó a temperatura ambiente por 5 min para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurridos los 5 min, al homogenizado se le adicionó 200 μl de cloroformo (Baker). Se dejó de 2-3 min a temperatura ambiente, se mezcló por vórtex durante 20 segundos y se dejó nuevamente a temperatura ambiente por 2-3 min. Se centrifugó (Jouan MR 3212) a 12,000 g por 15 min a 4°C . Con la centrifugación el homogenizado se separó en tres fases: 1) una fase superior acuosa incolora, donde se localiza exclusivamente el ARN total; 2) una interfase donde se localizan el ADN y las proteínas y 3) una fase inferior orgánica de color rojo que contiene fenol y cloroformo. Se tomó la fase acuosa y se depositó en un nuevo tubo de microcentrífuga. Aunque el volumen de la fase

acuosa era de aproximadamente el 60% del volumen de STAT-60 usado, sólo se tomó 500 µl para evitar al máximo llevarse proteínas con la fase acuosa y tener un ARN lo más puro posible.

Precipitación. A la fase acuosa se le adicionó un volumen (500 µl) de isopropanol (Baker) a temperatura ambiente que se mezcló por vórtex y se dejó precipitando a -20°C toda la noche.

Lavado del ARN. Al día siguiente las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 20-25 min, después fueron centrifugadas a 12,000 g por 20 min a 4°C . En este paso se puso mucho cuidado en la forma en la que eran colocados los tubos de microcentrífuga en la centrifuga, tratando que siempre estuvieran en la misma posición (con la pestaña de la tapa hacia el exterior de la centrifuga), para tener seguridad de la posición, dentro del tubo de microcentrífuga, de la pastilla de ARN, en caso de que ésta no fuera visible. Después de la centrifugación las muestras fueron mantenidas siempre a 4°C . El sobrenadante fue removido cuidadosamente con una micropipeta (Eppendorf) cuando la pastilla no era visible o por decantación cuando era visible. Para lavar la pastilla de ARN se le adicionó 1 ml de etanol al 75% frío, se mezcló por vórtex para disolver las sales y se centrifugó a 7,500 g por 12 min a 4°C ; posteriormente se eliminó el sobrenadante por decantación. Si la pastilla era visible y se veía muy blanca se repitió el paso del lavado con etanol al 75% una vez más. Después del lavado, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Cuando el etanol se evaporó por completo, a la pastilla de ARN se le adicionó 10 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma) y fue resuspendida con la micropipeta. El ARN se mantuvo a 4°C y se cuantificó inmediatamente.

Cuantificación de ARN. Para cuantificar el ARN se tomó 1 µl de la resuspensión anterior y se colocó en un tubo de microcentrífuga con 99 µl de agua con DEPC, para tener un volumen final de 100 µl, el ARN restante se mantuvo a 4°C o fue congelado a -70°C hasta su procesamiento. Los 100 µl fueron colocados en una celda de cuarzo (Sigma) de 1 ml para espectrofotómetro. La cuantificación del ARN se hizo midiendo la absorbancia de la muestra a una

longitud de onda de 260 nm, en un espectrofotómetro (DU 650, Beckman). La concentración de ARN se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{densidad óptica} \times \text{factor de dilución} \times 40 / 1000 = \mu\text{g ARN}/\mu\text{l}$$

Este valor se corrigió para tener la cantidad de ARN total en el volumen de resuspensión final. La pureza del ARN se determinó, midiendo la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 280 nm (que es un parámetro de la cantidad de proteína presente en la muestra) y 230 nm (que representa principalmente sales). La pureza del ARN está representada por las relaciones 260 nm/280 nm (para las proteínas) y 260 nm/230 nm (para las sales). Sólo los ARN con una relación 260 nm/280 nm mínima de 1 fueron usadas para la reacción de transcripción reversa (RT). Con este reactivo de extracción de ARN total, no se puede obtener relaciones 260 nm/230 nm mayores a 1, por lo que este parámetro no fue considerado como criterio para seleccionar los ARN a seguir con el paso de la RT. Dado el pequeño rendimiento de ARN esperado para cada muestra, no se usaron duplicados para cuantificar el ARN. Con este método se obtiene ARN libre de ADN genómico y no degradado; ésto se pudo comprobar al observar la migración electroforética de una muestra de ARN purificada con este reactivo en un gel de agarosa (Ultra-pure, Bio-Rad) al 2% (no mostrado).

Hipotálamo. Para extraer ARN total del hipotálamo se usó un método modificado del método de purificación de ARN por extracción con tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo seguido en el laboratorio y descrito por Chomczynski et al., 1987. La modificación se hizo porque con el método de Chomczynski se purificaba el ARN con relaciones 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm muy bajas que se reflejaban en una interferencia con la reacción de RT-PCR. El método de extracción seguido ya modificado fue el siguiente:

Homogenización y purificación. El hipotálamo congelado se homogenizó manualmente en un homogenizador de vidrio (Bellco Glass Inc) a temperatura ambiente, en 600 μl de solución de desnaturalización (solución D : tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio pH 7, 25 mM, sarcosil al 0.5%). Previo a la homogenización a la solución D se le adicionó 2-mercaptoetanol (Bio-Rad) (360 μl

de 2-mercaptoetanol por cada 50,000 μ l de solución D). Durante todo el procedimiento de purificación las muestras fueron mantenidas a 4°C; todos los reactivos de purificación fueron usados a temperatura ambiente menos cuando se indica lo contrario. Al homogenizado se le adicionó 60 μ l de acetato de sodio 2 M (Baker), pH 4 y se mezcló por vórtex. Posteriormente se adicionó 600 μ l de fenol (Baker) saturado con agua, se mezcló por vórtex, finalmente se le adicionó 120 μ l cloroformo-isoamílico (49:1) y se mezcló por vórtex durante 5 min o hasta que la muestra tomara un tono lechoso. Las muestras fueron colocadas durante 15 min sobre hielo (4°C). Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 13,000g a 4°C por 15 min. Se tomó la fase acuosa y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 2 ml, se le adicionó un volumen igual a la fase acuosa, de fenol saturado con agua, se mezcló por vórtex y se le adicionó también un volumen de cloroformo-isoamílico, se mezcló por vórtex hasta que la muestra tuviera un tono lechoso, se centrifugó de nuevo a 13,000 g a 4°C por 15 min.

Precipitación. Se tomó el sobrenadante (nunca más de 550 μ l, para evitar llevarse proteínas y ADN) y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Para precipitar el ARN, al sobrenadante se le adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló por vórtex y las muestras fueron colocadas a - 20°C toda la noche.

Lavado del ARN. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 g a 4°C por 30 min, el sobrenadante fue retirado por decantación. A la pastilla se le adicionó 800 μ l de etanol frío al 70%, se mezcló por vórtex ligeramente para que se disolvieran las sales pero sin romper por completo la pastilla. Se centrifugó a 13,000 g a 4°C por 15 min y el sobrenadante fue retirado por decantación. Este paso del lavado se repitió una vez más. Se decantó de nuevo para desechar el sobrenadante y la pastilla se dejó a temperatura ambiente hasta que estuviera seca. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua tratada con DEPC. El ARN se mantuvo a 4°C y fue cuantificado inmediatamente.

Cuantificación del ARN. Para la cuantificación del ARN total del hipotálamo se procedió de la misma manera que la descrita anteriormente para el NPV. Se midió la absorbancia de la muestra a las longitudes 280 nm, 260 nm y 230 nm, para sacar la concentración del ARN total en la muestra y el grado de pureza.

Diseño de los oligonucleótidos (desoxioligonucleótidos) para la PCR.

Para determinar la secuencia de los oligonucleótidos para amplificar los ADNc de los marcadores seleccionados, de la base de datos del GenBank, se obtuvo la secuencia del ADN complementario (ANDc) de cada marcador. Teniendo la secuencia del ADNc, el diseño de los oligonucleótidos se hizo con la ayuda del software Oligo (v4.03; National Biosciences Inc, MN, USA). Después de escoger la posición en el ADNc de los oligonucleótidos y el tamaño del producto de la PCR; de todas las posibilidades de oligonucleótidos diseñados por el programa Oligo, se seleccionaron solo aquellos pares que no formaran dúplex que involucraran el extremo 3'; en caso de formar dúplex se buscó que éstos no fueran mayores a 4pb y que los dos oligonucleótidos tuvieran una Tm similar. La posible hibridación de los oligonucleótidos diseñados por el programa, con otras secuencias homólogas fue descartada mediante el uso del software Blast 2.0.12 (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA). Este software busca el máximo alineamiento entre la secuencia de interés y todas las secuencias (de ADNc o proteínas) registradas en la base de datos del GenBank, determinando si hay una secuencia homóloga a la secuencia de interés. Los oligonucleótidos seleccionados fueron sintetizados por el método de fosfito-triester en un sintetizador automático 391 de Applied Biosystems (Unidad de Síntesis, Instituto de Biotecnología, UNAM). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados y usados como iniciadores para la PCR, fue la siguiente: GR: la secuencia sentido: 5'AAAAAGCACATCACACATAAATCTG3'; la secuencia antisentido: 5'TAAATAAGAGGGAGCAAACACTACTGG3'. Con estos iniciadores se puede amplificar un segmento de 639 pb correspondientes a los nucleótidos 4903-5542 del ADNc de GR de la rata. PPO: sentido: 5'CGGCGGCCTCAGACT CCT3',

antisentido 5'TAAAGCGGTGGCGGTTGC3'. El producto obtenido con estos iniciadores es de 435 pb que corresponden a los nucleótidos 5-440 del ADNc de PPO de la rata. Los oligonucleotidos para el ARNm de TRH y de G3PDH ya habían sido anteriormente diseñados y probados en el laboratorio. Las secuencias para la TRH fueron: sentido: 5'GGACCTTGTTGCTGTGCGACTC TGGCTTTG3'; antisentido: 5'ATGACTCCTGCTCAGGGTCATTCTAGAAGGGCT 3'. Con estos iniciadores se puede amplificar un fragmento de 670 pb que corresponde a los nucleótidos del 109-779 del ADNc de TRH de rata (Pérez-Martínez et al., 2001). Las secuencias de los oligonucleótidos para la G3PDH fueron: sentido: 5'TGAAGGTCGGTGTCAAACGGATTTGGC3'; antisentido: 5'CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC3'. Estos iniciadores permiten la amplificación de un segmento de 983 pb, correspondiente a los nucleótidos 35-1017 del ADNc de G3PDH de la rata (Pérez-Martínez et al., 2001).

Quantificación de ARNm por RT-PCR.

Para la obtención de ADNc por medio de RT, se procedió de la siguiente manera para el hipotálamo y para el NPV (de tejido congelado y del fresco). Para el hipotálamo, se calculó el volumen necesario para tener 1 µg de ARN; para el NPV como el rendimiento de ARN nunca pasaba de 1.5 µg se transcribió todo el ARN. En ambos casos el ARN era llevado a un volumen final de 12 µl con agua tratada con DEPC. El ARN fue calentado durante 5 min a 65°C y posteriormente colocado sobre hielo (4°C) por el mismo periodo de tiempo. Transcurridos los 5 min en hielo, la muestra fue centrifugada para bajar el líquido condensado en las paredes del tubo y se le agregó 20 µl de la mezcla de reacción para obtener ADNc por medio de RT. El ARN fue transcrito en un volumen final de 32 µl que contenía lo siguiente: amortiguador 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), DTT 10 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 200 µM, 500 ng de oligo dT y 100 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La reacción de RT se realizó colocando el ARN con la mezcla de reacción para RT, en un baño a 37°C

por 2 horas. El ADNc se mantuvo en hielo (a 4°C) para ser inmediatamente amplificado por PCR o fue colocado a -20°C hasta ser usado.

Optimización de las condiciones de la PCR semicuantitativa.

Para cada marcador se probaron diferentes condiciones de amplificación para determinar las condiciones en las que el ADNc fuera detectable, en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y estuviera dentro de la fase exponencial de la reacción de amplificación. Las condiciones probadas fueron, temperatura de alineamiento (T_m) (se realizó un gradiente de temperaturas hacia abajo y hacia arriba de la temperatura sugerida por el programa Oligo v.4); concentración de oligonucleótidos (100-150 ng), número de ciclos suficientes para detectar los productos de la PCR y seguir dentro de la fase exponencial de la reacción (se hizo una cinética sacando 10 μ l de la reacción a diferentes ciclos (25-35)), cantidades de ADNc (3-6 μ l). Todas estas condiciones se probaron para el NPV (disectado de tejido congelado y del fresco) y para el hipotálamo con cada uno de los marcadores. Para corregir las variaciones en la eficiencia de la reacción de amplificación entre un muestra y otra, se uso como control interno a G3PDH; su producto de amplificación por PCR fue usado para normalizar los productos de PCR de los otros marcadores. Se intentó usar como control interno la expresión del ARNm de la ciclofilina, un mensajero mucho más abundante en la célula que el mensajero de la G3PDH. Sin embargo no se pudo optimizar las condiciones que permitieran analizar la expresión de la ciclofilina dentro de la fase exponencial de la reacción de amplificación, por lo que se descartó esta proteína para ser usada como control interno.

Las condiciones de amplificación determinadas por la optimización fueron las siguientes: temperatura de alineamiento, se estableció en 60°C, para el GR y la PPO; esta temperatura es la misma que para la G3PDH y la TRH. La cantidad de cada par de oligonucleótidos fue: GR 150 ng, PPO 100 ng, G3PDH 10 ng y 100 ng para TRH. La cantidad de ADNc: 6 μ l para TRH y GR; 4 μ l para G3PDH y PPO. El número de ciclos usados fue 27 para TRH, GR y PPO y de 25-27 ciclos para la

G3PDH. Para cada muestra de NPV e hipotálamo se amplificaron los genes de interés en reacciones separadas con uno de los 4 oligonucleótidos. Se decidió no realizar una coamplificación (en el mismo tubo) porque la coamplificación de la G3PDH con cada uno de los marcadores y la TRH llevó a una disminución de la señal de los productos de la PCR (datos no mostrados).

Amplificación por PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, que contenía: 4 μ l o 6 μ l del producto de RT, amortiguador para PCR (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8.3) (Biotecnologías Universitarias), $MgCl_2$ 1.5 mM (Biotecnologías Universitarias), dNTPs 200 μ M, Taq polimerasa 5u/ μ l (amplificasa, Biotecnologías Universitarias) y las cantidades de cada iniciador antes descritas. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf). Cada ciclo de la PCR consistía en un paso de desnaturalización a 95°C por 1.15 min, un paso de alineación de los iniciadores a 60°C por 1 min, un paso de extensión a 72°C por 1 min; estos pasos fueron repetidos por 27 o 25-27 ciclos según el caso. Del producto de la PCR se tomaron 10 μ l y fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (Ultra-pure, Bio-Rad) al 2%, las muestras se dejaron correr en el gel por aproximadamente 40 min a 100 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se analizó en un multianalizador de imágenes (Fluor-S Multilmager, Bio-Rad). La migración de los productos de la PCR se comparó con la de unos marcadores de peso molecular, en un rango de 2176-154 pb (Marcador VI, Roche). En todas las reacciones de PCR el producto fue del tamaño esperado: 670 pb para la TRH, 639 pb para GR, 435 pb para PPO y 987 pb para la G3PDH.

Presentación de los datos. En todos los casos la intensidad de la señal detectada para el ADNc de cada marcador molecular fue dividida por la intensidad de la señal obtenida del ADNc de la G3PDH; por lo tanto, los resultados finales que se reportan son los cocientes. Para el análisis de la precisión de la disección del NPV, se usó como control la expresión del ARNm de los 3 marcadores en el

hipotálamo. Se trabajó con 3 hipotálamos independientes. Cada hipotálamo fue escogido aleatoriamente para ser usado como control en cada disección del NPV. Para 2 hipotálamos (que fueron usados de manera repetida), la expresión relativa de cada marcador, en todas las amplificaciones hechas, para cada hipotálamo mostró poca variación lo que muestra que el método semicuantitativo que se utilizó fue reproducible. Sin embargo, la expresión relativa de estos marcadores fue diferente para cada hipotálamo (Figura 9). Por lo que comparar la expresión de los marcadores obtenida para un NPV con uno de estos hipotálamos podría dar interpretaciones equivocadas sobre la precisión de la disección. Por lo que el análisis de la precisión de un mismo tipo de disección se hizo promediando los porcentajes de cambio obtenidos para cada marcador en varias disecciones independientes.

Cultivo de neuronas hipotalámicas.

Los cultivos se realizaron con hipotálamos de ratas Wistar de P0-P1 de edad, usando un método modificado del método de cultivo descrito por Brewer 1997, para el cultivo de neuronas hipocampales de ratas adultas. Preparación de los platos de cultivo. Un día antes del cultivo o por los menos 2 horas antes, se les adicionó a cajas de 24 pozos, 500 μ l de poli-D-lisina (0.03 mg/ml) como sustrato de anclaje para las células. Los platos se dejaron con la poli-D-lisina mínimo por dos horas en la incubadora a 37°C, posteriormente se lavaron dos veces con solución Hank's (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 440 μ M, NaH_2PO_4 750 μ M, D- (+) Glucosa 5 mM) y se guardaron con 500 μ l de la misma solución de nuevo en la incubadora hasta el momento de la siembra. La solución Hank's se retiró de los pozos justo antes de la adición de las células. El medio utilizado para el cultivo fue Neurobasal (NB) (Gibco, formula utilizada para cultivos de células embrionarias). Al NB se le adicionó B27 (50x) (un complemento libre de suero que contiene básicamente ácidos grasos, antioxidantes, vitaminas y hormonas), L-glutamina (0.5 mM) y antibiótico-antimicótico a una concentración final de 1% (NB-B27).

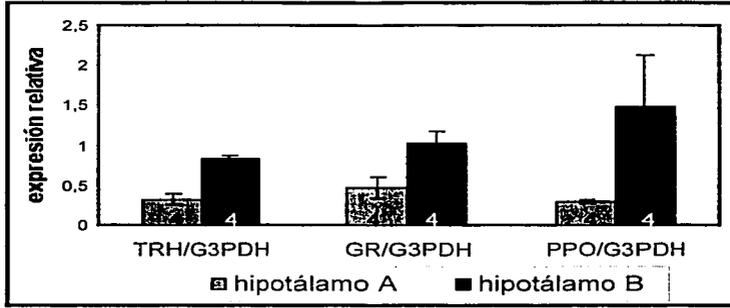


Figura 9. Expresión relativa de los marcadores para 2 de los hipotálamos usados como control para el análisis molecular de la disección del NPV de tejido congelado y fresco. Las barras representan el promedio de la expresión relativa obtenida para cada marcador \pm el error estándar. El número dentro de las barras representa el número de amplificaciones independientes realizadas para cada hipotálamo.

Disección del hipotálamo. Brevemente, las ratas neonatales fueron decapitadas, se les retiró la piel y el cráneo, rápidamente se les extrajo el cerebro y fue depositado sobre un tarjeta de cartón estéril. Para extraer el hipotálamo, se cortó a una profundidad de 3 mm aproximadamente, con unas tijeras pequeñas por delante del quiasma óptico, hacia los lados por lo largo de los surcos laterales y hacia la parte posterior incluyendo los cuerpos mamilares. Los hipotálamos así disectados fueron depositados sobre una caja de Petri de 35 mm estéril con 3 ml de medio NB-B27 (se colocaron máximo 12 hipotálamos). Con una pipeta Pasteur estéril se retiró de la caja de Petri la mayor cantidad de medio posible. Con unas tijeras pequeñas se cortaron los hipotálamos en trozos pequeños; con una pipeta Pasteur fueron transferidos a un tubo con 2 ml de medio NB-B27 y se dejaron agitando por 8 min a 30°C.

Dispersión del tejido. La digestión del tejido se hizo con papaína. Para prepararla, se disolvieron 12 mg de papaína en 6 ml de NB-B27, agitándola por 5 min en un baño a 37°C. Posteriormente la papaína se esterilizó por filtración y se almacenó en un tubo de 50 ml a 4°C. Media hora antes de ser utilizada la papaína se puso a 30°C. Después de los 8 min de agitación a 30°C, los trozos de hipotálamo fueron transferidos con una pipeta Pasteur al tubo con papaína y se dejaron incubando por 30 min a 30°C agitándose a 170 g. Al terminar el tiempo de incubación, los trozos de hipotálamo fueron transferidos con una pipeta Pasteur a un tubo con 2 ml de NB-B27, se dejaron 5 min a temperatura ambiente. Se realizó la dispersión mecánica utilizando 3 pipetas Pasteur con diámetros decrecientes entre sí. Los trozos de hipotálamo se pasaron 10 veces por cada pipeta, se dejaron sedimentar los trozos de tejido remanentes, se tomó el sobrenadante y se depositó en un tubo nuevo. Se adicionaron 2 ml de NB-B27 al botón de tejido restante y se repitió la dispersión mecánica, nuevamente se tomó el sobrenadante y se colocó con el sobrenadante anterior. Este paso se repitió una vez más. Los 6 ml de sobrenadante obtenidos de la dispersión mecánica, se centrifugaron a 1600 g a temperatura ambiente por 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 3 ml de NB-B27. De la resuspensión celular se tomaron 15 μ l y se le adicionaron 15 μ l de azul de tripano para determinar el número de células viables y la cantidad total de células en la suspensión. Las células fueron sembradas a las siguientes densidades 300.000, 150.000 o 75.000 células por pozos, con 500 μ l de NB-B27. Se cultivaron las células a 37°C en condiciones de alta humedad, en una atmósfera con 93% de aire y 7% de CO₂.

Tratamientos. Al momento de la siembra se adicionó BDNF (50 ng/ml) (Promega) a los pozos experimentales; esta neurotrofina fue mantenida hasta el 4 DIV, a este día se realizó a todos los pozos un cambio total de medio. Las células fueron mantenidas hasta el 4 DIV o hasta el 12 DIV, haciendo cambio de medio parcial cada dos días a partir del 6 DIV, adicionando o no con el medio fresco BDNF (50 ng/ml), según el paradigma experimental.

Análisis del cultivo.

Purificación del ARN total. Para la purificación del ARN total, al 4 DIV o al 12 DIV según el paradigma experimental, se retiró todo el medio al pozo y se adicionó 1 ml del reactivo de extracción STAT-60 (a 4°C) con el que las células fueron raspadas a temperatura ambiente y en una cámara de flujo laminar. El raspado celular se recuperó del pozo con una micropipeta, se depositó en un tubo de microcentrífuga y se colocó a 4°C, inmediatamente las células se homogenizaron, a temperatura ambiente, por vórtex durante 1 min a máxima velocidad. El protocolo de purificación seguido fue el ya descrito para la purificación del ARN total del NPV.

Cuantificación del ARN de TRH. Los niveles del ARNm de TRH se determinaron mediante RT-PCR semicuantitativa, usando como control interno al ARNm de la G3PDH. La reacción de amplificación se realizó en tubos separados para cada muestra de ADNc (de TRH y de G3PDH). Las condiciones de la RT-PCR usadas fueron las mismas que las descritas por Pérez-Martínez et al., 2001.

Análisis de la morfología celular. Como un parámetro del desarrollo de las neuronas en cultivo se observó su apariencia morfológica al 4 DIV y después cada dos días con el cambio de medio parcial. Las observaciones morfológicas de las células se realizaron utilizando un microscopio invertido (Nikon) empleando iluminación de Hoffman y un objetivo 40X. Las observaciones se hicieron cuidadosamente, moviendo lo menos posible los platos de cultivo evitando el daño mecánico a las células y rápidamente para reducir los efectos del cambio de condiciones durante la observación. Se tomaron fotografías de las células a los 8 y 12 DIV usando una película de 35 mm a color de ASA 100 (Kodak).

Radioinmunoensayo (RIA) de TRH. Procesamiento de las muestras para RIA. Al 12 DIV las células fueron cosechadas como sigue: se les retiró el medio y se lavaron con PBS pH 7.4 (KCL 2.68 mM, KH_2PO_4 1.44 mM, NaCl 138.89 mM, Na_2HPO_4 8.06 mM), se añadieron 500 μl de ácido acético al 20%, frío y se rasparon las células manteniéndolas sobre hielo (4°C). Se retiró el raspado celular y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, al plato se le adicionaron

500 μ l de metanol absoluto frío y se raspó de nuevo, se recolectó el raspado y se depositó en el mismo tubo de microcentrífuga. El tubo de microcentrífuga con el raspado celular, el ácido acético y el metanol absoluto fríos, se agitaron por vórtex y se almacenaron a -20°C durante toda la noche. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 7,500 g durante 40 min a 4°C , se tomó el sobrenadante y se depositó en tubos de vidrio para RIA de 5 ml. Las muestras se secaron en un evaporador rotatorio (SAVANT). Secas las pastillas, los tubos fueron cubiertos con Parafilm y almacenados a -20°C hasta su procesamiento. El RIA fue realizado por Miguel Cisneros, siguiendo el protocolo descrito por Joseph-Bravo et al., 1979.

Resultados.

I.- Disección del NPV

1.- Extracción de ARN total.

La estrategia experimental del proyecto implicaba la extracción de ARN total a partir de los tejidos disectados. El NPV congelado pesa aproximadamente 1 mg. Esto implicaba buscar un método de purificación que permitiera extraer ARN total a partir de cantidades de tejido muy pequeñas, es decir, a partir de la disección de un solo NPV (la parte izquierda y derecha del núcleo), con rendimiento y grado de pureza adecuados para las reacciones de RT-PCR. Se probaron dos métodos de purificación de ARN total, el primero descrito por Chomczynsky et al., 1987 (basado en la extracción con tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo) y el segundo, usando el reactivo de extracción STAT-60 (que contiene tiocianato de guanidina y fenol). Con ambos métodos se purificó ARN total a partir de 1, 2 y 3 NPVs.

Con el método descrito por Chomczynsky et al., 1987, a partir de 2 y 3 NPVs, se obtuvo un rendimiento de ARN total de 1.8 μ g y 2.5 μ g respectivamente. La pureza dada por la relación 260 nm/280 nm estuvo entre los valores 2-2.3, para la relación 260 nm/230 nm entre los valores 2-2.5. Usando el reactivo STAT-60 en los tres casos (1, 2 y 3 NPVs) se obtuvieron rendimientos de 1.3 μ g, 2.5 μ g y 3.3 μ g de ARN total, respectivamente, aunque el grado de pureza no fue tan bueno como el obtenido con el método anterior, la relación 260 nm/280 nm estuvo entre 1.04-1.07 y la relación 260 nm /230 nm entre 1.3-1.6 (Figura 10).

Las reacciones de RT-PCR realizadas a partir de los ARN obtenidos con STAT-60, demostraron que las relaciones 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm obtenidas no interferían con la reacción de RT-PCR (los datos no se muestran). Con base en los resultados anteriores, decidimos utilizar el reactivo STAT-60 como método para purificar ARN total de los NPVs disectados a partir de tejido congelado y del fresco, porque permitía obtener la cantidad de ARN total

necesaria para realizar la reacción de RT-PCR a partir de un NPV y relacionar los datos cuantitativos de la RT-PCR a cada disección.

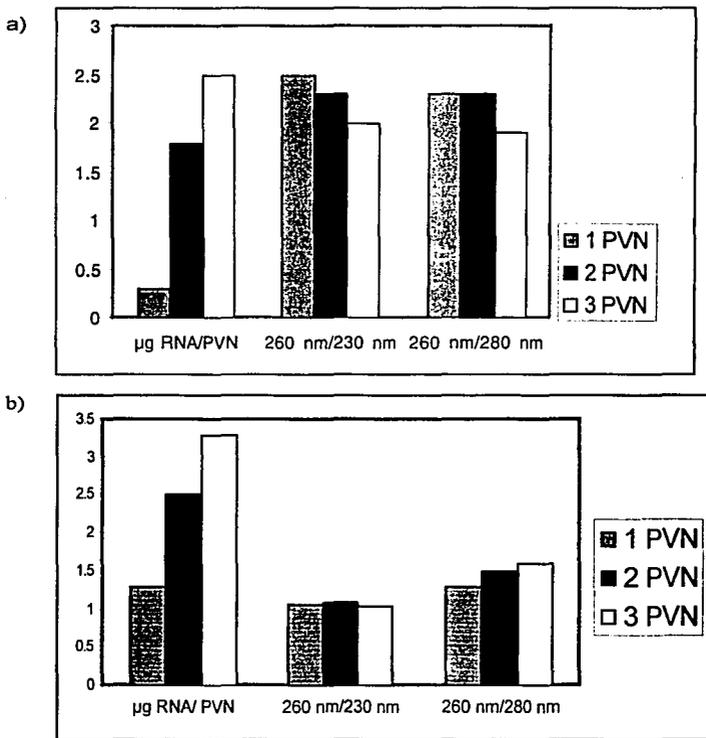


Figura 10. Determinación espectrofotométrica del rendimiento y pureza del ARN total obtenidos del NPV de neonatos, a partir de tejido congelado usando dos métodos de purificación a) Método de Chomczynski b) Método usando el reactivo de extracción STAT-60. Para cada método se muestran los valores para 1, 2 ó 3 NPVs.

Las reacciones de RT-PCR realizadas a partir de los ARN obtenidos con STAT-60, demostraron que las relaciones 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm obtenidas no interferían con la reacción de RT-PCR (los datos no se muestran). Con base en los resultados anteriores, decidimos utilizar el reactivo STAT-60 como método para purificar ARN total de los NPVs disectados a partir de tejido congelado y del fresco, porque permitía obtener la cantidad de ARN total necesaria para realizar la reacción de RT-PCR a partir de un NPV y relacionar los datos cuantitativos de la RT-PCR a cada disección. Como se mencionó anteriormente, no observamos mucha variación en el rendimiento de ARN total obtenido (0.9 µg-1.4 µg) de la purificación de los NPV disectados de tejido congelado. El grado de pureza promedio mostró poca variabilidad: los valores de las relaciones 260 nm/280 nm oscilaron entre 1.3-1.7 y los de 260 nm/230 nm entre 0.7 y 1. Similarmente a lo ocurrido con el tejido congelado, no observamos mucha variación en el rendimiento de ARN total obtenido de las disecciones del NPV a partir de tejido fresco, éste osciló entre 1.1 µg-1.3 µg. El grado de pureza fue similar a los valores obtenidos para el NPV de tejido congelado.

Para la purificación de ARN del hipotálamo se usó un método de purificación modificado del descrito por Chomczynsky et al.,1987 (ver Materiales y Métodos). El rendimiento de ARN total obtenido para el hipotálamo varió entre 29.6 µg y 46 µg. El grado de pureza estuvo dentro de los valores aceptables; para la relación 260 nm/280 nm los valores oscilaron entre 1.9-2.3 y para la relación 260 nm/230 nm los valores oscilaron entre 1.9-2.4.

Cuantificación de proteína total

No fue posible determinar la reproducibilidad de las disecciones de los NPV realizadas a partir de tejido congelado y fresco, con base en la cuantificación de proteína. Esto debido a la poca disponibilidad de animales y por lo que, siempre se trató de purificar en prioridad ARN total. La muestra utilizada para cuantificar proteína, se tenía que tomar del tejido homogenizado con el reactivo STAT-60, este reactivo interfiere con la determinación de la cantidad de proteína presente en

la muestra. Cuantificar las proteínas implicaba corregir la curva estandar adicionándole cierta cantidad de STAT-60, lo que por su poca disponibilidad y dificultad en su obtención decidimos no hacer.

2.- Disección de NPV.

a) Tejido congelado.

El análisis de la precisión de la disección del NPV se hizo comparando el nivel de expresión relativa de los ARNm de TRH, GR y PPO (el cociente del ADNc de cada marcador molecular entre el ADNc de la G3PDH), con los niveles de expresión relativa de los mismos marcadores, obtenidos para el hipotálamo, los cuales fueron considerados como el 100% de expresión. Por regla de tres se obtuvo el nivel de expresión correspondiente al NPV para cada uno de los 3 ARNm, en relación a los niveles de expresión obtenidos de los mismos para el hipotálamo.

Obteniendo la rebanada de tejido como se describió en Materiales y Métodos, la disección del NPV se hizo dividiendo en tres partes imaginarias al tercer ventrículo, obteniendo con un sacabocados (de 1 mm de diámetro) la porción de tejido del segundo tercio. De las disecciones hechas de esta manera, se obtuvieron los siguientes promedios de expresión relativa: 86% para el ARNm de TRH, 117% para el ARNm del GR y 10% para en ARNm de PPO, en comparación con los valores obtenidos de cada marcador para el hipotálamo (Figura 11). A pesar de que la expresión del ARNm de PPO (marcador negativo) fue relativamente baja, indicando poca contaminación con el HL, la expresión del ARNm de GR (marcador positivo), fue prácticamente igual a la obtenida para el hipotálamo. Aunque no se ha reportado cual es el incremento en la expresión relativa del ARNm de TRH que se debe obtener en una disección correcta del NPV, la expresión relativa obtenida del ARNm de los marcadores, indica que la anterior no era una buena disección. Los resultados anteriores llevaron a suponer que en las disecciones hechas no se estaba tomando al NPV, posiblemente por no

estar en la posición correcta a lo largo del tercer ventrículo. Por lo tanto, decidimos tomar el sacabocado de tejido moviéndonos 1 mm aproximadamente, hacia arriba

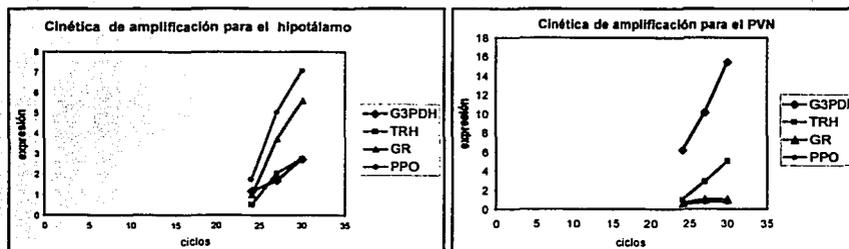
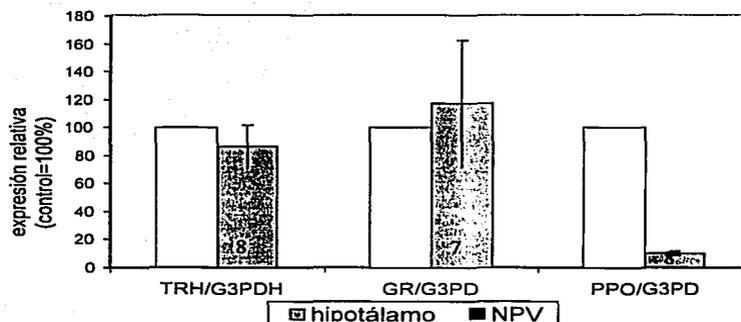


Figura 11. Comparación de la expresión de los marcadores en el hipotálamo y el NPV diseccionado a partir de tejido congelado por el procedimiento inicial. En la parte superior se muestra el promedio de los porcentajes de expresión relativa para cada marcador obtenidos de varias disecciones del NPV. Los valores están expresados tomando como el 100% la expresión relativa de cada marcador obtenida para el hipotálamo. Las barras representan el porcentaje promedio \pm el error estándar. Los números dentro de las barras representan el número de disecciones realizadas. En la parte inferior, se muestra la cinética obtenida de los productos de PCR para el NPV y el hipotálamo, de una disección. Se observa que entre los ciclos 25-28, para todos los ADNc, la reacción de PCR está en la fase exponencial. Las cinéticas realizadas para las disecciones subsiguientes mostraron la misma tendencia. El análisis de las disecciones está hecho tomando la señal de los productos de la PCR entre los ciclos 27-28 de cada marcador, para el NPV y el hipotálamo.

del segundo tercio del tercer ventrículo. Una disección hecha de esta forma mostró un incremento considerable (15 veces), en la expresión relativa del ARNm de TRH para el NPV y un incremento de 47 veces, en la expresión relativa del ARNm de GR, en comparación a la obtenida para el hipotálamo. La expresión del ARNm de PPO estuvo en los niveles de expresión mínima detectables por el densitómetro (los resultados no se muestran). En repeticiones posteriores de esta disección, no se logró obtener valores similares a los observados anteriormente en los niveles de expresión de los 3 ARNm. Sin embargo, la tendencia de estas repeticiones fue hacia un aumento en la expresión de los ARNm de TRH y de GR y niveles bajos de expresión del RNAm de PPO (en algunos casos los niveles de expresión del ARNm de este último marcador estuvieron entre los niveles mínimos detectables por el densitómetro)¹. La expresión relativa promedio obtenida para el ARNm de TRH fue del 167%, del 201% para el ARNm de GR y del 16% para el ARNm de PPO, en relación a la expresión relativa de los mensajeros de los mismos marcadores obtenida para el hipotálamo (Figura 12).

El no obtener la expresión relativa esperada de los ARNm de los 3 marcadores, similares a los obtenidos en la primera disección (realizada 1 mm arriba del segundo tercio del tercer ventrículo), nos llevó a suponer que podía haber un desplazamiento en el nivel del primer corte del cual se obtenía la rebanada y por lo tanto que ésta no contuviera todo el NPV. Por lo anterior se decidió sacar dos rebanadas del mismo cerebro. La rebanada posterior se obtuvo, de la forma habitual, justo al nivel donde termina la apertura del quiasma óptico, extendiéndose 0.5 mm (que fue la distancia calculada que aproximadamente ocupa el NPV en el hipotálamo) hacia la parte caudal del cerebro. La otra rebanada, anterior, se obtuvo extendiéndose, de la apertura del quiasma óptico, 0.5 mm hacia la parte rostral del cerebro. En las dos rebanadas la disección del

¹ La señal del producto de la PCR, estaba por debajo de los niveles de detección del densitómetro. Dado que en el gel de agarosa si se veía la banda del producto de PCR, para poder graficar el resultado, se tomaron los valores más pequeños obtenidos en otras disecciones, considerandolos como el límite inferior de detección del densitómetro.

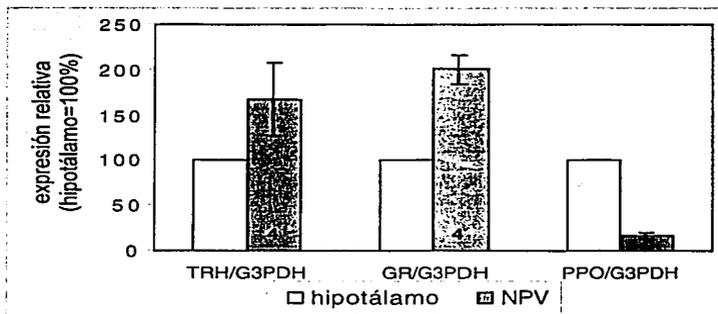


Figura 12. Comparación de la expresión de los marcadores en el hipotálamo total y en el NPV, diseccionado 1 mm hacia arriba del segundo tercio del tercer ventrículo. Los valores están expresados tomando como el 100% la expresión relativa de cada marcador obtenida para el hipotálamo. Las barras representan el promedio de los porcentajes de expresión relativa \pm el error estándar. Los números dentro o arriba de las barras representan el número de disecciones realizadas.

NPV se hizo tomando la porción de tejido contenida 1 mm aproximadamente, arriba del segundo tercio (imaginario) del tercer ventrículo. De las disecciones hechas de la rebanada posterior, se obtuvo un incremento en la expresión relativa del ARNm de TRH del 270% y un incremento del 212% para el ARNm de GR, mientras que la expresión de PPO fue tan sólo del 8.46% de la expresión relativa obtenida para los 3 mensajeros en el hipotálamo. Para las disecciones del NPV hechas de la rebanada anterior, la expresión relativa del ARNm de TRH fue del 11.3%, del 29% para el ARNm de GR y del 4.16% para el ARNm de PPO, respecto a la expresión relativa de los 3 mensajeros obtenidas en el hipotálamo (Figura 13).

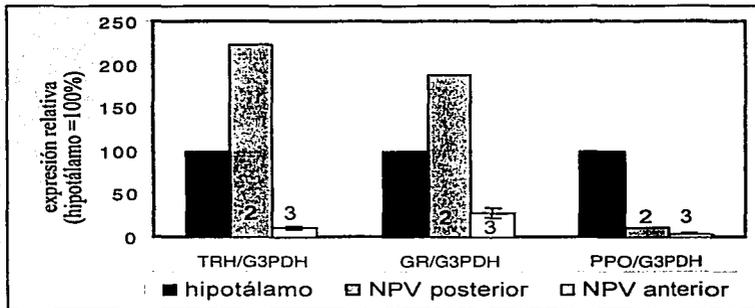


Figura 13. Comparación de la expresión de los marcadores en el hipotálamo y en el NPV obtenidos de dos rebanadas del mismo cerebro. La rebanada posterior, hecha de la forma habitual. La rebanada anterior hecha a la apertura del quiasma óptico y 0.5 mm hacia la parte rostral del cerebro. En estas disecciones el NPV fue disectado moviéndose hacia arriba aproximadamente 1 mm del segundo tercio del tercer ventrículo. Los valores están expresados tomando como el 100% la expresión relativa de cada marcador obtenida para el hipotálamo. Las barras representan el promedio de los porcentajes de expresión relativa \pm el error estandar. Los números dentro o arriba de las barras representan el número de disecciones realizadas.

b) Tejido fresco.

De las rebanadas obtenidas de tejido fresco, como se describió en Materiales y Métodos, se disectó el NPV de igual forma que la realizada para el tejido congelado, 1 mm arriba del segundo tercio imaginario del tercer ventrículo. De estas disecciones se obtuvo una expresión relativa promedio del 60% para el ARNm de TRH, del 61.6% para el ARNm de GR y del 5% para el ARNm de PPO, en comparación a la expresión relativa de los mensajeros de los marcadores obtenida para el hipotálamo (Figura 14).

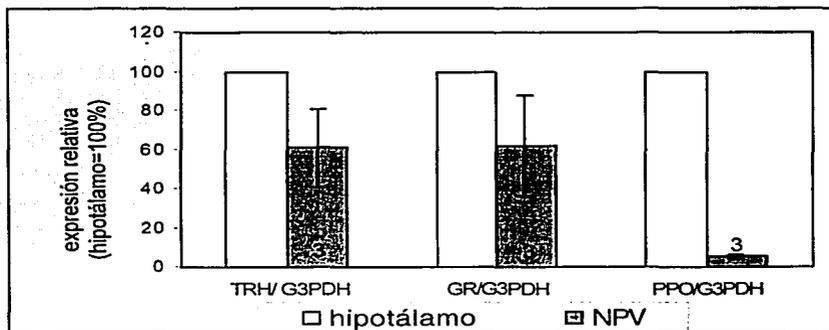


Figura 14. Comparación de la expresión del ARNm de los marcadores en el hipotálamo y el NPV disectado a partir de tejido fresco. Las disecciones fueron hechas obteniendo la rebanada al nivel de la apertura del quiasma óptico y 1 mm hacia la parte caudal del cerebro. El NPV se disectó moviéndose 1 mm hacia arriba del segundo tercio imaginario del tercer ventrículo. Los valores están expresados tomando como 100% la expresión obtenida para cada marcador en el hipotálamo. Las barras representan el promedio del porcentaje de expresión \pm el error estándar. Los números dentro o arriba de las barras representan el número de disecciones realizadas.

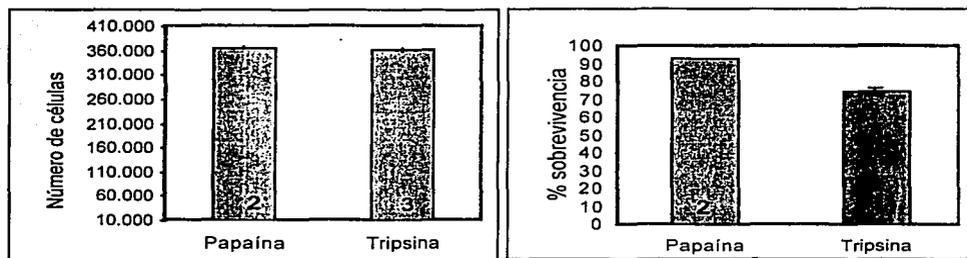
II.- Efecto del BDNF sobre el nivel del ARNm de TRH y de la TRH.

1.- Método de dispersión.

Como el cerebro de los neonatos (P0-P1) es relativamente fácil de disgregar, intentamos inicialmente dispersar y cultivar las neuronas hipotalámicas neonatales usando el método para cultivo de neuronas fetales ya optimizado en el laboratorio (Pérez-Martínez et al., 2000). Este método consiste en dispersar el tejido con tripsina y cultivar las células con medio DMEM suplementado con suero. Con este método la sobrevivencia inicial promedio (de 3 cultivos) fue del 74.6% y el rendimiento promedio de 0.362×10^6 células por hipotálamo. Estos datos están muy por debajo de los obtenidos en promedio para los cultivos primarios de hipotálamo fetal (92% de sobrevivencia inicial y rendimiento de 1.7×10^6 - 3×10^6 células por hipotálamo). Por lo que decidimos dispersar y cultivar las células hipotalámicas neonatales usando un método modificado del descrito por Brewer et al., 1997, para el cultivo de neuronas hipocampales de cerebro de rata adulta, basado en la dispersión del tejido con papaína (ver Materiales y Métodos). Con este método y usando NB-B27 se obtuvo una sobrevivencia inicial promedio (de 2 cultivos) del 93% y un rendimiento promedio de 0.366×10^6 células por hipotálamo (Figura 15). Este método de cultivo fue utilizado para realizar los estudios subsecuentes.

2.- Análisis morfológico.

Se uso el aspecto morfológico de las células como indicador de la viabilidad y del desarrollo de las mismas en cultivo. Se pudo detectar un aumento en el número de neuritas, en su grado de ramificación y en su longitud, en las células tipo neuronas, entre el día 8 DIV y el 12 DIV de cultivo. No hubo cambio aparente en la morfología entre las células que fueron tratadas con BDNF (50 ng/ml) de las células control. Durante el tiempo de cultivo, no detectamos la presencia de cuerpos apoptóticos ó alguna morfología irregular en las células, lo que indirectamente



a)

b)

Figura 15. Rendimiento y sobrevivencia inicial de células hipotalámicas neonatales usando dos métodos de dispersión diferentes: uno para neuronas de cerebro adulto (con papaína) y el otro para neuronas fetales (con tripsina). Los datos reportados son los promedios \pm el error estandar de los cultivos para cada caso a) rendimiento promedio por hipotálamo b) porcentaje promedio de sobrevivencia inicial. Los números dentro de las barras indican los cultivos realizados.

indica que las células se mantuvieron en el cultivo aparentemente sin excesiva muerte celular. Las células fueron mantenidas en un medio libre de suero, Neurobasal suplementado con B-27 (NB-B27) que inhibe el crecimiento de las células tipo glía por lo que se puede decir con seguridad que el tipo celular observado correspondía a neuronas. Sin embargo, durante todo el tiempo de cultivo, detectamos un tipo celular de morfología circular bien definida que fue aumentando con el tiempo de cultivo, por lo que no se trataba de células muertas. Aparentemente la contaminación por este tipo celular, que no pudimos identificar, no afectó el desarrollo y diferenciación morfológica de las células hipotalámicas neonatales cultivadas (Figura 16).



a)



b)



c)



d)

Figura 16. Morfología de células hipotalámicas neonatales cultivadas en medio sin suero. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio invertido (Nikon) usando iluminación Hoffman y con un objetivo 40X. Las fotografías se tomaron al 8 DIV: a) células control b) células tratadas con BDNF (50 ng/ml) y al 12 DIV: c) células control d) células tratadas con BDNF (50 ng/ml). Las células con ramificaciones son muy probablemente neuronas.

3.- Efecto de la densidad celular sobre los niveles del ARNm de TRH.

La densidad celular mostró un efecto sobre los niveles del ARNm de TRH. Al 4 DIV, se detectó un incremento del 457% en el nivel del ARNm de TRH a una densidad de 300×10^3 células por plato, al ser comparado con los valores obtenidos a 150×10^3 células por plato (Figura 17). A pesar de que no se pudo determinar la significancia estadística de estos datos, parece ser que la densidad celular tiene un efecto sobre los niveles de expresión del ARNm de TRH.

4.- Efecto del BDNF sobre los niveles del ARNm de TRH.

Para poder determinar si el BDNF tenía algún efecto sobre los niveles del ARNm de TRH en el hipotálamo neonatal, utilizamos como paradigma experimental cultivos de hipotálamo neonatal de rata. La concentración de BDNF (50 ng/ml) y la densidad celular fueron tomadas de Guerra-Crespo et al., 2001, quienes demostraron que el BDNF, a la concentración de 50 ng/ml y relativamente bajas densidades celulares (150×10^3 células por plato ó 75×10^3 células por cm^2), aumenta la expresión del ARNm de TRH al 4 DIV en cultivos primarios de hipotálamo fetal.

En el primer protocolo experimental utilizado, al momento de la siembra se adicionó BDNF (50 ng/ml) a los platos experimentales (sembrados a 150.000 células por plato) y las células estuvieron expuestas a esta neurotrofina hasta el 4 DIV. Este día se les retiró todo el medio del plato y se analizó el nivel del mensajero del TRH. La adición del BDNF (50 ng/ml) al momento de la siembra, incrementó significativamente los niveles de expresión del ARNm de TRH al 4 DIV (Figura 18). No se observó ningún cambio en la cantidad de ARN total en los platos tratados con BDNF con respecto al control (BDNF 0.9-1.4 μg ; control, 0.8-2 μg).

Para determinar si los efectos del BDNF sobre la expresión del ARNm de TRH se mantienen o varían con el tiempo de exposición a la neurotrofina, se manejaron 3 grupos experimentales; todos fueron sometidos al 4 DIV a un cambio total de medio y mantenidos hasta el 12 DIV, haciendo cambio parcial de medio

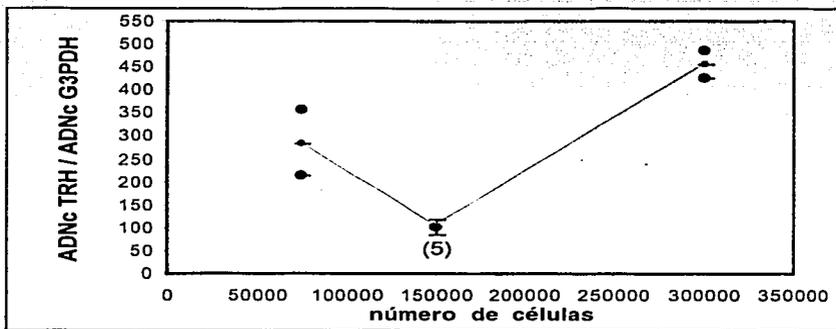


Figura 17. Efecto de la densidad celular sobre la expresión del ARNm de TRH al 4 DIV. Los puntos unidos por la línea representan el promedio \pm el error estándar de diferentes platos. Los valores están expresados tomando como 100% al grupo de 150, 000 células. Los números en parentesis representan el número de muestras.

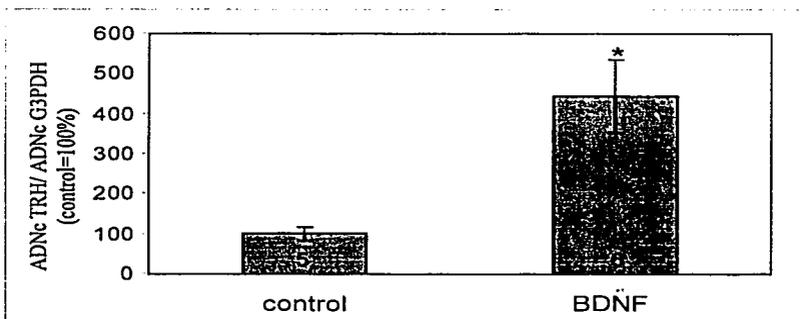


Figura 18. Efecto del BDNF sobre el nivel del ARNm de TRH al 4 DIV. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de diferentes platos. Los valores están expresados tomando como 100% al grupo control. El número dentro de las barras representa el número de muestras. * $p < 0.05$. Prueba de t.

cada dos días. Este cambio parcial de medio se hizo porque previamente se había visto que el mantener la mitad del medio condicionado en cada cambio de medio, aumenta el desarrollo de células tipo neurona y la cantidad de TRH intracelular (Charli et al., 1995).

Los grupos experimentales fueron tratados como a continuación se describe: Al grupo 1, se le adicionó BDNF con el medio fresco y éste fue agregado (manteniendo la concentración de 50 ng/ml) con cada cambio parcial de medio. Este grupo estuvo expuesto hasta el 12 DIV al BDNF. Al grupo 2, no se le adicionó BDNF con el medio fresco, ni en cada cambio parcial de medio, por lo tanto sólo estuvo expuesto al BDNF hasta el 4 DIV. El grupo 3, el grupo control, nunca estuvo expuesto al BDNF, pero fue tratado como los grupos experimentales (con cambio total de medio al 4 DIV y parcial cada dos días hasta el 12 DIV). Al 12 DIV, a todos los grupos se les retiró el medio, se extrajo ARN total y se cuantificó el nivel del ARNm de TRH. No se observó un efecto del BDNF en el nivel del ARNm de TRH al 12 DIV en aquellas células expuestas a esta neurotrofina todo el tiempo de cultivo (del 0 DIV hasta el 12 DIV), ni en aquellas expuestas sólo hasta el 4 DIV (Figura 19). No se observó ningún cambio en la cantidad de ARN total en los platos tratados con BDNF con respecto al control (BDNF hasta el 12 DIV: 0.8-1.7 µg, BDNF hasta el 4 DIV: 0.9-1.36 µg, control: 0.95-1.7 µg).

5.- Efectos del BDNF sobre los niveles de la TRH intracelular.

Los efectos del BDNF sobre los niveles de la TRH intracelular al 12 DIV se evaluaron mediante RIA de TRH. Se usaron dos grupos experimentales, uno que estuvo expuesto a los efectos del BDNF durante todo el tiempo del cultivo, desde el momento de la siembra hasta el 12 DIV y otro que estuvo expuesto al BDNF sólo hasta el 4 DIV. Debido a que in vitro, los niveles de la TRH son muy bajos (Loudes et al., 1983; Guerra-Crespo et al., 2001), al 10 DIV (con el cambio de medio parcial) y al 11 DIV (sin cambio de medio) se adicionó al cultivo ácido ascórbico (50 µM) para incrementar la actividad de la peptidil glicil α -amidasa monooxigenasa, lo que aumenta los niveles de TRH en cultivos primarios

hipotalámicos, promoviendo la conversión de TRH-gly a TRH. La adición de BDNF durante todo el cultivo, aumentó significativamente la cantidad de TRH intracelular al 12 DIV (Figura 20). No hubo efecto del BDNF en las células que estuvieron expuestas a esta neurotrofina hasta el 4 DIV; sin embargo para este grupo no se pudo determinar la significancia estadística de estos datos por tener pocas repeticiones (este dato no se muestra).

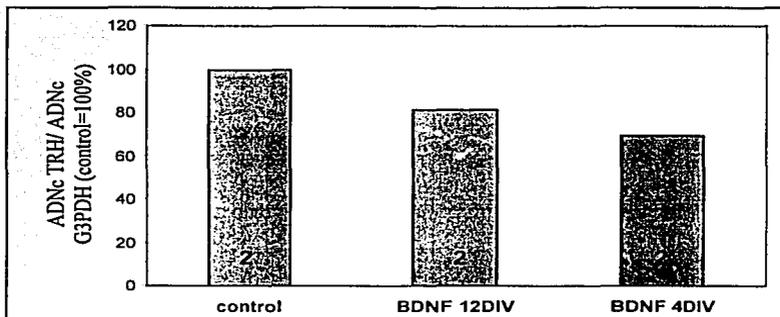
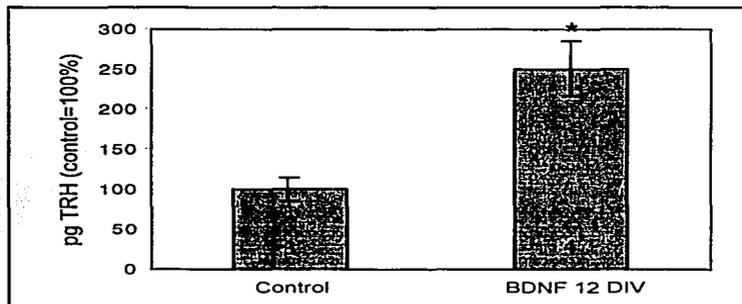


Figura 19. Efecto del BDNF sobre el nivel del ARNm de TRH al 12 DIV. Las barras representan el promedio de diferentes platos. Los valores están expresados tomando como 100% al control. El número dentro de las gráficas representa el número de muestras.



Gráfica 20. Efecto del BDNF sobre el nivel de TRH intracelular. Las barras representan el promedio \pm el error estandar de diferentes platos. Los valores están expresados tomando como 100% al control. El número dentro de las gráficas representa el número de muestras. * $p < 0.05$. Prueba de t.

Discusión.

I.- Disección del NPV neonatal

Optimizar la disección del NPV hipotalámico de ratas en etapa neonatal (P0-P1) sin teñir el tejido tiene cierto grado de dificultad. Por un lado nos encontramos con la falta de estructuras detectables a simple vista, que puedan servir como referencias anatómicas para determinar con mayor exactitud la región en el hipotálamo en donde localizar al NPV. En el cerebro de ratas adultas, estas referencias anatómicas son el grado de apertura del hipocampo, que da información sobre el nivel antero-posterior del hipotálamo y la estructura tal vez más importante, el fórnix, que delimita el nivel dorsoventral del hipotálamo (Palkovits et al., 1988). Sin embargo, en los neonatos, si bien el grado de la apertura del hipocampo da información sobre el nivel antero-posterior del hipotálamo, en las rebanadas de tejido congelado que se hacen para diseccionar al NPV, no es posible ver a simple vista el fórnix, por lo que no se cuenta con esta referencia anatómica. Este problema se resolvió aparentemente, analizando la posición del NPV en las películas de las hibridaciones in situ para TRH en el hipotálamo neonatal de rata, realizadas en el laboratorio. De esta manera se determinó que, al dividir imaginariamente al tercer ventrículo en tres partes, en el segundo tercio se podía localizar al NPV.

Aparte de las complicaciones a nivel anatómico que hay para lograr establecer marcadores morfológicos que permitan delimitar regionalmente al NPV, existen ciertas limitantes para determinar marcadores a nivel celular, que sirvan como criterio para definir si la disección del NPV se hace adecuadamente o no, descartando al máximo la presencia (contaminación) de otros núcleos hipotalámicos cercanos al NPV, como el hipotálamo lateral (HL). Existen varios marcadores moleculares que son expresados preponderantemente en el NPV adulto, como el CRH, el CART (Brobeger, 1999), la galanina, la encefalina (Aki et al., 1999) y la neurotensina (Lechan y Toni, 1992). Sin embargo, estos marcadores

pueden estar presentes también en núcleos hipotalámicos cercanos (como el HL, en caso del CART) o no expresarse durante los primeros días del nacimiento (P0-P1), lo que no los hace buenos marcadores moleculares para la disección del NPV neonatal. Hay otros marcadores que son exclusivos para el NPV en la rata adulta (Liposits, 1993), pero la falta de estudios sobre sus patrones de expresión durante el desarrollo impide que sean usados como marcadores moleculares en los neonatos. Los ARNm de GR y de PPO son de los pocos marcadores de los que se tuvo información sobre su expresión en la etapa fetal y en el periodo postnatal de la rata. El ARNm de GR es exclusivo del NPV durante el periodo postnatal P0-P16 (Su-Jin Yi et al., 1994). El ARNm de PPO es exclusivo del HL durante el periodo P0-P15 (Sakurai et al., 1998). Teniendo información sobre la expresión de estos marcadores moleculares en el neonato, se puede establecer el patrón de expresión (relativa al hipotálamo) que se esperaría obtener de una disección del NPV para considerarla precisa, aunque no se sabe con certeza el nivel de expresión que se debe de obtener de cada uno de ellos. En una disección correcta del NPV se espera que la expresión del ARNm de GR (marcador positivo) sea mayor y que no tenga expresión del ARNm de PPO (marcador negativo) o que ésta sea mínima, en relación a la expresión relativa para ambos mensajeros obtenida en el hipotálamo.

Para todas las disecciones realizadas del NPV a partir de tejido congelado y del fresco, no fue posible determinar la reproducibilidad de las mismas, con base en la cuantificación de proteína dada la poca disposición de animales y del reactivo. Sin embargo, la poca variabilidad en los rendimientos de ARN total (de 0.9-1.4 µg a partir de tejido congelado y de 1.1-1.3 µg a partir de tejido fresco), indica indirectamente que hay poca variación en la cantidad de tejido inicial de la cual se purificó el ARN total, sugiriendo que las disecciones hechas tuvieron un tamaño razonablemente reproducible.

Haciendo las disecciones del NPV tomando el tejido contenido en el segundo tercio imaginario del tercer ventrículo, no se obtuvo el patrón esperado de expresión relativa de los mensajeros de los marcadores. Por lo tanto es posible que estas disecciones no incluían al NPV.

Al desplazar la disección del NPV 1 mm aproximadamente hacia arriba en el tercer ventrículo, se obtuvo una expresión relativa de los mensajeros de los 3 marcadores de acuerdo a lo esperado: un incremento en la expresión del ARNm de TRH y de GR y poca expresión del ARNm de PPO. La expresión del ARNm de GR y de PPO sugiere poca contaminación con el HL en la disección y por lo tanto, que la expresión relativa obtenida del ARNm de TRH proviene casi exclusivamente de neuronas TRHérgicas del NPV. Por lo que, al hacer la disección de rebanadas obtenidas de la forma antes descrita y 1 mm aproximadamente arriba del segundo tercio del tercer ventrículo, se puede obtener con alta probabilidad al NPV. Sin embargo observamos cierta variabilidad en la expresión de los mensajeros de los marcadores moleculares en las diferentes disecciones realizadas.

Estas variaciones no se explican por una variabilidad en el tamaño de la disección, por las razones antes mencionadas. Pueden deberse más bien por desplazamientos de la región hipotálamica de donde se obtuvo la rebanada. Al obtener de cada cerebro dos rebanadas, una de la forma habitual, es decir, al nivel de la apertura del quiasma óptico (rebanada posterior) y la otra en una región anterior a la apertura del quiasma óptico (rebanada anterior), se confirmó que de las disecciones del NPV hechas de las rebanadas obtenidas de la forma habitual, se puede obtener un incremento en la expresión relativa del ARNm de TRH y de GR y una disminución de la expresión del ARNm de PPO. Estos experimentos también mostraron que desplazar la toma de la rebanada para hacer la disección, es perjudicial ya que probablemente no se incluye al NPV.

De los resultados obtenidos de las disecciones en tejido congelado, se puede concluir que con la estrategia seguida en este proyecto, se logró definir la región anatómica en el hipotálamo neonatal de rata en la que se puede encontrar

con alta probabilidad el NPV, reflejado en los incrementos de la expresión de los ARNm de TRH y de GR. Al tener reducida expresión del ARNm de PPO en estas disecciones, se puede tener la seguridad molecular de que la expresión del ARNm de TRH detectada proviene en su mayoría de neuronas TRHérgicas del NPV y no del HL.

Las disecciones del NPV realizadas a partir de tejido fresco mostraron gran variabilidad en los niveles de expresión relativos para los 3 ARNm. La expresión relativa del ARNm de TRH y de GR fue distinta a lo esperado; hubo baja expresión de ambos mensajeros, en comparación a la expresión obtenida para los mismos en el hipotálamo. Aunque la expresión del ARNm de PPO fue mínima como lo esperado, sugiriendo poca contaminación en la disección por tejido proveniente del HL, los niveles de expresión del ARNm de TRH y de GR obtenidos en estas disecciones sugieren que la rebanada, y/o el nivel del tercer ventrículo de donde se hizo la disección, no contenía al NPV.

La poca consistencia del tejido fresco dificulta su manipulación. Hay deformaciones del tejido al momento de hacer los cortes para la obtención de la rebanada, por lo que es muy probable que haya desplazamientos en la región del hipotálamo de la cual se obtiene esta rebanada. Dado que el NPV ocupa una porción muy pequeña del hipotálamo (0,5 mm), ligeros desplazamientos en la obtención de la rebanada del hipotálamo para hacer la disección pueden resultar en que esta rebanada no contenga todo el NPV y por lo tanto, como se observó en las disecciones del NPV realizadas a partir de tejido congelado, que la expresión relativa de los 3 mensajeros no sea como lo esperado.

Para mejorar la disección del NPV a partir de tejido fresco, se podría aumentar la consistencia del tejido, colocando el cerebro de la rata sobre un molde (en el que se realiza la disección) lo suficiente frío (con hielo seco). Con ésto se puede aumentar la consistencia del tejido sin congelarlo y por lo tanto mantenerlo a una temperatura que facilite su manipulación sin dañar a las células y sin interferir con las condiciones de cultivo.

II.- Efecto del BDNF sobre el fenotipo TRHérgico.

Varios estudios han demostrado que las neurotrofinas tienen un papel importante en la expresión del fenotipo peptidérgico en las etapas fetal y postnatal, aumentando la expresión del ARNm de varios péptidos en diferentes regiones del cerebro. Existen varios ejemplos de los efectos del BDNF *in vivo* e *in vitro*, sobre la expresión del ARNm y la proteína de varios péptidos, en varias regiones del cerebro. Se conoce poco todavía, sobre los factores tróficos que las neuronas hipotalámicas puedan requerir para la determinación de su fenotipo. En cultivo de hipotálamo fetal, es posible detectar al BDNF y NT3, así como a los mensajeros y a las isoformas activas de los receptores TrkB y TrkC. Utilizando estos antecedentes se ha mostrado que el BDNF está involucrado en la determinación del fenotipo peptidérgico de la OX y AVP de las neuronas del NPV y SON de la rata postnatal (Kusano et al., 1999) y de la SRIH en los núcleos periventriculares del hipotálamo fetal (Loudes et al., 2000; Petit et al., 2002).

Por hibridación *in situ*, se pudo demostrar que en el hipotálamo existe una relación espacio-temporal entre la expresión del ARNm de TrkB* (isoforma activa) y el ARNm de TRH; ambos mensajeros se pueden detectar en el NPV en los días E16, E18 y P1 (González 2001, Tesis de Maestría, UNAM). El BDNF es un factor trófico necesario para la diferenciación del fenotipo TRHérgico en el hipotálamo fetal. En cultivos de hipotálamo fetal, el BDNF pero no la NT3, aumenta la expresión del ARNm de TRH al 4 DIV. Sólo las neuronas hipotalámicas que expresan el receptor TrkB* responden a los efectos del BDNF (Guerra-Crespo et al., 2001).

Uno de los objetivos planteados en este trabajo, fue determinar si el BDNF regula los niveles del ARNm de TRH y del TRH (péptido) intracelular en cultivo de hipotálamo neonatal. Como era importante reducir la interferencia de moléculas solubles o de matriz, las células fueron cultivadas en un medio libre de suero, el NB-B27. El NB-B27 inhibe el crecimiento de las células gliales y por consiguiente la producción de matriz extracelular y factores tróficos por estas células gliales.

Varios de estos elementos son importantes para la sobrevivencia y la diferenciación celular (Charli et al., 1995; Niquet et al., 2000).

En este estudio se observó que la densidad celular tiene efecto sobre los niveles del ARNm de TRH, ya que los niveles del mensajero de TRH aumentan con el número de células sembradas por plato. Al no haber sido tratadas con BDNF las células y dado que fueron cultivadas en NB-B27, los resultados obtenidos se pueden explicar por la presencia de BDNF endógeno secretado por las neuronas. En cultivos de hipotálamo fetal el BDNF puede ser detectado (Loudes et al., 2000) aunque no se sabe si esta expresión sea mantenida durante la esta postnatal. Por otra parte es posible detectar el ARNm de TrkB⁺ en el NPV al día P1, en una región donde también se detecta el ARNm de TRH (González 2001, Tesis de Maestría, UNAM) lo que sugiere que el BDNF endógeno, en las células hipotalámicas postnatales sigue regulando la expresión del ARNm de TRH. Aunque los datos no son estadísticamente significativos, éstos muestran una tendencia similar a los obtenidos por Guerra-Crespo et al., 2001, sugiriendo que el BDNF endógeno tiene un efecto regulador sobre los niveles del ARNm de TRH tanto en células hipotalámicas fetales como en postnatales. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se tendría que modificar los niveles del BDNF endógeno.

La segunda conclusión es que in vitro las células hipotalámicas neonatales responden de manera similar a los efectos del BDNF (exógeno), que las neuronas del hipotálamo fetal. El BDNF (50 ng/ml) aumenta los niveles de expresión del ARNm de TRH al 4 DIV, a baja densidad celular (75×10^3 células por cm^2). Este incremento puede explicarse por un aumento en el nivel del ARNm de TRH en la célula TRHérgica o por un aumento en el número de células que expresan TRH. En el hipotálamo fetal, el BDNF aumenta el nivel del mensajero de TRH, aumentando la expresión de este mensajero por célula (Guerra-Crespo et al., 2001). Por lo tanto, el aumento en la expresión del mensajero de TRH, en el hipotálamo neonatal, con alta probabilidad puede ser resultado de los efectos a nivel de la transcripción del TRH.

El BDNF tiene ligeros efectos sobre la sobrevivencia celular a densidades bajas (75×10^3 células por cm^2) en cultivos de células hipotalámicas fetales, pero no tiene efecto sobre la población de neuronas TRHérgicas (Guerra-Crespo et al., 2001). Sin embargo el BDNF si tiene efecto sobre la sobrevivencia de las neuronas magnocelulares del hipotálamo postnatal (Berg-von der Emde et al., 1995). Esto sugiere que el BDNF puede tener efectos diferentes en la sobrevivencia de las neuronas hipotalámicas postnatales de aquellos observados en las células hipotalámicas fetales o que estos efectos sean dependientes del subtipo celular hipotalámico. Desafortunadamente no fue posible determinar si la sobrevivencia de las neuronas TRHérgicas es alterada por el BDNF. Sin embargo, el BDNF no incremento la cantidad de ARN total por plato (un incremento indicaría mayor número de células), por lo que es muy poco probable que los efectos del BDNF sobre el nivel del mensajero de TRH en cultivo de hipotálamo postnatal se deban a los efectos de esta neurotrofina en la sobrevivencia neuronal (aumento el número de células que expresan TRH). Consistente con esta interpretación, está el hecho de que no detectamos en la observación morfológica evidencia de muerte neuronal y algún efecto del BDNF.

Previamente se había mostrado que el efecto del BDNF sobre la expresión del ARNm de TRH al 4 DIV es proporcional al tiempo de exposición a esta neurotrofina (Guerra-Crespo et al., 2001). Sin embargo estos efectos no han sido determinados en cultivos mantenidos hasta el 12 DIV, tiempo que permite una diferenciación marcada de las neuronas TRHérgicas. Con el objetivo de observar si los efectos del BDNF sobre los niveles del mensajero de TRH en el hipotálamo neonatal aumentan, se mantienen, o si son reversibles, con los días en cultivo, mantuvimos los cultivos hasta el 12 DIV, unos expuestos al BDNF todo el tiempo y otros sólo hasta el 4 DIV. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto del BDNF sobre el mensajero de TRH no se mantiene.

En cultivos de hipotálamo fetal, la exposición al BDNF entre los DIV 0 y 1 es suficiente para ver los efectos del BDNF sobre la expresión del mensajero de TRH hasta el 4 DIV. En las células TRHérgicas de hipotálamos fetales, la exposición

prolongada al BDNF induce la expresión del mensajero de $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ en aquellas neuronas TRHérgicas que los expresaban en bajos niveles. Esto sugiere que el efecto del BDNF sobre el nivel del mensajero de TRH es acumulativo (Guerra-Crespo et al., 2001). Los efectos del BDNF sobre los niveles del mensajero de TRH en cultivos neonatales sugieren que el BDNF sólo es requerido durante los primeros días in vitro para aumentar los niveles del mensajero del TRH. Estos efectos se pueden detectar al 4 DIV de exposición al BDNF, pero esto no significa que a este día se detecten los efectos máximos del BDNF (se necesitaría determinar el nivel del mensajero del TRH entre el 4 DIV y el 12 DIV). Estos resultados sugieren que hay una regulación negativa de los efectos del BDNF, tal vez por el mismo BDNF (autoregulación), haciendo que los efectos "positivos" sobre el nivel del mensajero del TRH sólo sean detectados hasta cierto tiempo de exposición. En cultivos primarios de neuronas fetales, el tratamiento prolongado (crónico) con neurotrofinas puede aumentar (Ninkina et al., 1996) o disminuir (Frank et al., 1996) los niveles del receptor TrkB . En cultivos de hipotálamo fetal el BDNF actúa directamente sobre las neuronas TRHérgicas por la activación de su receptor TrkB^+ (Guerra-Crespo et al., 2001). Si bien la exposición prolongada al BDNF puede aumentar la expresión del receptor $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ en las células TRHérgicas, al prolongar demasiado esta exposición puede resultar en una retroalimentación negativa que lleva a la disminución del $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ y por lo tanto a la disminución de los niveles del mensajero de TRH. Para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar los niveles del mensajero y de la proteína del receptor $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ al 12 DIV.

Aunque no se determinó la sobrevivencia celular durante el cultivo, el hecho de no detectar la presencia de cuerpos apoptóticos ó de alguna morfología celular irregular durante los 12 días de cultivo indica indirectamente, que no hubo excesiva muerte celular, lo que sugiere que los resultados preliminares son confiables. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que las células hipotalámicas neonatales no resistan tanto tiempo en las condiciones de cultivo y

por lo tanto que sea difícil determinar los efectos reales del BDNF sobre el nivel del ARNm de TRH con el tiempo de exposición en el cultivo.

El tratamiento con BDNF produjo un aumento en el contenido intracelular de TRH al 12 DIV, en células que fueron expuestas al BDNF desde el momento de la siembra hasta el último día del cultivo. En las células hipotalámicas fetales, el BDNF al 4 DIV no tiene efecto sobre el nivel del TRH intracelular (Guerra-Crespo et al., 2001), pero no se han analizado sus efectos al 12 DIV. En cultivos primarios de hipotálamo fetal, los niveles del ARNm de TRH incrementan rápida y establemente durante la primera semana in vitro, mientras el péptido aumenta hasta la segunda semana in vitro. Ésto probablemente porque en la primera semana in vitro las neuronas tienen un sistema inmaduro de procesamiento y secreción (Loudes et al., 1983; Pérez-Martínez et al., 2000). El aumento en los niveles de la TRH intracelular al 12 DIV, en el hipotálamo neonatal, puede ser el resultado del efecto del BDNF en los niveles del ARNm de TRH al 4 DIV. Dado que al 12 DIV el BDNF ya no tiene efecto en los niveles del mensajero de TRH, hay un desfase de hasta 8 días entre el incremento en los niveles del mensajero de TRH y la acumulación del péptido intracelular. Puede ser que en la segunda semana in vitro, al madurar el sistema de procesamiento del precursor de TRH, se genere TRH a partir del ARNm previamente acumulado. Por otra parte, el BDNF no tiene efectos en el contenido de la TRH intracelular en las células expuestas al BDNF hasta el 4 DIV, lo que sugiere que el aumento en los niveles de la TRH puede ocurrir después del 4 DIV, pero antes del 12 DIV.

El aumento del TRH intracelular al 12 DIV, pero no de su mensajero, y sus efectos al 4 DIV sobre la expresión del mensajero de TRH, sugiere que el BDNF, en etapas diferentes del desarrollo del cultivo, está actuando sobre aspectos distintos del proceso de diferenciación fenotípica. El establecimiento del fenotipo peptidérgico es un proceso secuencial que involucra pasos de transcripción, traducción, procesamiento, empaquetamiento y liberación; cada uno de estos pasos puede estar regulado por varios factores en adición a los factores neurotróficos. De esta forma, el BDNF después del 4 DIV, puede tener un papel en

el procesamiento del precursor del TRH o en la liberación del péptido, en adición a los efectos sobre el nivel del mensajero de TRH que pudiera haber tenido previamente.

En resumen, el BDNF aumenta los niveles del ARNm de TRH al 4DIV y los niveles de la TRH intracelular al 12 DIV. El BDNF produce sus efectos por la activación directa de su receptor $\text{TrkB}^{\text{TK+}}$; sin embargo, las células TRHérgicas del hipotálamo son heterogéneas en la expresión de este receptor. Aunque se ha detectado el mensajero del receptor $\text{TrkB}^{\text{TK+}}$ en las neuronas del NPV en P1, no se sabe que proporción de células de este núcleo lo expresan y respondan a los efectos del BDNF. Dada la gran variedad de fenotipos que son expresados en el hipotálamo y que los efectos del BDNF sobre la diferenciación TRHérgica pueden variar según el subtipo celular hipotalámico, se torna relevante hacer coincidir los objetivos particulares del proyecto para aislar a las células del NPV del resto de la población hipotalámica y estudiar los efectos del BDNF y de otras influencias tróficas, en el establecimiento del fenotipo TRHérgico de las neuronas hipofisiotróficas del NPV.

Conclusiones.

1.- Con la estrategia de microdissección del NPV a partir de tejido congelado, se logró determinar una región en el hipotálamo neonatal en la cual, al hacer la microdissección se puede tener la seguridad molecular de que se tiene al NPV.

2.- Las células hipotalámicas neonatales responden de manera similar a las neuronas hipotalámicas fetales a los efectos del BDNF (exógeno) sobre la expresión del ARNm de TRH al 4 DIV. Ésto da la posibilidad de utilizar al hipotálamo neonatal para analizar el efecto del BDNF sobre la expresión del fenotipo TRHérgico en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV dado que el NPV hipotalámico neonatal es relativamente más fácil de disectar que el fetal.

Perspectivas.

Trasladar esta estrategia de microdissección del NPV al tejido fresco abrirá la oportunidad de realizar cultivos enriquecidos con neuronas TRHérgicas del NPV, aunque no se descarta absolutamente una contaminación menor con neuronas TRHérgicas provenientes del HL. Los cultivos de neuronas del NPV, obtenidos de esta forma, podrían ser sometidos a otros métodos de purificación, para obtener cultivos con mayor enriquecimiento en neuronas TRHérgicas provenientes del NPV. Con cultivos de estas características se podrán estudiar varios aspectos del proceso de diferenciación del fenotipo TRHérgico, teniendo la seguridad de que la información obtenida del análisis del fenotipo neuronal provendría casi exclusivamente de neuronas del NPV hipotalámico.

Referencias.

1. Akil H, Campeau S, Cullintan EW, Lechan RM, Toni R, Watson SJ y More RY (1999). Neuroendocrine systems I: overview-thyroid and adrenal axes. En *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, pp. 1128-1131.
2. Altman J y Bayer SA (1978a). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol* **182**: 945-972.
3. Altman J y Bayer SA (1978b). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol* **182**: 973-994.
4. Armstrong WE (1985). Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. En Paxinos G (ed): *The Rat Nervous System*, vol 1: Forebrain and midbrain. Academic Press, Sydney, pp 119-128.
5. Balkan W (1998). Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* **139**: 252-259.
6. Berg-von der Emde K, Dess WL, Hiney JK, Hill DF, Dissen GA, Costa ME, Moholt-Sibebert M y Ojeda SR (1995). Neurotrophins and the neuroendocrine brain: different neurotrophins sustain anatomically and functionally segregated subsets of hypothalamic dopaminergic neurons. *J Neurosci* **15**: 4223-4237.
7. Bleier R y Byne W (1985). Septum and hypothalamus. En *The Rat nervous System*. Vol 1: Forebrain and midbrain. Academic Press, Sydney, pp 87-117.
8. Burbach JPH (2000). Genetic pathways in the developmental specification of hypothalamic neuropeptide and midbrain catecholamine systems. *Eur J Pharmacol* **405**: 55-62.
9. Broberger C (1999). Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res*: **848**: 101-113.
10. Card JP, Swanson LW y Moore RY (1999). The hypothalamus: an overview of regulatory systems. En Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds): *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, San Diego, pp1013-1025.
11. Carnahan J, y Nawa H (1995). Regulation of neuropeptide expression in the brain by neurotrophins. Potential role in vivo. *Mol Neurobiol* **10**: 135-149.
12. Chakif M (1994). Green fluorescent protein as a marker for gen expression. *Science* **263**: 802-805.
13. Charli JL, Cruz C, Redondo JL, Guerra C. y Joseph-Bravo P (1995). Homologous conditioned medium expresion of TRH in hypothalamic neurons in primary culture. *Develop Brain Res* **89**:155-160.
14. Chomczynski P y Sacchit N (1987). Single-Step Method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
15. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM y Varon S (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor in adult brain. *J Neurosci* **17**: 2295-2313.

16. Figdor MC y Stern CD (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* **363**: 630-634.
17. Fliers E, Wiersinga WM y Swaab DF (1998). Physiological and pathophysiological aspects of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the human hypothalamus. *Thyroid* **8**: 921-928.
18. Friedman WJ, Olson L y Persson H (1991). Cell that expressed brain-derived neurotrophic factor ARNm in the development postnatal brain. *Eur J Neurosci* **3**: 688-697.
19. González-Sánchez JA (2001). Expresión del ARNm que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB^{TK} en el núcleo paraventricular de hipotálamo de rata durante el desarrollo y su relación con la expresión del ARNm de la hormona liberadora de tirotrópina. Tesis de Maestría, UNAM.
20. Griffiths EC y Bennett GW (1983). Thyrotropin-Releasing Hormone: A Introduction. Thyrotropin-Releasing hormone. Raven Press, New York, pp 1-14.
21. Guerra-Crespo M, Ubieta R, Joseph-Bravo P, Charli JL y Pérez-Martínez L (2001). BDNF increases the early expression of TRH ARNm in fetal TrkB⁺ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci* **14**: 483-494.
22. Haisenleder DJ, Orotolano GA, Dalkin AC, Yasin M y Marshall JC (1992). Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **130**: 2917-23.
23. Hyypää M (1969). Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. *Z Anat Entwickl-Gesch* **129**: 41-52.
24. Ifft JD (1972). An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J Comp Neurol* **144**: 193-204.
25. Jackson MD (1983). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in mammalian species and its functional significance. thyrotropin-releasing hormone. Raven Press, New York, pp 3-14.
26. Johnson JE (1999). Neurotrophic factors. En *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, pp 611-635.
27. Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM y Kordon C (1979). Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* **104**: 801-805.
28. Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Pérez-Martínez L, Zoeller T y Charli JL (1988). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol. Neurobiol* **18**: 231-319.
29. Kandel ER y Schwartz JH (1991). En *Principles of Neural Science*. Elsevier North/Holland, New York, pp 433-449.
30. Katoh-Semba R, Takeuchi KI, Semba R y Kato K (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* **69**: 34-42.
31. Kernie SG, Liebl DJ y Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* **19**: 1290-1300.
32. Kiss JZ, Martos J y Palkovits M (1991). Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat. *J Comp Neurol* **313**: 563-73.

33. Klein R, Martín-Zanca D, Barbacid M y Parada LF (1990). Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* **109**: 845-850.
34. Korsching S (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci*, **13**: 2739-2748.
35. Kusano K, House SB y Gainer H (1999) Effects of osmotic pressure and brain-derived neurotrophic factor on the survival of postnatal hypothalamic oxytocinergic and vasopressinergic neurons in dissociated cell culture. *J Neuroendocrinol* **11**: 145-152.
36. Lechan RM y Toni R (1992). Thyrotropin-releasing hormone neural systems in the central nervous system. En Nemeroff CB (ed): Neuroendocrinology. CRC Press, Boca Raton, pp 279-330.
37. Lechan RM, Wu P y Jackson IM (1987). Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology* **121**: 1879-91.
38. Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G y Goodman RH (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* **231**: 159-161.
39. Lee SL, Stewart K, Goodman RH (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* **263**:16604-16609.
40. Liposits Z (1993). Ultrastructure of hypothalamic paraventricular neurons. *Crit Rev Neurobiol* **7**: 89-162.
41. Loudes C, Petit F, Kordon C y Faivre-Bauman A (2000). Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* **72**: 144-153.
42. Loudes C, Petit F, Kordon C y Faivre-Bauman A (1999). Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3). *Eur J Neurosci* **11**: 617-624.
43. Markakis EA y Swanson LW (1997). Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Rev* **24**: 255-291.
44. Merlio JP, Ernfors P, Jaber M y Persson H (1992). Molecular cloning of rat *trkC* and distribution of cells expressing messenger ARNs for members of the *trk* family in the rat central nervous system. *Neuroscience* **51**: 513-532.
45. Nawa H, Bessho Y, Carnahan J, Nakanishi S y Mizuno K (1993). Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* **60**: 772-775.
46. Nawa H, Pellemounter MA y Carnahan J (1994). Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. *J Neurosci* **14**: 3751-3765.
47. Niquet J, Pérez-Martínez L, Guerra M, Grouselle D, Joseph-Bravo P y Charli JL (2000). Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vitro. *Develop Brain Res* **120**: 49-56.
48. O'Leary R y O'Connor B (1995). Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* **65**: 953-963.
49. Paxinos G, Ashwell KWS y Törk I (1994). Atlas of the developing rat nervous system, 2nd ed. Academic Press, San Diego.

50. Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, Morales C, Charli JL y Joseph-Bravo P (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH ARNm levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **68**: 345-354.
51. Pérez-Martínez L, Lezama L, Morales-Chapa C, Charli JL y Joseph-Bravo P (2001). An improved method for the culture of fetal hypothalamic neurons in primary culture. *Brain Res Protoc* (sometido)
52. Pérez-Martínez L, Charli JL y Joseph-Bravo P (2001). Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Dev Brain Res* **130**: 73-81.
53. Petit F, Huicq S, Gardette R, Epelbaum J, Loudes C, Kordon C y Favre-Bauman A (2002). The Neurotrophins NT3 and BDNF induce selective specification of neuropeptide coexpression and neural connectivity in arcuate and periventricular hypothalamic neurons in vitro. *Neuroendocrinology* **75**: 55-69.
54. Saltiel AR y Decker SJ (1994). Cellular mechanisms of signal transduction for neurotrophins. *BioEssays* **16**: 405-411.
55. Schmidt-Nielsen K (1986). Hormonal Control. En *Animal Physiology*. Cambridge University Press, New York, pp 497-505.
56. Simerly RB (1995) Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. En *The Rat Nervous System*. Academic Press, Sydney, pp 353-376.
57. Snider WD (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**: 627-638.
58. Stoop R y Poo M (1996). Synaptic modulation by neurotrophic factors. *Prog Brain Res* **109**: 359-364.
59. Strand FL (1999). *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*. MIT Press, Cambridge.
60. Su-Jin Yi, Masters JN y Baram TZ (1994). Glucocorticoid receptor ARNm ontogeny in the fetal and postnatal rat forebrain. *Mol Cell Neurosci* **5**: 385-393.
61. Wang S (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neural progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev Neurosci* **22**: 167-176.
62. Williams G, Harrold JA y Cutler DJ (2000). The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on black box. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 385-396.
63. Yamada M, Radovick S, Wondisford R, Nakayama Y, Weingraub BD y Wilber JF (1990). Cloning structure of human genomic ADN and hypothalamic ADNc encoding human prepro thyrotropin-releasing-hormone. *Mol Endocrinol* **4**: 551-556.
64. Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA y Feinstein SC (1997). Immunocytochemical localization of trkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* **378**: 135-157.