

Identificación de blancos moleculares para inducir neuroprotección y neuroregeneración en retina

Zulma Selene Becerra Rosales¹ y Carlos Guillermo Martínez Moreno²

¹Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Zacatecas. “Francisco García Salinas”. Zacatecas, Zac. México.

²Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México.

Resumen

La hormona de crecimiento (GH) se expresa en una amplia variedad de tejidos extrahipofisarios, incluido el sistema nervioso y tejidos oculares, particularmente en células neuroretinales. En el tejido retiniano, tanto la GH como su receptor se encuentran presentes, esto sugiere, además de la acción de la GH circulante, efectos autocrinos y paracrinos. La retina de las aves conserva la capacidad de neuroregeneración parcial, este fenómeno involucra la transdiferenciación de las células de Müller (gliales) y la proliferación de células progenitoras del nicho de los cuerpos cilares. La participación de la GH en este proceso neuroregenerado es desconocido, por lo que se analizaron marcadores moleculares en células de la neuroretina, los cuales revelan la presencia de neuronas maduras e inmaduras, utilizando NeuN y doblecortina (DCX) respectivamente. Después de un daño ocasionado por la administración de ácido kaínico (excitotoxicidad), se evaluó por medio de western blot cambios en las poblaciones de las células progenitoras neurales (positivas a DCX) y neuronas maduras (NeuN) en extractos de retinas de pollos neonatos. Se determinó que en retinas dañadas con kainato (KA), el tratamiento con GH induce el incremento de la inmunoreactividad para DCX pero no se observó efecto sobre NeuN. Se concluye que la GH en retinas dañadas por excitotoxicidad experimental podría inducir la formación de células progenitoras.

Palabras Clave: GH; retina; excitotoxicidad; neuroprotección.

INTRODUCCIÓN

La hormona del crecimiento (GH) se produce en la retina de peces, reptiles, aves y mamíferos, donde parece actuar como un factor de crecimiento y diferenciación a través de efectos locales de tipo autócrino y parácrino. También la GH proveniente de la hipófisis tiene efectos sobre la retina, ya que es capaz de cruzar la barrera hematoretiniana para después ser internalizada en células neuroretinales (Fleming et al., 2016).

Una vez que la GH se une a su receptor (GHR), ejerce sus efectos sobre la proliferación y diferenciación en el desarrollo, y también su acción neuroprotectora sobre las células ganglionares de la retina ante un reto excitotóxico (Sanders, *et al.*, 2011; Martínez-Moreno et al., 2016). La evidencia reciente en el pollo y la iguana verde sugiere que GH es un factor neurotrófico que puede proteger contra las lesiones causadas por el ácido káinico (KA), un agonista glutamatérgico (Fleming, et al., 2018; Ávila-Mendoza et al., 2016; Martínez-Moreno et al., 2018).

La excitotoxicidad es un mecanismo que induce una marcada degeneración de las células en la capa nuclear interna de la retina y la GH es capaz de neuroproteger contra este tipo de lesión (Schwarcz, et al., 1977; Martínez-Moreno et al., 2018b).

En este trabajo utilizamos a doblecortina (DCX) como un marcador de células progenitoras de la línea neural, la cual es una fosfoproteína de ~40 kDa codificada por el gen DCX. (Ayanlaja, et al, 2017). Es una proteína asociada a microtubulos específicos del sistema nervioso, la cual, se encuentra principalmente expresada durante la migración de neuronas del sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo embrionario y postnatal (Ayanlaja, et al, 2017).

La DCX es esencial para la diferenciación neuronal y la migración de neuronas humanas en virtud de su participación en la estabilización de los microtubulos (MT) (Ayanlaja, et al, 2017). Se expresa altamente en el axón de las neuronas y puede regular MTs en respuesta a las señales extracelulares en estas zonas distales para facilitar la identificación durante el desarrollo (Ayanlaja, et al, 2017). La DCX es un factor determinante en la formación del cono de crecimiento, extensión dendrítica, nuclear translocación, y también previene

defectos de nucleocinesis. Se ha demostrado que DCX influye en la estructura de MTs ya que facilita la unión de protofilamentos (pfs) e inhibe la despolimerización (Ayanlaja, et al, 2017).

La proteína NeuN se localiza en núcleos y citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas maduras en el sistema nervioso (Gusel, et al, 2015). Por otra parte, la proteína nunca se ha detectado en células gliales, lo que sugiere que es un marcador específico neuronal (Gusel, et al, 2015).

Estudios posteriores han demostrado que los anticuerpos anti-NeuN pueden identificar la mayoría de los tipos de neuronas en todo el sistema nervioso con raras excepciones (Gusel, et al, 2015). Por lo tanto, las células de Cajal-Retzius en la neocorteza, algunas células cerebelosas (incluidas las células de Purkinje), oliva inferior neuronas, células de la capa nuclear interna de la retina, neuronas motoras γ en la médula espinal y células ganglionares de la cadena simpática no son inmunohistoquímicamente teñidas con anticuerpos a NeuN (Gusel, et al, 2015).

Estudios han proporcionado una nueva visión en el papel neurogénico de GH, demostrando que la deficiencia de GH / IGF-I reduce la supervivencia de las neuronas granulares recién generadas sin influir en la proliferación o diferenciación neuronal en el giro dentado adulto (Lichtenwalner, et al, 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios de los marcadores moleculares, NeuN y doblecortina (DCX) con respecto a la administración de ácido kaínico y GH, para determinar si dicha hormona tiene un efecto neuroprotector en la retina después del daño ocasionado. Este trabajo se desarrolló estudiando la retina de pollos a los cuales se les administraron dosis de kainato a diferentes tiempos.

MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 17. Diseño experimental.

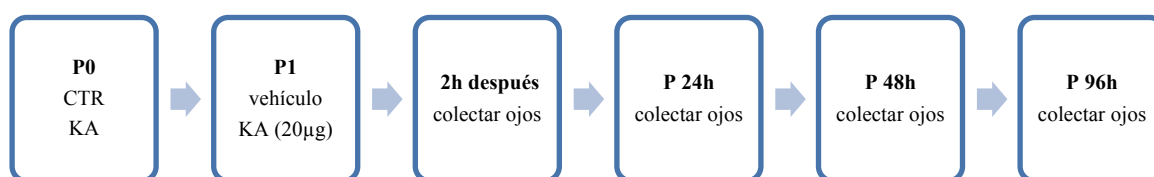


Figura 18. Tratamiento con KA.

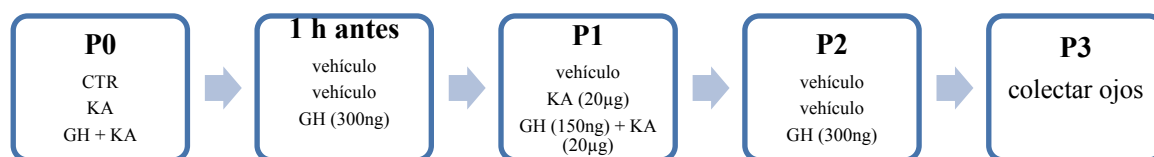


Figura 19. Tratamiento con GH + KA.

Extracción: Las proteínas de las neuroretinas de pollo se extrajeron mediante sonicación y homogeneización.

Cuantificación de proteínas: Se utilizó el método de Bradford para cuantificar la concentración de proteínas existentes en los homogeneizados de retina. Se hizo una curva patrón, los intervalos de las concentraciones utilizadas fueron de 0 a 20 µg/ml. El volumen final de las muestras con agua fue de 800 µl, y se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Una vez hecha la mezcla, se incubó durante 20 min a temperatura ambiente.

Después se cuantificó en el espectrofotómetro de luz UV/Vis (Beckman Coulter DU 730) (Bradford 1976).

Electroforesis: Análisis electroforético unidimensional en geles de poliacrilamida (12.5%) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), utilizando condiciones reductoras (en presencia de β -mercaptoetanol), solubilizando las muestras en un volumen total de 30 μ l. Se hizo la electroforesis con un amortiguador de corrida con TRIS-base 25 mM (Bio-Rad), glicina 192 mM (Bio-Rad), SDS (5 g/l), y pH 8.3, aplicando 150 V.

Western Blot: Una vez terminada la electroforesis, se equilibraron los geles y las membranas de nitrocelulosa con amortiguador de transferencia compuesto de TRIS 25 mM (Bio-Rad), glicina 192 mM (Bio-Rad), metanol 20% (Baker), con pH 8.3. Se realizó la electrotransferencia a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante una hora, aplicando 200 mA. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Bio-Rad) en TBS (TRIS 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5), durante una hora y se hicieron 3 lavados subsiguientes con TTBS (Tween 20 al 0.05% en TBS). Se llevó a cabo la inmunotinción de las proteínas de interés, incubando toda la noche, con el correspondiente anticuerpo diluido con leche descremada al 1%, a 4 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: NeuN (1:2000), DCx (1:2000). Posteriormente se lavaron las membranas con TTBS, 3 veces, en intervalos de 10 min.

Luego se incubó durante 2 h con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo para DCx y anti-IgG de ratón para NeuN [1:6000]) que correspondiera al anticuerpo primario utilizado, diluido con leche descremada al 1% en TTBS, a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagaron las membranas con TTBS, en intervalos de 10 min. Finalmente, las proteínas inmunorreactivas fueron reveladas utilizando un sustrato ECL quimioluminiscente (Amersham/ Accesolab), colocando las membranas en un cassette para revelado (Kodak) y exponiéndolas a una película fotográfica (BioMax de Kodak) en la oscuridad (Towbin *et al.*, 1979).

Análisis estadístico: Se llevó a cabo el análisis densitométrico de los luminogramas empleando el programa Image Lab (Bio-Rad). Posteriormente el análisis estadístico mediante el programa GraphPad Prism.

RESULTADOS

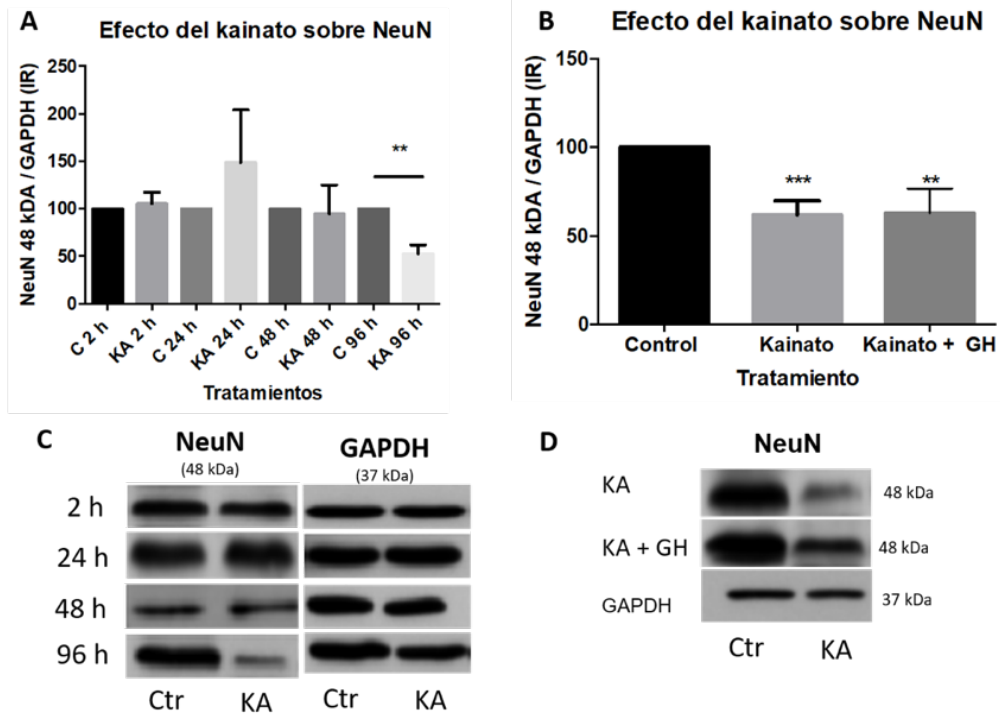


Figura 20. Inmunoblot de NeuN y GAPDH. Se obtuvo una banda cercana a 48 kDa para NeuN y de 37 kDa para GAPDH, (n=6), cada barra representa la media \pm error estándar ** $P < 0.01$ *** $P < 0.005$.

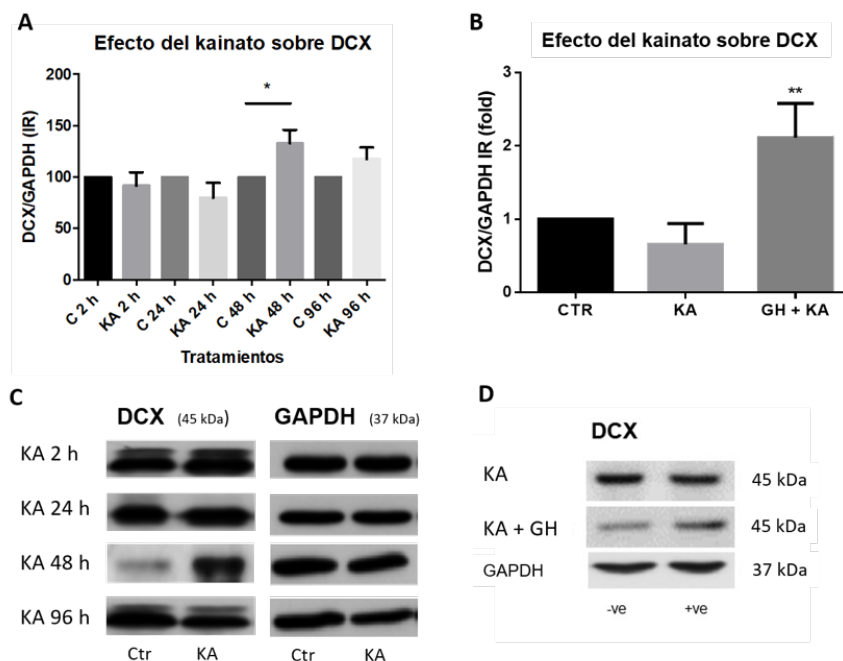


Figura 21. Inmunoblot de Doblecortina (DCX) y GAPDH. Se obtuvo una banda cercana a 45 kDa para DCX y de 37 kDa para GAPDH, (n=6), cada barra representa la media \pm error estándar * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

En la figura 4 se muestran los análisis de inmunoreactividad (densitometría) y luminogramas representativos para NeuN. En la gráfica 4A se observa un decremento significativo ($P < 0.01$) para el grupo de las retinas dañadas con KA a 96 h con respecto a su control y no se observaron cambios significativos en los otros tiempos, aunque se observa una tendencia a aumentar a las 24 h. En la gráfica 4B, se observa una diferencia significativa ($P < 0.005$) del grupo tratado con KA con respecto al control y una diferencia significativa ($P < 0.01$) del grupo tratado con KA + GH con respecto al control, en ambos casos la inmunoreactividad disminuyó. En la 4C y 4D se muestran los luminogramas representativos de las bandas inmunioreactivas de NeuN de 48 kDa y como control de carga GAPDH de 37 kDa.

En la figura 5, se muestran los análisis de inmunoreactividad para DCX. En la gráfica 5A se muestra un incremento significativo ($P < 0.05$) para las retinas dañadas con KA a 48 h con respecto a su control. En la 5B se observó un incremento significativo ($P < 0.01$) de la inmunoreactividad a DCX en el grupo tratado con KA + GH, lo anterior, con respecto al control. En la 5C y 5D se muestran los luminogramas de las bandas inmunioreactivas de DCX de 45 kDa y como control de carga GAPDH de 37 kDa.

CONCLUSIONES

Se logró establecer que la GH es capaz de promover el fenotipo de células progenitoras neurales en el modelo de daño excitotóxico experimental. Las retinas de pollo neonato dañadas con KA mostraron un incremento espontáneo de DCX específicamente a las 48 h, interesantemente se logró detectar un incremento de DCX a las 96 h en las retinas tratadas con GH. La pérdida de neuronas maduras se observó a las 96 h y la GH no fue capaz de aumentar ni de mantener los niveles normales de este marcador.

La GH, tanto de aporte hipofisiario como local, tienen efectos protectores y regeneradores en las células de la neuroretina.

REFERENCIAS

- Ayanlaja A. Xion Y., Gao Y., “Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility”, 2017, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10:199 1-13
- Bradford M. M., “A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein- Dye Binding”, 1976, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. PMID: 942051.
- Fleming T., Martínez-Moreno C. G., Carranza M., Luna M., Harvey S., Arámburo C., “Growth hormone promotes synaptogenesis and protects neuroretinal dendrites against kainic acid (KA) induced damage”, 2018, *General and comparative endocrinology*, PMID: 29454595.
- Gusel’nikova, D. E. Korzhevskiy, “NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker”, 2015, *Acta Naturae* 7:42-47
- Robin J. Lichtenwalner, M. Elizabeth Forbes, William E. Sonntag, and David R. Riddle., “Adult-Onset Deficiency in Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Decreases Survival of Dentate Granule Neurons: Insights Into the Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis”, 2006, *Journal of Neuroscience Research* 83:199–210

Sanders E. J., Baudet M. L., Parker E., Harvey S., “Signaling mechanism mediating local GH action in the neural retina of the chick embryo”, 2009c, General and comparative endocrinology, 163 (1-2); 63-69

Towbin H., Staehelin T., Gordon J., “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”, 1979, Proceeding of the National Academy of Science of the USA, 4350-4354. PMID: 1422008.