



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas  
y Aplicadas**

**Centro de Investigación en Dinámica Celular**

**Determinación del efecto del glutamato sobre la  
expresión de la enzima piroglutamil peptidasa II en  
cultivos primarios de tanicitos de eminencia media de  
rata**

**T e s i s**

Para obtener el título de

**Licenciado en Ciencias Bioquímica y Biología Molecular**

**Presenta**

**Gabriela Aguilar Vargas**

**Director de Tesis**

**Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez**

**Cuernavaca, Morelos.**

**Septiembre 2019**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de neurobiología molecular y celular del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt), bajo la asesoría de la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyectos CB254960 y PN562) y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyectos IN-206416 Y IN-212719)

COMITÉ TUTORAL:

Presidente: Dra. Verónica Narváez

Secretario: Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez

Vocal : Dr. Jean-Louis Joseph Marie Charli Casalonga

Suplente: Dra. Rosa María Uribe Villegas

Suplente: Dr. Raúl Arredondo Peter

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Jean-Louis Joseph Charli Casalonga y a la Dra. Patricia Joseph Bravo por la oportunidad que me dieron al aceptarme como tesista de Licenciatura en su laboratorio y por todo el apoyo recibido durante este periodo.
- ❖ A la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez y al Dr. Jean-Luis Joseph Charli Casalonga por aceptar el compromiso y la responsabilidad de dirigir y revisar el trabajo, por su interés constante en mi desarrollo profesional, por estar siempre al pendiente cuando necesité de su ayuda, por su paciencia, su comprensión, su tiempo, sus críticas constructivas y por esa enorme humildad y bondad que me alientó a no desistir; gracias totales!
- ❖ Al grupo de sinodales: Dra. Verónica Narváez, Rosa María Uribe Villegas, Raúl Arredondo Peter, Dra. María Juana Antonieta, Dr. Jean-Louis Charli por sus comentarios y críticas en el transcurso de evaluación de este proyecto de titulación.
- ❖ A la Q. I. Fidelia Romero Arteaga por el suministro de reactivos y su apoyo en las técnicas de purificación de ARN y cuantificación de ARN mensajero específico por RT-PCR punto final, a la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por el apoyo en las actividades del bioterio y a los laboratoristas Manuel Villa Herrera y Sandra Verónica Serrano por su apoyo en el funcionamiento diario del laboratorio.
- ❖ A todos los integrantes del laboratorio de neurobiología que de forma directa o indirecta me apoyaron en la realización de esta tesis. Especialmente a la Dra. Rosa María Uribe y al M. en C. Adair Rodríguez por su apoyo e instrucción para la realización de los procedimientos experimentales.

## DEDICATORIA

A mis padres: Guadalupe y Francisco por el esfuerzo que ambos pusieron para lograr este nuevo triunfo en mi vida.

A mis hermanos y sobrinos que a pesar de todo creyeron en mí. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

A mis amigos que son familia por elección: Anita Hernández, Marco Vinicio, Edgar Equihua, Abigail García, Liz Cerezo, Sandra Mendiola, Yuvizel Rivera, Oscar Bastida, Yamili Vargas por apoyarme en todo momento.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS. ....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	13
1.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES .....	15
1.3 LOS TANICITOS DE LA EMINENCIA MEDIA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL EJE HPT .....	18
1.4 PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II EN LOS TANICITOS Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD DEL EJE TIROIDEO .....	23
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>26</b>
2.1 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PPII EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA EMINENCIA MEDIA .....	26
2.2 EFECTO DE LA COMUNICACIÓN GLUTAMATÉRGICA, Y TRHÉRGICA EN LA EMINENCIA MEDIA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS TANICITOS Y LA PPII .....	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>30</b>
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	31
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
7.1 CULTIVO PRIMARIO.....	32
7.2 ESTIMULACIÓN CON GLUTAMATO Y/O CNQX.....	33
7.3 EXTRACCIÓN DEL RNA.....	34
7.4 OPTIMIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ARNs MENSAJEROS POR RT-PCR .....	35

7.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	38
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
8.1 VIABILIDAD CELULAR INICIAL Y MORFOLOGÍA A LO LARGO DEL CULTIVO.....	39
8.2 EXPRESIÓN DE LA PPII A LO LARGO DEL CULTIVO .....	40
8.3 MORFOLOGÍA DE TANICITOS ANTES Y DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON GLUTAMATO.....	40
8.4 INTEGRIDAD DEL ARN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE TANICITOS .....	42
8.5 RELACIÓN CICLO DE AMPLIFICACIÓN VS CANTIDAD DE PRODUCTO DE PCR .....	46
8.6 EFECTO DE GLUTAMATO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm: DOSIS-RESPUESTA.....	49
8.7 EFECTO DE GLUTAMATO SOBRE EXPRESIÓN DE ARN DE PPIIc Y PPIIt: CINÉTICA CON GLUTAMATO A 50 $\mu$ M.....	50
<i>8.7.1 Tratamiento con T3 como control positivo de regulación del ARNm de la PPIIc     y PPIIt .....</i>	<i>51</i>
8.8 EFECTO DE CNQX, UN ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO, SOBRE EXPRESIÓN DE ARN DE PPIIc, PPIIt, DII Y C-FOS .....	52
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>60</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los núcleos en hipotálamo que contribuyen al control del balance de energía, así como de señales metabólicas producidas por órganos de la periferia .....	12
Figura 2. Regulación central del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en la rata .....	14
Figura 3. Esquema coronal del hipotálamo medio basal .....	18
Figura 4. Efecto del ayuno sobre la expresión de los mRNAs de PRO-TRH, D2 y PPII .....	22
Figura 5. Mecanismo propuesto para el papel de la PPII en los tanicitos b2 de la eminencia media .....	23
Figura 6. Fotografías de platos de cultivo tomadas por microscopia de contraste de fases a varios días <i>in vitro</i> .....	36
Figura 7. Fotografías de células en cultivo antes y después del tratamiento con glutamato tomadas por microscopia de contraste de fases .....	38
Figura 8. Análisis del ARN total obtenido de cultivos de células de la eminencia media .....	39
Figura 9. Estandarización del número de ciclos para amplificación de cDNA por PCRs .....	44
Figura 10. Efecto del glutamato 50 $\mu$ M dos horas sobre la expresión de los ARN de PPIIc, PPIIt y D2 .....	45
Figura 11. Efecto del antagonista CNQX sobre el efecto del glutamato sobre los niveles de ARN de C-FOS y D2.....	48

## Índice de tablas.

Tabla 1. Genes expresados en tanicitos y células endoteliales .....	20
Tabla 2. Receptores de glutamato presentes en los tanicitos.....	27
Tabla 3. Medio y suplementos empleados para el medio de cultivo MD-DMEM-F12.....	31
Tabla 4. Mezcla de reacción para la reacción de Transcriptasa reversa RT .....	33
Tabla 5. Mezcla de reacción para la actividad de la reacción en cadena de la polimerasa o mezcla de reacción para la amplificación en cadena de ADNc específico.....	34
Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos empleados para la PCR .....	34
Tabla 7. Determinación del número de ciclos Prueba de ciclos para la amplificación de distintos cDNA .....	35
Tabla 8. Análisis de la expresión de la PPIIc y PPIIt a diferentes días de cultivo.....	38
Tabla 9. Viabilidad celular inicial y rendimiento en la obtención de ARNm de cada cultivo. .....	43
Tabla 10. Dosis respuesta del efecto del Glutamato durante dos horas sobre expresión de ARNm de PPIIc y PPIIt.....	47
Tabla 11. Dosis respuesta del efecto del Glutamato durante dos horas sobre la expresión del ARNm de c-Fos.....	48
Tabla 12. Cinética del efecto del Glutamato 50 $\mu$ M sobre la expresión de los ARNs mensajeros de PPIIc y PPIIt. ....	48
Tabla 13. Efecto de T3 sobre la expresión de los ARNs mensajeros de PPIIc y PPIIt.....	49
Tabla 14. Efecto del tratamiento con el antagonista de glutamato CNQX y del glutamato sobre la expresión de los ARNs mensajeros de PPIIc y PPIIt .....	50



## ABREVIATURAS

- PPII Piroglutamil peptidasa II
- PPIIc Piroglutamil peptidasa II isoforma completa
- PPIIt Piroglutamil peptidasa II isoforma truncada
- DII Desiodasa tipo II
- TRH Hormona Liberadora de Tirotrópina
- CNQX 7-nitro-2,3-dióxido-1,4-dihidroquinoxalina-6-carbonitrilo
- $\alpha$ MSH Hormona estimulante de los melanocitos
- ATP Adenosín trifosfato
- ARC Núcleo arcuato
- AgRP Proteína relacionada con la proteína agouti
- CART Transcrito regulado por anfetamina y cocaína
- EM Eminencia media
- HL Hipotálamo lateral
- HPT Hipotálamo-pituitaria-tiroides
- HT Hormonas tiroideas
- MCH Hormona concentradora de melanina
- PVN Núcleo paraventricular del hipotálamo
- NPY Neuropeptido Y
- NVM Núcleo ventromedial
- POMC Proopiomelocortina
- TSH Hormona estimulante de la tiroides o Tirotrópina
- T3 Triyodotironina

- T4 Tiroxina
- SNC Sistema nervioso central
- CRH Hormona liberadora de corticotropina
- RT-PCR Reacción de transcriptasa reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
- PFA Área perifornical del hipotálamo lateral
- TRHR1 Receptor de TRH tipo I
- CSF Fluido cerebroespinal
- BBB Barrera hematoencefálica
- Ep Ependimocitos ciliados
- MBH Hipotálamo mediobasal
- GLUT 1 Transportador de glucosa I
- GLUT 2 Transportador de glucosa 2
- cDNA Acido desoxirribonucleico complementario
- DMSO Acido desoxirribonucleico complementario

## Resumen

Los tanicitos son células gliales de tipo radial especializadas que se localizan entre otros lugares en las paredes de la porción ventrolateral del tercer ventrículo. Por la localización de los tanicitos  $\beta_2$ , se ha sugerido que es una población celular especializada para controlar el acceso al cerebro de sustancias transportadas por la sangre desde la periferia, quimio-sensora, e implicada en los circuitos neuroendocrinos. Los tanicitos expresan transportadores de hormonas tiroideas, así como la desiodasa II (DII enzima de biotransformación de la tiroxina a triiodotironina), y la ectoenzima degradadora de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), ectoenzima llamada piroglutamil peptidasa II (PPII), receptor para TRH. Estos antecedentes sugieren que los tanicitos son elementos de control del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT) en la eminencia media, mediante la degradación de la TRH liberada de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular (PVN) al sistema porta, regulando así la cantidad de TRH que llega a la adenohipófisis, y de esta forma modular la síntesis y liberación de tirotropina (TSH).

Se sabe que las hormonas tiroideas y la TRH son reguladores positivos de la PPII y que existe un microcircuito recíproco entre tanicitos y terminales de TRH, que implican la participación del glutamato liberado por las neuronas de TRH actuando sobre los tanicitos que liberan endocannabinoides y que actúan sobre las terminales TRHérgicas. Sin embargo, el papel fisiológico del glutamato en este micro-circuito no está completamente determinado. Proponemos que entre otros efectos el glutamato regula a la expresión de la PPII, lo que tendría como consecuencia ajustar la amplitud y/o duración de los pulsos de TRH liberados de la eminencia media. Para probarlo, hemos decidido determinar el efecto del glutamato sobre la expresión de la PPII en cultivos de tanicitos.

En estudios previos, se compararon algunos protocolos para el cultivo de tanicitos y hemos determinado su eficacia para la expresión y actividad de PPII. En general, es difícil obtener cultivos que expresan una actividad de PPII significativa, si bien cultivos sin suero parecen más prometedores.

En este trabajo se realizaron cultivos primarios de células de eminencia media de rata de 10 a 12 días postnatal, sembrándolas en un medio definido, el cual fue suplemento con selenio, vitaminas y putrescina. Se evaluó el efecto de estas nuevas condiciones sobre la calidad morfológica de las células y la expresión de RNAs (determinada por RT-PCR semicuantitativa), observando a 7 días in vitro, células vivas con una morfología similar a la de los tanicitos, las cuales expresaron a las isoformas completa (PPIIc, isoforma activa) y truncada (PPIIt, isoforma inactiva, dominante negativa) de la PPII, así como a receptores a hormonas tiroideas.

Una vez evaluada la calidad de los cultivos y el día de cosecha óptimo (7 días), en un primer lote de experimentos se cambió el medio de cultivo por un medio sin glutamato y se trataron las células con una dosis alta de glutamato (200  $\mu$ M); se cosecharon las células a diferentes tiempos en el rango de 0.5 a 4 h después del inicio del estímulo. Se evaluó posteriormente al tiempo de efecto máximo la dosis-respuesta del efecto. Se continuaron los siguientes cultivos con distintas concentraciones de glutamato (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) a los tiempos de 1h, 2h y 4h. Finalmente se analizó el efecto del compuesto CNQX (20  $\mu$ M) antagonista de los receptores de glutamato de tipo ionotrópico (AMPA, kainato, subtipos que se expresan en tanicitos) en presencia o ausencia de glutamato (50  $\mu$ M) durante 2 horas. Se obtuvo el ARN total y se analizó la expresión de las isoformas completa (PPIIc) y truncada (PPIIt) de la PPII, c-Fos y desiodasa tipo II (D2) comparada a la de controles internos (ciclofilina-A, hipoxantil ribosil fosfotransferasa-HPRT) por RT-PCR.

El glutamato tuvo efectos poco reproducibles, si bien se observaron tendencias a incrementar en la expresión tanto de los ARNm de PPIIc, PPIIt, y de cFos. Sin embargo, los efectos no variaron de acuerdo a las distintas concentraciones de glutamato, pero parecieron incrementarse con el tiempo de incubación para los ARNm de PPIIc y PPIIt. La respuesta al glutamato se vio disminuida con el tratamiento con el antagonista ionotrópico CNQX en el caso de la expresión de DII.

En conclusión, se han obtenido evidencias preliminares que sugieren que los cultivos primarios de células de la eminencia media en medio sin suero contienen tanicitos que responden al glutamato, tendiendo a incrementar la expresión de los ARNs mensajeros de PPII, si bien existen todavía existen limitaciones metodológicas que generan variabilidad en las respuestas, y que tienen que superarse.

## 1. Introducción

### 1.1 Homeostasis energética

El control del apetito, el gasto de energía, y el mantenimiento del balance energético han sido blanco de investigación extensiva durante los últimos años, ya que en todo el mundo la obesidad y la anorexia se presentan con una frecuencia elevada y son precursores de diversas patologías, incluyendo diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares que pueden llevar a la muerte. El "hambre" y la "saciedad" son sensaciones reguladas por circuitos y moléculas señalizadoras con actividad orexigénica o anorexigénica, que respectivamente facilitan e inhiben el comportamiento orientado a la ingesta de alimentos (Ferré *et al.*, 2017). Estos mismos circuitos y moléculas tienen generalmente efectos opuestos sobre el gasto de energía, o sea las moléculas y circuitos orexigénicos disminuyen el gasto de energía, mientras los anorexigénicos lo incrementan.

El equilibrio energético se regula finamente a través de una comunicación bidireccional entre el cerebro y los órganos periféricos. El hipotálamo es un área del cerebro importante en esta regulación. El hipotálamo comprende diferentes núcleos o áreas, en los que se han identificado diferentes poblaciones neuronales que producen péptidos orexigénicos u anorexigénicos. La actividad de estos circuitos neuropeptidérgicos es modulada por señales periféricas, de naturaleza hormonal, o por señales transmitidas por vía neural en las cuales pueden participar ellos mismos (Figura 1; Le Thuc *et al.*, 2017).

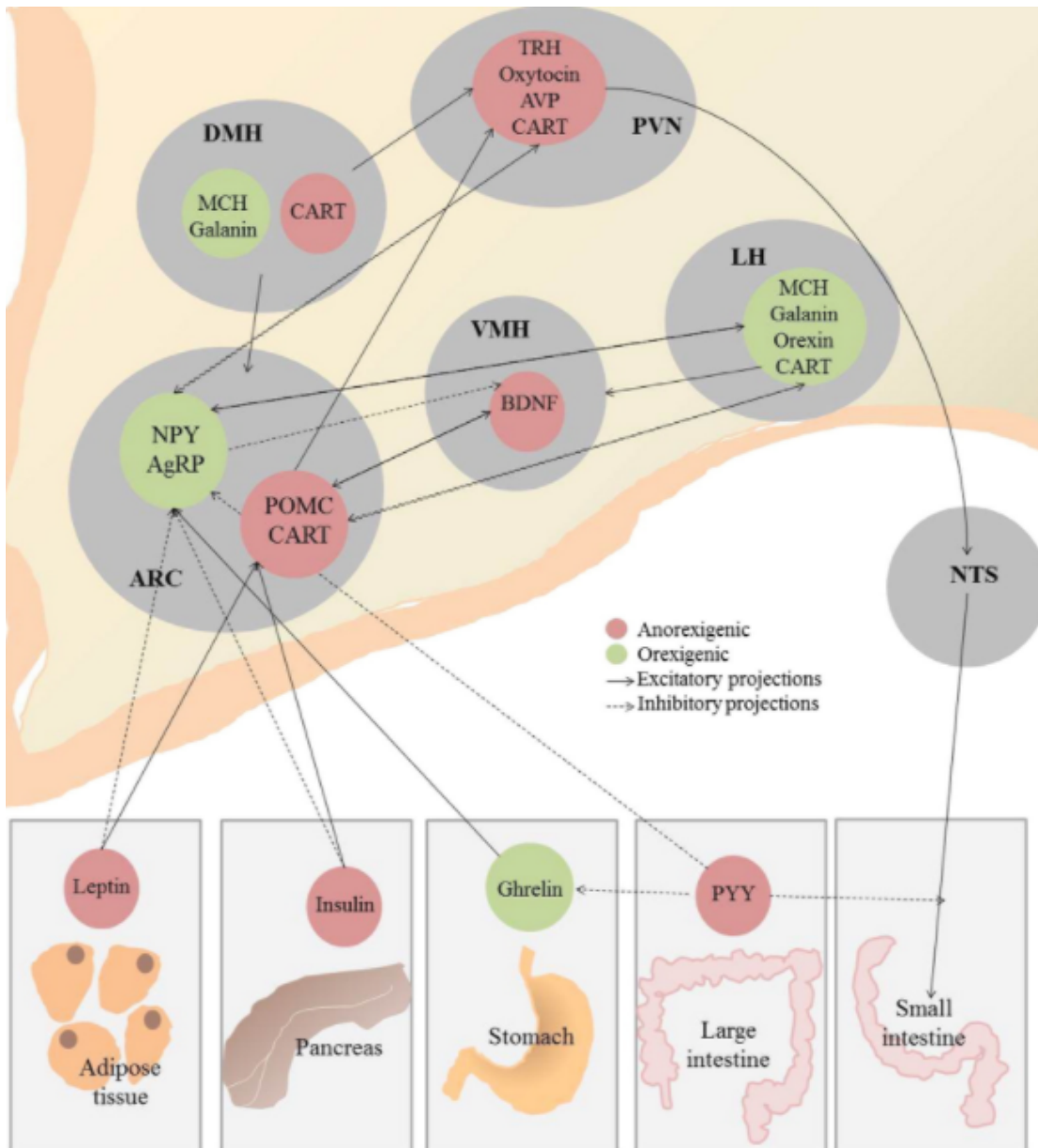


FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS NÚCLEOS EN EL HIPOTÁLAMO QUE CONTRIBUYEN AL CONTROL DEL BALANCE DE ENERGÍA, ASÍ COMO DE SEÑALES METABÓLICAS PRODUCIDAS POR ÓRGANOS DE LA PERIFERIA. (ESQUEMA TOMADA DE FARR *ET AL.*, 2016).

Señales producidas por el tejido adiposo blanco, el páncreas y el tracto gastro-intestinal son censadas por el núcleo arqueado (ARC). El ARC contiene neuronas NPY / AgRP que son orexigénicas y neuronas POMC / CART que son anorexigénicas. Estas neuronas se comunican con otros núcleos hipotalámicos donde se localizan neuronas de segundo orden que liberan otros péptidos con actividad de orexigénicos o anorexigénicos

que a su vez modulan la actividad de otras neuronas que directamente ejercen la acción de ajustar el gasto energético o el consumo de alimento.

## 1.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) es crucial para el mantenimiento de la homeostasis energética; este eje es el principal efector en el mantenimiento de niveles basales de hormonas tiroideas circulantes, que son esenciales para controlar la función biológica de todos los tejidos, incluyendo el desarrollo del cerebro, la regulación de la función cardiovascular, ósea y hepática, la ingesta de alimentos, y el gasto energético, entre muchos otros. Este sistema regulador está coordinado por un grupo de neuronas que residen en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN); estas neuronas producen la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) e integran una amplia variedad de señales humorales y neuronales para regular la actividad del eje HPT (Fekete y Lechan, 2014, Joseph-Bravo *et al.*, 2016). Las neuronas hipofisiotrópicas liberadoras de la TRH integran la información metabólica y controlan la actividad del eje tiroideo. Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas envían proyecciones a la capa externa de la eminencia media (EM), desde donde liberan TRH en los vasos sanguíneos del sistema porta que conectan la EM a la pituitaria anterior. Estas neuronas controlan la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH) por la pituitaria anterior; esta hormona a su vez activa la síntesis y secreción de hormonas tiroideas por la glándula tiroides (Figura 2; Joseph-Bravo *et al.*, 2016). Una de las funciones de las hormonas tiroideas es de promover la homeostasis energética. Se ha observado que uno de los núcleos hipotalámicos más importantes para la regulación del eje es el núcleo ARC, el cual se compone de poblaciones neuronales en clúster que se encargan :1) de inhibir la ingesta de alimentos y de activar el catabolismo de substratos energéticos a través de la síntesis y liberación de péptidos anorexígenicos, como la proopiomelanocortina (POMC), precursor de la hormona estimulante de melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH) y el péptido relacionado a la cocaína y anfetamina (CART), péptidos que inducen la biosíntesis de TRH en el NPV, y 2) de inhibir el gasto energético e inducir la ingesta de alimento a través de péptidos orexígenicos como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado al agoutí (AgRP), péptidos que inhiben la

biosíntesis del TRH en las neuronas del NPV (Schwartz *et al.*, 2000; López *et al.*, 2013; Garfield *et al.*, 2017). Estas neuronas del ARC son reguladas por los niveles de leptina, insulina y ghrelina circulantes. A estas neuronas se les denomina de primer orden, ya que son de las primeras en pensar información metabólica, y proyectan sus terminales hacia neuronas de segundo orden presentes en distintos núcleos hipotalámicos, como el núcleo paraventricular, el área hipotalámica lateral (LHA) y el área perifornical (PFA). El PVN es de gran importancia pues contiene poblaciones neuronales que sintetizan y liberan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), a la oxitocina, a la vasopresina y a la TRH (Schwartz *et al.*, 2000).

Otro elemento importante en la regulación del eje HPT se localiza cercano a las terminales nerviosas de las neuronas TRHérgicas. Recientemente se demostró que rodeando las terminaciones de las neuronas TRHérgicas en la capa externa de la EM se encuentran las extensiones citoplásmicas de un tipo de células gliales llamados tanicitos que expresan a la enzima que inactiva a la TRH (PPII) en el espacio extracelular limitando la acción de la TRH sobre la adenohipófisis.



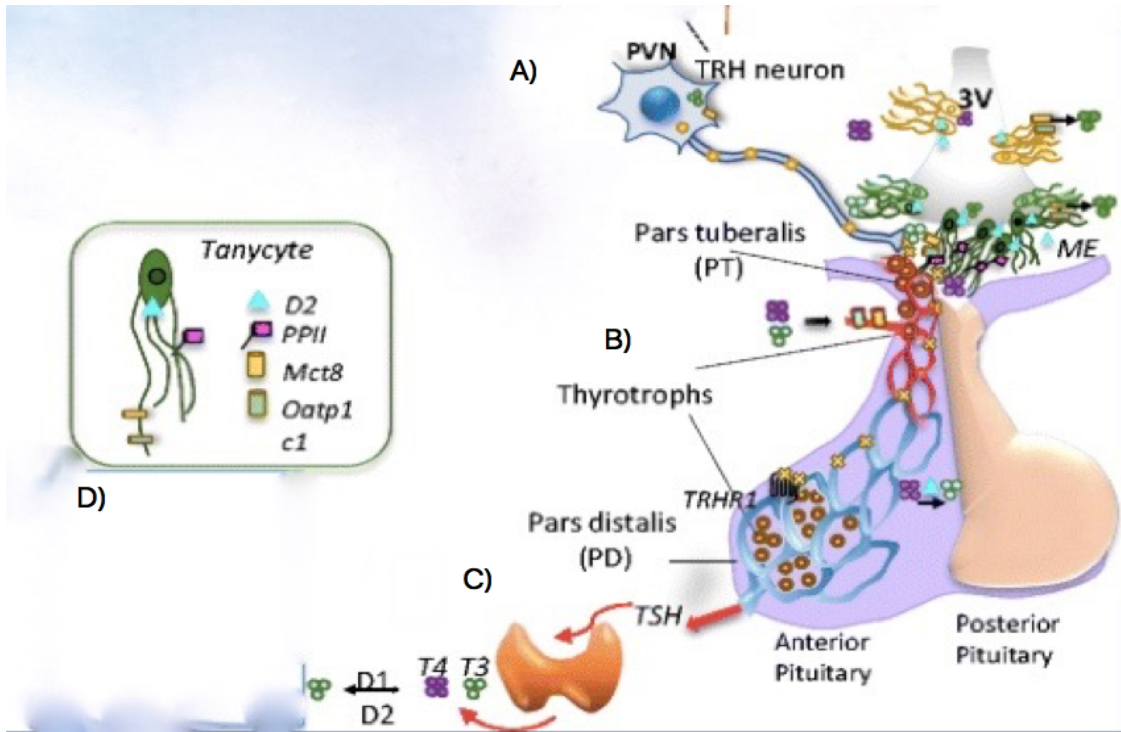


FIGURA 2. REGULACIÓN CENTRAL DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES EN LA RATA,

A. La actividad del eje hipotalámico-pituitario-tiroideo está regulada por las neuronas hipofisiotrópicas TRHérgicas ubicadas en la zona medial y caudal del PVN del hipotálamo. El pro-TRH se internaliza en gránulos secretores, y se procesa a través de varios pasos enzimáticos hacia la TRH biológicamente activa, mientras que los gránulos secretores se transportan a la terminación nerviosa. El tercer ventrículo está revestido con células endimarias y tanicitos; algunos tanicitos  $\alpha$  (amarillo) y tanicitos  $\beta$  (verde) se representan. Las terminales axónicas de neuronas de TRHérgicas entran en contacto con los procesos de los tanicitos  $\beta$ 2 en la eminencia media. Los tanicitos  $\beta$ 2 expresan la piroglutamil peptidasa II (PPII), enzima que degrada específicamente la TRH y regula la cantidad de la TRH transportada, a través de los vasos porta, a la parte distal (PD) de la glándula pituitaria. B. TRH se une al receptor de TRH tipo 1 (TRHR1) en tirotropos y estimula la síntesis y secreción de TSH. C. La PD-TSH actúa sobre la glándula tiroidea estimulando la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, T4 y T3. Las hormonas tiroideas entran en las células a través de transportadores de membrana tales como MCT8 o OATP1C1, y luego son transformadas mediante deiodinasas tipo 1, 2 o 3 (DI, DII, DIII). Los procesos de los tanicitos transportan T4 desde capilares porta y vasos sanguíneos en el núcleo arcuato o desde el fluido cerebroespinal (CSF). La T3 hipotalámica se produce localmente a partir de T4 por acción de DII expresada en tanicitos. Las terminales axónicas de las neuronas TRHérgicas en la eminencia media toman T3, que es transportada al cuerpo de la célula donde inhibe la transcripción de la *Trh*. La expresión de PD-TSH también

está controlada por la retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas. D. Moléculas expresadas en tanicitos (Modificada de Joseph-Bravo *et al.*, 2016).

### 1.3 Los Tanicitos de la Eminencia media y su participación en la regulación del eje HPT

Los tanicitos son células de tipo glía radial que rodean las paredes laterales del hueco infundibular, separando el tercer ventrículo (3V) del tejido cerebral. Los tanicitos se caracterizan por tener un cuerpo pequeño y largas proyecciones, similares a los fibroblastos, mismos que los diferencian de las células ependimales (Goodman y Hajihosseini, 2015). Sus polos apicales contactan con el líquido cefalorraquídeo (LCR), y las extensiones basales se proyectan en varios núcleos periventriculares, incluyendo el ARC, y en la EM (Flament-Durand y Brion, 1985). Estas células expresan elementos reguladores del eje HPT, incluyendo transportadores de hormonas tiroideas, la desiodasa de iodotironinas de tipo 2 (DII) y los receptores de las hormonas tiroideas. Los tanicitos están presentes en órganos circunventriculares como la EM o el órgano vasculoso de la lámina terminalis, zonas caracterizadas por contener células con propiedades proliferativas (Bennett *et al.*, 2009). La EM es una de las ventanas cerebrales de donde los péptidos y monoaminas sintetizados en diferentes núcleos hipotalámicos alcanzan la circulación portal. El cuerpo celular, las dendritas y un segmento largo del axón de estas neuronas se localizan en áreas protegidas por la barrera hematoencefálica (BBB), mientras que el segmento terminal del axón y el terminal propiamente dicho se localizan en un área que carece de BBB. Esto implica una organización compleja del espacio intercelular de esta área, incluyendo la existencia de compartimentos discretos, de modo que la eminencia media se comportaría como un canal, con puertas de entrada y salida. De esta forma, las neurohormonas pueden entrar en la eminencia media mediante el transporte axonal y, una vez liberadas, pueden alcanzar el espacio perivascular, el espacio intercelular de la EM y la sangre portal (Rodríguez *et al.*, 2010). Debido a su posición privilegiada en el hipotálamo, los tanicitos también pueden detectar señales mitogénicas y neurodiferenciadoras presentes en la sangre periférica o en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Robins *et al.*, 2013; Chaker *et al.*, 2016), funcionando como un nicho de células madre persistente en la edad adulta. Se ha postulado que los tanicitos funcionan como células neuromoduladoras, ya que regulan la disponibilidad de hormonas,

como la leptina (Balland *et al.*, 2014) y la ghrelina (Collden *et al.*, 2015), proveniente de los tejidos periféricos hasta las neuronas del ARC. También expresan la maquinaria molecular que permite la detección de la glucosa (García *et al.*, 2003; Cortés-Campos *et al.*, 2011; Orellana *et al.*, 2012) y transmiten señales a neuronas del ARC (Elizondo-Vega *et al.*, 2016).

En la rata, los tanicitos hipotalámicos comienzan a formarse durante los últimos días de gestación (E 19) y durante las dos primeras semanas de vida postnatal. Proviene de la glía radial local, que posiblemente se origina en la misma zona neurogénica ventricular que da origen al hipotálamo (Altman y Bayer, 1978; Goodman y Haijhosseini, 2015). No se aprecia dimorfismo sexual entre tanicitos de ratas hembra y macho, como lo indica Walsh *et al.*, 1978 a los días 1, 5 y 10 (según Miranda-Ángulo *et al.*, 2014). La maduración morfológica y funcional se alcanza durante el primer mes de vida post natal, aunque varía en función del subtipo de tanicitos. Estos se clasifican en cuatro grupos principales en base a diferencias en su localización y expresión génica:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  (Robins *et al.*, 2013),  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Rodríguez *et al.*, 2005) y más recientemente en  $\gamma$  (Wittmann *et al.*, 2017). Los tanicitos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  se localizan en las paredes laterales del 3V y se comunican con neuronas anorexigénicas y orexigénicas a través de sus extensos procesos. Los tanicitos  $\beta 2$  cubren el suelo del 3V, presentan uniones estrechas que forman la barrera LCR-ME, y extienden sus proyecciones dentro de la EM (Figura 3).

Los subtipos de tanicitos expresan diferencialmente moléculas funcionales importantes, tales como transportadores de glucosa y glutamato, una serie de receptores para neuropéptidos y hormonas periféricas, moléculas secretoras (como factores de crecimiento transformante, la prostaglandina E2, y la proteína específica P85), y proteínas de las vías endocíticas. Esto da como resultado diferencias funcionales entre los cuatro subtipos de tanicitos. La DII es una enzima que genera triyodotironina (T3) a partir de tiroxina; en el cerebro se expresa principalmente en los tanicitos, lo que sugiere que estas células son la principal fuente de T3 cerebral. El transportador de glucosa-2 (GLUT-2), un transportador de baja afinidad de glucosa y fructosa, y un canal de  $K^+$  sensible a  $ATP^+$  se expresan en tanicitos, lo que sugiere que pueden detectar las concentraciones de glucosa en LCR (Rodríguez *et al.*, 2005).

Uno de los marcadores que caracterizan a los tanicitos es la proteína “dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa” (DARPP-32). Sus niveles disminuyen hasta un 70% conforme avanza la edad del organismo (Rodríguez et al., 2000; Goodman y Hajihosseini, 2015). Otros marcadores son la vimentina, una proteína del citoesqueleto, el transportador de glucosa GLUT-1, Rax (necesaria para su desarrollo), algunos receptores, factores de crecimiento, etc. En particular, la proteína fibrilar glial ácida (GFAP) o la proteína de unión a calcio S-100 permiten la distinción entre los tanicitos y las células ependimales, mientras que otros como la nestina y la piroglutamil peptidasa II (PPII) permiten una distinción más específica de los tanicitos  $\beta$  (Goodman y Hajihosseini, 2015; Rodríguez et al., 2000) (Tabla 1).

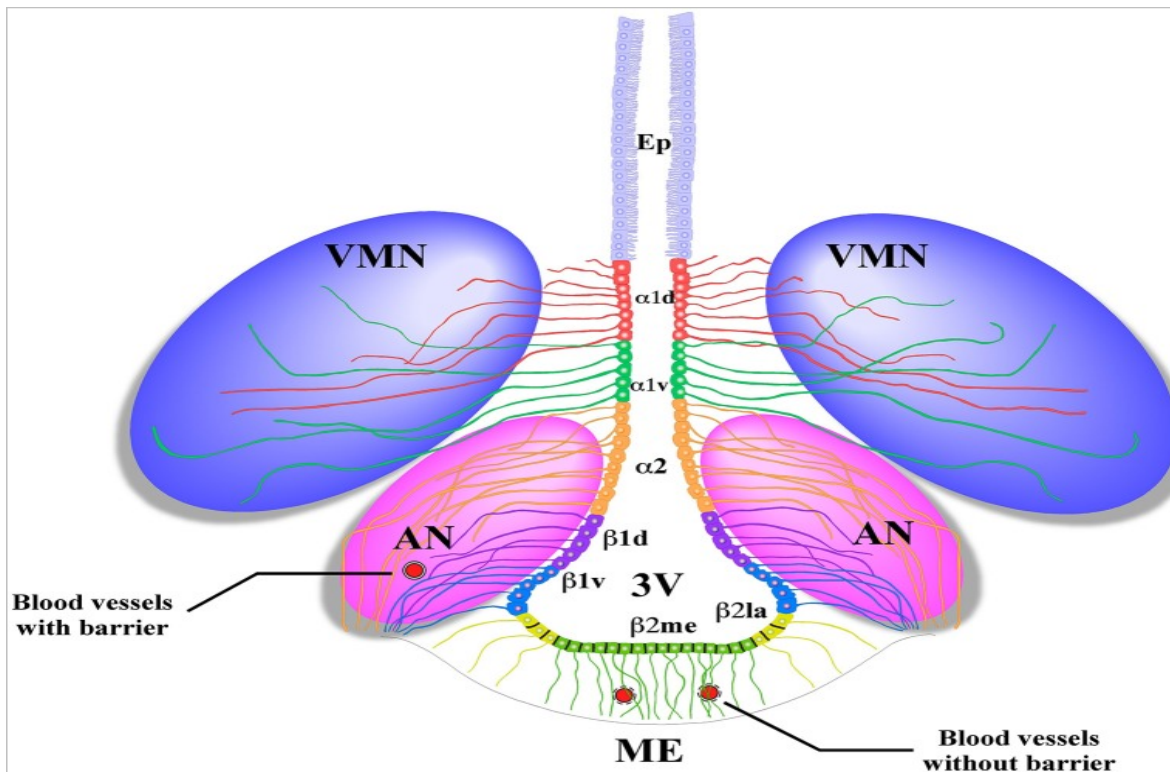


FIGURA 3. ESQUEMA CORONAL DEL HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL.

Las proyecciones largas de los tanicitos  $\alpha 1d$  y  $\alpha 1v$  hacen contacto con las neuronas del núcleo ventro-medial (VMN). Las proyecciones de los tanicitos  $\alpha 2$ ,  $\beta 1d$  y  $\beta 1v$  penetran el núcleo arqueado (AN), haciendo contacto con neuronas orexigénicas, anorexigénicas y vasos sanguíneos. En el suelo del 3V, los tanicitos laterales  $\beta 2$  ( $\beta 2la$ ) y mediales  $\beta 2$  ( $\beta 2me$ ) están unidos por uniones estrechas formando parte de la barrera entre la eminencia mediana (ME) y el líquido cefalorraquídeo; sus proyecciones hacen contacto con los vasos sanguíneos de la ME. Ependimocitos ciliados (Ep) ocupan las paredes dorsales del 3V (Tomado de: Elizondo-Vega *et al.*, 2015).

**Tabla 1. Genes expresados en tanicitos y células ependimales.**

Gene/Marker	$\beta$ tanicytes	$\alpha$ tanicytes	Ependymal cells	Parenchymal cells	Reference/s	CreERT2 source
Sox2					Haan et al., 2013	Jackson Laboratories
Vimentin					Allen Brain Atlas	
GLUT1					Peruzzo et al., 2000; Allen Brain Atlas	
Fgf Receptor 1					Allen Brain Atlas	
Fgf Receptor 2					Belluardo et al., 1997	
BLBP					Haan et al., 2013	
CNTFR					Kokoeva et al., 2005	
Fgf10					Hajihosseini et al., 2008	Haan et al., 2013
Nestin					Wei et al., 2002; Bennett et al., 2009	Jackson Laboratories
GPR50					Batailler et al., 2012; Salvatierra et al., 2014	
DARPP-32					Fekete et al., 2000	
UGS148					Ma et al., 2015	
PPII					Sanchez et al., 2009	
CRBPI					Helfer et al., 2012; Shearer et al., 2010	
Rax					Miranda-Angulo et al., 2014	Jackson Laboratories
Stra6					Shearer et al., 2010	
DIO2					Tu et al., 1997; Guadano-Ferraz et al., 1997	
Foxj1					Salvatierra et al., 2014	Jackson Laboratories

Expresión de genes en tanicitos de la EM, y otras células cercanas; la expresión de varios genes cambia posiblemente de acuerdo a las zonas de transición de los dominios celulares (Tomada y modificada de Goodman and Hajihosseini, 2015).

Una de las funciones de los tanicitos es el control del eje HPT, contribuyendo a la retroalimentación negativa por hormonas tiroideas, así como a las respuestas del eje a alteraciones en el balance energético y otros estímulos. Las terminales nerviosas que contienen TRH se concentran en la capa externa de la eminencia media, a proximidad de las extensiones citoplasmáticas de los tanicitos  $\beta$ 2, y de los capilares del sistema porta hipotálamo-hipófisis. Ambos tipos de tanicitos  $\alpha$  y  $\beta$  expresan enzimas involucradas en la regulación del eje HPT. Una de estas enzimas es la DII, que convierte T4 en T3. Otra es la ectoenzima degradadora de la TRH o PPII (Sánchez *et al.*, 2009).

#### 1.4 Piroglutamil peptidasa II en los tanicitos y su participación en el control de la actividad del eje tiroideo

Como se muestra en la tabla 1, la enzima piroglutamil peptidasa II es un marcador de los tanicitos, más específicamente de los tanicitos  $\beta 2$ . Es una ectoenzima que hidroliza específicamente el enlace peptídico piroglutamil-histidilo de la TRH; cuenta con 1025 aminoácidos (Schauder *et al.*, 1994); su estructura primaria está compuesta por un dominio N-terminal intracelular, una región trans-membranal y un dominio C-terminal extracelular que contiene motivos de exopeptidasa y catalíticos que permiten la hidrólisis de la TRH. La PPII se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central, con niveles bajos en la hipófisis y algunos otros órganos (Friedman y Wilk, 1986; Vargas *et al.*, 1992). Es un miembro de la familia M1 de las metaloproteasas; de acuerdo con datos bioquímicos es una ectopeptidasa dependiente de zinc (Charli *et al.*, 1988; Czekay y Bauer, 1993). La expresión de PPII en los tanicitos  $\beta 2$ , incluyendo en sus extensiones citoplasmáticas en la eminencia media, sugiere que la proteína se localiza en la superficie celular, cerca de terminales TRHérgicas, por lo que sería capaz de degradar a la TRH liberada en el espacio intercelular de la eminencia media (Heuer *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2009). Consistente con esta hipótesis, la actividad específica de PPII es relativamente alta en la EM y la inhibición de la actividad de PPII aumenta la recuperación de TRH en el medio extracelular de la eminencia media incubada *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2009). Esta enzima tiene una isoforma más corta que carece de una parte del dominio C-terminal, la cual se conoce como PPII troncada (PPII\*) lo cual es inactiva y es producida a partir del mismo mRNA primario que la PPIIc activa, por medio de un procesamiento alternativo (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005). Se sugiere que dicha isoforma juegue un papel en la regulación de la actividad de la PPII completa ya que es dominante-negativa y reduce de manera dosis-dependiente la actividad de la PPII completa (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005).

Se ha analizado la relación espacial en la eminencia media entre las terminaciones de los procesos de los tanicitos  $\beta 2$  (en donde se sabe que se expresa la PPII), y las terminales de los axones de las neuronas que expresan TRH. Éstos dos tipos de células tienen elementos celulares que colocalizan en la zona de transición de la eminencia media y la entrada al

sistema porta, en donde se encuentran los capilares portales (Sánchez *et al.*, 2009). En este trabajo también se demostró que existe una regulación positiva de la expresión y actividad de la PPII por parte de la hormona tiroidea T3, así como una amplificación del incremento de los niveles de TSH circulante al inyectar por vía intraperitoneal un inhibidor de la PPII en animales expuestos a un estímulo que incrementa la actividad de las neuronas de TRH (por ejemplo, en exposición de animales a una disminución de la temperatura ambiente).

El eje HPT se regula tanto en respuesta a cambios en los niveles de hormonas tiroideas, como en situaciones de variación de la demanda energética, como ocurre durante el ayuno, estrés crónico, o inflamación (Fekete y Lechan, 2014; Joseph-Bravo *et al.*, 2015). En un modelo experimental que produce una disminución de la actividad del eje HPT, el ayuno prolongado, se observa que la PPII es regulada positivamente, lo que sugiere que participa así en la disminución de la cantidad de TRH entrante al sistema porta, y por lo tanto regula negativamente al eje HPT (Figura 4; Lazcano *et al.*, 2015). En conjunto estos datos sugieren claramente que la PPII en los tanicitos  $\beta 2$  de la eminencia media contribuye significativamente al control del eje HPT, al hidrolizar la TRH secretada al medio extracelular de la eminencia media, previo a su entrada a los capilares portales (Figura 5). En la eminencia media, se ha demostrado que las hormonas tiroideas y la TRH son señales extracelulares que controlan la expresión y actividad de la PPII en los tanicitos.



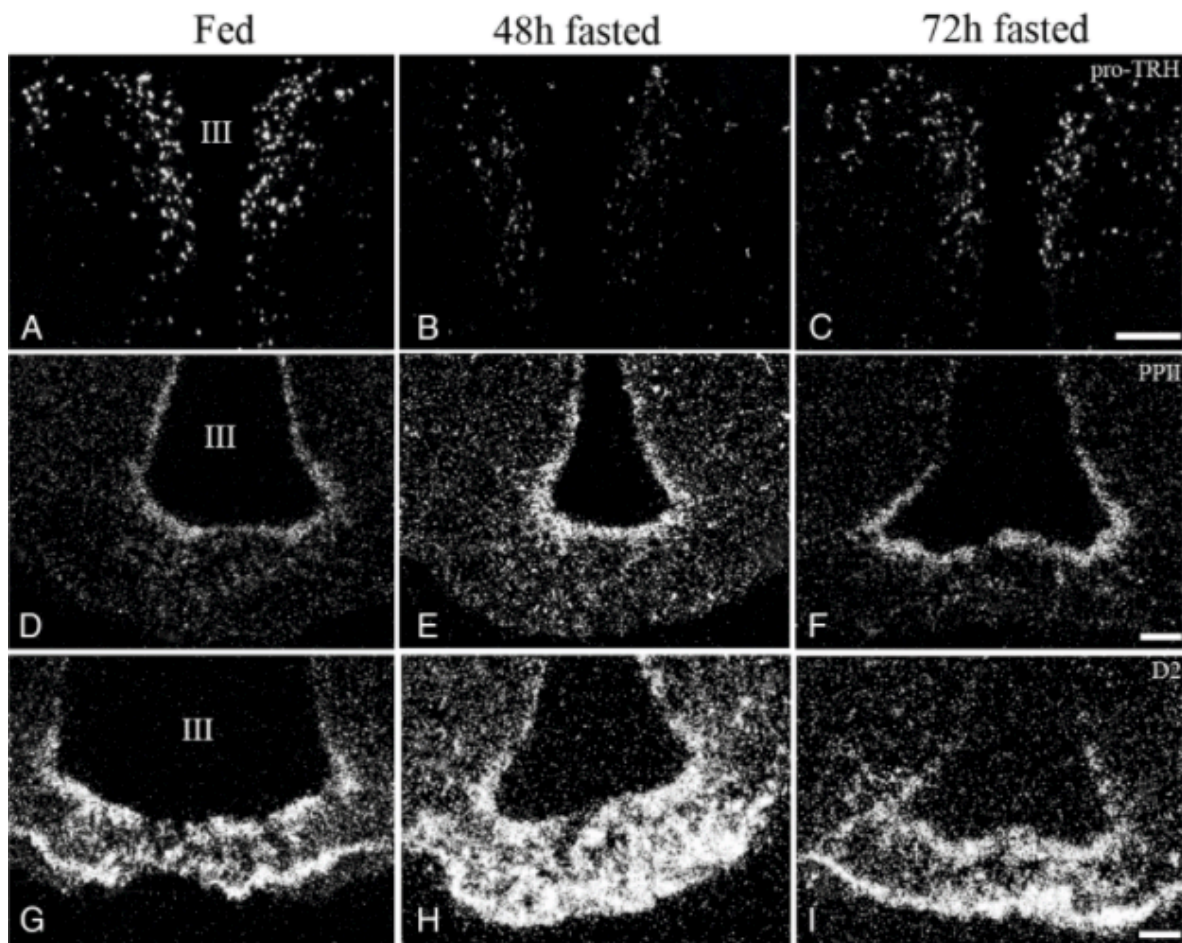


FIGURA 4. EFECTO DEL AYUNO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS MRNAS DE PRO-TRH, DII Y PPII.

A-C Fotomicrografías de cortes coronales del PVN medial hibridadas con una sonda antisentido para el mRNA de pro-TRH, D-F fotomicrografías de cortes coronales del hipotálamo medio basal (MBH) hibridadas con una sonda antisentido para el mRNA de PPII, G-I Fotomicrografías de cortes coronales de MBH hibridadas con una sonda antisentido para el mRNA de DII. A, D, G: ratas control, alimentadas ad libitum; B, E, H: ratas sometidas a 48 horas de ayuno; C, F, I: ratas sometidas a 72 horas de ayuno (Tomado de Lazcano *et al.*, 2015).

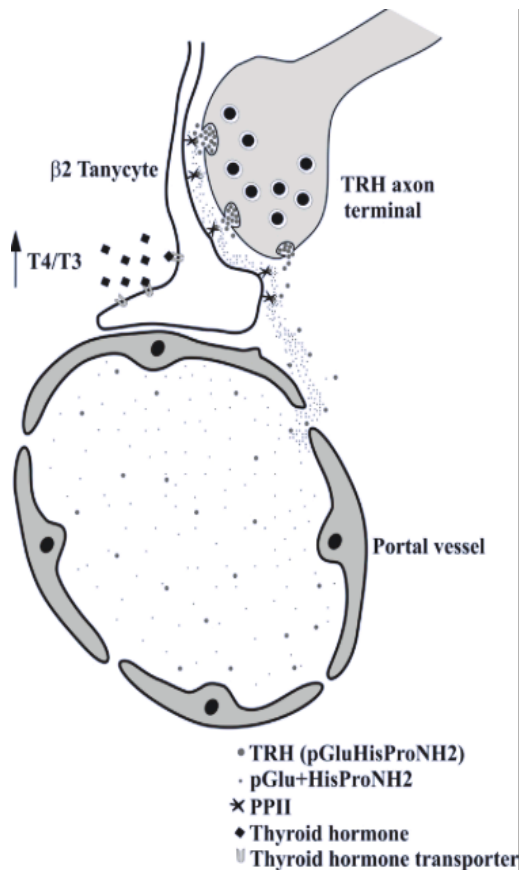


FIGURA 5. MECANISMO PROPUESTO PARA EL PAPEL DE LA PPII EN LOS TANICITOS B2 DE LA EMINENCIA MEDIA.

Una vez liberada de las terminales axónicas, la TRH es degradada por la PPII expresada por los tanicitos, en el espacio perivascular, reduciendo la cantidad de TRH activa transportada en el sistema porta y, en consecuencia, la secreción de TSH. En respuesta a niveles circulantes elevados de hormonas tiroideas, el transporte activo de T4 (o T3) en tanicitos por transportadores de hormona tiroidea y la conversión de T4 a T3 en el citoplasma de los tanicitos por la Desiodasa tipo II provoca un aumento de la actividad de PPII en tanicitos, lo que contribuye a la retroalimentación negativa (Sánchez *et al.*, 2009).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Expresión y actividad de la PPII en cultivos de células de la eminencia media

Con el propósito de estudiar la regulación de la expresión y actividad de la PPII en los tanicitos, en el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular y Celular del IBt-UNAM, se ha trabajado en el establecimiento de condiciones adecuadas para el cultivo primario de tanicitos de rata que promueven la expresión de la PPII. Para la realización de los cultivos se disecó la eminencia media (estructura enriquecida de los tanicitos  $\beta 2$ ) de ratas de 10 días de edad. La edad de los animales de los cuales se obtuvo el tejido para los cultivos se basó en estudios previos (Chauvet *et al.* 1996; Prevot *et al.* 2003) y parecía ser un aspecto crítico del procedimiento. En cultivos primarios en medio con suero, no se logró detectar actividad para la PPII (Urrieta Chávez 2017), por lo que se intentó posteriormente establecer cultivos sin suero. Las primeras pruebas se enfocaron en determinar las condiciones óptimas para la

disgregación enzimática, para tener un mejor rendimiento y viabilidad celular. Se probaron tres enzimas proteolíticas (tripsina [0.25mg/ml], colagenasa y papaína [20 UI/ml Sigma #P4762]), determinándose que la papaína fue la mejor, ya que en los cultivos en los cuales se utilizó tripsina y colagenasa para disociar los tejidos no pudo detectarse la actividad enzimática de la PPII, posiblemente por daños a la membrana celular, lo que generó la muerte de una proporción importante de células; mientras que en los cultivos en los que se utilizó papaína como agente de disociación se logró detectar la actividad enzimática de la PPII. Las células disgregadas con papaína se cultivaron en medio definido (DMEM/F-12) sin suero, adicionado con antibióticos, insulina (3.3 µg/ml), BSA (50 µg/ml), transferrina (10 µg/ml), HEPES (200 mM) y trombina (0.1 UI/ml), en placas tratadas con poli-D-lisina, esencialmente de acuerdo al método de DeFrancesco et al, 2017. Se determinó la identidad de las células por medio de inmunofluorescencia contra tres marcadores representativos de tanicitos: vimentina, nestina y DARPP-32. Dichas inmunodetecciones demostraron que, en estos cultivos, aproximadamente el 7% de la población celular son tanicitos. Se logró determinar la actividad de la PPII en los extractos celulares provenientes de los cultivos mediante ensayos fluorimétricos utilizando TRH-β-naftilamina como sustrato. Se pudo además observar que la expresión de la PPIIc aumentó después de la estimulación con T3 por 24 horas (Barajas, en proceso).

## **2.2 Efecto de la comunicación glutamatérgica, y TRHérgica en la eminencia media sobre la actividad de los tanicitos y la PPII**

En la zona externa de la eminencia media, los procesos de los tanicitos β2 se entremezclan estrechamente con los terminales axónicos de las neuronas hipofisiotrópicas que liberan la TRH, procesos que están adyacentes a los capilares de la circulación portal hipofisaria. Como se mencionó anteriormente, en este compartimiento muy complejo, se han identificado recientemente varias interacciones intercelulares adicionales que parecen importantes para el control del eje HPT.





Como para muchas otras neuronas, existe evidencia que sugiere que las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas usan neurotransmisores adicionales a la TRH. Así se ha mostrado que expresan el transportador vesicular tipo 2 del glutamato (Hrabovszky *et al.*, 2005), un

marcador de las neuronas que usan el glutamato como neurotransmisor. Por lo tanto, es probable que cuando se activan las neuronas TRHérgicas haya una co-liberación de la TRH y del glutamato en la eminencia media. Recientemente, se mostró que in vitro el glutamato incrementa el potencial de membrana de los tanicitos (Farkas *et al.*, 2017), lo que sugiere que la actividad de los tanicitos está controlada por la actividad de las neuronas glutamatérgicas, incluyendo las TRHérgicas. Sin embargo, no se ha aclarado la consecuencia funcional del efecto del glutamato sobre el potencial de membrana en los tanicitos.

En el trabajo de Campbell *et al.*, 2017, los autores usaron Drop-seq para catalogar sistemáticamente los diferentes tipos de células de la región ARC-EM y sus alrededores, identificando 34 poblaciones neuronales distintas (24 de ARC-EM) y 36 poblaciones no neuronales (26 de ARC-EM) a partir de 20,921 perfiles celulares individuales. De esta manera determinaron marcadores específicos que se pueden usar tanto para identificar tipos de células como para investigar su función. Entre sus hallazgos, se encontraron algunos receptores del glutamato en la EM, y en particular en los tanicitos; dentro de estos se detectaron las subunidades de los receptores ionotrópicos de tipo AMPA y kainato (Tabla 2; Campbell *et al.*, 2017).

Receptor de glutamato								
Glutamate Metabotropic Receptor	<i>Grm1</i>	<i>Grm2</i>	<i>Grm3</i>	<i>Grm4</i>	<i>Grm5</i>	<i>Grm6</i>	<i>Grm7</i>	<i>Grm8</i>
Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit	<i>Gria1</i>	<i>Gria2</i>	<i>Gria3</i>	<i>Gria4</i>				
Glutamate Ionotropic Receptor Delta Type Subunit	<i>Grid1</i>	<i>Grid2</i>						
Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit	<i>Grik1</i>	<i>Grik2</i>	<i>Grik3</i>	<i>Grik4</i>	<i>Grik5</i>			
Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	<i>Grin2c</i>	<i>Grin2d</i>	<i>Grin3a</i>	<i>Grin3b</i>	

	Abundancia relativa definida en tunicitos
	Abundancia relativa en tunicitos dudosa
	Abundancia relativa nula en tunicitos
	No se incluyó en el estudio

**Tabla 2. Receptores de glutamato presentes en los tunicitos.**

Tabla generada por M en C. Adair Rodríguez, a partir de datos de Campbell *et al.*, 2017.

Por otro lado, se ha demostrado que los tunicitos expresan el receptor TRH-R1, un receptor acoplado a proteína Gq/11, que el TRH incrementa la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> y la actividad de la PPII, y que in vivo el bloqueo de la comunicación por Gq/11 en los tunicitos incrementa la respuesta del eje HPT a la activación de las neuronas TRHergicas (Müller-Fielitz *et al.*, 2017). Por lo tanto, ambos co-transmisores (TRH y glutamato) pueden tener efectos locales sobre la función de los tunicitos, con consecuencias importantes para el eje HPT en el caso del efecto de la TRH.

### **3. Justificación**

Los antecedentes indican que los tanicitos son biosensores para la detección rápida de hormonas y de transmisores, y que participan en el control del eje HPT a través de la biotransformación de T4 hacia T3, la expresión de la enzima PPII, y la secreción de mensajeros que regulan la liberación de la TRH. El modelo de trabajo actual propone que mediante un proceso post-secreción la PPII de tanicitos regula la cantidad de TRH que entra a los vasos portales hipotálamo-hipófisiarios, lo que sitúa a estas células como elementos de control del eje HPT mediante la degradación de la TRH proveniente de las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular, regulando así la cantidad que llega a la adenohipófisis, y de esta forma la síntesis y secreción de TSH. Es por lo tanto importante identificar los reguladores de la actividad de la PPII en los tanicitos, ya que tendrán un impacto sobre la actividad del eje HPT. Se sabe que las hormonas tiroideas y la TRH son reguladores de la PPII, y que existe un microcircuito recíproco entre tanicitos y terminales de TRH que implica el glutamato actuando sobre los tanicitos y éstos a su vez actuando sobre las terminales TRHérgicas. El papel fisiológico del glutamato en este micro-circuito no ha sido claramente demostrado.

### **4. Hipótesis**

El glutamato actúa de manera coordinada con la TRH, incrementando la expresión y actividad de la PPII por los tanicitos de la eminencia media, lo que contribuye al control de la secreción pulsátil de TRH en la eminencia media.

### **5. Objetivo General**

Determinar el efecto del glutamato sobre la expresión y/o actividad de la PPII de tanicitos y explorar los mecanismos de transducción

## 5.1 Objetivos particulares

1. Mejorar los cultivos de células de eminencia media en medio definido para obtener células viables, morfológicamente similares a tanicitos, y que expresen marcadores de tanicitos y PPII
2. Determinar el efecto de una dosis alta de glutamato sobre la expresión de PPII; definir la cinética del efecto.
3. Determinar la relación dosis-respuesta de efecto del glutamato sobre la expresión de la PPII
4. Identificar farmacológicamente el o los receptores de glutamato involucrados

## 6. Estrategia experimental

Se realizaron cultivos primarios de células de eminencia media incubados con un medio definido previamente utilizado en el laboratorio de Neurobiología del IBt, el cual fue suplemento con selenio, un suplemento esencial para cultivos en los que se pretende favorecer la expresión de metaloproteasas (Saïto *et al.*, 2002), y que es cofactor de enzimas que contribuyen a la protección ante el estrés oxidativo (Villette *et al.*, 1998), vitaminas y putrescina, con el propósito de reproducir perfectamente las condiciones descritas en DeFrancesco *et al.*, 2017. Se evaluó el efecto del medio sobre la calidad morfológica de las células y el tiempo óptimo para la cosecha. Comparamos las condiciones establecidas (7 días *in vitro*) con tiempos de cultivo mayores (10 y 14 días). Se observó el estado morfológico a lo largo del cultivo por microscopía de contraste de fases. Una vez definidos la calidad y el día de cosecha óptimos en los cultivos, se prosiguió a realizar cultivos en las condiciones óptimas que fueron tratados con glutamato. Se obtuvo el ARN total y se analizó la expresión de PPIIc y PPIIt comparada a la de controles internos (ciclofilina A-CYC, hipoxantil ribosil fosfotransferasa-HPRT) por RT-PCR. Se usó como control positivo de la presencia de tanicitos en cultivo la detección del ARNm de la DII, además empleamos al ARNm de c-Fos como un marcador de respuesta temprana al tratamiento de glutamato. Se evaluó la dosis-respuesta del efecto de tratamiento con glutamato. En otro lote de experimentos se trataron las células de los cultivos enriquecidos en tanicitos, con una dosis alta de glutamato y se

cosecharan las células a diferentes tiempos en el rango de 0.5 a 4 h después del inicio del estímulo. A una dosis de glutamato que produjo un efecto significativo, se analizó el efecto de la co-incubación con el CNQX, un antagonista de los receptores de glutamato de tipo ionotrópico (AMPA/kainato, subtipos que se expresan en tunicitos). En cada cultivo se utilizó en general un par de pozos por condición y los tratamientos se repitieron en 3 cultivos independientes.

## **7. Metodología**

### **7.1 Cultivo Primario**

Se utilizaron ratas de 10 a 12 días postnatal de acuerdo a un protocolo autorizado por la comisión de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se disecó la eminencia media (región donde se encuentran los tunicitos  $\beta 2$ ). Los cerebros de ratas se extrajeron del cráneo, se limpiaron con solución Hanks y se colocaron en su cara dorsal para la extracción de la eminencia utilizando pinzas de punta fina. Los cultivos se realizaron a partir del protocolo basado en la publicación de DeFrancesco et al, 2017 e inicialmente utilizado en el laboratorio durante el desarrollo de la tesis del Biólogo Abraham Barajas. Se empleó un medio definido (llamado MD-DMEM-F12) desde el inicio del cultivo, al cual se le adicionó putrescina, vitaminas y selenio al día 0, y trombina al tercer día (Tabla 3). Las células se colocaron en placas multipozos de 1.9 cm de diámetro sembrando aproximadamente 2 a 2.5  $\times 10^6$  EM por pozo. Se hizo cambio parcial del medio de cultivo cada tercer día hasta el día de la cosecha; las células se mantuvieron a 37 °C, 50% CO<sub>2</sub> y 100 % humedad.



Medio y Suplementos	Concentración final
DMEM-F12 (Gibco #31600-034, #21700-075)	1 X
Antibióticos (Invitrogen #15420-096)	0.5 X
Insulina (Sigma #16634)	3.3 µg/ml
BSA (Hyclone #SH3057401)	50 µg/ml
Transferrina* (Calbiochem #616420)	10 µg/ml
Trombina (Sigma #T4393)	0.1 UI/ml
Putrescina	3.5 µM
Vitaminas marca	1 X
Selenio	10 nM
HEPES (Sigma #T4393)	200 mM

**Tabla 3. Medio y suplementos empleados para el medio de cultivo MD-DMEM-F12.**

\* Adicionado al tercer día del cultivo

Inicialmente, se compararon cultivos cosechados a los días 7 (protocolo estándar), 10 y 14 días in vitro, ya que observaciones preliminares sugieren un incremento en la calidad del cultivo con mayor tiempo in vitro. Esta comparación se evaluó de acuerdo a la calidad morfológica (microscopia de contraste de fases), a la expresión de PPII y de otros marcadores de tanicitos (RT-PCR de punto final).

## 7.2 Estimulación con Glutamato y/o CNQX

Para el tratamiento de las células con glutamato y/o CNQX al día 7, se preparó medio DMEM suplementado (llamado MD-DMEM) con la finalidad de tener un medio control sin glutamato para el tratamiento. A este medio se añadió glutamato a una concentración de 50 µM, 100 µM o 200 µM, de acuerdo al estímulo realizado en cada experimento.. El medio se precalentó sin glutamato y se añadió glutamato a 37 °C. Se hizo un reemplazo total del MD-DMEM-F12 por 500 µl de MD-DMEM con o sin glutamato y las células se regresaron con mucho cuidado a la incubadora (a 37 °C, 55% CO<sub>2</sub>) y la incubación se realizó durante 1,2 o

4 horas . . Transcurrido el tiempo de tratamiento, retiramos con mucho cuidado todo el medio y lavamos la caja con 500  $\mu$ l de PBS precalentado a 37 °C. Retiramos todo el PBS y congelamos en hielo seco. Guardamos las cajas a -70 °C hasta el día de la extracción del ARN total. Para determinar el efecto del antagonista CNQX sobre la estimulación del glutamato, las células se pre incubaron por 15 min con CNQX 20  $\mu$ M disuelto en DMSO y posteriormente se adicionó el glutamato 50  $\mu$ M y se continuó el tratamiento durante 2 horas. A los pozos controles se les adicionó la misma cantidad de DMSO que al grupo tratado.

### 7.3 Extracción del RNA

Las células se procesaron de tal manera que el material de 2 pozos se combinó para tener una sola muestra de la cual se obtuvo el ARN total. Para la extracción se agregó a cada pozo 200  $\mu$ l de solución D (compuesta por Tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 2.5 mM pH 7.0, sarcosyl 0.5%, mercaptoetanol 0.1 M). Dado que la solución D se prepara sin adicionar  $\beta$  mercaptoetanol, al momento de utilizarla se agregó por cada ml de solución 7.2  $\mu$ l de  $\beta$  mercaptoetanol. Una vez raspadas las células con la solución D, se colectó el homogenado celular y se colocó en un tubo de microcentrífuga, se le agregó entonces el acetato de sodio 2M pH 4.0 (1/10 vol) y se mezcló vigorosamente por vórtex 35s. Posteriormente se agregaron 350 $\mu$ l de fenol saturado en agua y 0.2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, tras lo cual se agitó violentamente con vórtex durante un minuto. La muestra debe entonces tomar un aspecto lechoso. Se dejó reposar 15 min sobre hielo y después se centrifugaron las muestras 20 min a 10 000 rpm a 4 °C (Hettich® MIKRO 200/200R centrifuge). Una vez el tiempo transcurrido, se retiraron con cuidado los tubos de la centrífuga para evitar que las fases se mezclaran y se colocaron las muestras sobre hielo y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, teniendo cuidado de no hacer contacto con el menisco de la interfase. A esta fase se les agregó 1½ porciones del volumen inicial de isopropanol frío, se mezclaron por vórtex 30s (rápidos) y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Tras este tiempo se sacaron las muestras del congelador (siempre sobre hielo) y se

centrifugaron 30 min a 13500 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por decantación eliminando los restos sobre una gaza estéril. Enseguida se agregaron 500 µl de etanol 70% frío enjuagando todas las paredes y se dejó reposar 5 min sobre hielo. Se centrifugó entonces a 13500 rpm a 4 °C por 19 min y se decantó nuevamente el etanol. Para asegurarnos de que se elimine todo el etanol se centrifugó unos segundos el tubo, se eliminó el resto con la micropipeta, y se dejó secar el resto por evaporación (5 min). En ese momento o al día siguiente (si se deja, guardar a -70 °C), el botón de RNA total se resuspendió en 20 µl de agua libre de ARNsas (agua grado milli Q tratada con dietil pirocarbonato, inhibidor de ARNsas 0.1%, posteriormente el agua se esterilizó para eliminar el dietil pirocarbonato) y se mezcló suavemente por vórtex 3 veces por 30 segundos rápidos.

Para determinar la cantidad de ARN total obtenida, y su pureza, se leyó la absorbancia de una alícuota de las muestras a 230, 280 y 260 nm, cuyo valor permite cuantificar sales, proteínas y ARN, respectivamente. Cuando las relaciones 260/230 y 260/280 fueron superiores a 1.6 se consideraron adecuadas para la determinación de la cantidad de ARNs mensajeros específicos. Posteriormente se realizaron alícuotas de 1 µg de ARN en un volumen final de 12 µl de agua libre de ARNsas.

#### 7.4 Optimización de la determinación de ARNs mensajeros por RT-PCR

En la síntesis de cADN de cada una de las muestras empleamos de 1 o 1.5 µg de ARN total, los que se ajustan a un volumen de 15 µl. La cantidad de ARN obtenida de cada muestra se calcula según la fórmula  $[C] = \frac{DO.FD.40}{1000}$ , en donde [C] es la concentración de nucleicos en ng, DO corresponde a la densidad óptica determinada a 260 nm (considerando que 1 unidad de DO a 260 nm corresponde a una concentración de nucleicos de 40 µg/ml), y FD es el factor de dilución empleado. Las reacciones de transcripción reversa (RT) se realizaron en 30 µl volumen final. La mezcla se preparó sobre hielo según el orden y cantidades descritas en la tabla 4.

#### **Tabla 4. Mezcla de reacción para RT**

	Para 30 µl de la reacción	[C] Final
H <sub>2</sub> O/DEPC	3.9 µl	-
Buffer first strand	6 µl	1 X
DTT	3 µl	0.1 M stock????
Oligo dT	1 µl	0.5 µg/µl
Mezcla de dNTPs	0.6 µl	10 mM/µl
Enzima RVT transcriptasa reversa (Invitrogen #28025-013 )	0.5 µl	200 U/µl
ARN	10 -11 µl	1 µg/30 µl

\*la enzima se agrega al final

Se pre-incubaron las muestras de 1 a 1.5 µg de ARN 5 min a 65 °C con el fin de eliminar la formación de estructuras secundarias del ARN, se dejaron reposar 5 min en hielo y seguido a esto se agregaron los 15 µl de la mezcla de reacción Se dejó incubando la reacción 2 h a 37 °C. Después de este tiempo se guardaron las muestras a -20 °C .

La mezcla de reacción para la PCR se hace siempre sobre hielo y en un orden específico indicado en la Tabla 5.

**Tabla 5. Mezcla de reacción en cadena de la polimerasa**

	Volumen en µl para 50 µl de la reacción	[C] Final
H <sub>2</sub> O/DEPC	33-36	
Buffer de Taq Pol (BioTecMol #AP004)	1	1 X
MgCl (BioTecMol #MP004)	2.5	1.5 mM
Oligo Sentido	1	25 pmol/µl
Oligo Antisentido	1	25 pmol/µl
dNTPs	1	10 mM/ µl
Taq polimerasa	0.5	2.5 U/µl
Muestra (cDNA)	3-6	0.2- 0.3 µg

Muestra el orden de la preparación de cada reacción para la semicuantificación de cada uno de los diferentes ARNs mensajeros. El volumen de  $H_2O$ /DEPC varía dependiendo de la concentración utilizada de muestra de cADN. En el caso de la semicuantificación del ARNm de ciclofilina y HRPT la cantidad de picomoles empleada fue de 50.

	Oligonucleótido sentido y Tm	Oligonucleótido anti sentido
DII	5'GAT GCT CCC AAT TCC AGT GT3' 65 °C	5AGG CTG GCAGTT GCC TAG TA3'
PPIIc	5'CTG GAT CGC ATA CAA AAA 3' 65 °C	5'GGA CAC CCA AAT AAT TGC T3'
PPII*	5'GTG CAGGCC TGA TTG ATG ATG 3' 65 °C	5'TCA GTG TGT GCA TTC ACA CAG3'
Ciclofilina	5'GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA3' 64 °C	5'GGC TGG ATG GCA AGC ATG T 3'
C-Fos	5'CCC GTA GAC CTA GGG AGG AC3'65 °C	5'CAA TAC ACT CCA TGC GGT TG3'

**Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR**

La mezcla de todos los reactivos para realizar la reacción de la PCR, sin muestra (cDNA), se centrifugó unos segundos y se mezcló suavemente por vórtex. Tras distribuir la mezcla en tubos para PCR se agregó la muestra. A continuación, se colocaron en el termociclador (Eppendorf mastercycler gradient), en el cual llevó a cabo la reacción. El programa de amplificación se seleccionó según el cDNA por amplificar, tomando en cuenta el tiempo de desnaturalización de la doble hebra (a 95 °C ), el alineamiento de los oligonucleótidos (Tm), la temperatura para la síntesis del amplificado (72 °C ) y un tiempo de ciclo final, con 10 min de recuperación a 4 °C Después de la amplificación, los productos de PCR se guardaron a 4 °C o -20 °C o se prepararon para la electroforesis.

Antes de hacer las PCRs de todas las muestras problema, primero se determinó el número de ciclos adecuados para realizar la amplificación, para lo cual se probó el siguiente rango de ciclos de acuerdo a cada gen (Tabla 7).

	Ciclos	cDNA
--	--------	------

DII	27-31	100 ng
Ciclofilina	21-26	100 ng
C-Fos	27-31	200 ng
PPIIc	31-35	200 ng
PPII*	31-35	200 ng

**Tabla 7. Determinación del número de ciclos para la óptima amplificación de distintos cADN**

Los productos de la PCR se semecuantificaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelto en amortiguador TBE 1X (60 ml a 95 ml dependiendo de las muestras ) Se calentó el TBE 1X con agarosa en el microondas hasta no ver lentejuelas de agarosa, y se dejó enfriar en el soporte de electroforesis colocando un peine hasta que gelificara. Una vez completamente gelificado, se retiró el peine y colocó en una cámara de corrida sumergido en TBE 0.5X frío, y se cargaron las muestras en los pozos generados por el peine. Estas generalmente tienen la mezcla del amplificado de un ARNm de problema y el amplificado de un ARNm control de la cantidad de ARN total. La electroforesis se llevó a cabo a 100-160V durante  $\approx$ 1.5 h. Al terminar el tiempo de corrida se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (3 mg/L) durante 12-15 min, tras lo cual se lavó durante el doble de tiempo con agua destilada. Finalmente se observó el gel en un transiluminador UV y se capturó la imagen (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software, BIO-RAD). Se calculó el cociente entre el valor del área amplificada partir del gen de interés y el valor del área amplificada a partir del control interno, en este caso, la ciclofilina.

### 7.5 Análisis de los datos

Cuando se obtuvo más de una determinación por grupo experimental en cada cultivo, los datos de cada valor fueron promediados. Este valor promedio se tomó como una medición independiente (o sea cada cultivo genero una medición independiente). Para cada cultivo el valor de los tratamientos fue expresado en % del promedio control tomado como 100%. Los promedios y errores estándares fueron calculados a partir de estos porcentajes. El análisis estadístico fue realizado por la prueba t student en los grupos donde había por lo menos 2 muestras independientes.

## 8. Resultados

### 8.1 Viabilidad celular inicial y morfología a lo largo del cultivo

Se realizaron 24 cultivos. La viabilidad celular inicial estuvo en el rango de 62 a 96 %. Una parte resulto en cultivos exitosos (17 cultivos), con buena densidad celular al cosecharlos. Sin embargo, no en todos estos cultivos se logró obtener un buen rendimiento de RNA en la extracción (Tabla 9). De manera cualitativa, estos cultivos parecían tener una mejoría en el crecimiento de los tanicitos al compararlos con cultivos previos (Urrieta, 2018; Barajas, 2019) en los cuales faltaron los suplementos añadidos en esta tesis. Se pudieron distinguir en diferentes campos varias células con un cuerpo pequeño y largas proyecciones, parecidas a fibroblastos, que pudieran ser tanicitos, ya que los fibroblastos no son favorecidos en estas condiciones de cultivo. Se siguió la morfología por microscopia de contraste de fases del día 2 al 6 (antes del estímulo), en estos días no parece haber cambios en el tamaño de las células con el paso de los días como se muestra en la figura 5. En algunas ocasiones, se amplió el tiempo de cultivo hasta 14 días (ver siguiente sección) y no se vio diferencia morfológica significativa entre 7, 10 y 14 días in vitro (fotografías no mostradas).

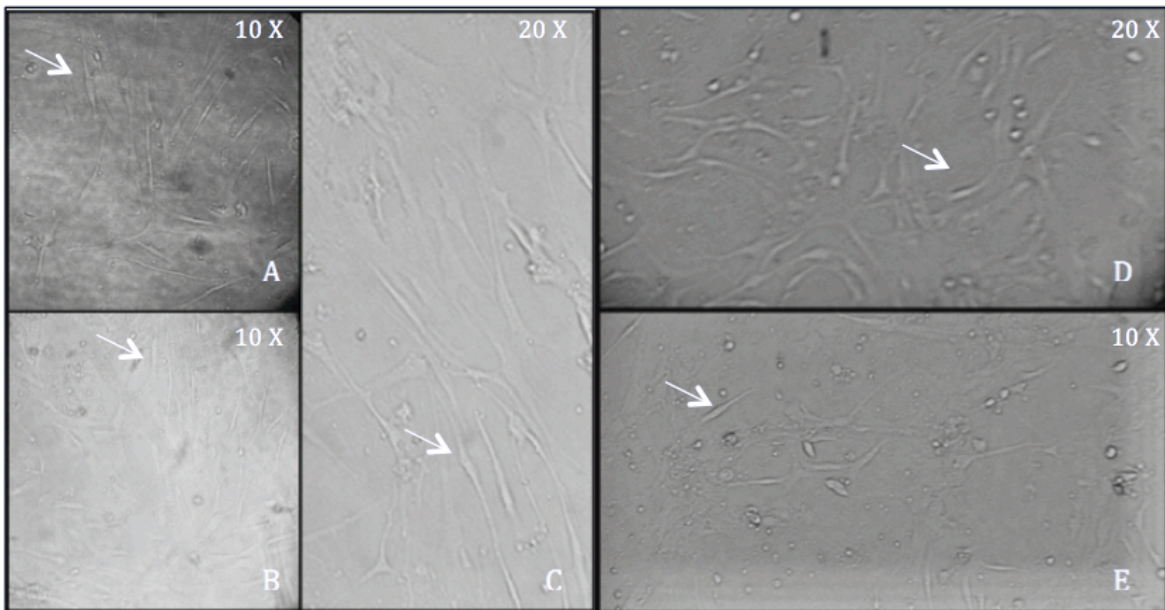


FIGURA 6. FOTOGRAFÍAS DE PLATOS DE CULTIVO TOMADAS POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES A VARIOS DÍAS IN VITRO.

La flechas indican las células que pudieran ser tanicitos por el tipo de morfología que presentan una morfología similar independientemente del tiempo de cultivo a:

A) 2 días de cultivo, B) 3 días de cultivo, C) 4 días de cultivo, D) 5 días de cultivo, E) 6 días de cultivo.

Fotografías tomadas del cultivo no. 9

## 8.2 Expresión de la PPII a lo largo del cultivo

Para tratar de elucidar que tiempo en cultivo es más adecuado para estudiar la respuesta a glutamato, analizamos la expresión de PPIIc, PPIIt y CYC en cultivos de 7, 10 y 14 días de cultivo, al término de los cuales aislamos ARN total y realizamos la RT-PCR. En la Tabla 8 se muestra que a los 7 días hay la presencia de los transcritos de PPIIt y PPIIc, cuya expresión parece aumentar con los días de cultivo; sin embargo, dado que el error estándar de las determinaciones fue muy grande para PPIIt, se decidió seguir utilizando el protocolo de 7 días in vitro.

	PPIIc/CYC (%)	PPIIt/CYC (%)
7 DIV	100±44 (3)	100±70 (3)
10 DIV	238 (1)	198±98 (3)
14 DIV	206±2 (2)	176±81 (3)

Tabla 8. Análisis de la expresión de la PPIIc y PPIIt a diferentes días de cultivo de tanicitos.

Estos resultados fueron obtenidos de los cultivos 1 y 2.

## 8.3 Morfología de tanicitos antes y después de la estimulación con Glutamato

Con el fin de determinar el estado de los tanicitos en cultivos posterior al tratamiento con glutamato ( 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  ), decidimos observó el estado morfológico de cultivos. Para esto se observó la morfología del cultivo antes de iniciar el tratamiento por 2 h con glutamato



(200  $\mu\text{M}$ ) la dosis más alta utilizada en este estudio y al terminar la incubación. La microscopía de contraste de fases no muestra cambio alguno en la morfología de los cultivos después del tratamiento como se puede observar en la figura 7. En el panel superior se muestran las células no estimuladas y en el panel inferior las células estimuladas con glutamato; como puede observarse no es evidente algún cambio en el tamaño de las proyecciones o longitud de las células, por lo que se concluyó que el glutamato no modificó la morfología de los tunicitos en cultivo.

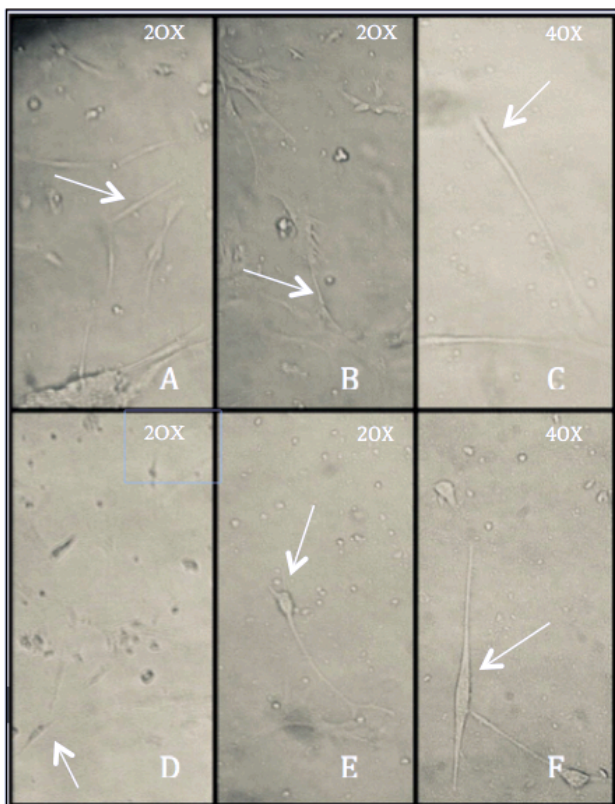


FIGURA 7. FOTOGRAFÍAS DE CÉLULAS EN CULTIVO ANTES Y DESPUÉS DE TRATAMIENTO CON GLUTAMATO TOMADAS POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES.

Tunicitos de 7 días de cultivo. En el panel superior (A, B, C) las flechas muestran la morfología de los tunicitos no estimulados. En el panel inferior (D, E, F) las flechas muestra la morfología de tunicitos estimulados con Glutamato 200  $\mu\text{M}$  durante 2 horas. Fotografías tomadas del cultivo 12

#### 8.4 Integridad del ARN de cultivos primarios de tanicitos

En cada extracción de ARN se analizó la pureza, integridad y cantidad del ARN total, obteniendo los valores observados en la tabla 9. En cuanto a los rendimientos, se obtuvo de 2 a 4  $\mu\text{g}$  de ARN total por un par de pozos (de 150,000-200.000 células por pozo), si bien en algunos casos se obtuvieron valores mucho más bajos. Antes de realizar las RT-PCR, se analizó la integridad del ARN, para lo cual se hizo una electroforesis con gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X y se corrió a 100 volts durante 1 h; posteriormente, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.3 mg/ml). El gel se destiñó 28 minutos en agua bidestilada y se observó en un analizador de imágenes (Figura 8). En esta imagen representativa, se muestra que el ARN está íntegro después de la extracción, ya que se distinguen las bandas del ARN ribosomal 28S y 18S en una proporción aproximada de 2 a 1. La figura muestra además que el tratamiento con glutamato no afecta la integridad del RNA, un dato consistente con la ausencia de efecto del glutamato sobre la cantidad total de RNA (Tabla 9).

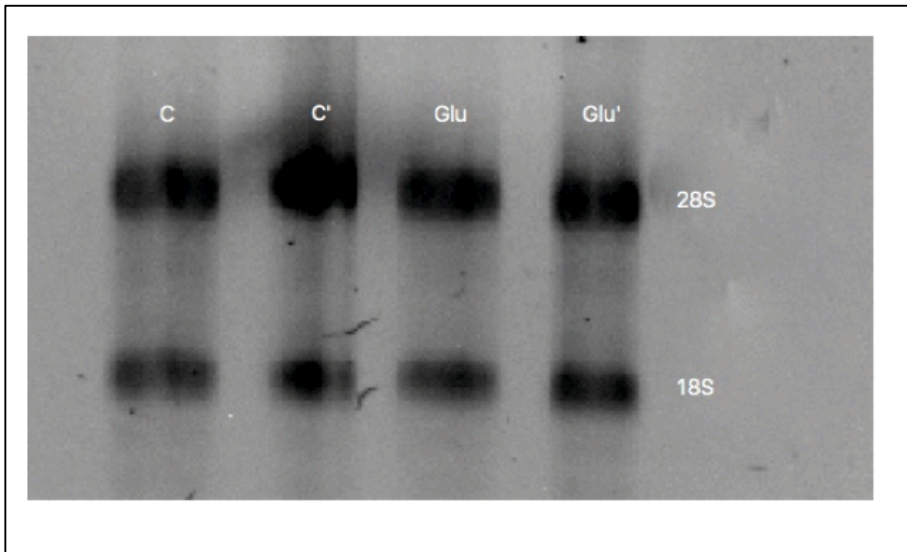


FIGURA 8. ANÁLISIS DEL RNA TOTAL OBTENIDO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE LA EMINENCIA MEDIA.

ARN ribosomal como indicador de la integridad del ARN total, en la imagen se observan las dos subunidades 28S y 18 S. Imagen tomada del cultivo número 5.

No. De Cultivo	Viabilidad Celular inicial	RNA ng/ $\mu$ L		Tratamientos
1	81.51 %	7 D	101.9	Cosecha a 7, 10 o 14 días in vitro
		10D	70.8	
		14D	161.0	
2	72.14%	7 D	60.4	Cosecha a 7, 10 o 14 días in vitro
		7D	40.7	
		10D	70.7	
		10D	89.7	
		14D	89.8	
		14D	289.8	
3 y 4	70.4%	C1	51.4	Cinética de respuesta (1, 3 y 6 h) con 100 $\mu$ M Glutamato No amplifico cADN
		C2	41.8	
		1A	39.7	
		1B	37.7	
		3A	39.8	
		3B	37.2	
		6A	41.6	
		6B	44.9	
5	64.23%	C1	114.7	100 $\mu$ M Glutamato durante 2 h
		C2	262	
		C3	294.2	
		G1	239.8	
		G2	151.2	
6	79.71%	C1	76.2	50 $\mu$ M Glutamato durante 2 h
		C2	110.1	
		C3	112.4	

		C4	120.3	
		G1	52.4	
		G2	142.9	
		G3	126.8	
		G4	105.7	
<b>7</b>	73.07 %	C1	91	Dosis respuesta al tratamiento con glutamato durante 2 h
		C2	62.1	
		G50	82.2	
		G50	120.9	
		G200	178.9	
		G200	138.2	
<b>8</b>	87.93%	C	114.1	Dosis respuesta a la estimulación con glutamato durante 2 h
		G50	145.6	
		G200	110.7	
<b>9</b>	62.12%	0	29.3	100 $\mu$ M Glu 200 $\mu$ M Glu 2 h
		2h	90.1	
<b>10</b>	74.69%	0	113. 7	200 $\mu$ M Glu 2 h
		2h	104. 2	
<b>11</b>	70.68%	0	137. 1	200 $\mu$ M Glu 2 h
		2h	119. 1	
<b>12</b>	84.33%	0A	93.6	200 $\mu$ M Glu 2 h
		0B	124. 4	
		2A	88.1	
		2B	132. 4	
<b>13</b>	68.85%	0	122.9	100 $\mu$ M Glu 2 h
		0	124.5	
		2A	113.8	
		2B	125.1	
		0	96.6	
		0	116.7	
		2A	65.7	

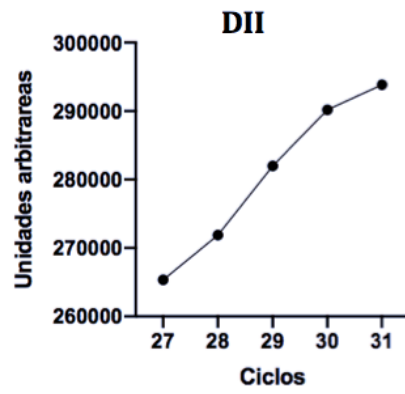
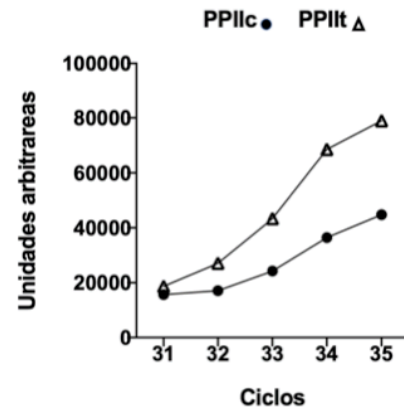
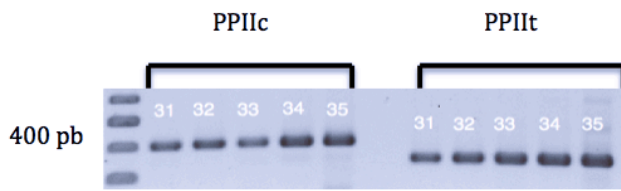
		2B	131	
<b>14</b>	74.15%	C	227.9	Cinética con 50 $\mu$ M glutamato
		1h	212.4	
		2h	368.6	
		4h	208.3	
<b>15</b>	62.80%	C	30.2	Cultivo con muy pocas células. No amplifico
		1h	94.4	
		2h	35.6	
		4h	46.1	
<b>16</b>	96.36 %	DMSO	121.9	50 $\mu$ M Glu  20 $\mu$ M CNQX 20 $\mu$ M DMSO por 2h
		DMSO	84.8	
		GLU	103.5	
		GLU	168.6	
		CNQX	148.2	
		CNQX	341.9	
		GLU+CNQX	274.4	
		GLU+CNQX	232.4	
<b>17</b>	79.07%	DMSO	18.3	No amplifico 50 $\mu$ M Glu 2 h 20 $\mu$ M CNQX 20 $\mu$ M DMSO
		DMSO	119.1	
		GLU	120.2	
		GLU	131.8	
		GLU+CNQX	74.5	
		GLU+CNQX	121.5	
<b>18</b>	86.85%	DMSO	80.6	No amplifico 50 $\mu$ M Glu 2 h 20 $\mu$ M CNQX 20 $\mu$ M DMSO
		DMSO	21.2	
		GLU	153.1	
		GLU	70.2	
		CNQX	127.6	
		CNQX	81.7	
		GLU+CNQX	105.3	
		GLU+CNQX	156.3	
<b>19</b>	73.2%	DMSO	160.3	No amplifico 50 $\mu$ M Glu 2 h 20 $\mu$ M CNQX 20 $\mu$ M DMSO
		DMSO	129.4	
		GLU	100.9	
		GLU	228.3	
		CNQX	72	
		GLU+CNQX	117.8	

		GLU+CNQX	193.5	
<b>20</b>	87.9%	0	206.0	Cinética 50 $\mu$ M Glu
		1h	234.8	
		2h	203.4	
		4h	210.2	
		T3	262.6	
<b>21</b>	96.4%	DMSO	19.5	50 $\mu$ M Glu 2 h 20 $\mu$ M CNQX 20 $\mu$ M DMSO
		DMSO	60.3	
		GLU	86.8	
		GLU	74.5	
		CNQX	60.1	
		CNQX	88.8	
		GLU+CNQX	70.3	
		GLU+CNQX	124.4	

**Tabla 9. Viabilidad celular inicial y rendimiento de la purificación de ARN total de cada cultivo.**  
Se muestran solo los cultivos que se mantuvieron hasta el día de la cosecha.

### 8.5 Relación ciclo de amplificación vs cantidad de producto de PCR

Para poder determinar si el estímulo con glutamato modifica el nivel de ARN de la PPII, realizamos curvas de amplificación por PCR para determinar los ciclos de amplificación que muestran un patrón lineal, lo que permitiría detectar aumentos o disminución de los ARNs mensajeros de interés (Figura 9). La curva de amplificación se realizó para cada cultivo y cada ARNm. Los datos mostrados en la figura 9 corresponden a muestras representativas, e indican las zonas lineares de la amplificación de la PCR para cada ARN.



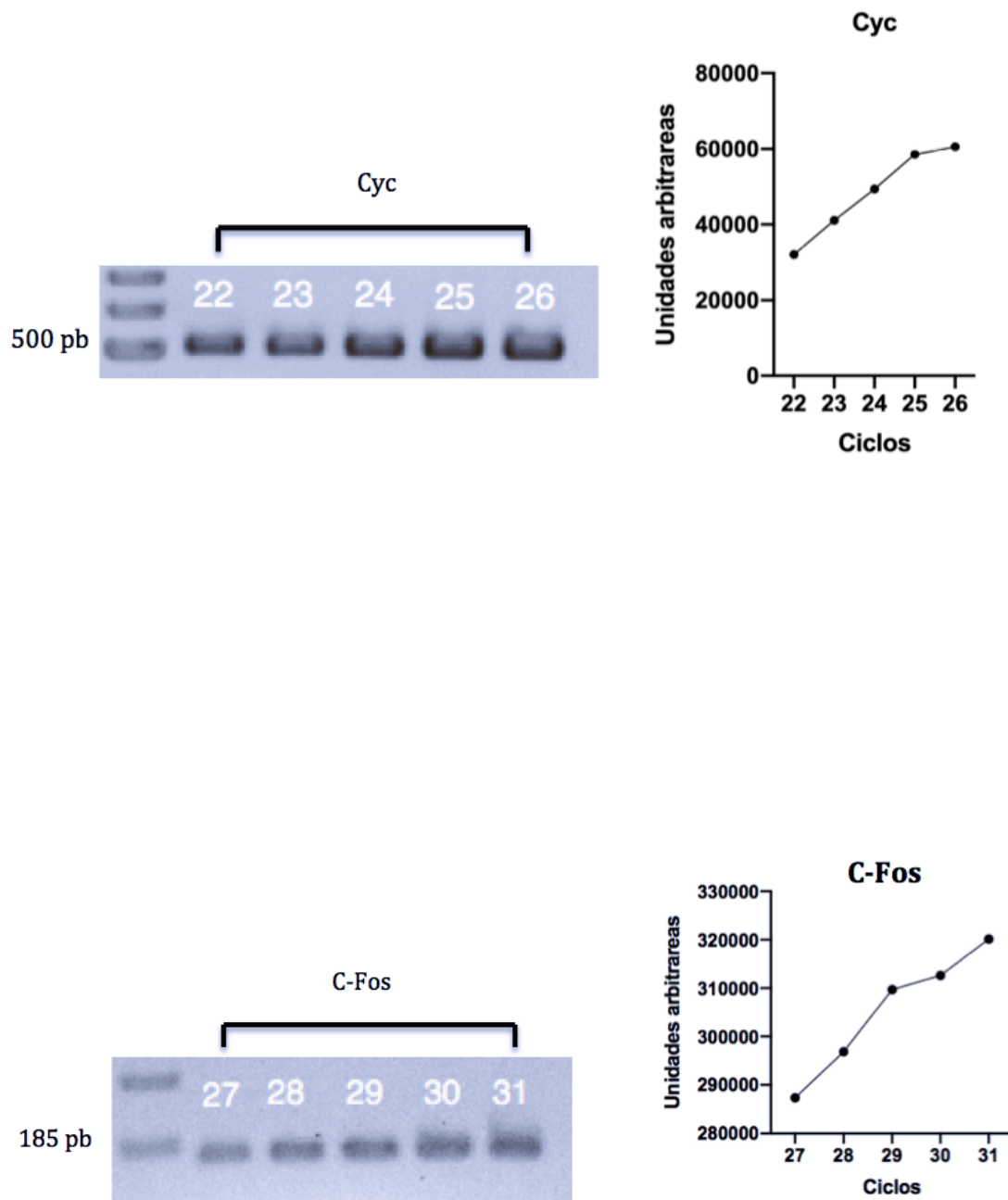


FIGURA 9. ESTANDARIZACIÓN DEL NÚMERO DE CICLOS PARA AMPLIFICACIÓN DE CADNs POR PCRS.

Se grafica el número de ciclos (eje X) contra unidades arbitrarias de ADN producido para cada transcrito (eje Y). La concentración de cADN utilizada se muestra en la tabla 7.



## 8.6 Efecto de glutamato sobre la expresión del ARNm: dosis-respuesta

Se hicieron tratamientos con concentraciones de glutamato de 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  durante 2 horas. Se obtuvo el RNA total para el análisis de la expresión de PPIIc, PPIIt, c-Fos y DII por RT-PCR punto final. La figura 10 muestra el resultado de un experimento a 50  $\mu\text{M}$  por 2 horas, y las tablas 9 y 10 el conjunto de los resultados a partir de varios experimentos. El glutamato parece aumentar el nivel de los ARNm de PPIIc, PPIIt y c-Fos, si bien la variación es muy importante y los efectos no parecen depender de la concentración del estímulo. Por otro lado, para los ARNm de PPIIt y PPIIc, el efecto del tratamiento de 50  $\mu\text{M}$  de glutamato parece más reproducible que a concentraciones mayores. En el experimento mostrado en la figura 10, no se ve efecto del glutamato sobre la cantidad de ARNm de DII.

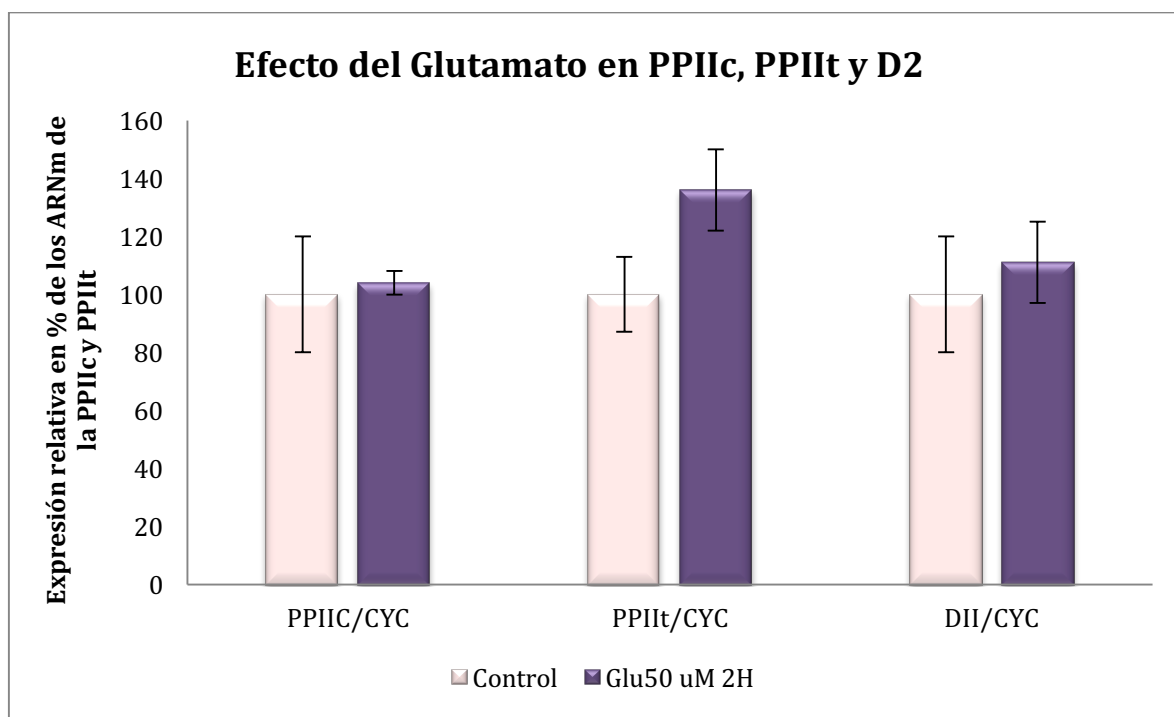


FIGURA 10. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLUTAMATO 50  $\mu\text{M}$  DURANTE DOS HORAS SOBRE EXPRESIÓN DE LOS ARNs MENSAJEROS DE PPIIc, PPIIt Y DII

Se puede observar que el nivel del ARNm de la PPII\* tiende a aumentar en los pozos tratados con glutamato, mientras que no se ven efecto en el caso de PPIIc y D2. n=4

	PPIIc/CYC (%)	PPIIt/CYC (%)
Control	100 $\pm$ 10 (10)	100 $\pm$ 15 (12)
Glutamato 50 $\mu\text{M}$	147 $\pm$ 13 (7)	165 $\pm$ 12 (7)
Glutamato 100 $\mu\text{M}$	109 (1)	138 $\pm$ 89 (2)
Glutamato 200 $\mu\text{M}$	204 $\pm$ 97 (5)	192 $\pm$ 114 (3)

**Tabla 10. Dosis respuesta del efecto del Glutamato durante dos horas sobre expresión de ARNm de PPIIc y PPIIt.**

Datos presentados en % del promedio del control de cada experimento tomado como 100%. Los datos corresponden a los cultivos: 5,9, 10, 11,12. El número de muestras analizadas para cada cultivo se muestra en la tabla entre paréntesis.

	c-Fos/CYC (%)
Control	100 $\pm$ 12 (6)
Glutamato 50 $\mu\text{M}$	244 $\pm$ 138 (3)
Glutamato 100 $\mu\text{M}$	99 $\pm$ 31 (4)
Glutamato 200 $\mu\text{M}$	367 $\pm$ 130 (3)

**Tabla 11. Dosis respuesta del efecto del Glutamato durante dos horas sobre la expresión del ARNm de c-Fos.**

Datos en % del promedio del control de cada experimento tomado como 100%. Los datos corresponden a los cultivos 10, 11,12 y 13. El número de muestras analizadas para cada cultivo se indica con el número entre paréntesis.

### 8.7 Efecto de glutamato sobre expresión de ARN de PPIIc y PPIIt: Cinética con Glutamato a 50 $\mu\text{M}$

Se estudio la cinética del efecto de glutamato 50  $\mu\text{M}$  sobre la densidad óptica de las bandas de amplicones observadas para los ARNm de PPIIc y PPIIt en referencia a la banda del

control interno, para obtener un valor de expresión. El glutamato parece aumentar los niveles de ARNm de PPIIc y PPIIt dependiendo del tiempo del estímulo, siendo el efecto mayor a las 4 horas (Tabla 13).

	PPIIc/CYC (%)	PPIIt/CYC (%)
0	100±0.8 (3)	100±0.5(3)
1 h	71± 1 (3)	130±8 (3)
2 h	140 (1)	117±39(3)
4 h	188±92 (2)	204±47 (2)

**Tabla 12. Cinética del efecto del Glutamato 50  $\mu$ M sobre la expresión de los ARNm de PPIIc y PPIIt.** Datos en % del promedio del control de cada experimento tomado como 100%. Cultivo no. 3,4 y 14. El número de muestras analizadas para cada cultivo se muestra en el número entre paréntesis.

#### 8.7.1 Tratamiento con T3 como control positivo de regulación del ARNm de la PPIIc y PPIIt.

Previamente se había demostrado que el ARNm de la PPIIc y PPIIt es regulado por la T3 en tanicitos. Para corroborar que nuestros cultivos responden similar a lo reportado al estímulo de T3 y que este efecto fuera un control positivo que apoyara la funcionalidad de los cultivos, lo que puede apoyar que los resultados de la estimulación con glutamato son confiables. En otro cultivo realizado en condiciones idénticas a los empleados para la estimulación con glutamato, se realizó una estimulación con T3 (Sigma #T2877) a una concentración de 0.01  $\mu$ M ( $10^{-8}$  M) durante 24 horas al 7<sup>o</sup> día del cultivo *in vitro*. Al igual que reportado en la bibliografía con esta misma concentración, los niveles de PPIIc y de PPIIt aumentaron con estas condiciones como podemos observar en la tabla 14. Esto significa que en nuestros cultivos se está reproduciendo un efecto observado *in vivo* y confirma que la biosíntesis del de la PPIIc y truncada es regulada positivamente por T3.

	T3
RNA ng/ $\mu$ L	262.6
Viabilidad del cultivo	87.9%
PPIIc/CYC (%)	172
PPIIt/CYC (%)	183

**Tabla 13. Efecto de T3 sobre la expresión de los ARN de PPIIc y PPIIt.**

Cocientes de densidad óptica de amplicones de PPIIc y PPIIt, en referencia al control interno (amplicon de ciclofilina). Datos en % del promedio del control de cada experimento tomado como 100%. Cultivo 20, n= 1.

### 8.8 Efecto de CNQX, un antagonista de los receptores de glutamato, sobre expresión de ARN de PPIIc, PPIIt, DII y c-Fos

Se analizó el efecto del tratamiento con 20  $\mu$ M del antagonista de los receptores de glutamato de tipo ionotrópico CNQX (antagonista competitivo de los receptores de tipo AMPA/kainato), sobre el efecto del glutamato 50  $\mu$ M por 2 h. Debido a que el CNQX no es soluble en agua, se utilizó DMSO 20  $\mu$ M como control. En estos experimentos no se observó el efecto del glutamato, o del CNQX solo, si bien la combinación glu + CNQX pareció incrementar el nivel del ARNm de PPIIt, sin que este dato sea significativo (Tabla 15).

	PPIIc/CYC (%)	PPIIt/CYC (%)
DMSO	100 $\pm$ 36 (3)	100 $\pm$ 36 (4)
GLUT	102 $\pm$ 40 (4)	114 $\pm$ 26 (4)
CNQX	121 $\pm$ 20 (4)	101 $\pm$ 47 (4)
CNQX +GLUT	126 $\pm$ 8 (4)	157 $\pm$ 22 (4)

**Tabla 14. Efecto del antagonista CNQX y del glutamato sobre la expresión de los mRNA de PPIIc y PPIIt.**

Cocientes de densidad óptica de amplicones de PPIIc y PPIIt, en referencia al control interno (amplicon de ciclofilina). Datos en % del promedio del control de cada experimento tomado como 100%. Cultivos 16, y 21. El número de muestras animalizadas para cada cultivo se muestra en la tabla números entre paréntesis.

Se analizó también el efecto del glutamato y del antagonista CNQX en la expresión de los mRNAs de DII y c-Fos. Similar a los resultados de las tablas anteriores el glutamato no tuvo efecto en los niveles de mRNA de C-Fos como se observa en la gráfica y la tabla de la Fig.

12 panel A. El antagonista solo o combinado con glutamato no tuvo efecto sobre el ARNm de C-Fos.

Para el ARNm de DII, el resultado no fue el mismo que el observado en un cultivo anterior (Fig. 10). El glutamato aumento el nivel de ARNm de D2, en este caso de manera significativa respecto al control. El antagonista no tuvo efecto por sí mismo. Cuando se cocubaron Glutamato + CNQX, el efecto del Glutamato sobre el nivel del ARNm de D2 se bloqueo (Fig. 12 panel B).

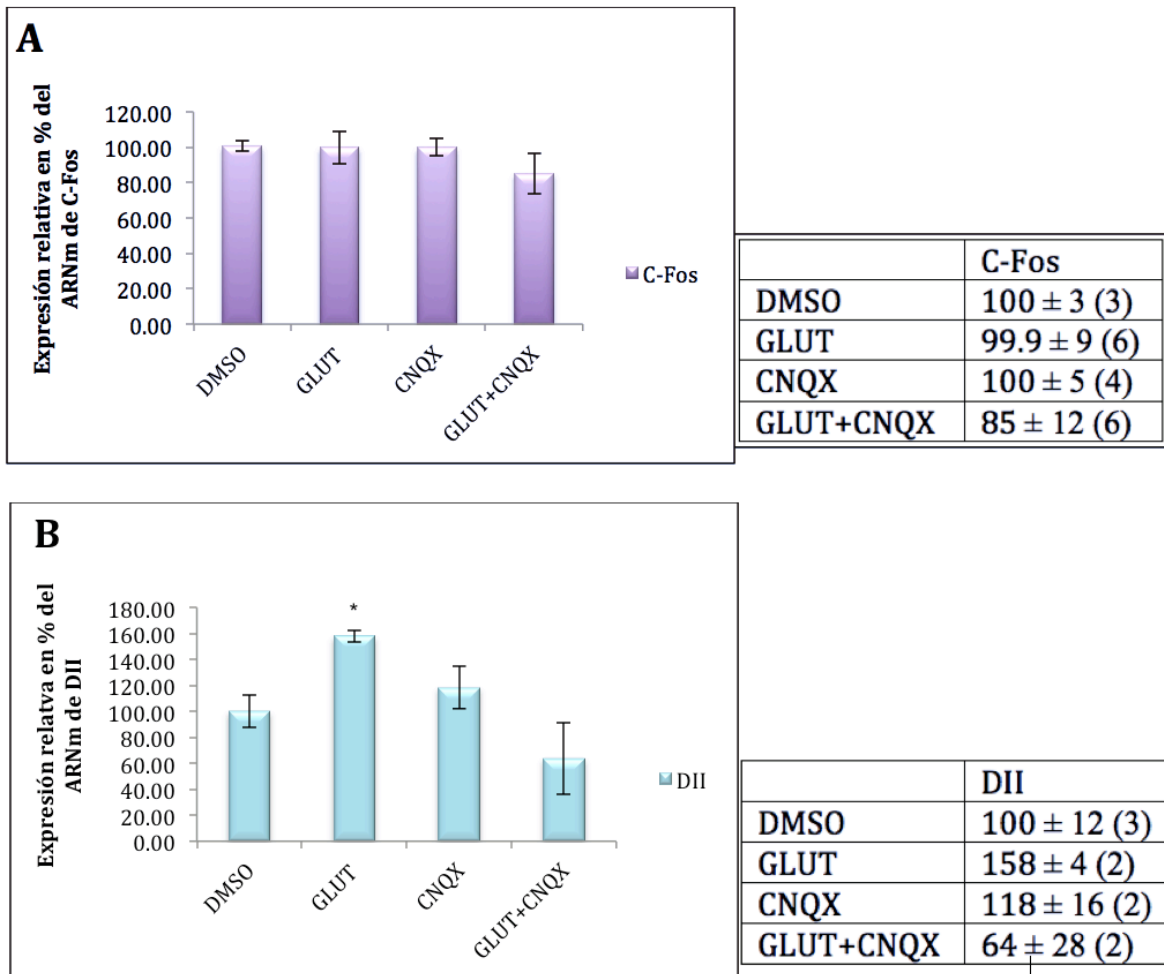


FIGURA 11. EFECTO DEL ANTAGONISTA CNQX SOBRE EL EFECTO DEL GLUTAMATO SOBRE LOS NIVELES DE ARN DE C-FOS Y DII.

A) El glutamato y el antagonista no tienen efecto sobre el nivel del ARNm de C-Fos. B) El glutamato aumenta los niveles del ARNm de D2, efecto cancelado por la pre-incubación con CNQX. Glutamato 50  $\mu$ M, CNQX 20  $\mu$ M. Las tablas muestran los datos analizados en las gráficas con sus respectivos errores estándar y entre paréntesis los números de muestras analizadas. Análisis estadístico T-test \* $p < 0.05$ . Cultivos 16 y 21.

## 9. Discusión

El propósito de este trabajo fue utilizar cultivos primarios sin suero de tanicitos de rata para probar la hipótesis que en tanicitos la expresión de la PPII es regulada por el glutamato, cotransmisor de la TRH en las neuronas hipofisiotropicas. A continuación, se describen las conclusiones, tanto en relación al cultivo primario de tanicitos en medio sin suero, como al efecto del glutamato sobre la expresión de PPII, y de otras mediciones control.

### Cultivo celular de tanicitos

El cultivo de tanicitos para fines bioquímicos es un reto significativo, ya que los tanicitos son células poco abundantes, y con antecedentes específicos relativamente limitados. Las condiciones utilizadas en estos cultivos nos permitieron tener un sistema *in vitro* útil para cultivar células que se parecen a tanicitos *in vivo*, en términos de características morfológicas, y marcadores moleculares..

Históricamente el medio con suero es el más utilizado como medio de cultivo debido a su alto contenido de factores de crecimiento y bajo contenido de  $\gamma$ -globulinas (Brenner et al., 2009) a demás de proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz, enzimas, hormonas proteicas y lípidos esenciales para el desarrollo; sin embargo su composición variable, tanto cuantitativa como cualitativa, lo vuelve un factor ambiguo que genera variaciones de los resultados experimentales (Gstraunthaler, 2003). La estrategia de utilizar un medio definido permite la reducción de la variabilidad a viabilidad de las células

ependimales. La transferrina, la albúmina sérica y la insulina son suplementos comunes a los medios sin suero y se han usado ampliamente en cultivos libres de suero ependimarios (Gabrion et al. 1998 ; Grondona et al. 2013 ; Laabich et al. 1989 ; Tritschler et al. 2007 ; Weibel et al. 1984 , 1986) Estas condiciones de cultivo parecen favorecer principalmente la supervivencia de las células similares a los tanicitos De Francesco et al, 2017

Las células se cultivaron en medio DMEM-F12 + todos los suplementos propuestos por De Francesco et al, 2017 (medio definido), lo que mejoró la calidad del cultivo comparando con cultivos con un menor número de suplementos, en los cuales las células parecían tener un menor tamaño respecto a las mostradas en la figura 6 (datos no mostrados) y en cultivos anteriores realizados en el laboratorio. Sin embargo, faltaría confirmar de manera objetiva esta impresión

Al momento de extraer el tejido de la región de interés (eminencia media) no solo contiene tanicitos, sino también pituicitos, astrocitos, células endoteliales, microglía, precursores de oligodendrocitos y vasos sanguíneos (Rodríguez *et al*, 2019). Aunque el medio utilizado favorece la sobrevivencia de los tanicitos, sería conveniente caracterizar por medio de marcadores específicos cuales son los otros tipos de células presentes en nuestros cultivos al DIV7. Al igual que con los cultivos sin suero realizados anteriormente en el laboratorio (Barajas, 2019), se pudieron distinguir células con la morfología observada en los cultivos de tanicitos por DeFrancesco et al, 2017, es decir, con un cuerpo pequeño y largas proyecciones como puede observarse en la figura 6. Las evidencias moleculares que son consistentes con la conclusión que nuestros cultivos incluyeron tanicitos son la detección de los ARNm de PPII (que en esta región se expresan únicamente en tanicitos), y del ARNm de la DII que esta enriquecido en tanicitos in vivo.

Si bien la duración del cultivo sin suero en las condiciones publicadas por De Francesco et al, 2017 es de 7 días, se comenzó probando distintos días de cosecha (7, 10 y 14 días), porque se consideró que un tiempo mayor con el medio adicionado con trombina pudiera mejorar el cultivo celular, dado que la trombina protegería a los tanicitos de la muerte celular inducida por hipoglucemia, estrés oxidativo y privación de factores de crecimiento, como pasa con astrocitos y neuronas (Vaughan 1995). Sin embargo, si bien parece que hay un aumento en

los niveles de los ARNm de PPIIt y PPIIc con el paso de los días en cultivo, como se muestra en la tabla 8, esto coincide con datos preliminares reportados en la tesis de Urieta 2017, pero en este caso el error estándar en las determinaciones es demasiado grande para que la conclusión sea sólida. La morfología y viabilidad celular a lo largo del cultivo no tuvo cambios relevantes, por lo que no sabemos a qué se debe la variación de los datos de expresión.

Al igual que en cultivos de tanicitos reportados en trabajos anteriores (Urieta, 2017), no todos los cultivos fueron exitosos; la confluencia es difícil de alcanzar, en algunos casos las células se murieron antes del día 7, o la cantidad resultante de células fue baja, lo que resultó en la imposibilidad de aislar ARN total suficiente. Aparentemente, las células están sufriendo daños al momento de la dispersión, ya que de 10 a 30 % de las células están muertas al sembrar, lo que podría impedir la adherencia de las sobrevivientes, incluso alterar la señalización de vías internas, lo que pudiera llevar a una disminución progresiva *in vitro* de la salud de las células. Otras causas externas de la muerte progresiva de algunos cultivos es que el número de células sembradas no fue el suficiente, disminuyendo posiblemente la concentración de factores tróficos producidos por las mismas células, indispensables para su sobrevivencia. Adicionalmente, es posible que falte alguna señal esencial para la supervivencia de los tanicitos, ya sea proveniente del líquido cefalorraqueo, del parénquima cerebral, o del suero. El grado de muerte celular posterior a la siembra no se evaluó, por lo que no conocemos la importancia del fenómeno de muerte al pasar los días de cultivo. Estas pruebas pueden llevarse a cabo, al inicio y final del cultivo, por medio de indicadores del estado de la membrana plasmática (tinción con azul de tripán, yoduro de propidio) o métodos de reflejo metabólico como los compuestos de tetrazolio (MTT) (Sittampalam et al., 2004).

La variabilidad en el éxito de los cultivos sugiere que hay todavía parámetros que no están optimizados. Así, la tasa inicial de viabilidad es todavía muy variable y a veces relativamente baja, lo que sugiere fuertemente que el proceso de dispersión no es óptimo. Otro elemento para considerar es la calidad de los reactivos que se utilizaron para los medios de cultivo y suplementos, desde el agua hasta cada uno de los reactivos, cuya vida de almacenamiento no fue considerada en este trabajo. Se sabe que los cultivos sin suero son extremadamente



sensibles a toxinas introducidas a través de los materiales, agua y reactivos, o a la pérdida de actividad de algunos componentes, por lo que una atención mayor a esto sería necesaria. Es muy probable que la obtención de cultivos de mayor calidad generará resultados bioquímicos más confiables.

A pesar de que la tasa de éxito de los cultivos fue mediana, se pudo obtener un número razonable de cultivos para probar la hipótesis sobre el efecto del glutamato, sugiriendo que tenemos un sistema en estado preliminar con el cual se pudieran conocer los mecanismos que regulan a la PPII y, por consecuencia, al eje HPT. En un experimento que sirvió de control positivo se observó que la adición de T3 al medio de cultivo provoca un incremento de la expresión de los ARNm de PPIIc y PPIIt, en concordancia con los datos *in vivo* (Sánchez et al, 2009). Este dato confirma que los tanicitos *in vitro* tienen la capacidad de regular la expresión de PPII, tal como ocurre *in vivo*, apoyando así la utilidad del modelo.

Sería bueno repetir estas condiciones de cultivo en cultivos organotípicos, a diferencia de los cultivos primarios, los organotípicos consisten de explantes o rebanadas del tejido, lo cual permite que se conserve la organización estructural del tejido original (Humpel, 2016). dado que este tipo de cultivos mantiene juntos distintos tipos celulares, con su propia matriz extracelular y nos permite la replicación parcial del contexto *in vivo* y las interacciones son más similares a su micro ambiente natural (Martins et al., 2016) y donde se logro ver actividad de la enzima y no solo expresión del ARNm lo que sugiere que la señalización que regula la expresión de la PPII se mantiene en rebanadas de EM (Urieta, 2017). Estas dos condiciones experimentales podrían usarse en conjunto para identificar la importancia de las interacciones paracrina en la regulación de la actividad y expresión de la PPII de tanicitos *in vitro*. Ya que en el caso de los tanicitos de mamíferos, no existen líneas celulares por lo que las opciones se reducen por el momento a estas dos opciones.

### **Efecto del glutamato**

El glutamato actúa como un neurotransmisor excitador y es uno de los más abundantes en el cerebro de los vertebrados; tiene dos familias de receptores: los receptores ionotrópicos (iGluRs) y los receptores metabotrópicos (mGluRs). La estimulación excesiva de los receptores de glutamato puede resultar en citotoxicidad para las neuronas. Se tomó como referencia para elegir las concentraciones de glutamato dosis utilizadas en glía para evitar que se llegara a la citotoxicidad. Uno de los dos medios utilizados para el cultivo de tanicitos es el F12, el cual contiene ácido glutámico  $9.9 \times 10^{-5}$  M y glutamina  $9.9 \times 10^{-4}$  M, por lo que al momento de estimular con glutamato se optó por hacer un remplazo total del medio de cultivo por solo medio DMEM (no contiene ácido glutámico) más suplementos para controlar precisamente las concentraciones de glutamato.

Para estudiar el efecto del glutamato, las células fueron lisadas para extraer ARN total. Una de las limitaciones de este estudio es que tuvimos que juntar células sembradas a partir de 4 a 5 EM para obtener una cantidad suficiente de ARN para llegar a una determinación experimental. Como se ve en la tabla 9, el rendimiento en la extracción de ARN fue muy variable, lo que puede deberse en parte a que el número final de células fue variable; sin embargo, es también posible que la metodología de purificación del ARN no haya sido utilizada de manera reproducible. Esta variabilidad de rendimiento pudiera además haber influenciado la calidad de los análisis por RT-PCR, a pesar de las optimizaciones que se llevaron a cabo en cada experimento. Este punto se tendría que analizar en el futuro, para descartar los datos de RT-PCR que no fueran confiables. Debido a que la cantidad de material biológico limitó la cantidad de las réplicas, muchos de los datos son claramente preliminares, y no se analizaron en general de manera estadística. Sin embargo, algunas conclusiones preliminares se pueden hacer.

El tratamiento con glutamato no modificó la morfología de los tanicitos, como se observó en la fig. 7, consistente con la falta de efecto tóxico. Refuerza esta conclusión el hecho de que el glutamato tampoco alteró el rendimiento de la purificación de ARN. Por otro lado, se observó una ligera tendencia a que el glutamato suba los niveles de los ARNm de PPIIt y PPIIc en algunos experimentos y condiciones. Estos efectos tuvieron una intensidad limitada, fueron muy variables, y no dependieron de la concentración de Glutamato, pero sí parecieron

depender de la duración del tratamiento, incrementándose con el tiempo. Basado en estos datos, pareciera que el glutamato tiene un efecto muy pequeño sobre la expresión de PPII, sugiriendo que no es un efector fisiológico relevante.

Sin embargo, observamos también que el glutamato, que puede iniciar la transcripción de genes de respuesta temprana, tuvo efectos positivos muy poco reproducibles sobre los niveles del ARNm de c-Fos, lo cual sugiere un pobre acoplamiento entre la estimulación de los receptores del glutamato y eventos transcripcionales. Por lo tanto, la conclusión de que el efecto del glutamato sobre la expresión de PPII es muy limitado pudiera deberse a condiciones experimentales que no fueron óptimas. Es posible que, en nuestras condiciones de cultivo, las células hayan perdido su capacidad de responder al glutamato.

En el caso del ARNm de la DII, observamos también resultados muy variables, con un experimento en el cual el glutamato tuvo un efecto positivo y otro en el cual no se vio efecto. Esto confirma que las células no expresan de manera reproducible la misma sensibilidad al glutamato. En el experimento en el cual hubo una respuesta al glutamato observamos claramente que el efecto fue inhibido por la pre-incubación con CNQX. Esto confirma que los tanicitos expresan algún receptor ionotrópico del glutamato tipo kainato o AMPA, tal como se describió in vivo. Es la primera evidencia que sugiere que estos receptores participan en la regulación de la expresión de la DII, un dato nuevo, que si es confirmado pudiera aportar una primera idea sobre el papel del glutamato en los tanicitos.

## **10. Conclusión**

Se logró obtener células morfológicamente, molecularmente y fisiológicamente similares a los tanicitos, en un cultivo primario de eminencia media de ratas de 10 días de edad en medio definido, coincidiendo con De Francesco et al, 2017. Sin embargo, falta todavía optimizar la metodología del cultivo para obtener cultivos de mayor calidad y reproducibilidad.

Por otro lado, por la limitación del material biológico, la variabilidad de los cultivos y de su sensibilidad al glutamato, o de la técnica de análisis por RT-PCR, no se pudo obtener

resultados claros relacionados a efecto del glutamato sobre la expresión de la PPII, si bien se sugiere que el glutamato tiene un ligero efecto positivo sobre los niveles de los ARNm de PPIIc y PPIIt.

## 11. Perspectivas

- Optimización profunda del cultivo primario de tanicitos de rata.
- Se tiene que optimizar una metodología de análisis más sensible y precisa, para obtener mayor cantidad de datos a partir de una cantidad pequeña de material biológico.
- Es necesario probar nuevamente efecto del glutamato en condiciones de cultivo y análisis óptimas

## 12. Bibliografía

Barajas A. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias –UNAM. INVESTIGACIÓN SOBRE EL PAPEL DE LOS TANICITOS EN EL CONTROL DEL EJE TIROIDEO Y EL BALANCE DE ENERGÍA. Tesis de Licenciatura, En proceso.

Campbell, J., Macosko E., Fenselau H., Pers T., Lyubetskaya A., Tenen D., Goldman M., Verstegen A., Resch J., McCarroll S., Rosen E., Lowell B., & Tsai L. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature Neuroscience*, 20, 484-496.

Chávez Gutiérrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M. A., Matta Camacho, E., Ducancel, F. & Charli, J. L. (2005). A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant negative activity. *Journal of neurochemistry*, 92 (4), 807-817.

Chávez-Gutiérrez L, Matta-Camacho E, Osuna J, Horjales E, Joseph-Bravo P, Maigret B, Charli JL. (2006). Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *J Biol Chem.* 281(27):18581-90.

De Francesco PN, Castrogiovanni D, Uriarte M, Frassa V, Agosti F, Raingo J, Perello M. A simple strategy for culturing morphologically conserved rat hypothalamic tanycytes. *Cell Tissue Res.* 2017 Aug;369(2):369-380.

De Seranno, S., Estrella, C., Loyens, A., Cornea, A., Ojeda, S. R., Beauvillain, J. C., & Prevot, V. (2004). Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *The Journal of neuroscience*, 24(46), 10353-10363.

De Seranno, S., D'Anglemont De Tassigny, X., Estrella, C., Loyens, A., Kasparov, S., Leroy, D. & Prevot, V. (2010). Role of estradiol in the dynamic control of tanycyte plasticity mediated by vascular endothelial cells in the median eminence. *Endocrinology*, 151(4), 1760-1772.

Erzsébet Farkas, Edina Varga, Antonieta Cote-Vélez, Magdalini Matziari, Mónika Tóth, Anett Szilvássy-Szabó, Andrea Kádár, Ronald M. Lechan, Jean-Louis Charli, Patricia Joseph-Bravo, Csaba Fekete (2017) A novel glial-neuron circuit in the external zone of the median eminence regulating hypophysiotropic TRH neurons via endocannabinoid system. *Resúmenes de la Reunion Anual de la Society for Neuroscience*, Washington, USA.

Farr O. M., Li, C. R., & Mantzoros, C. S. (2016). Central Nervous System Regulation of Eating: Insights from Human Brain Imaging. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(5), 699–713.

Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocrine Reviews* 35(2), 159-94.

Ferré, S. (2017). Hormones and Neuropeptide Receptor Heteromers in the Ventral Tegmental Area. Targets for the Treatment of Loss of Control of Food Intake and Substance Use Disorders. *Current Treatment Options in Psychiatry*, 4(2), 167–183.

Frayling, C., Britton, R., & Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of physiology*, 589(Pt 9), 2275–2286.

Garfield, A., Shah, B., Burgess, C., Li, M., Li, C., Steger, J., Madara, J., Campbell, J., Kroeger, D., Scammell, T., Tannous, B., Myers, M., Andermann, M., Krashes, M. & Lowell, B. (2016). Dynamic GABAergic afferent modulation of AgRP neurons. *Nature Neuroscience*, 19 (12) 1628-1635.

Goodman, T., & Hajihosseini, M. K. (2015). Hypothalamic tanycytes—masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Frontiers in neuroscience*, 9, 387.

Humpel C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305, 86–98.

Erik Hrabovszky, Gábor Wittmann, Gergely F. Turi, Zsolt Liposits, Csaba Fekete, Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone Neurons of the Rat Contain Vesicular Glutamate Transporter-2, *Endocrinology*, Volume 146, Issue 1, 1 January 2005, Pages 341–347

Joseph-Bravo, P, Jaimes-Hoy, L. & Charli, J.L. (2016). Advances in TRH signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17 (4) 545-558.

Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., Uribe R.M. & Charli, J.L. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, 226, T85-T100.

Lazcano, I., Cabral, A., Uribe, R., Jaimes-Hoy, J., Perello, M., Joseph-Bravo, P., Sánchez, E. & Charli, J. L. (2015). Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats. *Endocrinology*. 156 (7) 2713-23.

Lechan RM, Fekete C. (2016). Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides*, 28, 257-482.

Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J. L., Blondeau, N., & Rovère, C. (2017). Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Frontiers in endocrinology*, 8, 197.

Martins, J. P., Alvez, C. J., Neto, E., & Lamghari, M. (2016). Communication from the periphery to the hypothalamus through the blood – brain barrier : An in vitro platform. *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1–2), 119–130.

Mihály E, Fekete C, Tatro JB, Liposits Z, Stopa EG, Lechan RM. (2000). Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 85 (7) 2596-603.

Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 367-378.

Müller-Fielitz, H, Stahr M, Bernau M, Richter M, Abele S, Krajka V, Benin A, Wenzel J, Palies K, Mittag J, Heder H, Offermanns O. & Schwaninger M. (2017). Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nature Communications*, 8, 484.PAGS

Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P. (1988). Tissue-specific regulation of pyroglutamate amino-peptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48:211–218.

PJ Vaughan, CJ Pike, CW Cotman and DD Cunningham. (1995, July 1). Thrombin Receptor Activation Protects Neurons and Astrocytes from Cell Death Produced by Environmental Insults. *The Journal of Neuroscience*, 15, 7.

Recabal, A., Caprile, T. & García-Robles, M.L.A. (2017). Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 190.

Rodríguez E, Blázquez J, Pastor F, Peláez B, Peña P, Peruzzo B, & Amat P. (2015). Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. *International Review of Cytology*, 247, 89-164.

Rodríguez-Rodríguez, A., Lazcano, I., Sánchez-Jaramillo, E., Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Joseph-Bravo, P., & Charli, J. L. (2019). Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries. *Frontiers in endocrinology*, 10, 401.

Sánchez, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., ... & Lechan, R. M. (2009). Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*, 150(5), 2283-2291.

Urrieta Chávez B.E. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias –UNAM. OPTIMIZACION DE CULTIVOS DE EMINENCIA MEDIA DE RATA PARA ESTUDIAR LA REGULACION DE LA EXPRESION DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II EN TANICITOS. Tesis de Licenciatura, 8 Diciembre 2017.

Vargas, M.A., Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P, Charli JL (1992). Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides*. 13: 255-60.



Wittmann G1, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C. (2007) Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 503(2):270-9.

Zhang, A. & Pol, A. (2016). Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, 19(10) 1341-7.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. Aguilar Vargas Gabriela

Con número de matrícula 20134011001 cuyo título es:

Determinación del efecto del glutamato sobre la expresión de la enzima piroglutamil peptidasa II en cultivos primarios de tanitos de eminencia media de rata

Consideramos que si reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de Licenciado Ciencias con Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular

Atentamente "Por una humanidad culta"

Cuernavaca, Morelos, a 27 de agosto de 2020.

Grado, Nombre y Apellidos completos del jurado

Firma

PRESIDENTE: DRA. VERÓNICA NARVÁEZ PADILLA

SECRETARIO: DRA. MARIA JUANA ANTONIETA COTE VÉLEZ

VOCAL: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA

PRIMER SUPLENTE: DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS

SEGUNDO SUPLENTE: DR. RAÚL ARREDONDO PETER

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209. Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx

Handwritten signatures of the jury members in blue ink.

UA EM

RECTORÍA