



RESUMEN

Efecto inhibitorio de la hormona de crecimiento sobre la formación de neuroesferas en cultivos primarios de estriatum

Autor: Regalado Santiago Citlalli
Área de Investigación: Biomedicina
Tipo de Autor: Estudiante de Doctorado
Institución: UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Año Residencia: 2008
Hospital: hospital
Matrícula/Número Personal: S07016882
Teléfono Laboral: 8418900
Teléfono Particular:
Email: cregalado@uv.mx

Coautores: Juárez Aguilar Enrique
Número de registro: S/N

Dependencia: Instituto De Ciencias De La Salud

Extensión: 13758
Teléfono Celular: 2281202568
Email Alternativo: citrs61@hotmail.com

Argumentación teórica:

El desarrollo de terapias celulares para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se ha inhibido a causa de la falta de conocimiento sobre los procesos de proliferación y diferenciación celular en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). La hormona de crecimiento (HC) es sintetizada en la glándula hipófisis; sin embargo, esta hormona se ha detectado además en el SNC de varias especies, incluyendo a los roedores. La HC es inmunológicamente detectable a partir del décimo día de gestación en el cerebro fetal, incluso antes de su detección en la glándula hipófisis.¹ La detección de la HC no es afectada por la extirpación de la hipófisis sugiriendo la síntesis extra-glandular. Más aun, el RNAm de la HC se encuentra presente en las regiones del cerebro donde se detecta inmunológicamente a la hormona.² La presencia de la HC y de su receptor en áreas específicas del cerebro durante el desarrollo, sugiere fuertemente un papel de esta hormona sobre la neurogénesis y la gliogénesis.³ El descubrimiento de una población de células madre o "stem cells" en el cerebro embrionario y en el adulto ha estimulado el estudio de los procesos de proliferación y diferenciación neuronal.

Argumentación empírica:

En cultivo, las stem cells crecen en suspensión como agregados esféricos no adherentes conocidos como "neuroesferas" (NE) en un medio de cultivo libre de suero animal (MLS) conteniendo una mezcla de medio DMEM y medio Hamm F12 en una proporción 1:1 y suplementado con: insulina, transferrina, putrescina, progesterona, selenito de sodio y factor de crecimiento epidérmico (EGF), este último factor es indispensable para la formación de las neuroesferas. Las NE contienen una población heterogénea compuesta por stem cells y precursores de neuronas y células

glia. Debido a estas características, el cultivo de NE constituye un excelente modelo para el estudio de los procesos de proliferación y diferenciación neuronal.^{4, 5, 6}

Planteamiento del problema:

A pesar de las evidencias que sugieren un papel de la HC en el desarrollo del SNC, la función de esta hormona en este sistema no ha sido lo suficientemente aclarada. Previamente, nosotros reportamos el efecto mitogénico de la HC sobre el aislamiento de las NE a partir de cultivos primarios de estriatum de embrión de ratón a altas densidades celulares (150,000 cels/cm²)⁷. En el presente trabajo, realizamos un análisis más detallado del efecto de la hormona sobre este modelo utilizando una menor densidad celular (50,000 cels/cm²). La definición del papel principal de la HC en la proliferación de las NE permitirá establecer condiciones óptimas para el aislamiento de estas y su posible uso en el desarrollo de terapias de transplante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Objetivo General:

Analizar el efecto de la hormona de crecimiento sobre la formación de neuroesferas en cultivos primarios de estriatum de embrión de ratón.

Metodología:

Se trata de un estudio experimental. El tejido estriatal proveniente de cerebros de embriones de ratón de aproximadamente 14 días de gestación, fue disgregado enzimáticamente. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 5 x 10⁴ células / pozo (multiplatos de 48 pozos) en medio MLS sin o con HC a diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml de hormona). El efecto de la HC sobre la formación de las NE se

evaluó desde el 5º y hasta el 7º día en cultivo mediante el conteo directo del número de NE.

Resultados:

Previamente nosotros habíamos evaluado el efecto de la HC sobre el reclutamiento de la población que da origen a las NE del estriatum de embrión de ratón. En esos experimentos se demostró que la incubación de cultivos primarios con esta hormona en ausencia del EGF no estimula la formación de NE. Posteriormente, nosotros demostramos un efecto mitogénico de la HC sobre NE obtenidas mediante incubación simultánea con el EGF. En el presente trabajo, hemos continuado el análisis de este efecto mitogénico disminuyendo la densidad a la que se siembran las células obtenidas del estriatum del embrión. Bajo estas nuevas condiciones se logró confirmar el efecto mitogénico de la HC sobre las NE reclutadas por el EGF. El efecto mitogénico es estadísticamente significativo a partir del 6º día de cultivo en las concentraciones de 1, 10 y 50 ng/ml con incremento en la proliferación de NE de 23, 35 y 12%, respectivamente. Este efecto fue inhibido a partir de los 100 ng/ml hasta llegar a conteos entre 50 y 60% menores que el control con 1000 ng/ml de HC. Interesantemente, la observación de los cultivos posterior al 7º día de incubación con y sin la hormona mostró la adhesión de las NE y su posterior proliferación a partir de los bordes de las mismas, siendo este efecto mucho más evidente en los cultivos tratados con las concentraciones mitogénicas de la HC, sugiriendo que esta hormona puede seguir estimulando a esta población crónicamente. Cabe señalar que los cultivos incubados con concentraciones inhibitorias de 500 ng/ml y 1000 ng/ml de HC no presentaron adhesión ni aparente proliferación de NE posterior a los 7 días en cultivo.

Discusión:

Previamente habíamos observado el efecto inhibitorio de la HC a altas concentraciones de la hormona. Sin embargo, este se interpretó como parte del mecanismo de activación de su receptor, el cual requiere la unión de la HC a 2 moléculas del receptor. Se sabe que este mecanismo produce curvas de actividad en forma de campana debido a que altas concentraciones de la

HC promueven la formación de monómeros inactivos. Bajo estas condiciones la respuesta biológica a altas concentraciones de la HC es igual a la observada en el grupo control. Contrario a lo anteriormente mencionado, observamos una inhibición en la formación de NE por debajo de los valores del grupo control, sugiriendo un mecanismo diferente al de la dimerización del receptor de la HC. Huang y colaboradores (2004) reportaron un efecto inhibitorio de la HC sobre la afinidad del EGF a su receptor a concentraciones similares en las que nosotros observamos la inhibición en la formación de NE, sugiriendo un posible mecanismo de inhibición de la HC a través del bloqueo de la actividad del EGF.

Referencias Bibliográficas:

1. Lobie-PE, García-Aragón J, Lincoln Dt, Barnad R, Wilcox JN, Waters MJ. Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993; 74 (2):225-33.
2. Noguchi T. Effects of growth hormone on cerebral development: morphological studies. *Horm Res.* 1996; 45 (1-2):5-17.
3. Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sánchez-Franco F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 2003; 144 (3):1086-1097.
4. Reynolds A, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 1992; 12:4565-4574.
5. Iacovitti L, Donaldson A, Marshall C, Soun S, Yang M. A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: studies in vitro and in vivo. *Brain Research.* 2007; 1127: 19-26.
6. Ciccolini F, Svendsen CN. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsive in mouse striatal precursor cell: Identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci.* 1998; 18: 7869-80.
7. Juárez Aguilar E, Regalado Santiago C, Mendoza Balderas M. 2007: Efecto de la Hormona de Crecimiento sobre el aislamiento de Neuroesferas de Estriatum de Embriones de Ratón". *L Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.*
8. Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science.* 1992; 256:1677-1680.
9. Huang Y, Chang Y, Wang X, Jiang J, Stuart JF. Growth Hormone alters epidermal growth factor receptor binding affinity via activation of extracellular signal-regulated kinases in 3T3-F442A cells. *Endocrinology.* 2004; 145:3297-3306.