

T 577.175.8

FER
tra

**Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid**

BIBLIOTECA UCM



5301691015

**Transformación de las células glandulares parotídeas
sometidas a influencias hormonales hipotalámicas:
Estudio in vitro.**

**presentada como Memoria de Tesis Doctoral por
M^a del Pilar Fernández Mateos**

R. 24.654



M^a Pilar Fernández Mateos

M^a Pilar Fernández Mateos

[Handwritten signatures]

**DR. PABLO
GIL LOYZAGA**

**DR. JESUS A.
FERNANDEZ
TRESGUERRES**

Madrid, Diciembre de 1994

**Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid**

**Transformación de las células glandulares parotídeas
sometidas a influencias hormonales hipotalámicas:
Estudio in vitro**

**por
M^a del Pilar Fernández Mateos**

Madrid, Enero de 1995

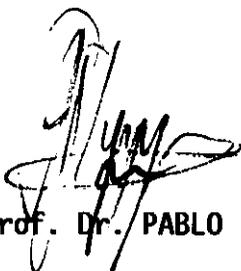
D. PABLO GIL LOYZAGA, Profesor Titular y Director del Centro Universitario de Cultivos Celulares de la Universidad Complutense de Madrid

y

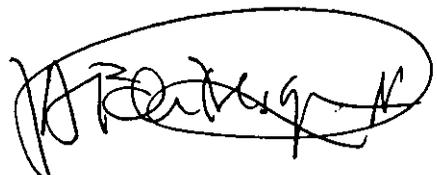
D. JESUS A. FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: Que la memoria de Investigación titulada: "Transformación de las células glandulares parotídeas sometidas a influencias hormonales hipotalámicas: Estudio *in vitro*" ha sido realizada bajo nuestra dirección por Doña MARIA DEL PILAR FERNANDEZ MATEOS, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, y hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Madrid, Enero de 1995.



Prof. Dr. PABLO
GIL LOYZAGA.



Prof. Dr. JESUS A.
FERNANDEZ TRESGUERRES



"El hecho de que las actividades que he llevado a cabo de forma tan imperfecta hayan sido y sigan siendo para mí una inagotable fuente de alegría, me lleva a creer que la imperfección, más que la perfección, en la ejecución de las tareas que nos han sido encomendadas o que hemos elegido, armoniza mejor con la naturaleza humana."

Rita Levi-Montalcini.

A mi hermano Eduardo

A mis padres

ABREVIATURAS

A-	Adrenalina
AcCh-	Acetilcolina
ACTH-	Hormona adrenocorticotropa
α -MSH-	Hormona estimuladora de melanocitos
AMH=MIF-	Hormona contra los conductos de Müller
ANP-	Péptido atrial natriurético
APO-HA-	Area preóptica del hipotálamo anterior
APO-HM-	Area preóptica del hipotálamo medial
bFGF-	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
β -LPH-	β -lipotropina
CGRP-	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CLIP-	Corticotropin Like Intermediate lobe Peptide
CRH-	Corticotropin Releasing Hormone
DA-	Dopamina
DMSO-	Dimetilsulfóxido
EGF-	Factor de crecimiento epidérmico
EKC-	Extracto hipotalámico de cordero
EHR-	Extracto hipotalámico de rata
FGF-	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH-	Hormona foliculo estimulante
GABA-	Acido gamma aminobutírico
GFAP-	Proteína fibrilar ácida de la glía
GH-	Hormona del crecimiento
GHRH-	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GH-RIH-	Hormona inhibidora de la GH
GnRH-	Hormona liberadora de gonadotropinas
HCG-	Gonadotropina coriónica humana
HDM-	Hipotálamo dorsomedial
HEPES-	Solución salina de alta eficacia tamponadora
HGF-	Factor de crecimiento de hepatocitos
HMB-	Hipotálamo medio basal
HMG-	Gonadotropina menopáusica humana
HP-	Hormona parotídea
HR-	Hipotálamo de rata
IGF I-	Factor análogo a la insulina tipo I
IGF II-	Factor análogo a la insulina tipo II
LH-	Hormona luteinizante
LHRH-	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
MAC-	Moléculas de adhesión celular
MEC-	Matriz extracelular
MEM-	Medio mínimo esencial
MIF=AMH-	Hormona contra los conductos de Müller

MSH-RF-	Hormona liberadora de la MSH
MSH-RIF-	Hormona inhibidora de la liberación de la MSH
NA-	Noradrenalina
NGF-	Factor de crecimiento nervioso
NPV-	Núcleo Paraventricular
NPVa-	Núcleo periventricular anterior
NSO-	Núcleo Supraóptico
NSQ-	Núcleo Supraquiasmático
NVM-	Núcleo Ventromedial
Ox-	Oxitocina
PBS-	Tampón fosfato salino
PEG-	Poliétilen glicol
PDGF-	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIF-	Hormona inhibidora de prl
POMC-	Proopiomelanocortina
PRF-	Hormona liberadora de prl
Prl-	Prolactina
PTH-	Hormona paratiroidea
RIA-	Radioinmunoensayo
RPWI-	Pocillos control tratados con medio RPWI
SCCC-	Servicio Central de Cultivos Celulares
SF-	Factor de dispersión
SS-	Somatostatina
TCA-	Acido tricloroacético
TGF α -	Factor de crecimiento transformante α
TGF- β -	Factor de crecimiento transformante β
TNF-	Factor de necrosis tumoral
TRH-	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH-	Hormona estimuladora del tiroides
VIP-	Péptido Intestinal Vasoactivo
VP-	Vasopresina
XF-	Pocillos sin células tratados con factores aislados
XHR-	Pocillos sin células tratados con EHR
5-HT-	Serotonina

INDICE

AGRADECIMIENTOS	IX
INTRODUCCION	1
APARTADO I: LA HIPOFISIS	2
1.- Estructura de la hipófisis normal	2
1.1.- Introducción	2
1.2.- Hipófisis anterior	2
1.2.1.- Anatomía	2
1.2.2.- Vascularización Hipofisaria	3
1.2.3.- Inervación Hipofisaria	5
1.3.- Hipófisis posterior o Neurohipófisis	6
1.3.1.- Secreción de la Neurohipófisis	7
1.4.- Lóbulo intermedio	8
1.5.- Embriología	9
2.- El Hipotálamo	10
2.1.- Las hormonas influyen sobre las neuronas hipotalámicas	12
2.2.- Aspectos funcionales: El hipotálamo y el sistema endocrino	12
2.3.- Influencia del hipotálamo sobre la hipófisis anterior	13
2.4.- Células neurosecretoras hipotalámicas	14
2.5.- Eminencia media y neuronas tuberoinfundibulares y tuberohipofisarias	15
2.5.1.- Anatomía	15
2.6.- Concepto del transductor neuroendocrino	17
2.7.- Hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas	18
3.- Neuroendocrinología: Importancia de la hipófisis en la organización hormonal de todos los sistemas	20
3.1.- Control neural de la secreción glandular	21
3.2.- Entrada de información neural en el hipotálamo endocrino	22
3.3.- Mecanismos a través de los cuales los neurotransmisores pueden regular a las hormonas hipotalámicas e hipofisarias	22
3.4.- Control secretomotor	23
4.- Neurosecreción	24
5.- Regulación de las hormonas hipofisarias individuales	25
5.1.- Consideraciones generales: Concepto de retroalimentación en neuroendocrinología	25
5.2.- Ritmos endocrinos.	26
5.3.- Regulación de la secreción de hormonas hipofisarias.	26
5.4.- Secreción de ACTH	28

5.4.1.- Estructura de la ACTH, péptidos relacionados, y del gen de la proopiomelanocortina	28
5.4.2.- Células corticotropas y contenido en ACTH	29
5.4.3.- Secreción de ACTH	29
5.4.4.- Acciones de la ACTH	30
5.4.5.- Regulación de la secreción de la ACTH	31
5.4.6.- Regiones cerebrales implicadas en regulación de corticotropina	32
5.5.- Secreción de LHRH	32
5.5.1.- Secreción de LHRH	33
5.5.2.- Mecanismos de acción de la LHRH	35
5.5.3.- Regulación de la secreción de LHRH	36
5.6.- Regulación de la secreción de TSH	37
5.6.1.- Control neural de la función hipofisaria tiroidea	38
5.7.- Regulación de Prolactina (Prl)	38
5.7.1.- Regulación hipotalámica de la secreción de Prl	38
5.7.2.- Diferencias sexuales en el control de la secreción de Prl	40
5.8.- Hormona estimuladora de melanocitos. Factores liberadores e inhibidores	40
5.9.- Regulación de la hormona del crecimiento	41
5.9.1.- Regulación de la secreción de GH	41
5.9.2.- Regulación de GH por neurotransmisores	43
5.9.3.- Regulación eje hipotálamo-hormona del crecimiento-somatomedinas	44
6.- Problemas clínicos. Déficits de hormonas hipofisarias	44
6.1.- Déficit global. Ausencia de hipófisis	44
6.1.1.- Apoplejía hipofisaria	45
6.2.- Sección de tallo hipofisario	47
6.3.- Déficits aislados por fallo en las hormonas hipofisiotrópicas	48
6.4.- Manifestaciones de déficit hormonal adenohipofisario	50
6.5.- Soluciones actuales para el déficit de hormonas	50
6.5.1.- Terapias de sustitución hormonal	50
6.5.1.1.- Déficit de cortisol	51
6.5.1.2.- Déficit de hormonas tiroideas	51
6.5.1.3.- Déficit de gonadotropinas y LHRH	51
6.5.1.4.- Déficit de GH	52
6.5.1.5.- Déficit de GHRH	53
6.5.2.- Sustitución de la hipófisis	53
6.5.2.1.- Cirugía hipofisaria	53
6.5.2.1.1.- Resultado de la cirugía hipofisaria	54
6.5.3.- Radioterapia hipofisaria	54
6.5.4.- Transplante hipofisario	55

APARTADO II: LAS GLANDULAS SALIVARES	57
7.- Glándulas salivares	57
7.1.- Anatomía de la glándula parótida	58
7.2.- Desarrollo	58
7.3.- Estructura de la glándula parótida	59
7.4.- Unidades secretoras terminales de las glándulas salivares	59
7.5.- Conductos de las glándulas salivares	60
7.6.- Células mioepiteliales de las glándulas salivales	62
7.7.- Control de la actividad de la glándula salivar	62
7.8.- Control hormonal de la glándula parótida	63
7.9.- Control nervioso	64
APARTADO III: TRANSFORMACION CELULAR	66
8.- Posibilidad de transformación morfofuncional de tejidos fetales y adultos bajo estímulos apropiados	66
9.- Factores de crecimiento: familias más importantes	67
9.1.- Familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF)	67
9.1.1.- EGF de ratón	67
9.1.2.- EGF humano	68
9.1.3.- Regulación del EGF	69
9.1.4.- Receptores de EGF y mecanismo de acción	69
9.1.5.- Acciones fisiológicas del EGF	69
9.1.6.- Transforming Growth Factor α	70
9.2.- Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFS)	71
9.2.1.- Efectos biológicos de FGF	71
9.3.- Familia del Transforming Growth Factor β	72
9.3.1.- Estructura química	73
9.3.2.- Receptores	73
9.3.3.- Papel biológico del TGF β	73
9.4.- Otros reguladores inhibidores del crecimiento	75
9.5.- Factores de crecimiento específicos de órganos y tejidos	76
9.5.1.- Factor de crecimiento del nervio (NGF)	76
9.5.1.1.- Receptores de NGF	76
9.5.1.2.- Efectos biológicos de NGF	76
9.5.2.- Interferones	78
9.5.3.- Somatomedinas	78
9.5.3.1.- Somatomedinas en otras especies	79
9.5.3.2.- Efecto sobre la proliferación celular	80

9.5.3.3.- Efectos de las somatomedinas en el tejido endocrino	80
10.- Implicaciones de los factores de crecimiento en la transformación celular	81
11.- Trabajos de Alvarez-Buylla	83
12.- Modelo <i>in vivo</i>	83
13.- Modelo <i>in vitro</i>	84
JUSTIFICACION	85
1.- Elección de la glándula parótida. Explicación del modelo de trabajo	86
2.- Objetivos	87
MATERIAL Y METODOS	88
1.- Instalaciones	89
1.1.- Servicio central de cultivos celulares	89
1.2.- Instalación radiactiva central	89
1.3.- Laboratorios	89
2.- Animales	90
3.- Protocolos experimentales	91
3.1.- Técnicas <i>in vitro</i>	91
3.1.1.- Cultivo en monocapa de células glandulares parotídeas	91
3.1.1.1.- Establecimiento de cultivos primarios de células glandulares parotídeas	92
3.1.1.2.- Tratamiento de los pocillos y cambio del medio de cultivo	94
3.1.1.3.- Controles	95
3.1.1.4.- Tratamientos realizados y número de semanas de duración	96
3.1.2.- Soluciones, medios y reactivos más importantes utilizados	99
3.1.2.1.- Solución de Hanks	99
3.1.2.2.- Solución completa de Hanks	100
3.1.2.3.- Albúmina de suero bovino (BSA)	100
3.1.2.4.- Medio RPMI completo	100
3.1.3.- Factores aislados	101

3.2.- Obtención de los extractos hipotalámicos de rata y de cordero	101
3.3.- Método analítico	102
3.3.1.- Radioinmunoanálisis (RIA)	102
3.3.1.1.- Generalidades	102
3.3.1.2.- Representación gráfica de la curva patrón	103
3.3.1.3.- Tampones y soluciones	105
3.3.1.4.- Reactivos utilizados durante la realización del RIA de LH y de TSH.	106
3.3.1.5.- Marcaje de hormonas con isótopos radiactivos	107
3.3.1.6.- Proceso de Radioinmunoanálisis (RIA)	110
3.4.- Método inmunocitoquímico	111
3.4.1.- Procesado de las muestras para inmunocitoquímica	115
3.4.2.- Test inmunológico para detectar proteínas de citoesqueleto, concretamente citokeratinas	115
3.4.2.1.- Inmunocitoquímica realizada a células procedentes de glándulas en cultivo: Estudio <i>in vitro</i>	116
3.4.2.2.- Inmunocitoquímica realizada a glándulas parotídeas: Estudio <i>in vivo</i>	118
3.4.3.- Detección de LH y TSH	119
3.4.4.- Controles	121
4.- Estadística de los resultados	122
RESULTADOS	127
1.- Obtención de células de parótida	128
1.1.- Puesta en marcha del cultivo de células glandulares parotídeas. Eliminación de fibroblastos	128
2.- Diferenciación de las células en cultivo	130
2.1.- Diferencias morfológicas de la glándula parótida del neonato con respecto a la del adulto	130
3.- Transformación de las células parotídeas sometidas a un estímulo procedente de extractos hipotalámicos de rata	131
3.1.- Morfología	131
3.2.- Bioquímica	131
3.2.1.- LH	132
3.2.2.- TSH	138

4.- Transformación de las células parotídeas sometidas a un estímulo procedente de extracto hipotalámico de cordero	144
4.1.- Morfología	144
4.2.- Bioquímica	145
4.2.1.- LH obtenida a partir de la estimulación de células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 0.25 hipotálamos de rata por pocillo y por día	145
4.2.2.- LH obtenida a partir de la estimulación de células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día	150
4.2.3.- LH obtenida a partir de la estimulación de células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 2 hipotálamos de rata por pocillo y por día	155
4.3.- Efectos observados al emplear asociado al extracto hipotalámico de cordero equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día, un anticuerpo anti-LHRH	162
5.- Transformación de las células parotídeas utilizando como estímulo factores hipotalámicos aislados	165
5.1.- Morfología	165
5.2.- Bioquímica	165
5.2.1.- LH	165
5.2.1.1.- LH obtenida al emplear mezclas a una concentración de 2 μ g de cada factor/día/pocillo	166
5.2.1.2.- LH obtenida al usar una de las mezclas a una concentración de 4 μ g de cada factor/día/pocillo	171
5.2.1.3.- LH obtenida al emplear las mezclas a concentración de 10 μ g de cada factor/día/pocillo	175
5.2.2.- TSH	180
5.2.2.1.- TSH obtenida al emplear las mezclas a una concentración de 2 μ g de cada factor/día/pocillo	180
5.2.2.2.- TSH obtenida al emplear dos de las mezclas a concentración de 4 μ g de cada factor/día/pocillo	186

5.2.2.3.- TSH obtenida al emplear las mezclas a una concentración de 10 μ g de cada factor/día/pocillo	191
6.- Citokeratinas	197
DISCUSION	224
1.- Discusión metodológica	225
2.- Diferenciación de las células glandulares parotídeas <i>in vitro</i>	231
3.- Diferencias morfológicas de la glándula parótida del neonato con respecto a la del adulto	232
4.- Diferenciación celular de las células parotídeas en presencia de extracto hipotalámico	240
5.- Diferenciación de las células epiteliales parotídeas sometidas a factores aislados	263
6.- Análisis comparativo global: efecto de la estimulación con extractos hipotalámicos frente a los efectos provocados por el estímulo con factores hipotalámicos aislados	270
CONCLUSIONES	273
BIBLIOGRAFIA	277

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar, en primer lugar mi agradecimiento al Prof. Puerta Fonollá y al personal de la Primera Cátedra de CC. Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por la ayuda prestada durante mis años de permanencia en el Departamento.

Desde aquí quiero agradecer a D^a Rosa sus esfuerzos por conseguirme animales de un día para otro y su amabilidad y cariño constantes. También quiero agradecerle a D. F. Ortego su ayuda, simpatía y apoyo incondicional.

Debo agradecer desde aquí el cariño de la Prof^a. A.I. Esquifino y de sus chicos, especialmente a D. Agustín Arce. Siempre me ayudaron cuando los necesité.

También quiero desde aquí, hacer llegar mi agradecimiento a la Dra. Pérez Cao, al Dr. JG. López Sánchez, Dra. A. Ibañez, a MT. Blázquez y a C. Micó.

También quiero hacer llegar mi agradecimiento al personal del departamento de Fisiología Humana (Endocrinología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Por distintas razones, durante estos últimos cuatro años he pasado allí muchas horas de trabajo, de día y de noche. Todo lo que allí encontré fue amabilidad, compañerismo y ayuda desinteresada. Vaya desde aquí mi sincero agradecimiento. Quiero recordar especialmente a la Prof^a. Carmen Ariznavarreta, por su constante alegría y sus consejos y a D^a Lucila Kraus, por su sincero cariño y su ayuda, ya que sin ella no habría sido posible manejar la cantidad de animales que han sido necesarios para la realización de esta Tesis.

Debo hacer mención especial a D^a Blanca Granados. Esta Tesis Doctoral, sencillamente, no se habría podido realizar sin ella. Su ayuda ha sido superior a lo que yo habría podido imaginar y siempre superó los límites de la mera cortesía. No creo que pueda agradecerte todo lo que has hecho por mí, pero si puedo decir, desde aquí, que ha sido un placer trabajar contigo.

Mis compañeros del grupo de Neurobiología de la Audición merecen también una mención especial; algunos de ellos hace poco que se han incorporado al laboratorio, pero a pesar del poco tiempo que hace que nos conocemos, siempre han tenido una sonrisa y una palabra de aliento. Son D. Paco Carricondo, D. Manolo García, D^a Esther Tapia, M^a José Gimeno y a D^a Belén Ruiz. A los más veteranos debo agradecerles

los consejos y la ayuda prestada en las muchas horas de trabajo que hemos compartido juntos. Vaya desde aquí mi agradecimiento especial para la Dra. MV. Bartolomé, D. F. Valderrama, D^a MA. Vicente, D^a E. Hernández y D. F. Simón.

Debo agradecer de forma especial la labor realizada por D^a Teresa Rodríguez y D^a Olga Iglesias. Siempre me ayudaron cuando las necesité, incluso fuera de sus horarios, y mira que las he necesitado veces. Muchas gracias de todo corazón.

Al Dr. M. RemezaI debo agradecerle su apoyo constante, sus consejos y su sincera amistad.

A D^a A. Rodríguez, no sabría que decirle. Me ha ayudado siempre, en el trabajo y fuera de él. Esta Tesis tiene mucho de su trabajo y cariño. Me ha dado su apoyo sin pedírselo y ha estado conmigo en lo bueno y en lo malo. Desde estas líneas, gracias.

Al Dr. A. Merchán debo agradecerle muchas cosas. No sólo me ha dado consejos, sino que también me ha dado un cariño y un apoyo superior a la distancia que nos ha separado en estos dos últimos años. Gracias por estar siempre a mi lado. Sin tí, nunca lo habría conseguido.

Al Prof. J.A. Fernández-Tresguerres debo agradecerle su paciencia, optimismo, afecto y calor. Siempre le encontré cuando le necesité y siempre tuvo palabras de apoyo y de aliento para hacerme las cosas infinitamente más sencillas. Sin sus consejos y ayuda me habría resultado imposible manejarme en el campo de la Endocrinología. Desde aquí le envío todo mi agradecimiento.

Del Prof. P. Gil Lozaga que voy a decir. Es mi jefe, mi maestro y mi amigo. En su laboratorio he aprendido todo lo que sé. Su inagotable capacidad de trabajo es un estímulo y ejemplo para todos los que trabajamos y aprendemos con él. El me ha dado la oportunidad de adentrarme en el mundo de la Investigación, siendo sus consejos y su cariño, durante estos cuatro años, fundamentales.

No quiero olvidar aquí a mis amigas sobre todo a D^a Marta Martín, D^a María González y D^a Eva Cano. Siempre estuvieron allí, aguantando mis días bajos y animándome durante años. Gracias por todo. También quiero agradecerle a D. Juan Manuel Iranzo su sincera amistad.

Por último, quiero hacer mención a mi familia. Mis padres han reído y sufrido más que yo misma, todas las alegrías y sinsabores de mi vida, me han animado, estimulado y apoyado, incluso cuando ellos necesitaban

el apoyo más que yo. Sé con la ilusión que esperan la lectura de esta Tesis y con ella quiero agradecerles su cariño, y disculparme por todo el tiempo que la realización de ésta les ha robado.

No quiero acabar los agradecimientos, sin recordar aquí a mi hermano Eduardo. Él fué la primera persona que confió en mí y en mis aptitudes, aún sin saber en aquellas fechas, ni tan siquiera a que me iba a dedicar, aunque ahora creo que siempre lo supo. Siempre me apoyó y me animó con un cariño y una energía sin límites.

Sé la ilusión que te habría hecho compartir esta Tesis conmigo, por eso, te la dedico con todo mi amor.

En la financiación de esta Tesis Doctoral ha participado el FISs mediante una ayuda a la investigación 92/0475 y mediante una Beca Predoctoral (1992-1994) de colaboración en este Proyecto.

INTRODUCCION

APARTADO I: LA HIPOFISIS.

1.- ESTRUCTURA DE LA HIPOFISIS NORMAL.

1.1 INTRODUCCION.

La hipófisis o pituitaria es una glándula endocrina situada en la silla turca y unida al hipotálamo a través del infundíbulo hipofisario fuente de al menos seis hormonas que regulan funciones tan diversas como el crecimiento, desarrollo, la función tiroidea, la función adrenal, la gonadal y la de las glándulas mamarias (Goodyear, 1989).

Los tejidos periféricos no endocrinos son también diana para algunas hormonas hipofisarias.

1.2.- HIPOFISIS ANTERIOR.

La hipófisis anterior es una glándula que regula varios órganos endocrinos integrando las señales procedentes del cerebro y las señales obtenidas por retroalimentación de las hormonas excretadas en órganos periféricos para estimular la liberación intermitente de hormonas por una glándula en particular.

1.2.1.- Anatomía.

La hipófisis está localizada en la silla turca o fosa hipofisaria del cráneo, bajo el cerebro. Está protegida por el hueso esfenoides y está cubierta por la duramadre, una densa capa de tejido conjuntivo que bordea la silla turca. El tuber cinereum del hipotálamo y el tercer ventrículo del cerebro yacen sobre el techo de la silla (Ikeda y cols., 1988).

La hipófisis está dividida en los lóbulos anterior y posterior. El lóbulo anterior está a su vez dividido en tres partes: la *par distalis*, la *pars intermedia* y la *pars tuberalis* (Thorner y cols., 1992). La *pars distalis* es la más grande y es donde están localizadas las células productoras de hormonas. La *pars intermedia* está pobremente desarrollada en los humanos; consiste en unas pocas cavidades, revestidas de un epitelio simple columnar o cuboideo, que contienen en su interior material amorfo de naturaleza proteica y pequeños restos de extrusión. La *pars tuberalis* es la porción más superior del lóbulo anterior y está adherido al tallo hipofisario. Contiene pequeños grupos de células que producen fundamentalmente glicoproteínas y también nidos de células de naturaleza escamosa.

La neurohipófisis o pituitaria posterior consta de tres partes (Sheehan y Kovacs, 1982) : la eminencia media del tuber cinereum, el tallo infundibular o tallo hipofisario y el proceso infundibular, lóbulo posterior o lóbulo neural.

1.2.2.- Vascularización hipofisaria.

La circulación hipofisaria es compleja y a través de ella se realiza el control hipotalámico de la hipófisis anterior. La hipófisis recibe sangre de dos arterias: Las arterias hipofisarias superior e inferior que se originan en la arteria carótida interna. Algunas ramas de la arteria hipofisaria superior terminan en el infundíbulo (Stanfield, 1960).

Las hormonas producidas por las neuronas hipotalámicas se

liberan en el infundíbulo, éste presenta un sistema vascular especial -el sistema porta-hipofisario-.

La mayoría de las arterias que se dirigen a la adenohipófisis se ramifican en capilares en el tallo hipofisario. En la parte superior del tallo, forman amplias zonas de capilares conocidas como sinusoides que finalmente convergen en grandes venas. Estas venas porta hipofisarias regresan hacia la adenohipófisis, donde forman un nuevo grupo de sinusoides entre las células epiteliales. Desde estos sinusoides, la sangre es recogida por venas que abandonan la hipófisis. Es decir, la sangre de los sinusoides de la adenohipófisis ha atravesado primero la red de capilares del tallo hipofisario. De tal forma que, las sustancias, pueden ser transportadas desde el tallo hipofisario hasta el lóbulo anterior.

La circulación portal proporciona aproximadamente del 80 al 90% del aporte sanguíneo al lóbulo anterior. La adenohipófisis también recibe sangre de procedencia extraportal, procedente de las arterias hipofisarias superiores; las cuales, atraviesan el infundíbulo para transportar sangre arterial, proporcionando del 10 al 20% del aporte sanguíneo que recibe la hipófisis. Las arterias hipofisarias superiores proceden de la circulación periférica, y la sangre transportada está relativamente exenta de hormonas hipotalámicas (Thorner y cols., 1992).

Las arterias capsulares proceden de las arterias hipofisarias inferiores y proporcionan sangre a la cápsula fibrosa hipofisaria; también penetran en las capas superficiales del lóbulo anterior y abastecen de sangre

arterial a las capas de células más superficiales.

La neurohipófisis recibe su aporte sanguíneo de las arterias hipofisarias inferiores. Estas arterias no abastecen de sangre el lóbulo anterior, excepto a través de las arterias capsulares. La sangre venosa abandona la hipófisis a través de senos venosos adyacentes para entrar en las venas yugulares bilateralmente (Bergland y Page, 1979).

Los vasos portales cortos son la conexión vascular directa entre los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis.

Se ha asumido que el flujo sanguíneo fluye unidireccionalmente desde el hipotálamo a la hipófisis anterior, pero en determinadas circunstancias la dirección de este flujo puede revertir. Esta reversión, puede tener importantes implicaciones funcionales ya que si la sangre fluye a través de los vasos portales cortos desde el lóbulo anterior al lóbulo posterior y a través de los vasos portales largos, desde el lóbulo anterior a la eminencia media, las hormonas adenohipofisarias pueden llegar a afectar la actividad funcional de distintos centros neurales (sistema de regulación por retroalimentación ultracorto) (Thorner y cols., 1992).

1.2.3.- Inervación hipofisaria.

A pesar de su proximidad con el cerebro, el lóbulo anterior no presenta una inervación directa salvo por unas pocas fibras nerviosas simpáticas que alcanzan el tejido a lo largo de los vasos sanguíneos. Las fibras contienen distintos péptidos que aunque pudieran influir en la

circulación sanguínea, no parecen influir en los fenómenos de regulación de síntesis y liberación hormonal (Thorner y cols., 1992).

El lóbulo posterior presenta una rica inervación. Fibras nerviosas no mielinizadas entran en el lóbulo posterior a través del tallo hipofisario. Estas fibras se originan en el núcleo supraóptico (NSO), en el núcleo paraventricular (NPV) y en otras áreas del hipotálamo. Estas fibras no sólo afectan al lóbulo posterior por medio de las propias influencias neurales sino que además contienen vasopresina (VP) y oxitocina (OX), hormonas sintetizadas en el hipotálamo pero transportadas y almacenadas en la neurohipófisis desde donde serán liberadas a la circulación periférica. La estructura y función de la neurohipófisis depende de esta inervación; tanto es así, que cuando el tallo hipofisario es seccionado y en consecuencia, la inervación interrumpida, el lóbulo posterior se atrofia y se pierden las hormonas neurohipofisarias, manifestándose clínicamente este defecto por el desarrollo de la diabetes insípida (Thorner y cols., 1992).

1.3.- HIPOFISIS POSTERIOR o NEUROHIPOFISIS.

Los tractos nerviosos principales de la neurohipófisis proceden de un par de núcleos: NSO, localizado sobre el quiasma óptico y NPV, localizado a cada lado del ventrículo. Ninguno de los dos tractos (supraóptico-hipofisario y paraventricular-hipofisario) está mielinizado y descienden a través del infundíbulo y el tallo hipofisario para terminar en el lóbulo neural (Reeves y

Andreoli, 1992). Algunas fibras también terminan en la eminencia media, donde se relacionan con la regulación del lóbulo anterior. Sus principales secreciones son VP y OX, pero pequeñas poblaciones neuronales que terminan en el lóbulo neural contienen otros neuropéptidos incluyendo TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), VIP (péptido intestinal vasoactivo) y neurotensina. En algunas fibras se han colocalizado dos tipos de péptidos como es el caso de las fibras CRH-VP procedentes del NPV (Lechan, 1987).

1.3.1.- Secreción de la neurohipófisis.

Las sustancias biológicamente activas más importantes del lóbulo hipofisario, se clasifican por tener actividad antidiurética (VP) y actividad facilitadora de la contracción uterina (OX) (Du Vigneaud, 1969). La VP, aumenta la presión arterial, provocando vasoconstricción cuando se administra a dosis muy elevadas. Tanto la VP como la OX son nonapéptidos, es decir ambas contienen nueve aminoácidos. La mayoría de los vertebrados no mamíferos tienen solo un péptido neurohipofisario, arginina vasotocina (Acher, 1974), péptido que es probablemente el precursor filogenético de la OX y de la VP. Una única mutación en la posición 8 de la vasotocina (de Arginina a Leucina), da lugar a la formación de la OX. Una única mutación en la posición 3 (de Leucina a Fenilalanina) da lugar a la formación de la VP.

Las prohormonas para OX y VP también comparten una extensa homología, lo que sugiere que los dos péptidos se originan

a partir de un gen común.

La VP y la OX están asociadas con distintos péptidos denominados neurofisinas. Las neurofisinas forman parte de las respectivas prohormonas propresofisina y prooxifisina. Las neurofisinas se liberan simultáneamente con sus respectivos péptidos neurohipofisarios. Los factores que regulan la secreción de VP y OX también regulan la secreción de las distintas neurofisinas (Pickering y Jones, 1978).

1.4.- LOBULO INTERMEDIO.

El lóbulo intermedio de la hipófisis, deriva embriológicamente de la pared posterior de la bolsa de Rathke (la adenohipófisis deriva de la pared anterior). Este lóbulo se encuentra bien desarrollado en la mayoría de los vertebrados, incluyendo a los fetos humanos, sin embargo en el adulto es solo vestigial, estando sus células dispersas en los lóbulos anterior y neural.

Anteriormente se creía que la función del lóbulo intermedio era regulada por factores liberadores hipotalámicos; sin embargo, esta hipótesis no se pudo mantener gracias al rápido descubrimiento de la naturaleza química y origen de los péptidos del lóbulo intermedio.

Las hormonas estimuladoras de melanocitos (MSH) del lóbulo intermedio son sintetizadas como parte de una larga prohormona, denominada proopiomelanocortina (POMC), que es también el precursor de la ACTH, β -lipotropina (β -LPH), y β -endorfina en la adenohipófisis y un elevado número de péptidos relacionados con la ACTH en las neuronas

hipotalámicas (Herbert y cols., 1980; Krieger, 1983b). En el lóbulo intermedio la ACTH dará lugar a la α -MSH y a un fragmento de ACTH (aminoácidos 18 a 39) denominado como péptido del lóbulo intermedio similar a la corticotropina (Corticotropin Like Intermediate lobe Peptide, CLIP). Muchas de estas formas están acetiladas. Es importante reconocer, que el mismo gen puede ser expresado y regulado de forma diferente en distintos tejidos. Por ejemplo, la formación de POMC en el lóbulo intermedio está regulada fundamentalmente por la dopamina y por la serotonina; mientras que la forma principal de regulación de la expresión del gen de POMC en el lóbulo anterior, es por medio de glucocorticoides (Reichlin, 1992).

1.5.- EMBRIOLOGIA.

La hipófisis tiene dos orígenes según la región de la glándula que consideremos (Asa y Kovacs, 1984). La porción epitelial, que incluye la *pars distalis*, el lóbulo intermedio y la *pars tuberalis*, se origina a partir de una evaginación del ectodermo bucal, la bolsa de Rathke. La porción neural que incluye el infundíbulo, el tallo neural y el lóbulo posterior, procede del saco infundibular, una parte del diencéfalo. La bolsa de Rathke, se compone inicialmente de una pequeña vasícula que aparece en el techo de la primitiva cavidad bucal, denominada estomodeo, y posteriormente se expande en dirección al *saco infundibularis* adhiriéndose a él. Después de la unión de las dos partes, la terminación más distal se estrecha y forma el canal craneofaríngeo. Las células del extremo

distal de la bolsa de Rathke gradualmente desaparecen, mientras que aquellas que se encuentran en el extremo proximal comienzan a proliferar (Thorner y cols., 1992). La proliferación celular comienza en el sitio de unión de los dos primordios, el ectodermo y el tubo neural; la acumulación celular es mucho más rápida y extensa en la pared anterior que en la pared posterior. La pared anterior da lugar a la *pars distalis* de la adenohipófisis y la pared posterior se desarrolla dando lugar al lóbulo intermedio. La porción anterolateral de la bolsa de Rathke se extiende hacia arriba de forma bilateral, se fusiona en frente del infundíbulo y forma la *pars tuberalis*. Posteriormente el infundíbulo se alarga y la hipófisis se embebe cada vez más profundamente en la silla turca formada por el hueso esfenoides. La neurohipófisis se diferencia en la eminencia media y el lóbulo posterior distal que se conectan con la eminencia media por el tallo hipofisario (Thorner y cols., 1992).

2.- EL HIPOTALAMO.

En la pared del tercer ventrículo, por debajo del surco hipotalámico, se identifican pequeños núcleos inmersos en una masa difusa de neuronas. Todo ello constituye el hipotálamo. De manera general, podemos distinguir una área medial del hipotálamo, que contiene distintos núcleos bien diferenciados y un núcleo o área hipotalámica lateral que presenta una estructura difusa. Esta última estructura está atravesada por un conjunto de fibras que de forma colectiva constituyen el fascículo telencefálico medial, aunque éste

no es un único tracto ni anatómica ni funcionalmente hablando y no tiene fronteras claramente definidas (Brodal, 1992).

Con respecto al área medial del hipotálamo, se divide funcionalmente en tres zonas: la rostral o supraóptica, la medial o tuberal y la caudal o mamilar. Los NSO y NPV constituyen los componentes esenciales del hipotálamo rostral y sus axones se proyectan fundamentalmente hacia la neurohipófisis, formando el tracto hipotálamo-hipofisario. El NPV se encuentra situado cercano a la pared del tercer ventrículo. El NSO se sitúa justo sobre el quiasma óptico (Brodal, 1992).

Los núcleos ventromedial, dorsomedial y arcuato constituyen los principales componentes de la zona medial y sus neuronas proyectan fundamentalmente hacia los capilares situados en la eminencia media. El núcleo arcuato se encuentra situado en la base del tercer ventrículo, por debajo del núcleo ventromedial. En la zona caudal encontramos los núcleos mamilares (formados por varios subnúcleos) situados en el suelo del ventrículo (Brodal, 1992).

En general existe un alto grado de cooperación entre los núcleos hipotalámicos mediado por fibras cortas intrahipotalámicas.

Gracias a métodos inmunocitoquímicos y bioquímicos se ha podido demostrar la presencia de neurotransmisores como por ejemplo acetilcolina (AcCh), noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), histamina y distintos neuropéptidos. La NA es el neurotransmisor que se ha

localizado en mayor concentración. Algunos de estos neurotransmisores están relacionados con el control de la hipófisis. Además de receptores para los neurotransmisores endógenos, muchas células hipotalámicas también contienen receptores para varias hormonas, como las hormonas sexuales esteroideas, hormonas tiroideas y para las hormonas relacionadas con la hipófisis anterior (Tresguerres, 1992c).

2.1.- LAS HORMONAS INFLUYEN SOBRE LAS NEURONAS HIPOTALÁMICAS.

Las células hipotalámicas contienen receptores para distintas hormonas, tales como las hormonas esteroides, hormonas tiroideas, y para hormonas liberadas por la adenohipófisis. Las hormonas sexuales y las hormonas tiroideas atraviesan la barrera hematoencefálica con mucha facilidad. Las hormonas sexuales esteroideas, se unen a receptores intracelulares, y además influyen en la actividad de las células hipotalámicas. Algunas hormonas no atraviesan la barrera hematoencefálica con facilidad, pero pueden actuar sobre el hipotálamo y sobre otras zonas del cerebro, debido a que existen áreas cerebrales cercanas a los ventrículos que carecen de barrera (Reichlin, 1992).

2.2.- ASPECTOS FUNCIONALES: EL HIPOTALAMO Y EL SISTEMA ENDOCRINO.

Enfermedades o lesiones que afecten al hipotálamo pueden alterar funciones controladas por el sistema endocrino como por ejemplo funciones sexuales, crecimiento y metabolismo.

De los órganos endocrinos, sólo la médula adrenal recibe una inervación autonómica importante. Los efectos del hipotálamo sobre los órganos endocrinos, son debidos a que el hipotálamo controla el órgano endocrino superior: la hipófisis. Este control afecta tanto a la porción anterior como a la posterior de la hipófisis. Existen dos vías diferentes de interacción hipotálamo-hipofisario. La hipófisis posterior estaría directamente relacionada con el llamado tracto supraóptico hipofisario, mientras que la hipófisis anterior se relacionaría con el tracto denominado tuberoinfundibular y por un sistema vascular portal especializado (Brodal, 1992).

2.3.- INFLUENCIA DEL HIPOTALAMO SOBRE LA HIPOFISIS ANTERIOR.

Numerosos axones del hipotálamo terminan en la parte más superior del tallo hipofisario, concretamente en la eminencia media. Inicialmente se creía que las fibras procedían sólo de la región tuberal del hipotálamo y especialmente del núcleo arcuato, como su nombre, tracto tuberoinfundibular, indica.

Las fibras del tracto tuberoinfundibular contactan con los capilares en la eminencia media. Estas fibras transportan péptidos desde los cuerpos celulares de las células que los sintetizan y los liberan en el sistema porta hipofisario. Desde los capilares que se encuentran en la eminencia media, los péptidos son transportados por la sangre a la segunda red de capilares que se encuentra entre las células epiteliales de la adenohipófisis. La mayoría de los

péptidos transportados por el sistema porta causan la secreción de hormonas por parte de las células epiteliales, recibiendo por tanto, la denominación de factores liberadores de hormonas. Un factor liberador actúa sobre una única clase de célula epitelial y produce la secreción de sólo una hormona. Algunos péptidos transportados en el tracto tuberoinfundibular tienen un efecto inhibitor sobre la secreción de hormonas por la adenohipófisis y se denominan factores inhibidores (Brown, 1994).

Algunos de los péptidos implicados en el control hipofisario se encuentran también en neuronas en otras partes del cerebro donde se liberan en sinapsis convencionales, como por ejemplo, somatostatina (SS) (inhibidor de GH), TRH y corticotropin-releasing hormone (CRH).

2.4.- CELULAS NEUROSECRETORAS HIPOTALAMICAS.

Las células neurosecretoras son fibras nerviosas modificadas, que en lugar de secretar un neurotransmisor, secretan una hormona a la circulación para facilitar la comunicación neuroendocrina. Hay dos grupos de células neurosecretoras hipotalámicas: El sistema magnocelular y el sistema parvicelular (Hayward, 1977).

*** Sistema Magnocelular.**

Las grandes células neurosecretoras están localizadas en el NPV y en NSO. Estos núcleos se encargarán de la síntesis de OX y de VP. (Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983).

*** Sistema Parvicelular.**

Formado por pequeñas células neurosecretoras localizadas en el área preóptica, núcleo ventromedial (NVM), y núcleo arcuato y que proyectan en la eminencia media. Estas células terminan en la eminencia media, liberando sus hormonas hipotalámicas en el plexo primario, desde el cual entran al sistema porta-hipofisario. Estas hormonas modulan la liberación de hormonas adenohipofisarias y se las conoce con el nombre de hormonas hipofisiotrópicas.

En una célula neurosecretora, las neurohormonas se sintetizan como prohormonas y se empaquetan en gránulos neurosecretores en el cuerpo celular. Estos gránulos se transportan por el axón y se almacenan en el terminal nervioso. Cuando la célula es estimulada, el potencial de acción despolariza el terminal nervioso y libera la neurohormona a la circulación, al líquido cefalorraquídeo o a una sinapsis (Brownstein, Russell y Gainer, 1980; Bennett y Whitehead, 1983). La liberación de neurohormonas hipotalámicas es estimulada por neurotransmisores liberados por otras células nerviosas y regulados por procesos de retroalimentación por hormonas, neuropéptidos y otros mensajeros químicos.

2.5.- EMINENCIA MEDIA Y NEURONAS TUBEROINFUNDIBULARES Y TUBEROHIPOFISARIAS.

2.5.1.- Anatomía.

La eminencia media del hipotálamo es el lugar en el cual, las neuronas hipotalámicas que regulan la hipófisis anterior liberan sus secreciones al plexo primario del

5301691015

sistema porta hipofisario. Esta región es también el lugar a través del cual pasan las neuronas que terminan en el lóbulo neural y en el lóbulo intermedio de la hipófisis. En esta estructura, se pueden identificar tres componentes: 1) Componente neural, que consiste en terminales nerviosos y neuronas *en passant*. 2) Componente vascular, que consiste en el plexo capilar primario y venas portales y 3) Componente epitelial, que consiste en la *pars tuberalis* de la hipófisis anterior (Gay, 1972).

Dos clases de neuronas tuberohipofisarias proyectan a la eminencia media. La mayoría son peptidérgicas como TRH, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y SS; otras contienen catecolaminas, fundamentalmente dopamina (Reichlin, 1992).

Aunque la mayoría de los axones de los tractos supraóptico y paraventricular, pasan a través de la eminencia media en su camino desde donde se encuentran sus células de origen, en el hipotálamo, hasta donde terminan, en el lóbulo neural, existe una población de neuronas paraventriculares que proyectan en la eminencia media. Las neuronas que se encuentran en esta localización realizan papeles de control de la secreción de hormonas de la hipófisis anterior, especialmente , controlan la secreción de ACTH y de prolactina (Prl).

El hipotálamo estará expuesto a elevadas concentraciones de hormonas secretadas por los lóbulos anterior y posterior hipofisarios. Sin embargo, el flujo reverso desde la hipófisis al hipotálamo no resulta significativo (Brodal, 1992).

El tercer componente de la eminencia media, la *pars tuberalis*, es una lámina glandular muy fina que se encuentra rodeando el infundíbulo y el tallo hipofisario. A la *pars tuberalis* no se le confiere un papel eminentemente fisiológico sino que serviría fundamentalmente como una estructura a través de la cual se disponen las arterias y venas de la circulación porta hipofisaria.

2.6.- CONCEPTO DE TRANSDUCTOR NEUROENDOCRINO.

Debido a que las células neurosecretoras hipotalámicas son estimuladas por neurotransmisores como DA, NA y 5-HT para liberar sus hormonas, y son capaces de transformar la información neural en una respuesta hormonal, se ha denominado genericamente a estas células, transductores neuroendocrinos (Wurtman y Anton-Tay, 1969). El especial mecanismo de actuación de las células neurosecretoras, permite al sistema endocrino recibir información tanto del sistema nervioso central como de estímulos internos y externos.

Un transmisor neuroendocrino es, en definitiva, una célula nerviosa modificada que recibe la información por medio de un neurotransmisor y que responde liberando una hormona (Brown, 1994). En el organismo existen cuatro tipos de neurotransmisores neuroendocrinos diferentes: a) las células neurosecretoras magnocelulares del NSO y del NPV que sintetizan y liberan OX y VP; b) las células neurosecretoras hipotalámicas parvicelulares, que secretan hormonas hipofisiotrópicas en el plexo primario de la eminencia media; c) la médula adrenal, que estimulada por

fibras simpáticas secreta adrenalina y noradrenalina a la sangre; y d) La glándula pineal, que estimulada por fibras adrenérgicas libera melatonina a la sangre.

2.7.- HORMONAS HIPOFISIOTROPICAS HIPOTALAMICAS.

Existen nueve hormonas hipofisiótropicas hipofisarias que están encargadas de la regulación de la liberación de hormonas adenohipofisarias. Tres hormonas adenohipofisarias (Prl, hormona del crecimiento (GH) y MSH) están controladas por dos hormonas hipotalámicas, una estimuladora (liberadora) y otra inhibidora de esa liberación. Las otras cuatro (hormona estimuladora del tiroides (TSH), ACTH, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) están reguladas sólo por hormonas liberadoras hipotalámicas.

La estructura química de TRH, CRH, GnRH, GHRH y SS ha sido ya identificada (Martin y Reichlin, 1987), mientras que las hormonas hipotalámicas que regularían a la MSH (MSH-RF y MSH-RIF) y Prl (PRF y PIF) no han sido identificadas, aunque todas las evidencias indican que el PIF sería la dopamina (DA).

Además de regular la liberación hormonal, los factores hipofisiotrópicos, regulan la diferenciación, proliferación y síntesis de hormonas de las células hipofisarias (Reichlin, 1992).

La idea original que sugería que debía existir un único factor estimulador por cada hormona liberada en la hipófisis anterior, actualmente ha perdido vigencia. Existen factores hipotalámicos que ejercen una acción

inhibidora sobre la función de la hipófisis anterior. Estos factores inhibidores interactúan con los factores activadores respectivos para ejercer un control dual sobre determinadas hormonas, entre las que se encuentran Prl, GH y TSH. Además las acciones de las hormonas hipofisiotrópicas no se limitan estrictamente a una única hormona hipofisaria. Por ejemplo, la TRH es un potente liberador de Prl y de TSH siendo capaz en determinadas circunstancias de liberar ACTH y GH. LHRH libera tanto LH como FSH. La SS inhibe la secreción de GH, TSH y una amplia variedad de otras hormonas no hipofisarias. El principal inhibidor de la secreción de Prl, DA, también inhibe la liberación de TSH, gonadotropinas, y en determinadas circunstancias, inhibe también la liberación de GH (Reichlin, 1992).

De forma sinérgica, la secreción de ACTH está regulada por CRH, VP y adrenalina (A) (procedente de la circulación general). Las acciones de GHRH y de CRH son relativamente específicas, aunque GHRH tiene un ligero efecto como liberador de Prl (Reichlin, 1992).

La secreción de las hormonas liberadoras está regulada por neurotransmisores locales y neuropéptidos que interactúan con los efectos producidos a su vez por distintas hormonas circulantes tales como los glucocorticoides, los esteroides gonadales y las hormonas tiroideas. Existen también fenómenos de retroalimentación producidos por las hormonas de la hipófisis anterior (control por retroalimentación corto) y por los propios factores hipofisiotrópicos (control por retroalimentación ultracorto) (Tresguerres,

1992).

3.- NEUROENDOCRINOLOGIA: IMPORTANCIA DE LA HIPOFISIS EN LA ORGANIZACION HORMONAL DE TODOS LOS SISTEMAS.

El sistema nervioso y endocrino regulan casi todas las actividades metabólicas y homeostásicas del organismo, determinando la buena marcha del desarrollo y del crecimiento, influyendo en muchas formas de comportamiento y controlando la reproducción. Los dos sistemas reguladores interaccionan. La mayor parte de las secreciones endocrinas están influidas directa o indirectamente por el cerebro, y por otro lado, todas las hormonas a su vez, pueden influir en la actividad cerebral (Brodal, 1992). Las células nerviosas y las células endocrinas tienen ciertas características en común. Las células nerviosas tienen una importante función secretora, así como una gran capacidad para propagar los potenciales de acción. Por su lado, las células endocrinas tienen potenciales eléctricos y también capacidad secretora (Reichlin, 1992). Las neuronas y las células endocrinas, activan sus células diana a través de los mediadores químicos que interaccionan con receptores celulares específicos. Hay distintos tipos de péptidos y neurotransmisores que son sintetizados por células nerviosas idénticos a aquellos secretados por las glándulas endocrinas, y que parecen tener su origen evolutivo como factores reguladores celulares de organismos unicelulares primitivos (Reichlin, 1992).

En general, la especificidad de la acción de las hormonas circulantes está comprometida por la presencia de

receptores sobre tejidos diana, mientras que la especificidad neuronal procede de la distribución de receptores y de las distintas conexiones anatómicas.

El sistema inmune se reconoce actualmente como el tercer sistema integrador que interacciona tanto con el sistema endocrino como con el sistema nervioso. Los factores endocrinos y nerviosos pueden influir en distintos elementos implicados en la respuesta inmune y a su vez, factores de la respuesta inmune (liberación de citoquinas por los linfocitos activados) modulan tanto las funciones endocrinas como las neurales (Reichlin, 1992).

Desde una perspectiva neuroendocrina, la población linfocítica es un sistema de reconocimiento de proteínas extrañas, que responde a la invasión antigénica mediante la secreción de factores hormonales especializados (Blalock 1989).

3.1.- CONTROL NEURAL DE LA SECRECCION GLANDULAR.

Las células secretoras se han clasificado clásicamente en dos tipos: 1) células exocrinas, que liberan sus productos al exterior del organismo o a una luz que comunica con el exterior; y 2) células endocrinas que secretan sus productos en la circulación sanguínea. El descubrimiento de la neurosecreción añade una tercera categoría de células secretoras: las células neurohormonales, que son células nerviosas que liberan sus productos en la circulación sanguínea. Las glándulas endocrinas y exocrinas, con contadas excepciones, son reguladas directa o indirectamente por impulsos neurales: Las células exocrinas

por las fibras secretomotoras; las glándulas diana de hormonas hipofisarias por las fibras neurosecretoras hipotalámicas y las células neurosecretoras lo son por los neurotransmisores (Reichlin, 1992).

3.2.- ENTRADA DE INFORMACION NEURAL EN EL HIPOTALAMO ENDOCRINO.

Uno de los principales problemas que surgen al estudiar los distintos neurotransmisores que regulan la liberación de hormonas hipotalámicas o hipofisarias es que los mismos neurotransmisores pueden estar implicados en diferentes vías de secreción hormonal (Brodal, 1992).

3.3.- MECANISMOS A TRAVES DE LOS CUALES LOS NEUROTRANSMISORES PUEDEN REGULAR A LAS HORMONAS HIPOTALAMICAS E HIPOFISARIAS.

Existen cuatro mecanismos a través de los cuales, los neurotransmisores pueden regular la liberación de hormonas desde el hipotálamo y la hipófisis.

- El neurotransmisor se libera en una sinapsis de una vía neural determinada, llevando información procedente de receptores sensitivos, de otras regiones cerebrales, tales como el sistema límbico o la médula espinal hasta la célula neurosecretora (estimulación indirecta).

- El neurotransmisor puede ser liberado por una neurona extrahipotalámica, formando una sinapsis axo-dendrítica o axo-somática con la célula neurosecretora (estimulación directa).

- El neurotransmisor se liberaría formando sinapsis axo-

axónicas con la célula neurosecretora.

- Los neurotransmisores pueden ser liberados en el sistema porta-hipofisario actuando así directamente sobre la hipófisis (Brodal, 1992).

3.4.- CONTROL SECRETOMOTOR.

El control secretomotor está mediado a través de los nervios que terminan directamente sobre las células secretoras en sinapsis definidas que se asemejan bastante a los terminales nerviosos sobre los músculos (Schultzberg y cols. 1980, 1982; Hökfelt y cols. 1980a y 1980b). Ejemplos de control secretomotor son, por ejemplo, la regulación del flujo de la saliva, lágrimas, sudor, grasa y jugos gástricos; la secreción de adrenalina y melatonina; y el control de la función de las células yuxtaglomerulares y de los islotes pancreáticos. Las fibras nerviosas secretomotoras son parte del sistema nervioso simpático y parasimpático e incluso pueden ser controladas directamente por las vías del sistema nervioso central. Los efectos secretomotores a menudo interaccionan con las influencias hormonales.

Un ejemplo excelente para mostrar esas relaciones sinérgicas de los neurotransmisores es el control neural parasimpático al que está sometido la glándula parótida, el cual está mediado por la acetilcolina (AcCh) y por el VIP (Lundberg y cols., 1980; McMillan y Talamo, 1989). La estimulación del nervio (la corda timpani) que estimula la parótida conduce a la liberación de ambos factores. Cuando se administra sola, la AcCh estimula la secreción de saliva

rica en enzimas; el VIP por sí mismo tiene muy poco efecto sobre la producción de saliva, pero estimula el flujo sanguíneo parotídeo. Cuando se administran juntos, VIP y AcCh conducen a un aumento en la secreción salival mucho mayor que aquella producida por la acetilcolina sola (Lundberg y cols., 1980).

4.- NEUROSECRECION.

El término neurosecreción, se refiere a la liberación de una hormona por un terminal nervioso en el torrente circulatorio (Bern y Knowles, 1966). Un ejemplo de una glándula típicamente neurosecretora en los mamíferos es la neurohipófisis. Las neurosecreciones VP y OX formadas en los cuerpos celulares localizados en el hipotálamo y transportadas al lóbulo neural por el flujo axoplasmático son liberadas en la sangre como verdaderas hormonas, regulando la función de órganos que se encuentran en posiciones alejadas. Las neurosecreciones de este tipo se denominan neurohormonas, aunque actualmente dentro del concepto de neurosecreción se acepta la liberación de cualquier producto neuronal secretado por una terminación nerviosa. La secreción puede ser tanto de un neurotransmisor como de un neuromodulador (Guillemin, 1978). Los neurotransmisores se liberan en la hendidura sináptica y estimulan o inhiben neuronas postsinápticas con latencia corta.

Ya que la comunicación dentro del sistema nervioso se realiza casi exclusivamente a través de mensajeros químicos, la neurosecreción es una propiedad fundamental de

todas las neuronas.

La ruta final tomada por el producto secretor de un axón y su sitio de acción depende de sus relaciones anatómicas con otras estructuras. Las células neurosecretoras independientemente de cual sea su localización, retienen propiedades funcionales y estructurales de neuronas.

El término transductor neuroendocrino ha sido aplicado a las células nerviosas de este tipo (Wurtman y Anton-Tay, 1969), ya que son capaces de transformar la actividad neural en una liberación hormonal. Las neuronas que afectan a la función glandular están gobernadas por otras neuronas y por sus diferentes ambientes metabólicos y hormonales. Los receptores neuronales especializados que reaccionan a los cambios que se producen tanto en su medio intracelular como en el extracelular son capaces de modelar incluso la función endocrina.

5.- REGULACION DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS INDIVIDUALES.

5.1.- CONSIDERACIONES GENERALES: CONCEPTO DE RETROALIMENTACION EN NEUROENDOCRINOLOGIA.

La mayoría de los sistemas hormonales forman parte de un proceso cíclico de retroalimentación, en el cual la variable a controlar (generalmente, los niveles de hormona plasmática o alguno de los efectos que ejerce esa hormona) determina la tasa de secreción hormonal. Estos sistemas suelen ser sistemas de control por retroalimentación negativa, aunque también existen sistemas de control por retroalimentación positiva (Houk, 1988).

5.2.- RITMOS ENDOCRINOS.

Todas las funciones de los seres vivos, independientemente de su posición en la escala evolutiva, están sujetas a cambios cíclicos periódicos, muchos de los cuales están directamente bajo la influencia del sistema nervioso (Moore, 1978), otros pueden estar coordinados por señales externas tales como los cambios de luz/oscuridad, cambios estacionales, etc.

La mayoría de estos ciclos está, regulado por el cerebro. La estructura neural responsable de los ciclos circadianos, es el núcleo supraquiasmático (NSQ) (Moore, 1983), una estructura par localizada en el hipotálamo anterior justo por encima del quiasma óptico. Este núcleo está organizado para permitir interacciones neurona-neurona a través de contactos sinápticos directos. Este núcleo posee ritmicidad intrínseca, incluso *in vitro* y recibe información neuronal de distintas partes del cerebro, así como una proyección directa no visual, procedente de la retina (Moore, 1983). Los ritmos circadianos están regulados por neuropéptidos. El NSQ también responde a las secreciones de la glándula pineal ya que presenta una elevada concentración de receptores de melatonina.

5.3.- REGULACION DE LA SECRECION DE HORMONAS HIPOFISARIAS.

Las hormonas hipotalámicas se unen a receptores de membrana de alta afinidad que se encuentran en los tipos celulares hipofisarios específicos y que regulan la secreción de la hormona por esa célula. Con la posible excepción de la Prl, todas las hormonas de la hipófisis anterior se encuentran

sometidas a un control por retroalimentación por las hormonas secretadas por las glándulas diana sobre las que las hormonas hipofisarias actúan (Piva y cols., 1979). Incluso, existe un sistema de integración de señales procedentes del cerebro y de la periferia que regulan la secreción de hormonas hipofisarias para mantener un estado endocrino normal. Si una glándula diana falla, existe una disminución en el proceso de retroalimentación negativo que conduce al aumento de la secreción de la hormona hipotalámica trófica (también se produciría una reducción en la secreción tónica de la correspondiente hormona inhibidora hipotalámica). El resultado final de todo esto es una estimulación de la respuesta hipofisaria a los estímulos tróficos hipotalámicos. Estos procesos de retroalimentación negativos se producen tanto a nivel hipofisario como a nivel hipotalámico (Piva y cols., 1979). Además, como las hormonas hipofisarias son transportadas hacia el hipotálamo, en los denominados procesos de retroalimentación ultracortos, se inhibirá la secreción de la hormona hipotalámica cuando se incrementa la secreción hipofisaria.

Todas las hormonas de la hipófisis anterior se secretan de forma pulsátil. Este patrón típico de liberación de las hormonas hipofisarias es importante para el estímulo eficaz y efectivo de los tejidos diana, de tal forma, que los efectos de las señales endocrinas generadas de forma intermitente se prolongan, a pesar de que se esté produciendo un aclaramiento metabólico de la hormona (Thorner y cols., 1992).

Se ha estimado que el 95% de la secreción de LH se produce aproximadamente en el 27% del día, aunque se puedan detectar fácilmente concentraciones de LH en suero a lo largo de todo el día. Esto es debido a que el aclaramiento metabólico de esta hormona es muy lento (Veldhuis y cols., 1987). En contraste, aunque el 95% de la secreción de GH sucede durante un 37% del día, las concentraciones de GH del suero, son más difíciles de detectar utilizando ensayos convencionales ya que el aclaramiento metabólico de la GH plasmática es muy rápido (Hartman y cols., 1991).

5.4.- SECRECIÓN DE ACTH.

5.4.1.- Estructura de la ACTH, péptidos relacionados, y del gen de la proopiomelanocortina.

La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos que se sintetiza como parte de una molécula precursora mucho más larga de 241 aminoácidos que se denomina proopiomelanocortina (POMC). Esta prohormona sufre un procesamiento post-transcripcional que incluye glicosilación, ruptura enzimática, fosforilación, acetilación de extremos NH₂ terminales y amidación del extremo COOH terminal de determinados péptidos obtenidos a partir de la ruptura enzimática. Este procesamiento es específico de especies y de tejidos. En la adenohipófisis humana este péptido sufre una ruptura enzimática de la que se obtiene β-lipotropina (β-LPH), ACTH, un péptido denominado de unión, y un péptido del extremo NH₂ terminal (Thorner y cols., 1992). En el humano, el lóbulo intermedio es vestigial excepto durante la vida fetal y el final de la gestación. En el lóbulo

intermedio de humanos, la ACTH se rompe en forma de α -hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH) y un péptido similar a la ACTH (ACTH-like peptide), mientras que la β -LPH dará lugar a LPH y β -endorfina (Thorner y cols., 1992). Los primeros 18 aminoácidos de ACTH tienen una actividad biológica completa, y los primeros 24 aminoácidos son idénticos en todas las especies. La ACTH sintética (1-24) tiene una vida media mayor que la ACTH nativa (1-18) y se utiliza en evaluaciones clínicas.

Ya que los péptidos producidos por las células corticotropas derivan de la misma molécula precursora, se secretan en cantidades equimoleculares. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de éstos no varían en tándem puesto que tanto las vidas medias como los aclaramientos metabólicos de estos péptidos son diferentes (Lundbland y Roberts, 1988).

5.4.2.- Células corticotropas y contenido en ACTH.

La célula corticotropa típica es una célula de tamaño medio, ovoide o angular, basófila, PAS positiva y que presenta inmunoreactividad para la ACTH y otros péptidos derivados de la POMC, tales como endorfinas, β -lipotropina y fragmento NH_2 terminal.

5.4.3.- Secreción de ACTH.

La ACTH se secreta de forma pulsátil causando picos similares en las concentraciones de cortisol plasmático. Los pulsos secretores de ACTH (en el hombre) son más frecuentes después de 3 ó 5 horas de sueño, y son máximos

en las últimas horas antes de despertar y la hora siguiente. La secreción de ACTH está también sometida a un control circadiano regulado por distintos factores, siendo el ciclo luz/oscuridad, el que tiene mayor importancia. Los ciegos presentan un ritmo de ACTH de alrededor de 25 h (Orth y cols., 1979). En sujetos normales las concentraciones de ACTH disminuyen por la mañana y alcanzan un pico nocturno antes de despertar. El ritmo se establece después del primer año de vida. Este ritmo no se ve afectado por una privación a corto plazo de los períodos de sueño, por alimentación continua, por una estancia en cama prolongada o por los turnos de trabajo nocturnos, si se mantiene un patrón de sueño normal los fines de semana. El ritmo se rompe por los viajes transmeridianos realizados en avión (jet lag) y tarda algunos días en recuperarse el ritmo normal (Desir y cols., 1981).

El estrés, tanto psicológico como físico activan el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal con aumento tanto en la secreción de ACTH como en la de cortisol.

Los glucocorticoides actúan en multitud de sitios de las células corticotropas para inhibir la secreción de ACTH, inhibiendo la respuesta de ACTH a CRH e inhibiendo la síntesis de ACTH vía bloqueo de la transcripción y síntesis del gen de la POMC. En el hipotálamo, los glucocorticoides inhiben la síntesis y liberación de CRH y de VP (Thorner y cols., 1992).

5.4.4. Acciones de la ACTH.

Se han descrito receptores para ACTH en células de la zona

reticular y fascicular de las adrenales. Las acciones de la ACTH sobre la adrenal están mediadas a través de receptores de membrana de alta afinidad.

Las acciones de la ACTH están mediadas por la adenilato ciclasa, que conducirá a la acumulación de AMPc intracelular y que aumentará la actividad de la proteína kinasa A y la fosforilación de numerosas proteínas. La ACTH estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol fundamentalmente) aunque también participa en el control de la secreción de mineralocorticoides. Las acciones de la ACTH son de dos tipos, agudas y prolongadas (Simpson y Waterman, 1988). Los efectos agudos, que tienen lugar en el transcurso de minutos, lleva consigo la estimulación del paso inicial (paso limitante) de la conversión de colesterol a pregnenolona. Los efectos prolongados de ACTH, promueven el mantenimiento del tamaño de la adrenal, aumentando la síntesis proteica e incluyendo la síntesis de enzimas implicadas en la biosíntesis de hormonas esteroides.

5.4.5.- Regulación de la secreción de ACTH.

La CRH estimula la secreción de ACTH ya que se une a receptores de alta afinidad existentes en las células corticotropas. Estos receptores están asociados a adenilato ciclasa, la cual se activará produciendo un aumento de la síntesis de AMPc; este aumento de la concentración de AMPc activará a la proteína kinasa A, que desencadenará la cadena de procesos asociados que determinarán la liberación de ACTH por las células corticotropas. La CRH además de

aumentar la liberación de ACTH y de sus péptidos asociados activa el proceso de transcripción y síntesis del gen de la POMC (Thorner y cols., 1992). La administración exógena de CRH estimula la secreción de ACTH y de cortisol. La magnitud de la respuesta es dependiente del momento del día y del nivel de glucocorticoides circulantes. La respuesta del cortisol es mayor por la tarde que por la mañana (Decherney y cols., 1985). Los glucocorticoides exógenos inhiben la respuesta de la ACTH a CRH. La VP por sí misma facilita debilmente la secreción de ACTH, sin embargo, si actúa de forma sinérgica con CRH es capaz de intervenir en la regulación de ACTH. Muchos otros péptidos y neurotransmisores están implicados en el control de la secreción de CRH, VP y de ACTH, sin embargo, sólo la presencia de CRH es esencial en este proceso de control (Thorner y cols., 1992).

5.4.6.- Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la corticotropina.

Las neuronas secretoras de CRH se han identificado mediante técnicas de inmunohistoquímica. Estas neuronas se encuentran en el NPV y proyectan en la eminencia media (Brown, 1994).

5.5.- SECRECIÓN DE LHRH.

La liberación de gonadotropinas por las células gonadotropas de la adenohipófisis está regulada por LHRH. Esta LHRH también funciona como neuromodulador en el cerebro (Krieger, 1983a, 1986). Existe gran controversia

sobre si es una única GnRH la que estimula tanto la LH como la FSH o si existen dos hormonas liberadoras distintas, permaneciendo, una de ellas, todavía sin identificar. Algunos investigadores creen que existen dos hormonas liberadoras de gonadotropinas diferentes, LH-RH y FSH-RH, mientras que otros aceptan la existencia de una única GnRH que sería la LHRH (Brown, 1994).

5.5.1.- Secreción de LHRH.

En roedores, la LHRH se sintetiza en áreas preópticas del hipotálamo anterior (APO-HA) (Merchenthaler y cols, 1989), mientras que en primates, los cuerpos celulares están localizados en el hipotálamo medio basal (HMB) (Knobil, 1980). Estas células neurosecretoras regulan la secreción tónica o basal de LHRH y de FSH y están moduladas mediante un proceso de retroalimentación por los esteroides gonadales. En la rata hembra, las células secretoras de LHRH del APO-HA son las responsables de la aparición del pico de LH preovulatorio en respuesta al feed-back positivo procedente de los estrógenos ováricos (Sharp y Fraser, 1978; Zaborszky, 1982). En los primates, la retroalimentación positiva ejercida por los estrógenos actúa sobre las células neurosecretoras de LHRH situadas en el HMB permitiendo la estimulación del pico ovulatorio de LH (Müller y Nistico, 1989). En los roedores (machos) y en primates, la LHRH se libera en pulsos tónicos, aunque no existen picos de LH en machos debido a la falta de una retroalimentación positiva ejercida por los estrógenos. La naturaleza pulsátil de la liberación de GnRH es esencial

para el mantenimiento de la secreción de LH. Dosis elevadas de LHRH mantenidas de forma continua, tienen de forma paradójica, efectos opuestos a la administración de GnRH de forma pulsátil, inhiben la liberación de LH e inhiben las funciones gonadales (Knobil, 1980; Crowley y cols, 1985). Además, agonistas sintéticos de GnRH pueden ser utilizadas como drogas anticonceptivas (Brodie y Crowley, 1984).

La LHRH es esencial para la secreción de gonadotropinas y la duración de los pulsos de LHRH, es crucial en la regulación de la secreción de LH y de FSH.

La vida media de la LHRH es bastante corta (entre 2 y 4 min). El hecho de que la LH y la FSH se secreten de forma pulsátil nos permite asumir que la secreción de LHRH también lo sea. Este hecho ha sido comprobado con la realización de distintos experimentos, entre ellos estudios realizados midiendo sangre portal hipotálamo-hipofisaria, de monos y ovejas donde se descubrió que la LHRH se secretaba de forma pulsátil a intervalos de 70-90 min. (Carmel y cols., 1976). En condiciones normales, tanto la LH como la FSH presentan una secreción pulsátil en la mujer. Dicha pulsatilidad comienza inicialmente sólo por la noche al aproximarse la pubertad, y una vez pasada ésta se mantiene a lo largo de 24h, con picos cada hora y media o dos horas durante la fase folicular y cada tres o cuatro horas durante la etapa luteínica, en dependencia directa de la secreción de un decapeptido hipotalámico, la LHRH (Leyendecker y cols., 1980; Tresguerres, 1989).

Los estudios *in vitro* han confirmado que la administración de LHRH de forma pulsátil aumenta la transcripción de las

subunidades α y β de la LH (Shupnik, 1990). La transcripción de los genes de las distintas subunidades se ha realizado utilizando fragmentos de hipófisis anterior de rata a los que se ha sometido a perfusiones con LHRH de forma continua o pulsátil cada 30 ó 60 minutos durante 1 ó 6 horas. Durante la exposición continua a LHRH sólo la síntesis del mRNA de la subunidad α era estimulada. Durante la administración pulsátil de LHRH, la transcripción de la subunidad β de la LH aumenta.

La regulación de la secreción de FSH y LH no se realiza de la forma tradicional, es decir, más hormona, más acción, sino modificando la frecuencia de los pulsos. De esta forma la LHRH consigue, no sólo, aumentar o disminuir los niveles de ambas gonadotropinas, sino que podría controlar por separado a LH y a FSH (Tresguerres, 1989).

5.5.2.- Mecanismo de acción de la LHRH.

Los pasos iniciales llevan consigo, la liberación y posterior unión de la LHRH a los receptores de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de estas células. El mecanismo de actuación de la LHRH parece ser AMPc independiente pero necesita sin embargo, la activación de Proteína Kinasa C y la presencia de Calcio (Conn, 1986).

La LHRH regula:

- 1.- Síntesis y almacenamiento de gonadotropinas.
- 2.- Activación y movilización de gonadotropinas de reserva a un pool preparado para ser secretado.
- 3.- Liberación inmediata de gonadotropinas.

La secreción fisiológicamente pulsátil de LHRH a nivel

hipotalámico es capaz de desencadenar, en las células gonadotropas de la hipófisis, la liberación de LH y de FSH (Brown, 1994).

5.5.3.- Regulación de la secreción de LHRH.

La liberación de LHRH se regula por la presencia de distintos neurotransmisores y neuropéptidos, muchos de los cuales, interactúan entre ellos y con los esteroides gonadales para modular la liberación de LHRH (Weiner, Findell y Kordon, 1988). Este mecanismo de control múltiple, permite que una amplia variedad de estímulos internos y externos influyan en el control neural de la liberación de LHRH. Por ejemplo, esta liberación está modulada por: a) Neuronas que proyectan sobre el NSQ del hipotálamo, que regula los ritmos circadianos (Brown, 1994); b) Neuronas procedentes del NPV que procesan la entrada de la información aferente visceral y que pueden activar cambios en la liberación de esta GnRH inducidos por el estrés (Brown, 1994). c) Información neural procedente de las vías olfativas y vomeronasales a través de las cuales, las feromonas pueden influir en la liberación de GnRH (Sharp y Frazer, 1978; Zaborszky, 1982; Brown, 1994). Dentro de las características a destacar de la LHRH, se encuentra su secreción pulsátil, que es responsable de la secreción episódica de las gonadotropinas, siendo los esteroides gonadales los que en último término modulan la frecuencia y amplitud de los pulsos de LHRH.

Diversas experiencias demuestran que un cambio en la frecuencia de los pulsos de GnRH puede modificar

dinamicamente la concentración de LH y de FSH en la circulación (Rodríguez Poyo-Guerrero y cols., 1989).

5.6.- REGULACION DE LA SECRECION DE TSH.

La secreción de TSH está regulada por hormonas hipotalámicas y por hormonas tiroideas circulantes. El tripéptido hipotalámico TRH es el que estimula la liberación de TSH (Reichlin, 1989).

El principal regulador de la función de TSH son las hormonas tiroideas, ya que éstas actúan a nivel hipotalámico para inhibir la síntesis de TRH, y a nivel hipofisario inhibiendo la secreción de TSH (Lechan, 1987).

La TSH se secreta de forma pulsátil siguiendo un ritmo circadiano (Parker y cols., 1987).

La regulación de la TSH en las células tireotropas de la adenohipófisis es estimulada por la TRH existente en las células neurosecretoras del NPV, núcleo periventricular anterior (NPVa) y del hipotálamo dorsomedial (HDM) e inhibida por la SS procedente de las células neurosecretoras que se encuentran en el área preóptica del hipotálamo medial (APO-HM) (Bennett y Whitehead, 1983; Müller y Nistico, 1989).

La DA reduce los niveles basales de TSH e inhibe la liberación de TSH inducida por el frío de dos formas: 1) Inhibiendo la liberación de la TRH por el hipotálamo y 2) Inhibiendo a las células tireotropas en la hipófisis. La A y la NA estimulan la liberación de TRH y de TSH, tanto la liberación basal como la liberación inducida por el frío. El papel de la 5-HT en la regulación de la TSH está sujeta

a controversia (Krulich, 1979; Jimenez y Walker, 1985).

La AcCh puede estar implicada en la liberación de TSH estimulada por el frío. La histamina parece estimular la liberación de TRH, mientras que las encefalinas y el GABA inhiben la liberación de TRH y de TSH (Brown, 1994).

5.6.1.- Control neural de la función hipofisaria tiroidea.

El sistema nervioso juega un papel fundamental en la regulación del eje hipofisario-tiroideo. En situaciones en las que la hipófisis es privada de la información procedente de la eminencia media, la secreción de TSH se reduce de forma clara. Esta situación se produce después de la sección del tallo hipofisario, en casos de trasplante de hipófisis ectópicas, después de producir lesiones en el área tireotrópica hipotalámica y en células hipofisarias en cultivo.

5.7.- REGULACION DE PROLACTINA (Prl).

La secreción de Prl, como la de GH y la de ACTH, responde a una gran variedad de estímulos externos, incluyendo la lactancia, el celo, el estrés físico y emocional y los ritmos internos relacionados con el ciclo de sueño y vigilia (Thorner y cols., 1992).

5.7.1.- Regulación hipotalámica de la secreción de Prl.

La propia Prl ejerce un efecto de retroalimentación sobre la hipófisis para regular su propia secreción (efecto de retroalimentación corto); también influye en la secreción de gonadotropinas suprimiendo la liberación de LHRH (Brown,

1994). El control neural de la secreción de Prl está mediado por distintas neuronas tuberohipofisarias.

La secreción de Prl por las células lactotropas de la adenohipófisis está estimulada por el factor liberador de Prl (Prolactin releasing factor; PRF) e inhibida por el factor inhibidor de Prl (Prolactin inhibiting factor; PIF) (Ben-Jonathan, Arbogast y Hyde, 1989). Todavía no se ha identificado un factor liberador de Prl específico, aunque se ha comprobado que muchos neuropéptidos aumentan la liberación de Prl, entre los que se encuentran TRH, VIP, OX y β -endorfinas (Leong y cols., 1983; Ben-Jonathan y cols., 1989).

De la misma forma, todavía no se ha identificado un factor inhibidor de Prl específico, aunque la DA liberada por las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas de la región eminencia media-núcleo arcuato, en las venas porta-hipofisarias es el mejor inhibidor de Prl conocido hasta el momento. El GABA también actúa como factor inhibidor de Prl (Leong y cols., 1983; Ben-Jonathan y cols., 1989).

La secreción de Prl está regulado por estímulos que abren o cierran los ciclos. La lactancia y el estrés estimulan un control caracterizado por la existencia de un ciclo abierto. La Prl por sí misma ejerce un efecto de retroalimentación negativo, ya que disminuye la concentración de la DA porta-hipofisaria y aumenta sin embargo el turnover de DA de las neuronas tuberoinfundibulares. La Prl actúa en el hipotálamo regulando su propia secreción e inhibiendo la secreción de LHRH. Este hecho explica la inhibición de gonadotropinas

que se observa de forma característica en los estados de hiperprolactinemia.

El sistema regulador de Prl y su control por catecolaminas ha sido estudiado a fondo debido a la frecuente aparición de síndromes hipersecretorios de Prl. Tanto la hipófisis como el hipotálamo tienen receptores de DA que inhibirán Prl; desafortunadamente, la respuesta a la estimulación del receptor de DA y el bloqueo del mismo, no distingue entre las acciones centrales o periféricas de la droga y ningún test farmacológico es capaz de identificar de forma definitiva la etiología de la hipersecreción de Prl.

5.7.2.- Diferencias sexuales en el control de la secreción de Prl.

El control hipotalámico de Prl como el de LH, difiere en machos y en hembras. En el macho, la Prl presenta un patrón de liberación tónico y acíclico, mientras que en la hembra, la liberación de Prl es cíclica con picos periódicos (Neill, 1972). Estas diferencias sexuales entre la secreción de Prl y de LH parecen ser resultado de las diferencias sexuales en la organización de las áreas hipotalámicas, preóptica, dorsomedial, y ventromedial debido a la masculinización del cerebro por los andrógenos durante el desarrollo (Brown, 1994).

5.8.- HORMONA ESTIMULADORA DE MELANOCITOS. FACTORES LIBERADORES E INHIBIDORES.

La hormona estimuladora de melanocitos (MSH) se libera por las células melanotrofas de la *pars intermedia* gracias a un

factor liberador de la MSH (MSH-RF) e inhibida por un factor inhibidor de la liberación de la MSH (MSH-RIF). No se han podido identificar ni MSH-RF ni MSH-RIF, sin embargo, existen numerosas hormonas que pueden influir en la liberación de la MSH. Parte de la molécula de OX (el extremo C-terminal) puede actuar como un factor liberador, mientras que la DA actúa como un factor inhibidor de la MSH, similar a la acción inhibidora que ejerce sobre la Prl (Schally y cols, 1978; Taleisnik, 1978).

5.9.- REGULACION DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO.

La secreción de la GH se modifica por estímulos externos, por ritmos neurales endógenos y por efectos de retroalimentación que ejerce la propia hormona. El estímulo que dispara la liberación de GH son, el ejercicio, el estrés físico y mental, la ingesta elevada de proteínas y la ingesta de comidas ricas en carbohidratos (Brown, 1994).

5.9.1.- Regulación de la secreción de GH.

La secreción de hormona del crecimiento (Growth Hormone, GH) por las células somatotropas de la adenohipófisis está regulada por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GH-RH), también llamada Somatocrinina (Guillemin y cols., 1984) y por la hormona inhibidora de la GH (GH-RIH) a la que también se denomina somatostatina. La GHRH se libera de forma pulsátil por células neurosecretoras situadas en el HMB (concretamente, NVM) y en el núcleo arcuato. Estas células neurosecretoras están reguladas por neurotransmisores tipo catecolaminas y 5-HT

así como por neuropéptidos, entre los que se incluyen los opioides y TRH (Bennett y Whitehead, 1983; Martin 1985).

La SS se sintetiza primeramente en las células neurosecretoras del NPV y del APO-HA, desde donde se envían axones al sistema porta-hipofisario de la eminencia media (Zaborszky, 1982). La SS se libera también desde las células neurosecretoras del hipotálamo ventromedial y del hipotálamo dorsomedial, quienes envían sus axones a otras áreas del cerebro donde la SS es liberada como neurotransmisor (Krieger 1983a, 1986; Merchenthaler y cols. 1989). A su vez la liberación de SS está regulada por distintos neurotransmisores y neuropéptidos.

La GHRH controla la síntesis de GH a través del AMPc. La SS antagoniza de manera dosis-dependiente los efectos de la GHRH como liberador de GH. También, afecta a la expresión de GH y a la proliferación celular (Devesa y cols., 1992).

La unión de la SS a su receptor inhibe la liberación de GH, disminuyendo las concentraciones de calcio intracelular e inhibiendo a la adenilato ciclasa. Estos efectos están mediados por proteínas G. La GHRH interacciona con un receptor de membrana que estimula a la adenilato ciclasa, que conduce a un aumento de los niveles de AMPc intracelular (Devesa y Tresguerres, 1992). Cuando las células están expuestas a la acción de la GHRH y a la acción de la SS, la SS ejerce el efecto dominante, la concentración de calcio intracelular disminuye y se inhibe la liberación de GH. Aunque el mecanismo íntimo por el que este efecto ocurre, no se conoce bien, se postula que se debe, o a una inhibición de los movimientos de Ca^{2+} , a la

hiperpolarización de la membrana celular tras incremento de la permeabilidad al ión K^+ , o también debido a la inhibición del sistema adenilato ciclasa vía proteínas G_i (Devesa y Tresguerres, 1992).

5.9.2.- Regulación de GH por neurotransmisores.

Ya que la GH está controlada tanto por GHRH como por SS, consideraremos si los neurotransmisores estimulan la GHRH o inhiben a la SS o viceversa. DA y NA parecen aumentar los niveles de GH. Las drogas que actúan como agonistas de los receptores de DA o como agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos aumentan la secreción de GH, ya que inhiben a la SS, mientras que las drogas que actúan por medio de los receptores β disminuyen la secreción de GH porque estimulan a la SS (Devesa y cols., 1992).

El papel de la serotonina (5-HT) como regulador de la secreción de GH es dual y difícil de interpretar ya que se han descrito efectos estimuladores y efectos inhibidores. La acetilcolina (AcCh) parece estimular la liberación de GHRH e inhibir la liberación de SS a través de su acción sobre receptores muscarínicos (Devesa y Tresguerres, 1992). Como el GABA es un neurotransmisor inhibitor puede inhibir la liberación de SS o de GHRH o incluso ambos (Müller y Nistico, 1989). El GABA no actúa directamente sobre las neuronas neurosecretoras del hipotálamo pero lo hace regulando la actividad de la DA. La histamina y los opiáceos parecen aumentar la liberación de GH (Brown, 1994).

5.9.3.- Regulación del eje Hipotálamo-Hormona del crecimiento-Somatomedinas.

El IGF I y el IGF II pueden mimetizar la acción promotora del crecimiento de GH en ratas hipofisectomizadas (Schoenle y cols., 1982), pero además las somatomedinas participan en un proceso de retroalimentación negativo de regulación de GH. El IGF I a nivel hipofisario ejerce un efecto de retroalimentación negativo. A nivel hipotalámico el IGF I, estimula la secreción de SS (Berclowitz y cols., 1981). Basándose en datos farmacológicos indirectos, parece que la liberación de GHRH está estimulada por AcCH, estímulos α -adrenérgicos y dopaminérgicos y es inhibida por estímulos β -adrenérgicos. La secreción de SS, si se estudia mediante ensayos directos *in vitro*, se estimula mediante AcCH y VIP pero se inhibe por la acción del GABA. La secreción de GH se modificó por ritmos endógenos de sueño, por el estrés y por el ejercicio (Brown, 1994).

Distintas redes neuronales peptidérgicas centrales también están implicadas en la regulación de GH. Otro péptido que simula la liberación de GH es la galanina. Se ha descrito que inhibe la liberación hipotalámica de SS (Tresguerres, 1989).

6.- PROBLEMAS CLINICOS. DEFICITS DE HORMONAS HIPOFISARIAS.

6.1.- DEFICIT GLOBAL. AUSENCIA DE HIPOFISIS.

Los desórdenes del eje hipotálamo-hipofisario proceden de lesiones a distintos niveles. Al nivel más inferior, los problemas surgen a raíz de la destrucción de la hipófisis (por tumor, infarto o inflamación) o a partir de un déficit

de origen genético, de una célula hipofisaria en particular, como la que se observa en los casos extraños de déficit de FSH o de GH (Reichlin, 1992). La pérdida selectiva de receptores de hormonas tiroideas en la hipófisis pueden dar lugar a un aumento en la secreción de TSH y tirotoxicosis. A niveles anatómicos superiores, los desórdenes pueden ser provocados por ruptura de la zona de contacto vascular entre la eminencia media y el tallo hipofisario, por ruptura del tallo en sí mismo o de los terminales nerviosos del sistema tuberohipofisario. Tal destrucción de la vía final común de regulación hipofisaria puede producirse después de una sección quirúrgica del tallo, en tumores de tallo hipofisario y en enfermedades de naturaleza inflamatoria (Reichlin, 1992).

6.1.1.- Apoplejía Hipofisaria.

La apoplejía hipofisaria se define como un infarto agudo de la hipófisis que amenaza la supervivencia del individuo. El infarto hemorrágico tiene lugar, en los casos más comunes, en situaciones en las que existe un tumor hipofisario previo, aunque también puede producirse de forma espontánea en una hipófisis normal, después de una hemorragia obstétrica (Síndrome de Sheehan) (Sheehan y Stanfield, 1961), en casos de aumento de la presión intracraneal o como consecuencia de una terapia de anticoagulación sistémica. El panhipopituitarismo puede desarrollarse también después de la cirugía o de la radioterapia de adenomas hipofisarios. Las mujeres que sufren el síndrome de Sheehan exhiben unas manifestaciones características,

entre las que se incluyen, imposibilidad para la lactancia, desórdenes/pérdida de la menstruación, del vello genital y axilar, y en casos severos evidencia de panhipopituitarismo. Otros factores que predisponen al infarto hipofisario incluyen la diabetes mellitus, la neumoencefalografía, la angiografía carotídea, la ventilación mecánica, traumas e infecciones del tracto respiratorio superior (Thorner y cols., 1992).

El infarto hipofisario produce una disfunción de la adenohipófisis que puede ser permanente o transitoria. El grado de deterioro dependerá de la cantidad de tejido destruido. Se ha descrito un déficit en la secreción de GH en el 88% de los casos, en la secreción de gonadotropinas entre el 58% y el 76% de los casos y en la secreción de ACTH en el 66% de los casos. Se produce hipotiroidismo secundario entre el 42 y el 53% de los casos y secreciones anormales de Prl entre el 65 y el 100% de los casos descritos (Veldhuis y Hammond, 1980).

Así, la apoplejía puede tener lugar en glándulas hipofisarias no tumorales, como en los casos que se producen en mujeres durante el período de postparto. La característica común de estos casos es un parto con una pérdida de sangre excesiva. después de un período de isquemia completa, se observa una revascularización y una subsiguiente congestión vascular asociada a una trombosis del lóbulo anterior (Reid y cols., 1985). La hemorragia espontánea también se produce en hipófisis tumorales. Se pueden producir hemorragias en todo tipo de tumores hipofisarios y pueden pasar desde inadvertidas a tener

consecuencias catastróficas.

El patrón de crecimiento tumoral, el tamaño del tumor, y la cantidad de hemorragia y de edema en la glándula determinan los síntomas. El infarto con hemorragia y edema puede causar una rápida expansión de la lesión, asociada a la compresión de las estructuras circundantes y a un funcionamiento neurológico anormal. En un paciente consciente, los síntomas iniciales son dolores de cabeza de localización retroorbital, acompañados de náuseas y vómitos. La extravasación de sangre o tejido necrótico en el espacio subaracnoideo puede causar fiebre, irritación meníngea, pérdida de consciencia e incluso coma. La expansión a niveles superiores puede causar opresión del quiasma y/o del nervio óptico con pérdida de campo visual y disminución de la agudeza (Thorner y cols., 1992).

6.2.- SECCION DEL TALLO HIPOFISARIO.

Las lesiones capaces de destruir el tallo hipofisario, tales como la ruptura a raíz de un golpe en la cabeza, sección quirúrgica del tallo o a una enfermedad espontánea (tumor, granuloma) producen un patrón característico de disfunción hipofisaria. La diabetes insípida se desarrolla en un porcentaje elevado de los casos de ruptura de tallo hipofisario, aunque la incidencia de la enfermedad depende del nivel al cual se ha producido la sección (Moses, 1983). En las hembras, la menstruación cesa después de la sección del tallo o hipofisectomía (Dugger y cols., 1962). A diferencia de la situación que se genera después de una hipofisectomía, las gonadotropinas pueden ser aún

detectables en orina después de haber realizado una sección de tallo hipofisario.

El fallo general adenohipofisario que se produce después de una sección del tallo es debido, en parte, a una pérdida de las uniones vasculares y neurales específicas con el hipotálamo y en parte al grado de infarto al que se ha sometido a la hipófisis (Adams y cols., 1966). El patrón de daño celular está relacionado con la distribución de los pequeños capilares sanguíneos que penetran en la hipófisis por debajo del nivel al que se ha producido la sección.

6.3.- DEFICITS AISLADOS POR FALLO EN LAS HORMONAS HIPOFISIOTROPICAS.

Puede producirse un fallo hipofisario selectivo debido a un déficit de los tipos celulares hipofisarios específicos o por un déficit de una o más hormonas hipotalámicas. Si tenemos en cuenta el lugar anatómico donde se ha producido la lesión, en los casos de déficits de TSH, se pueden establecer diferencias entre las causas de origen, ya que éstas pueden ser de origen hipotalámico o de origen hipofisario (Lamberton y Jackson, 1983).

La secreción deficiente de TRH conduce a una síntesis alterada de TSH en la hipófisis, incluyendo cambios en la glicosilación. Una TSH pobremente glicosilada tiene una actividad biológica baja; sin embargo, y a pesar de estos datos, es difícil diagnosticar casos de hipotiroidismo hipotalámico (Beck-Peccoz y cols., 1985).

El déficit aislado de LHRH, es el más común de las deficiencias de hormonas hipofisiotrópicas. En el síndrome

de Maestre de San Juan (Maestre de S. Juan, 1856) (déficit de gonadotropinas asociada con hiposmia) el mayor defecto neuroanatómico se encuentra en un desarrollo defectuoso del sistema neuronal LHRHérgico. Este desarrollo defectuoso parece proceder de una migración defectuosa de las neuronas del epitelio nasal olfatorio embrionario que contenían LHRH (Schwanzel-Fukuda y cols., 1989).

Por otro lado, las malformaciones de las estructuras situadas en la línea media como por ejemplo el *septum pellucidum* se asocian a defectos encontrados en la regulación de las gonadotropinas. El déficit más común es el denominado hipogonadismo hipogonadotrópico (Krause Brucker y Gardner, 1980).

Los déficits de GHRH son en la mayoría de los casos, los responsables de la insuficiencia de GH que da lugar al enanismo idiopático. La secreción de GH es la más vulnerable de todas las funciones de la hipófisis anterior a cualquier daño producido en el tallo hipofisario (Brauner y cols., 1989).

La ausencia de secreción de DA conduce a hiperprolactinemias (Molitch y Reichlin, 1985). Asimismo, los niveles de Prl se elevan, en casos de lesiones que conducen a una separación traumática del hipotálamo de la hipófisis.

La insuficiencia adrenal es una manifestación común de problemas hipotalámicos, atribuidos en algunos casos a déficit de CRH o de destrucción de células adrenotropas (Sauter y cols., 1990).

6.4.- MANIFESTACIONES DE DEFICIT HORMONAL ADENOHIPOFISARIO.

El hipopituitarismo total o selectivo puede producirse en pacientes con adenomas hipofisarios, y aquellos pacientes que han sufrido cirugía hipofisaria o radioterapia, o aquellos que han sufrido lesiones en la cabeza. La adenohipófisis secreta seis hormonas fundamentales (LH, FSH, GH, TSH, ACTH y Prl) y pueden producirse déficits en cualquiera de ellas. El síntoma más común tanto en hombres como en mujeres es la disminución de la función gonadal. El hipogonadismo secundario puede producirse debido al déficit de LH y de FSH aunque también puede producirse en los casos de hiperprolactinemia. El diagnóstico de la enfermedad se realiza a partir de la observación de una pérdida progresiva de secreción de hormonas adenohipofisarias por el siguiente orden: gonadotropinas (LH Y FSH), GH, TSH, ACTH (Rodríguez Poyo-Guerrero y cols., 1989). Sin embargo, pueden producirse variaciones, ya que algunos pacientes presentan déficits en ACTH y/o TSH como característica fundamental. El déficit de Prl no es muy común y cuando se produce es debido a infarto hipofisario. En los niños, los síntomas más evidentes son el cese del crecimiento y el retraso en la pubertad.

6.5.- SOLUCIONES ACTUALES PARA EL DEFICIT DE HORMONAS.

6.5.1.- Terapias de sustitución hormonal.

La terapia de sustitución consiste en la administración de hormonas producidas por las glándulas diana. Las excepciones son la administración de GH en los casos de déficits de GH, la terapia de gonadotropinas para inducir

la ovulación en mujeres y el tratamiento de infertilidad en los hombres y la desmopresina para el tratamiento de la diabetes insípida.

La terapia de sustitución hormonal debe ser personalizada para cada paciente y no debería ser instaurada hasta que no se hayan valorado los daños sufridos en el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (Thorner y cols., 1992).

6.5.1.1. Déficit de cortisol.

El déficit de cortisol se trata de forma usual mediante la administración oral de hidrocortisona dos veces al día. Esta es la forma más sencilla de restablecer el ritmo circadiano de secreción de cortisol. Se pueden utilizar otros glucocorticoides sintéticos como prednisona y dexametasona. Los riesgos de los glucocorticoides incluyen la sobredosis (síndrome de Cushing) y la supresión adrenal (Thorner y cols., 1992).

6.5.1.2. - Déficit de hormonas tiroideas.

Este déficit se trata con levotiroxina (Thorner y cols., 1992).

6.5.1.3.- Déficit de gonadotropinas y LHRH.

Estas hormonas se administran de forma exógena a pacientes que evidencien niveles lo suficientemente bajos de gonadotropinas como para que se produzcan situaciones de anovulación (Tresguerres, 1989). Esta terapia se instaura, una vez que se hayan descartado otros factores de origen puramente ginecológico (problemas ovárico-endometriales;

problemas periférico-obstructivos, que impidan la ovulación y sean origen de esterilidad).

La inducción de la ovulación podrá hacerse con drogas u hormonas que aumenten los niveles de gonadotropinas endógenas, o mediante la administración de las propias gonadotropinas de origen humano. Dentro de las primeras se puede utilizar el citrato de clomifeno o la GnRH, y dentro de las segundas la gonadotropina menopaúsica humana (HMG) (pergonal) con función predominante FSH, aunque lleve también LH, obtenido de orina de mujeres postmenopáusicas, y la HCG (Profasi) o gonadotropina coriónica, con acción similar a la LH, obtenida de orina de mujeres, durante el primer trimestre de embarazo (Tresguerres, 1992a).

Los análogos de LHRH son muy útiles para el tratamiento del hirsutismo. Entre las vías de administración se incluyen la vía nasal, subcutánea y las formas "en depósito". El ketoconazole, derivado del imidazol, inhibe a la 17 α -hidroxilasa, enzima encargada de la síntesis de andrógenos, con lo que las concentraciones séricas de éstos disminuyen en mujeres con hirsutismo. Sin embargo, y debido a los efectos colaterales entre los que se incluyen molestias gastrointestinales, prurito y alteraciones en la función hepática, el uso del ketoconazol para el tratamiento del hirsutismo debe ser limitado (Tresguerres, 1989).

6.5.1.4.- Déficit de GH.

Las terapias que se están siguiendo actualmente están basadas en dos preparados producidos mediante técnicas de ADN recombinante; una de ellas se ha realizado en células

procariotas y el segundo en células de mamífero. Los dos preparados parecen ser igualmente efectivos. La GH se administra de forma subcutánea (Milner y cols., 1979).

6.5.1.5.- Déficit GHRH.

Se ha administrado GHRH a niños deficientes en GH. Se administra dos veces al día y también mediante administración pulsátil subcutánea (Grossman y cols., 1986). Es necesario continuar estudiando y experimentando para determinar si el tratamiento crónico con GHRH es equivalente o presenta ventajas con respecto al tratamiento con GH.

6.5.2.- Sustitución de la hipófisis.

6.5.2.1.- Cirugía hipofisaria.

La cirugía hipofisaria moderna ofrece la posibilidad de reseca de forma selectiva los adenomas hipofisarios, dejando la hipófisis normal intacta. Harvey Cushing fue pionero en la técnica transesfenoidal pero posteriormente la abandonó en favor de la técnica por acercamiento transcraneal. La cirugía hipofisaria moderna (transesfenoidal) se desarrolló por Guiot y Hardy en 1973 (Hardy, 1969; Guiot, 1973).

En los casos más graves, el tamaño del tumor hace necesaria la extirpación total hipofisaria, con lo que se producirá un panhipopituitarismo postquirúrgico que necesitará obligatoriamente tratamiento de sustitución.

6.5.2.1.1.- Resultado de la cirugía hipofisaria.

Ya que la mayoría de los tumores hipofisarios son benignos, los resultados de la cirugía suelen ser gratificantes, sobre todo en los pacientes que presentaban anormalidades visuales (Trautman y Laws, 1983).

Las complicaciones en la cirugía hipofisaria suelen ser pequeñas. Sin embargo, cada operación por el mero hecho de serlo, constituye un riesgo a tener en cuenta.

6.5.3.- Radioterapia hipofisaria.

Este tratamiento disminuye el crecimiento tumoral y reduce la hipersecreción hormonal, sin embargo el hipopituitarismo parcial o total es un riesgo que siempre está presente. Habitualmente, la radioterapia se reserva para pacientes con enfermedades residuales después de haber sufrido cirugía o para pacientes en los que no está recomendada la resección quirúrgica.

Una de las consecuencias más comunes de la radioterapia es el desarrollo de un hipopituitarismo posterior al tratamiento, parcial o completo (Nelson y cols., 1989). Otras complicaciones de la radioterapia incluyen daños en el quiasma óptico y/o en el nervio óptico y nervios craneales con la consecuente pérdida visual (Linfoot, 1978); el daño vascular puede causar isquemia cerebral, compresiones y desarrollo de tumores hipofisarios o cerebrales (Thorner y cols., 1992).

6.5.4.- Transplante Hipofisario.

En estudios realizados en ratas con transplante de hipófisis, se ha podido comprobar que el aporte de sangre por el sistema porta hipofisario es esencial para el funcionamiento hipofisario normal. En los trasplantes que se realizaban en los años 50, los autores describían un estado de buena vascularización en el transplante, pero sin embargo, sólo aquellos trasplantes que estaban situados bajo la eminencia media funcionaban (Harris y Jacobsohn, 1952); otros autores sugerían que si los explantes hipofisarios que habían estado previamente situados en el riñón, se retransplantaban en la eminencia media, recuperaban la funcionalidad (Everett, 1958).

El transplante de la hipófisis, separada del hipotálamo, llevaba consigo la atrofia de la adrenal y del tiroides, pero el grado de atrofia, no era tan pronunciado como el que se producía después de la hipofisectomía. El nivel de la actividad residual se podía aumentar, aumentando el número de hipófisis implantadas, sin embargo, nunca se acabó de recuperar la función hipofisaria normal (Sirett, 1975). Actualmente se siguen realizando estudios tendentes a conseguir una mejora en la técnica y en la viabilidad de los trasplantes. Según estudios realizados en trasplantes hipofisarios experimentales en conejos, se ha podido comprobar que cuando se probaron explantes procedentes de individuos neonatales, y éstos se situaron bajo la eminencia media de los conejos receptores, estos individuos sobrevivieron y las hipófisis funcionaron casi de forma normal. Si los explantes procedían de animales adultos, los

transplantes fracasaron (Wang y cols., 1992); de estos estudios se deduce, la existencia de una cierta plasticidad en la respuesta de las células hipofisarias de estadios poco diferenciados, cuando son sometidas a los estímulos hipotalámicos. No hay que olvidar, que estos estudios todavía se encuentran en fase experimental.

APARTADO II: LAS GLANDULAS SALIVARES.

7.- GLANDULAS SALIVARES.

Una glándula salival puede ser definida como cualquier célula u órgano que vierte su secreción a la cavidad bucal. Se pueden distinguir las glándulas salivares mayores, localizadas a cierta distancia de la mucosa bucal y que comunican con ella a través de uno o más conductos extraglandulares, y las glándulas salivares menores, que se hallan en la mucosa o en la submucosa y se abren directa o indirectamente en la superficie epitelial de la misma a través de numerosos y pequeños conductos excretorios (colectores). En el hombre, las glándulas salivares mayores están constituidas por tres grandes masas de tejido bilaterales (las glándulas parótida, submaxilar y sublingual), mientras que las glándulas salivares menores, están constituidas por las glándulas linguales anteriores, bucales y palatinas. Entre sus funciones se incluye: la lubricación de los alimentos para que puedan ser deglutidos; el humedecimiento de la mucosa bucal, que es esencial para la fonación; el aporte de un disolvente acuoso, necesario para la degustación; el aporte de un cierre líquido, necesario para la succión (incluyendo la lactación); la secreción de enzimas digestivas tal como la amilasa salival, y la secreción de hormonas como cortisol, 17- α -OH progesterona, melatonina, VIP (McMillan y Talamo., 1989; Mauser y Kronberger, 1992), y de otras sustancias como neuropéptido Y, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P, alanina (Hauser-Kronberger

y cols., 1992), estrógenos (Campbell y cols., 1990), progesterona y testosterona (Blom y cols., 1993). La glándula parótida también es la fuente principal de distintos factores de crecimiento como el FGF básico (Merkel y Phelps, 1987; Amano y cols., 1993) y el EGF (Thesleff y cols., 1988). También se ha descrito la presencia de IGF-I (Ryan y cols., 1992).

7.1.- ANATOMIA DE LA GLANDULA PAROTIDA.

Se localiza por delante de la oreja y por detrás de la rama ascendente de la mandíbula. Esta glándula sintetiza y secreta una solución proteínica, acuosa, rica en amilasa salival. Este tipo de secreción, se conoce como secreción serosa.

7.2.- DESARROLLO.

Los acinos secretores y el sistema de conductos, muy ramificados, se desarrollan como una invaginación del epitelio bucal, de origen ectodérmico. Los cordones epiteliales invaginados invadirán el mesénquima embrionario. El epitelio, dará origen al tejido parenquimatoso de las glándulas salivares, es decir, a los futuros acinos y conductos. El mesénquima dará lugar al futuro tejido conectivo de la glándula. El estroma es el tejido de sostén que incluye la cápsula fibrosa y los tabiques de tejido conjuntivo relacionados con ella (Davis, 1986). La diferenciación de las células secretoras parotídeas de la rata, se produce de forma postnatal durante un período aproximado de 40 días (Maruyama y cols.,

1982), estando además este proceso de diferenciación postnatal, estimulado por la lactación.

7.3.- ESTRUCTURA DE LA GLANDULA PAROTIDA.

Las glándulas salivares mayores son glándulas ramificadas compuestas, que están formadas por numerosos lóbulos compuestos a su vez por lobulillos enlazados por un estroma interlobular, un tejido areolar denso, que contiene conductos excretores (colectores), vasos sanguíneos, fibras nerviosas, y pequeños ganglios. Cada lóbulo está delimitado por las ramificaciones de un conducto único, que finalizan como unidades secretoras terminales, las cuales a su vez, producen la secreción primaria. Este esquema se modifica secundariamente con la formación de los conductos intercalares estriados y excretores, de manera que estos últimos se ramifican en uno o más conductos que dirigen la saliva hacia la cavidad bucal.

7.4.- UNIDADES SECRETORAS TERMINALES DE LAS GLANDULAS SALIVARES.

Las células glandulares de los ácidos son piramidales, tienen un vértice luminal estrecho y una base amplia, mientras que la de los túbulos son más cilíndricas. Estas células que son las principales productoras de glicoproteínas se describen comunmente como serosas, seromucosas o mucosas.

Las unidades secretoras terminales de la glándula parótida están formadas principalmente por ácidos serosos.

Las células seromucosas y las serosas tienen una forma

aproximadamente piramidal. La membrana plasmática a nivel basal suele ser lisa, pero a nivel lateral está plegada de manera que se interdigita con la de las células adyacentes. La membrana plasmática luminal, con frecuencia, tiene vellosidades entre las que se encuentran vesículas pinocitósicas. Las células serosas presentan un citoesqueleto muy desarrollado y una gran cantidad de gránulos de secreción (Tandler y Phillips, 1993). Los gránulos contienen: enzimas, como por ejemplo: α -amilasa, peroxidasa, lactoperoxidasa, lisozima, DNasa, RNasa y lipasa. También existen factores de crecimiento, entre los que se encuentra el NGF y el EGF (Tandler y Phillips, 1993).

7.5.- CONDUCTOS DE LAS GLANDULAS SALIVARES.

A partir de las unidades secretoras terminales, nos encontramos, consecutivamente, con los conductos intercalares, estriados y excretores y en las glándulas salivares que denominamos mayores, como la glándula parótida, el conducto excretor principal. Los conductos intercalados y los conductos estriados están localizados en el interior de los lóbulos, mientras que los conductos excretores se encuentran en posición interlobulillar, dentro de los septos de tejido conjuntivo. El conducto excretor principal forma el denominado conducto de Stenon (Tandler 1993 a y b). En la rata, existe otro tipo de conductos, situados entre los conductos intercalados y los estriados, son los denominados conductos granulares (Tandler 1993 a y b).

Los conductos intercalados son los más cercanos a los acinos secretores. Se ha sugerido que las células de este tipo de conductos, podían ser las progenitoras de los dos tipos celulares, las de los acinos y las de los conductos (Zajicek y cols., 1985). Las células que tapizan los conductos intercalares son cuboideas o ligeramente aplanadas. Estas células están rodeadas por células mioepiteliales. Estas células no son importantes en la síntesis de proteínas, pero esto no impide que se vean implicadas en el aporte de agua y electrolitos a la saliva. Se han descubierto gran cantidad de glicoconjugados en los gránulos de las células de estos conductos (Jezernik y Pipan, 1989).

En los roedores, el conducto que precede, al conducto estriado, es el conducto granular. Este conducto se especializa en secreción (Gresik, en prensa; en Tandler, 1993). Estos conductos pueden mostrar, las especializaciones basales características de los conductos estriados (Tamarin y Sreenby, 1965).

La característica principal de las células que revisten los conductos estriados es su estriación basal semejante a un césped grueso. Este aspecto estriado era debido a la presencia de columnas de mitocondrias alargadas muy apretadas entre sí (Pease, 1956). En el interior de estas células existen gránulos de glucógeno dispersos (Imai y cols., 1978). En los conductos estriados del gato, se han descubierto gránulos cargados de kalikreina (Schachter y cols., 1983). También se ha descubierto, la presencia de fibronectina (Kanehisha y cols., 1991). Se les considera

como los conductos encargados de la reabsorción de los electrolitos procedentes de la saliva.

Según estudios inmunocitoquímicos, tanto los conductos estriados, como los conductos excretores de la glándula parótida de la rata, son muy reactivos al péptido atrial natriurético (ANP) (Vollmar y cols., 1991).

Las células de los conductos estriados, fagocitan por endocitosis ciertos materiales a partir de la luz del conducto; posteriormente degradan estos materiales en los lisosomas (Hand y cols., 1987). Esto también se realiza en los conductos intercalados y en los excretores (Hand y cols., 1987; Coleman y Hand, 1987)

7.6.- CELULAS MIOEPITELIALES DE LAS GLANDULAS SALIVARES.

Estas células contráctiles están situadas entre la lámina basal y las células epiteliales propiamente dichas de los conductos intercalares o también de las unidades secretoras terminales. Los efectos de su contracción son los siguientes: 1) aceleran el flujo de salida de la saliva, 2) disminuyen el contenido de los conductos intercalares y unidades secretoras terminales, 3) aumentan la presión de secreción, 4) sostienen el parénquima subyacente, 5) ayudan al flujo salivar a sobrepasar los aumentos de resistencia periférica, y en determinadas condiciones 6) ayudan a expulsar el contenido de las células secretoras asociadas (Garrett y Emmelin., 1979).

7.7.- CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE LA GLANDULA SALIVAR.

Las rápidas variaciones en la composición de la saliva, así

como en la cantidad y velocidad a la que es producida, en respuesta a estímulos ambientales, sugieren la existencia de un mecanismo de control muy elaborado (Emmelin, 1972). En algunas glándulas, la saliva se secreta espontáneamente, aparentemente incluso en ausencia de un estímulo externo; en otras, la secreción puede ser inducida por el estímulo de una amplia gama de receptores extraglandulares: gustativos, nociceptivos, olfatorios y táctiles.

7.8.- CONTROL HORMONAL DE LA GLANDULA PAROTIDA.

No existe evidencia clara de que la actividad de las hormonas pueda inducir directamente la secreción de saliva a niveles fisiológicos. Las hormonas locales, sin embargo tienen intensos efectos sobre la actividad de las glándulas salivares; en la glándula submaxilar de gato se ha demostrado, por ejemplo, que aunque la vasodilatación se inicia mediante influencias nerviosas, se mantiene por la acción de kininas plasmáticas que se forman localmente cuando la kalikreína es liberada de las células secretoras después de una estimulación por aminas simpáticas (Gautvik y cols., 1972).

Existen autores, que ya en el año 1968, sugerían la existencia de un posible eje hipotálamo-parotídeo-endocrino (Leonora y Steinman, 1968) y que actualmente sugieren la existencia de un factor hipotalámico que estaría encargado de liberar una hormona parotídea (HP) de naturaleza polipéptica, encargada del transporte del fluido dentinal en la rata (Tieche y Leonora, 1989).

Incluso estos mismos autores sugieren que las glándulas

parótidas de rata pueden ejercer un efecto insulínico, ya que la parotidectomía privaría a las células β pancreáticas de un principio humoral que sería esencial para optimizar la respuesta de insulina a la presencia de glucosa (Leonora y cols., 1987; 1988).

7.9.- CONTROL NERVIOSO.

En la mayoría de las glándulas salivares, la mayor parte del flujo salival está bajo control nervioso. Las fibras implicadas contienen fundamentalmente AcCh (parasimpáticas) y A (simpáticas) (Emmelin, 1987; Garrett y Kidd, 1993).

Existen evidencias que pueden sugerir que el VIP puede funcionar como un neurotransmisor parasimpático en la glándula parótida de la rata. Se ha demostrado inmunorreactividad tipo VIP en las glándulas salivares de distintas especies (Uddman y cols., 1980) y además el péptido estaría colocalizado con la AcCh en el ganglio óptico de donde procede la inervación parotídea (McMillan y Talamo, 1989).

Si quisiéramos describir un modelo general de inervación glandular tendríamos que tener en cuenta que existe una variación considerable en las diferentes glándulas y en las diferentes especies (Garrett, 1972), y que el modelo de inervación puede variar con la edad en una misma glándula (Yohro, 1971). Las fibras colinérgicas acompañan a los conductos y forman arborizaciones complejas alrededor de las unidades secretoras terminales. Las fibras adrenérgicas generalmente penetran en las glándulas acompañando a las arterias, distribuyéndose con sus ramas.

En el interior de la glándula, las fibras se entremezclan, de modo que axones adrenérgicos y colinérgicos, se sitúan con frecuencia en invaginaciones adyacentes de la misma célula de Schwann (Eneroth y cols., 1969; Garrett, 1972, 1976).

Las zonas del axón dilatadas y cargadas de vesículas se relacionan funcionalmente con las células efectoras a las que inervan formando sinapsis.

Las unidades secretoras terminales pueden estar inervadas por axones colinérgicos y adrenérgicos, existiendo células secretoras individuales que a menudo tienen una inervación doble. Las fibras colinérgicas (parasimpáticas) y adrenérgicas (simpáticas) de la glándula parótida de la rata son secretomotoras (Harrop y Garrett, 1974; Hodgson y Spiers, 1974).

La saliva producida por estimulación adrenérgica difiere de la producida después de una estimulación por fibras parasimpáticas, tanto en cantidad como en composición. En algunos casos, las fibras adrenérgicas, más que provocar secreción salival, podrían producir una modificación secundaria de la saliva secretada en respuesta a una estimulación colinérgica.

Las células de los conductos de las glándulas salivares pueden producir modificaciones en la composición de la saliva, y, aunque están peor inervadas que las unidades secretoras terminales, parece que su actividad está controlada, al menos en parte, por influencias nerviosas respondiendo electricamente tanto a estímulos simpáticos como parasimpáticos (Lundberg, 1958).

APARTADO III: TRANSFORMACION CELULAR.

8.- POSIBILIDAD DE TRANSFORMACION MORFOFUNCIONAL DE TEJIDOS FETALES Y ADULTOS BAJO ESTIMULOS APROPIADOS.

Aunque las hormonas juegan un papel indiscutible en el crecimiento corporal, su efecto estimulador sobre la división celular, *in vitro*, es menos espectacular de lo que cabría esperar, si se tienen en cuenta sus efectos *in vivo*. La razón fundamental para esta discrepancia radica en que las hormonas no realizan esta función por sí mismas sino que lo hacen asociadas a factores de crecimiento de naturaleza peptídica. En la mayoría de sus funciones los factores de crecimiento son muy similares a las hormonas: actúan a través de receptores específicos, están sujetos a regulación fisiológica, y utilizan mecanismos similares para la transducción de la señal encargada de producir los efectos biológicos en los tejidos diana (Underwood y Van Wyk, 1992).

La diferencia fundamental entre estos factores y las hormonas es que los primeros pueden ser producidos en tejidos muy diferentes y ejercen sus efectos en tejidos vecinos (efectos paracrinos) o incluso en sus propias células de origen (efectos autocrinos), más que en tejidos alejados a los que pueden acceder sólo vía torrente sanguíneo (efectos endocrinos). Estos modos de acción no son mutuamente exclusivos y la misma hormona puede emplear uno u otro en función de la situación en que se encuentre. Por ejemplo, la SS funciona como un producto neurosecretor en el hipotálamo, mientras que lo hace como factor

paracrino en los islotes de Langerhans, y como una hormona tradicional cuando se secreta por el páncreas y se transporta por la sangre portal hasta el hígado (Underwood y Van Wyk., 1992).

La mayoría de las hormonas y de los factores de crecimiento pueden estimular o una respuesta mitogénica o el desarrollo de funciones de células diferenciadas, dependiendo del tipo celular, del estado de desarrollo, del medio hormonal y de otras circunstancias ambientales (Underwood y Van Wyk., 1992). Algunos de los factores de crecimiento como el Transforming Growth Factor β (TGF β), son bifuncionales y capaces tanto de estimular como de inhibir el crecimiento. Incluso la naturaleza de la respuesta celular a hormonas y a factores de crecimiento, es debida en menor medida, a la naturaleza de las propiedades de estos mensajeros químicos más que al contexto en el que éstos actúan. Los factores de crecimiento se han definido como "*..parte de un lenguaje de señalización celular compleja, en el que los péptidos individuales son equivalentes a los caracteres de un código alfabético...*" (Sporn y Roberts., 1988).

9.- FACTORES DE CRECIMIENTO: FAMILIAS MAS IMPORTANTES.

9.1.- FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF).

9.1.1.- EGF de ratón.

El EGF fué descubierto por Cohen en 1962 cuando descubrió que extractos de glándulas salivares de ratón aceleraban la erupción de los incisivos y la apertura de los párpados de los ratones recién nacidos. Aisló el factor, lo

caracterizó, describió sus interacciones con el receptor y describió la mayoría de sus efectos biológicos (Carpenter y Cohen, 1979).

Se trata de un polipéptido de cadena sencilla formado por 53 aminoácidos. Se extrajo de las glándulas salivares como heterotetrámero compuesto por dos moléculas de EGF y dos proteínas de unión. Las proteínas de unión codificadas en genes diferentes liberan a la molécula activa de EGF (53 aas) de un precursor formado por 1217 aas (Gray y cols., 1983).

El prepro EGF se sintetiza como una proteína de membrana ya que su secuencia de aas presenta una homología de un 40% con los residuos encontrados en el dominio extracelular del receptor de superficie celular para proteínas de baja densidad. En algunos tejidos, como los túbulos distales del riñón, el preproEGF se sintetiza pero no se procesa en EGF (Rall y cols., 1985). Su función en estos tejidos no está clara pero la estructura sugiere que puede participar en la señalización transmembrana.

9.1.2.- EGF Humano.

El homólogo humano del EGF de ratón se aisló de orina basándose en su capacidad para inhibir las secreciones ácidas de la mucosa gástrica. Aunque inicialmente se le denominó urogastrona, este péptido tiene las propiedades biológicas del EGF de ratón y es idéntico en 37 de los 53 aas. Los péptidos humano y de ratón presentan reacciones cruzadas con otros receptores pero difieren considerablemente en las reactividades inmunológicas

cruzadas (Hollenberg, 1979). Se ha mapeado el gen para el EGF humano en el mismo cromosoma en el que se ha encontrado el gen para la interleuquina 2 (Brissenden y cols., 1984).

9.1.3.- Regulación del EGF

Las concentraciones de EGF en las glándulas salivares son dependientes de andrógenos. Las glándulas submaxilares de machos contienen 15 veces más EGF que las glándulas salivares de hembras (Barthe y cols., 1974). A pesar de estas diferencias asociadas al sexo, las concentraciones séricas de EGF son comparables entre ratones machos y hembras. En la piel y en las glándulas submaxilares, las concentraciones de EGF pueden ser reguladas por hormonas tiroideas, especialmente en los primeros cinco días de vida.

9.1.4.- Receptores de EGF y Mecanismo de Acción.

El receptor de EGF varía de tamaño en los distintos tejidos, pero siempre se mantiene en un rango que varía desde los 160 a los 190 Kd, dependiendo del grado de glicosilación de la molécula (Das, 1982). La unión del EGF a su receptor va seguida de la internalización del complejo y disminución del número de receptores que se encuentran en la superficie celular. Un segundo gen relacionado con el receptor de EGF podría ser el encargado de codificar el receptor de anfiregulina (Plowman y cols., 1990).

9.1.5.- Acciones Fisiológicas del EGF.

La mayoría de los efectos biológicos del EGF provienen de

su capacidad para estimular la proliferación de las capas de células basales de epitelios ectodérmicos. El EGF está presente en el fluido amniótico (Nexo y cols., 1981), y el/los miembros de sus familias homólogas (como el factor de crecimiento transformante tipo α , TGF α) pueden ser reguladores importantes del desarrollo fetal. En la rata parece ser esencial en el cierre del paladar (Hassell y Pratt, 1977) e incluso se ha descrito su importancia como estimulador de la secreción de TSH en la rata (Altschuler y cols., 1993).

Se han detectado cantidades significativas de EGF en la leche humana, llegando su concentración en el calostro hasta 300 $\mu\text{g/L}$. El EGF del calostro puede estar implicado en la maduración del borde en cepillo y de otras funciones del intestino en la vida neonatal (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.1.6.- Transforming Growth Factor α .

Muchos tumores secretan un péptido similar al EGF que es capaz de interactuar con receptores de EGF en células normales. A este péptido de 50 aas se le denominó transforming growth factor α (TGF α) ya que fue el primer péptido de estas características en ser descubierto. TGF α y EGF presentan un 35% de homología en sus secuencias y aparentemente interactúan con el mismo receptor. TGF α también se produce en células normales como por ejemplo células deciduales del sistema nervioso central y de la piel. Se ha observado una sobreexpresión de este péptido en pacientes con psoriasis.

9.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFS).

En 1975 se descubrió, que extractos cerebrales e hipofisarios contenían FGFs, los cuales junto con pequeñas cantidades de suero, eran capaces de estimular la proliferación de muchas líneas celulares de origen neuroectodérmico y mesodérmico (Gospadorowicz, 1975). El FGF se aisló inicialmente de cerebros bovinos (Bohlen y cols., 1984) en dos formas: como un péptido débilmente ácido o como un péptido fundamentalmente básico (pI 9.6) de 13.4 Kd difícilmente distinguible del FGF encontrado en hipófisis bovinas. Esta forma básica se encontró en tejidos derivados fundamentalmente del mesodermo y del neuroectodermo, mientras que la forma débilmente ácida se encuentra confinada en el sistema nervioso y en la retina. La propiedad más clara que presenta el FGF es una fuerte afinidad por heparina; los factores de crecimiento que se unen a heparina se han aislado de una gran variedad de células en cultivo o de extractos de órganos y tumores (Burgess y Maciag, 1989). Estos factores de crecimiento análogos a FGF son el producto de al menos siete genes altamente relacionados.

9.2.1.- Efectos biológicos de FGF.

FGF estimula la proliferación celular de la misma forma en que lo hace el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y puede ser sustituido por PDGF en medios definidos (Gospadorowicz y cols., 1975). FGF induce proliferación en las células blastoméricas y en los muñones de las extremidades de las ranas después de una amputación, aunque

el papel que juega en la regeneración de las extremidades todavía está por aclarar. El FGF retrasa la senescencia de células mantenidas en cultivo y es un potente mitótico para las células endoteliales vasculares (Broadley y cols., 1989). El FGF estimula multitud de procesos bioquímicos en los tejidos diana, incluyendo la fosforilación de proteínas intracitoplasmáticas e inducción de la síntesis de nuevas proteínas. Aunque los FGFs están entre los factores de crecimiento más potentes, su relevancia en los procesos fisiológicos normales todavía no se ha podido demostrar (Rifkin y Moscatelli, 1989). El FGF se encuentra en la matriz extracelular de las células endoteliales, donde está fuertemente ligado a sustancias similares a heparina (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.3.- FAMILIA DEL TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF β)

La familia de polipéptidos del TGF β incluye tres miembros homólogos (TGF β_1 , TGF β_2 y TGF β_3) localizados en los humanos en el cromosoma 19, 1 y 14, respectivamente y otro grupo de polipéptidos lejanamente relacionados que, sin embargo, comparten con ellos homología de secuencias y de actividades biológicas (Barnard y cols., 1990). Entre este último grupo se incluyen la hormona contra los conductos de Müller (anti-müllerian hormone, AMH, también conocido como müllerian inhibiting factor, MIF); inhibinas y activinas y también distintas proteínas que pueden regular la formación del hueso y del cartílago.

9.3.1. Estructura Química.

Los tres miembros de la familia del TGF β se sintetizan en forma de polipéptidos precursores que posteriormente son procesados hasta que se obtienen monómeros activos de 25 Kd (Barnard y cols., 1990). Aunque los precursores respectivos difieren, los tres péptidos una vez maduros, conservan una homología del 75%. Las activinas, inhibinas y AMH comparten entre un 20 y un 40% de homología de secuencia con el TGF β . El TGF β se secreta por las células en cultivo en una forma inactiva que no se une a los receptores de TGF β existentes en la superficie celular. Estas formas latentes de TGF β se pueden activar por acidificación transitoria o tratamiento con proteasas como la plasmina. De hecho, los inhibidores de plasmina bloquean algunas de las acciones paracrinas mediadas por TGF β (Sata y Rifkin, 1989). Las formas latentes del TGF β se secretan por casi todos los tipos de células en cultivo.

9.3.2.- Receptores.

Se han identificado en las membranas celulares tres tipos de glicoproteínas distintas capaces de unir TGF β . Los efectos biológicos del TGF β en las células epiteliales y quizá en otros tipos celulares se cree que está mediado por el receptor tipo I (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.3.3.- Papel biológico del TGF β .

Muchos factores de crecimiento son bifuncionales, y el término factor de crecimiento se emplea en esta situación para referirse a una sustancia que inhibe el crecimiento

aunque también puede estimularlo (Roberts y cols., 1985). Los miembros de esta familia son especialmente interesantes debido a su bifuncionalidad. El TGF β es un potente inhibidor del crecimiento y la producción de TGF β_2 por cultivos en monocapa que llegan a confluencia puede ser responsable de la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad celular.

En circunstancias apropiadas el TGF β estimula la proliferación de las células derivadas del mesénquima, aunque sus mayores efectos son sobre las células epiteliales. El TGF β es 10000 veces más potente que la ciclosporina como supresor de la proliferación de linfocitos T. El TGF β no mata a las células y sus efectos, además, son reversibles (Underwood y Van Wyk., 1992).

Como ya hemos comentado, el TGF β puede estimular la proliferación de las células derivadas del mesénquima, tales como los fibroblastos y los osteoclastos, sin embargo este efecto es tardío y probablemente indirecto. Su papel fundamental es prevenir la proliferación de células tumorales más que estimular su formación.

El TGF β nos permite saber que la respuesta de una célula a una señal hormonal está determinada más por las circunstancias de la célula en ese momento que por la naturaleza de la señal. El crecimiento de los fibroblastos 3T3, por ejemplo, es estimulado por TGF β en presencia de PDGF e inhibido en presencia de EGF. Además en presencia de EGF, TGF α y TGF β estimulan el crecimiento de células de riñón de rata en agar e inhibe su crecimiento en cultivos de monocapa. Todavía queda por saber si estas sustancias

promueven el crecimiento dependiendo del sustrato en algunos sistemas, si sirven como inhibidores del crecimiento en otros y si actúan como factores transformantes en otros. La capacidad multifuncional del TGF β probablemente juega un papel extremadamente importante en el desarrollo embrionario ya que en los estadios embrionarios más tempranos es fundamentalmente mitogénico mientras que en los estadios finales inhibe la proliferación celular (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.4.- OTROS REGULADORES INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO

Aunque no están estructuralmente relacionados con la familia de los TGF β , existen otros inhibidores de crecimiento celular o sustancias que son bifuncionales en sus acciones para modular el crecimiento celular. Como en el caso de los miembros de la familia de los TGF β , el efecto predominante depende del tipo celular, del medio hormonal y de otras circunstancias. Entre este grupo de sustancias se encuentra el factor de necrosis tumoral (TNF), los interferones y los retinoides. Los chalones son una familia de inhibidores de crecimiento, específicos de tejido que aparecen fundamentalmente en tejidos hematopoyéticos y en epidermis. Existen además, un número elevado de sustancias inhibidoras de crecimiento que aunque están bien documentadas no están suficientemente caracterizadas. Todas ellas están presentes en el suero. Parece estar claro, que las sustancias encargadas de inhibir el crecimiento son como mínimo tan importantes como las encargadas de promoverlo (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.5.- FACTORES DE CRECIMIENTO ESPECIFICOS DE ORGANOS Y TEJIDOS .

En contraste con estas superfamilias que promueven el crecimiento de una gama muy amplia de tipos celulares, existen otros factores de crecimiento más o menos específicos de un tipo celular determinado. La mayoría de estos agentes se han descubierto porque estaban encargados de regular un tipo de citodiferenciación especializada.

9.5.1.- Factor de crecimiento del nervio (NGF)

La existencia de una sustancia neurotrófica difusible fué sugerida por Levi-Montalcini en 1951 (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951). Como el EGF, el NGF se encontró en grandes cantidades en las glándulas submaxilares de ratones macho, característica no compartida con los humanos.

Esta molécula se puede disociar en tres tipos de subunidades, siendo la subunidad B la forma biologicamente activa (Thomas y cols., 1981).

9.5.1.1.- Receptores de NGF.

Existen dos tipos de receptores en las células neurales; un receptor de alta afinidad y baja capacidad y otro receptor de baja afinidad y alta capacidad. Los linfocitos y los macrófagos contienen sólo los receptores de baja afinidad. Tanto uno como otro receptor se sospecha que proceden de un único gen (Hempstead y Chao, 1989).

9.5.1.2.- Efectos Biológicos de NGF.

El efecto fundamental de NGF es promover la supervivencia,

diferenciación y el crecimiento axonal de los ganglios sensitivos y simpáticos. Ya que las neuronas son células completamente diferenciadas que no se replican, el NGF no funciona como un mitótico para el sistema nervioso maduro. El NGF es un mitótico débil para el tejido linfoide, sin embargo puede ser mitótico en el tejido nervioso de embriones de estadios tempranos. El efecto del NGF sobre la supervivencia neuronal parece estar regulado por el desarrollo: la inyección de anticuerpos anti NGF provocan la degeneración neuronal en animales en estadios fetales, sin embargo en los animales adultos las neuronas sensitivas no requieren NGF para su supervivencia (Gorin y Johnson, 1980).

El NGF acelera la diferenciación morfológica y bioquímica de las células parentales en neuronas simpáticas y sensitivas (Thoenen y Barde, 1980).

La producción selectiva de NGF durante el desarrollo de los tejidos periféricos atrae a las neuritas de las neuronas simpáticas o sensitivas apropiadas a lo largo de un gradiente quimotáctico de NGF, lo que lleva consigo una inervación tisular selectiva. Después, el NGF se transporta de forma retrógrada hasta sus ganglios diana donde se concentra (Korsching y Thoenen, 1983). Se cree que éste es el esquema que siguen estos tejidos para determinar tanto la especificidad como la densidad de sus conexiones axonales (Thoenen y Edgar, 1985).

El NGF también juega un papel fundamental en las respuestas tanto inmune como inflamatoria: El NGF es un quimioatrayente de neutrófilos, y la administración de

subunidades β de NGF a animales recién nacidos ha conducido a la aparición de mastocitos en distintos tejidos (Aloe y Levi-Montalcini, 1977). El NGF estimula a los receptores de interleuquina 2 en linfocitos humanos. El NGF es un débil mitótico que puede potenciar la síntesis de DNA en respuesta a distintos mitóticos de células T y B (Thorpe y Pérez-Polo, 1987).

9.5.2.- Interferones.

Este es el término que se le ha dado a las glicoproteínas secretadas capaces de inducir un estado antiviral en las células (Isaacs y Lindemann, 1957). El interferon α y el interferon β , se originaron en leucocitos y en fibroblastos respectivamente; difieren en sus propiedades químicas y biológicas del interferon γ que es producido por las células T previamente estimuladas; de hecho la actividad antiviral del interferon γ parece ser secundaria a su estimulación por interferon α e interferon β (Hughes y Baron, 1987). Los interferones estimulan la replicación celular bajo determinadas circunstancias e inhibe el crecimiento celular en otras. El efecto predominante en la mayoría de las líneas celulares es inhibir las señales mitogénicas (tales como las de los protooncogenes c-myc y c-fos) en respuesta a otros factores de crecimiento (Romeo y cols., 1989).

9.5.3.- Somatomedinas.

Se aislaron, basándose en sus tres propiedades fundamentales: Actividad similar a la GH en el cartílago,

actividad similar a la insulina en el tejido adiposo y en el músculo y propiedades mitóticas en sistemas celulares en cultivo (Dulak y Temin, 1973). Factor de crecimiento Insulínico I (IGF-I) y Somatomedina C son los diferentes nombres que recibe este homólogo de la proinsulina humana. Existe otra somatomedina, denominada factor de crecimiento insulínico II (IGF-II), homóloga al IGF-I. IGF I es más dependiente de GH y más potente promoviendo el crecimiento; mientras que IGF-II tiene una mayor actividad insulínica que IGF-I. El homólogo en la rata al IGF-II humano se secuenció como una actividad estimuladora de la multiplicación celular (AMS) (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.5.3.1.- Somatomedinas en otras especies.

Las estructuras de las somatomedinas están muy conservadas en las distintas especies. La rata tiene dos formas de somatomedinas homólogas a las existentes en humanos. La secuencia de aas de la IGF I bovina, es idéntica a la IGF I humana. La somatomedina de rata, dependiente de GH difiere del IGF I humano sólo en tres aas (Casella y cols., 1987), mientras que el IGF II de rata difiere del humano sólo en cinco aas. Tanto los IGFs como sus receptores han sido identificados en pájaros, peces e insectos. Las somatomedinas se encuentran fundamentalmente en sangre, aunque también puede presentar otras localizaciones como por ejemplo hígado, pulmón, riñón, corazón, músculo, testículos, próstata, cerebro y glándulas submaxilares (D'Ercole y cols., 1984).

9.5.3.2.- Efecto sobre la proliferación celular.

Aunque inicialmente se describieron como factores de crecimiento de tejido esquelético, IGF-I o IGF-II pueden estimular síntesis de DNA y proliferación celular, en células de distintos orígenes embriológicos y en distintos organismos desde invertebrados a humanos. Distintos autores descubrieron que las células no podían crecer *in vitro* en un medio de cultivo que no tuviera suero, a no ser, que se añadiera al mismo una concentración del orden micromolar de Insulina (Bottenstein y cols., 1979). A estas concentraciones tan elevadas, la insulina funcionaría interactuando con el receptor Tipo I de IGF. En la mayoría de las células, concentraciones del orden nanomolar de IGF, son ya capaces de promover el crecimiento de forma tan efectiva como lo hacen las concentraciones micromolares de insulina.

A pesar de todas estas características, se ha observado que la ausencia de otras hormonas o factores de crecimiento, los efectos de IGF I y de IGF II son muy débiles (Underwood y Van Wyk., 1992).

9.5.3.3.- Efectos de las somatomedinas en el tejido endocrino.

Las IGFs se sintetizan en las adrenales y en las gónadas, donde están encargadas de la regulación de la proliferación celular y las funciones especializadas de las glándulas. Aunque inactivas por sí mismas, las IGFs potencian las acciones esteroidogénicas de la ACTH y de la Angiotensina II en las adrenales (Penhoat y cols., 1989) o de la FSH en

las células granulosas del ovario y de LH en la producción de andrógenos por las células intersticiales tecaales en el ovario y las células de Leydig en el testículo (Kasson y Hsueh, 1987).

El mecanismo más importante mediante el que realizan su función es amplificando el efecto de las hormonas tróficas sobre la generación de AMPc (Underwood y Van Wyk., 1992).

10.- IMPLICACION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA TRANSFORMACION CELULAR.

A la vista de todos estos resultados, se puede postular que todos los factores de crecimiento y productos de oncogenes, constituyen el único sistema regulador del crecimiento fisiológico que puede igualar en importancia al sistema endocrino. Estos péptidos funcionan mediante mecanismos autocrinos, paracrinos e incluso endocrinos para regular procesos tan diversos como la diferenciación celular, el envejecimiento, la regeneración de tejidos e incluso de órganos, la curación de heridas, el crecimiento normal y el desarrollo. En los últimos años, a todas estas acciones, se ha unido una más, que es el posible papel de los factores de crecimiento en los procesos de transdiferenciación celular. Cada vez aparecen mayor número de trabajos que implican a alguno o a varios de estos factores en procesos de conversiones celulares. Por ejemplo, IGF I es capaz de convertir células hipofisarias de rata, secretoras de GH en células secretoras de Prl (Inoue y Sakai, 1991); así como NGF es capaz de inducir la diferenciación de células β pancreáticas, secretoras de insulina, en células con

comportamientos muy similares a los que presentan las neuronas (Polak y cols., 1992) o cómo el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) es capaz de actuar intracelularmente para causar la transdiferenciación de precursores de células de Schwann, derivadas de cresta neural de codornices embrionarias, en melanocitos (Sherman y cols., 1993). Hay también casos descritos donde sustancias estimuladoras de la diferenciación como el dimetilsulfóxido (DMSO) son capaces de transformar células pancreáticas acinares en células pancreáticas ductales (Arias y Bendayan, 1994). Sin embargo, estas actividades, tanto las que están directamente relacionadas con mecanismos de proliferación como las que están relacionadas con mecanismos de transformación no son exclusivas de los factores de crecimiento, sino que también se ha descrito que los factores hipotalámicos son necesarios no sólo para la diferenciación de los distintos tipos celulares adenohipofisarios (Heritier y Dubois, 1994) sino también para el mantenimiento de las proporciones relativas de células adenohipofisarias que secretan uno u otro tipo de hormona hipofisaria (Hoeffler y Frawley, 1987); así mismo, los factores hipofisarios son necesarios para la proliferación de células musculares lisas arteriales como respuesta a lesiones (Fingerle y cols., 1992).

Esta serie de trabajos nos permiten apoyar la hipótesis de que una glándula exocrina como la parótida pero del mismo origen ectodérmico que la hipófisis, pueda adquirir de forma al menos parcial, funciones propiamente hipofisarias al ser estimulada con extractos hipotalámicos.

11.- TRABAJOS DE ALVAREZ-BUYLLA.

Los trabajos de Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla (1963) demostraron que la sustitución de la hipófisis del perro joven por un trozo de su propia glándula parótida, era capaz de reinstaurar algunas de las funciones hipofisarias, cosa que no ocurría si se colocaba músculo en la silla turca esfenoidal. Los mismos autores comprobaron que los perros con autotransplante parotídeo tras hipofisectomía tenían una supervivencia mayor que los que no tenían transplante o recibían músculo (Alvarez-Buylla y cols. 1970) y que ello podía ser debido al mantenimiento de la función adrenocortical (Alvarez-Buylla y Roces de Alvarez-Buylla, 1964, 1967, 1970). También observaron el restablecimiento de las funciones sexuales (Alvarez-Buylla y cols., 1973).

12.- MODELO IN VIVO.

Los trabajos realizados posteriormente (Alvarez y cols. 1991; Granados 1993 a y b; Alvarez, 1994), confirman la modificación inducida en el transplante glandular al cabo de varias semanas de realizado éste, con la adquisición de propiedades inmunohistoquímicas similares a las hipofisarias. También se han realizado estudios, en los que se ha podido comprobar que ratas hembras hipofisectomizadas y sometidas a transplantes de glándula parótida en sustitución de la hipófisis, han recuperado de forma parcial el ciclo estral, mientras que si el transplante era de tejido graso la restitución del ciclo estral no llegaba a producirse (Alvarez, 1994). Seguía, no obstante, sin

demostrarse de forma fehaciente, que toda esta serie de modificaciones no fueran debidas a restos hipofisarios que quedasen tras la hipofisectomía, por lo que era necesario la realización de estudios *in vitro* que ayudasen a entender los mecanismos de transformación morfofuncional, por un lado y confirmasen por el otro los datos antes mencionados.

13.- MODELO IN VITRO.

Estudios experimentales, sugieren que todos los tipos celulares hipofisarios proceden de células progenitoras procedentes de la bolsa de Rathke. Se cree que las células adenohipofisarias se encuentran comprometidas a partir del día 11 de desarrollo, pero el fenotipo determinado lo consiguen después (Dubois y Hemming, 1991). Existen estudios sobre la importancia de la presencia de GnRH sobre la diferenciación de las células gonadotropas (Bégeot y cols., 1984a), así como de la importancia de la presencia de TRH en la diferenciación de las células tireotropas (Heritier y Dubois, 1993). En lo que respecta a estudios realizados sobre el metabolismo de glándulas salivares *in vitro*, se ha podido constatar que las células acinares son capaces de responder, aumentando la secreción de glicoproteínas en presencia de EGF, dexametasona y ácido retinoico (Redman y cols., 1988). Estudios preliminares, sin embargo, sugieren que las células parotídeas en cultivo sometidos a la presencia en el medio de extractos hipotalámicos artificiales, son capaces de secretar TSH (Quintanar y Stephano, estudios no publicados).

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

1.- ELECCION DE LA GLANDULA PAROTIDA. EXPLICACION DEL MODELO DE TRABAJO.

En trabajos previos, se ha comprobado mediante técnicas de inmunohistoquímica y medidas de hormonas mediante RIAs específicos (Alvarez y cols. 1991; Alvarez, 1994) cómo las células de la glándula parótida adulta transplantada a la silla turca tras hipofisectomía son capaces de secretar LH, GH y Prl. Sin embargo, la transformación no es total, probablemente por un problema de revascularización del trasplante; esta revascularización debía de ser exclusivamente de procedencia hipotalámica pues de ahí es de donde le llegan las hormonas inductoras (Sirett, 1975). Por otro lado, en los modelos *in vivo* realizados por Alvarez Buylla, siempre se planteaba el interrogante de si los resultados obtenidos se debían a que la resección hipofisaria se había realizado de forma incompleta o incluso que el efecto se debía a la acción de los factores liberadores hipotalámicos circulantes (aumentados en las hipofisectomías) ya que se sugirió que estos factores serían capaces de estimular, por sí mismos, a los órganos diana finales (Ferguson y Greenhoot, 1974) o si en realidad sería la glándula parótida transplantada (transformada gracias al estímulo de los factores hormonales hipotalámicos) la responsable de que los animales recobraran en parte sus funciones endocrinas. Para intentar despejar el interrogante, decidimos poner en cultivo células glandulares parotídeas (con lo que obviamos la posibilidad de que fueran las células hipofisarias las productoras) y las estimulamos con factores hormonales

hipotalámicos, para posteriormente estudiar el resultado. Desde el punto de vista embriológico, podemos decir, además, que la adenohipófisis y la glándula parótida derivan del ectodermo oral, mientras que las otras dos glándulas salivares mayores, son de origen endodérmico (Moore, 1982).

2.- OBJETIVOS.

Estudiar, *in vitro*, la transformación funcional de células procedentes de tejido glandular parotídeo neonatal sometido a la influencia de hormonas hipotalámicas, bien purificadas sintéticas o bien, en forma de extracto hipotalámico en crudo, tanto específico de rata como de cordero, investigando la posible producción de hormonas hipofisarias (LH y TSH) al medio de cultivo mediante radioinmunoensayo, para la detección bioquímica y mediante técnicas inmunocitoquímicas para la detección hormonal a nivel morfológico.

MATERIAL Y METODOS

1.- INSTALACIONES.

1.1.- SERVICIO CENTRAL DE CULTIVOS CELULARES.

Todas las técnicas utilizadas en en la realización de esta Tesis Doctoral que han requerido condiciones de esterilidad, han sido realizadas en el Servicio Central de Cultivos Celulares (SCCC).

El laboratorio de cultivos celulares consta de los siguientes equipos: campana de flujo laminar (Telstar MH-100), autoclave (Matachana, Miniclave 21L), incubador de CO₂ (Heraeus mod. 5060), centrífuga refrigerada (Beckman mod. TJ-6, Madrid), congelador de -20°C, nevera, microscopio invertido (DM-IL, Leica), microscopio estereoscópico (Meiji), fuentes de luz fría (Schott) y equipo de fotografía (Leica).

1.2.- INSTALACION RADIATIVA CENTRAL.

La instalación radiativa central situada en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, cuenta con unos laboratorios equipados para el manejo de isótopos radiactivos, y una sala central de medición de radioisótopos, con contadores de radiación Γ (Packard mod. Cobra autogamma) y con un espectrofotómetro de radiación β (Packard mod. 2500-TR).

1.3.- LABORATORIOS.

El departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid dispone de laboratorios equipados para la obtención de los extractos hipotalámicos,

utilizados en los cultivos celulares, así como para el montaje y la realización de los radioinmunoensayos (RIAs).

El laboratorio de Técnicas del Servicio Central de Cultivos Celulares de la Universidad Complutense de Madrid, está equipado para la realización de las técnicas de inmunocitoquímica, morfología e histología, fundamentales para el procesamiento de las muestras obtenidas en cultivo.

2.- ANIMALES.

Los cultivos de células glandulares se han realizado a partir de glándulas parótidas de crías (ambos sexos) de ratas Wistar, extraídas en el primer o segundo día de vida postnatal (considerándose como primer día, las 24 horas siguientes al nacimiento de los animales).

Algunas parótidas fueron utilizadas en el estudio de la distribución de las citokeratinas en el nacimiento.

Por otro lado, se utilizaron animales Wistar adultos 250-300 gr., criados en el Animalario Central de la Universidad Complutense (Facultad de Medicina) y en el del Departamento de Fisiología (UCM). De estos animales se extrajeron las glándulas parótidas para estudiar la distribución de las citokeratinas existentes en las glándulas del animal adulto. Estos animales se han alimentado con piensos compuestos (Panlab, Barcelona) y agua *ad libitum*. En el Animalario Central se mantienen las siguientes condiciones: 1) Ritmo luz-oscuridad en ciclos de 12 horas (8:00-20:00). 2) Temperatura controlada entre 22 ± 2 °C. 3) Ventilación

controlada.

3.- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

3.1.- TECNICAS *IN VITRO*.

3.1.1.- Cultivo en monocapa de células glandulares parotídeas.

Una de las principales consideraciones a tener en cuenta a la hora de establecer un protocolo que implique el uso de técnicas de cultivo celular es, la elección del sistema de cultivo. En nuestro caso, nos decidimos por el sistema de cultivo en monocapa debido a que era el que más se adecuaba a nuestros propósitos.

Entre sus principales ventajas, caben destacar las siguientes:

1.- Es un sistema de cultivo eficaz para la producción celular a gran escala, ya que permite aumentar de forma significativa la superficie de cultivo con respecto al volumen de medio de cultivo a utilizar.

2.- Resulta muy sencillo cambiar el medio de cultivo y lavar la monocapa celular antes de añadir medio fresco.

3.- Si se necesita mantener un número elevado de células, a este sistema de cultivo se le pueden aplicar técnicas de perfusión continua de medio que nos permitan asegurar que todas las células reciben los nutrientes que les son imprescindibles. De esta manera, se consigue aumentar de forma considerable la eficacia del sistema, ya que es mucho más sencillo perfundir cultivos en monocapa debido a que las

células están adheridas a la superficie de la placa y por tanto inmovilizadas, por lo que no se requiere el uso de sistemas de filtro.

4.- Por otro lado, las células expresan con más facilidad el producto objeto de estudio, cuando se encuentran adheridas a un sustrato.

5.- Este sistema de cultivo es el más eficaz cuando se trata de poner en marcha una técnica que requiere el uso de proporciones distintas tanto de medios de cultivo como de número de células.

6.- Los cultivos en monocapa, son además, los más flexibles ya que pueden usarse para todos los tipos celulares, siendo especialmente útil cuando se tienen que cultivar distintos tipos celulares.

3.1.1.1.- Establecimiento de Cultivos Primarios de células glandulares parotídeas.

El cultivo se realizó según el método de Quintanar-Stephano y Martín (datos no publicados), sometido a ligeras modificaciones.

Se utilizaron, por cultivo, 10 ratas Wistar de 1 día de edad (1 pn) de las que se extrajeron ayudándonos de una lupa estereoscópica (Wild, M3Z), 20 glándulas parótidas.

Extracción de las glándulas.

Las crías se lavan en alcohol de 70°, se decapitan y la cabeza se pone en una placa de Petri de plástico de 30 mm.

Posteriormente, se procede a la resección del pabellón auditivo. Utilizando esta zona de referencia, se realizó una incisión lateral en la región auriculo temporal.

Posteriormente, estas glándulas se recogen en placas de Petri de plástico de 30 mm de diámetro (NUNC, Intermed) y se lavan en una solución salina tamponada pH= 7.4 de Hanks (Sigma), a la que se le ha añadido 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de fungizona (JRH Biosciences). Todas las operaciones se realizaron en condiciones de asepsia y en cámara de flujo laminar.

La dispersión mecánica de las células de parótida se hace en grupos de 20 glándulas. Estas se disgregan y posteriormente se trasladan a tubos cónicos estériles de polibutadieno estireno (17 X 120 mm, NUNC), y se centrifugan durante 10 min, 1000 rpm y 4°C. El pellet obtenido se resuspende en 7.5 ml de solución de Hanks libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ con 0.1 mg/ml de Colagenasa P (Boehringer-Mannheim) y 0.3 mg/ml de hialuronidasa (Boehringer-Mannheim). Todos los tubos se incuban durante 50 min. en un incubador a 37°C con agitación manual periódica y una atmósfera de un 95% de O₂ y un 5% de CO₂. Al final de esta primera incubación, el contenido de los tubos se pipetea varias veces con una pipeta Pasteur a la que previamente se le habrá estrechado la punta, para facilitar de esta forma la dispersión celular. Posteriormente, se centrifugan los tubos 10 min. a 1000 rpm y a 4°C, y se retira la solución enzimática, resuspendiéndose el pellet, en 2.5 ml de solución de Hanks sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ a la que se añadirá 0.1

mg/ml de tripsina (Boehringer-Mannheim). Esta solución se mantendrá 10 min. a temperatura ambiente, en posición vertical y con agitación periódica.

Al final de esta segunda incubación manual se procedió a realizar una nueva dispersión celular mecánica con la ayuda de la pipeta Pasteur. Las células se separaron de la solución enzimática centrifugando (10 min, 1000 rpm, 4°C) y lavando dos veces: la primera, con solución de Hanks a la que siempre deben añadirse los antibióticos y antifúngicos, y un segundo lavado con medio RPMI 1640 completo. Los precipitados finales se suspendieron en 0.5 ml de solución de Hanks completa a los que se añadieron 5 ml de medio RPMI 1640 que contenía un 4% de Albúmina de Suero Bovino (BSA Fracción V, Sigma Chemicals), HEPES 10mM (HEPES 1M, Sigma Chemicals) y los antibióticos. Este último fluido de lavado, se quitó después de una centrifugación (10 min a 1000 rpm, 4°C). Posteriormente, las células se resuspenden en RPMI 1640 completo, de donde se separa una alícuota de 10 μ l para el conteo de células en una cámara de Neubauer y para la realización de las pruebas de viabilidad celular [Método de exclusión: Trypan Blue (Sigma Chemicals)]. Posteriormente, las células se distribuyen en placas de 24 pocillos, siendo el volumen de medio total por pocillo de 500 μ l.

3.1.1.2.- Tratamiento de los pocillos y cambio del medio de cultivo.

El cultivo, una vez colocado en la placa, se deja estabilizar

una semana antes de comenzar el tratamiento; éste se prolongó durante tres semanas más.

Los pocillos recibieron dos dosis al día, dejando 10h de diferencia entre tratamientos. El medio de cultivo se sustituyó dos veces por semana, guardándose los medios retirados a -20°C hasta el momento de la realización de los RIAs de LH y de TSH.

3.1.1.3.- Controles.

Se realizaron distintos tipos de controles:

- a) Pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas a las que solo se añadía medio RPMI 1640 completo (RPMI).
- b) Pocillos sin células glandulares parotídeas a los que se añadía medio RPMI 1640 completo en el que se había disuelto el equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día (es decir, medio hipotálamo de rata por pocillo y dosis) (XH).
- c) Pocillos sin cultivo de células glandulares parotídeas a los que se añadía medio RPMI 1640 completo en el que se habían disuelto los factores hipotalámicos aislados en las mismas concentraciones utilizadas en los pocillos con células (XF).

Estos dos últimos controles b y c nos permitieron conocer el grado de degradación tanto de las hormonas existentes en los extractos hipotalámicos como de los factores hipotalámicos aislados, debido a las enzimas presentes en el suero,

condiciones de humedad, temperatura y porcentaje de CO₂ en las que se lleva a cabo el experimento.

3.1.1.4.- Tratamientos realizados y número de semanas de duración.

Se realizaron distintos experimentos en los que se midió mediante técnicas de RIA la concentración de LH en los medios de cultivo. En los casos en los que se indique, también se midió la concentración de TSH y se hicieron estudios de inmunocitoquímica con anticuerpos anti LH y con anticuerpos anti TSH.

a) *Primer grupo de experimentos.*

Los controles utilizados (n=20) fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo a las que sólo se les añadió medio RPMI completo.

Otra parte de los pocillos (n=12) con cultivo de células glandulares parotídeas, recibieron un estímulo que consistió en extracto hipotalámico de rata, preparado de acuerdo al método que Lima describió en 1988, en una cantidad equivalente a un hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento, dividido en dos dosis, mañana y tarde.

En este primer grupo de experimentos se midieron las concentraciones de LH y TSH existentes en los medios de cultivo.

b) *Segundo grupo de experimentos.*

En este segundo grupo de experimentos se hicieron cuatro

grupos de pocillos:

- Quince de estos pocillos se mantuvieron como controles en los que había células glandulares parotídeas en cultivo a las que sólo se les añadió medio RPMI.

- Otro grupo de pocillos (n=15) con cultivo de células glandulares parotídeas, recibieron un aditivo que consistió en extracto hipotalámico de cordero, preparado de acuerdo al mismo método descrito por Lima en 1988, en una cantidad equivalente en peso fresco a 0.25 hipotálamos de rata por pocillo y por día de tratamiento, dividido en dos dosis, mañana y tarde.

- Se hizo un tercer grupo de otros 15 pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas, que recibieron un estímulo que consistió en extracto hipotalámico de cordero, en una cantidad equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento, dividido en dos dosis, mañana y tarde.

- Por último, un cuarto grupo de pocillos (n=15), con cultivo de células glandulares parotídeas, que recibieron un aditivo que consistió en extracto hipotalámico de cordero, en una cantidad equivalente a 2 hipotálamos de rata por pocillo y por día de tratamiento, dividido en dos dosis, mañana y tarde.

En este segundo grupo de experimentos se midieron las concentraciones de LH existentes en los medios de cultivo. También se realizaron pruebas de inmunocitoquímica para detectar mediante esta técnica la presencia de esta hormona, así como para detectar la presencia de las citokeratinas.

c) *Tercer grupo de experimentos.*

En este tercer grupo de experimentos se hicieron dos grupos de pocillos.

- Primer grupo: Pocillos denominados control (n=27), en los que había células glandulares parotídeas en cultivo que recibieron un tratamiento que consistió en extracto hipotalámico de cordero, en una cantidad equivalente en peso a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento, dividido en dos dosis, mañana y tarde.

- Segundo grupo: Pocillos (n=12) con el mismo tratamiento que sus controles pero a los que además habíamos añadido anticuerpo anti LHRH (Elaborado en el laboratorio de Endocrinología Experimental de la Facultad de Medicina, según el método de Goodfriend y cols., 1964) a una dilución 1:100.

En este tercer grupo de experimentos se midieron las concentraciones de LH existentes en los medios de cultivo.

d) *Cuarto grupo de experimentos.*

Hemos dividido los pocillos en dos grupos.

- Primer grupo: Pocillos control (n=20), en los que había células glandulares parotídeas en cultivo a las que solo se les añadió medio RPMI completo.

Y por otro una mezcla de hormonas hipotalámicas (LHRH y TRH) + EGF a distintas concentraciones:

- Segundo grupo: Los pocillos (n=27) se tratan con 3 combinaciones de factores hipotalámicos aislados (+ EGF)

diferentes:

- * [TRH+LHRH] + EGF.
- * [TRH+GHRH+CRH] + EGF.
- * [TRH+LHRH+GHRH+CRH] + EGF.

Estas combinaciones de factores, se emplearon a tres concentraciones distintas:

- 2 μ g de cada factor/pocillo/día.
- 4 μ g de cada factor/pocillo/día.
- 10 μ g de cada factor/pocillo/día.

En este cuarto grupo de experimentos se midieron las concentraciones de LH y TSH existentes en los medios de cultivo.

3.1.2.- Soluciones, medios y reactivos más importantes utilizados.

3.1.2.1.- Solución de Hanks.

Se autoclava a un pH menor de 6.5 (1 bar) durante no menos de 20 min. Antes de su uso, se debe ajustar el pH a 7.4 con NaOH estéril o con HEPES 20 mM.

Se utiliza como medio general de manejo de tejidos, sobre todo durante los lavados y la disección de las glándulas.

Siempre es conveniente añadir los antibióticos y antifúngicos en las soluciones de manejo general, ya que es durante el proceso de manipulación del tejido, donde aumentan las posibilidades de contaminación.

3.1.2.2.- Solución Completa de Hanks.

Si esta solución salina, se usa como parte integrante del medio de cultivo deberá añadirsele NaHCO_3 4mM (Biochrom, Seralab).

3.1.2.3.- Albúmina de suero bovino (BSA).

Esta proteína, mayoritaria en el suero, realiza distintas funciones tanto *in vivo* como en los medios libres de suero que se utilizan *in vitro*. Entre otras funciones se caracteriza por:

- Comportarse como tampón fisiológico en los casos en los que se produzcan modificaciones de pH.
- Ser transportador de hormonas, factores de crecimiento, lípidos (colesterol, ácidos grasos, etc), vitaminas liposolubles, tóxicos u otros metabolitos.
- Actuar como protector celular en casos de daños provocados por fricciones mecánicas.

Nosotros hemos utilizado BSA Fracción V obtenida por choque térmico proporcionada por Sigma.

3.1.2.4.- Medio RPMI completo.

- RPMI 1640 (Sigma). Medio Base.
- 10% Suero Bovino Fetal (Cultek).
- 0.3 mg/ml de L-Glutamina (Sigma).
- 10 mM de HEPES (Sigma).
- 150 UI/ml de penicilina, (JRH Biosciences).
- 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (JRH Biosciences).

- 2.5 µg/ml de fungizona (JRH Biosciences).

Todos los productos y medios de cultivo que no hayan sido previamente Γ irradiados, deberán ser filtrados y esterilizados antes de su uso, mediante filtros de acetato de celulosa de tamaño de poro menor de 0.20 µm (Sartorius), acoplables a jeringuillas de 10 ml (Plastipak B-D).

3.1.3.- Factores aislados.

Los factores aislados empleados fueron los siguientes:

- LHRH (Luforán, Serono, Madrid).
- GHRH (Geref, Serono, Madrid).
- TRH (TRH PREM, PREM, Barcelona).
- CRH (Bachem, California).
- EGF obtenido por ingeniería genética por Serono, Madrid.

3.2.- OBTENCION DE LOS EXTRACTOS HIPOTALAMICOS DE RATA Y DE CORDERO.

El procesamiento de los hipotálamos tanto de rata como de cordero, se realizó según el método descrito por Lima en 1988.

Los hipotálamos de rata se procesan de 10 en 10, estimándose el peso de cada hipotálamo de rata en 10 mg. Se homogenizan 10 hipotálamos de rata por cada 5 ml de ácido acético 2M. La homogenización se realiza primero con una varilla de teflón y posteriormente mediante el uso de un sonicador. Una vez llegados a este punto del proceso, los hipotálamos se hierven

durante 5 min y el contenido de cada tubo se decanta. Se añaden 5 ml más de ácido acético 2M por cada 10 hipotálamos, se agita durante unos minutos y posteriormente se centrifuga durante 30 min a partir del momento en que se alcanzan las 17000 rpm. Posteriormente, se une el contenido de todos los tubos de 10 hipotálamos, procesados cada vez. Se agita durante unos minutos, y se vuelve a dividir en tubos haciendo una equivalencia de un hipotálamo de rata por cada ml del conjunto de extracto hipotalámico. Posteriormente estos extractos se congelan y se liofilizan.

Cuando se procesó el hipotálamo de cordero se hizo la equivalencia en peso, considerándose 10 mg de hipotálamo de cordero equivalentes a 1 hipotálamo de rata. El resto del proceso hasta conseguir el extracto hipotalámico final, se realizó de la misma manera.

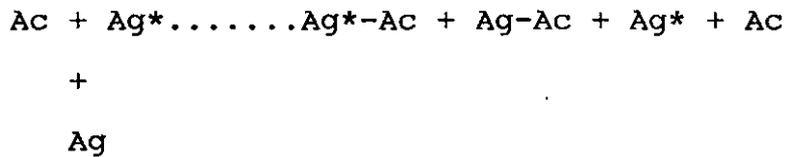
3.3.- METODO ANALITICO.

3.3.1.- Radioinmunoanálisis (RIA).

3.3.1.1.- Generalidades.

En 1959, Yalow y Berson propusieron por vez primera un método radioinmunológico que permitió valorar la insulina. Desde entonces, estas técnicas se han extendido. La base del método consiste en la inhibición competitiva de la unión de una sustancia fría (no marcada radiactivamente) a su anticuerpo específico (Ac) por la misma sustancia previamente marcada con un isótopo radiactivo. A la sustancia sin marcar, la llamamos antígeno (Ag), mientras que a la sustancia marcada

la llamamos (Ag*). La reacción de competición es la siguiente:



La concentración de Ag (hormona) presente en una muestra problema se puede determinar construyendo una curva patrón en la que las concentraciones del Ac y del Ag* marcado permanecen constantes, aumentando progresivamente la concentración de Ag, hormona sin marcar. Al aumentar la concentración de ésta, los centros de unión del Ac se saturan progresivamente, de modo que éste tiene menor capacidad para unirse al Ag* marcado. La disminución de Ag* marcado ligado al Ac nos indica la presencia de Ag sin marcar.

Después de la incubación de los tres componentes esenciales (Ag, Ag* y Ac), los complejos Ag*-Ac y Ag-Ac se separan del Ag* marcado que no reaccionó. La radiactividad presente en el complejo Ag*-Ac se mide en un contador de radiación F.

3.3.1.2.- Representación gráfica de la curva patrón.

De cada punto de la curva patrón se determinan las cuentas por minuto (cpm), procedentes del complejo Ag*-Ac. Cada punto

de la curva se valora por triplicado, obteniéndose las cpm medias de cada uno de ellos.

La captación se determina mediante la fórmula:

$$\frac{B-N}{B_0-N} \times 100$$

Donde B mide la unión de la hormona marcada con el Ac en presencia de concentraciones conocidas de la hormona sin marcar, B_0 mide la unión máxima de la hormona marcada con el Ac en ausencia de la hormona sin marcar y N mide la radiactividad residual o inespecífica como consecuencia de uniones con la pared del tubo en el que se realiza el análisis. No lleva por tanto ni Ac ni hormona fría (sin marcar).

Utilizamos un papel semilogarítmico, con el eje de ordenadas dividido de forma lineal y el eje de abcisas logarítmicamente. En el primero expresamos el porcentaje de captación específica de cada punto y en el segundo la concentración de Ag (hormona) sin marcar que se ha añadido a cada punto. De este modo, y uniendo todos los puntos, obtenemos un trazo sinusoidal. La concentración de Ag presente en la muestra se determina por la radiactividad presente en el complejo Ag^*-Ac correspondiente, interpolándolo en la curva que se construye con las soluciones patrón.

3.3.1.3. Tampones y soluciones.

- Tampón I: Tampón Fosfato 0.5 M, pH= 7.6. Se prepara a partir de dos soluciones previas: a) Solución de fosfato monosódico 0.5 M (Na_2HPO_4) y b) Solución de fosfato monopotásico 0.5 M (KH_2PO_4). Se mezclan 418 ml de solución a) con 82 ml de solución b), midiéndose posteriormente el pH. Si éste es superior a 7.6 entonces se añade solución b) Si es inferior a 7.6 entonces se añade solución a). Se emplea para el marcaje y para preparar el tampón II.

- Tampón II: Tampón fosfato 0.01M (pH= 7.6) y 0.15 M de ClNa. Se realiza diluyendo el tampón I, 50 veces en agua bidestilada y posteriormente se le añaden 8.8 gr. de NaCl/litro. Se utiliza para eluir la columna de marcaje y para preparar los tampones III y IV.

- Tampón III: Tampón fosfato 0.01 M, 0.15 M de ClNa, 1% de albúmina de suero bovino (BSA) fracción V pH= 7.6. Al tampón II se le añade 1 gr. de albúmina por 100 ml de tampón (1% peso/volumen). Se emplea para las diluciones de las hormonas de la curva estandar, para completar las alicuotas de las muestras problema hasta el volumen empleado en la curva estandar del RIA y para diluir las hormonas marcadas.

- Tampón IV: Tampón fosfato 0.01 M, 0.15 M de ClNa, ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.025 M y Titriplex 0.025 M, pH= 7.6. Se hace a partir del tampón II al que se le añaden 0.95 gr. y 0.84 gr. de EDTA y Titriplex respectivamente, ajustándose de nuevo el pH a 7.6. Se emplea para eluir el primer anticuerpo.

3.3.1.4.- Reactivos utilizados durante la realización del RIA de LH y de TSH.

Los antígenos puros para marcar, para la curva patrón, han sido suministrados generosamente por la Human Pituitary Agency del NIAMDDK, NIH (Bethesda, USA).

- La hormona luteinizante (LH) para iodar (NIAMDDK rat-LH-I9), Se presenta liofilizada con una actividad biológica aproximada de 888 UI/mg y con una contaminación menor del 0.1% con respecto al resto de las hormonas hipofisarias. No se reconstituye todo el liofilizado sino que se pesa una parte almacenándose el resto a -20°C . La LH pesada se reconstituye en PBS a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, distribuyéndose en alícuotas de 2.5 μg en 25 μl , que se almacenan a -20°C . Se pueden utilizar por un tiempo no superior a tres meses.

- La LH (NIAMDDK rat-LH-RP-3) para la curva patrón, se obtiene liofilizada. se reconstituye en tampón III y se toman alícuotas de 150 ng/30 μl que se guardan a -20°C . La curva patrón está comprendida en un rango de concentraciones de 0.001 a 2.5 ng de LH, en 300 μl de tampón III.

- La hormona estimuladora del tiroides (TSH) para iodar (NIAMDDK rat-TSH-I8). Se presenta liofilizada con una actividad biológica aproximada de 35 UI/mg y con una contaminación menor del 5% con respecto al resto de las hormonas hipofisarias. No se reconstituye todo el liofilizado sino que se pesa una parte almacenándose el resto a -20°C . La TSH pesada se reconstituye en PBS a una concentración de 100

$\mu\text{g/ml}$, distribuyéndose en alícuotas de $2.5 \mu\text{g}$ en $25 \mu\text{l}$, que se almacenan a -20°C . Se pueden utilizar por un tiempo no superior a tres meses.

- La TSH (NIAMDDK rat-TSH-RP-2) para la curva patrón, se obtiene liofilizada. Se reconstituye en tampón III y se distribuye en alícuotas de $200 \text{ ng}/40 \mu\text{l}$ que se guardan a -20°C . La curva patrón está comprendida en un rango de concentraciones de 0.0025 a 10 ng de TSH, en $600 \mu\text{l}$ de tampón III.

Los anticuerpos específicos de las hormonas (LH y TSH) fueron los siguientes:

- Anticuerpo anti LH (rabbit anti rat-LH-S-10). Se presenta en forma líquida en PBS con un 2% de suero normal de conejo y un 0.01% de metiolato. Se hace una dilución 1/10 en tampón IV y se almacena en alícuotas de $100 \mu\text{l}$ a -20°C hasta su utilización posterior. La dilución de trabajo es 1/18000.

- Anticuerpo anti TSH (rabbit anti rat-TSH-S-5). Se presenta en forma líquida en PBS con un 2% de suero normal de conejo. Se almacena puro en alícuotas de $100 \mu\text{l}$ a -20°C hasta su utilización posterior. La dilución de trabajo es 1/9000.

3.3.1.5.- Marcaje de hormonas con isótopos radiactivos.

Los isótopos más utilizados en el RIA son ^{131}I , ^{125}I , ^{14}C y ^3H . Como trazador para las hormonas proteicas, se utiliza ^{125}I , que presenta una vida media mayor que el ^{131}I . El ^{125}I tiene la ventaja de poseer una actividad específica mayor que el ^3H y de emitir, además, radiaciones Γ que son más fáciles

de medir que las radiaciones β procedentes del ^3H , ya que para la medida de éstas últimas se requiere el uso de líquido de centelleo (Arce, 1994).

Marcaje de LH y de TSH con ^{125}I .

El marcaje tanto de LH como de TSH, se realiza por el método de la lactoperoxidasa (Sigma). Esta técnica se basa en la oxidación por H_2O_2 , en presencia de lactoperoxidasa, del yoduro radiactivo en yodo atómico, introduciéndose éste último en uno de los carbonos del grupo tirosilo de la hormona polipeptídica.

Se toma una alícuota de la hormona, que contiene $2.5 \mu\text{g}$ de la misma en $25 \mu\text{l}$ de NaHCO_3 (Merck). A continuación se añaden $25 \mu\text{l}$ de tampón I para tamponar la solución a $\text{pH} = 7.6$, añadiéndose posteriormente 0.5 mCi de ^{125}I y $0.5 \mu\text{g}$ de lactoperoxidasa. Se deja reaccionar durante 4 min, agitando ocasionalmente. La reacción se detiene por adición de $100 \mu\text{l}$ de tampón III y la mezcla de reacción se pasa inmediatamente a una columna de separación que permite aislar la hormona marcada del ^{125}I que no ha reaccionado.

Se utiliza una columna de vidrio de $10 \times 0.5 \text{ cm}$ que contiene gel de Sephadex G-50. La columna se empaqueta por gravedad, se equilibra con tampón II y se satura previamente mediante la adición de un volumen de tampón III equivalente al volumen vacío de la columna para prevenir la posible adsorción de la hormona marcada a la fase estacionaria o a las paredes de la columna.

La mezcla del marcaje se eluye con tampón II, recogién dose fracciones de 0.5 ml en tubos de plástico previamente albuminizados. Las fracciones se recogen utilizando un colector de fracciones automático (Isco). Se cuenta la radiactividad contenida en 10 μ l de cada fracción y se representa graficamente. El primer pico de radiactividad corresponde a la hormona marcada con ^{125}I , mientras que el segundo pico corresponde al ^{125}I libre. Se mezclan las fracciones correspondientes a la zona descendente del primer pico, repartiéndose en alícuotas de 400 μ l, que se almacenan congeladas a -20°C hasta su uso en el RIA.

Actividad Específica.

La actividad específica se calcula por un método de precipitación de proteínas inespecífico con ácido tricloroacético (TCA) (Merck).

Se toma una alícuota de 1 μ l del producto de radioiodación sobre 2 ml de tampón II, se agitan y se toman ocho alícuotas de 50 μ l de la mezcla. A la mitad de ellas se les añaden 0.5 ml de tampón III, para aumentar el contenido proteico, lo que permite asegurar la precipitación total de la hormona marcada, al añadir posteriormente 2 ml de TCA al 10% con agitación. Los tubos se dejan reposar durante 15 min. a 4°C , y se centrifugan a 3000 rpm a 4°C durante 15 min. Se aspira el sobrenadante y se cuenta la radiactividad de todas las alícuotas en un contador de radiación Γ , calculándose la media de c.p.m. en cada caso (precipitado y sin precipitar).

Estos valores nos permitirán calcular posteriormente el rendimiento del marcaje y la actividad específica. El primero se expresa en porcentaje mientras que la segunda se expresa en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de hormona.

$$\text{Rendimiento del marcaje: } \frac{\text{c.p.m. del precipitado}}{\text{c.p.m. sin precipitar}} \times 100$$

$$\text{Actividad Específica: } \frac{\text{Rendimiento (\%)} \times \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}}{\mu\text{g de hormona}}$$

3.3.1.6.- Proceso del Radioinmunoanálisis (RIA).

Se disponen una serie de tubos de RIA en los que se pipeteen las curvas estándar en un rango de concentraciones entre 0.001 y 2.5 ng para la LH y entre 0.0025 y 10 ng para la TSH en 200 μl con tampón III. Este paso concreto se realiza por quintuplicado.

En otra serie de tubos se pipeteen 100 μl de la muestra previamente agitada; posteriormente, estos mismos tubos se completan con 100 μl de tampón III, consiguiendo un volumen final de 200 μl .

Cuando se han completado todos los tubos se procede a pipetear los anticuerpos anti LH de rata S-10 (en los RIAs en los que se desee medir LH en las muestras) y anti TSH de rata S-5 (en los RIAs en los que se desea medir TSH en las muestras).

El anticuerpo anti-LH de rata se utiliza a una dilución final

de 1/18000 y se utiliza en una solución que contiene un 0.04% de suero de conejo y un 0.16% de Tritón X-100 en Tampón IV. De esta solución se añaden 300 μ l a cada tubo.

El anticuerpo anti TSH de rata se utiliza a una dilución final de 1/9000 y se utiliza en una solución que contiene un 0.08% de suero de conejo y un 0.33% de Tritón X-100 en tampón IV. De esta solución se añaden 600 μ l a cada tubo.

Se preincuba durante 72h en nevera (2-4°C).

Se mezclan 50 μ l de LH-I¹²⁵ (10000 cpm/tubo) ó 200 μ l de TSH-I¹²⁵ (20.000 cpm/tubo) en tampón III.

Se incuba 48h en nevera (2-4°C).

Posteriormente, se procede a la adición del segundo anticuerpo. Se pipetearán 500 μ l por tubo de una mezcla que contiene un 10% en peso de polietilen glicol (PEG) y la concentración mínima de anti IgG de conejo (desarrollado en oveja) capaz de provocar la máxima precipitación. En nuestro caso sólo fueron necesarios 10 μ l de suero de oveja.

Se agitan los tubos y se incuban durante 20 min, a 4°C y se precipita el complejo 2º anticuerpo-1er anticuerpo mediante una centrifugación a 3000 rpm a 4°C, durante 15 min.

El sobrenadante se aspira y el precipitado se cuenta en un contador de radiación Γ .

3.4.- METODO INMUNOCITOQUIMICO.

En este trabajo, se ha estudiado la presencia de hormonas hipofisarias como la LH y la TSH en células glandulares parotídeas en cultivo sometidas a tratamientos con extractos

hipotalámicos de rata o de cordero. El estudio analítico se ha realizado mediante RIAs, mientras que la localización morfológica de la expresión de estas sustancias se ha realizado mediante métodos inmunocitoquímicos.

Los métodos inmunocitoquímicos se basan en la capacidad que tienen los anticuerpos para reconocer específicamente determinadas sustancias, los antígenos, a los que se unen de forma no covalente.

Los anticuerpos primarios utilizados proceden del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney diseases (NIDDK) y han sido donados por el Dr. AF. Parlow (HARBOR-UCLA MEDICAL CENTER, CA, USA). Los anticuerpos utilizados fueron policlonales anti-rat LH-IC-1 a una dilución de 1:100 y anti-rat TSH-IC-1 a una dilución de 1:120, desarrollados ambos en cobaya, y utilizando como inmunógenos tanto LH como TSH procedentes de hipófisis congeladas de rata y posteriormente purificadas.

A fin de evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo primario hemos utilizado dos de los métodos más usuales: el método inmunoenzimático indirecto y el método ABC. En el método inmunoenzimático indirecto, el primer anticuerpo se evidencia por la unión de un anticuerpo secundario que se visualiza mediante una reacción histoquímica para la peroxidasa de rábano picante (HRP). La reacción utilizada es la reacción descrita por Graham y Karnovsky en 1966, en la que se utilizaba como cromógeno diaminobenzidina (DAB).

En nuestro caso en vez de utilizar un segundo anticuerpo

hemos utilizado una modificación, que consiste en el empleo de la Proteína A, procedente de la bacteria, *Staphylococcus aureus*. Esta proteína, tiene la ventaja de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas G, independientemente de la especie animal de la que procedan. Esta proteína A irá ligada a HRP.

El método inmunoenzimático indirecto (Proteína A ligada a peroxidasa) sufrirá el proceso del revelado de la peroxidasa, siendo el sustrato utilizado el agua oxigenada y el cromógeno oxidable utilizado la DAB que dará lugar a un precipitado visible al microscopio óptico convencional.

Entre las ventajas de utilizar métodos indirectos podemos destacar que los anticuerpos o proteínas anti-IgG son más específicos; que dos moléculas de proteína A anti IgG marcadas se pueden unir a cada molécula de primer anticuerpo, con lo que se amplifica la reacción, consiguiéndose de esta forma una mayor sensibilidad. Por último, con un segundo anticuerpo marcado, sólo se pueden reconocer primeros anticuerpos desarrollados frente a distintas sustancias, siempre que estos primeros anticuerpos se hayan desarrollado en la misma especie animal, problema que se obvia con el uso de la proteína A.

En el método ABC (Avidin-Biotin Complex) se utiliza un segundo anticuerpo biotinilado, esto es, un segundo anticuerpo al que se han unido de forma covalente una gran cantidad de moléculas de biotina. La detección de este segundo anticuerpo en el tejido requiere varios pasos en los

que interviene una proteína, la avidina, capaz de unirse de forma muy específica y con gran afinidad a la biotina. Cada molécula de avidina presenta cuatro sitios de unión para la biotina. En un primer paso, se pone en contacto una solución de avidina con otra solución que contiene una cantidad adecuada de una molécula biotinilada, que en nuestro caso es HRP. Con esto se consigue la formación de complejos avidina-biotina-HRP, si bien quedan libres al menos una parte de los sitios de unión de la avidina, dispuestos a unirse a nuevas moléculas de biotina (Merchán-Pérez, 1992).

Tendremos así un segundo anticuerpo biotinilado fijado al anticuerpo específico que se encuentra situado sobre las células parotídeas fijadas y por otra parte un complejo avidina-biotina-HRP capaz todavía de unirse a otras moléculas biotiniladas. Si a continuación se pone en contacto el complejo avidina-biotina-HRP con las células parotídeas fijadas, se producirá la unión de los citados complejos al segundo anticuerpo (biotina-avidina-biotina-HRP). Como la molécula unida a la avidina es HRP, el siguiente paso consistirá en el revelado de la peroxidasa al igual que sucede en el caso del método inmunoenzimático indirecto.

Tanto el método inmunoenzimático indirecto como el método ABC nos proporciona preparaciones estables, fácilmente fotografiables y que pueden estudiarse en un fotomicroscopio convencional sin necesidad de equipos especiales de iluminación.

3.4.1.- Procesado de las muestras para inmunocitoquímica.

Al finalizar las tres semanas de tratamiento, las células glandulares parotídeas desarrolladas en cultivo, se fijaron en etanol de 70° durante 24h y posteriormente se lavaron en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6 durante 24h antes de la realización del experimento. Este fijador se utilizó en los casos en los que se utilizaron los anticuerpos anti-LH o anti-TSH, y anti-citokeratinas en tejido glandular parotídeo procedente de animales adultos y de animales recién nacidos (estudios *in vivo*).

Cuando se empleó el anticuerpo anti-citokeratinas, el fijador utilizado fue metanol al que se añadió un 3% de agua oxigenada. Este fijador se mantuvo en contacto con las células durante media hora y posteriormente se procedió al lavado de las mismas en un baño de agua corriente durante 30s. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min. cada uno, en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6.

3.4.2.- Test inmunológico para detectar proteínas de citoesqueleto, concretamente citokeratinas.

Las proteínas existentes en los filamentos intermedios citoplasmáticos, forman una parte fundamental del citoesqueleto y se han convertido en unas estructuras muy útiles en los procesos de identificación celular. Se han descrito muchos subgrupos de filamentos, basándose en la morfología, composición peptídica e inmunogenicidad de los mismos. Se ha podido comprobar que la distribución de éstos

es específica del tejido en el que se encuentran. Por ejemplo, los epitelios de la mayor parte de los tejidos contienen citokeratinas, mientras que la mayoría de las células procedentes de tejidos mesenquimáticos contienen vimentina. La desmina, está presente entre otros tipos celulares en las fibras musculares, mientras que la proteína de los neurofilamentos aparece en neuronas y la GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) aparece en astrocitos.

Se pueden distinguir un total de 19 polipéptidos de citokeratinas, si se realiza una clasificación según los puntos isoeléctricos y el peso molecular (Moll y cols., 1982).

El anticuerpo anti citokeratinas N° 1-8 (Boehringer-Mannheim) se trata de una IgG_{2a} monoclonal procedente de híbridos realizados con células de ratón y reconoce distintos clones de citokeratinas concretamente el tipo 1 y el tipo 8.

Hemos seleccionado estos subtipos de citokeratinas porque son dos de las subfamilias que aparecen típicamente en epitelios sencillos.

3.4.2.1.- Inmunocitoquímica realizada a células procedentes de glándulas parotídeas en cultivo: Estudio *in vitro*.

Se utilizaron cultivos procedentes de células glandulares parotídeas sometidas a tratamiento con extracto hipotalámico de rata y de cordero, se fijaron en etanol 70° durante 24 h y posteriormente se lavaron en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6 durante 24h antes de la realización del experimento. La

técnica de inmunocitoquímica se realizó mediante el método ABC. El fijador utilizado fué metanol con un 3% de agua oxigenada durante 30 min. El procesado posterior de las células fué el siguiente:

- 1.- Lavado en TRIS 0.05 M pH= 7.6, 5 X 5 min.
- 2.- Preincubación en TRIS 0.05 M pH= 7.6 con un 10% de suero normal de caballo a temperatura ambiente durante 30 min.
- 3.- Primer anticuerpo, anti citokeratinas n° 1-8 (Boehringer-Mannheim, monoclonal, hecho en ratón). Se empleó una dilución 1:50. Las diluciones se realizaron en tampón TRIS 0.05 M pH= 7.6. El anticuerpo se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1h y 30 min.
- 4.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 4 X 2 min.
- 5.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 2 X 15 min.
- 6.- Segundo anticuerpo, Anti-mouse IgG (Biotinilado) hecho en caballo. Dilución de trabajo: 1: 20. Lo mantenemos a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.
- 7.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 4 X 2 min.
- 8.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 2 X 15 min.
- 9.- Complejo ABC, 60 min. Mezclar 10 μ l. del reactivo A con 10 μ l. del reactivo B y con 980 μ l. de PBS 2.5x. (El PBS 2.5x, se prepara a partir de PBS 5x pH= 7.3, mezclado a partes iguales con agua destilada; el PBS es un tampón fosfato salino). Este complejo se prepara 30 min antes de su uso y se mantiene en oscuridad.
- 10.- Lavado en PBS 1x, 1 X 5 min.
- 11.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 1 X 5 min.

12.- Lavado en TRIS 0.05M pH= 7.6, 1 X 5 min.

13.- Revelado de la peroxidasa con DAB (6 mg/10 ml) y agua oxigenada 3% en TRIS 0.05M pH= 7.6. Disolver 6 mg de DAB en 10 ml. de TRIS 0.05M pH= 7.6, sonicar. Añadir 5 μ l. de agua oxigenada (Sigma, 30%). Incubar las preparaciones durante 5 min., bajo agitación suave y oscuridad. La DAB es tóxica, debe usarse bajo la campana extractora de gases, con guantes y con mascarilla. Desnaturalizar, una vez utilizada en agua con lejía.

14.- Paro del revelado de la peroxidasa. Lavar con TRIS pH= 7.6 al menos un pase rápido y otros tres pases de 5 min., cada uno de ellos.

**3.4.2.2.- Inmunocitoquímica realizada a glándulas parotídeas:
Estudio *in vivo*.**

Se utilizaron preparaciones histológicas procedentes de glándula parótida de animales adultos y de crías recién nacidas pero que en vez de ser disgregadas y sometidas a cultivo, se procesaron directamente para inmunocitoquímica, es decir, se fijaron en etanol 70° durante 24h y posteriormente se procesaron como sigue:

1. Alcohol 50° 1h.
2. Agua destilada 30 min.
3. Solución salina 0.9% 1h.
4. TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6.
5. Inclusión en Tissue-Tek y corte en criostato (12 μ m).

Una vez obtenidas las secciones, se procesaron exactamente igual que las células obtenidas en cultivo, sólo se

produjeron modificaciones en las diluciones empleadas de primer y segundo anticuerpo. Otra diferencia consistió en que se realizó bloqueo de peroxidasas endógenas, ya que en el fijador empleado con el tejido *in vivo* no había agua oxigenada. Por esta razón, el bloqueo de las peroxidasas endógenas, y su lavado correspondiente, se realizó aparte.

Primer anticuerpo, anti citokeratinas n° 1-8 (Boehringer-Mannheim, monoclonal, desarrollado en ratón). Dilución: 1/200. La dilución se realizó en tampón TRIS 0.05 M pH= 7.6. El anticuerpo se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1h y 30 min.

Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 3 X 10 min.

Bloqueo de las peroxidasas endógenas. Incubar las preparaciones durante 30 min. en agua oxigenada al 0.3% en metanol, en oscuridad y con agitación suave.

Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 3 X 5 min.

Segundo anticuerpo, Anti-mouse IgG (Biotinilado) desarrollado en caballo. Dilución de trabajo: 1: 200. Lo mantenemos a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.

A partir de este punto el proceso se realizó exactamente igual que con las muestras *in vitro*.

3.4.3.- Detección de LH y TSH.

El procedimiento utilizado para la realización de la inmunocitoquímica tanto en el caso del anticuerpo anti rat LH IC 1 y como en el caso del anticuerpo anti rat TSH IC 1 fué similar, por esta razón describiremos el proceso una única

vez y al final comentaremos las diferencias.

Tanto el anticuerpo anti-rat LH IC 1 como el anti rat TSH IC 1 fueron cedidos amablemente por el Dr. Parlow del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney diseases (NIDDK, HARBOR-UCLA MEDICAL CENTER). Se trataba de una IgG policlonal producida en cobaya.

La técnica de detección fué el método inmunoenzimático indirecto (proteína A ligada a HRP).

Se utilizaron cultivos procedentes de células glandulares parotídeas sometidas a tratamiento con extracto hipotalámico de rata y de cordero. El fijador utilizado fué etanol de 70°. El procesado posterior de las células fué el siguiente:

- 1.- Lavado en PBS/BSA 0.2%, 3 X 5 min.
- 2.- Preincubación en PBS/BSA 0.2% con un 0.3% de Tritón X-100, 30 min.
- 3.- Primer anticuerpo, anti rat LH 1:100. Diluir las alícuotas con la cantidad adecuada de tampón. El tampón consiste en PBS/BSA 0.2% con un 0.3% de Tritón X-100. La incubación se realiza toda la noche en nevera, y en una cámara húmeda para evitar el secado de las preparaciones.
- 4.- Lavado en PBS/BSA 0.2%, 3 X 5 min.
- 5.- Bloqueo de las peroxidasas endógenas. Incubar las preparaciones durante 30 min. en agua oxigenada al 0.3% en metanol, en oscuridad y bajo agitación suave.
- 6.- Lavar abundantemente después de la incubación: al menos un pase rápido más tres pases de 5 min. en PBS/BSA 0.2%.
- 7.- Segundo anticuerpo, Proteína A 1:100 (Sigma, p-8651).

Diluir las alícuotas con la cantidad apropiada de tampón. Este consistía en tampón fosfato 0.1 M pH= 8.6. La incubación se desarrolló durante 1h. a temperatura ambiente, en oscuridad y en cámara húmeda para evitar la desecación.

8.- Lavado en PBS 1X 1 X 5 min.

9.- Lavado en TRIS 0.05M-ClNa 0.9% pH= 7.6, 2 X 5 min.

10.- Lavado en TRIS 0.05M pH= 7.6, 1 X 5 min.

11.- Revelado de la peroxidasa con DAB (50 mg/100 ml) y agua oxigenada 0.1% en TRIS. Disolver 6 mg de DAB en 12 ml. de TRIS, sonicar. Añadir 4 μ l. de agua oxigenada (Sigma, 30%). Incubar las preparaciones durante 5 min., bajo agitación suave y oscuridad. La DAB es tóxica, debe usarse bajo la campana extractora de gases, con guantes y con mascarilla. Desnaturalizar, una vez utilizada en agua con lejía.

12.- Paro del revelado de la peroxidasa. Lavar con TRIS pH= 7.6 al menos un pase rápido y otros tres pases de 5 min., cada uno de ellos.

El protocolo seguido para el estudio inmunocitoquímico de la TSH, llevado a cabo en estas células en cultivo fué básicamente el mismo que el protocolo seguido para la LH; la única diferencia estribó en la dilución empleada, ya que con el anticuerpo anti rat TSH, se empleó una dilución 1:120.

3.4.4.- Controles.

Se utilizó un control, denominado control negativo. Consistía en la realización del mismo protocolo descrito, pero eliminando el primer anticuerpo de la primera incubación.

Este tipo de control se llevó a cabo en todos los estudios realizados, dando resultados negativos en todos ellos.

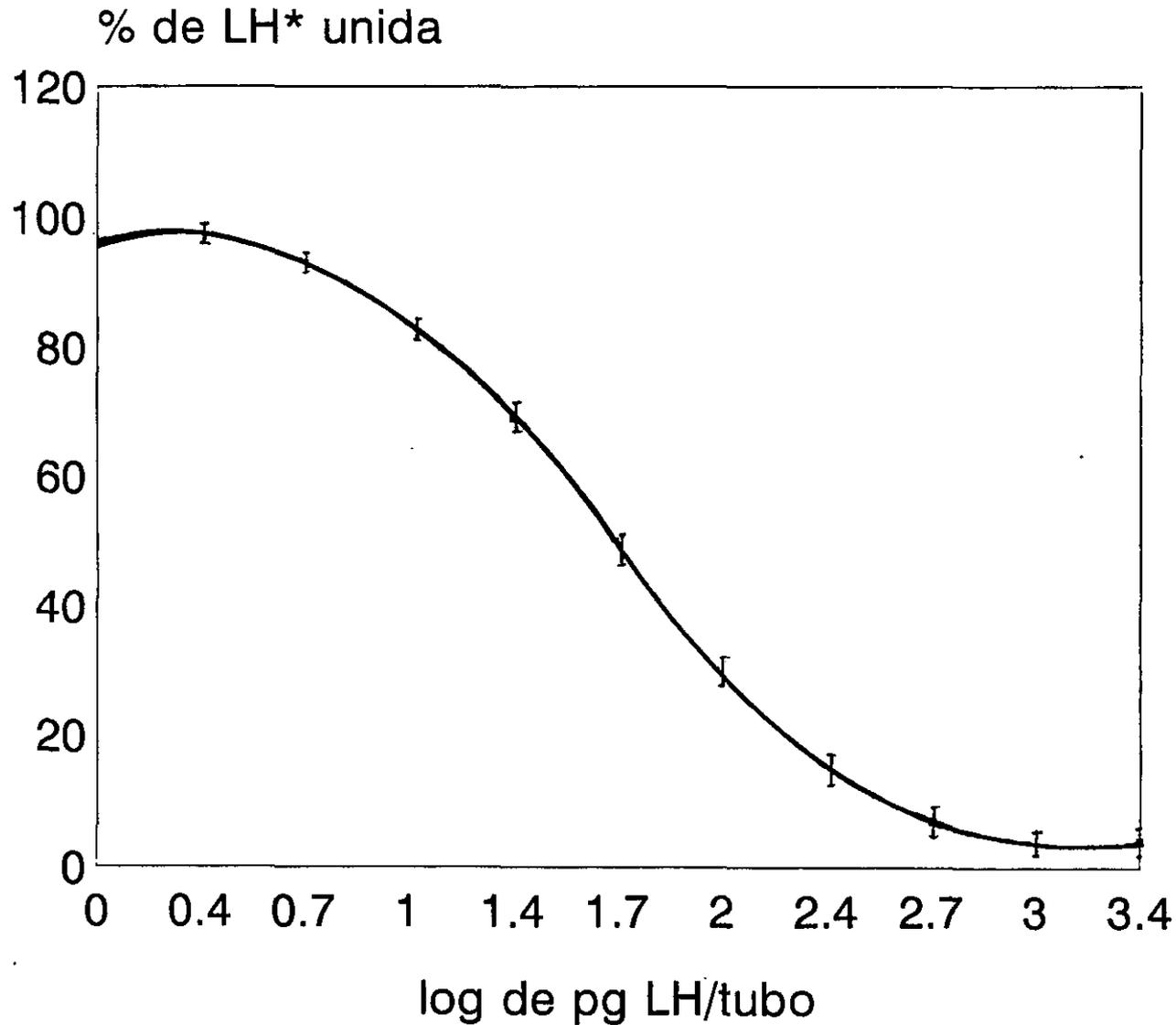
4.- ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS.

Las concentraciones hormonales detectadas en los medios de cultivo mediante la técnica de RIA, se calcularon por interpolación con la curva patrón. Como controles intraensayos, se utilizaron tres diluciones distintas procedentes de sueros de rata de concentración de LH y de TSH conocidas. Comparando los valores obtenidos de esta forma en RIAs sucesivos, se pudo comprobar la variación existente interensayos.

Los resultados se han expresado en pg de hormona/ml de medio de cultivo.

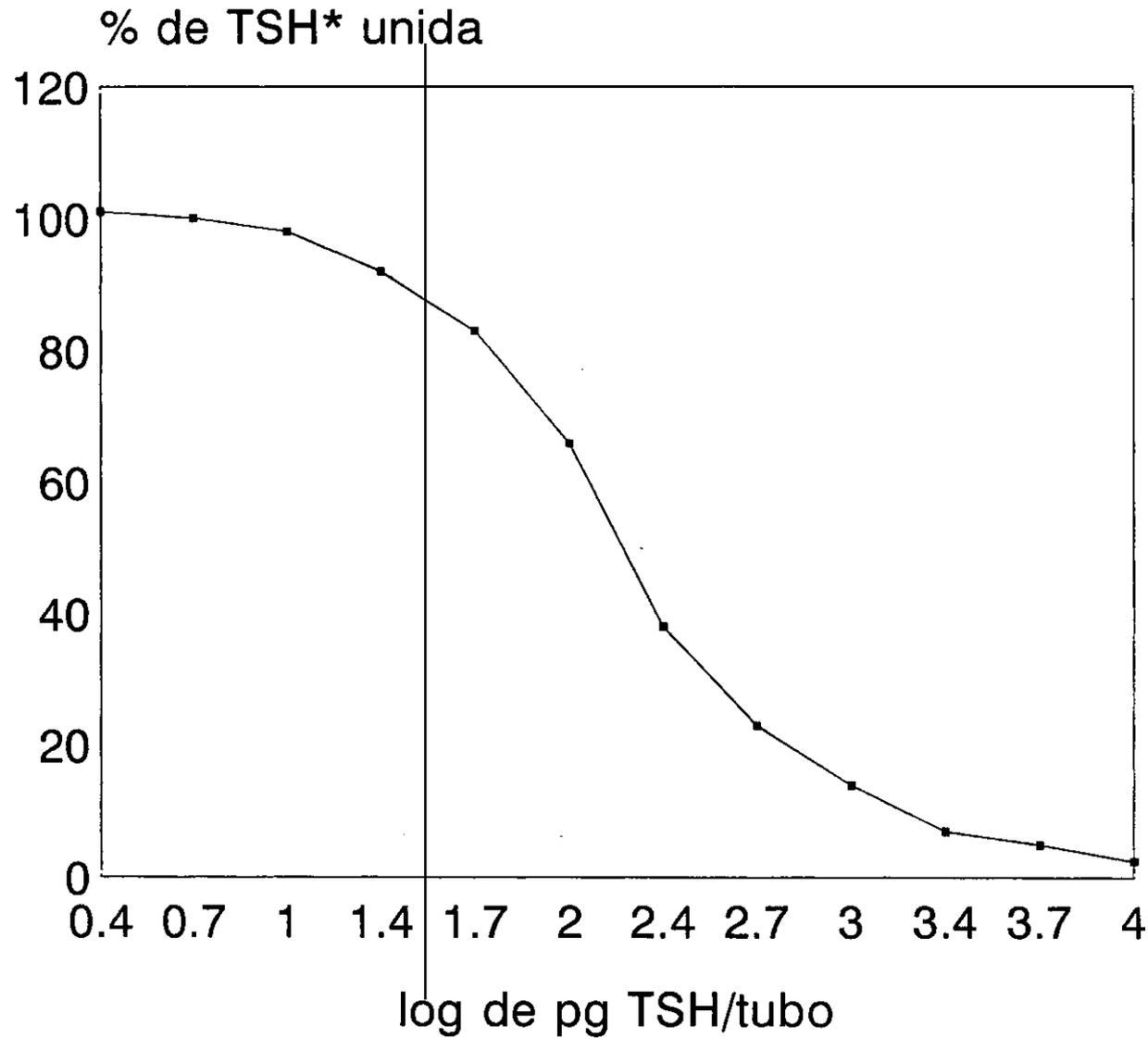
El análisis estadístico se ha realizado comparando la media \pm el error estándar de la media, usando el test de la T de Student.

CURVA PATRON DE LH



—•— % de LH* Unida

CURVA PATRON DE TSH



—•— % de TSH* unida

DETECCION DE LH EN EL MEDIO DE CULTIVO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

I. PRIMER EXPERIMENTO

CONTROL: RPMI

CONTROL: pocillos sin células tratados con 1 HR (XHR)

ESTIMULOS: EXTRACTO HIPOTALAMICO DE RATA (1 HR)

II. SEGUNDO EXPERIMENTO

CONTROL: RPMI

ESTIMULO : EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

Equivalente en peso fresco a: 0.25 HR (EHC EQ.0.25 HR)

1 HR (EHC EQ. 1 HR)

2 HR (EHC EQ. 2 HR)

III. TERCER EXPERIMENTO

CONTROL: EHC EQ. 1 HR

ESTIMULO: EHC EQ. 1 HR + Ab -LHRH 1:100

IV. CUARTO EXPERIMENTO

CONTROL: RPMI

CONTROL: Pocillos sin células tratados con Factores Hipotalámicos aislados (XF)

ESTIMULO: * LHRH+TRH+CRH+GHRH+EGF a distintas concentraciones:

2 μ g de cada factor/pocillo/día de tratamiento

10 μ g de cada factor/pocillo/día de tratamiento

*** LHRH+TRH+EGF a distintas concentraciones:**

2 μ g de cada factor/pocillo/día de tratamiento

4 μ g de cada factor/pocillo/día de tratamiento

10 μ g de cada factor/pocillo/día de tratamiento

DETECCION DE TSH EN EL MEDIO DE CULTIVO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

I. PRIMER EXPERIMENTO

CONTROL: RPMI

CONTROL: pocillos sin células tratados con 1 HR (XHR)

ESTIMULO: EXTRACTO HIPOTALAMICO DE RATA (1 HR)

II. SEGUNDO EXPERIMENTO

CONTROL: RPMI

CONTROL: Pocillos sin células tratados con Factores Hipotalámicos aislados (XF)

ESTIMULO: * LHRH+TRH+CRH+GHRH+EGF a distintas concentraciones:

2 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

10 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

*** LHRH+TRH+EGF a distintas concentraciones:**

2 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

4 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

10 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

*** TRH+CRH+GHRH+EGF a distintas concentraciones:**

2 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

4 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

10 µg de cada factor/pocillo/día de tratamiento

RESULTADOS

1.- OBTENCION DE CELULAS DE PAROTIDA.

1.1. PUESTA EN MARCHA DEL CULTIVO DE CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS. ELIMINACION DE FIBROBLASTOS.

Para ello se empleó un medio de cultivo que permite el crecimiento de las células epiteliales y que inhibe el crecimiento de los fibroblastos (MEM D-Val, Gibco).

Las células epiteliales tienen la posibilidad de utilizar D-Valina como única fuente de valina en el medio de cultivo, ya que poseen la enzima D-aminoácido oxidasa que les permite transformar D-valina en L-Valina. Los fibroblastos, sin embargo, no contienen este enzima por lo que no podrán crecer en el medio si la única fuente de valina en el medio procede de la forma D del aminoácido.

El resultado fué que al desaparecer los fibroblastos, las células glandulares perdían su anclaje, se despegaban de la placa y ya no se adherían más, con lo que morían. Este medio no se volvió a emplear.

Probamos además, diferentes sustratos para facilitar la adhesión y posterior proliferación celular, entre ellos colágeno (Boehringer), poli-L-lisina (Biochrome) y el cultivo sobre plástico tratado especialmente para cultivos celulares (Corning, NY). No obtuvimos diferencias significativas derivadas del uso de unos u otros sustratos.

Para facilitar el crecimiento de las células glandulares empleamos EGF (en la semana previa al comienzo del tratamiento con las mezclas de factores aislados, que a su vez también contenían EGF) a una concentración de 10 ng/ml.

No observamos, a nivel macroscópico (tiempo de estabilización del cultivo, velocidad de formación de los agrupamientos celulares y velocidad de formación de la monocapa) diferencias significativas, con respecto a los pocillos que no lo llevaban, por lo que dejamos de utilizarlo.

En otros pocillos empleamos GH a tres concentraciones diferentes 2 μ g, 800 ng y 400 ng/pocillo/día durante las tres semanas de tratamiento y tampoco observamos diferencias, a nivel macroscópico, significativas con respecto a los pocillos que no habían sido tratados con esta hormona, por lo que no la volvimos a emplear.

También utilizamos tres tipos distintos de sueros: Suero Bovino Fetal activado e inactivado (Cultek) y también suero de cordero (Seralab). El suero bovino fetal activado disminuía el tiempo de formación de la monocapa y de organización celular en grupos. El suero de cordero nos permitió el cultivo pero al no ser fetal, los fibroblastos no proliferaban a la misma velocidad.

En lo que se refiere a la dispersión celular, probamos distintos tiempos de digestión enzimática, para la colagenasa y la hialuronidasa (desde 40 min. hasta 1h.) No observamos diferencias significativas en lo que a daños celulares se refieren, al dejar actuar las enzimas en ese margen de tiempo. En todos los casos la viabilidad fué superior al 80%. Las diferencias fundamentales consistieron en que al final del procesamiento se obtuvieron unos fragmentos tisulares más o menos digeridos o una mayor proporción de células aisladas,

en función del tiempo de exposición a la acción de los enzimas (Planchas 1 y 2).

2.- DIFERENCIACION DE LAS CELULAS EN CULTIVO.

La dispersión celular lleva al aislamiento de las células en el cultivo, aunque también se identifican pequeños fragmentos glandulares debido a una digestión enzimática incompleta (Plancha 1). Las células al inicio del cultivo son redondas y presentan un halo brillante. A las 24h. del inicio del cultivo, las células han comenzado a adherirse a la placa. Los fibroblastos procedentes de la cubierta conjuntiva de la glándula, tardan alrededor de 5 días en llegar a la confluencia, durante ese período de tiempo, las células glandulares parotídeas que inicialmente estaban aisladas han empezado a agruparse. Estos grupos celulares se mantienen como tales durante el período de cultivo, aunque también pueden quedar pequeños acúmulos de células aisladas (Plancha 2). Las células glandulares se disponen fundamentalmente sobre los fibroblastos. Si no existe una capa de fibroblastos subyacentes, no se produce adhesión de las células glandulares (Plancha 3).

2.1.- DIFERENCIAS MORFOLOGICAS DE LA GLANDULA PAROTIDA DEL NEONATO CON RESPECTO A LA DEL ADULTO.

En el neonato, existe una gran cantidad de tejido parenquimatoso desigualmente diferenciado. Este tejido parenquimatoso representará el tejido funcional de un órgano,

que en este caso serán los acinos y los conductos de la glándula parótida. Se pueden observar sistemas de conductos poco ramificados y acinos en formación. Se observa también tejido mesenquimatoso que dará lugar al estroma, futuro tejido conectivo de la glándula parótida.

En el adulto, los acinos secretores , así como el sistema de conductos, muy ramificados, se encuentran completamente desarrollados. Toda la glándula, estará rodeada por una cápsula fibrosa, de donde parten, tabiques de tejido conjuntivo que se disponen entre los distintos lóbulos glandulares.

3.- TRANSFORMACION DE LAS CELULAS PAROTIDEAS SOMETIDAS A UN ESTIMULO PROCEDENTE DE EXTRACTOS HIPOTALAMICOS DE RATA.

3.1.- MORFOLOGIA.

No se han podido realizar estudios inmunocitoquímicos con células tratadas con extractos hipotalámicos de rata, ya que las células a partir de la tercera semana de tratamiento sufren un deterioro progresivo y rápido con respecto a las células sometidas a otros tratamientos en la misma placa. El resultado final es que las células comienzan a perder adhesividad lo que conduce a la muerte celular.

3.2.- BIOQUIMICA.

Se ha cuantificado la concentración de LH existente en el medio de cultivo de las células glandulares parotídeas expuestas a distintos tratamientos. En los casos en los que

se ha tratado a las células con extracto hipotalámico de rata y con factores hipotalámicos aislados se ha medido también TSH.

Los resultados se presentan en tablas [Media \pm ESM (n)] y gráficos independientes para LH y para TSH, separados según el estímulo recibido y la semana de tratamiento a la que correspondan los resultados.

El medio del cultivo se retiró cada 3 días y medio, realizándose posteriormente su valoración.

Las concentraciones hormonales obtenidas en los RIAs se expresaran en pg de hormona por ml de medio de cultivo.

3.2.1.- LH.

Los controles utilizados fueron de dos tipos; por un lado pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo, equivalente al volumen de extracto hipotalámico añadido a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l. En estas condiciones las concentraciones medias de LH detectadas fueron las siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 37 \pm 7 pg/ml de medio de cultivo, siendo el n=29.

A la primera semana (1): 36 \pm 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46

A la semana y media (1.5): 36 \pm 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas y media (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

A las tres semanas (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 1 y Gráfica nº 1.

Por otro lado, se trató otro grupo de pocillos en los que no se cultivaron células glandulares parotídeas pero que si han estado expuestos al extracto hipotalámico de rata en las mismas dosis y en la misma concentración cada dosis que los pocillos con células. A este tipo de pocillos control se les ha denominado tanto en las tablas como en las gráficas XHR. En estos pocillos, las concentraciones medias de LH detectadas fueron las siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 23 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A la primera semana (1): 24 ± 13 pg/ml de medio de cultivo n=2.

A la semana y media (1.5): 41 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las dos semanas (2): 69 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las dos semanas y media (2.5): 60 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las tres semanas (3): 43 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tabla n° 1 y Gráfica n° 1.

También se midió la cantidad de LH residual existente en el extracto hipotalámico antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 62 pg por dosis de extracto hipotalámico. Tabla n° 1 y Gráfica n° 1.

Existe un tercer grupo de pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas, que recibieron un estímulo que consistió en medio RPMI completo en el que se había disuelto el equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento. El tratamiento se administraba en dos dosis, mañana y tarde, de tal forma que, en la dosis de la mañana se administraba 1/2 hipotálamo de rata y en la de la tarde el otro 1/2. En estas condiciones las concentraciones medias de LH detectadas fueron las siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 917 ± 222 pg/ml de medio de cultivo; n=17.

A la primera semana (1): 857 ± 56 pg/ml de medio de cultivo n=17.

A la semana y media (1.5): 1256 ± 132 pg/ml de medio de cultivo; n=12.

A las dos semanas (2): 1834 ± 190 pg/ml de medio de cultivo; n=12.

A las dos semanas y media (2.5): 1781 ± 290 pg/ml de medio de cultivo; n=19.

A las tres semanas (3): 764 ± 93 pg/ml de medio de cultivo; n=10.

A este tipo de pocillos, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos 1 HR. Tabla n° 1 y Gráfica n° 1.

El aumento de la concentración de LH observado en los pocillos tratados con extracto hipotalámico de rata con respecto al grupo control RPMI, resultó ser significativo a lo largo de las tres semanas de cultivo ($p < 0.001$, en todos los casos). Gráfica n° 1.

LH pg/ml A PARTIR 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 1

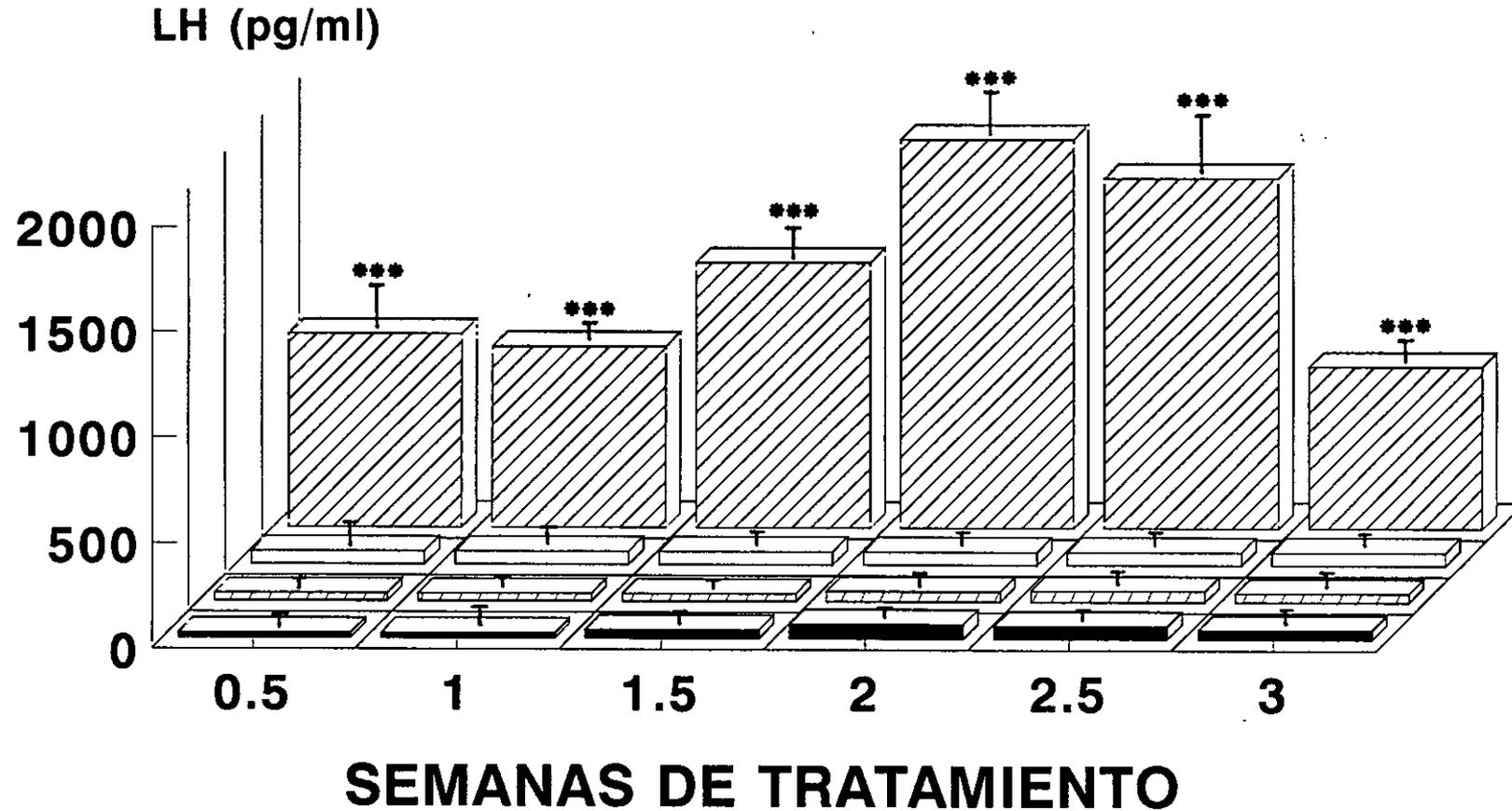
SEMANAS DE TRATAMIENTO	XHR	RPMI	LH EN HR por dosis	1 HR/POCILLO/DIA
MEDIA	23 ± 1 (2)	37 ± 7 (29)	62 ± 16 (6)	917 ± 222 (17)
PRIMERA	24 ± 13 (2)	36 ± 3 (46)	62 ± 16 (6)	857 ± 56 (17)
SEMANA Y MEDIA	41 ± 1 (2)	36 ± 4 (35)	62 ± 16 (6)	1256 ± 132 (12)
SEGUNDA	69 ± 6 (2)	48 ± 7 (35)	62 ± 16 (6)	1834 ± 190 (12)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	60 ± 1 (2)	52 ± 6 (38)	62 ± 16 (6)	1781 ± 290 (19)
TERCERA	43 ± 8 (2)	41 ± 8 (42)	62 ± 16 (6)	764 ± 93 (10)

XHR: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON 1 HR/POCILLO/DIA

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA ± ESM (n)

LH pg/ml A PARTIR 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

■ XHR ▨ RPMI □ LH EN HR por dosis ▩ 1 HR/POCILLO/DIA

XHR: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON 1 HR/POCILLO/DIA

t de Student

***: $p < 0.001$

3.2.2.- TSH.

Los controles utilizados fueron los mismos que los utilizados cuando se midieron las concentraciones de LH. Por un lado, pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo, equivalente al volumen de extracto hipotalámico añadido a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l. En estas condiciones las concentraciones medias de TSH detectadas fueron las siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 83 \pm 15 pg/ml de medio de cultivo, siendo el n=12.

A la primera semana (1): 147 \pm 23 pg/ml de medio de cultivo; n=34

A la semana y media (1.5): 142 \pm 18 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

A las dos semanas (2): 129 \pm 13 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

A las dos semanas y media (2.5): 163 \pm 17 pg/ml de medio de cultivo; n=28.

A las tres semanas (3): 129 \pm 16 pg/ml de medio de cultivo; n=30.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 2 y Gráfica nº 2.

Y por otro lado, pocillos en los que no se habían cultivado

células glandulares parotídeas pero que sí habían estado expuestos al extracto hipotalámico de rata en las mismas dosis y en la misma concentración cada dosis que los pocillos con células. A este tipo de pocillos control se les denominó tanto en las tablas como en las gráficas XHR. En estos pocillos, las concentraciones medias de TSH detectadas fueron las siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 39 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A la primera semana (1): 123 ± 3 pg/ml de medio de cultivo n=2.

A la semana y media (1.5): 571 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las dos semanas (2): 142 ± 15 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las dos semanas y media (2.5): 333 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

A las tres semanas (3): 140 ± 35 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tabla n° 2 y Gráfica n° 2.

Otra parte de los pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas, recibieron un estímulo que consistió en medio RPMI completo en el que se había disuelto el equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento. El tratamiento se administraba en dos dosis, mañana y tarde, de

tal forma que, en la dosis de la mañana se administraba 1/2 hipotálamo de rata y en la de la tarde el otro 1/2. En estas condiciones las concentraciones medias de TSH detectadas fueron las siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 3475 ± 476 pg/ml de medio de cultivo; n=4.

A la primera semana (1): 2974 ± 294 pg/ml de medio de cultivo n=9.

A la semana y media (1.5): 3803 ± 637 pg/ml de medio de cultivo; n=10.

A las dos semanas (2): 3046 ± 287 pg/ml de medio de cultivo; n=10.

A las dos semanas y media (2.5): 3702 ± 69 pg/ml de medio de cultivo; n=10.

A las tres semanas (3): 440 ± 31 pg/ml de medio de cultivo; n=10.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos EHR. Tabla nº 2 y Gráfica nº 2.

Por otro lado, se midió la cantidad de TSH residual existente en el extracto hipotalámico antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 166 pg por dosis de extracto hipotalámico.

El aumento de la concentración de TSH observado en los pocillos tratados con extracto hipotalámico de rata resultó ser significativo a lo largo de las dos primeras semanas y media de cultivo con respecto al grupo control RPMI ($p < 0.001$,

en todos los casos), dejando de ser significativo en la tercera semana después de haber comenzado el tratamiento. Gráfica n° 2.

TSH A PARTIR DE EHR

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 2

SEMANAS de TRATAMIENTO	RPMI	XHR	EHR
MEDIA	83 ± 15 (12)	39 ± 1 (2)	3475 ± 476 (4)
PRIMERA	147 ± 23 (34)	123 ± 3 (2)	2974 ± 294 (9)
SEMANA Y MEDIA	142 ± 18 (25)	571 ± 1 (2)	3803 ± 637 (10)
SEGUNDA	129 ± 13 (25)	142 ± 15 (2)	3046 ± 287 (10)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	163 ± 17 (28)	333 ± 1 (2)	3702 ± 69 (10)
TERCERA	129 ± 16 (30)	140 ± 35 (2)	440 ± 31 (10)

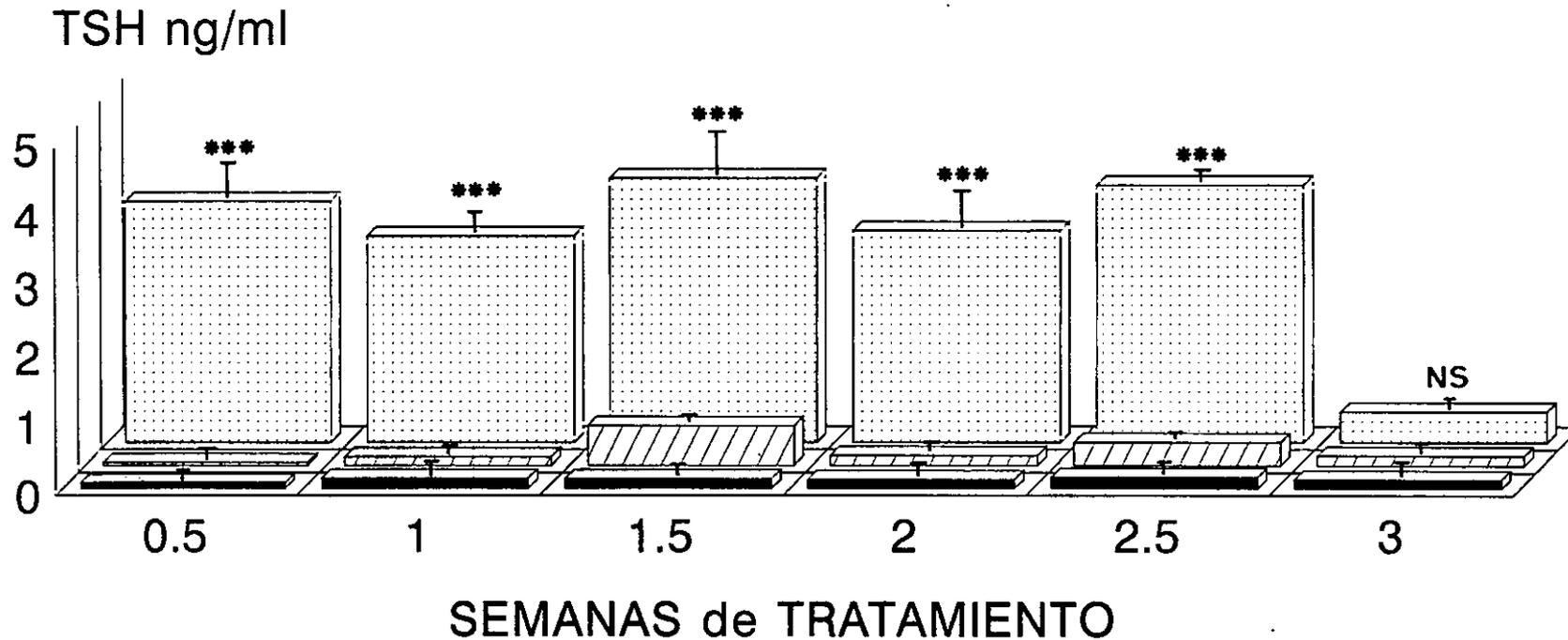
XHR: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON 1 HR/POCILLO/DIA

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA ± ESM (n)

TSH A PARTIR DE EHR

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

■ RPMI ▨ XHR ▤ EHR

XHR: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON 1 HR/POCILLO/DIA

t de Student

NS : No Significativo; *** : $p < 0.001$

4.- TRANSFORMACION DE LAS CELULAS PAROTIDEAS SOMETIDAS A UN ESTIMULO PROCEDENTE DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO.

4.1.- MORFOLOGIA.

La inmunoreactividad positiva tanto a la LH como a la TSH, apareció como un acúmulo de material opaco, de color marrón rojizo que en el caso de la LH no se dispone de forma generalizada en las agrupaciones celulares como tales sino que se acumula sólo en las células productoras. Planchas (4 y 5).

Aunque en las pruebas bioquímicas se detectó un aumento en la producción de LH a medida que aumentaba la cantidad de extracto hipotalámico de cordero con el que se estimulaba a las células, cuando se realizaron los estudios inmunocitoquímicos, no pudimos observar un aumento en el número de células marcadas como células LH positivas.

En el caso de la TSH se observan pocas células aisladas marcadas positivamente. Sin embargo, si que se observan agrupaciones celulares de mayor tamaño, marcadas positivamente. Se realizaron controles negativos en ausencia del primer anticuerpo. Planchas (10, 11, 12 y 13).

Al emplear como estimulador, extracto hipotalámico de cordero, las células no sufrieron ningún deterioro a lo largo de las distintas semanas de tratamiento, conservándose en buenas condiciones para la realización de los estudios inmunocitoquímicos posteriores.

4.2.- BIOQUIMICA.

Con el protocolo de trabajo descrito en el material y métodos, hemos realizado el análisis de la concentración de LH en el medio de cultivo de las células glandulares parotídeas expuestas a extractos hipotalámicos de cordero.

El extracto de cordero se ha empleado en una cantidad equivalente en peso fresco a:

a) 0.25 hipotálamos de rata/pocillo/día de tratamiento.

b) 1 hipotálamo de rata/pocillo/día de tratamiento y

c) 2 hipotálamos de rata/pocillo/día de tratamiento.

El extracto hipotalámico se suministró en dos dosis diarias de mañana y tarde. El medio del cultivo se retiró cada 3 días y medio, realizándose posteriormente su valoración. Las concentraciones hormonales obtenidas en los RIAs se expresaran en pg de hormona por ml de medio de cultivo.

4.2.1.- LH obtenida a partir de la estimulación de las células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 0.25 hipotálamos de rata por pocillo y por día.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo equivalente al volumen de extracto hipotalámico añadido, a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l. En estas condiciones las concentraciones medias de LH detectadas

fueron las siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 37 ± 7 pg/ml de medio de cultivo, siendo el $n=29$.

A la primera semana (1): 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; $n=46$

A la semana y media (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; $n=35$.

A las dos semanas (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; $n=35$.

A las dos semanas y media (2.5): 52 ± 10 pg/ml de medio de cultivo; $n=38$.

A las tres semanas (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; $n=42$.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 3 y Gráfica nº 3.

Otra parte de los pocillos, con cultivo de células glandulares parotídeas, recibieron un tratamiento (en dos dosis diarias de $50 \mu\text{l}$) que consistió, en medio RPMI completo en el que se había disuelto el extracto hipotalámico de cordero en una cantidad equivalente a 0.25 hipotálamos de rata por pocillo y por día de tratamiento.

En estas condiciones, los valores medios de LH encontrados a lo largo de las tres semanas de cultivo fueron los siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 43 ± 12 pg/ml de medio de cultivo, siendo el $n=15$.

A la primera semana (1): 53 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=15.

A la semana y media (1.5): 126 ± 36 pg/ml de medio de cultivo; n=16.

A las dos semanas (2): 108 ± 21 pg/ml de medio de cultivo; n=14.

A las dos semanas y media (2.5): 101 ± 10 pg/ml de medio de cultivo; n=15.

A las tres semanas (3): 291 ± 23 pg/ml de medio de cultivo; n=15.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos EHC EQ. a 0.25 HR. Tabla nº 3 y Gráfica nº 3.

En este caso, también se midió la cantidad de LH residual existente en el extracto hipotalámico, antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 4 ± 1 pg por dosis de EHC EQ. a 0.25 HR; n=4. Tabla nº 3 y Gráfica nº 3.

El aumento de la concentración de LH observado en los pocillos tratados con EHC EQ. a 0.25 HR resultó no ser significativo a lo largo de la primera semana de tratamiento. Sin embargo, a partir de la primera semana y media de tratamiento el aumento observado en la concentración de LH resultó ser significativo con respecto al grupo control RPMI ($p < 0.001$). Gráfica nº 3.

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 0.25 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO

TABLA 3

SEMANAS DE TRATAMIENTO	LH EN EL EHC por dosis	RPMI	EHC EQ A 0.25 HR
MEDIA	4 ± 1 (4)	37 ± 7 (29)	43 ± 12 (15)
PRIMERA	4 ± 1 (4)	36 ± 3 (46)	53 ± 13 (15)
SEMANA Y MEDIA	4 ± 1 (4)	36 ± 4 (35)	126 ± 36 (16)
SEGUNDA	4 ± 1 (4)	48 ± 7 (35)	108 ± 21 (14)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	4 ± 1 (4)	52 ± 10 (38)	101 ± 10 (15)
TERCERA	4 ± 1 (4)	41 ± 8 (42)	291 ± 23 (15)

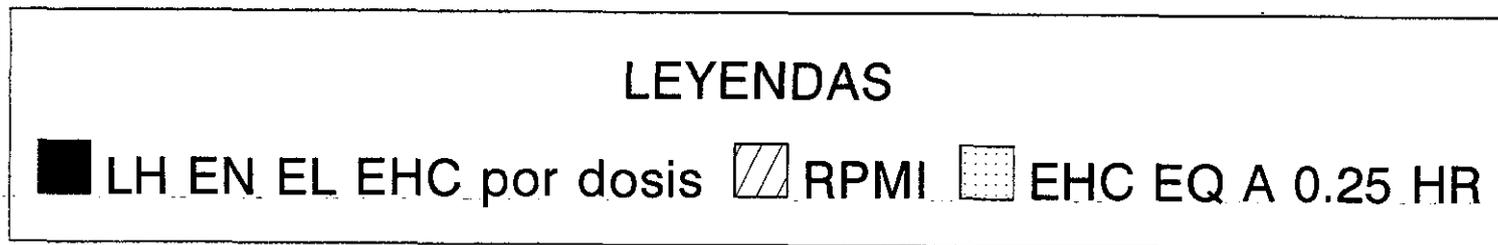
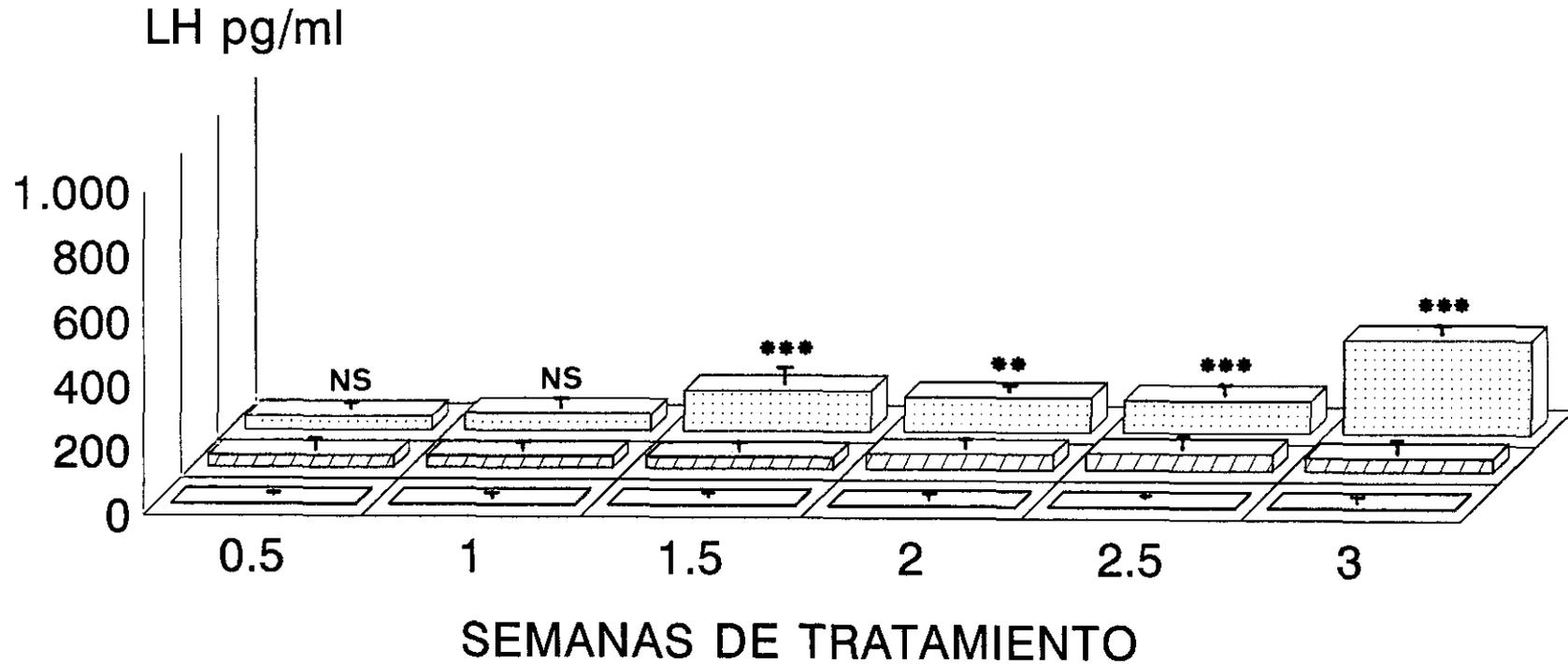
CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA ± ESM (n)

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 0.25 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO



CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

t de Student: NS: No Significativo.

** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

4.2.2.- LH obtenida a partir de la estimulación de las células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo equivalente al volumen de extracto hipotalámico añadido, a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l. En estas condiciones las concentraciones medias de LH detectadas fueron las siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 37 ± 7 pg/ml de medio de cultivo, siendo el n=29.

A la primera semana (1): 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46

A la semana y media (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas y media (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

A las tres semanas (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 4 y Gráfica nº 4.

Otra parte de los pocillos, con cultivo de células

glandulares parotídeas, recibieron un tratamiento (en dos dosis diarias de 50 μ l) que consistió, en medio RPMI completo en el que se había disuelto el extracto hipotalámico de cordero en una cantidad equivalente a 1 hipotálamo de rata por pocillo y por día de tratamiento.

En estas condiciones, los valores medios de LH encontrados a lo largo de las tres semanas de cultivo fueron los siguientes:

A la media semana de tratamiento (0.5): 104 \pm 17 pg/ml de medio de cultivo, siendo el n=27.

A la primera semana (1): 61 \pm 8 pg/ml de medio de cultivo; n=26.

A la semana y media (1.5): 121 \pm 14 pg/ml de medio de cultivo; n=27.

A las dos semanas (2): 162 \pm 10 pg/ml de medio de cultivo; n=27.

A las dos semanas y media (2.5): 357 \pm 55 pg/ml de medio de cultivo; n=24.

A las tres semanas (3): 764 \pm 141 pg/ml de medio de cultivo; n=21.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos EHC EQ. a 1 HR Tabla n° 4 y Gráfica n° 4.

En este caso, también se midió la cantidad de LH residual existente en el extracto hipotalámico, antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 8 \pm 1 pg por dosis de EHC EQ. a 1 HR; n=6. Tabla n° 4 y Gráfica n° 4.

El aumento de la concentración de LH observado en los pocillos tratados con EHC EQ. a 1 HR resultó ser significativo con respecto al grupo control RPMI desde el inicio del tratamiento ($p < 0.01$ para la primera semana de tratamiento y $p < 0.001$ en el resto de los casos). Gráfica nº 4.

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO

TABLA 4

SEMANAS DE TRATAMIENTO	LH EN EL EHC por dosis	RPMI	EHC EQ A 1 HR
MEDIA	8 ± 1 (6)	37 ± 7 (29)	104 ± 17 (27)
PRIMERA	8 ± 1 (6)	36 ± 3 (46)	61 ± 8 (26)
SEMANA Y MEDIA	8 ± 1 (6)	36 ± 4 (35)	121 ± 14 (27)
SEGUNDA	8 ± 1 (6)	48 ± 7 (35)	162 ± 10 (27)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	8 ± 1 (6)	52 ± 6 (38)	357 ± 55 (24)
TERCERA	8 ± 1 (6)	41 ± 8 (42)	764 ± 141 (21)

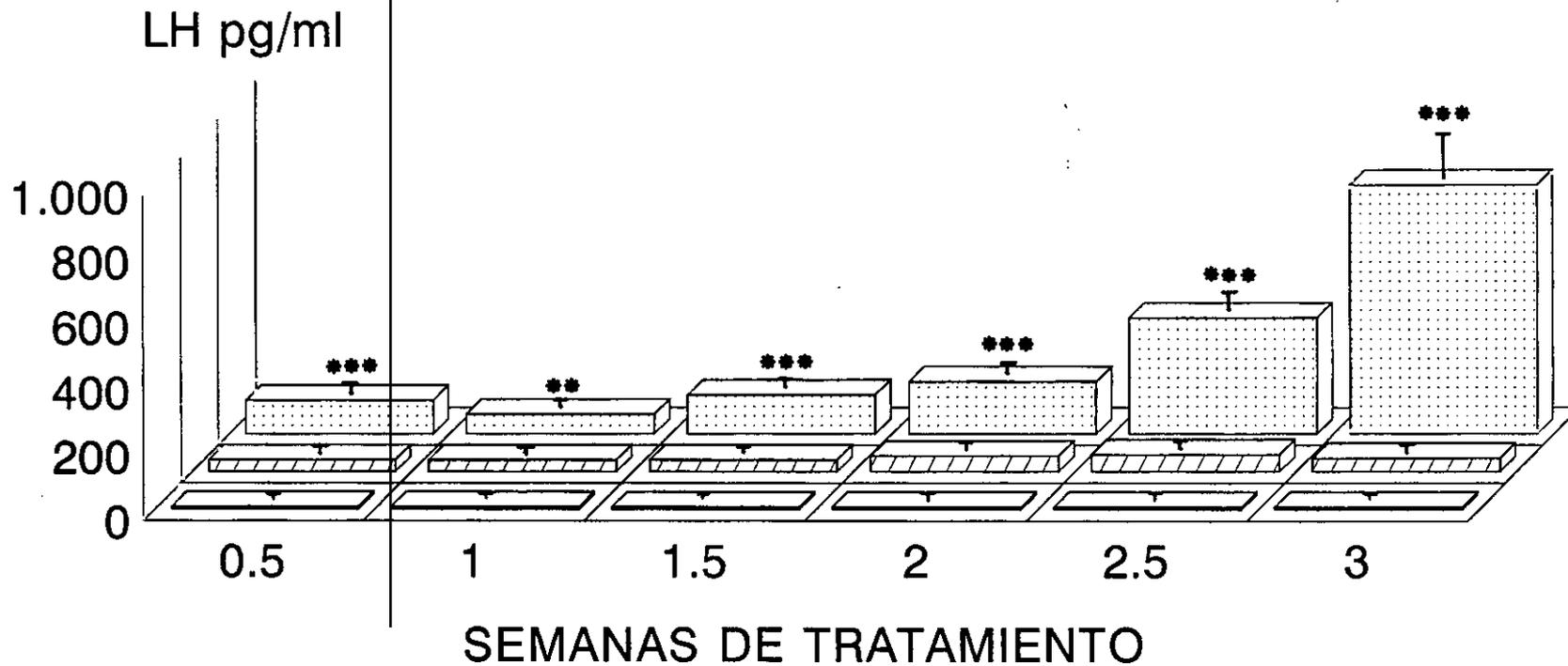
CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA ± ESM (n)

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO



LEYENDAS

■ LH EN EL EHC por dosis ▨ RPMI ▩ EHC EQ A 1 HR

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

t de Student

** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

4.2.3.- LH obtenida a partir de la estimulación de las células glandulares con una cantidad de extracto hipotalámico de cordero equivalente a 2 hipotálamos de rata por pocillo y por día.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo equivalente al volumen de extracto hipotalámico añadido, a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l. En estas condiciones las concentraciones medias de LH detectadas fueron las siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 37 ± 7 pg/ml de medio de cultivo, siendo el n=29.

A la primera semana (1): 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46

A la semana y media (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

A las dos semanas y media (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

A las tres semanas (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla n° 5 y Gráfica n° 5.

Otra parte de los pocillos, con cultivo de células

glandulares parotídeas, recibieron un tratamiento (en dos dosis diarias) que consistió, en medio RPMI completo en el que se había disuelto el extracto hipotalámico de cordero en una cantidad equivalente a 2 hipotálamos de rata por pocillo y por día de tratamiento.

En estas condiciones, los valores medios de LH encontrados a lo largo de las tres semanas de cultivo fueron los siguientes.

A la media semana de tratamiento (0.5): 123 ± 17 pg/ml de medio de cultivo, siendo el $n=15$.

A la primera semana (1): 130 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; $n=15$.

A la semana y media (1.5): 124 ± 26 pg/ml de medio de cultivo; $n=14$.

A las dos semanas (2): 233 ± 24 pg/ml de medio de cultivo; $n=15$.

A las dos semanas y media (2.5): 250 ± 15 pg/ml de medio de cultivo; $n=15$.

A las tres semanas (3): 908 ± 161 pg/ml de medio de cultivo; $n=12$.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos EHC EQ. a 2 HR. Tabla nº 5 y Gráfica nº 5.

En este caso, también se midió la cantidad de LH residual existente en el extracto hipotalámico, antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 15 ± 2 pg por dosis de EHC EQ. a 2 HR; $n=7$. Tabla nº 5 y Gráfica nº 5.

El aumento de la concentración de LH observado en los pocillos tratados con EHC EQ. a 2 HR resultó ser significativo con respecto al grupo control RPMI desde el inicio del tratamiento ($p < 0.001$ en todos los casos). Gráfica n° 5.

Podemos decir, además, que las cantidades de LH producidas por las células al ser estimuladas con el extracto hipotalámico de cordero son dependientes de la dosis empleada, siendo este hecho especialmente evidente en la tercera semana a partir del inicio del tratamiento. Tabla n° 6 y Gráfica n° 6.

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 2 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO

TABLA 5

SEMANAS DE TRATAMIENTO	LH EN EL EHC por dosis	RPMI	EHC EQ A 2 HR
MEDIA	15 ± 2 (7)	37 ± 7 (29)	123 ± 17 (15)
PRIMERA	15 ± 2 (7)	36 ± 3 (46)	130 ± 7 (15)
SEMANA Y MEDIA	15 ± 2 (7)	36 ± 4 (35)	124 ± 26 (14)
SEGUNDA	15 ± 2 (7)	48 ± 7 (35)	233 ± 24 (15)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	15 ± 2 (7)	52 ± 6 (38)	250 ± 15 (15)
TERCERA	15 ± 2 (7)	41 ± 8 (42)	908 ± 161 (12)

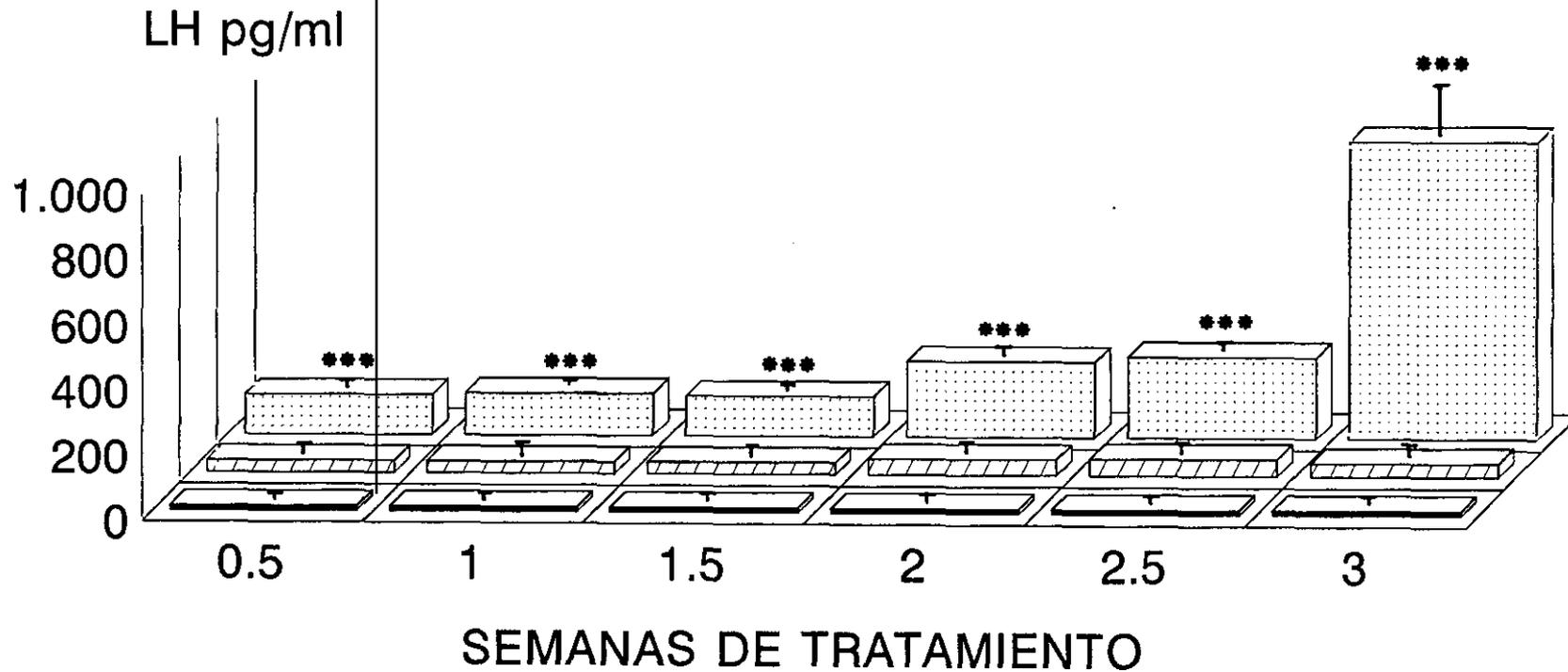
CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA ± ESM (n)

LH A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 2 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO



LEYENDAS

■ LH EN EL EHC por dosis ▨ RPMI ▩ EHC EQ A 2 HR

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

t de Student

*** : $p < 0.001$

LH pg/ml A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 0.25, 1 Y 2 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO

TABLA 6

SEMANA DE TRATAMIENTO	LH EN EL RPMI	RPMI	LH EN EL EQ A 0.25 HR	EHC EQ A 0.25 HR	LH EN EL EQ A 1 HR	EHC EQ. A 1 HR	LH EN EL EQ A 2 HR	EHC EQ. A 2 HR
TERCERA SEMANA	2 ± 1 (4)	41 ± 8 (42)	4 ± 1 (4)	291 ± 3 (15)	8 ± 1 (6)	764 ± 141 (21)	15 ± 2 (7)	908 ± 61 (12)

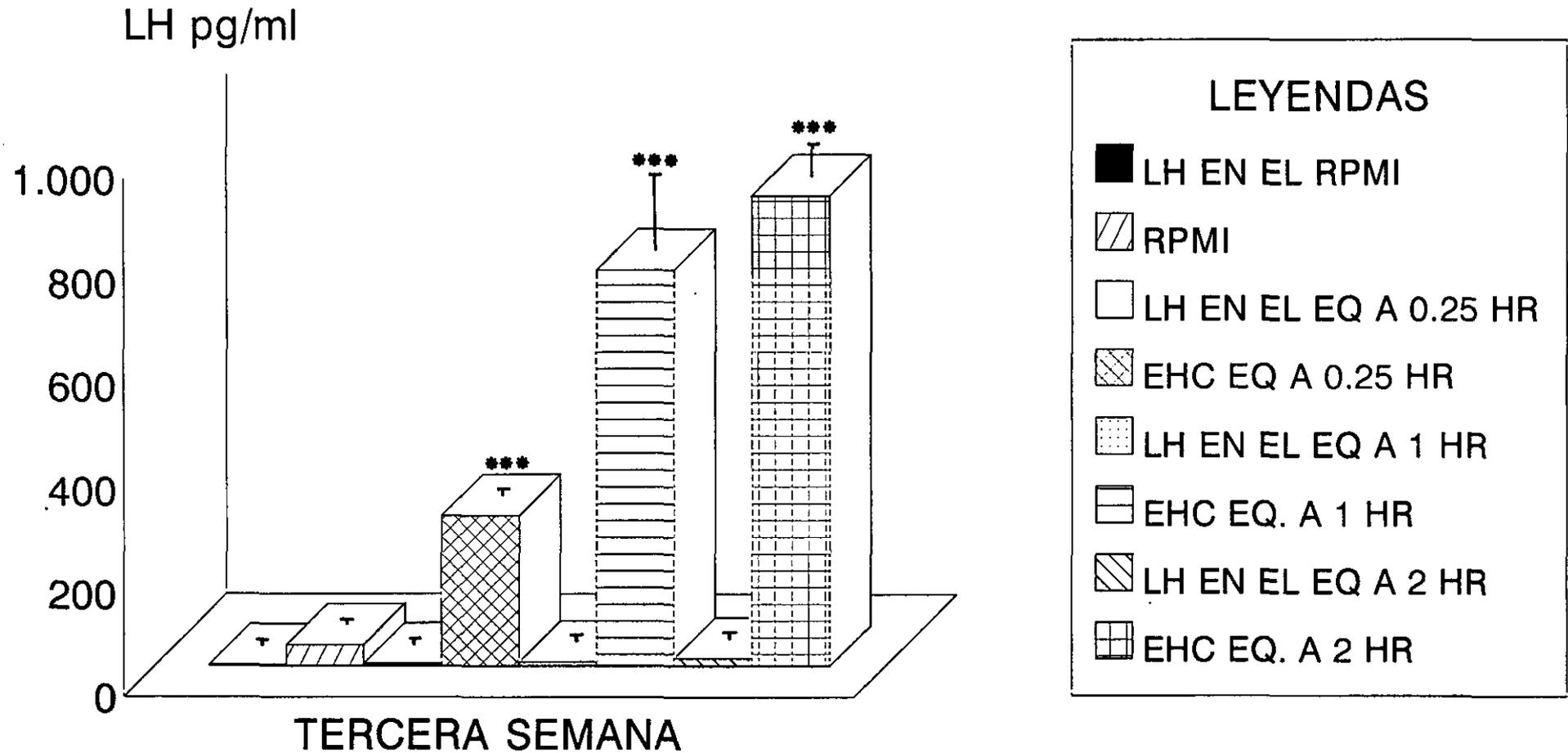
Valores de LH en el EHC y en RPMI expresados en pg/dosis

Resto de los valores en pg/ml de medio

Media ± ESM (n)

LH pg/ml A PARTIR DE EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO

EQUIVALENTE A 0.25, 1 Y 2 HIPOTALAMOS DE RATA/DIA/POCILLO



CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

t de Student: *** : $p < 0.001$

VALORES DE LH EN EHC Y EN RPMI EXPRESADOS POR DOSIS

4.3.- EFECTOS OBSERVADOS AL EMPLEAR ASOCIADO AL EHC EQ. A 1 HR UN ANTICUERPO ANTI-LHRH.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo en el que se había disuelto EHC EQ. a 1 HR por pocillo y por día de tratamiento. En estas condiciones, la concentración media de LH detectada en la semana de máxima producción (3) fué: 764 ± 141 pg/ml de medio de cultivo; $n=21$.

En los pocillos en los que se ha añadido EHC EQ. a 1 HR + Ab α -LHRH 1:100 por pocillo y por día de tratamiento, la concentración media de LH detectada a la tercera semana de tratamiento ascendió a 148 ± 10 pg/ml de medio de cultivo; $n=12$.

En este caso, también se midió la cantidad de LH residual existente en el extracto hipotalámico, antes de añadirlo a las células en cultivo, observándose un valor de 8 ± 1 pg por dosis de EHC EQ. a 1 HR; $n=6$. También se midió la cantidad de LH residual existente en el EHC EQ. a 1 HR + Ab α -LHRH 1:100 siendo ésta de 5 ± 1 pg por dosis; $n=4$. Tabla nº 7 y Gráfica nº 7.

La disminución de la concentración de LH observada en los pocillos tratados con EHC EQ. a 1 HR + Ab α -LHRH 1:100 resultó ser significativa con respecto al grupo control EHC EQ. a 1 HR ($p<0.001$). Gráfica nº 7.

**EFECTO DEL Ab α -LHRH 1:100 SOBRE EL EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO
EQUIVALENTE A 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO
TABLA 7**

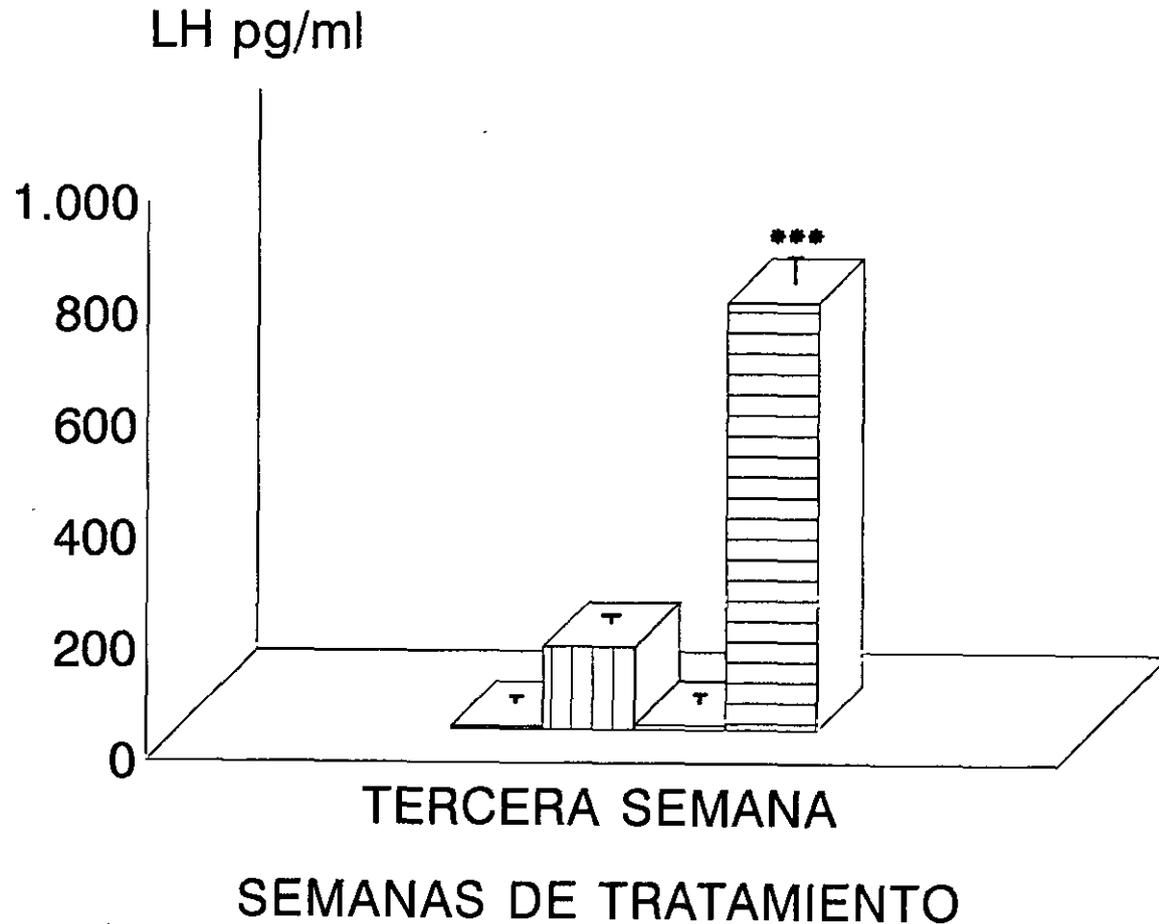
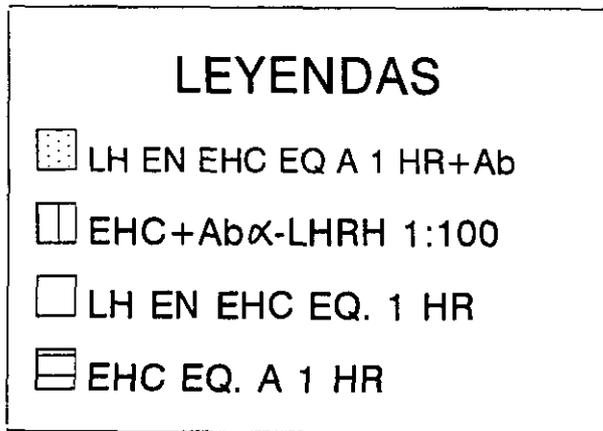
SEMANAS DE TRATAMIENTO	LH EN EHC EQ A 1 HR+Ab	EHC+Ab -LHRH 1:100	LH EN EHC EQ. 1 HR	EHC EQ. A 1 HR
TERCERA SEMANA	5 \pm 1 (4)	148 \pm 10 (12)	8 \pm 1 (6)	764 \pm 141 (21)

LH en EHC EQ. 1HR + Ab y LH en EHC EQ. 1HR expresados por dosis

Resto de los datos expresados en pg/ml de medio

Media \pm ESM (n)

EFEECTO DEL Ab α -LHRH 1:100 SOBRE EL EXTRACTO HIPOTALAMICO DE CORDERO
EQUIVALENTE A 1 HIPOTALAMO DE RATA/DIA/POCILLO
CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LH en EHC EQ. 1HR + Ab y LH en EHC EQ. 1HR expresados por dosis
t de Student

*** : $p < 0.001$ vs EHC EQ. 1HR + Ab α -LHRH 1:100

5.- TRANSFORMACION DE LAS CELULAS PAROTIDEAS UTILIZANDO COMO ESTIMULO FACTORES HIPOTALAMICOS AISLADOS.

5.1.- MORFOLOGIA.

No se han observado modificaciones en lo que a la morfología de las células en cultivo se refiere, con respecto a la morfología que presentaron otras células sometidas a otros tratamientos. La única diferencia observable, consistió en que las células estimuladas con factores hipotalámicos aislados presentaron una vida media mayor que las células de los pocillos control (RPMI) y también mayor que las de las células sometidas a estímulo con extracto hipotalámico de rata; sin embargo, murieron antes que las células sometidas a extracto hipotalámico de cordero.

5.2.- BIOQUIMICA.

Con el protocolo de trabajo descrito en el material y métodos, hemos realizado el análisis de dos hormonas (LH y TSH) en el medio de cultivo de las células glandulares parotídeas expuestas a distintos factores hipotalámicos aislados.

Las concentraciones hormonales obtenidas se expresarán como la cantidad total de LH secretada por las células, después de tres semanas de tratamiento. La definiremos en pg de hormona por ml de medio de cultivo.

5.2.1.- LH.

Se trataron las células glandulares en cultivo con distintas

mezclas de factores hipotalámicos aislados y a distintas concentraciones. En el caso concreto de la LH, las mezclas utilizadas fueron las siguientes:

- (LHRH+TRH+CRH+GHRH) + EGF.
- (LHRH+TRH) + EGF.

5.2.1.1.- LH obtenida al emplear las mezclas a una concentración de 2 μ g de cada factor/día/pocillo.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo equivalente al volumen añadido, a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l.

Primera semana de tratamiento (1): 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46.

Semana y media de tratamiento (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

Tercera semana de tratamiento (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla n° 8 y Gráfica n° 8.

En este caso, también se han introducido pocillos control sin células que han estado expuestos al efecto de los factores hipotalámicos aislados en las mismas dosis y en la misma

concentración cada dosis que los pocillos con células. A este tipo de pocillos control se les ha denominado tanto en las tablas como en las gráficas XF. Tabla n° 8 y Gráfica n° 8.

Primera semana de tratamiento (1): 41 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 41 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 37 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 13 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

En el caso de los pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas tratados con una mezcla de (LHRH+TRH+CRH+GHRH) + EGF, la concentración ascendió en la primera semana de tratamiento (1) a: 80 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 128 ± 14 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 51 ± 2 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 24 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

En este caso y al comparar con los pocillos RPMI, observamos un aumento en la concentración de LH significativo durante la primera semana ($p < 0.01$) y durante la primera semana y media de tratamiento ($p < 0.001$). Posteriormente las concentraciones de LH disminuyen, no observándose diferencias significativas con respecto al control. Tabla 8 y Fig. 8.

Hubo un cuarto grupo de pocillos que se trataron con una mezcla de (LHRH+TRH)+EGF obteniéndose las siguientes concentraciones de LH:

Primera semana de tratamiento (1) a: 65 ± 2 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 104 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 59 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 40 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

A esta concentración la mezcla de (LHRH+TRH)+EGF ofreció diferencias significativas con respecto al control (RPMI) durante la primera y la primera semana y media de tratamiento ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente). Posteriormente las concentraciones de LH disminuyen, no observándose diferencias significativas con respecto al control. Tabla 8 y Fig. 8.

LH A PARTIR DE 2 μ g DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 8

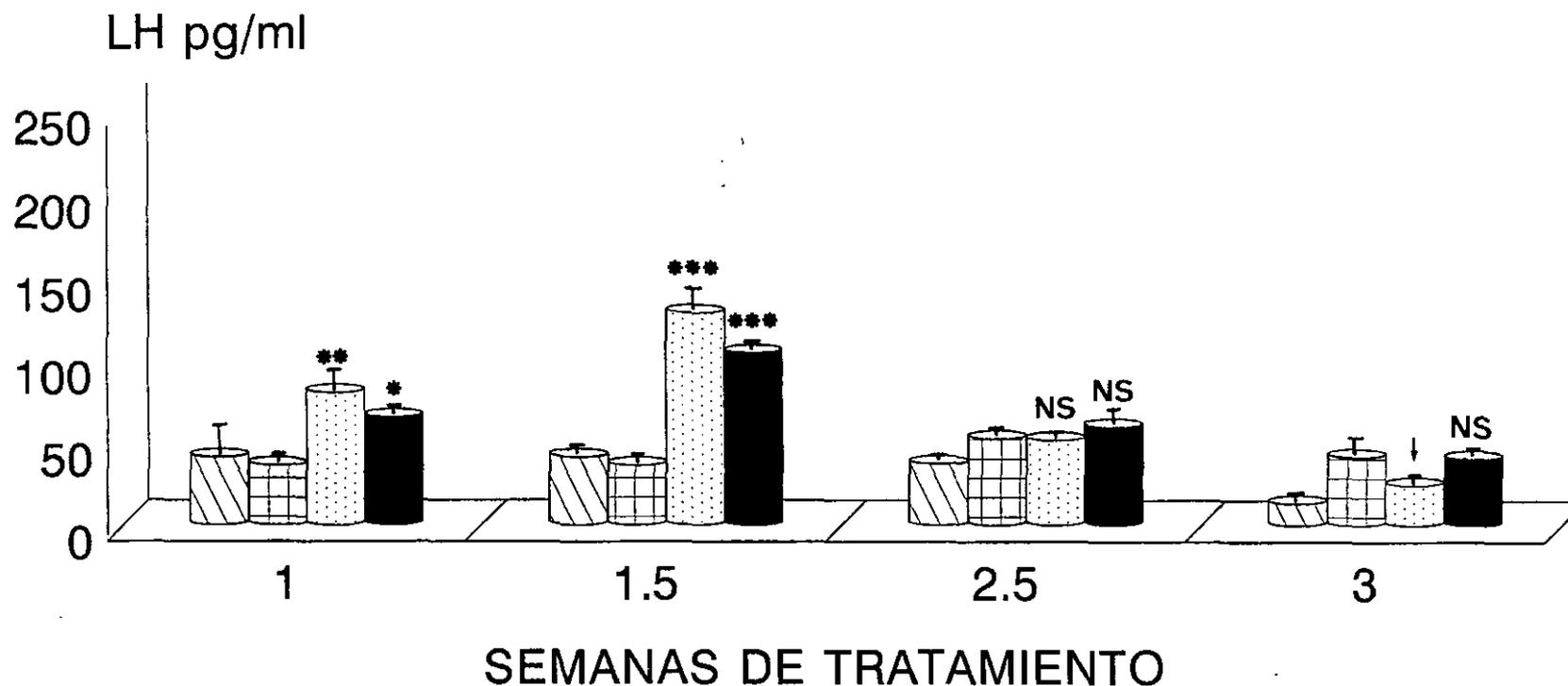
SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	TODAS*	LHRH+TRH+EGF
PRIMERA SEMANA	41 \pm 18 (3)	36 \pm 3 (46)	80 \pm 13 (3)	65 \pm 2 (3)
SEMANA Y MEDIA	41 \pm 6 (3)	36 \pm 4 (35)	128 \pm 14 (3)	104 \pm 6 (3)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	37 \pm 1 (2)	52 \pm 6 (38)	51 \pm 2 (3)	59 \pm 8 (3)
TERCERA	13 \pm 1 (2)	41 \pm 8 (42)	24 \pm 1 (2)	40 \pm 3 (3)

TODAS* LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH; XF: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS
DATOS EXPRESADOS EN pg/ml DE MEDIO

Media \pm ESM (n)

LH A PARTIR DE 2 μg DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

 XF
  RPMI
  LHRH+TRH+EGF+CRH+GHRH
  LHRH+TRH+EGF

XF: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

t de Student: NS : No Significativo

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

5.2.1.2.- LH obtenida al usar una de las mezclas a una concentración de 4 μg de cada factor/día/pocillo.

En este caso sólo se empleó una de las mezclas, concretamente (LHRH+TRH)+EGF, las concentraciones de LH a lo largo de las distintas semanas fueron las siguientes:

Primera semana de tratamiento (1) a: 101 ± 5 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 132 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 63 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 23 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Se utilizaron dos tipos de controles:

- RPMI: Con células y medio pero sin factores, obteniéndose una concentración de LH a lo largo de las distintas semanas de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

Segunda semana de tratamiento (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

Tercera semana de tratamiento (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

- XF: Sin células pero con medio y factores hipotalámicos aislados.

Primera semana de tratamiento (1) a: 41 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 41 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 82 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 37 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 13 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Al realizar la estadística, se ha visto que en este caso existieron diferencias significativas durante la primera semana y la primera semana y media de iniciarse el tratamiento ($p < 0.001$) al comparar los pocillos tratados con el control (RPMI). A partir de este momento, las concentraciones de LH disminuyen y no se obtienen diferencias estadísticamente significativas. Tabla nº 9 y Gráfica nº 9.

LH A PARTIR DE 4 μ g DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 9

SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	LHRH+TRH+EGF
PRIMERA	41 \pm 18 (3)	36 \pm 3 (46)	101 \pm 5 (2)
SEMANA Y MEDIA	41 \pm 6 (3)	36 \pm 4 (35)	132 \pm 8 (3)
SEGUNDA	82 \pm 4 (3)	48 \pm 7 (35)	41 \pm 8 (3)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	37 \pm 1 (2)	52 \pm 6 (38)	63 \pm 18 (3)
TERCERA	13 \pm 1 (2)	41 \pm 8 (42)	23 \pm 7 (3)

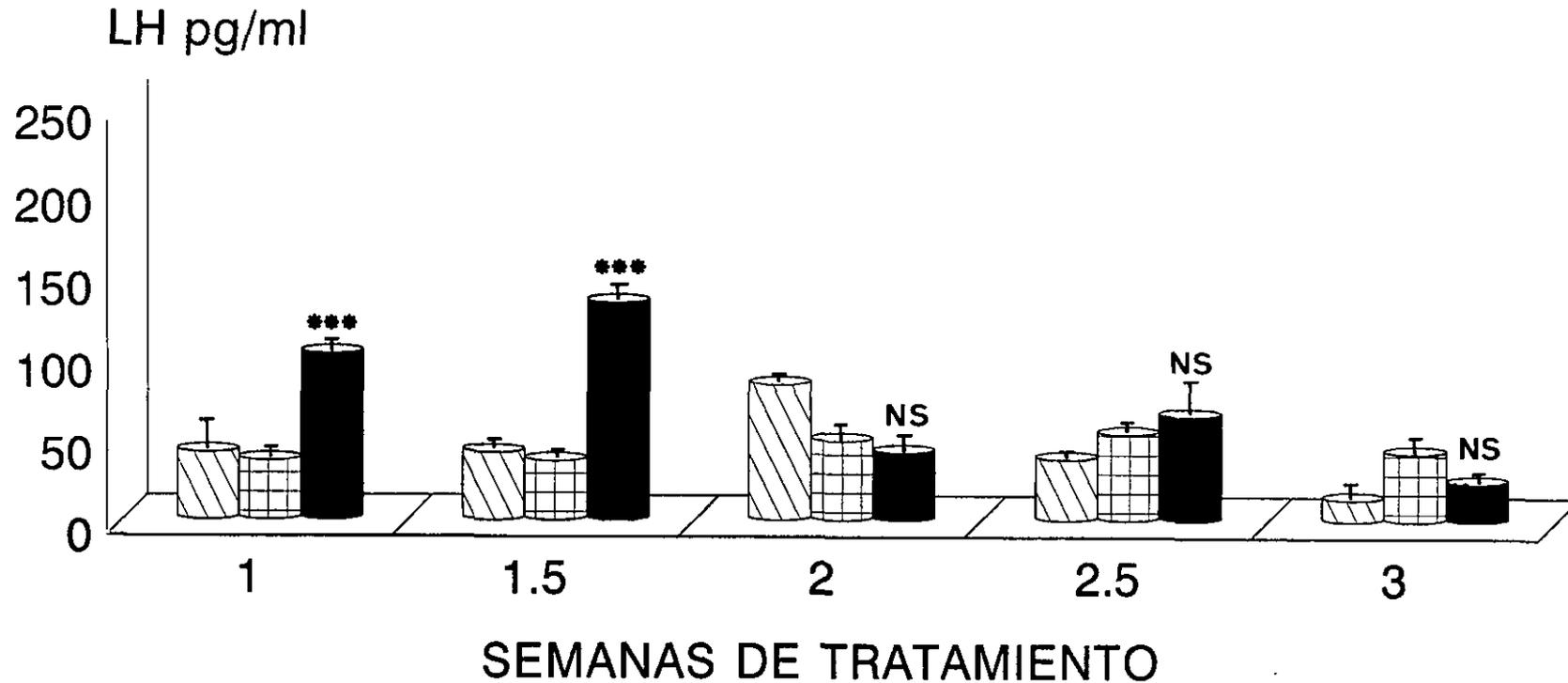
XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

Datos expresados en pg/ml de medio

Media \pm ESM (n)

LH A PARTIR DE 4 μg DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

 XF  RPMI  LHRH+TRH+EGF

XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

t de Student

NS : No Significativa; *** : $p < 0.001$

5.2.1.3.- LH obtenida al emplear las mezclas a concentración de 10 µg de cada factor/día/pocillo.

En este caso se volvieron a emplear las dos mezclas. Las concentraciones de LH obtenidas al emplear la mezcla de (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF fueron las siguientes:

Primera semana de tratamiento (1) a: 75 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 216 ± 46 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 55 ± 5 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 59 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 14 ± 2 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

La concentración de LH global al emplear la otra mezcla (LHRH+TRH)+EGF ascendió a

Primera semana de tratamiento (1) a: 85 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 0 ± 0 pg/ml de medio de cultivo; n=0.

Segunda semana de tratamiento (2): 175 ± 25 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 126 ± 28 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 23 ± 9 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Los controles empleados fueron otra vez, controles con células y controles sin ellas:

- RPMI: Con células y medio pero sin factores, obteniéndose una concentración de LH a lo largo de las semanas de tratamiento:

Primera semana de tratamiento (1) a: 36 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=46.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 36 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

Segunda semana de tratamiento (2): 48 ± 7 pg/ml de medio de cultivo; n=35.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 52 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=38.

Tercera semana de tratamiento (3): 41 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=42.

- XF: Sin células pero con medio y factores hipotalámicos aislados. La concentración de LH a lo largo de las distintas semanas fué de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 41 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 41 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 82 ± 4 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 37 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 13 ± 1 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tabla 10 y Fig. 10.

Al realizar la estadística, se ha podido comprobar que existieron diferencias significativas al comparar los pocillos tratados con la mezcla (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF y los pocillos control (RPMI), durante la primera y primera semana y media de tratamiento ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). A partir de aquí, se produce una disminución de la concentración de LH y las concentraciones de ésta no son significativas estadísticamente (Fig 10). Cuando se compararon los pocillos tratados con la mezcla (LHRH+TRH)+EGF con los pocillos control (RPMI) se observaron diferencias significativas a lo largo de las dos primeras semanas y media de tratamiento ($p < 0.01$). No existen diferencias significativas en la tercera semana de tratamiento. Fig nº10.

LH A PARTIR DE 10 μ g DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

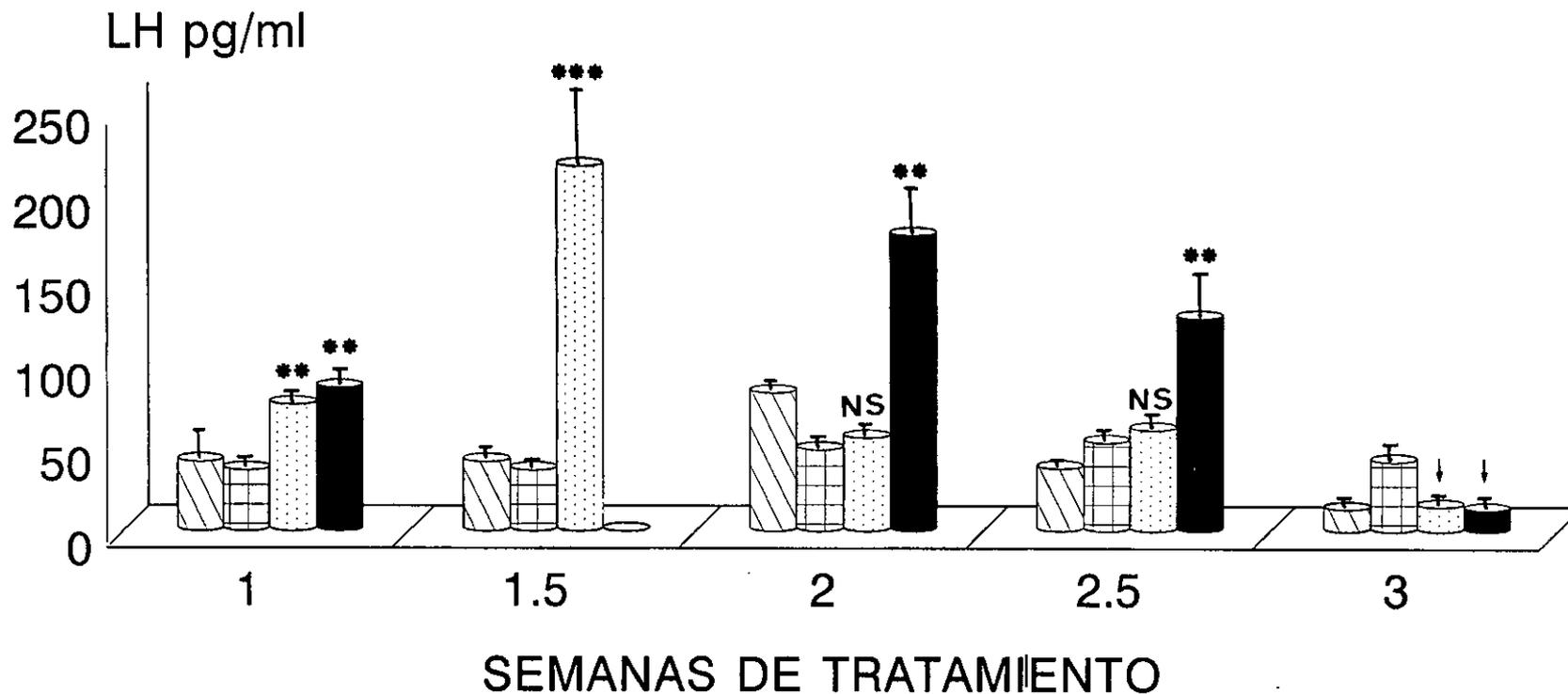
TABLA 10

SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	TODAS*	LHRH+TRH+EGF
PRIMERA	41 \pm 18 (3)	36 \pm 3 (46)	75 \pm 6 (3)	85 \pm 8 (3)
SEMANA Y MEDIA	41 \pm 6 (3)	36 \pm 4 (35)	216 \pm 46 (3)	0 \pm 0 (0)
SEGUNDA	82 \pm 4 (3)	48 \pm 7 (35)	55 \pm 5 (3)	175 \pm 25 (3)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	37 \pm 1 (2)	52 \pm 6 (38)	59 \pm 8 (3)	126 \pm 28 (3)
TERCERA	13 \pm 1 (2)	41 \pm 8 (42)	14 \pm 2 (2)	23 \pm 9 (2)

TODAS*: LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH; XF: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS
DATOS EXPRESADOS EN PG/ML DE MEDIO DE CULTIVO
 MEDIA \pm ESM (n)

LH A PARTIR DE 10 μg DE CADA FACTOR/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

XF
 RPMI
 LHRH+TRH+EGF+CRH+GHRH
 LHRH+TRH+EGF

XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

t de Student

NS : No Significativo; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

5.2.2.- TSH.

Se trataron las células glandulares en cultivo con distintas mezclas de factores hipotalámicos aislados y a distintas concentraciones. En el caso concreto de la TSH, las mezclas utilizadas fueron las siguientes:

- (TRH+CRH+GHRH+LHRH)+EGF.
- (TRH+CRH+GHRH)+EGF.
- (TRH+LHRH)+EGF.

5.2.2.1.- TSH obtenida al emplear las mezclas a una concentración de 2 μ g de cada factor/día/pocillo.

Los controles utilizados fueron pocillos en los que había células glandulares parotídeas en cultivo, a las que sólo se les añadió un volumen de medio RPMI completo equivalente al volumen añadido, a los pocillos que sí recibieron tratamiento, es decir, 50 μ l.

Primera semana de tratamiento (1) a: 147 ± 23 pg/ml de medio de cultivo; n=34.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 142 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana de tratamiento (2): 129 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 163 ± 17 pg/ml de medio de cultivo; n=28.

Tercera semana de tratamiento (3): 129 ± 16 pg/ml de medio de cultivo; n=30.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 11 y Gráfica nº 11.

En este caso, también se han introducido pocillos control sin células que han estado expuestos al efecto de los factores hipotalámicos aislados en las mismas dosis y en la misma concentración cada dosis que los pocillos con células. A este tipo de pocillos control se les ha denominado tanto en las tablas como en las gráficas XF. Tabla nº 11 y Gráfica nº 11.

Primera semana de tratamiento (1) a: 43 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 49 ± 34 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana de tratamiento (2): 35 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 71 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 29 ± 20 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

En el caso de los pocillos con cultivo de células glandulares parotídeas tratados con una mezcla de (TRH+CRH+GHRH+LHRH) + EGF, la concentración de TSH ascendió a:

Primera semana de tratamiento (1) a: 181 ± 37 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 449 ± 59 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 0 ± 0 pg/ml de medio de

cultivo; n=0.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 292 ± 69 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 134 ± 28 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Cuando los pocillos se tratan con (TRH+CRH+GHRH)+EGF la concentración de TSH ascendió a:

Primera semana de tratamiento (1) a: 270 ± 77 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 344 ± 38 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 592 ± 142 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 240 ± 27 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 375 ± 43 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Por último, cuando los pocillos se trataron con la mezcla de (TRH+LHRH)+EGF la concentración de LH fué de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 179 ± 16 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 357 ± 24 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 0 ± 0 pg/ml de medio de cultivo; n=0.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 202 ± 31 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 152 ± 42 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tabla 11 y Fig. 11.

A esta concentración las tres mezclas ofrecieron diferencias significativas con respecto al control (RPMI).

La mezcla (TRH+CRH+GHRH+LHRH)+EGF ofreció diferencias significativas con respecto al control (RPMI) en la primera semana y media de tratamiento y en la segunda semana y media de tratamiento ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente).

La mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF presentó diferencias significativas con respecto al control RPMI a lo largo de todas las semanas salvo en la segunda semana y media de haberse iniciado el tratamiento ($p < 0.01$ en la primera semana y la primera semana y media de tratamiento y $p < 0.01$ en la segunda y tercera semana de tratamiento. Sin embargo, en la segunda semana y media de tratamiento, estadísticamente no se han detectado diferencias significativas).

La mezcla (TRH+LHRH)+EGF solamente presentó diferencias significativas al ser comparada con los pocillos control (RPMI) durante la primera semana y media de haberse instaurado el tratamiento ($p < 0.001$). No se observaron diferencias significativas en las siguientes semanas estudiadas. Gráfica n° 11.

TSH A PARTIR DE 2 μ g DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 11

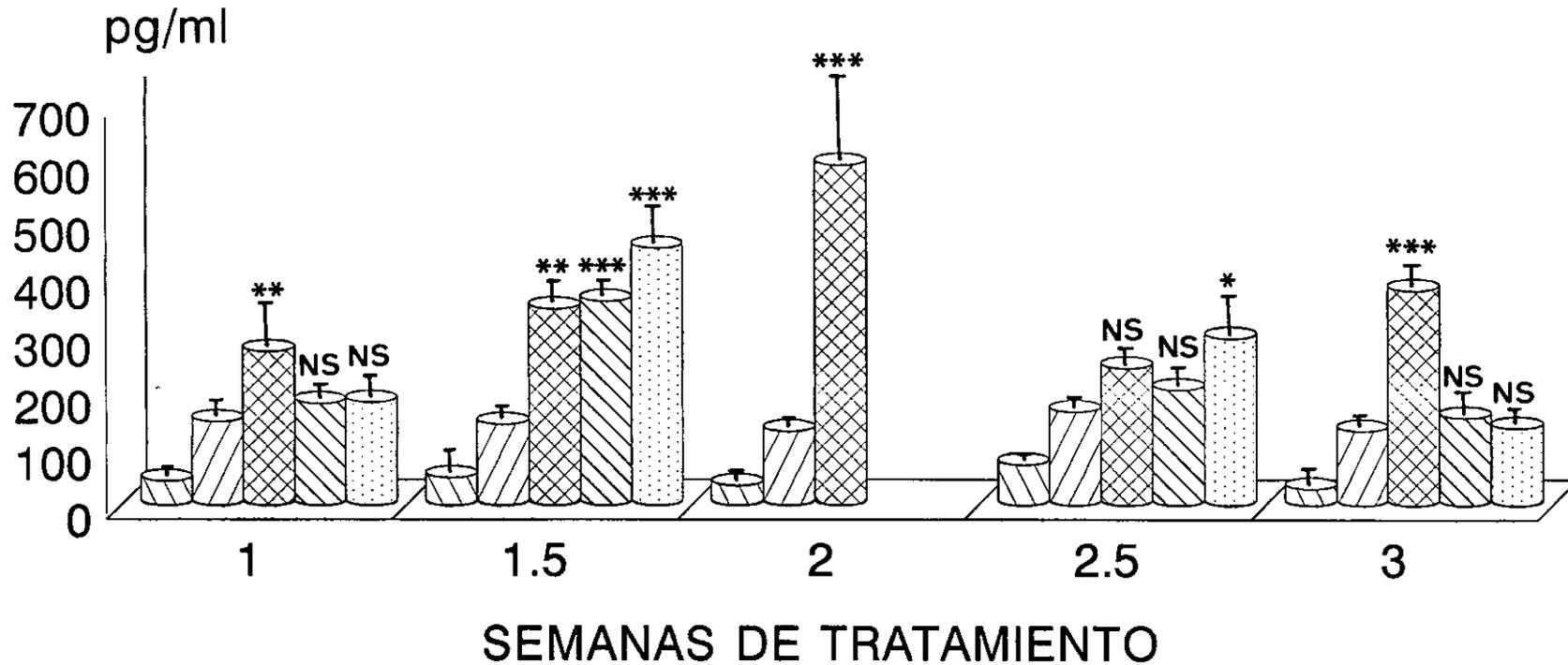
SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	TRH+EGF+CRH+GHRH	LHRH+EGF+TRH	TODAS*
PRIMERA	43 \pm 18 (3)	147 \pm 23 (34)	270 \pm 77 (3)	179 \pm 16 (3)	181 \pm 37 (2)
SEMANA Y MEDIA	49 \pm 34 (2)	142 \pm 18 (25)	344 \pm 38 (3)	357 \pm 24 (3)	449 \pm 59 (3)
SEGUNDA	35 \pm 3 (2)	129 \pm 13 (25)	592 \pm 142 (3)		
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	71 \pm 6 (2)	163 \pm 17 (28)	240 \pm 27 (3)	202 \pm 31 (3)	292 \pm 69 (3)
TERCERA	29 \pm 20 (2)	129 \pm 16 (30)	375 \pm 43 (3)	152 \pm 42 (3)	134 \pm 28 (3)

TODAS* LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH; XF : POCILLOS SÍN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS
DATOS EXPRESADOS EN pg/ml DE MEDIO

MEDIA \pm ESM (n)

TSH A PARTIR DE 2 μg DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

- XF
- RPMI
- 2 TRH+EGF+CRH+GHRH
- 2 LHRH+EGF+TRH
- 2 TODAS*

TODAS* LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH; XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS
 t de Student: NS : No Significativo

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

5.2.2.2.- TSH obtenida al emplear dos de las mezclas a una concentración de 4 μ g de cada factor/día/pocillo.

En este caso se emplearon solamente dos de las mezclas, concretamente (TRH+LHRH)+EGF y la mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF.

La concentración de TSH obtenida después de emplear la mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF a lo largo de las distintas semanas fué la siguiente:

Primera semana de tratamiento (1) a: 0 ± 0 pg/ml de medio de cultivo; n=0.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 404 ± 41 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 226 ± 26 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 308 ± 43 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 220 ± 30 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

La concentración de TSH obtenida después de emplear la mezcla (TRH+LHRH)+EGF a lo largo de las distintas semanas fué la siguiente:

Primera semana de tratamiento (1) a: 164 ± 12 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 567 ± 111 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 274 ± 22 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 246 ± 34 pg/ml

de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 283 ± 160 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Se mantuvieron el mismo tipo de controles:

- RPMI: Con células y medio pero sin factores, obteniéndose una concentración de TSH a lo largo de las distintas semanas de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 147 ± 23 pg/ml de medio de cultivo; n=34.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 142 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana de tratamiento (2): 129 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 163 ± 17 pg/ml de medio de cultivo; n=28.

Tercera semana de tratamiento (3): 129 ± 16 pg/ml de medio de cultivo; n=30.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 12 y Gráfica nº 12.

- XF: Sin células pero con medio y factores hipotalámicos aislados. La concentración de LH en este caso fué de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 43 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 49 ± 34 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana de tratamiento (2): 35 ± 3 pg/ml de medio de

cultivo; n=2.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 71 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 29 ± 20 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tabla n° 12 y Gráfica n° 12.

Al realizar la estadística, se han observado diferencias significativas al comparar los pocillos tratados con el control (RPMI).

La mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF presentó diferencias significativas con respecto al control (RPMI) durante la primera semana y media de tratamiento ($p < 0.001$), y durante la segunda y segunda semana y media de tratamiento ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tercera semana de tratamiento. Fig. 12.

La mezcla (TRH+LHRH)+EGF presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (RPMI) durante la primera semana y media de tratamiento ($p < 0.001$), durante la segunda ($p < 0.01$) y durante la tercera semana de tratamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ni durante la primera ni durante la tercera semana de tratamiento. Fig. 12.

TSH A PARTIR DE 4 μ g DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

TABLA 12

SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	TRH+EGF+CRF+GHRH	LHRH+EGF+TRH
PRIMERA	43 \pm 18 (3)	147 \pm 23 (34)		164 \pm 12 (3)
SEMANA Y MEDIA	49 \pm 34 (2)	142 \pm 18 (25)	404 \pm 41 (3)	567 \pm 111 (3)
SEGUNDA	35 \pm 3 (2)	129 \pm 13 (25)	226 \pm 26 (3)	274 \pm 22 (3)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	71 \pm 6 (2)	163 \pm 17 (28)	308 \pm 43 (3)	246 \pm 34 (3)
TERCERA	29 \pm 20 (2)	129 \pm 16 (30)	220 \pm 30 (3)	283 \pm 160 (3)

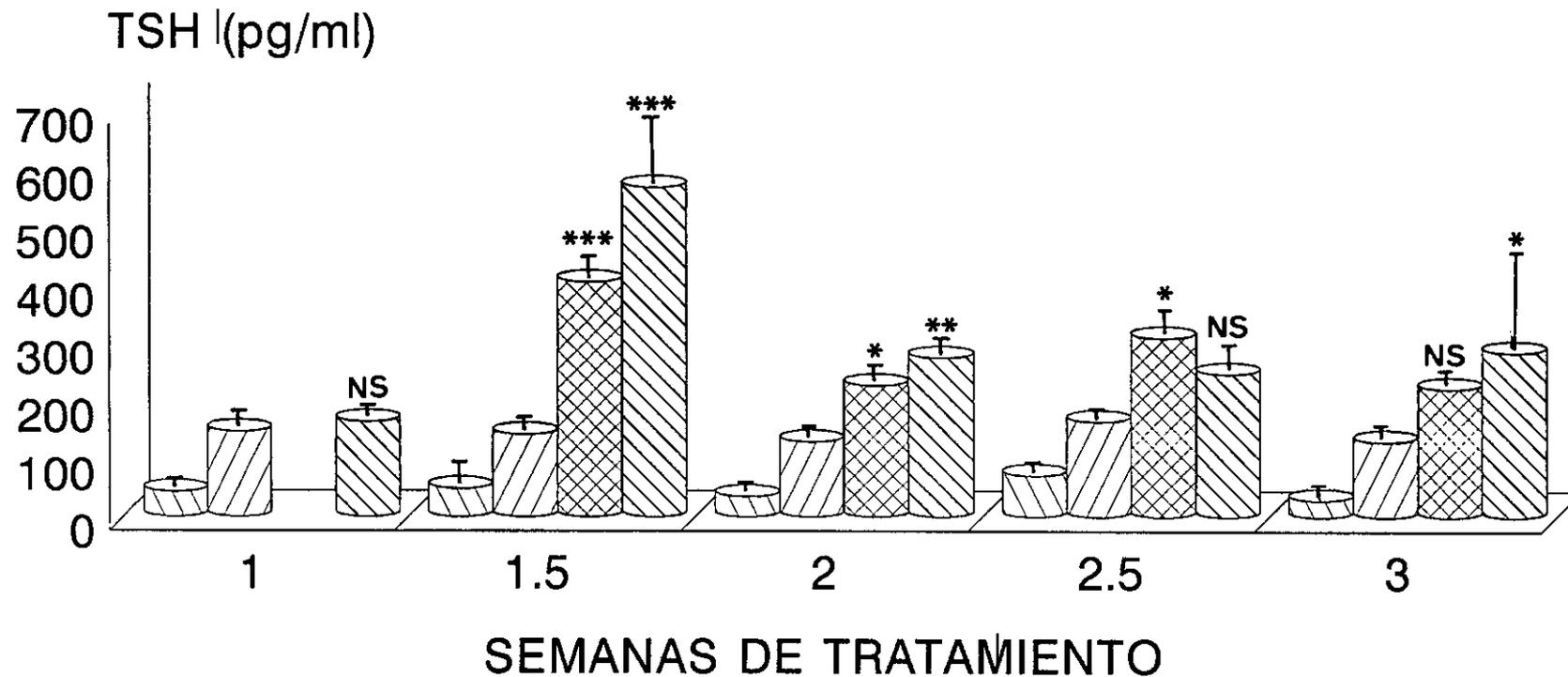
XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

Datos expresados en pg/ml de medio

MEDIA \pm ESM (n)

TSH A PARTIR DE 4 μ g DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

XF
 RPMI
 4 TRH+EGF+CRF+GHRH
 4 LHRH+EGF+TRH

XF : POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

t de Student: NS : No Significativo

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

5.2.2.3.- TSH obtenida al emplear las mezclas a una concentración de 10 μg de cada factor/día/pocillo.

En este caso se volvieron a emplear las tres mezclas. La concentración de TSH obtenida al emplear la mezcla de (TRH+CRH+GHRH+LHRH)+EGF a lo largo de las respectivas semanas fué la siguiente:

Primera semana de tratamiento (1) a: 164 ± 33 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 352 ± 31 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana de tratamiento (2): 59 ± 12 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 200 ± 44 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 178 ± 28 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

La concentración de TSH al emplear la mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF fué la siguiente:

Primera semana de tratamiento (1) a: 125 ± 12 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 159 ± 81 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana de tratamiento (2): 164 ± 44 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 229 ± 36 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 209 ± 44 pg/ml de medio de

cultivo; n=3.

Por último, al emplear la mezcla (LHRH+TRH)+EGF, se observó que la concentración de TSH a lo largo de las distintas semanas de tratamiento ascendió a:

Primera semana de tratamiento (1) a: 187 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 323 ± 8 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana de tratamiento (2): 215 ± 15 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 252 ± 10 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Tercera semana de tratamiento (3): 203 ± 22 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Los controles empleados fueron otra vez, controles con células y controles sin ellas:

- RPMI: Con células y medio pero sin factores, obteniéndose una concentración de TSH a lo largo de las distintas semanas de tratamiento de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 147 ± 23 pg/ml de medio de cultivo; n=34.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 142 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana de tratamiento (2): 129 ± 13 pg/ml de medio de cultivo; n=25.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 163 ± 17 pg/ml de medio de cultivo; n=28.

Tercera semana de tratamiento (3): 129 ± 16 pg/ml de medio de cultivo; n=30.

A este tipo de pocillos control, se les ha denominado en las tablas y gráficas como pocillos RPMI. Tabla nº 13 y Gráfica nº 13.

- XF: Sin células pero con medio y factores hipotalámicos aislados. La concentración de TSH en este caso fué de:

Primera semana de tratamiento (1) a: 43 ± 18 pg/ml de medio de cultivo; n=3.

Primera semana y media de tratamiento (1.5): 49 ± 34 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana de tratamiento (2): 35 ± 3 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Segunda semana y media de tratamiento (2.5): 71 ± 6 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tercera semana de tratamiento (3): 29 ± 20 pg/ml de medio de cultivo; n=2.

Tabla nº 13 y Gráfica nº 13.

Al realizar la estadística, se ha podido comprobar que no existieron diferencias significativas al comparar los pocillos tratados con la mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF con los pocillos control (RPMI) en ninguna de las semanas que duró el tratamiento. Sin embargo, al estudiar el efecto de las otras dos mezclas, si que se observaron diferencias significativas con respecto a los pocillos tratados sólo con medio RPMI.

La mezcla (TRH+CRH+GHRH+LHRH)+EGF presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sólo

en la primera semana y media de tratamiento $p < 0.001$. (Gráfica 13).

La mezcla (TRH+LHRH)+EGF sólo presentó diferencias significativas con respecto al control durante la primera semana y media de tratamiento ($p < 0.01$) y durante la segunda semana de tratamiento ($p < 0.05$). Gráfica. n° 13.

TSH A PARTIR DE 10 μ g DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO

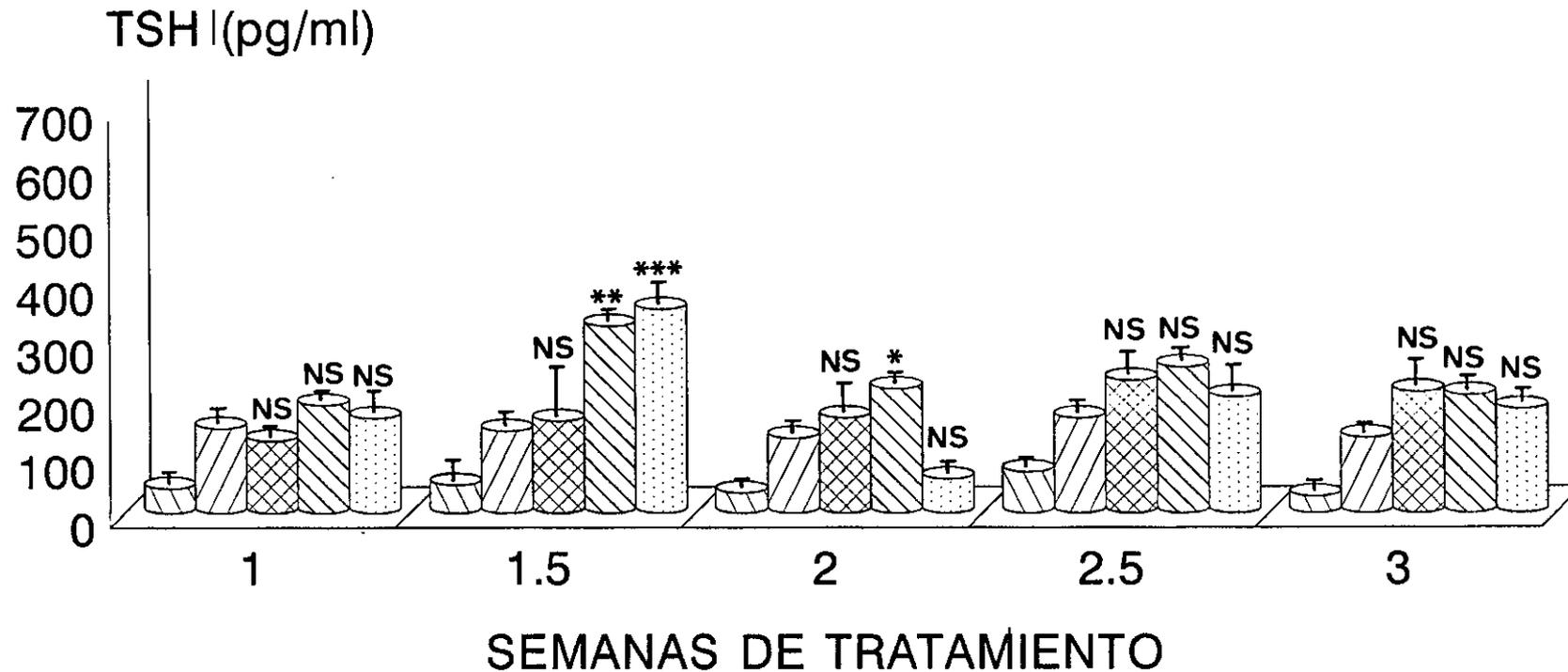
TABLA 13

SEMANAS DE TRATAMIENTO	XF	RPMI	TRH+EGF+CRH+GHRH	LHRH+EGF+TRH	TODAS*
PRIMERA	43 \pm 18 (3)	147 \pm 23 (34)	125 \pm 12 (2)	187 \pm 13 (3)	164 \pm 33 (3)
SEMANA Y MEDIA	49 \pm 34 (2)	142 \pm 18 (25)	159 \pm 81 (2)	323 \pm 8 (2)	352 \pm 31 (3)
SEGUNDA	35 \pm 3 (2)	129 \pm 13 (25)	164 \pm 44 (3)	215 \pm 15 (3)	59 \pm 12 (2)
SEGUNDA SEMANA Y MEDIA	71 \pm 6 (2)	163 \pm 17 (28)	229 \pm 36 (3)	252 \pm 10 (3)	200 \pm 44 (3)
TERCERA	29 \pm 20 (2)	129 \pm 16 (30)	209 \pm 44 (3)	203 \pm 22 (3)	178 \pm 28 (2)

TODAS* : LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH ; XF: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS
Datos expresados en pg/ml de medio
 MEDIA \pm ESM (n)

TSH A PARTIR DE 10 μ g DE CADA HORMONA/DIA/POCILLO

CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS EN CULTIVO



LEYENDAS

-  XF
-  RPMI
-  10 TRH+EGF+CRH+GHRH
-  10 LHRH+EGF+TRH
-  10 TODAS*

TODAS* : LHRH+CRH+EGF+GHRH+TRH ; XF: POCILLOS SIN CELULAS TRATADOS CON LOS FACTORES AISLADOS

t de Student : NS : No Significativo

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

6.- CITOKERATINAS.

Como marcador de filamentos intermedios típicos de células epiteliales se utilizó un anticuerpo anticitokeratinas 1-8. Este anticuerpo se probó en condiciones *in vivo*, en glándulas parótidas adultas jóvenes (10 sem.) y de ratas de 1 día postnatal, así como en hipófisis de rata adulta joven (10 sem.). En la hipófisis este anticuerpo no presentaba ninguna positividad, mientras que en la parótida este anticuerpo marca sobre todo células ductales tanto de conductos intercalados como de conductos estriados. Debemos comentar que el marcaje que hemos encontrado en los adultos jóvenes fué muy fuerte, mientras que en los animales de 1 día postnatal, el marcaje era mucho más suave, indicándonos diferencias en la expresión de las citokeratinas tipo 1-8 entre los animales en desarrollo y los animales adultos.

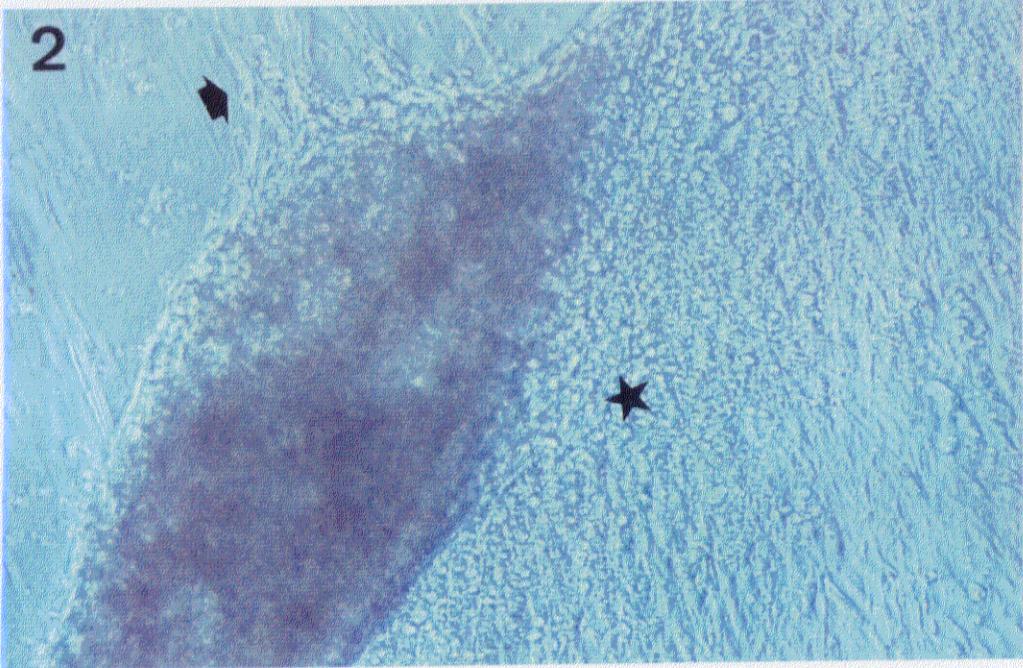
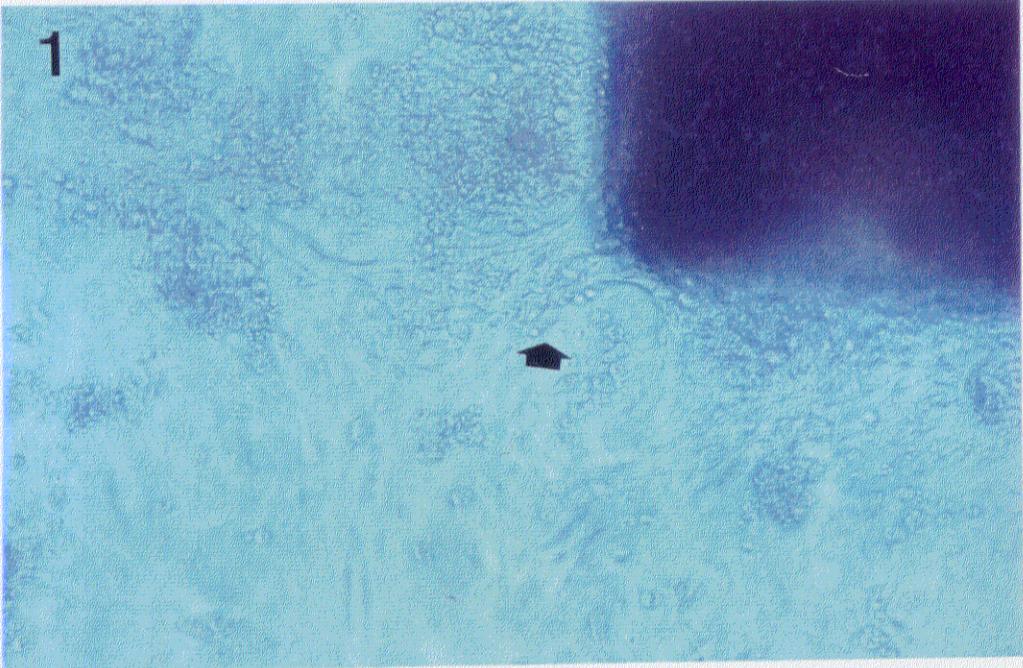
(Planchas 6 y 7).

En los cultivos de células glandulares parotídeas, este anticuerpo también marca células aisladas (que suponemos de origen ductal) o conjuntos de células que se disponen formando un entramado especial que recuerda a la disposición longitudinal de los conductos en la glándula *in vivo* (Plancha 8). Hemos podido comprobar que también se marcan células epiteliales (Plancha 9).

Plancha 1

1 Y 2 .- Fragmentos tisulares parotídeos que se pueden encontrar en el cultivo, si disminuimos los tiempos de actuación de las enzimas; concretamente de la colagenasa y de la hialuronidasa. A partir del explante se produce la diseminación celular (flecha) y la consiguiente formación de la monocapa celular (estrella). 31 días de cultivo. 200X.

PLANCHA 1

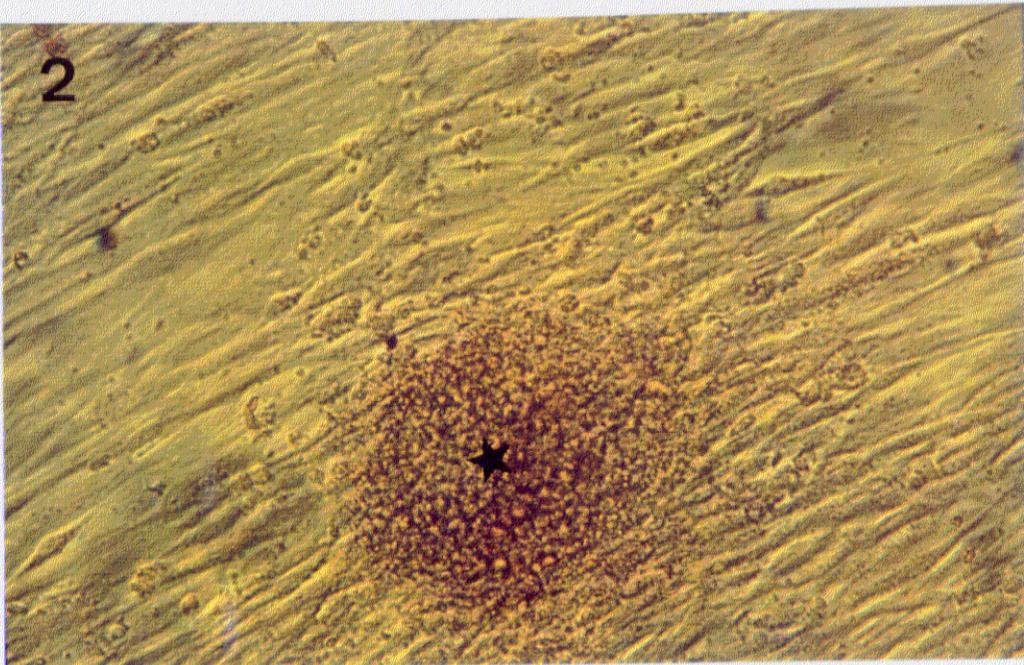
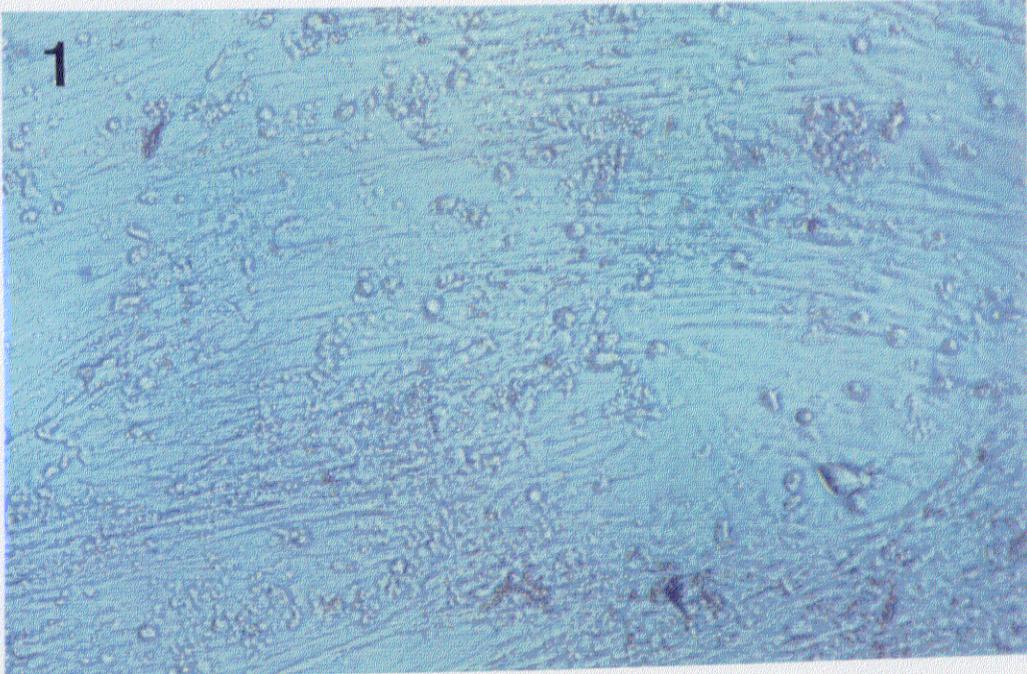


Plancha 2

1.- Panorámica de las células en cultivo I. Las células se pueden situar de forma dispersa como en este caso. 21 días en cultivo. 200X.

2.- Panorámica de las células en cultivo II. Formación de agregados celulares (estrella). 35 días en cultivo. 100X.

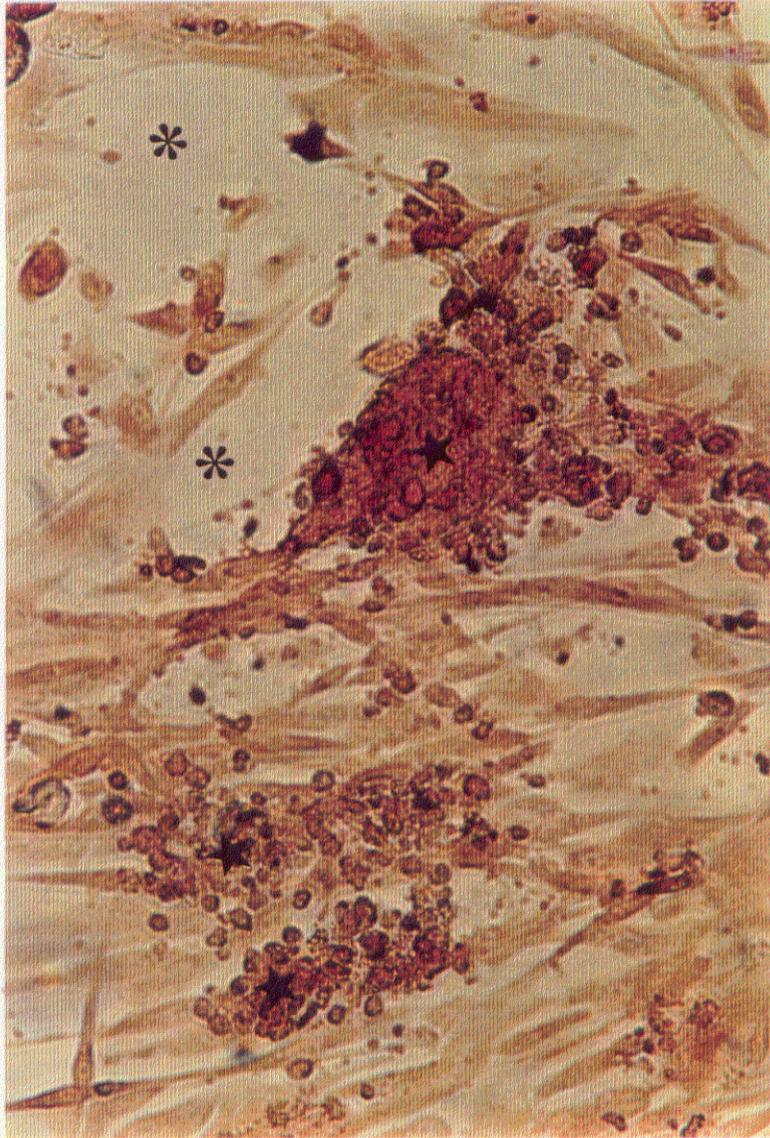
PLANCHA 2



Plancha 3

Las células glandulares se disponen sobre la monocapa de fibroblastos (estrella). Obsérvese que donde la monocapa de fibroblastos se ha perdido (asterisco) no hay células glandulares. 30 días en cultivo. 250X.

PLANCHA 3



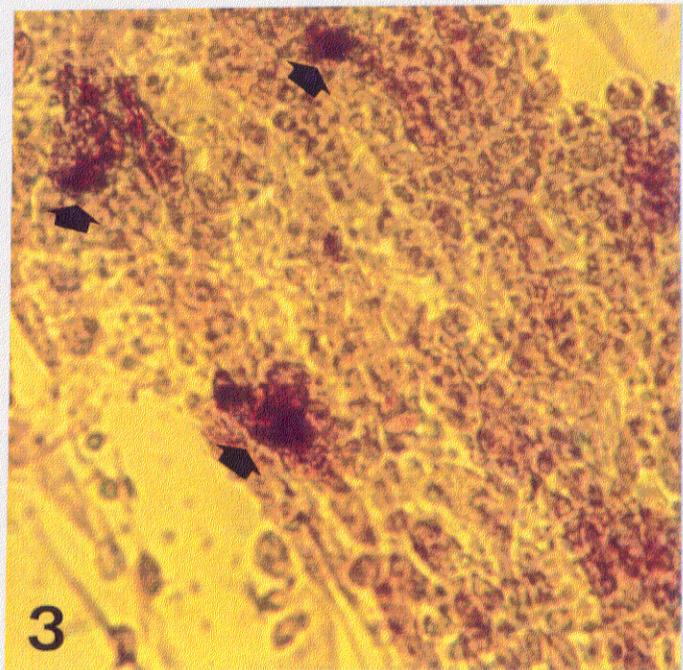
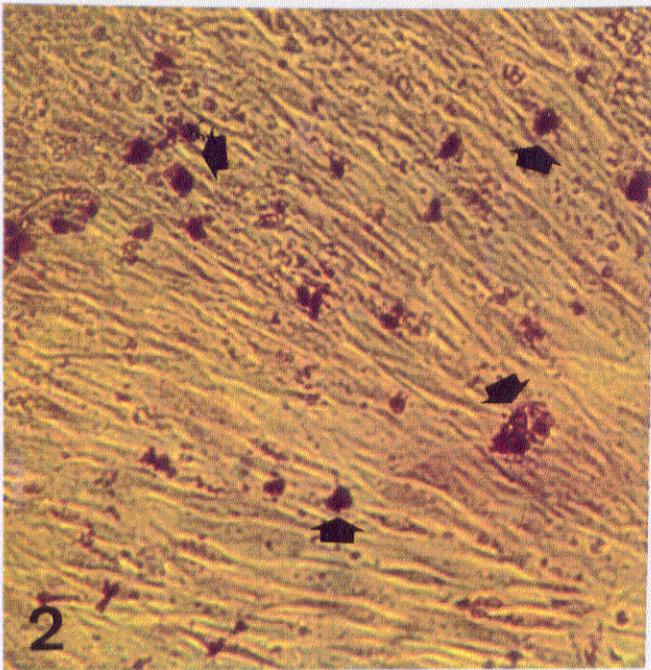
Plancha 4

1.- Anticuerpo anti LH de rata 1:100. Control negativo. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. Todo el agregado de células aparece sin marcaje (flecha). 35 días en cultivo. 100X.

2.- Anticuerpo anti LH de rata 1:100. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR y marcadas positivamente (flechas). 35 días en cultivo. 250X.

3.- Anticuerpo anti LH de rata 1:100. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR y marcadas positivamente (flechas). 35 días en cultivo. 400X.

PLANCHA 4

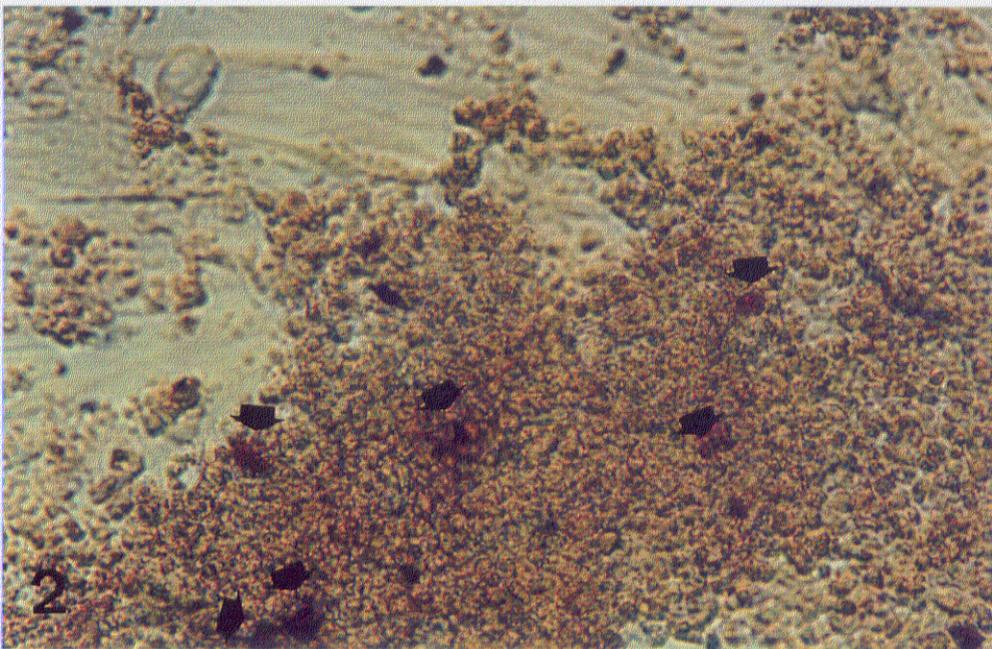
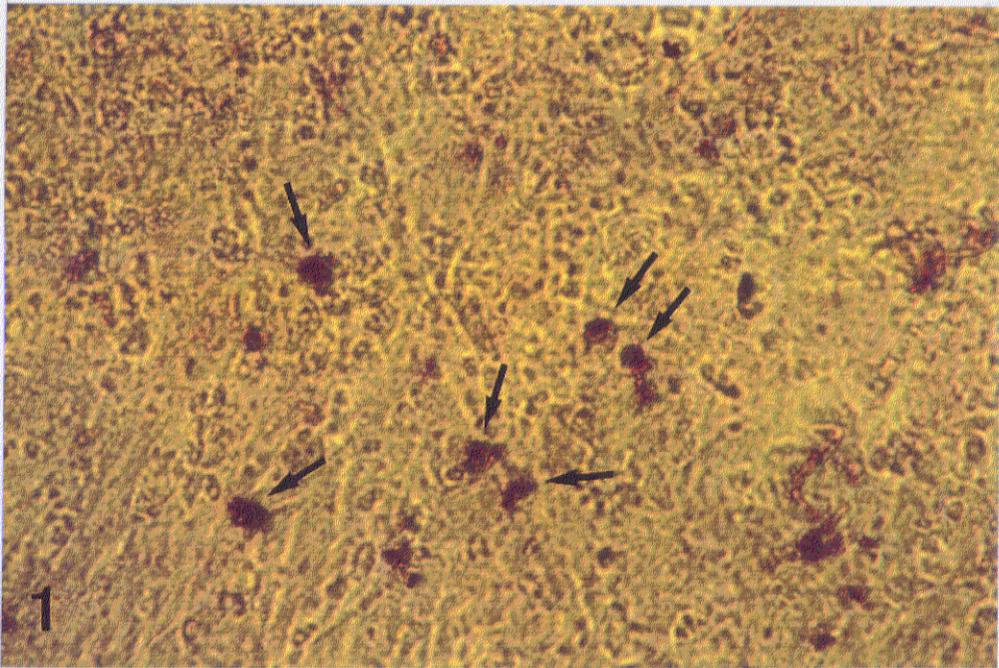


Plancha 5

1.- Anticuerpo anti LH de rata 1:100. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR y marcadas positivamente (flechas). 35 días en cultivo. 400X.

2.- Anticuerpo anti LH de rata 1:100. Células glandulares marcadas positivamente. Tratamiento: EHC equivalente en peso fresco a 1 HR . 35 días en cultivo. 250X.

PLANCHA 5

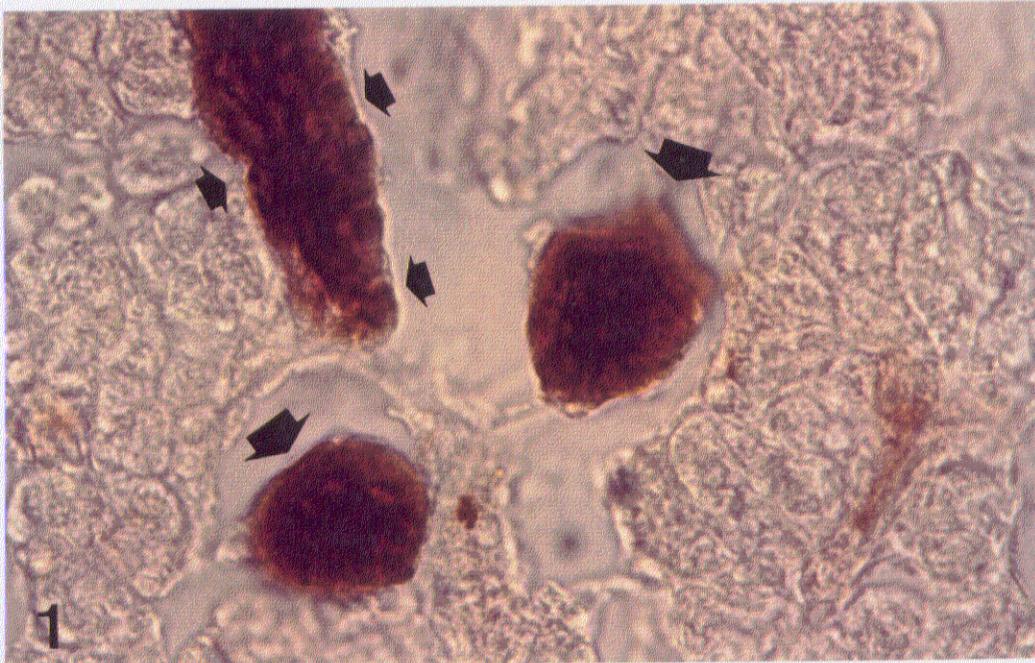


Plancha 6

1.- Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:100. Conducto granular (flechas) de una glándula parótida de rata adulta joven (30 días). Estudio in vivo. 630X.

2.- Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:100. Conducto estriado (asterisco) de una glándula parótida de rata adulta joven (30 días). Estudio in vivo. 630X.

PLANCHA 6

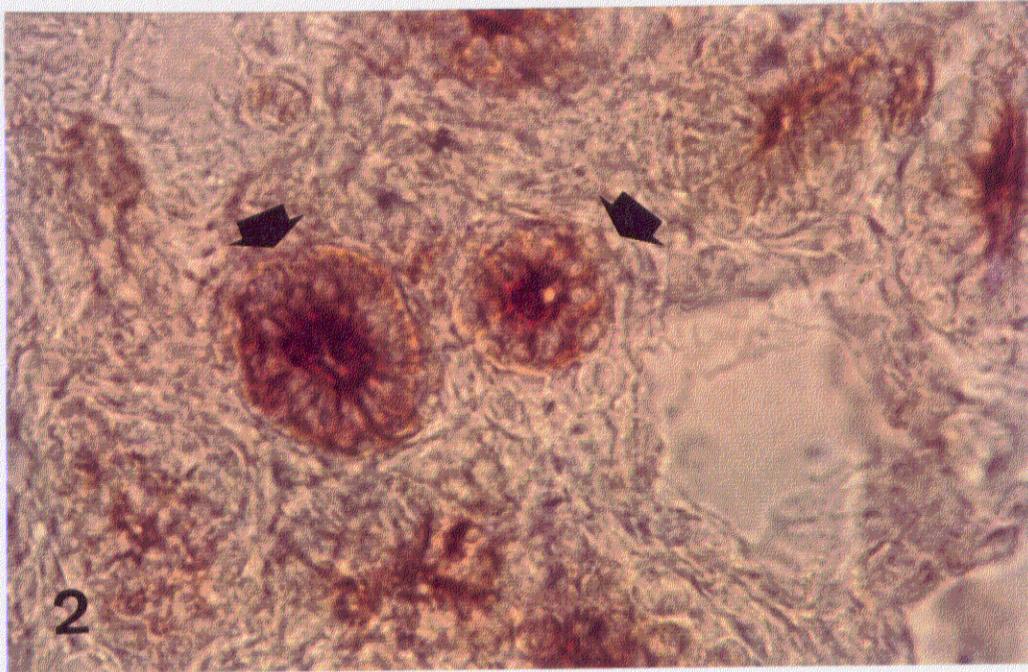
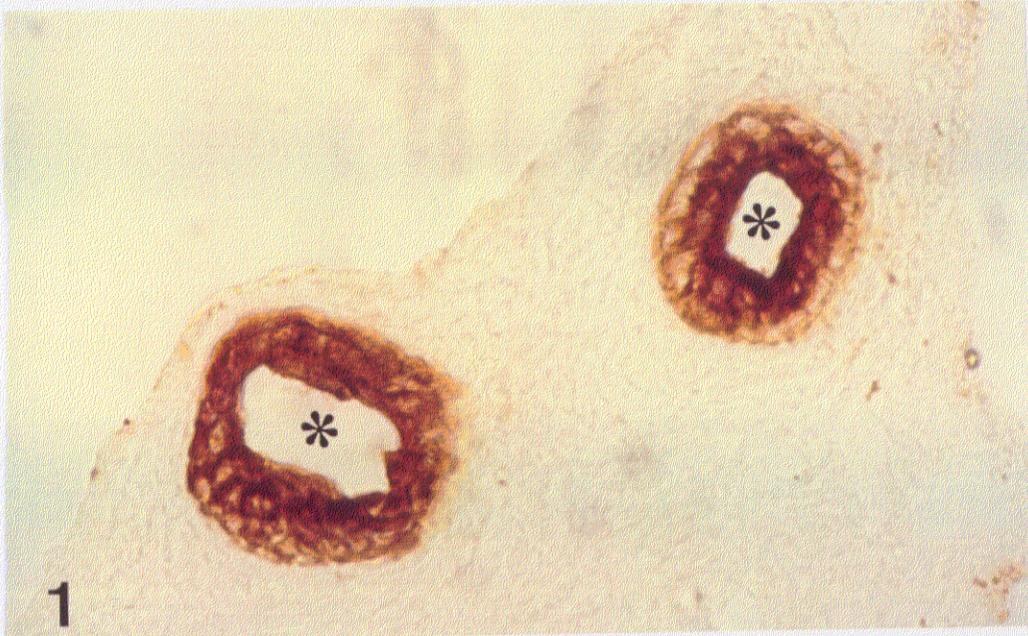


Plancha 7

1.- Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:100. Parénquima marcado (asterisco) de una glándula parótida de rata de 1 día postnatal. Obsérvese la diferencia de intensidad en el marcaje si lo comparamos con la rata adulta. Estudio in vivo. 400X.

2.- Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:100. Sistema de conductos (flechas) de una glándula parótida de rata de 1 día postnatal. Estudio in vivo. 630X.

PLANCHA 7

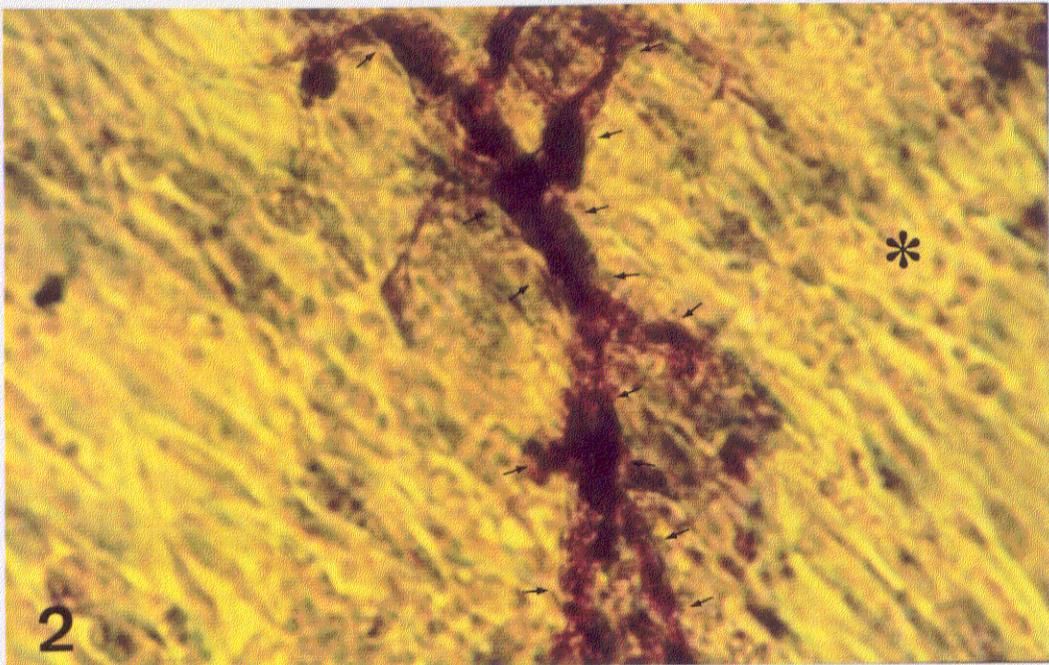
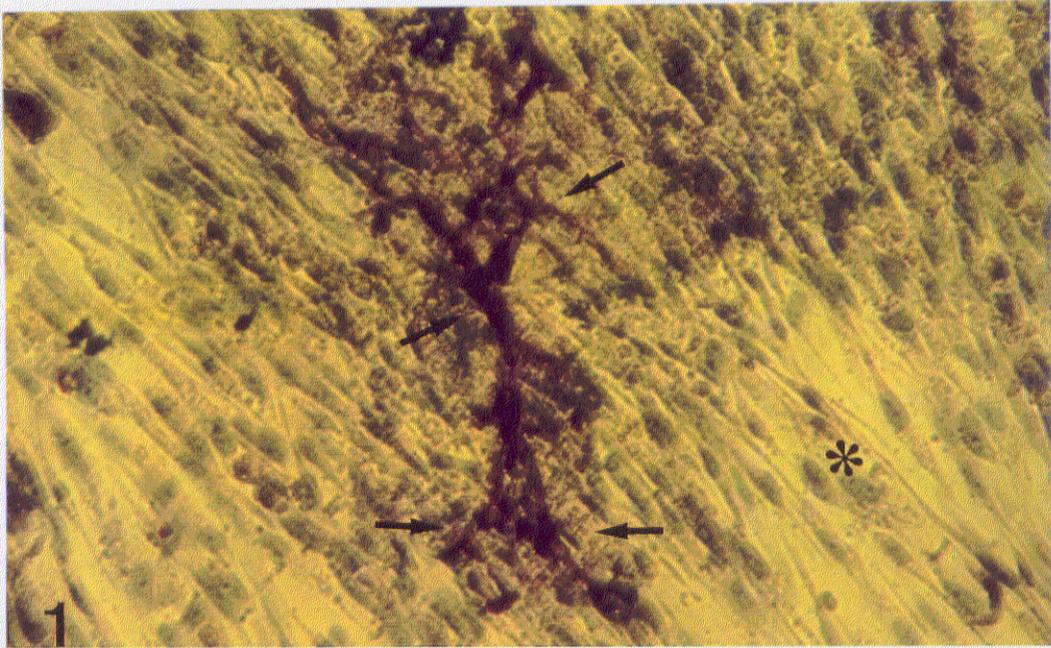


Plancha 8

1.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:20. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. Marca unas células que se disponen en forma de un entramado especial (flechas) que recuerda al sistema de conductos de la glándula. Los fibroblastos están teñidos con hematoxilina (asterisco). Estudio in vitro. 35 días en cultivo. 200X.

2.- La misma imagen a mayor aumento. 400X

PLANCHA 8

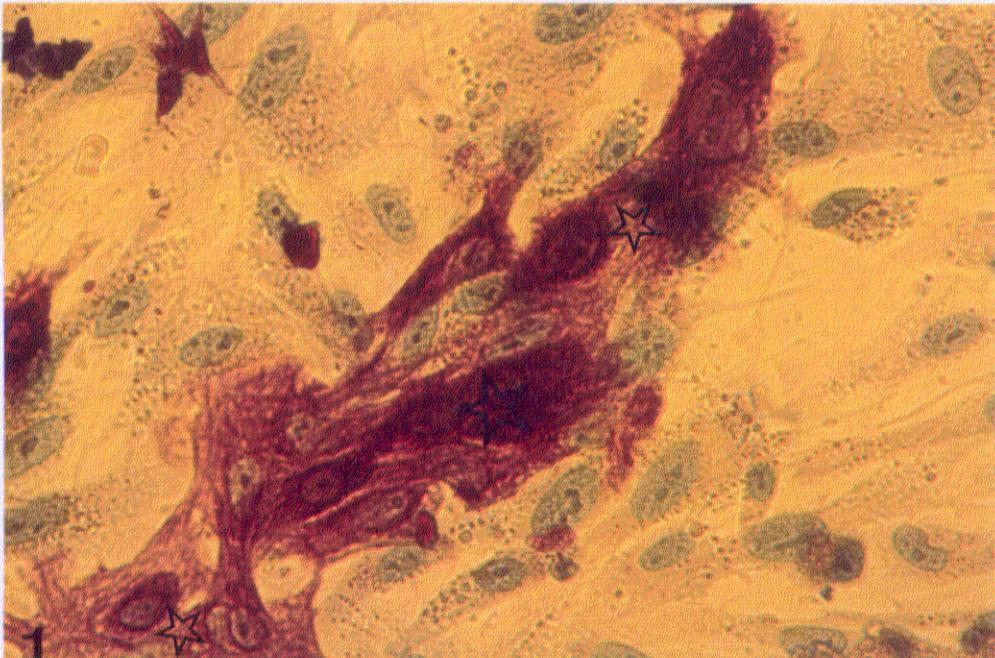


Plancha 9

1.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Anticuerpo anti citokeratinas 1-8. Dilución 1:50. Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. Marca unas células de origen epitelial (asterisco) que se disponen entre los fibroblastos que en la imagen aparecen contrateñidos con hematoxilina. Estudio in vitro. 400X.

2.- Otra imagen de células epiteliales presentes en el cultivo de células parotídeas y que aparecen marcadas con anticuerpo anticitokeratinas 1:50. 400X.

PLANCHA 9

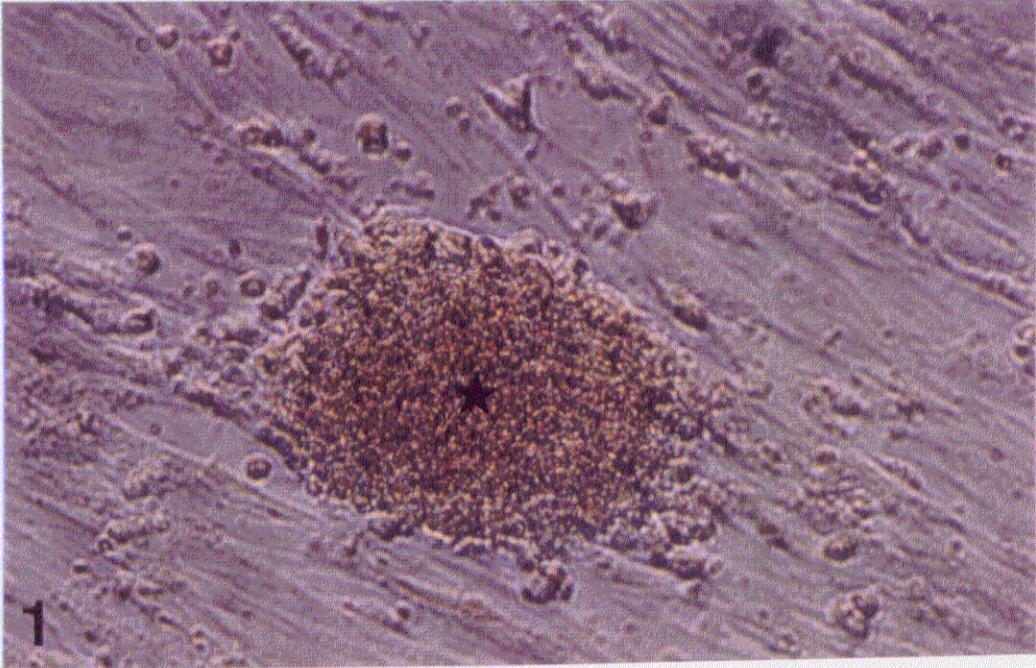


Plancha 10

1.- Agrupación celular parotídea en cultivo. Control negativo del Anticuerpo anti TSH de rata (estrella). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

2.- Agrupación celular parotídea en cultivo con zonas marcadas positivamente con un anticuerpo anti TSH de rata 1:120 (flechas). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

PLANCHA 10



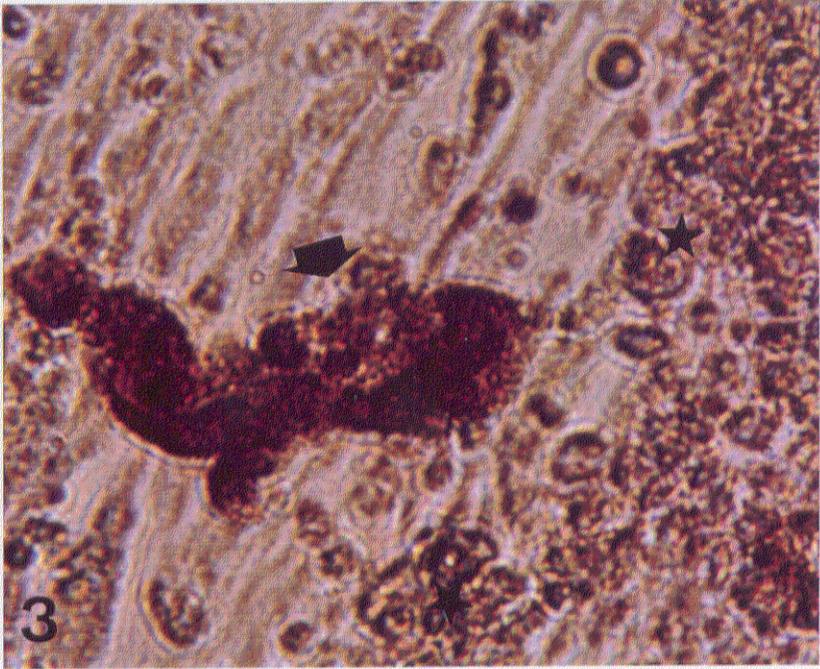
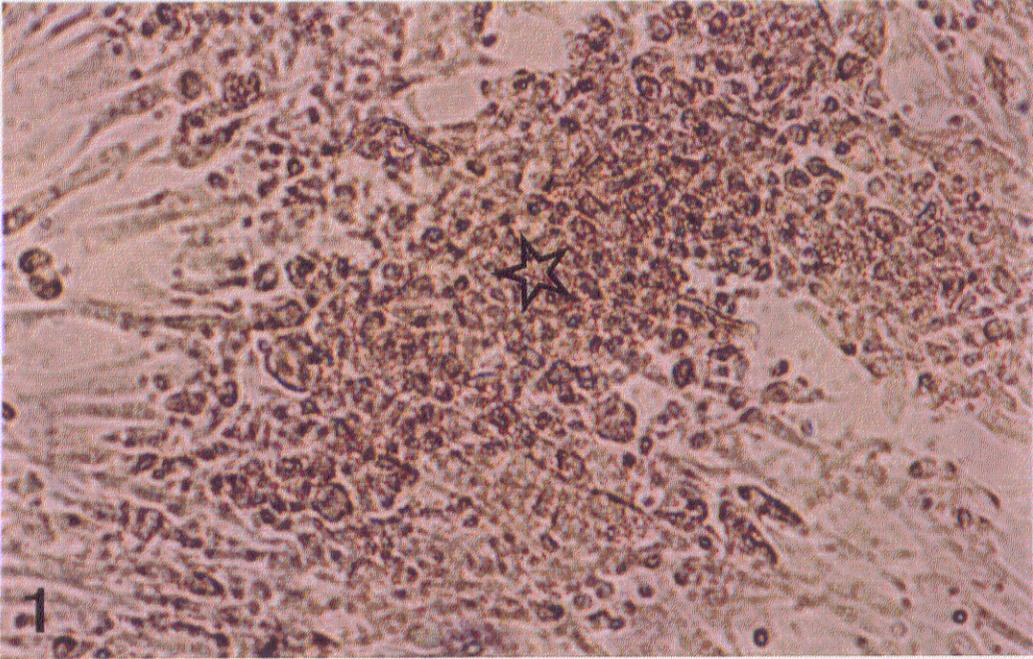
Plancha 11

1.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Control negativo del Anticuerpo anti TSH de rata (estrella). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

2.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Aparece un grupo de células marcadas positivamente con un anticuerpo anti TSH de rata 1:120 (flechas). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

3.- Es la misma imagen que en 2 pero a un aumento mayor. 500X.

PLANCHA 11



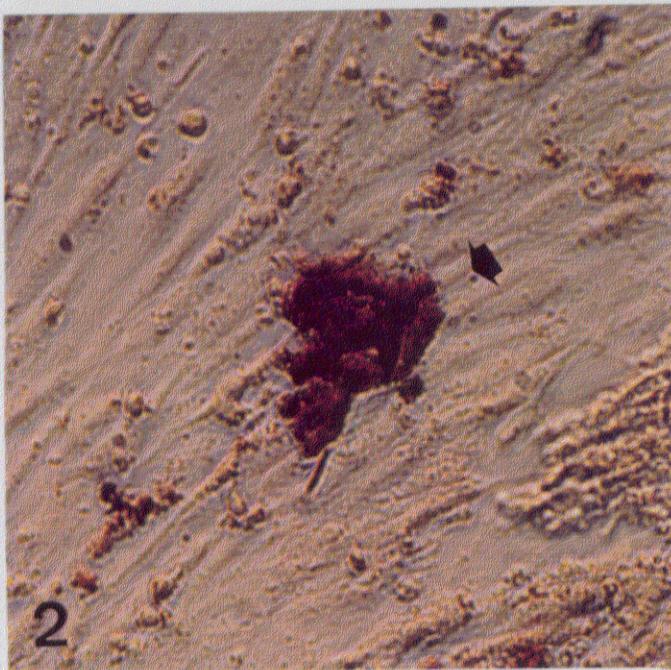
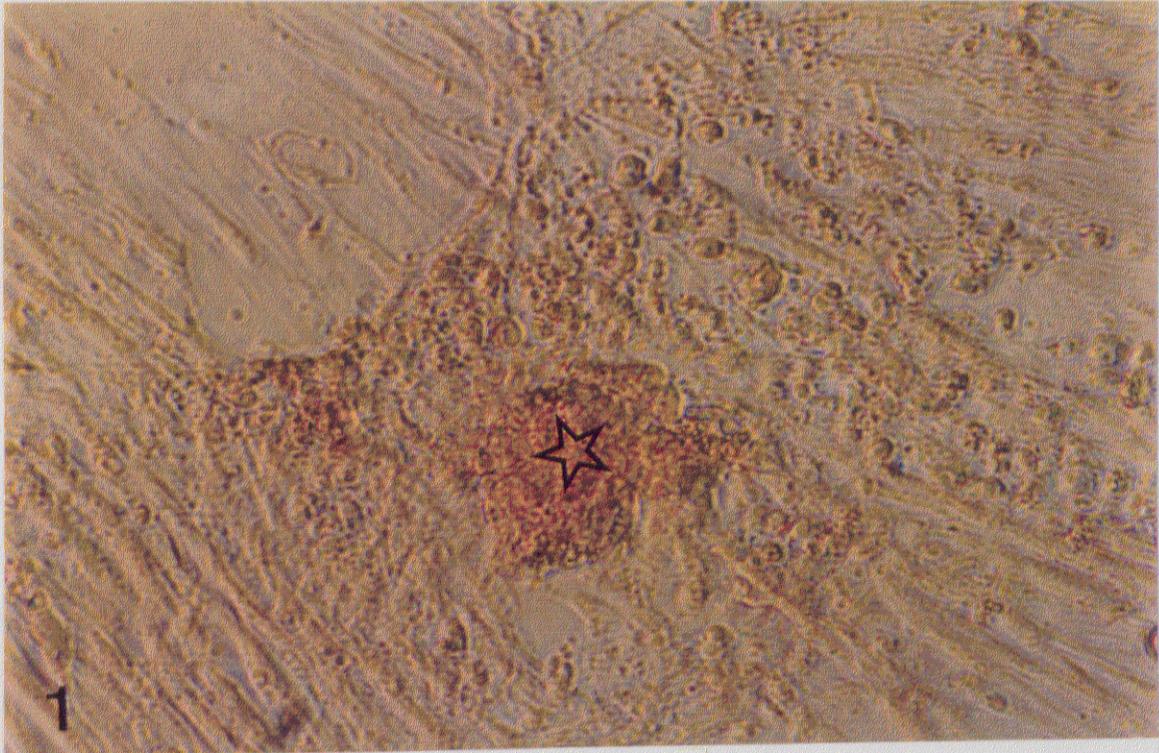
Plancha 12

1.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Control negativo del Anticuerpo anti TSH de rata (estrella). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

2.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Aparece un grupo de células marcadas positivamente con un anticuerpo anti TSH de rata 1:120 (flechas). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

3.- Otra imagen diferente que nos muestra una agrupación celular de mayor tamaño que la mostrada en la foto 2. 250X.

PLANCHA 12

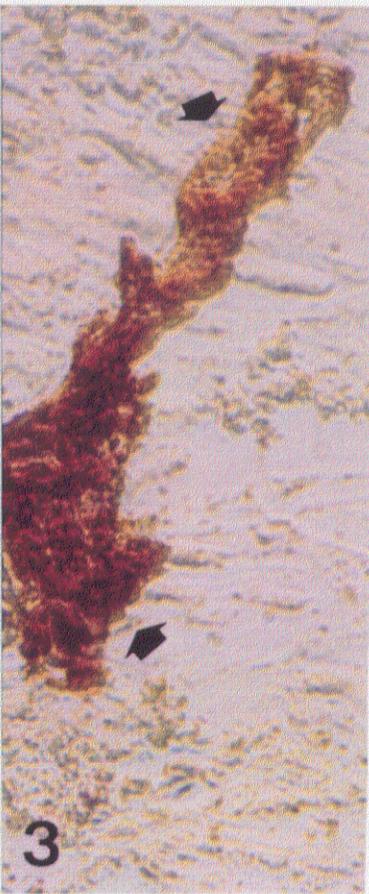
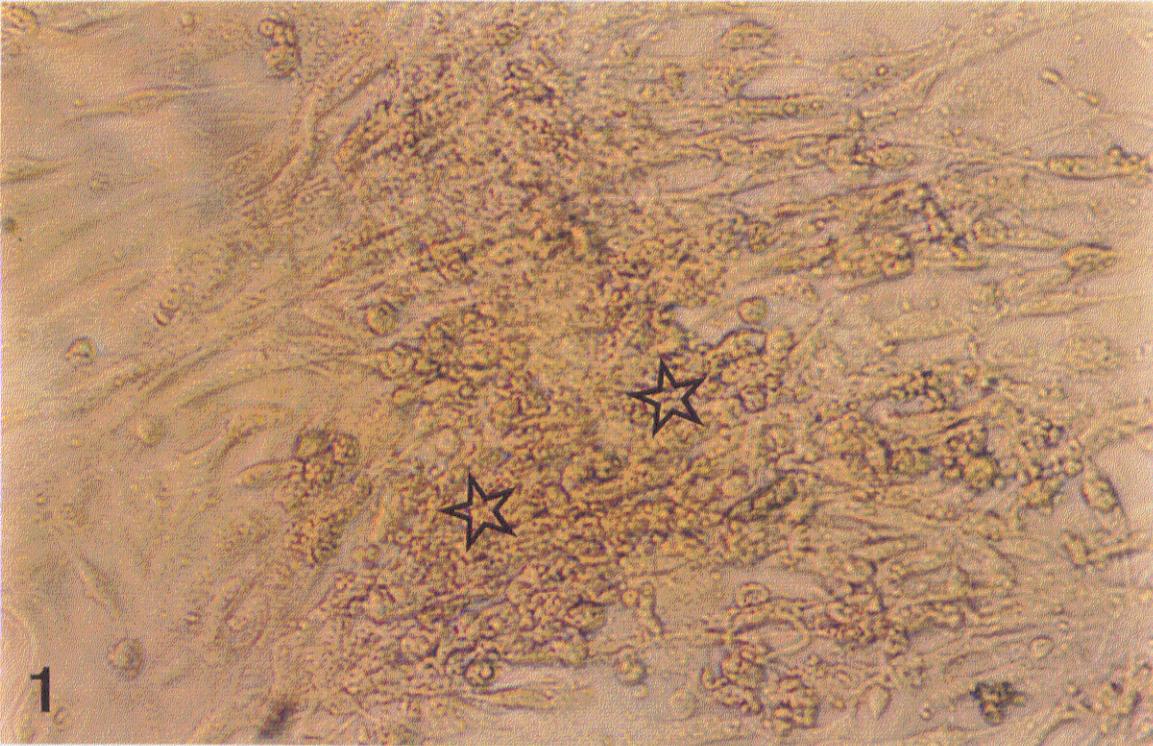


Plancha 13

1.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Control negativo del Anticuerpo anti TSH de rata (estrellas). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. Contraste de fase. 250X.

2 y 3.- Células glandulares parotídeas en cultivo. Aparecen grupos de células marcadas positivamente con un anticuerpo anti TSH de rata 1:120 (flechas). Células tratadas con EHC equivalente en peso fresco a 1 HR. 30 días en cultivo. 250X.

PLANCHA 13



DISCUSSION

1.- DISCUSION METODOLOGICA.

El tejido de las glándulas salivares de mamíferos presenta serias dificultades para su cultivo. Las glándulas salivares están compuestas por distintos tipos de células epiteliales: células ductales pertenecientes tanto a los conductos estriados como a los conductos intercalados, células acinares y células mioepiteliales. Concretamente, las células de los acinos salivares son células epiteliales muy diferenciadas y en consecuencia, difíciles de mantener periodos largos en cultivo sin perder su fenotipo diferenciado (Oliver y cols., 1987). De hecho, la falta de un modelo útil que permita mantener las células acinares *in vitro* de manera estable ha limitado el desarrollo de técnicas que faciliten el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de las funciones de las células acinares (Yeh y cols., 1991).

Las dificultades encontradas a la hora de cultivar células epiteliales salivares, reflejan la compleja serie de factores que son necesarios para el mantenimiento, *in vivo*, de la estructura y funcionalidad de la glándula.

La fisiología de las glándulas salivares se ha estudiado *in vivo* utilizando, como modelo experimental, la rata (Johnson, 1987). No obstante, los cultivos primarios de células acinares o de complejos de células acinares-células ductales o dispersas han aportado también abundante información. Los modelos utilizados han sido los cultivos de cortes de parótida de rata (Lucas, 1969; Batzri y Selinger, 1973) y los cultivos de células aisladas y dispersas en suspensión (Mangos y cols., 1975). Sin embargo, los cultivos de secciones de parótida sólo pueden mantenerse periodos cortos

antes de que se deterioren metabólicamente y lleguen a la muerte celular, por lo cual se ha optado por los cultivos de células acinares que pueden mantenerse periodos más largos.

En general, la realización de cultivos celulares en monocapa implica la preparación de suspensiones celulares después de una digestión enzimática. Posteriormente, las células aisladas se dejan estabilizar en placas de cultivo con distintos substratos. El substrato elegido dependerá de la capacidad del mismo para mantener en cultivo las características propias de las células, en nuestro caso las células parotídeas. El substrato se comporta frente a las células, como la matriz extracelular frente a las células vivas, e interacciona con su superficie celular.

Sin embargo, los mecanismos de interacción entre la matriz extracelular y la membrana plasmática todavía no se conocen en profundidad. Existen datos suficientes como para sugerir que las interacciones afectan a una gran variedad de funciones, entre las que se incluyen, la movilidad celular, el tamaño y adhesividad de las células, los procesos de comunicación intercelular y el crecimiento celular (Reddi, 1984; Birchmeier y Birchmeier, 1993). Se ha demostrado que algunas de las principales moléculas que constituyen las membranas basales modulan la síntesis y secreción de proteínas. Estudios *in vitro* han demostrado que algunos substratos son fundamentales para la fisiología celular, por ejemplo: los hepatocitos de rata en cultivo requieren geles ricos en laminina para secretar albúmina (Bissell y cols., 1987); las células epiteliales de glándulas mamarias de ratón, en cultivo necesitan la presencia de geles de colágeno

para la síntesis y secreción de caseína (Emerman y cols., 1977). Por otro lado, es conocido que los glicosaminoglicanos de los proteoglicanos actúan como estimuladores de la secreción; por ejemplo: la heparina, el heparán sulfato y el dermatán sulfato aumentan de forma selectiva la secreción de proteínas de las células musculares lisas vasculares (secretan hasta cinco veces más, cantidad de proteína que los controles) (Majack y Bornstein, 1984).

Los principales substratos empleados en el cultivo de complejos celulares ductales y acinares de glándula submandibular de rata a medio plazo, 22 días, han sido la laminina y el colágeno (Redman y cols., 1988).

Por su parte, las células acinares parotídeas se han cultivado en monocapa sobre un substrato de colágeno durante 5 días (Fritz y cols., 1980) e incluso se han mantenido como agregados en suspensión por encima de cuatro semanas (Oliver, 1980). También se han podido cultivar en matrices extracelulares durante un mínimo de 20 días (Oliver y cols., 1987). Las células glandulares submandibulares y parotídeas de origen humano se han cultivado durante tres meses, utilizando geles de colágeno como matriz tridimensional (Iwai y cols., 1991). Otros autores han empleado para el cultivo de células epiteliales salivares coágulos plasmáticos (Prasad y cols., 1992).

Finalmente otros investigadores han podido cultivar células acinares parotídeas durante 10 días sin utilizar como substratos componentes de membranas basales (Kiser y cols., 1990).

En nuestro estudio, el principal problema planteado fue el

crecimiento masivo de fibroblastos que invadían el cultivo. En un principio pensamos que estos fibroblastos podrían interferir de forma negativa en nuestro protocolo de trabajo, y por ello decidimos modificar nuestro medio de cultivo, de tal forma que pudieramos obtener un cultivo de células glandulares parotídeas lo más homogéneo posible, en lo que a tipos celulares se refiere. Para ello localizamos un medio de cultivo que promoviera el crecimiento de nuestro tipo celular, epitelial, y que inhibiera el crecimiento de los fibroblastos. Las células epiteliales tienen la posibilidad de utilizar D-Valina como única fuente de valina en el medio de cultivo, ya que poseen la enzima D-aminoácido oxidasa que les permite transformar D-valina en L-Valina. Los fibroblastos, sin embargo, no contienen este enzima por lo que no podrán crecer en el medio si la única fuente de valina en el medio procede de la forma D del aminoácido (Gilbert y Migeon, 1975). Basándonos en esta peculiaridad metabólica que presentan las células epiteliales frente a los fibroblastos, empleamos en nuestro protocolo un medio de cultivo que sólo contenía D-Val (MEM D-Val, Gibco). De esta forma los fibroblastos murieron, pero con el tiempo, nuestras células glandulares también. Los fibroblastos en cultivo siguen produciendo colágeno y fibronectina, que establecen un equilibrio electroquímico con las células ya que aportan las cargas positivas que interaccionan con las cargas negativas de la membrana celular de las células glandulares facilitando así la adhesividad de éstas y su proliferación posterior. Cuando los fibroblastos desaparecían las células glandulares perdían su anclaje, se despegaban de la placa y ya no se

adherían más, con lo que morían. Posteriormente y gracias a las técnicas de inmunocitoquímica pudimos comprobar que los fibroblastos no eran los encargados de la producción hormonal y que su presencia era beneficiosa para el desarrollo de las células por lo que decidimos mantenerlos en nuestros cultivos.

Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores que han utilizado una monocapa de fibroblastos 3T3 como substrato nutricional, que les permitió el cultivo en serie de células epiteliales de glándulas submandibulares y parótidas normales y tumorales procedentes de monos y humanos (Sabatini y cols., 1991; Prasad y cols., 1992; Lewis y cols., 1993).

Los resultados obtenidos al probar el medio mínimo esencial con D-Valina para eliminar los fibroblastos fueron equivalentes a los descritos por otros autores (Gilbert y Migeon, 1975). Es decir se obtuvo la muerte de los fibroblastos y la selección de células glandulares. Sin embargo, en nuestro estudio, las células glandulares morían en ausencia de la capa de fibroblastos.

En nuestro estudio hemos utilizado, diferentes substratos para facilitar la adhesión y posterior proliferación celular, entre ellos colágeno (Boehringer), poli-L-lisina (Biochrome) y el cultivo sobre plástico tratado especialmente para cultivos celulares (Corning, NY). El uso de estos distintos substratos no ha presentado diferencias significativas, por lo que se tomó la decisión de realizar la mayor parte del estudio sobre plástico tratado para cultivos. Otros autores han comprobado que el plástico tratado (Corning) tiene una

superficie que favorece la adhesión celular rápida (2 días) de las células acinares parotídeas (Kiser y cols., 1990).

Para la disociación celular hemos empleado una menor concentración de enzimas de digestión que otros autores (Kiser y cols., 1990; Evans y cols., 1992, 1993), no obstante la viabilidad celular fué similar ya que con nuestra técnica se obtuvo una viabilidad celular del 82% y con la empleada por dichos autores la viabilidad fue del 83.7%.

El crecimiento de las células glandulares fue estimulado por el uso de EGF, el cual es un mitógeno potente concretamente para fibroblastos y células epiteliales. No obstante, en nuestro estudio nosotros no observamos diferencias significativas entre las células tratadas con EGF y las no tratadas. Sin embargo, en las últimas semanas, las células que se encontraban en los pocillos tratados con EGF presentaron una mayor supervivencia que las de los pocillos control.

En general, el método empleado en el presente estudio es mucho más simple que los desarrollados por otros autores. En nuestro estudio hemos empleado combinaciones simples de suplementos, menos complejas que las utilizadas por otros autores (Redman y cols., 1988; Kiser y cols., 1990; Yeh y cols., 1991; Sabatini y cols., 1991; Prasad y cols., 1992). Estos autores han utilizado un medio de cultivo con más suplementos que los empleados por nosotros (glutación reducido, putrescina, transferrina, adenina, mitomicina C, insulina, dexametasona que aumenta la supervivencia de los conductos estriados en cultivo, isoproterenol que facilita la secreción de los acinos, ácido retinoico, ácido selénico y

EGF). Las diferencias en las necesidades de suplementación, creemos que pueden ser debidas a que sus células procedían de animales adultos jóvenes (Entre 30 y 45 días). Algunos autores han utilizado extracto hipofisario bovino como suplemento del medio basal (Prasad y cols., 1992). Estos autores, usaron placas pretratadas que permitieron que las células epiteliales se agregaran y se adhirieran aunque morían en cortos periodos. Nuestro estudio ha permitido que las células de animales de animales postnatales se mantuvieran como mínimo tres semanas y en algunos casos incluso siete semanas. La diferencia puede radicar en que en los primeros estudios se emplearon células de adultos jóvenes (30 días) mientras que en nuestro estudio se emplearon células procedentes de animales de uno-dos días postnatales. Otra de las diferencias estriba en que en los estudios previos se empleó suero bovino fetal inactivado, mientras que en nuestro estudio cuando se utilizó suero bovino inactivado, las células se adhirieron tardamente a la placa, siendo además la proliferación celular mucho más lenta. Esto puede ser debido a que durante el proceso de inactivación es posible que se pierdan factores que permiten la proliferación de la monocapa de fibroblastos.

2. DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GLANDULARES PAROTIDEAS IN VITRO.

Al dispersar las células y explantarlas a las condiciones del cultivo, se encuentran células aisladas, aunque, en algunos casos, pueden quedar pequeños fragmentos glandulares que no han sido digeridos totalmente por las enzimas. Todas las

células, al inicio del cultivo son redondas y al microscopio invertido con contraste de fase podemos observar que presentan un halo brillante. A las 24 h del inicio del cultivo los fibroblastos procedentes de la cubierta conjuntiva de la glándula comienzan a adherirse a la placa. Los fibroblastos, tardan alrededor de 4 días en llegar a la confluencia y durante ese período de tiempo, las células glandulares parotídeas que inicialmente se encontraban aisladas empiezan a agruparse. Algunos autores sugieren que los agregados celulares se mantienen un mayor tiempo en cultivo manteniéndose las células más tiempo funcionales (Conway y cols., 1992; Lewis y cols., 1993). En nuestros cultivos, observamos que, efectivamente, estos agregados celulares se mantienen como tales durante el período de tiempo que dura el experimento, sin observar en ellos ningún síntoma de degeneración. En el cultivo, también pueden quedar pequeños grupúsculos de células aisladas. Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores (Kiser y cols., 1990; Iwai y cols., 1991; Sabatini y cols., 1991; Prasad y cols., 1992)

3.- DIFERENCIAS MORFOLOGICAS DE LA GLANDULA PAROTIDA DEL NEONATO CON RESPECTO A LA DEL ADULTO.

Durante el desarrollo embrionario, los acinos secretores y el sistema de conductos, muy ramificado, se desarrollan como una invaginación del epitelio bucal. Los cordones epiteliales que se invaginan invaden el tejido conjuntivo o ectomesénquima embrionario. De esta forma el epitelio bucal (de origen ectodérmico) da lugar a un tejido parenquimatoso que

representará el tejido funcional de un órgano, que en este caso serán los acinos y los conductos de la glándula parótida. El conjuntivo embrionario (ectomesénquima) formará el estroma, futuro tejido conectivo de la glándula parótida. El estroma hará las funciones de tejido de sostén y dará lugar a la cápsula fibrosa y a los tabiques de tejido conjuntivo relacionados con ella.

En el neonato, después de lo comentado hasta aquí, podemos decir que existe una gran cantidad de tejido parenquimatoso desigualmente diferenciado. Se pueden observar sistemas de conductos poco ramificados y acinos en formación. Se observa también tejido mesenquimatoso. Se ha demostrado que este mesénquima ejerce un efecto inductor sobre el epitelio bucal, que culmina con la diferenciación y el desarrollo de los elementos del parénquima de la glándula (Bernfield y Wessells, 1970).

Las ramificaciones de la glándula submandibular fetal del ratón se han estudiado desde el punto de vista de las interacciones epitelio-mesénquima. Este tipo de estudios se han abordado desde dos puntos de vista diferentes, los dos realizados *in vitro*. Uno de los estudios, se realizó con un cultivo organotípico, donde a las dos clases de tejido, el epitelio y el mesénquima, se las permitía interaccionar con la misma facilidad con la que lo hacen *in vivo* (Bernfield y Wessells, 1970). En el otro experimento se cultivó el epitelio en una matriz tridimensional (Matrigel) y se separó del mesénquima por medio de un filtro. La morfogénesis de la ramificación era comparable a la que se produce *in vivo* (Takahashi y Nowaga, 1991).

Ya en el año 1953, se llevaron a cabo los primeros experimentos en los que se empleaba un filtro para separar los dos tipos de tejidos, con lo que el epitelio, mostraba unas hendiduras muy profundas en su superficie, de manera que su forma era distinta de la típica obtenida en los cultivos organotípicos (Grobstein, 1953). En estudios realizados posteriormente (Takahashi y Nowaga, 1991) se analiza la acción del mesénquima sobre el epitelio, incluyendo los efectos de algunas matrices extracelulares, el efecto de factores difusibles, los contactos directos célula-célula y las acciones mecánicas de las células del mesénquima, como por ejemplo, los movimientos celulares y las fuerzas de tracción (Nogawa y Nakanishi, 1987).

En los estudios en los que se empleaba mesénquima submandibular como inductor heterotípico, los procesos de penetración celular se observaban con dificultad si se empleaban filtros con un tamaño de poro de $0.6 \mu\text{m}$. Si los filtros tenían un tamaño de poro de $0.2 \mu\text{m}$ no se producía la inducción (Saxen, 1980). En los estudios posteriores, en los que se ha cultivado el epitelio sobre una matriz extracelular, y luego se han separado del mesénquima con un filtro (tamaño de poro de $0.4 \mu\text{m}$, $0.1 \mu\text{m}$ y $0.05 \mu\text{m}$), los resultados han sido mejores que cuando no existía una matriz extracelular. Este hecho sugiere que el efecto inductor que ejerce el mesénquima puede estar mediado por factores difusibles y que los geles de matrices extracelulares proporcionan un medio extracelular apropiado para la inducción del crecimiento epitelial.

Los componentes mayoritarios de las membranas basales y del

matrigel son laminina, colágeno tipo IV, heparan sulfato, proteoglicanos, nidogen y entactina (Kleinman y cols., 1986). Los proteoglicanos de la lámina basal juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la morfología lobular y en la morfogénesis de la ramificación de la glándula (Bernfield y cols., 1972; Banerjee y cols., 1977).

Con respecto a la laminina, se ha sugerido que podría estar implicada en la expresión de la polaridad de las células epiteliales de los túbulos metanéfricos (Klein y cols., 1988), en la alineación de las células endoteliales para la formación de estructuras análogas a los capilares (Grant y cols., 1989) y en la ramificación normal que se produce en el epitelio del pulmón (Schuger y cols., 1990). Estos estudios sugieren que la laminina estaría implicada, junto a otros componentes de membranas basales, en la organización general y de la polaridad de las células epiteliales.

Es decir, en lo que a las glándulas salivares del neonato se refiere, existe una gran cantidad de tejido parenquimatoso inducible, sistemas de conductos poco ramificados y acinos en formación. Se observa también tejido mesenquimatoso. Estos resultados concuerdan con las descripciones hechas por otros autores para los animales en desarrollo (Davis, 1986).

Con respecto a la morfología de la glándula de los animales adultos, podemos decir que, los acinos secretores, así como el sistema de conductos se encuentran muy ramificados, y completamente desarrollados.

A partir de la realización de estudios morfométricos, realizados en glándula submandibular de las ratas macho Wistar, existen autores que han llegado a la conclusión de

que los acinos representan el 63% del volumen de la glándula, mientras que los conductos granulares representan el 18%, el estroma el 14%, los conductos intercalados el 4% y los conductos estriados el 1% (Dehaye y Turner, 1991).

Los filamentos de actina, los filamentos intermedios citoplásmicos y los microtúbulos del citoesqueleto están directamente implicados en la morfogénesis de las glándulas salivares (Spooner y Wessells, 1972). El citoesqueleto tiene una función muy importante, en la transducción de la señal y en la transición de ciertos tipos celulares desde la situación de reposo a la situación de actividad proliferativa (Lewis y cols., 1993).

Los filamentos intermedios son alargados, de unos 10 nm de diámetro aproximadamente, formadas por la polimerización de moléculas helicoidales arrolladas que presentan un aspecto final en forma de bastoncillo. Se han clasificado en seis clases (Albers y Fuchs, 1992), aunque se pueden dividir en tres grandes grupos (Stewart, 1993):

- Grupo A: Keratinas (tanto ácidas como básicas).
- Grupo B: Desmina, Vimentina, GFAP, Neurofilamentos.
- Grupo C: Laminas nucleares.

Los filamentos intermedios contribuyen a la estabilidad mecánica de las células, pero además de esta función, el estudio de las proteínas de los filamentos intermedios ha permitido analizar algunos aspectos de la implicación de éstos en la diferenciación celular de los individuos en desarrollo (Lazarides, 1982). En los individuos adultos, los filamentos intermedios pueden estar implicados, en la determinación de las características diferenciales de

adhesividad que presentan las células en función de su tejido de origen.

El componente característico de los filamentos intermedios de las células epiteliales y de las células de origen epitelial son las keratinas. Las keratinas son unas estructuras muy estables; son insolubles en tampones acuosos neutros, pero se pueden extraer utilizando solventes desnaturizantes (Urea 8 M). También se necesita la presencia de un agente reductor para extraer eficazmente las keratinas a partir de células totalmente diferenciadas. Esta estabilidad podría indicar que no son unas estructuras muy dinámicas, sin embargo existen muchos estudios que explican el intercambio de subunidades y los procesos dinámicos de ensamblaje y desensamblaje de las distintas subunidades (Vikstrom y cols., 1992).

Existen dos subtipos de keratinas si nos basamos en la homología de sus secuencias (Coulombe, 1993):

- Keratinas de tipo I: Son más pequeñas (40-56.5 kd) y de naturaleza ácida, mientras que las
- Keratinas de tipo II: Son más grandes (53-67 kd) y de naturaleza básica o neutra.

Esta naturaleza dual tiene una gran relevancia funcional ya que los filamentos de keratina son heteropolímeros, formados fundamentalmente por cadenas de tipo I y por cadenas de tipo II en una proporción 1:1 molar. La mayoría de las keratinas tienden a expresarse en las células epiteliales, *in vivo*, como heterodímeros tipo I-tipo II de forma característica en función del estadio de diferenciación. Incluso, tanto los epitelios simples como los complejos expresan distintos grupos de keratinas y que todos los epitelios complejos se

pueden clasificar basándonos en la expresión de unas keratinas determinadas (las células progenitoras expresan keratinas distintas a las células en procesos de diferenciación) (Moll y cols., 1982).

Se han descrito un total de 21 polipéptidos de keratinas (Coulombe, 1993). De entre las distintas keratinas, las citokeratinas 7, 8, 18 y 19 se han considerado como típicas de epitelios simples. Por esa razón, nosotros hemos utilizado un anticuerpo anti citokeratinas 1-8, desarrollado a partir de un inmunógeno que contenía keratinas tipo 8 humanas, pero que reconoce heterodímeros tipo 1-8.

A pesar de la heterogeneidad extrema entre los diferentes polipéptidos de las keratinas, las citokeratinas comparten ciertas similitudes que implican una cierta homología en las secuencias. El hecho más evidente es que las citokeratinas de mamíferos de distintas especies, están inmunologicamente relacionadas. Aunque las keratinas se pueden distinguir inmunologicamente ya sea dentro de una misma especie o entre especies distintas, los anticuerpos desarrollados frente a las keratinas de la epidermis humana y frente a las keratinas epidérmicas bovinas muestran reactividad cruzada con las keratinas de las células epiteliales de otras especies, entre las que destacan las de conejo, las de ratón, las de rata, e incluso las de anfibios (Lazarides, 1982). Esta reactividad cruzada que presentan los anticuerpos es muy útil para demostrar que un epitelio dado contiene polipéptidos análogos a las citokeratinas. También resulta muy útil, saber que las citokeratinas son específicas de células epiteliales y de células de origen epitelial (ectodérmicos o endodérmicos), ya

que no están presentes en células de ningún otro origen embrionario. Además, estos anticuerpos han permitido demostrar de forma directa que los filamentos identificados en el citoplasma de células epiteliales como los hepatocitos, células acinares pancreáticas y células mioepiteliales eran de hecho keratinas, y no otro tipo de filamentos intermedios (Lazarides, 1982).

Esta reactividad cruzada tan amplia que presentan los anticuerpos anticitokeratinas ha servido para demostrar que los keratinocitos en cultivo, son capaces de seguir expresando keratinas que se visualizan mediante técnicas de inmunofluorescencia como una red citoplásmica de filamentos (Franke y cols., 1981). Estos anticuerpos se pueden utilizar también para investigar el posible origen de un tumor (Bannasch y cols., 1980).

Además de las similitudes inmunológicas entre las keratinas, la composición de aminoácidos de las keratinas que aparecen dentro de un mismo epitelio (como por ejemplo, el estrato córneo) son muy parecidos, aunque estas moléculas difieran sustancialmente en el peso molecular (Fuchs y Green, 1978). Los fragmentos polipeptídicos producidos por hidrólisis parcial enzimática muestran una fuerte homología entre todas las keratinas del estrato córneo humano así como con las células epidérmicas humanas en cultivo y con las células de roedores (Lazarides, 1982).

En el presente estudio se ha demostrado la presencia de citokeratinas en células parotídeas tanto *in vivo*, en glándulas parótidas de ratas adultas jóvenes (10 sem.) y en ratas de 1 día de edad.

En la parótida el anticuerpo anti citokeratinas 1-8, reconoce sobre todo células ductales tanto de conductos estriados como de conductos granulares. En las preparaciones de adultos jóvenes se identificó una reactividad muy importante, mientras que en los animales de 1 día postnatal, el marcaje fué mucho más débil, indicando probablemente la existencia de diferencias en la expresión de las citokeratinas tipo 1-8 entre los animales en desarrollo y los animales adultos.

En la parótida humana se han identificado citokeratinas tipo 8 aunque en estos trabajos no se ha encontrado la expresión de la citokeratina tipo 1. El anticuerpo frente a citokeratinas tipo 8 identificó tanto las células acinares como las células ductales (Makino y cols., 1992). Un anticuerpo desarrollado frente a este heterodímero (1-8) de keratinas, en la hipófisis humana y han podido comprobar que no se expresa hasta los estadios adultos (Ikeda y Yoshimoto, 1991). En los cultivos de células glandulares parotídeas, este anticuerpo también marca células aisladas (que suponemos de origen ductal) o conjuntos de células que se disponen formando un entramado especial que recuerda a la disposición longitudinal de los conductos en la glándula *in vivo*.

4.- DIFERENCIACION CELULAR DE LAS CELULAS PAROTIDEAS EN PRESENCIA DE EXTRACTO HIPOTALAMICO.

De los resultados obtenidos podemos deducir, que los dos tipos de controles empleados, tanto los que contenían células glandulares en cultivo y posteriormente se tratan solamente con medio RPMI completo (RPMI), como aquellos en los que no hay células y a los que se añade una cantidad de medio

estimulante equivalente a la recibida por las células tratadas (XHR) nos permitieron comprobar en el primer caso (controles RPMI), que la ausencia de extracto hipotalámico estimulante implicaba la ausencia de hormonas en el medio de cultivo y en el segundo caso (controles XHR) que en los pocillos en los que no había células, en el medio estimulante no había cantidades significativas de hormonas de naturaleza propiamente hipofisaria.

Desde el punto de vista embriológico, no debemos olvidar que la adenohipófisis y la glándula parótida derivan del ectodermo oral, mientras que las otras glándulas salivares son de origen endodérmico (Davis, 1986).

Existen estudios experimentales que sugieren que todos los tipos celulares hipofisarios proceden de células progenitoras existentes en la bolsa de Rathke (Dubois y Hemming, 1991). Las células de la adenohipófisis de rata parecen estar comprometidas antes del día 11 de gestación aunque, expresarán el fenotipo correspondiente más tarde.

La diferenciación celular depende de una señal específica para cada tipo celular. Estudios previos han demostrado que existen distintos factores que pueden inducir la diferenciación de las células de la bolsa de Rathke. La diferenciación de los gonadotropos y de los lactotropos estaría controlada por LHRH (Bégeot y cols., 1984a) y por un factor hipofisario, la subunidad α de las hormonas de naturaleza glicoproteica como TSH, FSH y LH (Bégeot y cols., 1984c) respectivamente. Otros estudios sugieren que la TRH es capaz de inducir la diferenciación de los gonadotropos y de los tiotropos *in vitro* (Heritier y Dubois, 1993). La

diferenciación de las células precursoras hacia gonadotropos o hacia tirotropos requiere los mismos factores centrales que los implicados en la regulación de la secreción de las correspondientes hormonas hipofisarias en la vida adulta. La aparición de TRH y de LHRH en el cerebro fetal en el día 12 de gestación, puede ser muy importante para la inducción de los fenotipos de las hormonas glicoproteicas (Heritier y Dubois, 1993).

En los estudios realizados *in vivo*, siempre se dudaba de la fiabilidad de los animales transplantados con un fragmento de glándula parótida. Se sugería, que los resultados positivos podían ser debidos a la existencia en la silla turca de restos hipofisarios ya que estaba descrito que el aporte sanguíneo procedente del sistema porta hipofisario era fundamental para el mantenimiento de la funcionalidad (Sirett, 1975) y que en el caso de los animales transplantados este aporte se perdía, perjudicando la viabilidad del transplante.

En los estudios *in vitro* no hay posibilidad de que existan células hipofisarias con lo que ese problema se obvia. Por otro lado, el extracto hipotalámico entra directamente en contacto con las células en cultivo y en consecuencia las hormonas hipotalámicas también.

Durante el desarrollo de la adenohipófisis los distintos tipos celulares van apareciendo de forma ordenada. El primer tipo celular que aparece es un tipo de célula que expresa el gen de la subunidad α común a las tres hormonas glicoproteicas (Simmons y cols., 1990). Posteriormente aparecerán de forma secuenciada los corticotropos,

tireotropos, gonadotropos, somatotropos y lactotropos. La interdependencia entre unos y otros hechos, es desconocida, aunque se ha sugerido que tanto los somatotropos como los lactotropos proceden de un progenitor común (Hoeffler y cols., 1985). En muchas especies, se ha observado que el desarrollo de esta progresión celular se continúa incluso después del nacimiento. En el nacimiento, la citogénesis de los lactotropos no está completa ni en la rata (Hoeffler y cols., 1985), ni en el ratón (Slabaugh y cols., 1982) ni en el hámster (Campbell y cols., 1986), ni en el cerdo (Dacheux, 1984). En la rata y el ratón, a partir del día 12 de vida, se produce un incremento en el número de lactotropos detectables y un incremento de la expresión del gen de Prl. Este hecho va precedido de un aumento en el número de gonadotropos. Los corticotropos, por su parte que se encuentran bien desarrollados en el momento del nacimiento, disminuyen en número durante la primera semana de vida postnatal, aunque posteriormente vuelven a aumentar (entre los 10 y los 15 días de vida postnatal, Moriarty y cols., 1982). Distintos estudios realizados en fetos anencefálicos y en ratones hipogonadales indicaban que los factores liberadores hipotalámicos no se requerían durante los primeros momentos de la diferenciación adenohipofisaria (a partir del día 9 de gestación, en la rata) (Bégeot y cols., 1984b, Nemeskéri y cols., 1990) y que para que el hipotálamo comience a controlar a la adenohipófisis deben darse unos prerequisites morfológicos que no se hacen patentes hasta los días 19 ó 20 de gestación en la rata (Gash y cols., 1982). Entre estos requisitos se encuentra la formación del sistema porta

hipofisario (Halász y cols., 1972). Estos factores hipotalámicos, sin embargo, podían estimular la actividad mitótica y la progresión de la diferenciación de sus respectivas células diana (Hoeffler y Frawley, 1987; McNicol y cols., 1988) e incluso en algunos casos se ha sugerido que el hipotálamo puede estimular la síntesis y almacenamiento de TSH, pero influiría minimamente en el desarrollo de los mamotropos y de los gonadotropos (Gash y cols., 1982). Sin embargo, parece que la mayoría de estos autores sigue la línea que establecieron Daikoku y cols., en 1973 que sugirieron que las células agranulares adenohipofisarias (16 días de gestación) se diferenciaban en células granulares sin necesidad de la presencia de factores hipotalámicos pero que sin embargo necesitan de éstos para llegar a la completa maduración. Recientemente se ha descubierto un factor de transcripción adenohipofisario denominado Pit-1 que puede actuar de forma sinérgica con otros factores de transcripción, interviniendo en la citodiferenciación de los somatotropos, lactotropos y tireotropos (Li y cols., 1990; Thorner y cols., 1992). La expresión en la hipófisis de Pit-1 precede a la activación de los genes de GH y de Prl. Parece que la acción de Pit-1 se requiere para la activación inicial de ambos genes, pero se necesitan otros factores de transcripción distintos para la expresión completa. Parece que los estrógenos actúan en concierto con Pit-1 para regular la transcripción de Prl (Simmons y cols., 1990).

Paralelamente, existen estudios que sugieren que la LHRH es capaz de estimular la liberación de Prl, sin embargo esta acción no la ejerce directamente sobre los lactotropos sino

que lo realiza a través de un factor paracrino secretado por los gonadotropos (Denef y Andries, 1983; Denef, 1986). La afinidad topológica de los lactotropos por los gonadotropos puede ser la base microanatómica de este efecto de la LHRH sobre la secreción de la Prl. Los gonadotropos, además, liberan factores de crecimiento paracrinos. La liberación se estimula tanto por LHRH como por neuropéptido Y (Tilemans y cols., 1992), un péptido sintetizado en la hipófisis anterior (Jones y cols., 1989) pueden influir en la función de los gonadotropos (Crowley cols., 1987). Estos factores de crecimiento paracrinos procedentes de los gonadotropos estimulan el número de lactotropos y de corticotropos que replican su DNA y disminuyen el número de somatotropos que replican su DNA (Tilemans y cols., 1992). Este posible factor paracrino podría ser la subunidad α de la LH ya que se ha comprobado que ésta es capaz de intervenir en el desarrollo de los lactotropos sometidos a inducción previa por LHRH [estudios realizados durante el período embrionario de ratas, (Bégeot y cols., 1983)]. Todos estos estudios se han realizado con reagregados de células adenohipofisarias *in vitro*; sin embargo, los resultados pueden presentar un cierto paralelismo con lo que sucede en la situación *in vivo*, ya que ratones que sufren hipogonadismo hipogonadotrópico (Stanley y cols., 1986) donde no existe LHRH y en experimentos realizados en ratones a los que se les han extirpado los gonadotropos mediante técnicas transgénicas (Kendall y cols., 1991), se ha podido observar que los lactotropos existen pero se encuentran poco desarrollados y secretan muy poca Prl. La causa del escaso desarrollo de estas células puede

ser la ausencia de estrógenos, ya que el tratamiento con éstos es capaz de restablecer los valores normales (Stanley y cols., 1986). Por otro lado, se ha podido comprobar que el tratamiento de los agregados de células hipofisarias en cultivo con estrógenos aumentó el número de células capaces de expresar mRNA de Prl en una mayor medida que cuando estas células se trataban con LHRH (Van Bael y cols., 1994). Estos datos parecen indicar que la LHRH no parece ser el único factor implicado en la expresión de la población de lactotropos. En contraposición con estos datos, en estudios realizados *in vivo* se ha observado que el tratamiento con LHRH estimula la síntesis de Prl en ratones hipogonadales. Estos experimentos se han realizado en animales adultos, mientras que los experimentos realizados *in vitro* se hicieron a partir de células de animales de 14 días (Van Bael y cols., 1994). Durante este período, el estradiol circulante está ligado a α -fetoproteína y este hecho impide que el estradiol se una a sus receptores con facilidad en las dos primeras semanas de vida (McEwen, 1988). Por otro lado, el papel que juega el estradiol en el desarrollo de los lactotropos, durante esta etapa del desarrollo, no parece ser muy importante (Van Bael y cols., 1994).

Asimismo, hay que comentar la existencia de trabajos que describen la posibilidad de inducir cambios morfofuncionales en células adultas. Existen trabajos en los que se describe que la PTH es capaz de suprimir de manera reversible la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos funcionales (Bellows y cols., 1990). También se ha descrito la capacidad de los andrógenos para estimular la

diferenciación y mitogénesis de las células óseas (Kasperk y cols., 1990) y la de la cortisona como inductor de la diferenciación de las células intestinales en ratas adrenalectomizadas (Yeh y cols., 1989). Existen estudios sobre la influencia de las hormonas sexuales en la diferenciación de los precursores de las células adiposas (Xu y Björntorp, 1987) y sobre el papel de la LHRH en la diferenciación de las células gonadotropas y lactotropas en tejido hipofisario embrionario de hámster, transplantado bajo la cápsula renal de animales adultos hipofisectomizados y orquidectomizados (Horacek y cols., 1989).

Al tratar las células glandulares parotídeas con 1 HR/pocillo/día de tratamiento, se observa un aumento en la concentración de LH secretada por las células *in vitro*; este aumento fué claramente significativo con respecto a los controles (pocillos RPMI y XHR) desde la primera media semana de tratamiento y se mantuvo durante las tres semanas que se mantuvieron las células de parótida en cultivo.

Cuando tratamos a nuestras células en cultivo con extracto hipotalámico de cordero en una cantidad equivalente en peso fresco a 0.25 HR/pocillo/día se observó un aumento en la cantidad de LH producida que fué claramente significativo a partir de la primera semana y media de tratamiento.

Cuando las células en cultivo se trataron con EHC equivalente a 1 HR/pocillo/día se obtuvo como respuesta, una producción de LH que fué significativa con respecto a los pocillos control (RPMI) desde la primera media semana de tratamiento.

Cuando tratamos a las células en cultivo con EHC equivalente a 2 HR también se obtuvo como respuesta una producción de LH

que fué significativa con respecto a los pocillos control (RPMI) desde la primera media semana de tratamiento, lo mismo que sucedía cuando se estimulaba con EHC equivalente a 1 HR. Si comparamos las tres dosis de EHC empleado, podemos decir que en los tres casos, se obtuvo la máxima producción en la tercera semana de tratamiento y que la respuesta de las células a la presencia del extracto en el medio fué dependiente de la dosis. Sin embargo, si comparamos la LH producida al estimular las células con EHC equivalente a 1 HR con la cantidad de LH obtenida al estimular las células con 1 HR debemos decir que se obtuvo una mayor cantidad de LH al estimular con el HR que con el EHC (la mínima cantidad de LH obtenida al tratar a las células con 1 HR, 764 ± 93 pg/ml en la tercera semana de tratamiento, es casualmente la máxima cantidad de LH obtenida cuando estimulamos nuestras células con EHC equivalente a 1 HR, 764 ± 141 pg/ml, también en la tercera semana de tratamiento. Es decir, cuando estimulamos con 1 HR, la producción de LH sufre un máximo en la segunda semana y luego posteriormente va decayendo. Cuando estimulamos con EHC equivalente a 0.25 HR, a 1 HR y a 2 HR, observamos una producción mínima en las primeras semanas que va aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo en la tercera semana de tratamiento.

Las diferencias fundamentales que hemos encontrado al estimular con extracto hipotalámico de rata o con extracto hipotalámico de cordero han sido debidas probablemente a la diferente vida media de las células en cultivo. Al tratar las células en cultivo con el HR las células a partir de la segunda semana y media de tratamiento presentaron una rápida

tendencia a la citolisis. Este hecho queda reflejado en la disminución drástica de la producción de TSH que deja de ser significativa con respecto al control (RPMI) en la tercera semana de tratamiento. La producción de LH también sufre una disminución en la tercera semana de tratamiento y aunque sigue siendo significativa con respecto a los pocillos control, la cantidad de LH disminuye de casi 1800 pg/ml en la segunda semana y media de tratamiento, hasta 764 pg/ml en la tercera semana. Se desconocen las razones que favorecen la muerte celular masiva, aunque podría derivarse de la acción de algún factor presente en el extracto que fuera específico de cada especie.

Ya que los factores hipofisiotrópicos hipotalámicos actúan en todas las especies animales y ya que la estructura de la TRH parece ser idéntica en todas las especies animales, se asumió inicialmente que la estructura de la LHRH era la misma en todas las especies, lo cual no es totalmente cierto. Existen diferencias estructurales entre especies (Millar y King, 1988) y dentro de las mismas especies se puede encontrar más de una forma distinta de LHRH localizada en regiones distintas.

Existen, además, estudios en los que se ha descrito el empleo de extractos hipotalámicos de otras especies para estimular células hipofisarias de rata. Existen trabajos realizados estimulando transplantes hipofisarios con extractos de eminencias medias porcinas en los que se obtienen unos resultados que sugieren que en ratas hipofisectomizadas y a las que se les ha transplantado la pars distalis adenohipofisaria bajo la cápsula renal, la infusión continua

de la arteria renal con hipotálamo porcino estimularía la síntesis y liberación de gonadotropinas, TSH y posiblemente ACTH (Evans, 1972). Hay otros trabajos en los que se estimula a las células hipofisarias en cultivo con extractos hipotalámicos de vaca y se consigue con ello la liberación de LH por las células hipofisarias de rata al medio de cultivo (Leiva y de la Lastra, 1993).

Cuando tratamos las células con el EHC, independientemente de las concentraciones empleadas, se observó una mayor supervivencia de las células, aunque éstas producían una menor cantidad de hormonas que las estimuladas con HR.

Por otro lado, se planteó comprobar si la LHRH existente en el extracto hipotalámico podía ser la responsable de este aumento de la producción de LH por las células en cultivo. Al incubar anticuerpo anti-LHRH a una concentración 1:100 con el EHC y adicionarlo posteriormente a las células en cultivo se observó que se producía una disminución de LH claramente significativa con respecto a la cantidad de LH producida por las células estimuladas con EHC equivalente a 1 HR en la tercera semana de tratamiento, aunque el anticuerpo empleado a esa concentración no fué capaz de inhibir completamente la producción de LH. Esto nos permite sugerir la posibilidad de que la producción de LH no sea debida exclusivamente a la acción de LHRH, como también han sugerido otros autores (Leiva y de la Lastra, 1993) o bien que el anticuerpo no fuera capaz de neutralizar totalmente la actividad LHRH presente en el extracto.

Nuestros resultados concuerdan con los trabajos realizados *in vivo* por otros autores, en los que se sustituía la hipófisis

de perros por glándulas parótidas y se conseguía la recuperación de la función gonadal (Alvarez-Buylla y cols., 1961, 1970a, 1973; Araujo y cols., 1975). También concuerdan, con otros trabajos previos (realizados *in vivo*) en los que se ha comprobado, mediante técnicas de inmunohistoquímica y medidas de hormonas mediante RIAs específicos (Alvarez y cols. 1991, 1994; Granados y cols., 1993b) que las células de la glándula parótida adulta transplantada a la silla turca tras hipofisectomía son capaces de secretar LH, GH y Prl cuando el aporte sanguíneo del trasplante procede del hipotálamo y es rico, por lo tanto, en hormonas hipotalámicas.

Las células en cultivo respondieron a la presencia de 1 HR con un aumento de las concentraciones de TSH a partir de la primera media semana de tratamiento. Este aumento resultó ser claramente significativo al compararlo con las células control (RPMI) o con las control (XHR). Las células respondieron rápidamente y las cantidades de TSH detectadas fueron muy elevadas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que también detectaron TSH en los medios de cultivo de células glandulares parotídeas después de estimular con extractos hipotalámicos de rata (Quintanar-Stephano y Martín, datos no publicados). Sin embargo, estos autores detectaron aparentemente niveles de TSH muy superiores a los observados en nuestro estudio. En el presente trabajo hemos detectado entre 6 y 7 ng/ml de TSH a la semana, mientras que dichos autores detectaron entre 1.5 ng/ml en la primera semana hasta 40 ng/ml la tercera). Esta diferencia puede ser debida a que

dichos autores añadieron una mayor cantidad de TSH con el EH a lo largo de la semana y a que utilizaron fetos de 20 días de gestación para la realización del estudio mientras que en nuestro trabajo se han utilizado animales en los que la glándula parótida había alcanzado un mayor grado de diferenciación. Es necesario poner de relieve en este momento que la glándula parótida es de diferenciación postnatal (Schneyder y Hall, 1967).

Nuestro estudio concuerda además con las observaciones originales de otros autores que sugerían la existencia de una restauración parcial de las funciones hipofisarias en perros transplantados con un fragmento de glándula parótida en la silla turca (Alvarez-Buylla y cols., 1970 a y b). En este estudio, se observaba que en los animales hipofisectomizados se reducía la recaptación de ^{131}I a un 7% de la encontrada en los animales normales (recaptación del 100%), mientras que en los animales hipofisectomizados y posteriormente transplantados con un fragmento de glándula parótida, la captación de iodo se recuperaba en un 55%. De forma similar, los cambios morfológicos que se producían en el tiroides, como la pérdida de folículos y el aplanamiento de las células epiteliales que se observaba en los perros hipofisectomizados, se corregía de una forma evidente en los animales transplantados con un fragmento de glándula parótida (Alvarez-Buylla y cols., 1970b). Este mismo efecto positivo que presentaron los animales transplantados se observó en relación con las funciones adrenocorticales (Alvarez-Buylla y de Alvarez-Buylla, 1964, 1967, 1970; Alvarez-Buylla y Tsutsumi, 1979).

Se ha especulado mucho sobre el posible papel que juega el hipotálamo en el desarrollo de la hipófisis en estadios embrionarios precoces. Existen trabajos realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, que sugieren que la LHRH hipotalámica influiría en la diferenciación de los gonadotropos de rata, aunque esta LHRH debería actuar en presencia de insulina y de transferrina (Bégeot y cols., 1984a). Incluso, otros autores que han realizado estudios en células hipofisarias en cultivo, plantearon una hipótesis sobre un posible efecto estimulador que ejercería la insulina sobre la liberación de LH, sugiriendo que la insulina podría aumentar la afinidad y/o el número de receptores para LHRH en las células (Adashi y cols., 1981).

La regulación de los sistemas endocrinos por factores salivares exocritos no se ha estudiado en profundidad. Que tal interacción existe, se ha podido comprobar en estudios realizados *in vivo* con ratas sialoadenectomizadas (Boyer y cols., 1986). Estos autores observaron que en las ratas machos sin glándulas submandibulares se producía una disminución en el peso de los testículos y en hembras tenía como consecuencia un crecimiento uterino menor como respuesta a la acción del estradiol exógeno (Campbell, observaciones no publicadas pero referidas en Lewis y cols., 1993). Esto parece ser debido a la presencia de gran cantidad de EGF en dichas glándulas (Lewis y cols., 1993) que sería necesario en ambos procesos, pero también quizás a otros factores. Otros estudios demuestran la existencia de receptores de estrógenos específicos en las glándulas parótidas y submandibulares de ratas hembras (Campbell y cols., 1990) y que los receptores

de andrógenos se distribuyen de forma desigual (en función del sexo) en las glándulas submandibulares de ratones (Kyakumoto y cols., 1986).

Se ha descrito también que el mesénquima de las glándulas salivares podría condicionar la diferenciación de células embrionarias hipofisarias (Kusakabe y cols., 1985). Estos trabajos sugieren que existe un estadio de desarrollo de la hipófisis en el ratón en los que el epitelio hipofisario puesto en contacto con el mesénquima de una glándula salivar responde, desarrollando un tejido análogo a una glándula. Concretamente entre los días 8.5 y 11 de gestación en el ratón, el epitelio hipofisario está formado por una población mixta de células previamente determinadas y otras que no lo están. Si el mesénquima de la glándula submandibular se asocia con el epitelio hipofisario durante este periodo, las células determinadas proseguirán con la morfogénesis hipofisaria y su posterior diferenciación funcional, mientras que las células que no lo estaban previamente respondían a la inducción del mesénquima procedente de la glándula salivar y se diferenciaban en un tejido análogo a la glándula salivar, en donde aparecen incluso células α -amilasa positivas (Kusakabe y cols., 1985).

De este estudio se deduce la existencia de interacciones en diferentes estadios de desarrollo entre las glándulas salivares y la hipófisis. Este mismo proceso pero al contrario podrían haber sufrido las células glandulares parotídeas en cultivo. Concretamente, sugeriríamos que si a las células adenohipofisarias sometidas a un estímulo apropiado se las puede inducir para que se transformen en

células al menos, funcionalmente análogas a las células salivares (células α -amilasa positivas), podría ser posible que las células glandulares parotídeas sometidas a los mismos estímulos a que están sometidas las células adenohipofisarias (factores hormonales hipotalámicos) se transformen sintetizando hormonas típicamente adenohipofisarias como son la LH y la TSH.

Si a este hecho le añadimos, los posibles efectos que pueden ejercer las hormonas hipotalámicas sobre la diferenciación de las células adenohipofisarias y la posibilidad de desdiferenciación y posterior transformación que presentan, incluso tejidos diferenciados de animales adultos sometidos a la acción hormonal, la idea de la posible transformación funcional de las células parotídeas debido a la acción de hormonas hipofisiotrópicas hipotalámicas no parece tan descabellada.

Inicialmente, se parte de células que no están todavía totalmente diferenciadas, ya que proceden de animales que han sufrido un desarrollo postnatal corto y que posteriormente se han puesto en condiciones de cultivo, donde con toda seguridad, deberán sufrir un cierto proceso de desdiferenciación. Sin embargo, estas células están cultivadas sobre una matriz favorable (fibroblastos procedentes del mesénquima glandular) que permite la difusión de hormonas y de factores de crecimiento existentes en el extracto hipotalámico.

Estudios clásicos han demostrado, que las hormonas están asociadas con todos los niveles de la estructura celular, incluyendo el núcleo, el citoesqueleto y la matriz

extracelular. Lo que no se conoce con certeza, es cómo bajo la influencia de las hormonas, las estructuras existentes en la matriz del tejido son capaces de interaccionar, para modular la estructura de la cromatina y para regular, finalmente, la función celular.

Existen evidencias que sugieren que la regulación hormonal de la expresión genética puede ser debida a interacciones estructurales quimio-mecánicas, dentro de un sistema dinámico y tridimensional como es la matriz tisular (Getzenberg y cols., 1990).

Denominaremos matriz tisular al conjunto de las estructuras asociadas a:

- La membrana plasmática: concretamente el glicocálix y las proteínas integrales de membrana, que formaran canales de comunicación.
- Al citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.
- Al nucleoplasma: Formado por filamentos intermedios (láminas nucleares), complejos de poro, redes de comunicación internas y nucleolos residuales)
- A la matriz extracelular: colágenos, lamininas, fibronectinas, proteoglicanos etc.
- A las integrinas: Anclarán a la célula a la matriz extracelular.
- A las moléculas de adhesión celular (CAMs), desmosomas y uniones estrechas.

La matriz tisular es capaz de sufrir cambios dinámicos en su estructura y conformación mediante polimerizaciones, uniones cruzadas, modificaciones bioquímicas y movimientos

vibratorios y contráctiles que pueden facilitar que las señales extracelulares lleguen al núcleo y como última opción que incluso interaccionen con el genoma. La matriz tisular puede, incluso organizar el transporte intracelular y la disposición espacial de los sistemas de señalización celular (Getzenberg y cols., 1990).

Una forma de regulación puede ser la modificación de la forma de la célula. Estudios clásicos han demostrado que la forma de la célula se puede manipular y que este hecho podría estar directamente relacionado con el control de la síntesis de DNA (Folkman y Moscona, 1978). Otros estudios demuestran que la regulación de la forma de la célula por la acción de distintos substratos, la capacitan o incapacitan para responder a la acción de determinadas hormonas mitogénicas (Gospodarowicz y cols., 1978). Otros autores han propuesto que la MEC afecta a la expresión genética a través de interacciones con proteínas de membrana y elementos del citoesqueleto que causan alteraciones nucleares que pueden dirigir la expresión génica. Este mecanismo se denomina reciprocidad dinámica (Bissell y Aggeler, 1987) y es el mecanismo al que actualmente se le está dando más importancia (Getzenberg y cols., 1990).

Además de lo anteriormente expuesto, se ha descrito la existencia de sinergismos entre la acción de las hormonas y la MEC para regular la expresión génica, por ej. las glándulas mamarias de hembras vírgenes de ratón, presentan niveles bajos de mRNA para transferrina, mientras que los hígados de esos mismos animales tienen niveles elevados para ese mRNA (Blum y cols., 1989). Cuando estas hembras están en

periodo de gestación o lactancia, los niveles de mRNA para la transferrina de la glándula mamaria, aumentan. En cultivo los niveles de mRNA no son sensibles a los niveles de hormonas existentes en el medio, pero no es que estas células se hayan hecho completamente insensibles a las hormonas, ya que la expresión del gen de la β -caseína continúa respondiendo a la acción de las hormonas lactogénicas (Blum y cols., 1989). Cuando estas células se cultivan sobre la MEC que les es propia, los niveles de mRNA para la transferrina aumentan de forma sustancial (Blum y cols., 1989). Este sistema indica que la MEC y las hormonas trabajan regulando los niveles de mRNA de transferrina mediante mecanismos con pasos comunes (Getzenberg y cols., 1990).

Algunos tumores hipofisarios de rata secretan Prl y GH (Pryor-jones y cols., 1985); sin embargo, si estas células se cultivan sobre una MEC producida por células de endotelio corneal bovino, los niveles de Prl aumentan, mientras que los niveles de GH disminuyen. Una de estas líneas tumorales hipofisarias cultivada sobre una MEC producida por células de endotelio corneal bovino, aumenta su respuesta a TRH y este aumento se corresponde con un aumento de la síntesis de DNA y con un aumento en la síntesis de proteínas totales. Además, la morfología de las células cultivadas sobre la MEC es diferente.

La MEC es una estructura dinámica y compleja formada por moléculas de proteoglicanos muy ramificadas, carbohidratos complejos y proteínas estructurales como el colágeno. Esta estructura tan compleja también estará formada por fibronectina, laminina y factores de crecimiento (Schittny y

Yurchenco, 1989).

Los componentes de la MEC contactan con los receptores transmembrana a través de la membrana celular, en donde se encuentran las integrinas y las moléculas de adhesión celular (MAC). Estas MAC, como por ejemplo la E-cadherina, pueden mediar contactos específicos célula-célula. De esta forma se ponen en contacto la MEC y el citoesqueleto. Además el citoesqueleto también se conecta por medio de estas MAC con otras células (Getzenberg y cols., 1990).

Por su parte, los componentes del citoesqueleto interaccionan con hormonas para modificar las vías de señalización celular. Este hecho adquiere especial importancia, en el caso de los factores de crecimiento, ya que la célula responde a su acción mediante vías intracelulares.

Hay otro hecho fundamental, que ya hemos comentado y es el papel que juegan los factores de crecimiento en los procesos de transdiferenciación celular. Por ejemplo, IGF I es capaz de convertir células hipofisarias de rata, secretoras de GH en células secretoras de Prl (Inoue y Sakai, 1991); así como NGF es capaz de inducir la diferenciación de células β pancreáticas, secretoras de insulina, en células con comportamientos muy similares a los que presentan las neuronas (Polak y cols., 1993) o cómo el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) es capaz de actuar intracelularmente para causar la transdiferenciación de precursores de células de Schwann, derivadas de cresta neural de codornices embrionarias, en melanocitos (Sherman y cols., 1993). Hay también casos descritos donde sustancias estimuladoras de la diferenciación como el dimetilsulfóxido

(DMSO) son capaces de transformar células pancreáticas acinares en células pancreáticas ductales (Arias y Bendayan, 1994).

Los estudios *in vitro*, son los más adecuados para que los factores difusibles puedan funcionar de forma efectiva, ya que en los estudios *in vivo* la distancia que deben recorrer estos factores es limitante. Una de las razones por las cuales se limita la difusión de estos factores es debido a los componentes de la matriz extracelular que rodean la mayoría de las células y de los tejidos (Jessell y Melton, 1992). Existen evidencias de que la familia del TGF β y de que los dos tipos de FGF se unen a proteoglicanos y a otros componentes de la matriz extracelular y de que proteoglicanos diferentes presentan diferentes especificidades en lo que a la unión a los factores de crecimiento se refiere (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991). La asociación con la MEC puede regular la actividad biológica de los factores de crecimiento. Por ejemplo, la asociación del bFGF con el heparán sulfato de la superficie celular parece imprescindible para que el bFGF pueda ejercer su función activando el crecimiento de los fibroblastos y la diferenciación de las células musculares (Yayon y cols., 1991). No hay que olvidar que nosotros no añadimos extracto hipotalámico puro, sino que lleva unas cantidades residuales tanto de LH (62 pg/dosis) como de TSH (166 pg/dosis). Está descrito que estas hormonas añadidas con el extracto, pueden actuar a su vez como factores mitogénicos de distintos tipos celulares como células 3T3 y condrocitos (Gospodarowicz y Moran, 1976).

Otros investigadores sugieren que *in vitro*, el TGF β ejerce

efectos mitogénicos sobre distintas células mesenquimales aunque además puede inhibir la proliferación de células endoteliales y epiteliales y estimular la proliferación de la MEC (Barnard y cols., 1990). Existen autores que sugieren que el TGF β se expresa exclusivamente en epitelios que sufren una morfogénesis muy activa, como por ejemplo el de las glándulas salivares (Millan y cols., 1991). En principio durante las interacciones que se producen entre el epitelio y el mesénquima, los distintos miembros de la familia del TGF β pueden enviar señales autocrinas y paracrinas que por un lado, inhiban el crecimiento y la diferenciación de distintos compartimentos epiteliales y que por otro activen la formación de la MEC y la mitosis de las células mesenquimales (Birchmeier y Birchmeier, 1993).

Se ha demostrado que una vez activados, los receptores de los factores de crecimiento, son capaces de activar proteínas kinasas o señales lipídicas implicadas en la vía del inositol fosfato (Getzenberg y cols., 1990). Por ej. se ha demostrado que durante el desarrollo de las glándulas salivares, se expresa c-met que es un receptor transmembrana asociado a Tyr-kinasas. Este receptor se expresa en epitelios tubulares y sometidos a procesos de ramificación durante su desarrollo. Su ligando es el denominado factor de dispersión (SF) o también llamado factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que se ha descrito como un factor inductor de la tubulogénesis epitelial *in vitro* que se expresa fundamentalmente en el mesénquima que rodea al epitelio tubular (Birchmeier y Birchmeier, 1993). Una vez que el receptor es activado, se sospecha que los componentes del

citoesqueleto, estarán implicados en la regulación de los segundos mensajeros. Sin embargo, todavía está por determinar cómo se realizaría esta regulación en el interior de la célula (Getzenberg y cols., 1990).

El citoesqueleto juega un papel dinámico fundamental no sólo en el transporte intracelular de las hormonas sino también como modulador estructural de la acción hormonal (Getzenberg y cols., 1990).

Las hormonas pueden afectar al sistema de los filamentos intermedios. Se sabe que la insulina puede afectar a la red de filamentos intermedios de las células 3T3 (Bockus y Stiles, 1984). Las hormonas, a su vez pueden afectar la polimerización de las subunidades de tubulina de los microtúbulos. Incluso, se ha descrito que en líneas celulares de gliomas la hidrocortisona puede promover la polimerización de los microtúbulos (Armelin y Armelin, 1983).

Por otro lado, la colchicina que desorganiza los microtúbulos es capaz de inhibir el transporte citoplasmático de la TRH, de PTH, de GH y de Prl (Gautvik y Tashjian, 1973; Hall, 1984).

Por otro lado, durante los procesos de motilidad celular es necesario que el citoplasma sufra una remodelación dinámica de su citoesqueleto. Dos de los factores implicados en la remodelación del citoesqueleto celular son el IGF-I y la insulina que ejercen su acción a través de receptores de IGF-I presentes en la membrana celular (Stracke y cols., 1989). Es evidente que el citoesqueleto juega un papel importante no sólo en el transporte intracelular de las hormonas sino que es además un modulador estructural de la acción hormonal. Por

otro lado, sirve de conexión entre la MEC y la matriz nuclear. Por estas razones, la variabilidad de los componentes del citoesqueleto en los distintos tipos celulares y su posible alteración por la acción hormonal es de capital importancia para explicar cómo la estructura celular permite la transmisión de la señal (Getzenberg y cols., 1990).

En definitiva, la matriz del sistema puede regular el control de la expresión génica que ejercen las hormonas sobre un tejido concreto. Este control lo ejercerían, organizando el DNA en una conformación espacial tridimensional concreta; de esta forma, transmitirían la información estructural y funcional a través de la célula hasta llegar al DNA (Getzenberg y cols., 1990).

En el caso concreto de las hormonas hipotalámicas se sabe que éstas activarían mecanismos reguladores, que tendrían como resultado la expresión de factores activadores de genes como el Pit-1, factor de transcripción hipofisario que activaría los promotores de los genes de Prl y de GH (Van Bael y cols., 1994).

5.- DIFERENCIACION DE LAS CELULAS EPITELIALES PAROTIDEAS SOMETIDAS A FACTORES AISLADOS.

Como en el caso anterior, los dos tipos de controles empleados, tanto los que contenían células glandulares en cultivo y posteriormente se tratan solamente con medio RPMI completo (RPMI), como aquellos en los que no hay células y a los que se añade una cantidad de medio estimulante equivalente a la recibida por las células tratadas (XF), nos

permitieron comprobar que en el primer caso (controles RPMI), la ausencia de medio estimulante (es decir, medio al que se han añadido los factores hipotalámicos aislados) implicaba la ausencia de hormonas en el medio de cultivo recogido a las distintas semanas de tratamiento y que en el segundo caso, controles XF, que eran pocillos en los que no había células, nos indican que en el medio estimulante no había cantidades significativas de hormonas de naturaleza propiamente hipofisaria.

Cuando estimulamos las células con la mezcla (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF por una parte y (LHRH+TRH)+EGF por otra, a una concentración de 2 μg de cada factor/pocillo/día de tratamiento se obtienen diferencias de concentración de LH significativas con respecto a los pocillos control (RPMI) hasta la primera semana y media de haberse iniciado el tratamiento. A partir de ese momento se produce una disminución de la LH detectada, siendo ésta equiparable a la detectada en los pocillos control (RPMI). Cuando se incrementó la concentración a 4 μg de cada factor/pocillo/día de tratamiento, el conjunto de factores empleado (LHRH+TRH)+EGF presentó diferencias significativas con respecto a los pocillos control (RPMI), hasta la primera semana y media de haberse iniciado el tratamiento, igual que sucedía cuando se empleó la mezcla a una concentración de 2 μg . También se ha puesto de manifiesto, que a una concentración superior (10 μg de cada factor/pocillo/día de tratamiento) este mismo conjunto de factores produjo un estímulo celular suficiente que permitió observar producción de LH hasta las dos primeras semanas y media de haberse

instaurado el tratamiento, mientras que el conjunto de factores (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF siguió presentando su máxima significación a la semana y media de haberse instaurado el tratamiento y a partir de este momento, dejó de presentar diferencias significativas. Debemos comentar, sin embargo, que aún en estas condiciones, la cantidad de LH máxima detectada en el medio ascendió a 216 ± 46 pg de LH/ml de medio de cultivo, y se obtuvo al emplear el conjunto de factores (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF durante semana y media a una concentración de $10 \mu\text{g}$ de cada factor/pocillo/día de tratamiento. Esta cantidad de LH detectada, aún presentando diferencias significativas con respecto a los pocillos control (RPMI) ($p < 0.001$), es muy diferente de la cantidad de LH detectada al tratar a las células parotídeas de rata con extractos hipotalámicos (sobre todo si éste procede de rata) donde se detectó un máximo de LH de 1834 ± 190 pg/ml de medio a la segunda semana de haber comenzado el tratamiento.

En lo que respecta a los valores de TSH obtenidos al estimular las células parotídeas en cultivo con distintos conjuntos de factores hipotalámicos aislados, podemos decir que las células en cultivo respondieron de forma claramente significativa a las tres mezclas cuando se emplearon a una concentración de $2 \mu\text{g}$ /pocillo/día a la semana y media de haberse iniciado el tratamiento. A partir de aquí sólo una de las mezclas, muestra una cierta estabilidad a lo largo de las distintas semanas de tratamiento. Se trata del conjunto de factores (TRH+CRH+GHRH)+EGF.

Al aumentar la concentración de las mezclas empleadas a $4 \mu\text{g}$ de cada factor/pocillo/día de tratamiento observamos que, una

vez más, se detecta la máxima concentración de TSH a la semana y media de haberse instaurado el tratamiento pero que a esta concentración, la mezcla que mejores resultados ofrece es (TRH+LHRH)+EGF en donde llegan a detectarse hasta 567 ± 111 pg de TSH/ml de medio de cultivo.

Es importante reseñar que al utilizar los conjuntos de factores antes expuestos, a una concentración de $10 \mu\text{g}$ de cada factor/día/pocillo, se observó una reducción drástica de las concentraciones de TSH detectadas independientemente de la mezcla empleada. Aún así, tanto el conjunto de factores (TRH+LHRH)+EGF como el de (TRH+CRH+GHRH+LHRH)+EGF permitieron que las células parotídeas produjeran cantidades de TSH claramente significativas con respecto al control (RPMI), pero como siempre, a la semana y media del inicio del tratamiento, mientras que el conjunto de factores (TRH+CRH+GHRH)+EGF no consiguió que las células produjeran cantidades de TSH significativas ninguna semana.

El conjunto de factores que permitió una mejor respuesta fué el de (TRH+LHRH+CRH+GHRH)+EGF con el que se llegó a alcanzar un máximo a la semana y media de tratamiento de 352 ± 31 pg de TSH/ml de medio de cultivo.

A la vista de estos resultados, se puede sugerir que con las tres concentraciones de trabajo seleccionadas no se obtienen respuestas proporcionales a la magnitud del estímulo administrado. Se pone de relieve que, en general se produce una respuesta máxima en la primera semana y media de tratamiento (en cuanto a TSH detectada en el medio de cultivo) independientemente de la concentración empleada. Con respecto a la mezcla que proporciona una respuesta mayor, no

podemos decantarnos por ninguna en concreto, ya que dependerá de la concentración a la que la empleemos. Lo que si parece evidente es que una concentración de 10 μg de cada factor, no produce mejor efecto que concentraciones inferiores, ya que lejos de obtener un aumento en la respuesta obtuvimos una clara disminución.

Debemos comentar, sin embargo, que aún en estas condiciones, la cantidad de TSH máxima detectada en el medio ascendió a 592 pg de TSH/ml de medio de cultivo, y se obtuvo al emplear la mezcla (TRH+CRH+GHRH)+EGF durante dos semanas a una concentración de 2 μg de cada factor/pocillo/día de tratamiento. Esta cantidad de TSH detectada, aún presentando diferencias significativas con respecto a los pocillos control (RPMI) ($p < 0.001$), es muy diferente de la cantidad de TSH detectada al tratar a las células con extractos hipotalámicos de rata donde se detectó un máximo de TSH de 3803 pg/ml de medio a la semana y media del inicio del tratamiento.

De estos datos se deduce que las hormonas hipotalámicas empleadas de forma aislada (LHRH y TRH) son capaces de estimular a las células, y que los factores hipotalámicos participarían en la diferenciación funcional postnatal de las células parotídeas en cultivo, de una forma similar (salvando las distancias) a como supuestamente lo hacen con las células adenohipofisarias (Gash y cols., 1982; Bégeot y cols., 1983; 1984a; Héritier y Dubois, 1993). Estos últimos autores sugieren que la presencia de TRH es fundamental para el desarrollo de las células tirotropas adenohipofisarias de rata *in vitro* al igual que lo es la LHRH para el desarrollo

de los gonadotropos. Existen además, trabajos en los que se sugiere que es la LHRH, junto con distintos factores paracrinos secretados por los gonadotropos, la encargada de la selección de las células adenohipofisarias que posteriormente expresarán Prl (Tilemans y cols., 1992; Van Bael y cols., 1994) y que la LHRH podría estar también implicada en la diferenciación de los futuros corticotropos y somatotropos (Tilemans y cols., 1992).

Sin embargo y atendiendo a las diferencias de concentración obtenidas en función de si estimulábamos con factores o con extractos, se deduce que debe existir algún factor en el extracto que de alguna forma potencia la acción estimuladora de las hormonas hipotalámicas, bien directamente o actuando sobre otros tipos celulares diferentes, que posteriormente sintetizarán el factor paracrino responsable de potenciar el estímulo hipotalámico. Este mecanismo de acción, según el cual se sugiere la existencia de factores paracrinos corresponsables de la estimulación, se ha sugerido por distintos autores como explicación de los procesos de diferenciación adenohipofisarios (Denef y Andries, 1983; Denef, 1986), e incluso ya empiezan a conocerse algunos de ellos, como son los factores de transcripción (Li y cols., 1990; Simmons y cols., 1990), los factores de crecimiento (Getzenberg y cols., 1990) e incluso hay autores que actualmente le adjudican un posible papel a la subunidad α de las hormonas glicoproteicas (Bégeot y cols., 1984c; Heritier y Dubois, 1993).

Ya en el año 1968, se sugirió la posible existencia de un eje hipotálamo-parotídeo-endocrino (Leonora y Steinman, 1968),

que actualmente sugieren la existencia de un factor hipotalámico que estaría encargado de liberar una hormona parotídea (HP) de naturaleza polipetídica, encargada del transporte del fluido dentinal en la rata (Tieche y Leonora, 1989).

Dichos autores sugieren que las glándulas parótidas de rata pueden ejercer un efecto insulínico, ya que la parotidectomía privaría a las células β pancreáticas de un principio humoral que sería esencial para optimizar la respuesta de insulina a la presencia de glucosa (Leonora y cols., 1988). Los datos de estos autores, apoyarían la hipótesis de que de alguna forma las células glandulares parotídeas son capaces de responder a los estímulos procedentes de las hormonas de origen hipotalámico. Por otro lado, a partir de los mismos resultados y con los experimentos realizados, no podemos asegurar la existencia de una posible influencia del EGF sobre las muestras motivo del presente trabajo.

El papel del EGF puede estar más relacionado con el mantenimiento de las células en cultivo que con la potenciación del efecto de los distintos factores hipotalámicos aislados. El crecimiento de las células ductales puede estar influido por un mecanismo que implica al EGF *per se*, indicando la existencia de una vía de transducción de la señal para el EGF. El EGF puede ser un factor de crecimiento necesario para las células salivares. Sin embargo, esta vía de transducción de la señal no ha sido todavía caracterizada (Durban, 1990). El EGF en combinación con la dexametasona incrementa claramente el tiempo de

supervivencia de las células glandulares salivares en cultivo (Redman y cols., 1988), este hecho, justificaría que nosotros no observásemos mayor proliferación celular en las células tratadas con EGF con respecto a las células que no lo estaban.

No se han observado modificaciones, en lo que a la morfología de las células parotídeas en cultivo se refiere, en función del tratamiento al que fueron sometidas las células. Las células en todos los casos, independientemente de si se estimularon con extractos hipotalámicos o con factores aislados, pasaron del aspecto redondeado inicial a un aspecto aplanado que se mantuvo a lo largo de todo el tratamiento (nos referimos fundamentalmente, a las células que no formaban parte de las agrupaciones celulares). La diferencia fundamental, que hemos encontrado ha sido debida a la diferente vida media de las células en cultivo. Cuando estimulábamos con EHC independientemente de la concentración a la que se empleara, la vida media de las células era superior a cuando se estimulaba con HR o con factores hipotalámicos aislados.

6.- ANALISIS COMPARATIVO GLOBAL: EFECTO DE LA ESTIMULACION CON EXTRACTOS HIPOTALAMICOS FRENTE A LOS EFECTOS PROVOCADOS POR EL ESTIMULO CON FACTORES HIPOTALAMICOS AISLADOS.

Las diferencias más significativas que encontramos con respecto al empleo del extracto hipotalámico o los factores hormonales hipotalámicos aislados, se refieren a la cantidad de hormona detectada en el medio de cultivo, mientras que con el extracto hipotalámico de rata se obtenían cantidades de LH

del orden de 1834 pg/ml a las dos semanas de haberse instaurado el tratamiento, al emplear factores hipotalámicos aislados se observaron cantidades de LH del orden de los 216 pg/ml como cantidad máxima obtenida al tratar las células con la mezcla (LHRH+TRH+CRH+GHRH)+EGF a una concentración de 10 µg, después de semana y media de tratamiento. Cuando el extracto hipotalámico en vez de ser de rata era de cordero, también se conseguía estimular a las células, detectándose en el medio de cultivo en la tercera semana de tratamiento, cantidades crecientes de LH a medida que se aumentaba la concentración de extracto de cordero empleado. Las cantidades de LH detectadas en el medio fueron mayores que las que se obtuvieron al emplear factores hipotalámicos aislados como estimuladores, pero mucho menores que las detectadas cuando la estimulación se realizó con HR directamente. Este hecho nos habla de las diferencias estructurales existentes en la LHRH en función de la especie que se considere.

En lo que respecta a la TSH los resultados observados han sido equivalentes, pero con una diferencia fundamental, la cantidad de TSH detectada en el medio de cultivo era muy superior a las cantidades de LH detectadas (el doble cuando se estimulaba con HR y el cuádruple cuando se estimulaba con factores hipotalámicos aislados). Esto puede ser debido a la elevada homología de la hormona liberadora existente entre especies.

Por otro lado, podemos comentar que si las células glandulares tratadas con factores hipotalámicos aislados además de EGF, vivían menos tiempo que las células tratadas con extracto hipotalámico de cordero, esto puede significar

que en el extracto hipotalámico de cordero puede haber alguna sustancia que prolongue la vida media de las células en cultivo.

CONCLUSIONES

1.- La metodología empleada para la realización del cultivo de células glandulares parotídeas es apropiada para la realización de nuestro estudio. La monocapa de fibroblastos procedente del estroma glandular que sirve de sustrato para facilitar la adhesión de las células, resulta ser fundamental para la supervivencia de éstas. Las células inicialmente dispersas acaban disponiéndose en forma de agregados celulares.

2.- La morfología de las células se mantiene a lo largo del cultivo, sin embargo, en los agregados celulares se produce la asociación de un grupo de células procedentes, presumiblemente, del sistema de conductos de la glándula que se disponen formando un entramado especial que recuerda a la disposición longitudinal de los conductos en la glándula *in vivo*.

3.- Cuando estimulamos a las células glandulares parotídeas con 1 HR/pocillo/día de tratamiento, las células respondieron rápidamente pudiéndose detectar en el medio de cultivo cantidades de TSH a los tres días y medio entre 3 y 4 ng/ml de medio. En lo que respecta a la LH detectamos cantidades que alcanzaron cerca de 2 ng/ml de medio de cultivo. El comportamiento de las dos hormonas no fué el mismo; mientras la TSH se detectaba en gran cantidad desde el inicio del tratamiento y se obtenía la máxima producción a la semana y media de haberse instaurado el tratamiento, la LH tardaba más en detectarse, obteniéndose el máximo a las dos semanas de haberse iniciado el tratamiento.

4.- Al tratar a las células con EHC equivalente en peso fresco a 0.25, 1 y 2 HR, se detectó asimismo la presencia de LH en el medio de cultivo, si bien en cantidades menores que las obtenidas cuando se estimulaba a las células con 1 HR. Sin embargo, la supervivencia de las células fue mayor que cuando se estimulaba a las células con HR. Independientemente de la concentración de EHC empleado, la máxima cantidad de LH se obtiene en la tercera semana de tratamiento y de forma dosis dependiente.

5.- Al incubar anticuerpo anti-LHRH con el EHC y añadirsele posteriormente a las células en cultivo, observamos que se produce una disminución de la LH en el medio claramente significativa con respecto a la cantidad producida por las células estimuladas con EHC. Este hecho nos confirma que la LHRH del extracto hipotalámico está implicada en la estimulación de las células glandulares en cultivo. El anticuerpo no fué capaz de inhibir totalmente la producción de LH, lo que parece indicar que o bien la producción de LH no es debida exclusivamente a la acción de LHRH, o que el bloqueo con el anticuerpo no es completo.

6.- Las células en cultivo respondieron a las mezclas de factores hormonales hipotalámicos aislados, cuando se emplearon a 2, a 4 y a 10 μg de cada factor/pocillo/día de tratamiento, pudiendo detectarse TSH y LH en el medio de cultivo. Estas respuestas son muy inferiores a las detectadas con los extractos, lo que indicaría la presencia en éstos de otros factores.

7.- Estos estudios *in vitro* demuestran de forma indudable la capacidad de las células epiteliales parotídeas para asumir aunque sea parcialmente funciones hipofisarias. Las técnicas inmunocitoquímicas confirman la presencia de células productoras de hormonas hipofisarias.

BIBLIOGRAFIA

- * Acher R. Chemistry of neurohypophysial hormones: An example of molecular evolution. En: Greep RO., Astwood EB y Knobil E. eds. Handbook of physiology. Sect 7: Endocrinology Vol IV. The pituitary gland and its neuroendocrine control. Part 1. Washington DC. American Physiological Society. 1974. 119-130.
- * Adams JH., Daniel PM., Prichard MM. Transection of the pituitary stalk in man: anatomical changes in the pituitary glands of 21 patients. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1966. 29: 545-555.
- * Adashi EY., Hsueh AJW. y Yen SSC. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. Endocrinology. 1981. 108: 1441-1449.
- * Albers K. y Fuchs E. The molecular biology of intermediate filament proteins. Int. Rev. Cytol. 1992. 134: 243-279.
- * Aloe L. y Levi-Montalcini R. Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. Brain Res. 1977. 133: 358-366.
- * Altschuler LR., Parisi MN., Cagiao LF., Chiochio SR., Fernández-Pol JA. y Zaninovich AA. Epidermal growth factor stimulates thyrotropin secretion in the rat. Neuroendocrinology. 1993. 57: 23-27.
- * Alvarez Vega P., Gil-Lozaga P., Alvarez-Buylla R., Tresguerres JAF. Partial pituitary function of parotid gland tissue autotransplanted to the sella turcica after hypophysectomy. 73 th. Ann. Meet. Endocr. Soc. Washington. 1991. p. 416.
- * Alvarez P. Transformación morfofuncional del trasplante de parótida en la silla turca tras hipofisectomía en la rata. 1994. Tesis Doctoral.
- * Alvarez-Buylla R., Segura ET. y Rocas de Alvarez-Buylla E. Participation of the hypophysis in the conditioned reflex which reproduces the hypoglycemic effect of insulin. Acta Physiol. Lat. Am. 1961. Vol XI. Nº 3. 113-119.
- * Alvarez-Buylla R. y Rocas de Alvarez-Buylla E. Regulation of hypoglycemia in the hypophysectomized dogs with glandular transplants in the "sella turcica". Acta Physiol. Lat. Am. 1963. 13: 306-312.

- * Alvarez-Buylla R. y Roces de Alvarez-Buylla E. The reflex mechanism which controls the release of ACTH stored in the hypophysis. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1964. Vol 14. Nº 3. 251-254.
- * Alvarez-Buylla R. y Roces de Alvarez-Buylla E. The metopirone test in hypophysectomized dogs with salivary or adrenal gland transplants. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1967. Vol XVII. Nº 4. 253-257.
- * Alvarez-Buylla R. y Roces de Alvarez-Buylla E. Adrenocortical activity in normal dogs, hypophysectomized dogs and dogs with a transplant of salivary gland in the place of the extirpated hypophysis. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1970. Vol XX. Nº 2. 93-96.
- * Alvarez-Buylla R., Mandoki J. y Roces de Alvarez-Buylla E. Survival comparison between totally hypophysectomized dogs and dogs with a transplant of salivary gland in the place of the extirpated hypophysis. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1970a. Vol XX. Nº 1. 20-23.
- * Alvarez-Buylla R., Erlij D. y Roces de Alvarez-Buylla E. I^{131} uptake by thyroid of hypophysectomized dogs with salivary gland transplants in the sella turcica. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1970b. Vol XX. Nº 1. 13-19.
- * Alvarez-Buylla R., DeLeón I. y Roces de Alvarez-Buylla E. Gonadal function in hypophysectomized dogs with glandular transplants in the sella turcica. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1973. Vol XXIII. Nº 2. 75-82.
- * Alvarez-Buylla R. y Tsutsumi V. Adrenocortical function in hypophysectomized dogs with parotid gland transplants in direct contact with the basal hypothalamus. *Acta Endocrinologica.* 1979. 92: 710-719.
- * Amano O., Yoshitake Y., Nishikawa K. e Iseki S. Basic fibroblast growth factor in rat salivary glands. *Cell Tissue Res.* 1993. 273: 467-474.
- * Araujo RL., Queiroz EA., Saraiva EMF. y Junqueira Alvarenga R. Histo-physiological study of hypophysectomized dogs in which the hypophysis was replaced by parotid gland. *Acta Physiol. Lat. Am.* 1975. 25: 12-22.
- * Arce A. Papel de la prolactina y la inervación autonómica en los efectos de la ciclosporina sobre la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares. 1994. Tesis Doctoral.

- * Arias AE. y Bendayan M. Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. *Lab. Invest.* 1993. 69(5): 518-530.
- * Armelin MCS. y Armelin HA. Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J. Cell Biol.* 1983. 97: 459.
- * Asa SL y Kovacs K. Utilization of Electron Microscopic Techniques in the in vitro study of the adenohipophysial function and regulation. *Microscopy Research and technique.* 1992. 20: 136-151.
- * Banerjee SD., Cohn RH. y Bernfield MR. Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J. Cell. Biol.* 1977. 73: 445-463.
- * Bannasch P., Zerban H., Schmid E., Franke WW. Characterization of cytoskeletal components in epithelial and mesenchymal liver tumours by electron and immunofluorescence microscopy. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 1981. 36(2-3): 139-158.
- * Barnard JA., Lyons RM. y Moses HL. The cell biology of transforming growth factor β . *Biochem. Biophys. Acta.* 1990. 1032: 79-87.
- * Barthe PL., Bullock LP. y Mowszowicz I. Submaxillary gland epidermal growth factor: A sensitive index of biologic androgen activity. *Endocrinology.* 1974. 95: 1019-1025.
- * Batzri S. y Selinger Z. Enzyme secretion mediated by epinephrine beta-receptor in rat parotid slices. Factors governing efficiency of the process. *J. Biol. Chem.* 1973. 248: 356-360.
- * Beck-Peccoz P., Amr S. y Menezes-Ferriera M. Decreased receptor binding of biologically inactive thyrotropin in central hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 1985. 312: 1085-1090.
- * Begeot M., Hemming FJ., Martinat N., Dubois MP. y Dubois PM. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulates immunoreactive lactotroph differentiation. *Endocrinology.* 1983. 112: 2224-2226.
- * Begeot M., Morel G., Rivest RW., Aubert ML., Dubois MP. y Dubois PM. Influence of gonadoliberin on the differentiation of rat gonadotrophs: An in vivo and in vitro study. *Neuroendocrinology.* 1984a. 38: 217-225.

- * Begeot M., Dubois MP. y Dubois PM. Evolution of lactotrophs in normal and anencephalic human fetuses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984b. 58: 726-730.
- * Begeot M., Hemming FJ., Combarnous Y., Dubois MP., Aubert ML. y Dubois PM. Lactotrope differentiation induced by LH α subunit. *Science.* 1984c. 226: 566-568.
- * Bellows CG., Ishida H., Aubin JE y Heersche JN. Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts. *Endocrinology.* 1990. 127 (6): 3111-3116.
- * Ben-Jonathan N., Arbogast LA. y Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog. Neurobiol.* 1989. 33: 399-447.
- * Bennett GW. y Whitehead SA. *Mammalian Neuroendocrinology.* 1983. New York. Oxford University Press.
- * Berclowitz M., Szabo M. y Frohman LA. Somatomedin C mediates growth hormone negative feed-back by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science.* 1981. 212: 1279-1281.
- * Bergland RM. y Page RB. Pituitary brain vascular relations: A new paradigm. *Science* 1979. 204: 18-24.
- * Bern HA y Knowles FGW. Neurosecretion. In: Martini L., Ganong WF., eds. *Neuroendocrinology.* Vol 1. New York: Academic, 1966: 139-186.
- * Bernfield MR. y Wessells NK. Intra and extracellular control of epithelial morphogenesis. *Dev. Biol. Suppl.* 1970. 4: 195-249.
- * Bernfield MR., Banerjee SD. y Cohn RH. Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at the epithelial surface. *J. Cell. Biol.* 1972. 52: 674-689.
- * Birchmeier C. y Birchmeier W. Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1993. 9: 511-540.
- * Bissell MJ. y Aggeler J. Dynamic reciprocity: How do extracellular matrix and hormones direct gene expression? *Prog. Clin. Biol. Res.* 1987. 249: 251.
- * Bissell DM., Arenson DM. y Maher JJ. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J. Clin. Invest.* 1987. 79: 801-812.

- * Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 1989; 69: 1-32.
- * Blom T., Ojanotko-Harri A., Laine M. y Huhtaniemi I. Metabolism of progesterone and testosterone in human parotid and submandibular salivary glands in vitro. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 1993. Vol 44. N° 1. 69-76.
- * Blum JL., Zeigler ME. y Wicha MS. Regulation of mammary differentiation by the extracellular matrix. *Environ Health Perspect.* 1989. 80: 71.
- * Bockus BJ. y Stiles CD. Regulation of cytoskeletal architecture by platelet-derived growth factor, insulin and epidermal growth factor. *Exp. Cell Res.* 1984. 153:186.
- * Bohlen P., Baird A. y Esch F. Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. 81: 5364-5368.
- * Bottenstein J., Hayashi L. y Hutchings S. The growth of cells in serum-free supplemented media. *Methods Enzymol.* 1979. 58: 94-109.
- * Boyer R., Escola R. y Arancibia S. Effect of submandibular salivary gland removal on body weight, plasmatic testosterone levels, testicular weight and spermatogenesis in rats. *J. Biol. Buccale.* 1986. 14: 187-193.
- * Brauner R., Rappaport R. y Prevot C. A prospective study of the development of growth hormone deficiency in children given cranial irradiation, and its relation to statural growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989. 68: 346-351.
- * Brissenden JE., Ullrich A. y Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like-growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature.* 1984. 310: 781-784.
- * Broadley KN., Aquino AM. y Woodward SC. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab. Invest.* 1989. 61: 571-575.
- * Brodal P. *The Central Nervous System: Structure and Function.* 1992. Oxford University Press.
- * Brodie TD. y Crowley WF. Jr. Neuroendocrine control of reproduction and its manipulation with LHRH and its analogs. *Trends in Neurosci.* 1984. 7: 340-342.

- * Brown RE. An introduction to Neuroendocrinology. 1994. Cambridge University Press.
- * Brownstein MJ., Russell JT. y Gainer H. Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. 1980. Science 207: 373-378.
- * Burgess WH. y Maciag T. The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Annu Rev. Biochem. 1989. 58: 575-606.
- * Campbell PS. y Moriarity DM. (1991-1993). observaciones no publicadas. Estrogen regulation of EGF secretion. DHHS/PHS Grant.
- * Campbell GT., Wagoner J., Borer KT., Kelch RP. y Corley K. Ontogenesis of corticotrophs and lactotrophs in situ in the pituitary gland of the hamster. Cell Tissue Res. 1986. 245: 673-679.
- * Campbell BS., Ben-Aryeh H. y Swanson KA. Differential distribution of an estrogen receptor in the submandibular and parotid salivary glands of female rats. Endoc. Res. 1990. 16(3). 333-345.
- * Carmel PW., Araki S. y Ferin M. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence of pulsatile release of gonadotropin releasing hormone (GnRH). 1976. Endocrinology. 99: 243-248.
- * Carpenter G. y Cohen S. Epidermal growth factor. Annu Rev. Biochem. 1979. 48: 193-216.
- * Casella SJ., Smith EP. y Van Wyk JJ. Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin like growth factor I precursor DNA. 1987. 6: 325-330.
- * Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem. 1962. 237: 1555-1562.
- * Coleman R. y Hand AR. Endocytosis of native and cationized ferritin by intralobular duct cells of the rat parotid gland. Cell Tissue Res. 1987. 249: 577-586.
- * Conn PM. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. Endocr. Rev. 1986. 7: 3-11.
- * Conway R., Meacham C., Johnson AD. y Lewis ML. Effects of a unique rotating culture system on pancreatic release. J. Al. Acad Sci. 1992. 63:59.

- * Coulombe PA. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Current Opinion in cell biology*. 1993. 5: 17-29.
- * Crowley WF. Jr., Filicori M., Spratt DI. y Santoro NF. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog. Horm. Res.* 1985. 41: 473-531.
- * Crowley WH., Hassid A. y Kalra SP. Neuropeptide Y enhances de release of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology*. 1987. 120. 941-945.
- * D' Ercole AJ., Stiles AD. y Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. 81: 935-939.
- * Dacheux F. Functional differentiation of the anterior pituitary cells in the fetal pig. *Cell Tissue Res.* 1984. 235: 623-633.
- * Das M. Epidermal growth factor: Mechanisms of action. *Int. Rev. Cytol.* 1982. 78: 233-256.
- * Daikoku S., Kinutani M. y Watanabe Y. Role of the hypothalamus on development of adenohypophysis: an electron microscopic study. *Neuroendocrinology*. 1973. 11: 284-305.
- * Davis WL. *Histología y embriología bucal*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. 1986. pp: 206-224.
- * Decherney GS., De Bold CR. y Jackson RV. Diurnal variation in the response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to intravenous ovine corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985. 61: 273-279.
- * Dehaye JP. y Turner RJ. Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts. *Am. J. Physiol.* 1991. 261: C490-C496.
- * Deneff C. y Andries M. Evidence for paracrine interaction, between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology*. 1983. 112: 813-822.
- * Deneff C. Paracrine interactions in the anterior pituitary. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1986. 15: 1-31.
- * Desir D., Van Cauter E y Fang VS. Effects of "jet-lag" on hormonal patterns I. Procedures, variations in total plasma proteins, and disruption of adrenocorticotropin-cortisol periodicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981. 52: 628-641.

- * Devesa J., Lima L. y Tresguerres JAF. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. TEM. 1992. Vol 3. Nº 5. 175-183
- * Devesa J. y Tresguerres JAF. control de la secreción de GH. En: Retrasos del crecimiento: Fisiopatología. Eds Díaz de Santos. Madrid. 1992. 35-54.
- * Du Vigneaud V. Hormones of the mammalian posterior pituitary gland and their naturally occurring analogues. John Hopkins Med. J. 1969. 124: 53-65.
- * Dubois PM. y Hemming FJ. Fetal development and regulation of pituitary cell types. J. Electron. Microsc. Tech. 1991. 19: 2-20.
- * Dugger GS., Van Wyk JJ. y Newsome JF. The effect of pituitary stalk section on thyroid function and gonadotropic hormone secretion in women with mammary carcinoma. J. Neurosurg. 1962. 19: 589-593.
- * Dulak NC. y Temin HM. Multiplication-stimulating activity for chicken embryo fibroblasts from rat liver cell conditioned medium: A family of small polypeptides. J. Cell. Physiol. 1973. 81: 161-170.
- * Durban EM. Mouse submandibular salivary epithelial cell growth and differentiation in long-term culture: Influence of the extracellular matrix. In Vitro Cell Dev. Biol. 1990. 26: 33-43.
- * Emerman JT., Enami J. y Pitelka DR. Hormonal effects on intracellular and secreted casein in culture of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. 74: 4466-4470.
- * Emmelin N. Control of salivary glands. En: Oral Physiology. Emmelin N y Zotterman Y. eds. Pergamon Press. 1972. pp: 1-16.
- * Emmelin N. Nerve interactions in salivary glands. J. Dent. Res. 1987. 66: 509-517.
- * Eneroth CM., Hökfelt T. y Norberg KA. The role of the parasympathetic and sympathetic innervation for the secretion of the human parotid and submandibular glands. 1969. Acta Otolaryngol, 68: 369-375.
- * Evans JS. Local intravascular infusion with porcine hypothalamic extract changed the cytology and stimulated the secretory activity of rat pituitary autografts. Endocrinology. 1972. 90: 123-130.

- * Evans RL., Lau KR. y Case RM. Isolation and characterization of individual striated ducts from the rabbit mandibular salivary glands. *J. Physiol.* 1992. 452: 73P.
- * Evans RL., Lau KR. y Case RM. Structural and functional characterization of striated ducts isolated from the rabbit mandibular salivary gland. *Exp. Physiol.* 1993. 78: 49-64.
- * Everett JW. The mammalian hypothalamo-hypophysial system. In Jeff Coate S.L.; Hutchinson J.S.M. eds. *The endocrine hypothalamus*, London Academic, 1958: 1-34.
- * Ferguson JP. y Greenhoot JH. Sella turcica salivary transplants in hypophysectomized animals. *J. Surg. Res.* 1974. 16: 169-171.
- * Fingerle J., Faulmuller A., Muller G., Bowen Pope DF., Clowes MM., Reidy MA., Clowes AW. Pituitary factors in blood plasma are necessary for smooth muscle cell proliferation in response to injury in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 1992. 12(12): 1488-1495.
- * Folkman J. y Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature.* 1978. 273: 345.
- * Franke WW., Schiller DL., Moll R., Winter S., Schmid E., Engelbrecht I., Denk H., Krepler R., Platzer B. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.* 1981. 153(4): 933-959.
- * Fritz ME., LaVeau P. y Nahmias AJ. Primary cultures of feline acinar cells: Dissociation culturing and viral infection. *Am. J. Physiol.* 1980. 239: G288-G294.
- * Fuchs E. y Green H. The expression of keratin genes in epidermis and cultured epidermal cells. *Cell.* 1978. 15: 887-897.
- * Garrett J.R. Neuro-effector sites in salivary glands. In: *Oral Physiology* (Emmelin N and Zotterman Y eds). Pergamon Oxford. 1972; pp: 83-97.
- * Garrett J.R. Structure and innervation of salivary glands. In: *Scientific Foundations of Dentistry*. Cohen B and Kramer JRH. eds. 1976; Heineman; London pp: 499-516.
- * Garrett JR. y Emmelin N. Activities of salivary myoepithelial cells: A Review. 1979. *Med. Biol.*; 57: 1-28.
- * Garrett JR. y Kidd A. The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. *Microsc. Res. Tech.* 26: 75-91. 1993a.

- * Gash D., Ahmad N. y Schechter J. Comparison of gonadotroph, thyrotroph and mammothroph development in situ, in transplants and in organ culture. *Neuroendocrinology*. 1982. 34: 222-228.
- * Gautvik KM. y Tashjian Jr. AH. Effects of cations and colchicine on the release of prolactin and growth hormone by functional pituitary tumor cells in culture. *Endocrinology*. 1973. 93: 793.
- * Gautvik KM., Kriz M. y Lund-Larsen K. Adrenergic vasodilatation in the cat submandibular salivary gland. 1972 In: *Oral Physiology*: Emmelin N. and Zotterman Y., (eds). Pergamon Press., Oxford pp: 161-162.
- * Gay VL. The hypothalamus: Physiology and clinical use of releasing factors. *Fertil Steril*. 1972. 23: 50-63.
- * Getzenberg RH., Pienta KJ y Coffey DS. The tissue matrix: Cell dynamics and hormone action. *Endocr. Rev.* 1990. Vol 11. N° 3. 399-417.
- * Gilbert SF. y Migeon BR. D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell*. 1975. 5(1): 11-17.
- * Goodfriend TL., Levine L. y Fasman GD. Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science*. 1964. 144: 1344-1346.
- * Goodyear CG. Ontogeny of pituitary hormone secretion. En: Collu R., Ducharme JR., Guyda HJ eds. *Pediatric Endocrinology*. New York: Raven Press. 1989. 125-169.
- * Gorin PD. y Johnson EM Jr. Effects of long term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: An experimental autoimmune approach. *Brain Res*. 1980. 198: 27-42.
- * Gospodarowicz D., Greene G. y Moran J. Fibroblast growth factor can substitute for platelet factor to sustain the growth of BALB/c 3T3 cells in the presence of plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. 65: 779-787.
- * Gospodarowicz D. y Moran JS. Growth factors in mammalian cell culture. *Annu. Rev. Biochem.* 1976. 45: 530-552.
- * Gospodarowicz D., Greenburg G. y Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res*. 1978. 38: 4155.

- * Graham RC y Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 1966. 14: 291-302.
- * Granados B., Ariznavarreta C., Gil-Loyzaga P., Alvarez P. y Tresguerres JAF. GH values in hypophisectomized (HPX) rats autotransplanted with various tissues in the sella turcica. International Symposium "Growth Hormone and IGF-I". Santiago de Compostela. España. 1993a.
- * Granados B., Ariznavarreta C. y Tresguerres JAF. Adrenal and parotid tissue autotransplantation to the sella turcica are able to partially recover gonadotrophic function in hypophisectomized (HPX) rats. 6th. Meeting of the European Neuroendocrine association. Lisboa. Portugal. 1993b. *J. Endocrinol. Invest.* 16 (Suppl. 1 N° 8). pp: 112.
- * Grant DS., Tashiro K., Segui-Real B., Yamada Y., Martin GR y Kleinman HK. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell.* 1989. 58: 933-943.
- * Gray A., Dull TJ. y Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature* 1983. 303: 722-725.
- * Gresik E. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microsc. Res. Tech.* (En prensa; Tandler, 1993).
- * Grobstein C. Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature.* 1953. 172: 869-871.
- * Grossman A., Savage MO. y Besser GM. Growth hormone releasing hormone. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1986. 15: 607-627.
- * Guillemin R. Peptides in the brain: The new endocrinology of the neuron (Nobel lecture). *Science*, 1978; 202: 390-402.
- * Guillemin R., Brazeau P. y Bohlen P. Somatocrinin, the growth hormone releasing factor. *Rec. Prog. Horm. Res.* 1984. 40: 233-299.
- * Guiot G. Transsphenoidal approach in surgical treatment of pituitary adenomas: general principles and indications in nonfunctioning adenomas. En: Kohler PO., Ross GT. eds. *Diagnosis and treatment of pituitary tumors.* New York: American Elsevier. 1973. 159-178.

- * Halász B., Kosara B. y Sengvári I. Ontogenesis of the neurovascular link between the hypothalamus and the anterior pituitary in the rat. In: Brain-Endocrine interaction. Median eminence: Structure and function. Knigge KM., Scott DE., Weindl A., eds. 1972. pp 27-34.
- * Hall PF. The role of the cytoskeleton in hormone action. Can J. Biochem. Cell Biol. 1984. 62: 653.
- * Hand AR., Coleman R., Mazariegos MR., Lustmann J. y Lotti LV. Endocytosis of proteins by salivary gland duct cells. J. Dent. Res. 1987. 66: 412-419.
- * Hardy J. Transsphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary. Clin. Neurosurg. 1969. 16: 185-217.
- * Harris GW. y Jacobsohn D. Functional grafts of the anterior pituitary gland. Proc. Roy. Soc. London. B139: 263-279.
- * Harrop TJ. y Garrett JR. Effects of preganglionic sympathectomy on secretory changes in parotid acinar cells of rats on eating. 1974. Cell Tissue Res. 154: 135-150.
- * Hartman ML., Faria ACS. y Vance ML. Temporal structure of in vivo growth hormone secretory events in man. Am. J. Physiol. 1991. 260: E101-E110.
- * Hassell JR. y Pratt RM. Elevated level of AMPc alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in secondary palatal epithelium. Exp. Cell Res. 1977. 106: 55-62.
- * Hauser-Kronberger C., Albigger K., Saria A y Hacker GW. Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. Acta Otolaryngol (Stockh). 1992. 112: 343-348.
- * Hayward JN. Functional and morphological aspects of hypothalamic neurons. Physiol. Rev. 1977. 57: 574-658.
- * Hempstead BL. y Chao MV. The nerve growth factor receptor: Biochemical and structural analysis. Recent Prog. Horm. Res. 1989. 45: 441-466.
- * Herbert E., Roberts J. y Phillips M. Biosynthesis, processing, and release of corticotropin, β -endorphin, and α -melanocyte stimulating hormone in pituitary cell culture systems. In: Martini L., Ganong F., eds. Frontiers in Neuroendocrinology Vol 6. New York: Raven, 1980: 67-102.
- * Heritier AG. y Dubois PM. Influence of Thyroliberin on the rat pituitary cell type differentiation: An in vitro study. Endocrinology. 1993. 132 (2): 634-639.

- * Heritier AG. y Dubois PM. Re-evaluation of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action on pituitary cell differentiation with special regard to its effect on LH and TSH cell types. *J. Neuroendocrinol.* 1994. 6(1). p:33.
- * Hodgson C. y Spiers RL. The effect of preganglionic cervical sympathectomy on the amylase content of parotid glands in fasted and fed rats. *J. Physiol. Lond.* 1974. 237: 56-57P.
- * Hoeffler JP., Boockfor FR. y Frawley LS. Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology.* 1985. 117: 187-195.
- * Hoeffler JP. y Frawley LS. Hypothalamic factors differentially affect the proportions of cells that secrete growth hormone or prolactin. *Endocrinology.* 1987. 120: 791-795.
- * Hökfelt T., Lundberg J.M. y Schultzberg M. Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1980a; 22: 1-23.
- * Hökfelt T., Johansson O. y Ljungdahl A. Peptidergic neurons. *Nature.* 1980b; 284: 515-521.
- * Hollenberg MD. Epidermal growth factor-urogastrone, a polypeptide acquiring hormonal status. *Vitam. Horm.* 1979. 37: 69-110.
- * Horacek MJ., Campbell GT. y Blake CA. Luteinizing hormone releasing hormone: Effects of induction of LH follicle-stimulating hormone, and prolactin cell differentiation. *Endocrinology.* 1989. 124 (4): 1800-1806.
- * Houk JC. Control strategies in physiological systems. *FASEB J.* 1988. 2: 97-107.
- * Hughes TK. y Baron S. A possible role for IFNs α and β in the development of IFN- Γ 's antiviral state in mouse and human cells. En: Baron S., Dianzani F., Stanton GJ., eds. *The interferon system. A current review to 1987.* Austin: University of Texas Press, 1987. 187-196.
- * Ikeda H., Suzuki J. y Sasano N. The development and morphogenesis of the human pituitary gland. *Anat Embryol. (Berl).* 1988. 178: 327-336.
- * Ikeda H. y Yoshimoto T. Immunohistochemical distribution of simple epithelial type keratins and other intermediate filament proteins in the developing human pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 1991. 266: 59-64.

- * Imai M., Minoda T., Oikawa M. y Okano T. Investigation on glycogen in the salivary glands of man and many kinds of mammals. *Aichi-Gakkaishi J. Dent. Sci.* 1978. 16: 123-131 (En japonés con resumen en inglés).
- * Inoue K. y Sakai T. Conversion of growth hormone secreting cells into prolactin-secreting cells and its promotion by insulin and insulin like growth factor I in vitro. *Exp. Cell Res.* 1991. 195: 53-58.
- * Isaacs A. y Lindemann J. Virus interference: I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond [Biol].* 1957. 147: 258-267.
- * Iwai M., Iwai Y., Suzumura S., Miyahara H., Imai S. y Matsunaga T. Normal human salivary gland cells produce carcinoembryonic antigen-related antigen in collagen gels. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1991. 27A: 759-762.
- * Jessell TM. y Melton DA. Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell.* 1992. Vol 68: 257-270.
- * Jezernik K. y Pipan N. Cytochemical localization of carbohydrates in intercalated duct and acinar cells of mouse parotid gland. *Histochem. J.* 1989. 21: 131-135.
- * Jimenez A. y Walker RF. The serotonergic system. En: Steger RW y Johns A. eds. *Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system.* Boca Raton. Florida: CRC Press. 1985. 109-154.
- * Johnson DA. Regulation of salivary glands and their secretions by masticatory, nutritional and hormonal factors. En: Sreenby LM. eds. *The salivary system.* Boca Raton. Florida. CRC Press Inc. 1987. 135-155.
- * Jones PM., Gathe MA., Steel J., O' Halloran D., Gon G., Legon S., Burrin JM., Leonhardt U., Polak JM., y Bloom SR. Evidence for neuropeptide Y synthesis in the rat anterior pituitary and the influence of thyroid hormone status: Comparison with vasoactive intestinal peptide, substance P, and neurotensin. *Endocrinology*, 1989. 125:334-341.
- * Kanehisa J., Doi S., Yamanaka T. y Takeuchi H. Salivary fibronectin in man: An immunoblotting, radioimmunoassay and immunohistological study. *Arch. Oral Biol.* 1991. 36: 265-271.
- * Kasperk C., Fitzsimmons R., Strong D., Mohan S., Jennings J., Wergedal J., Baylink D. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990. 71 (5): 1322-1329.

- * Kasson BG. y Hsueh AJ. Insulin like growth factor I augments gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1987. 52: 27-34.
- * Kendall SK., Saunders TL., Jin L., Lloyd RV., Glode LM., Neh TM., Keri RA., Nilson GH. y Camper SA. Targeted ablation of pituitary gonadotrophs in transgenic mice. *Molecular Endocrinology.* 1991. 5: 2025-2036.
- * Kiser ChS., Rahemtulla F y Månsson-Rahemtulla B.. Monolayer culture of rat parotid acinar cells without basement membrane substrates. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1990. 26: 878-888.
- * Klein G., Langegger M., Timpl R. y Ekblom P. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell.* 1988. 55: 331-341.
- * Kleinman HK., McGarvey ML., Hassell JR., Star VL., Cannon FB., Laurie GW. y Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986. 25: 312-318.
- * Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research.* 1980. 36: 53-88.
- * Korsching S. y Thoenen H. Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 1983. 39: 1-4.
- * Krause Brucker W. y Gardner DW. Optic nerve hypoplasia associated with absent septum pellucidum and hypopituitarism. *Am. J. Ophthalmol.* 1980. 89: 113-120.
- * Krieger DT. Brain Peptides: What, Where and Why?. *Science* 1983a; 222:975-985.
- * Krieger DT. The multiple faces of pro-opiomelanocortin, a prototype precursor molecule. *Clin. Res.* 1983b; 31: 342-353.
- * Krieger DT. An overview of neuropeptides. In Martin JB. y Barchas JD. eds. *Neuropeptides in neurologic and psychiatric disease.* New York. 1986. Raven Press. pp 1-32.
- * Krulich L. Central neurotransmitter and the secretion of prolactin, GH, LH and TSH. *Annual review of Physiology.* 1979. 21: 603-615.
- * Kusakabe M., Sakakura T., Sano M. y Nishizuka Y. A pituitary-salivary mixed gland induced by tissue recombination of embryonic pituitary epithelium and embryonic submandibular gland mesenchyme in mice. *Developmental Biol.* 1985. 110: 382-391.

- * Kyakumoto S., Kurokawa R., Ohara-Nemoto Y. y Ota M. Sex differences in the cytosolic and nuclear distribution of androgen receptor in mouse submandibular gland. *J. Endocrinol.* 1986. 108: 267-273.
- * Lamberton RP. y Jackson IMD. Investigation of hypothalamic-pituitary disease. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1983. 12: 509-534.
- * Lazarides E. Intermediate filaments: A chemically heterogenous, developmentally regulated class of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1982. 51: 219-250.
- * Lechan RM. Neuroendocrinology of pituitary hormone regulation. *Endocrinol. Metab. Clin. North Ame.* 1987. 16: 475-502.
- * Leiva L.A. y De la Lastra M.; LH-releasing activity of hypothalamic extracts not attributable to GnRH. *Neuroendocrinology.* 1993; 57: 615-620.
- * Leong DA., Frawley LS. y Neill JD. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 1983. 45: 109-127.
- * Leonora J. y Steinman RR. Evidence suggesting the existence of a hypothalamic-parotid gland endocrine axis. *Endocrinology.* 1968. 83: 807-815.
- * Leonora J., Tieche JM y Celestin J. Physiological factors affecting secretion of parotid hormone. *Am. J. Physiol.* 1987. 252: E477-E484.
- * Leonora J., Tieche JM y Cooks DS. Evidence for insulinotropic effect from rat parotid glands. *Diabetes.* 1988. 37: 441-445.
- * Levi-Montalcini R. y Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 1951. 116: 321-362.
- * Lewis ML., Moriarity DM y Campbell PS. Use of microgravity bioreactors for development of an in vitro rat salivary gland cell culture model. *J. Cell Bioch.* 1993. 51: 265-273.
- * Leyendecker G., Wildt L. y Hansmen M. Pregnancies following chronic intermittent pulsatile administration of GnRH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980. 51: 1214-1216.
- * Li S., Crenshaw Eb., Rawson EJ., Simmons DM., Swanson LW. y Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU domain gene Pit-1. *Nature.* 1990. 347: 528-533.

- * Linfoot JA. Alpha particle pituitary irradiation in the primary and postsurgical management of pituitary microadenomas. En: Faglia G., Giovanelli MA. y McLeod RM. eds. Pituitary microadenomas. London: Academic. 1978. 515-529.
- * Lima-Rodríguez L. Estudio del ritmo endógeno hipotálamo-somatotropo e influencia de los niveles circulantes de esteroides sexuales sobre la secreción de hormona de crecimiento. Tesis Doctoral. 1988.
- * Lucas DR. The effect of hydrocortisone, oxygen tension and other factors on the survival of the submandibular, sublingual, parotid and exorbital lacrimal glands in organ culture. *Exp. Cell Res.* 1969. 55: 229-242.
- * Lundberg A. Electrophysiology of salivary glands. *Physiol. Revs.* 1958. 38: 21-40.
- * Lundberg J.M., Ånggard A., Fahrenkrug J., Hökfelt T. y Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 1651-1655.
- * Lundbland JR. y Roberts JL. Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr. Rev.* 1988. 9: 135-158.
- * Maestre de S. Juan A. Falta total de nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía una atrofia congénita de los testículos y miembro viril. *Siglo médico.* 1856. Vol 131. pp: 211.
- * Majack RA. y Bornstein P. Heparin and related glycosaminoglycans modulated the secretory phenotype of vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 1984. 99: 1688-1695.
- * Makino I., Muramaki Y., Muramaki M., Saito Y., Wada Y. y Nishiyama Y. An immunohistological study of the parotid gland. *J. Otolaryngol. Jpn.* 1992. 95: 1923-1930.
- * Mangos JA., McSherry NR., Butcher R., Irwin K. y Barber T. Dispersed rat parotid acinar cells I. Morphological and functional characterization. *Am. J. Physiol.* 1975. 229: 553-559.
- * Maruyama S., Tanaka T. y Barka T. The effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on hormone-induced differentiation of rat parotid gland in organ culture. *Exp. Mol. Pathol.* 1982. 37(2): 141-149.

- * Martin J.B. y Reichlin S. Clinical neuroendocrinology. 2nd ed. Philadelphia. F.A. Davis. 1987.
- * Martin C.R. Endocrine Physiology. Oxford University Press. 1985.
- * McEwen BS. Actions of sex hormones on the brain: "Organization" and "activation" in relation to functional teratology. Prog. Brain Res. 1988. 73: 121-134.
- * McMillan MK. y Talamo BR. Parasympathetic denervation increases responses to VIP in isolated rat parotid acini. Peptides. 1989. Vol 10 pp: 721-727.
- * McNicol AM., Kubba MAG. y McTeague E. The mitogenic effects of corticotrophin -releasing factor on the anterior pituitary gland of the rat. J. Endocrinol. 1988. 118:237-241.
- * Merchán-Pérez A. Identificación de neurotransmisores durante el desarrollo del receptor acustico. 1992. Tesis Doctoral.
- * Merchenthaler I., Setalo G., Csontos C., Petrusz P., Flerko B. y Negro-Vilar A. Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of LHRH and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. Endocrinology. 1989. 125: 2812-2821.
- * Merkel GJ y Phelps ChL. Mitogenic and morphogenic effects of a bovine salivary gland extract on astrocytes and fibroblasts. Bioch. Bioph. Acta. 1987. 924: 492-501.
- * Millan FA., Denhez F., Kondaiah P. y Akhurst RJ. Embryonic gene expression patterns of TGF B1, B2, and B3 suggest different developmental functions in vivo. Development. 1991. 111: 131-144.
- * Millar RP. y King JA. Evolution of gonadotropin-releasing hormone: Multiple usage of a peptide. News Physiol. Sci. 1988. 3: 49-53.
- * Milner RDG., Russell-Fraser T y Brook CGD. Experience with human growth hormone in Great Britain: report of the MRC working party. Clin. Endocrinol. 1979. 11: 15-38.
- * Molitch ME. y Reichlin S. Hypothalamic hyperprolactinemia neuroendocrine regulation in man. En: McLeod RM., Thorner MO., Scapagnini V. eds. Prolactin. Basis and clinical correlates. Padua: Liviana, 1985. 709-719.
- * Moll R., Franke WW., Schiller DL., Geiger B. y Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. Cell. 1982. 31: 11-24.

- * Moore RY. Central neural control of circadian rhythms. En: Ganong WF., Martini L., eds. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Vol 5. New York, Raven Press. 1978. 185-206.
- * Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 1983. 42: 2783-2789.
- * Moriarty G., Ellison DG., y Ramaley JA. Storage of anterior lobe adrenocorticotropin in corticotrophs and a subpopulation of gonadotrophs during the stress-nonresponsive period in the neonatal male rat. *Endocrinology*. 1982. 110: 1676-1692.
- * Moses AM. Long-standing post-traumatic diabetes insipidus. *Med. Grand. Rounds*. 1983. 2: 117-128.
- * Müller EE. y Nistico G. *Brain messengers and the pituitary*. 1989. San Diego. Academic Press.
- * Neill JD. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin. *Endocrinology*. 1972. 90: 1154-1159.
- * Nelson PB., Goodman ML. y Flickenger JC. Endocrine function in patients with large pituitary tumors treated with operative decompression and radiation therapy. *Neurosurgery*. 1989. 24: 398-400.
- * Nemeskéri A., Sétáló G., Kacsóh B. y Halász B. Fetal pituitary graft is capable of initiating hormone synthesis in median eminence removed adult rat. *Endocrinologia Experimentalis*. 1990. Vol, 24: 283-292.
- * Nexø E., Lamberg SI. y Hollenberg MD. Comparison of a receptor binding assay with a radioimmunoassay for measuring human epidermal growth factor-urogastrone in urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1981. 41: 577-582.
- * Nogawa H. y Nakanishi Y. Mechanical aspects of the mesenchymal influence on epithelial branching morphogenesis of mouse salivary gland. *Development*. 1987. 101: 491-500.
- * Oliver C. Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells in vitro. *In vitro*. 1980. 16: 297-305.
- * Oliver C., Waters JF. y Tolbert CL. Growth of exocrine salivary cells on a reconstituted basement membrane gel. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1987. 23: 465-473.
- * Orth DN., Besser GM. y King PH. Free-running circadian plasma cortisol rhythm in a blind human subject. *Clin. Endocrinol.* 1979. 10: 603-617.

- * Parker DC., Rossman LG. y Pekary AE. Effect of 64 hour sleep deprivation on the circadian waveform of thyrotropin (TSH): further evidence of sleep-related inhibition of TSH release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987. 64: 157-161.
- * Penhoat A., Jaillard C. y Saez JM. Synergistic effects of corticotropin and insulin like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. 165: 355-359.
- * Pease D.C. An electron microscopic study of red bone marrow. *J. Hematol.* 1956. II: 501-526.
- * Pickering BT. y Jones CW. Neurophysins. En: Li Ch. ed. *Hormonal proteins and peptides*. Vol 5. New York: Academic Press. 1978. 103-158.
- * Piva F., Motta M. y Martini L. Regulation of hypothalamic and pituitary function: Long, short and ultrashort feedback loops. En: LJ. de Groot eds. *Endocrinology*. New York: Grunne y Statton. 1979. Vol I. 21-33.
- * Plowman GD., Whitney GS. y Neubauer MG. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. 87: 4905-4909.
- * Polak M., Scharfmann R., Seilheimer B., Eisenbarth G., Dressler D., Verma IM. y Potter H. Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin secreting pancreatic beta cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol 90. 5781-5785.
- * Prasad KN., Edwards-Prasad, Carvalho E., La Rosa FG., Balbinder E., Meyers A y Quissell D. Establishment of primary cultures of rat and human parotid epithelial cells for transfection experiments. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1992. 28A: 493-499.
- * Prysor-Jones RA., Silverlight JJ. y Jenkins JS. Differential effects of extracellular matrix on secretion of prolactin and growth hormone by rat pituitary tumour cells in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1985. 108: 156.
- * Quintanar-Stephano A. y Martin JM. Hypothalamic induction of TSH secretion by cultured fetal rat parotid cells. Datos no publicados.
- * Rall LB., Scott J., Bell GI. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature.* 1985. 313: 228-231.

- * Reddi AH. Extracellular matrix and development. In: Piez K., Reddi AH eds. Extracellular matrix biochemistry. New York. Elsevier. 1984. 375-412.
- * Redman RS., Quissell DO., Barzen KA. Effects of dexamethasone, epidermal growth factor, and retinoic acid on rat submandibular acinar-intercalated duct complexes in primary culture. In Vitro Cell Dev. Biol. Vol 24. Nº 8. 1988. 734-742.
- * Reeves WB. y Andreoli TE. The posterior pituitary and water metabolism. En: Williams Textbook of Endocrinology, Wilson JD. y Foster DW. eds. 8th. ed. Philadelphia. 1992.
- * Reichlin S. Neuroendocrinology. En: Williams: Textbook of Endocrinology. Wilson y Foster eds. 1992. 135-220.
- * Reid RL., Quigley ME. y Yen SSC. Pituitary apoplexy. Arch. Neurol. 1985. 42: 712-719.
- * Rifkin DB. y Moscatelli D. Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. J. Cell Biol. 1989. 109: 1-6.
- * Roberts AB., Anzano MA. y Wakefield LM. Type beta transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. 82: 119-123.
- * Rodríguez Poyo-Guerrero P., Pato Castel I. y Tresguerres JAF. Posibilidades actuales en el diagnóstico de los hipogonadismos hipogonadotrópicos. An. Med. Intern. 1989. Vol 6. Nº 11. 598-602.
- * Romeo G., Fiorucci G. y Rossi GB. Interferons in cell growth and development. Trends Genet. 1989. 5: 19-24.
- * Ruoslahti E. y Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activity. Cell. 1991. 64: 867-869.
- * Ryan J., Mantle T., McQuaid S. y Costigan DC. Salivary insulin-like growth factor-I originates from local synthesis. J. Endocrinol. 1992. 135: 85-90.
- * Sabatini LM., Allen-Hoffmann, Warner TF y Azen EA. Serial cultivation of epithelial cells from human and macaque salivary glands. In Vitro Cell Dev. Biol. 1991. 27A: 939-948.
- * Sata Y. y Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor beta 1 like molecule by plasmin during co-culture. J. Cell Biol. 1989. 109: 309-315.

- * Sauter NP., Toni R. y McLaughlin CD. Isolated adrenocorticotropin deficiency associated with an autoantibody to a corticotroph antigen that is not adrenocorticotropin or other proopiomelanocortin-derived peptides. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990. 70: 1391-1397.
- * Saxen L. Mechanism of morphogenetic tissue interactions: The message of transfilter experiments. In: Results and problems in cell differentiation. Vol 11: Differentiation and Neoplasia. McKinnel RG., DiBerardino MA., Blumenfeld M. y Bergard RD. eds. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg. 1980. 147-154.
- * Schachter M., Wheeler GD., Matthews RW., Peret MW. y Moriwaki C. Ultrastructural immunolocalization of kallikrein in apical granules of striated duct cells of cat submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1983. 31: 345-347.
- * Schally AV., Coy DH. y Meyers CA. Hypothalamic regulatory hormones. *Ann. Rev. Bioch.* 1978. 47: 89-128.
- * Schittny JC. y Yurchenco PD. Basement membranes: Molecular organization and function in development and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1989. 1: 983.
- * Schneyder ChA. y Hall HD. Autonomic regulation of the immature and adult rat parotid gland. En: Schneyder LH. y Schneyder ChA. eds. Secretory mechanisms of salivary glands. Academic Press. New York. 1967. 155-177.
- * Schoenle E., Zapf J. y Humbel RE. Insulin like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature.* 1982. 296: 252-253.
- * Schuger L., O'Shea S., Rheinheimer J. y Varani J. Laminin in lung development: Effects of anti-laminin antibody in murine lung morphogenesis. *Dev. Biol.* 1990. 137: 26-32.
- * Schultzberg M., Hökfelt T. y Lundberg JM. Peptide neurons in the autonomic nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1980. 25: 341-348.
- * Schultzberg M., Hökfelt T. y Lundberg JM. Coexistence of classical transmitters and peptides in the central and peripheral nervous systems. *Br. Med. Bull.* 1982. 38: 309-313.
- * Schwanzel-Fukuda M., Bick D. y Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol. Brain Res.* 1989. 6: 311-326.

- * Sharp PJ. y Fraser HM. Control of reproduction. En SL. Jeffcoate and JSM Hutchinson (eds). The endocrine hypothalamus. London: Academic Press. 1978. 271-332.
- * Sheehan HL. y Stanfield JP. The pathogenesis of postpartum necrosis of the anterior lobe of the pituitary gland. Acta Endocrinol. 1961. 37: 479-510.
- * Sheehan HL. y Kovacs K. Neurohypophysis and hypothalamus. En: Blood-worth JMB Jr ed. Endocrine Pathology. Baltimore. Williams y Wilkins. 1982. 45-99.
- * Sherman L., Stocker KM., Morrison R. y Ciment G. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. Development. 1993. 118: 1313-1326.
- * Shupnik MA. Effects of gonadotropin releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration of luteinizing hormone beta gene stimulation. Mol. Endocrinol. 1990. 4: 1444-1450.
- * Silverman AJ. y Zimmerman EA. Magnocellular neurosecretory system. Ann. Rev. Neurosci. 1983. 6: 357-380.
- * Simmons DM., Voss JW., Ingraham HA., Holloway JM., Broide RS., Rosenfeld MG., Swanson LW. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. Genes Dev. 1990. 4: 695-711.
- * Simpson ER. y Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. Annu. Rev. Physiol. 1988. 50: 427-440.
- * Sirett NE. Studies of hypothalamic pituitary adrenal and thyroid relationships in rats with transplanted pituitaries. NZ. med. J. 1975. 81: 63-65.
- * Slabaugh MB., Liebermann ME., Rutledge JJ. y Gorski J. Ontogeny of growth hormone and prolactin gene expression in mice. Endocrinology. 1982. 110: 1489-1497.
- * Spooner BS. y Wessells NK. An analysis of salivary gland morphogenesis: Role of cytoplasmic microfilaments and microtubules. Dev. Biol. 1972. 27: 38-54.
- * Sporn MB. y Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. Nature. 1988. 332: 217-218.

- * Stanley HF., Curtis A., Sheward WJ., Roberts JL y Fink G. Prolactin messenger ribonucleic acid levels in the normal and hypogonadal mouse pituitary gland. *Endocrinology*. 1986. 119: 2422-2426
- * Stanfield JP. The blood supply of the human pituitary gland. *J. Anat.* 1960. 94: 257-273.
- * Stewart M. Intermediate filaments structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993. 5: 1-2.
- * Stracke ML., Engel JD., Wilson LW., Rechler MM., Liotta LA., Schiffmann E. The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 1989. 264: 21544.
- * Swanson LW. y Sawchenko PE. Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 1983. 6: 269-324.
- * Takahashi Y. y Nogawa H. Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development*. 1991. 111: 327-335.
- * Taleisnik S. Control of melanocyte stimulating hormone (MSH) secretion. En: Jeffcoate SL., y Hutchinson JSM eds. *The endocrine hypothalamus*. London: Academic Press. 1978. 421-439.
- * Tamarin A. y Sreebny L.M. The rat submaxillary salivary gland. A correlative study by light and electron microscopy. *J. Morphol* 117: 296-352.
- * Tandler B. Introduction to mammalian salivary glands. *Microsc. Res. Tech.* 26: 1-4. 1993a.
- * Tandler B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microsc. Res. Tech.* 26: 57-74. 1993b.
- * Tandler B. y Phillips CJ. Structure of serous cells in salivary glands. *Microsc. Res. Tech.* 26: 32-48. 1993.
- * Thesleff I., Vinikka L., Saxen L., Lehtonen E. y Perheentupa J. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life Sci.* 1988. Vol 43. pp: 13-18.
- * Thoenen H. y Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 1980. 60: 1284-1335.
- * Thoenen H. y Edgar D. Neurotropic factors. *Science*. 1985. 229: 238-242.

- * Thomas KA., Baglan NC. y Bradshaw RA. The aminoacid sequence of the gamma subunit of mouse submaxillary gland 7S nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1981. 256: 9156-9168.
- * Thorner MO., Vance ML., Horvath E. y Kovacs K. The anterior pituitary. En: Williams: Textbook of Endocrinology 8 th ed. Wilson y Foster eds. 1992. 221-310.
- * Thorpe LW. y Pérez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* 1987. 18: 134-139.
- * Tieche JM. y Leonora J. Biological and chemical evidence for the existence of a porcine hypothalamic parotid hormone releasing factor. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 1989. Vol 159. N° 3. 899-906.
- * Tilemans D., Andries M. y Denef C. Luteinizing hormone releasing hormone and neuropeptide Y influence DNA replication in three anterior pituitary cell types. Evidence for mediation by growth factors released from gonadotrophs. *Endocrinology.* 1992. 130: 882-894.
- * Trautmann JC. y Laws ER. Jr. Visual status after transsphenoidal surgery at the Mayo Clinic. 1971-1982. *Am. J. Ophthalmol.* 1983. 96: 200-208.
- * Tresguerres JAF. *Fisiología Endocrina.* Eudema Universidad. Madrid. 1989.
- * Tresguerres JAF. *Enfermedades de las gónadas.* En: *Medicina Interna* 12 ed. Farreras-Rozman eds. 1992a. 2121-2129.
- * Tresguerres JAF. *Somatomedinas.* En: *Retrasos del crecimiento: Fisiopatología.* Eds Díaz de Santos. Madrid. 1992b. 55-68.
- * Tresguerres JAF. *Fisiología Humana.* 1ª ed. Interamericana. Madrid. 1992c.
- * Uddman R., Fahrenkrug J., Mahm L., Alumets J., Hakanson R., Sundler F. Neuronal Vip in salivary glands: distribution and release. *Acta Physiologica Scand.* 1980. 110: 31-38.
- * Underwood LE. y Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. En: Williams: Textbook of Endocrinology. Wilson y Foster eds. 8th. ed. 1992. 1079-1138.
- * Van Bael A., Huygen R., Himpens B. y Denef C. In vitro evidence that LHRH stimulates the recruitment of prolactin mRNA-expressing cells during the postnatal period in the rat. *J. Mol. Endocrinol.* 1994. 12: 107-118.

- * Veldhuis JD. y Hammond JH. Endocrine function after spontaneous infarction of the human pituitary: report, review and reappraisal. *Endocr. Rev.* 1980. 1: 100-107.
- * Veldhuis JD., Carlson ML., Johnson ML. The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. 84: 7686-7690.
- * Vikstrom KL., Lim SS., Goldman RD. y Borisy GG. Steady state dynamics of intermediate filament networks. *J. Cell Biol.* 1992. 118: 121-129.
- * Vollmar AM., Colbatzky F., Hermanns W. y Schultz R. Origin and characterization of atrial natriuretic peptide in the rat parotid gland. *Anat. Embryol.* 1991. 184: 331-335.
- * Wang YF., Liu CJ., Shi JX., Cheng HW., Shao XG., Liu WX., Xu SX., Yang WR. An experimental study of pituitary transplantations in rabbits. *Chin. Med. J. (Abstract en Inglés).* 1992. 105(5): 415-419.
- * Weiner RI., Findell PR. y Kordon C. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En: Knobil E., Neill JD., eds. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press. 1988. Vol 1. 1235-1281.
- * Wurtman RJ. y Anton-Tay F. The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent. Prog. Horm. Res.* 1969; 25: 493-522.
- * Xu XF. y Björntorp P. Effects of sex steroid hormones on differentiation of adipose precursor cells in primary culture. *Exp. Cell Res.* 1987. 173 (2): 311-321.
- * Yalow RS. y Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 1959. 184: 1648-1649.
- * Yayon A., Klagsbrun M., Esko JD., Leder P. y Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991. 64: 841-848.
- * Yeh KY., Yeh M. y Holt PR. Induction of intestinal differentiation by systemic and not by luminal corticosterone in adrenalectomized rat pups. *Endocrinology.* 1989. 124 (4): 1898-1904.

- * Yeh C., Mertz PM., Oliver C., Baum BJ., Kousvelari EE. Cellular characteristics of long-term cultured rat parotid acinar cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991. 27A: 707-712.
- * Yohro T. Nerve terminals and cellular junctions in young and adult mouse submandibular glands. *J. Anat.* 1971. 108: 409-417.
- * Zaborszky L. Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology.* 1982. 69: 1-107.
- * Zajicek G., Yagil C. y Michaeli Y. The streaming submandibular gland. *Anat. Rec.* 1985. 213: 150-158.