



6
ZEJ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**

**REGULACION NEUROTROFICA POR FACTORES
DE CRECIMIENTO EN CELULAS GnRHERGICAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:

ALEJANDRA LOCHOA ZARZOSA

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE, 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M., bajo la asesoría del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, y con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, (DGAPA, proyecto IN200393) y la Coordinación de Apoyo a Programas Académicos.

***"... porque la simple búsqueda de conocimiento
le da sentido a nuestra esencia humana..."
(A.O.Z.)***

AGRADECIMIENTOS

A Gonzalo, por guiarme en este difícil y apasionante camino hacia el conocimiento.

A los Drs. Marco A. Carbón, Luis Covarrubias, Horacio Merchant y Miguel Morales, por sus comentarios y críticas acerca de éste trabajo.

Al Dr. Carlos Larralde, por enriquecer mi formación académica y personal.

Al Dr. Enrique Chávez, por su ayuda en la comprensión y aceptación de mi esencia.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio, por hacer del mismo algo que un lugar de trabajo: Alfonso, Ana, Citlali, María del Mar, Gino, Zulma, Clelia, Francisco, Salvador, Luz, Luis, María Elena, Julieta, Eva, Emilio, Dirk, Roberto Nájera por supuesto a la Dra. Carmen Clapp.

Al tipo, Gabriel y Alejandro, por su ayuda técnica y amistad de todo momento.

A mis compañeros de batalla durante éstos últimos años, por alimentar mi espíritu académico y personal, y por su amistad: Carla, Gabi J., Gino, Lucia, Mario, Norma y Tania.

A todos y cada uno de mis maestros, porque de alguna forma han sido los responsables de lo que soy ahora.

A mis amigos, sin más palabras (cada uno de ellos sabe por qué): Gabi G., Carla, Montes, Olivia, Cielo, Mari, Camilo.

A Sara y a Xóchitl, por su cariño y apoyo (en su modo muy particular de demostrarlo).

A Josefina, por todo lo que me ha dado, pero principalmente por su infinito amor.

A Papi Lolo, porque su cariño siempre estará conmigo.

A Rosa, antes que nada por permitirme ser YO, por su inmenso amor y cariño, por su comprensión y por su ayuda de ayer, hoy y siempre.

A Bernardo, por lo que hemos aprendido juntos en cada día de todos éstos años como pareja y como compañeros, por permitirme crecer como ser humano y como profesional, pero principalmente por su amor y ayuda infinitos.

A la Universidad, sin más palabras.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	3
1.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas	3
A) Hipotálamo	4
B) Hipófisis	4
*Adenohipófisis	4
C) Sistema portal Hipotálamo-Hipofisario	5
2.- Las neuronas GnRHérgicas	6
A) Origen	6
B) Redes GnRHérgicas	7
C) Morfología	7
D) Síntesis y secreción de GnRH	8
E) Neuronas GT1	8
II.- ANTECEDENTES	10
1.- Efecto de diversos fármacos activadores de vías de señalización intracelular sobre la división y la diferenciación en líneas celulares.	10
2.- Efecto de factores de crecimiento sobre la división y la diferenciación en líneas celulares.	11
3.- Estudios en las neuronas GnRHérgicas.	12
III.- OBJETIVOS	14
1.- Objetivo general	14
2.- Objetivos particulares	14

IV.- MATERIAL Y METODOS	15
1.- Cultivo celular	15
2.- Condiciones experimentales	15
3.- Conteo de neuritas	16
4.- Preparación del RNA	16
5.- Análisis del RNA mensajero mediante Northern Blot	17
6.- División celular	17
V.- RESULTADOS	19
1.- Diferenciación	19
A) Extensión de neuritas	19
* Fármacos	19
** Factores de crecimiento	19
2.- Expresión del mRNA para GnRH y Antígeno T	20
3.- División celular	21
A) Fármacos	21
B) Factores de crecimiento	22
SECCION DE FIGURAS	23
VI.- DISCUSION	24
VII.- CONCLUSIONES	33
Adj. Índice I	34
Factores de crecimiento: estructura, función y receptores	35
A) Factor de Crecimiento Neural (NGF)	35
* Receptor para el NGF (NGFR)	36

** Transducción de señales por el NGFR	36
B) Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF)	37
* Receptor para el bFGF (bFGFR)	38
** Transducción de señales por el bFGFR	38
C) Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1 (IGF-1)	39
* Receptor para el IGF-1 (IGF-1R)	39
** Transducción de señales por el IGF-1	40
D) Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Transformante α (TGF- α)	40
* Receptor para el EGF (EGF-R)	41
** Transducción de señales por el EGF-R	42

Apéndice 2	43
-------------------	-----------

División y diferenciación neuronal	44
A) División celular	44
B) Diferenciación celular	46

VIII.- REFERENCIAS	48
---------------------------	-----------

RESUMEN

Un papel protagónico en la función reproductiva de la mayoría de los vertebrados lo juega la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), la cual es secretada por neuronas hipotalámicas. Hasta el momento se desconocen las señales que permiten el establecimiento de las redes neuronales GnRHérgicas, ya que su distribución es difusa y su número es escaso. Con la creación de una línea neuronal GnRHérgica (línea GT1), la naturaleza de éstas señales neurotróficas ya puede ser explorada.

En este trabajo, utilizamos células de la clona GT1-1, las cuales fueron tratadas con los siguientes factores de crecimiento: el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) 50 ng/ml, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF) 50 ng/ml, el Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1 (IGF-1) 10 ng/ml, el Factor de Crecimiento Transformante α (TGF- α) 10 ng/ml y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) 10 ng/ml. Estos tratamientos se realizaron durante 24 horas, y con el objeto de determinar algunas de las vías de señalización celular involucradas por los mismos, se trataron a las células con activadores de algunas de ellas: TPA 2.5 nM (activador de la Proteína Cinasa C (PKC)) y forskolina 10 μ M (activador de la vía de la Proteína Cinasa A (PKA)). El objetivo de los tratamientos anteriores, fue elucidar la regulación que ejercen los factores de crecimiento sobre la diferenciación, determinada por la expresión de GnRH mediante análisis de Northern Blot y por el conteo manual de la extensión de neuritas, y sobre la proliferación, determinada por la incorporación de 3 H-timidina de las neuronas GT1-1. De igual forma, se determinó la regulación que ejercen los distintos factores de crecimiento sobre la expresión del Antígeno T, ya que las células GT1 fueron transformadas con SV40.

Nuestros resultados muestran que los factores de crecimiento, ejercen tres distintas clases de regulación sobre la diferenciación y la proliferación de las células GT1-1: en la primera de ellas se observa que mientras se favorece un proceso, el otro se inhibe; por lo que constituye una regulación inversa. En el segundo tipo se observa que se favorecen eventos proliferativos, mientras que

los diferenciadores no se modifican en algunos de los parámetros considerados. Finalmente se detecta que tanto la proliferación como la diferenciación se promueven con el mismo estímulo, lo que constituiría una regulación paralela. De igual forma, nuestros datos muestran que la vía de la PKC está involucrada con eventos de la diferenciación de las neuronas GT1-1 y que, algunos de los factores de crecimiento utilizados en éste trabajo, recurren a ésta vía para regular la diferenciación y la proliferación de éstas células. Detectamos, que la regulación de la expresión de GnRH y del Ag T, no va en paralelo, lo cual nos permite indicar que el efecto que observamos de éstos factores de crecimiento sobre la diferenciación y la proliferación de las células GT1-1, puede ser muy diferente a la regulación que ejercen los mismos sobre las neuronas GnRHérgicas *in vivo*.

I.- INTRODUCCION

La reproducción es una función de vital importancia, ya que permite la continuidad de las especies, desde las más simples hasta las más complejas. En los vertebrados, la reproducción involucra, entre otros aspectos la comunicación neuroendócrina entre distintas estructuras. Un papel protagónico en este evento lo juega el decapeptido denominado Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), el cual, como se describe en las siguientes secciones, regula la reproducción. Esto lo realiza a través de la regulación de la secreción de gonadotropinas hipofisarias y de la conducta sexual. Es por esto, que un problema fundamental en la neurobiología es el estudio del establecimiento y el funcionamiento de las redes del sistema neurosecretor de GnRH como parte de un complejo circuito en el que participan diversos órganos y sistemas, y cuyo eje fundamental es el compuesto por el Sistema Nervioso central (SNC), la hipófisis y las gónadas.

1.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas

Como se mencionó anteriormente, este eje regula la función reproductiva, cuya vía final común es el disparo de GnRH. Es por esto que a continuación se describen las principales características de algunas de estas estructuras, enfatizando el papel que desempeñan ya sea secretando o respondiendo a GnRH:

A) Hipotálamo

Está compuesto por distintos tipos de neuronas, algunas de las cuales se agrupan en núcleos definidos. Estas neuronas hipotálamicas forman sistemas neurosecretores reguladores muy importantes, y entre algunos de los productos que secretan encontramos: vasopresina (AVP), oxitocina (OT), Hormona Liberadora de Hormona de Crecimiento (GHRH), Proopiomelanocortina (POMC), Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH), Somatostatina (SRIF), Factor liberador de Corticotropina (CRF), Dopamina (DA), Norepinefrina (NE), Epinefrina (E), Histamina (5-HT), Glutamato (GLUT), ácido gamma-amino-butírico (GABA), Neuropeptido Y (NP-Y), Substancia P (SP), y GnRH. Muchos de estos productos,

como es el caso de GnRH, van a actuar sobre la hipófisis regulando de esta manera la secreción de las hormonas que esta última sintetiza (Harris, G.W., 1948, revisado en Everett, J.P, 1994 y Page, R.B., 1994).

B) Hipófisis

La hipófisis es una glándula que sintetiza y secreta diversas hormonas, en respuesta a muchos de los factores provenientes del hipotálamo, funcionando, por lo tanto como un relevo y amplificador de las señales neuroendócrinas. En el caso de la GnRH, la hipófisis responde produciendo las dos gonadotropinas: la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Estimuladora de Folículo (FSH), como se verá más adelante. Esta glándula ha sido clasificada bajo un criterio anatómico, en base a las estructuras que la conforman, y bajo un criterio funcional, en base a los productos que sintetiza y secreta. Considerando éste último criterio, la hipófisis se divide en dos principales estructuras: adenohipófisis y neurohipófisis. La adenohipófisis es la estructura glandular que produce diversas hormonas; sus principales características se describen a continuación:

***Adenohipófisis**

En términos generales, y a pesar de que se pueden presentar diferencias entre especies, se han logrado identificar siete hormonas secretadas por distintas poblaciones celulares localizadas en esta estructura: la Hormona Estimuladora de la Tiroides (TSH), la Prolactina (PRL), la Hormona del Crecimiento (GH), la Adrenocorticotropina (ACTH), la B-endorfina (B-END), y como ya se mencionó, las dos gonadotropinas LH y FSH secretadas y sintetizadas por los gonadotropos en respuesta a la GnRH. Dentro de los primeros reportes de la función hipofisaria, se encuentran los de Oliver, G. y Schafer, E.A. (1895) (revisado en Everett, J.P, 1994 y Page, R.B., 1994).

La comunicación neuroendócrina desde el hipotálamo hasta la adenohipófisis, requiere de un sistema de transporte de los factores hipotalámicos de estimulación e inhibición hacia la glándula (como es el caso de la GnRH), el cual se describe a continuación:

C) Sistema Portal Hipotálamo-Hipofisario

Los capilares y vasos portales de la hipófisis transportan los nutrientes y péptidos necesarios para el funcionamiento de la adenohipófisis. Una vez que las hormonas abandonan el torrente sanguíneo, estas interactúan con los receptores apropiados en la hipófisis anterior, regulando de ésta manera la liberación de las hormonas peptídicas que la misma produce, las cuales entran a los capilares, y de ahí son transportados hacia sus órganos blanco. En el caso de la GnRH, ésta estimula la liberación adenohipofisaria de LH y FSH, las cuales a su vez, actúan principalmente en las gónadas. Los primeros reportes de la existencia de un Sistema Portal Hipotálamo-Hipofisario fueron de Papa, G.T. y colaboradores (1930) (revisado en Everett, J.P., 1994 y Page, R.B., 1994).

Lo anterior permite ejemplificar la integración del Eje Hipotálamo-Hipofisis-Gónadas, con el control del ciclo ovárico, en donde, como ya se mencionó, la secreción de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH está controlada por el SNC a través de la secreción de GnRH. La liberación de la misma desde el hipotálamo, es influenciada por factores externos (estímulos del medio ambiente) e internos (regulación hormonal, de neurotransmisores, etc.), y se controla por mecanismos de retroalimentación tanto positivos como negativos provenientes de la secreción ovárica de estrógenos y progesterona, estimulada por los niveles de gonadotropinas. Dentro de los principales trabajos relacionados con la función de la hipófisis en la reproducción se encuentran los de Smith, P.E. y Engle, E.T. (1927) (revisado en Everett, J.P., 1994 y Page, R.B., 1994).

2.- Las neuronas GnRHérgicas

A) Origen

El sistema neurosecretor GnRHérgico es muy difuso ya que contiene neuronas dispersas en diversas regiones, por lo cual se pueden estar integrando varios tipos de información.

Recientemente se demostró, que éstas neuronas comienzan a diferenciarse en una estructura localizada en el cerebro anterior denominada la placa olfatoria. Posterior a su diferenciación, migran a través del septum nasal y entran al cerebro anterior ventral, para luego migrar caudalmente y establecerse en las regiones septal, preóptica y anterior del hipotálamo (Silvermann, A.J. et al, 1994).

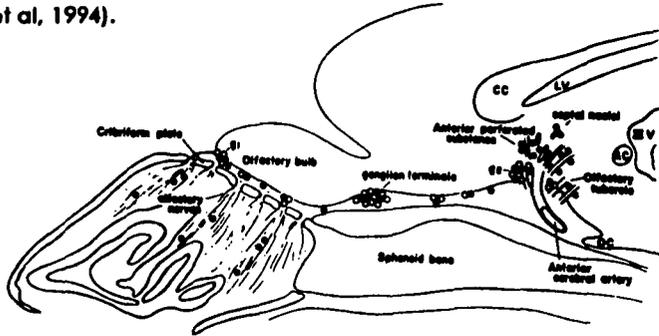
La mayor parte de los estudios relacionados con el origen de las neuronas secretoras de GnRH, se realizaron en el ratón, pero diversos trabajos permiten suponer que el origen en la placa olfatoria, y la posterior migración de las neuronas, son procesos que ocurren de forma general en todos los mamíferos (Silvermann, A.J. et al, 1994).

Por lo que respecta a la expresión del gene de GnRH, se sabe que en ratones comienza a ocurrir en el día 11.5 del desarrollo embrionario (para cuestiones de nomenclatura se abrevia como E11.5), y alrededor de E12.5 el número de células que sintetizan GnRH en el septum nasal es similar al que se encuentra en adultos en el cerebro anterior (Silvermann, A.J. et al, 1994).

Mientras estas neuronas migran a través de un SNC que está en desarrollo, elaboran procesos axonales, algunos de los cuales van a establecerse en lo que será la eminencia media (Silvermann, A.J. et al, 1994).

En todos los mamíferos estudiados, se encuentran distintas subpoblaciones de neuronas GnRHérgicas dentro del SNC. Estas neuronas no se localizan dentro de núcleos establecidos, sino que aparecen como integrantes de redes neuronales difusas que se extienden a través de varias estructuras bien definidas. La red más prominente, y por lo tanto la que se propone como la que más contribuye a la regulación de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, es aquella que se compone de neuronas que forman un continuo difuso y que se extiende desde la banda diagonal telencefálica de Broca, hacia

áreas septales más dorsales y hacia la *stria terminalis* y áreas diencefálicas. Entre éstas últimas, podemos encontrar el área periventricular, preóptica medial y lateral, hipotálamo anterior y zona retroquiasmática (Esquema 1) (Silvermann, A.J. et al, 1994).



ESQUEMA 1: Se representa la distribución de las neuronas GnRHérgicas de un cerebro de cobayo de 45 días. Los puntos negros (e) representan las neuronas GnRHérgicas inmunoreactivas, y los puntos blancos (o) representan los cuerpos celulares de otras neuronas que no resultaron positivas al anticuerpo contra GnRH (Tomado de Silvermann, A.J. et al, 1994).

B) Redes GnRHérgicas

La proyección más prominente de éstas neuronas, es hacia la eminencia media. El camino hacia esta estructura se presenta por más de una ruta, la principal, en casi todas las especies estudiadas, es la vía septo-preóptica infundibular. De igual forma, éstas neuronas emiten proyecciones hacia órganos circumventriculares, principalmente hacia el órgano vasculoso de la lámina terminal, pero se desconoce como está involucrada esta estructura con la secreción de gonadotropinas. Fibras de una sola neurona pueden proyectar a múltiples sitios dentro y fuera del SNC, y algunas neuronas se encuentran asociadas con distintas estructuras olfativas, las cuales pueden tener una función en la conducta reproductiva a través de la comunicación con feromonas (Silvermann, A.J. et al, 1994).

C) Morfología

En la mayoría de las especies estudiadas, las neuronas GnRHérgicas tienen forma oval con un diámetro de entre 10 y 20 μm . Los procesos dendríticos

que extienden pueden ser simples sin ramificaciones y extenderse a partir de un solo polo o de ambos de la célula. Los axones pueden provenir del cuerpo celular o de una dendrita. Estudios ultraestructurales, han demostrado sinapsis axosomáticas y axodendríticas entre neuronas secretoras de GnRH, aunque también forman sinapsis con otros tipos de neuronas. Con respecto a las aferencias de las neuronas GnRHérgicas, se han encontrado terminales que contienen dopamina, serotonina, B-endorfina, GABA, vasopresina y glutamato (Silvermann, A.J. et al, 1994).

D) Síntesis y secreción de GnRH

La síntesis y la secreción de GnRH es modulada, entre otros factores, por neuronas localizadas en el cerebro anterior, medio y posterior, las cuales actúan en forma directa sobre las neuronas GnRHérgicas o, de manera indirecta, sobre otras neuronas que modulan la actividad de estas últimas. Dentro de las terminales sinápticas que se han encontrado sobre las neuronas GnRHérgicas se encuentran aquellas provenientes de neuronas secretoras de dopamina, serotonina, B-endorfina, GABA, vasopresina y glutamato. Además de la influencia neuronal sobre éstas células, también se presenta una regulación endocrina proveniente de las gónadas, vía interneuronas, ya que no se han encontrado receptores a estrógenos en neuronas GnRHérgicas (Silvermann, A.J. et al, 1994). De manera semejante a como ocurre con otros péptidos producidos por el SN, la GnRH se sintetiza en los cuerpos celulares de las neuronas GnRHérgicas; se empaqueta en vesículas granulares que se encuentran en el aparato de Golgi para finalmente ser transportada a lo largo del axón, en cuya terminal se almacena, y posteriormente se libera en respuesta a los diversos estímulos (Fink, G.,1988).

E) NEURONAS GT1

Hasta este momento he enfatizado la función que ejerce el Sistema Neurosecretor GnRHérgico sobre la reproducción y he descrito algunas de sus características. Sin embargo, como mencioné, este sistema es difuso y escaso, por lo que se dificulta su acceso experimental. Es por esto, que no se han podido explorar muchas de las señales concernientes a la regulación de la reproducción (parámetro que se complica por el carácter neuronal de las

células ya que las neuronas se encuentran en fase Go del ciclo celular (Apéndice 2) y la diferenciación de estas neuronas. Con la reciente creación de una línea celular productora y secretora de GnRH muchas preguntas relacionadas con el desarrollo de estas neuronas podrán obtener respuesta.

La creación de esta línea se realizó mediante inducción genética de tumores (Mellon, P. et al, 1990). Para llevar a cabo lo anterior, se introdujo un gene híbrido en ratones. Este gene está compuesto por el promotor para la GnRH acoplado a una región que codifica para el producto del oncogene del antígeno-T (AgT) del virus del simio 40 (SV40). La línea celular, denominada GT1, se obtuvo de un solo ratón macho cuyo tumor hipotalámico expresaba los ARNm para GnRH y para el antígeno T. Se obtuvieron tres clonas de este tumor: GT1-1, GT1-3 y GT1-7, las cuales presentan un fenotipo neuronal pero con distintas características entre cada una de ellas: las GT1-1 expresan en mayor cantidad el ARNm para GnRH y extienden pocas neuritas, las GT1-7 extienden una gran cantidad de neuritas y expresan en menor cantidad el ARNm de GnRH con respecto a las GT1-1, mientras que las GT1-3 son una clona intermedia entre las dos anteriores, que presentan un poco más de apariencia neuronal (Weiner, R.I. et al, 1992). Desde el establecimiento de las clonas, se puede apreciar una relación inversa entre la extensión de neuritas y la secreción de GnRH.

Se ha logrado determinar que las células GT1 secretan GnRH en forma pulsátil de manera semejante a lo que ocurre *in vivo*, con pulsos que tienen una frecuencia de uno cada 25.8 minutos (Martínez de la Escalera, G. et al, 1992). Esta es una propiedad intrínseca de las células (Wetsel, W.C. et al, 1992), regulada entre otros factores, por la propia hormona, ya que se han encontrado receptores a la misma en células GT1-7 (Krsmanovic, L.Z. et al, 1993). Por otra parte, se han explorado algunos de los reguladores de la secreción de GnRH, y de igual manera, las vías de señalización intracelular por las que actúan. Dentro de los principales trabajos concernientes a este aspecto se encuentran aquellos que describen el efecto de la norepinefrina, la cual actúa a través de receptores B1 en células GT1-1 (Martínez de la Escalera, G. et al, 1992, *Endocrinology* (a)) y de la dopamina, la cual estimula la secreción en estas mismas células por medio de receptores D1 (Martínez de la Escalera, G. et al, 1992, *Endocrinology* (b)). Ambos receptores están acoplados positivamente a la adenilato ciclasa. El efecto de la vía de los fosfatos de inositol sobre la secreción de GnRH también se ha estudiado. El trabajo de Noris y colaboradores (1995) reporta que la secreción de esta hormona involucra la activación de esta vía en

respuesta a la histamina a través de receptores H1 en células GT1-1. Con respecto a la función de otros neurotransmisores, se encontró que el efecto de GABA es bifásico, ya que estimula la secreción de GnRH a través de los receptores GABA_A, pero la inhibe por medio de los GABA_B (Martínez de la Escalera, G. et al, 1994). El glutamato estimula la secreción de GnRH en células GT1-7 e incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular (Mahachoklertwattana P. et al, 1994).

II.- ANTECEDENTES

1.- Efecto de diversos fármacos activadores de vías de señalización intracelular sobre la división y la diferenciación en líneas celulares

Existen varios estudios en diferentes modelos celulares sobre la participación de diversas vías de señalización intracelular en la diferenciación neuronal. Tal es el caso de la línea celular de feocromocitoma de rata PC12, o de distintas líneas de neuroblastoma (de humano, de rata o de ratón). En estos modelos se ha probado, principalmente, la participación de dos cascadas de señalización sobre la extensión de neuritas: la que involucra a la cinasa de proteínas A (PKA), y la que involucra a la PKC.

La línea celular PC12 se ha utilizado exhaustivamente como modelo de estudio de la diferenciación neuronal debido al fenotipo de neuronas simpáticas que adquiere cuando se le trata con diversos activadores. Dentro de los principales estudios en los que se ha observado el efecto de la vía de la PKA, destacan los de Schubert y colaboradores (1977) en los que comprueba el efecto diferenciador al utilizar análogos de AMP cíclico (cAMP) y activadores de la adenilato ciclasa, y también se ha comprobado el efecto positivo de otros nucleótidos cíclicos sobre éste parámetro. Este mismo efecto se observó por el grupo de Furmanski (1971) en la línea de neuroblastoma de ratón C1300 al inducir en esta eventos de diferenciación con un análogo del cAMP, dibutilil AMP cíclico, a una dosis de 1 mM durante 24 horas.

En relación a la función diferenciadora de la PKC sobre líneas de neuroblastoma se encuentran los trabajos de Pahlman y colaboradores (1981) en los que utiliza la línea de neuroblastoma humana SK-N-SH, y observa

diferenciación fenotípica y bioquímica al utilizar TPA a una concentración de 16 nM durante 72 horas de tratamiento.

2.- Efecto de factores de crecimiento sobre la división y la diferenciación en líneas celulares

Dentro de esta sección se mencionarán los principales trabajos relacionados con la acción diferenciadora de varios factores de crecimiento en especial sobre la neurogénesis en los modelos de líneas celulares mencionados anteriormente.

Los estudios de Greene y Tischler (1976) demuestran que cuando células PC12 crecen en presencia del NGF (50 ng/ml) durante 24 horas, se diferencian en neuronas de tipo simpático al extender neuritas funcionales, y mientras realizan este proceso dejan de dividirse.

Togari y colaboradores (1983) demostraron el mismo efecto que el ejercido por el NGF sobre las células PC12, tanto a nivel morfológico como bioquímico, utilizando bFGF a una concentración de 50 ng/ml y observando el efecto a las 72 horas.

Huff y colaboradores (1981) reportaron que células PC12 tratadas con el factor de crecimiento epidérmico a una dosis de 10 ng/ml no produce extensión de neuritas pero sí ejerce efecto mitogénico sobre estas células. En relación al factor de crecimiento transformante α , y debido a la analogía funcional que presenta con el EGF por su unión al mismo receptor, se consideró que podía ejercer funciones neurotróficas. Este factor se encontró en el cerebro por Fallon y colaboradores (1984).

Los resultados con el factor de crecimiento tipo insulina 1 son controversiales, ya que el grupo de Rabinovsky (1992) encontró que en la línea de neuroblastoma humano IMR-32 este factor a una concentración de 10 ng/ml durante 24 horas no ejerce efecto sobre la proliferación celular, mientras que el grupo de Mattsson (1986) demostró en otra línea de neuroblastoma humano (SY-SY5Y) que sí tiene efecto mitogénico cuando se añade a una dosis de 30 ng/ml durante 96 horas.

3.- Estudios en las neuronas GnRHérgicas

En relación a la diferenciación de las neuronas GnRHérgicas, Ojeda y colaboradores (1990) demostraron que el EGF a una dosis de 100 ng/ml estimula la secreción de GnRH en cultivos primarios de hipotálamos de rata.

Han sido pocos los trabajos relacionados con la diferenciación y la división de las neuronas GT1 ya sea por fármacos o por factores de crecimiento. Bruder y colaboradores (1992) encontraron que el tratamiento con TPA 10 nM en células de la clona GT1-7, disminuye la expresión del ARNm de GnRH con respecto a células sin tratamiento, pero al mismo tiempo, incrementa la secreción de ésta hormona. En este trabajo no se encontraron cambios fenotípicos en las células relacionados con el tratamiento con TPA. Con el objeto de determinar el efecto que ejerce el TPA sobre la PKC en las células GT1-7, ya que se ha reportado que dosis elevadas y períodos prolongados del tratamiento con el mismo inactivan a la PKC (Adams, J.C. et al, 1989) en este mismo trabajo se utilizó la estaurosporina, que es un inactivador de ésta cinasa. Los resultados que presentan sugieren que el TPA actúa en las células GT1-7 estimulando a la PKC, ya que el tratamiento con la estaurosporina en conjunto con el TPA inhibe el efecto ejercido por el ester de forbol, ya sea sobre la expresión del gene o sobre la secreción de GnRH. Hallazgos de Wetsel y colaboradores (1993) muestran resultados semejantes a los mencionados anteriormente con respecto al efecto que ejerce el TPA en las células GT1, y además reportan que el TPA a una dosis de 100 nM estimula la retracción de las neuritas extendidas en células GT1-7. Por otro lado, éste mismo grupo también estudió el efecto sobre la diferenciación de éstas neuronas al activar a la proteína adenilato ciclasa con forskolina a una dosis de 10 μ M. Sus datos sugieren que la forskolina estimula la secreción de GnRH, no modifica la expresión del ARNm de la misma, y promueve la extensión de neuritas.

Por otra parte, Zhou y colaboradores (1994) reportan que células GT1-1 no responden al NGF, ni a ninguna otra de las neurotrofinas relacionadas con este factor de crecimiento, por lo que se asumió que no expresaban el receptor de alta afinidad que se une a las mismas. Es por esto que se decidió transfectar a las células con el *trkA* para determinar la posible función que ejerce el NGF *in vivo* sobre las neuronas GnRHérgicas. Los principales efectos relacionados con la adición de este factor de crecimiento a una dosis de 100 ng/ml durante 24 horas fueron la extensión de neuritas, la inducción en la expresión del ARNm para

GnRH y el incremento en la expresión de genes de respuesta temprana como lo es c-fos.

Los estudios de Melcangi y colaboradores (1995) reportan que al añadir TGF-B a células GT1-1 se estimula la secreción de GnRH, y que al cocultivar estas neuronas con astrocitos tipo 1, se estimula de nuevo esta secreción. Una hipótesis de este grupo de trabajo es que las células gliales están ejerciendo el efecto estimulador sobre las GT1-1 a través de la secreción de TGF-B.

El reciente trabajo de Tsai y colaboradores (1995), reporta un efecto estimulador del bFGF sobre la extensión de neuritas de células GT1-7. Sus resultados también muestran que éstas neuronas expresan los receptores 1 y 3 a los que el bFGF se une.

Por otra parte, evidencias de Olson y colaboradores (1995) muestran que células GT1-7 expresan el receptor para el IGF-1. Sus resultados sugieren que el IGF-1 es un factor mitogénico para éstas neuronas.

III.- OBJETIVOS

1.- Objetivo general

En vista de que se desconocen las señales neurotróficas que permiten la proliferación, la migración y el establecimiento del sistema neurosecretor GnRHérgico, el objetivo del presente estudio fue el de elucidar los principales efectos que ejercen diversos factores de crecimiento sobre la diferenciación y la división de las células GT1.

2.- Objetivos particulares

En particular nos propusimos:

a) Identificar que factor (es) de crecimiento interviene (n) en la regulación de eventos de la diferenciación (ya sea estimulándola o inhibiéndola) de las neuronas GT1, tomando como parámetros de la misma la extensión de neuritas y la expresión de GnRH.

b) Identificar que factor (es) de crecimiento interviene (n) en la regulación de la proliferación (ya sea estimulándola o inhibiéndola) de las neuronas GT1.

c) Una vez identificados éstos factores, determinar como regulan tanto eventos de la diferenciación, como la proliferación de las células GT1, utilizando conjuntamente, activadores de vías de señalización intracelular.

IV.- MATERIAL Y METODOS

1.- Cultivo celular

La línea celular GT1-1 se cultivó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY) y 100 U/ml de penicilina-estreptomina (Gibco). Las células se sembraron en cajas de 24 pozos y en cajas petri (Costar, Cambridge, MA, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera saturada con agua con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Los subcultivos de las células se realizaron con solución balanceada de Hank con tripsina al 0.05% y EDTA 0.53 nM (Gibco). Las células se cultivaron hasta que alcanzaron el 50-70% de confluencia, y entonces el medio se reemplazó por medio definido (Opti-MEM, Gibco) sin suero durante 24 horas. Después de este tiempo se realizaron los tratamientos que se describen a continuación.

2.- Condiciones experimentales

Las células fueron tratadas durante 24 horas con los siguientes fármacos: ¹²acetato ¹³ de forbol (TPA) (SIGMA CHEMICAL CO.) a una concentración final de 2.5 nM y/o con forskolina (SIGMA CHEMICAL CO.) a una dosis final de 10 μM. Estos fármacos se disuelven en DMSO, en una concentración final del mismo de 0.1%. La elección de las dosis del TPA y de la forskolina, se realizó en base a experimentos pilotos, en los que se utilizó un rango amplio de concentraciones de ambos fármacos. La dosis elegidas fueron aquellas en las que se observó un efecto sin que se presentara daño celular. De igual manera, se elaboraron tratamientos con diversos factores de crecimiento solos y en conjunto con TPA y/o forskolina. Los factores de crecimiento y las dosis utilizadas de los mismos, fueron los siguientes: Factor de Crecimiento Nervioso 2.5S, purificado de glándula submaxilar de ratón a una dosis de 50 ng/ml, Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 humano a una dosis de 10 ng/ml, Factor de Crecimiento Epidérmico natural murino a una dosis 10 ng/ml, Factor de Crecimiento básico de Fibroblastos recombinante humano a una dosis de 10 ng/ml y el Factor de Crecimiento Transformante α recombinante humano a una dosis de 10 ng/ml. Los Factores de Crecimiento se obtuvieron de GIBCO BRL. Al igual que con los fármacos, la elección de estas dosis se determinó mediante experimentos

previos, en los que se trabajaba con dosis altas y dosis bajas de los mismos, pero siempre de acuerdo a un criterio establecido en base al efecto medio-máximo reportado por otros grupos de investigación.

La duración de todos los tratamientos anteriores fué de 24 horas, tiempo en el cual se determinó su efecto sobre eventos de la diferenciación como lo es la extensión de neuritas, y la expresión del ARNm de GnRH; de igual forma se cuantificó el efecto de los mismos sobre la proliferación celular. En vista de que en las células GT1 el antígeno T está acoplado al promotor de GnRH, también se analizó la expresión de éste oncogene con el objeto de determinar si ésta va en paralelo con la expresión de GnRH. Los métodos utilizados para llevar a cabo lo anterior se describen a continuación:

3.- Conteo de neuritas

El número de neuritas extendidas se determinó por conteo manual de fotografías (Kodak, PLUS X-Pan, ASA 125) tomadas a través de microscopía de contraste de fases de un microscopio invertido Nikon TMS con una cámara Nikon AFX-IIA, y con un aumento 50X del microscopio, al que se le multiplica por un factor de 3.6 que es el aumento de las fotografías. Las neuritas se contaron por campos fotográficos en 4-10 fotos. De igual forma, en los campos fotográficos se midió la longitud de las neuritas extendidas.

4.- Preparación del ARN

El ARN total de las células se extrajo por un método de un solo paso en el que se utiliza el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (1987). Las células se lisaron con 4 volúmenes de una solución de guanidina (4 M de tiocinato de guanidina (SIGMA CHEMICAL CO.), 0.5% de sarcosinato lauryl de sodio (SIGMA CHEMICAL CO.), 0.1 M de B-mercaptoetanol (SIGMA CHEMICAL CO.), y 25 mM de citrato de sodio (SIGMA CHEMICAL CO.) pH 7). El lisado se extrajo con fenol-cloroformo (GIBCO BRL y SIGMA CHEMICAL CO.) y el ARN se precipitó con etanol.

5.- Análisis del ARN mensajero mediante Northern blot

La concentración del ARN se determinó por absorbancia espectrofotométrica a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU 650. Las muestras se fraccionaron en geles al 1% de agarosa (Gibco) y formaldehído 1M (SIGMA), y posteriormente se transfirieron a membranas de nylon (Hybon-NTM, Amersham) mediante capilaridad con un buffer de sales compuesto por citrato de sodio 0.3M y NaCl 3M a pH 7 (SSC). Los blots se hibridaron con: el fragmento de 340 pb digerido con BamHI/HindIII (Gibco) del cDNA de GnRH de rata, el fragmento de 2.8 kb digerido con BamHI/EcoRI del cDNA del Ag T de rata, y se utilizó como control el fragmento de 800 pb digerido con BamHI del cDNA de ciclofilina de rata. Los cDNA se extrajeron de los plásmidos con una preparación a mediana escala utilizando el método descrito por Sambrook y colaboradores (1989) de lisis mediante ebullición, al que se le añadieron 100 mg de ARNasa A (Boehringer). La extracción del plásmido se realizó con fenol-cloroformo. Para la purificación del fragmento, se separó el DNA en un gel de agarosa-bromo de etidio, y se cortó con las enzimas adecuadas. Posteriormente, se cortó la banda deseada con ayuda de una lámpara de UV y mediante congelación en nitrógeno líquido se extrajo el fragmento añadiendo LiCl 4 M, el cual posteriormente, se extrajo con fenol-cloroformo.

Las sondas se marcaron con (α - 32 P)deoxy-ATP (New England Nuclear) por el método de primeros al azar descrito por Feinberg y Vogelstein (1983). El blot se hibridó durante toda la noche con las respectivas sondas a 42 °C y se lavó durante 20 minutos a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0.1%. Posteriormente se realizaron tres lavados de SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 20 minutos a 50 °C. El blot se dejó exponiendo en una película de rayos-X (Kodak X-OMAT) con una pantalla intensificadora a -70 °C.

6.- División celular

El índice mitótico, se determinó por incorporación de 3 H-timidina (Amersham International plc). Las células crecidas en placas de 24 pozos, se incubaron durante 4 horas con 500 000 cpm/pozo de 3 H-timidina. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con una incubación con ácido tricloroacético (TCA) al 5% durante 20 minutos a -20 °C. El precipitado se lavó 3 veces con este reactivo. Para solubilizar las proteínas precipitadas, se añadieron 0.5 ml de NaOH

0.25 N y se agitaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente el precipitado, en el cual se encuentra el DNA marcado, se colectó en viales de centelleo, añadiendo 3.5 ml de solución de centelleo (RPI, Mount Prospect, IL, USA) y se contaron en un contador de emisiones B Beckman LS 6500.

0.25 N y se agitaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente el precipitado, en el cual se encuentra el DNA marcado, se colectó en viales de centelleo, añadiendo 3.5 ml de solución de centelleo (RPI, Mount Prospect, IL, USA) y se contaron en un contador de emisiones B Beckman LS 6500.

V.- RESULTADOS

1.- DIFERENCIACION

a) Extensión de neuritas

***Fármacos**

En la Figura 1, se observa el efecto que ejercen el TPA (1B), a una dosis de 2.5 nM, y la forskolina (1C), a una concentración de 10 μ M, a las 24 horas de tratamiento sobre la extensión de neuritas de las células GT1-1. Como se puede apreciar en ésta figura, el tratamiento con TPA incrementó el número y la longitud de las neuritas con respecto a células tratadas únicamente con DMSO al 0.1% (1A), mientras que el tratamiento con forskolina favoreció la longitud de neuritas extendidas. En la Figura 2A, se muestra gráficamente el efecto que ejercieron ambas fármacos sobre el número de los procesos neuríticos totales extendidos por campo. Esta figura es el resultado del promedio del número de neuritas totales extendidas por campo de los distintos experimentos reportados en las figuras posteriores (Figs. 3, 4, 5, 6 y 7). Como puede apreciarse, el TPA incrementó significativamente el número total de las neuritas en más de un 100% con respecto a las células control. Este parámetro no fue favorecido con el tratamiento con forskolina, el cual incrementó únicamente, y en forma significativa, la longitud de las neuritas (2B) en más de un 100%. En ésta misma figura se observa también el efecto del tratamiento con la combinación de los dos fármacos, el cual resultó en una estimulación significativa del 30% sobre el número de neuritas, comparando con células tratadas únicamente con DMSO. En la Figura 2B, puede apreciarse que el TPA también favorece la longitud de los procesos extendidos. Cabe mencionar, que se realizó una comparación del número de neuritas extendidas por células tratadas con DMSO con células crecidas únicamente en medio OPTIMEM, y no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (resultados no mostrados).

****Factores de crecimiento**

En la Figura 3 se observa el resultado del conteo de neuritas por campo del tratamiento con el NGF (50 ng/ml). El NGF por sí solo a las 24 horas de tratamiento no ejerció efecto sobre este evento de la diferenciación de las

células GT1-1 (3B) con respecto a células control (3A). Sin embargo, el tratamiento de este factor de crecimiento en conjunto con el TPA o con TPA+forscolina disminuyó significativamente el efecto de éstos tratamientos solos. El NGF no modificó el tratamiento de la forscolina sola.

Como puede observarse en la Figura 4B el tratamiento con el bFGF (10 ng/ml) incrementó significativamente el número de neuritas totales extendidas en un 57.4% comparado con células control (4A). Este factor de crecimiento disminuyó el efecto del TPA en un 15.6% y el del tratamiento con TPA + forscolina en un 33.63%, ambos resultados fueron significativos en comparación con los tratamientos de los fármacos solos. El tratamiento del bFGF con forscolina no mostró diferencias significativas con respecto a la aplicación de la forscolina sola.

El tratamiento con el IGF-1 (10 ng/ml) no mostró diferencias significativas sobre el número de neuritas extendidas como puede apreciarse en la Figura 5B, pero sí incrementó significativamente el efecto del TPA en un 39.04%. Los tratamientos del IGF-1 con forscolina o con TPA + forscolina no modificaron los efectos de los fármacos solos (Figura 5B vs 5A).

El TGF- α (10 ng/ml) no ejerció por sí mismo efecto alguno (Figura 6B) sobre el número de neuritas extendidas. Si bien disminuyó el efecto del TPA, así como el efecto de la combinación de TPA y forscolina (Figura 6B versus 6A) en forma significativa. El tratamiento del TGF- α con forscolina no tuvo efectos significativos al compararlo con el tratamiento de la forscolina sola.

El tratamiento con EGF (10 ng/ml) (Figura 7B) no mostró diferencias significativas con respecto al control, pero en combinación con TPA y/o con forscolina, disminuyó en todos los casos la extensión de neuritas extendidas comparando con los fármacos solos (Figura 7B versus 7A).

2.- Expresión del ARNm para GnRH y Antígeno T

El tratamiento de las células GT1-1 con TPA disminuyó la expresión del ARNm para GnRH en un 80% con respecto al control, mientras que la forscolina lo hizo en un 64% (Figura 8, columnas 1, 2 y 3 del panel superior, y gráfica

inferior). Para la obtención de éstos resultados se realizó la corrección densitométrica en base a la expresión de ciclofilina (Figura 8, panel superior). En el caso del tratamiento con los distintos factores de crecimiento se observó que: el NGF no modifica éste parámetro (Figura 8, línea 4 del panel superior), mientras que el bFGF, IGF-1, TGF- α y EGF, incrementan la expresión de GnRH con respecto al control en un 47%, 43%, 25% y 61%, respectivamente (Figura 8 líneas 4-8 del panel superior, y gráfica inferior).

En la Figura 9, se muestra el efecto que ejercieron los fármacos y los factores de crecimiento sobre la expresión del ARNm para el Ag T. Se encontró que el TPA incrementó la expresión del transcrito aproximadamente en más de un 100%, mientras que la forskolina la inhibió en un 20% (Figura 9, líneas 1, 2 y 3 del panel superior, y gráfica inferior). De manera semejante a lo observado en el caso del ARNm de GnRH, estos resultados se obtuvieron después de la corrección densitométrica en base a la expresión de ciclofilina. Por lo que respecta a los factores de crecimiento, el NGF no modificó la expresión del Ag T, mientras que el bFGF la incrementó en más de un 100%. Por otro lado el IGF-1, el TGF- α y el EGF ejercieron un efecto inhibitorio sobre el mismo en un 45%, 40% y 55% respectivamente (Figura 9, líneas 4-8 del panel superior, y gráfica inferior).

Cabe mencionar, que los niveles de expresión se consideran de manera aproximada por el carácter cualitativo del Northern Blot. Estos resultados son representativos de tres experimentos distintos.

3.- División celular

En la Figura 10, se muestra el efecto que ejercieron los fármacos y los factores de crecimiento sobre la división celular, determinada por la incorporación de ^3H -timidina. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos.

***Fármacos**

El TPA y la forskolina (Figura 10 A) inhibieron el índice mitótico, a juzgar por la incorporación de ^3H -timidina, en un 50% y un 75% respectivamente, en comparación con células tratadas únicamente con DMSO.

***Factores de crecimiento**

En cuanto a la acción de los factores de crecimiento sobre la incorporación de ^3H -timidina, el NGF disminuyó este parámetro en un 31.16% con respecto al control, lo cual no fue significativo (Figura 10B). El tratamiento de este factor de crecimiento en conjunto con TPA y/o forskolina no ejerció ningún efecto sobre el índice mitótico en relación al control y a los fármacos solos. Por lo que respecta al bFGF, se observó un incremento en el índice de división celular del 33.82% (Figura 10C) en comparación con el control, el cual resultó significativo. El tratamiento con este factor de crecimiento no alteró los efectos del TPA y/o forskolina. Por otro lado, el tratamiento con el IGF-1 disminuyó la incorporación de ^3H -timidina en un 49.75% (Figura 10D). El tratamiento con IGF-1 y TPA y/o forskolina no difirió del efecto de estos últimos solos. Las células tratadas con TGF- α , presentaron una disminución significativa del 31.12% del índice mitótico con respecto al control (Figura 10E). La administración del TGF- α en conjunto con TPA disminuyó un 56.81% el índice mitótico, mientras que con forskolina lo disminuyó un 46.12%, y con la combinación de ambos, la disminución fue del 89.43%. Todos los tratamientos anteriores fueron estadísticamente significativos. Por último, la administración del EGF inhibió la división celular en un 44.08%, en conjunto con TPA este efecto la disminuyó en un 64.89%, con forskolina la inhibición fue de un 54.95%, y con la combinación de las drogas fue del 87.8%. Todos los tratamientos del EGF fueron significativos.

Debido a que en ninguna de las combinaciones de los factores de crecimiento con los fármacos se observan diferencias significativas en comparación con los fármacos solos, en la Figura 11 se representa el efecto de los fármacos y los factores de crecimiento solos, para facilitar la interpretación de los resultados.

FIGURAS

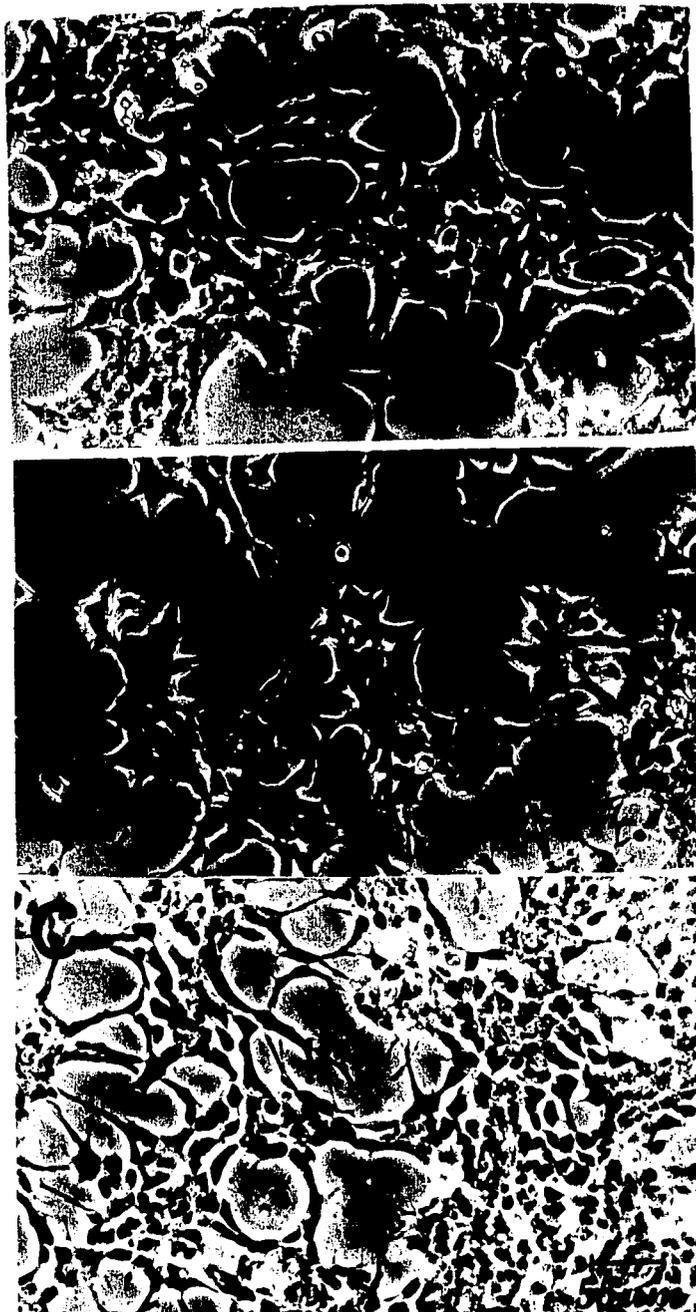


Figura 1.- Fotografías de células GT1-1 mediante microscopía de contraste de fases con un aumento de 50X a las 24 horas de los siguientes tratamientos: A) células en medio de cultivo OPTIMEM con DMSO (control), B) células tratadas con TPA 2.5 nM y C) células tratadas con Forscolina 10 μ M.

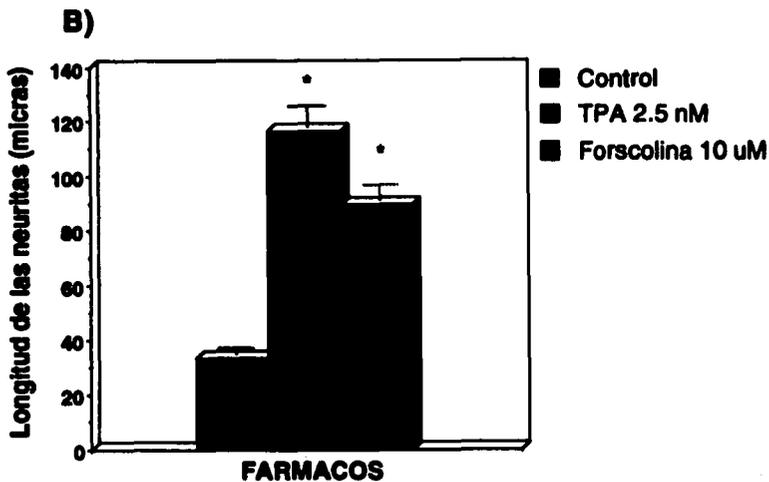
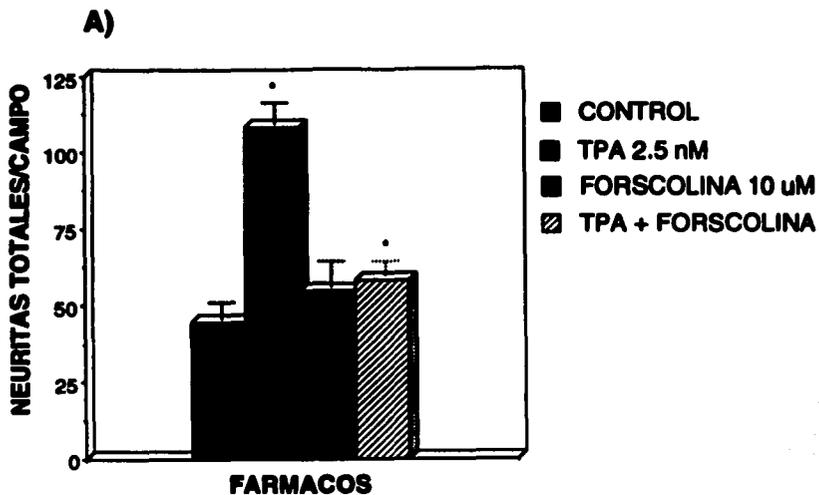
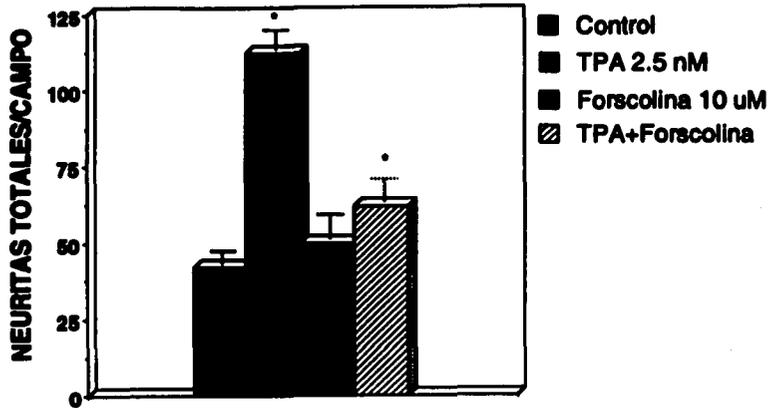


FIGURA 2.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo obtenidas con los tratamientos de TPA 2.5 nM, Forscolina 10 μM y la combinación de ambos. Para todos lo casos n=10 y se esquematiza el promedio de cinco experimentos. B) Se grafica la longitud de las neuritas de células GT1-1 tratadas con TPA 2.5 nM Forscolina 10 μM y de células sin tratamiento. Para todos los casos n=25 y se representa el promedio de cuatro experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante el análisis estadístico correspondiente.

A) FARMACOS



B) NGF 50 ng/ml

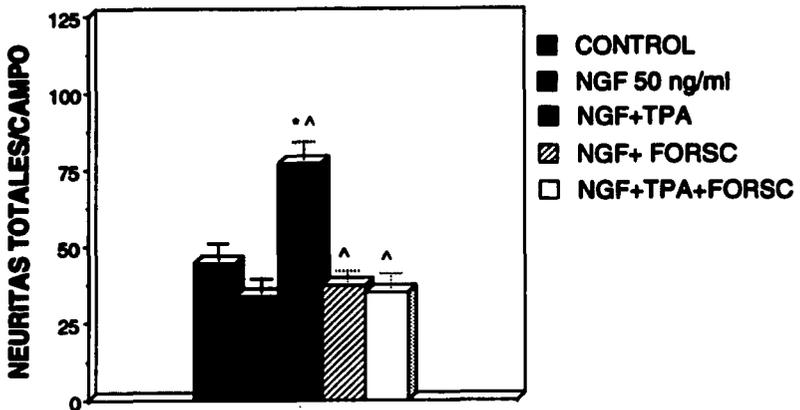
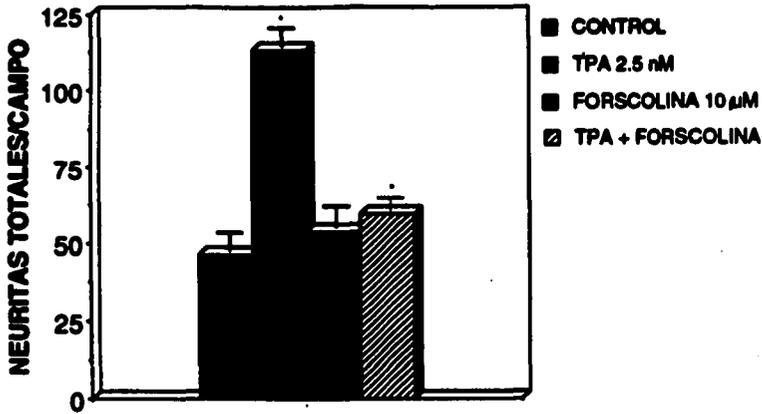


FIGURA 3.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo del control y el tratamiento de los fármacos correspondiente al experimento con el NGF (50 ng/ml). B) Se grafica el efecto del NGF solo y en conjunto con las distintas drogas sobre el número de neuritas totales por campo. Para todos los casos n=10 y se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante el análisis estadístico correspondiente.

^ Significancia del promedio con respecto a su control mediante el análisis estadístico correspondiente.

A) FARMACOS



B) bFGF 10 ng/ml

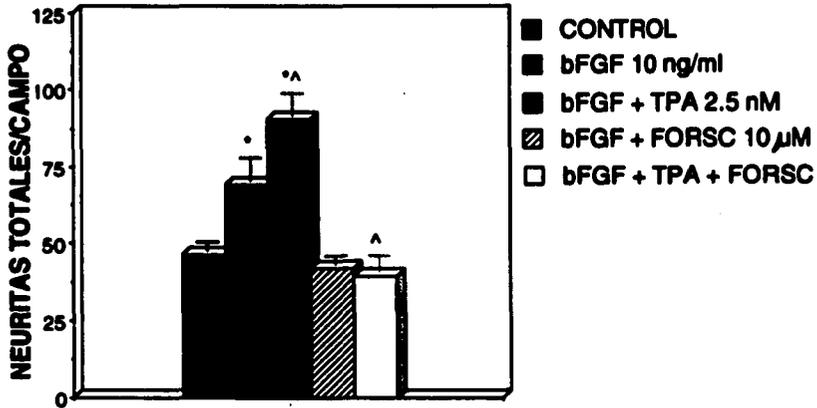
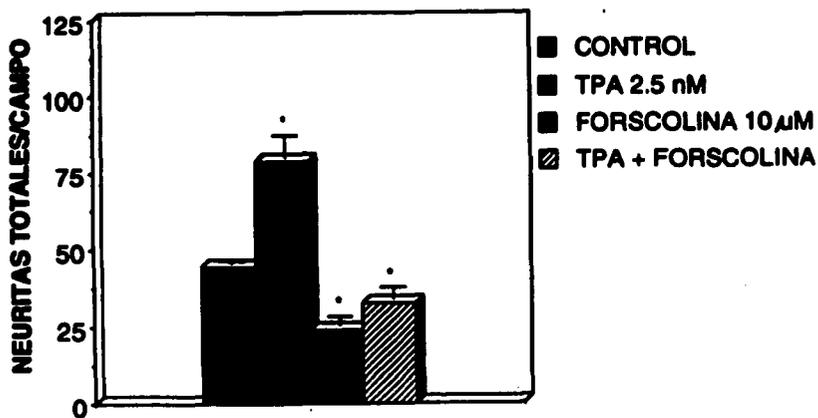


FIGURA 4.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo del control y el tratamiento de los fármacos correspondiente al experimento con el bFGF (10 ng/ml). B) Se grafica el efecto del bFGF solo y en conjunto con las distintas drogas sobre el número de neuritas totales por campo. Para todos los casos n=10 y se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante ANOVA.

^ Significancia del promedio con respecto a su control mediante ANOVA.

A) FARMACOS



B) IGF-1 10 ng/ml

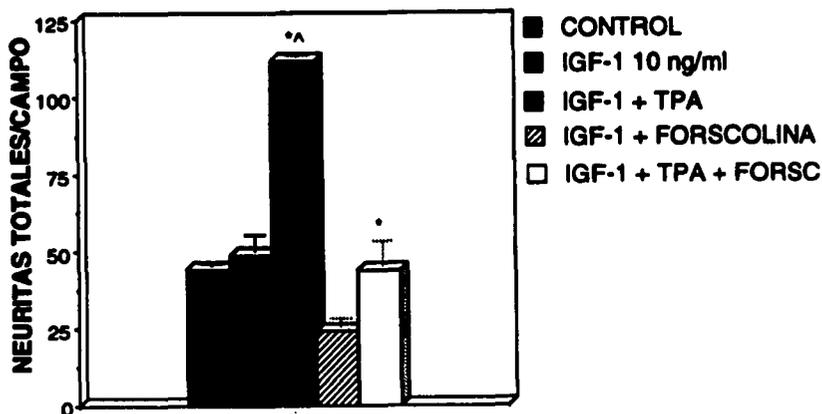
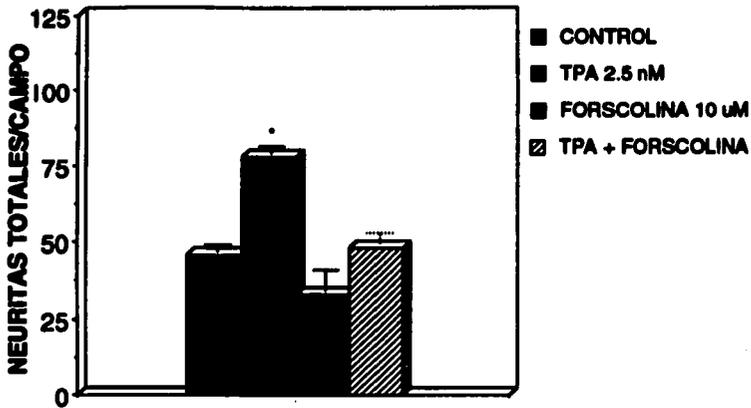


FIGURA 5.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo del control y el tratamiento de los fármacos correspondiente al experimento con el IGF-1(10 ng/ml). B) Se grafica el efecto del IGF-1 solo y en conjunto con las distintas drogas sobre el número de neuritas totales por campo. Para todos los casos n=10 y se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante ANOVA.

^ Significancia del promedio con respecto a su control mediante ANOVA.

A) FARMACOS



B) TGF alpha 10 ng/ml

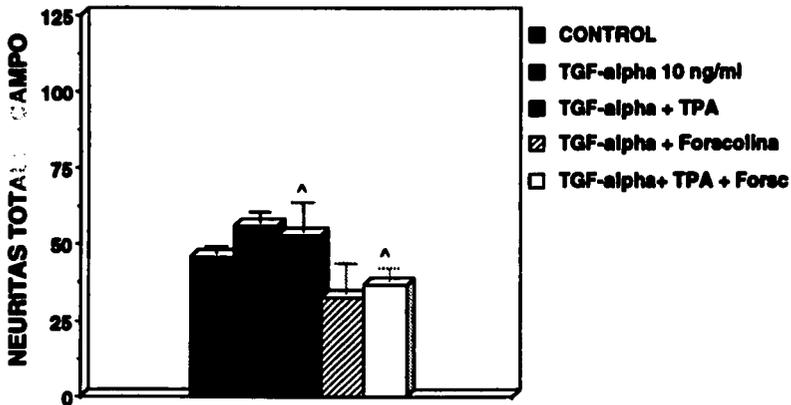
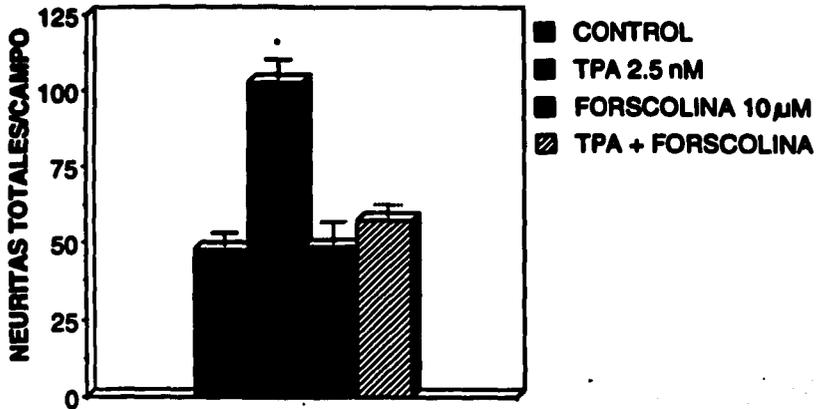


FIGURA 6.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo del control y el tratamiento de los fármacos correspondiente al experimento con el TGF- α (10 ng/ml). B) Se grafica el efecto del TGF- α solo y en conjunto con las distintas drogas sobre el número de neuritas totales por campo. Para todos los casos n=4 y se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante el análisis estadístico correspondiente.

^ Significancia del promedio con respecto a su control mediante el análisis estadístico correspondiente.

A) FARMACOS



B) EGF 10 ng/ml

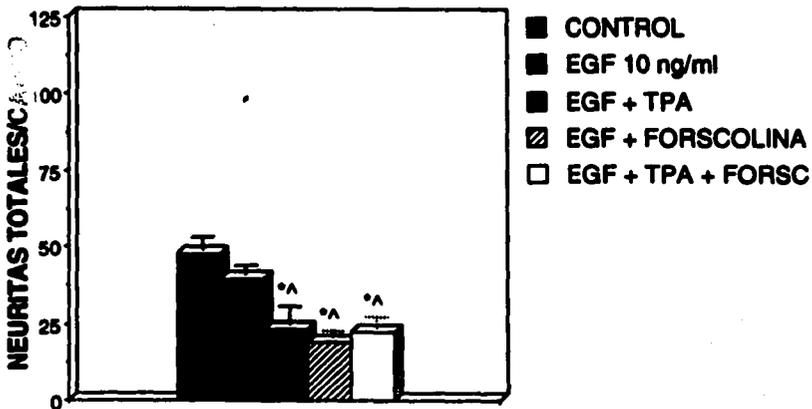


FIGURA 7.- A) Se representa el número de neuritas totales por campo del control y el tratamiento de los fármacos correspondiente al experimento con el EGF (10 ng/ml). B) Se grafica el efecto del EGF solo y en conjunto con las distintas drogas sobre el número de neuritas totales por campo. Para todos los casos n=4 y se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

^ Significancia del promedio con respecto a su control mediante prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

Expresión de GnRH

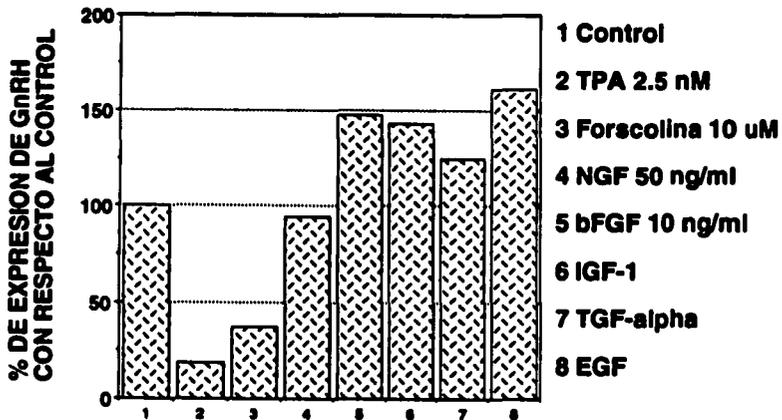
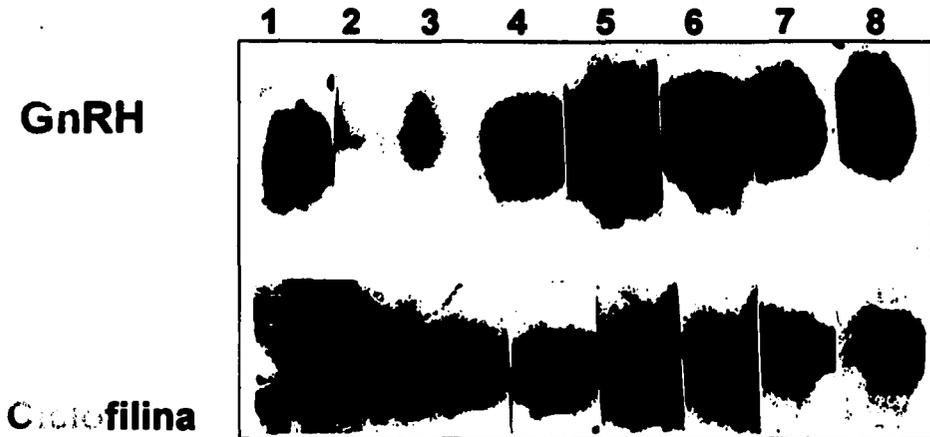


FIGURA 8.- En el panel superior se muestra el Northern Blot de GnRH y ciclofilina de las siguientes muestras: (1) Control, (2) TPA 2.5 nM, (3) Forscolina 10 μ M, (4) NGF 50 ng/ml, (5) bFGF 10 ng/ml, (6) IGF-1 10 ng/ml, (7) TGF- α 10 ng/ml y (8) EGF 10 ng/ml. En el panel inferior se grafica el porcentaje de expresi3n con respecto al control posterior al an3lisis densitom3trico.

Expresión de Ag T

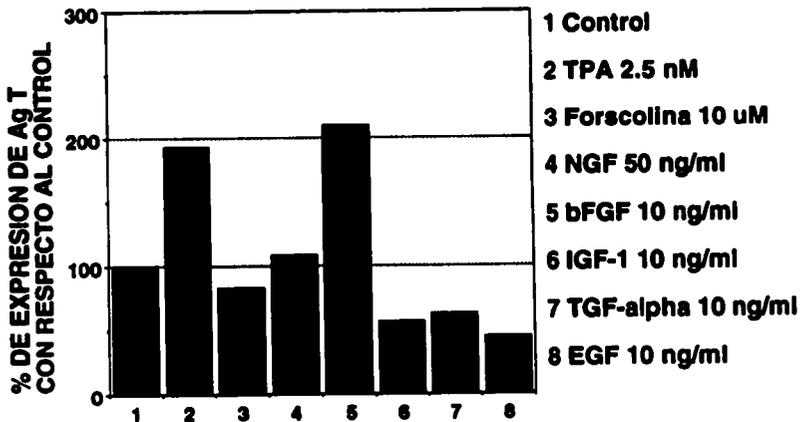
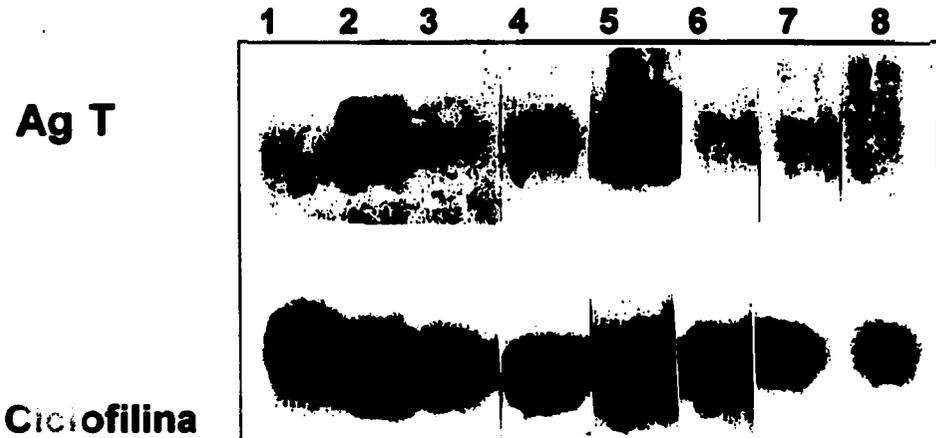


FIGURA 9.- En el panel superior se muestra el Northern Blot del Ag T y ciclofilina de las siguientes muestras: (1) Control, (2) TPA 2.5 nM, (3) Forscolina 10 μM, (4) NGF 50 ng/ml, (5) bFGF 10 ng/ml, (6) IGF-1 10 ng/ml, (7) TGF-α 10 ng/ml y (8) EGF 10 ng/ml. En el panel inferior se grafica el porcentaje de expresión con respecto al control posterior al análisis densitométrico.

INCORPORACION DE ³H-TIMIDINA

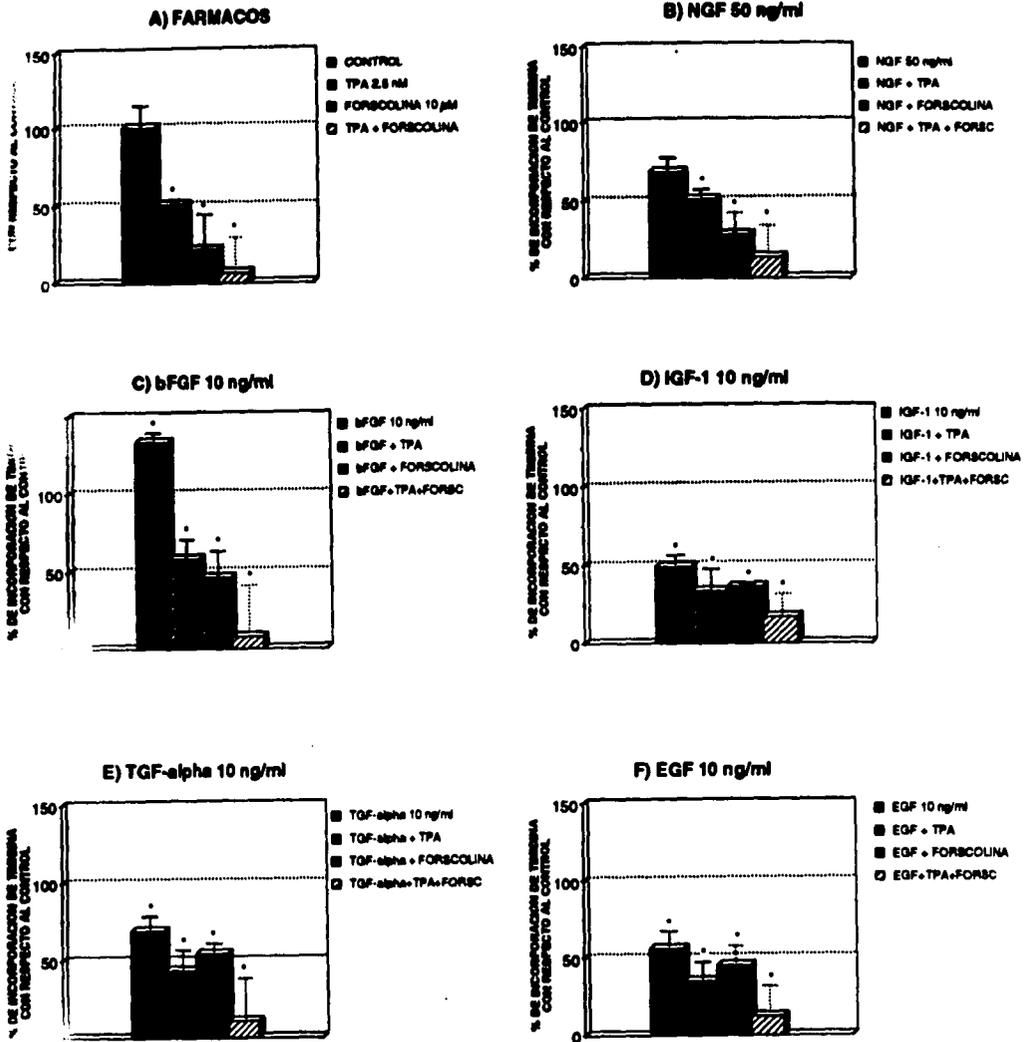


FIGURA 10.- Se representa el porcentaje con respecto al control sin tratamiento de las cuentas por minuto (cpm) relacionadas con la incorporación de ³H-timidina de células GT1-1 tratadas con: A) los fármacos, B) el NGF, C) el bFGF, D) el IGF-1, E) el TGF- α y F) el EGF.

Se grafica el promedio de tres experimentos.

* Significancia del promedio con respecto al control mediante el análisis estadístico con prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

INCORPORACION DE ³H-TIMIDINA

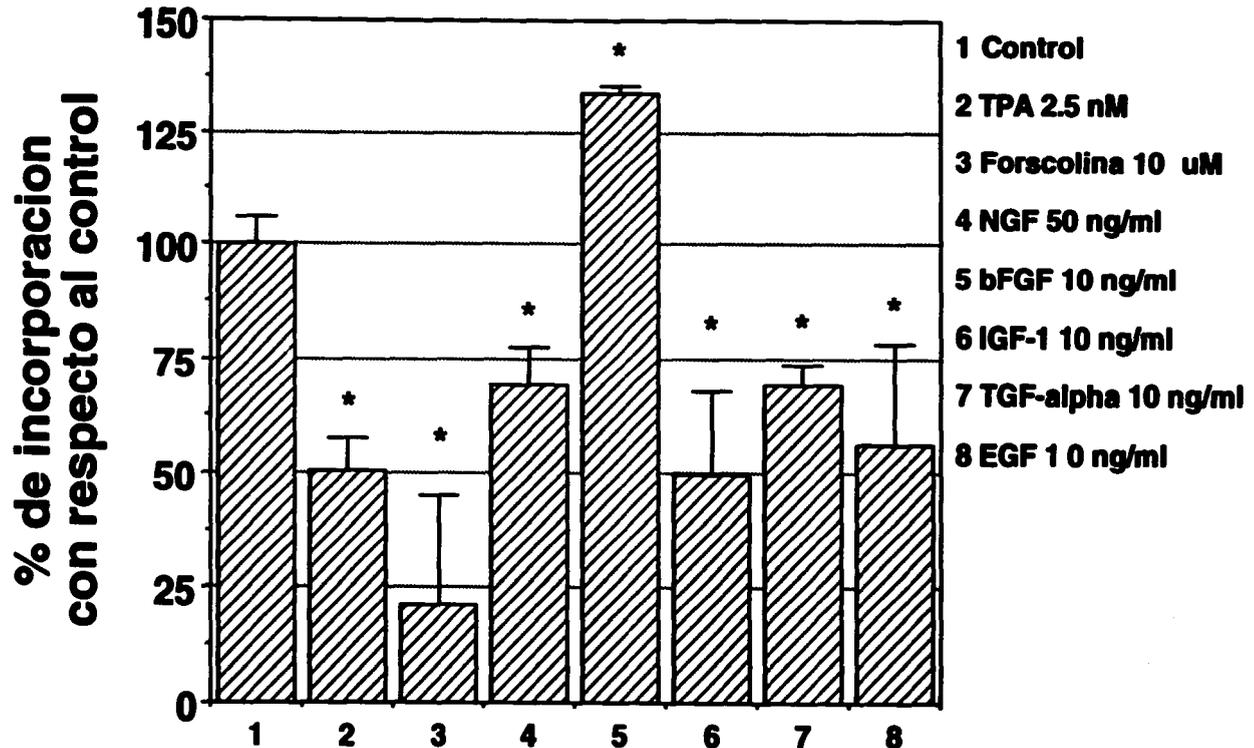


FIGURA 11.- Se representa el porcentaje de incorporación de ³H-Timidina con respecto al control de las células GT1-1 tratadas con los distintos factores de crecimiento y con los fármacos. Los resultados son el promedio de 3 experimentos distintos.

* Significativo con respecto al control (prueba t, $p \leq 0.05$).

VI.- DISCUSION

Los resultados mostrados en éste trabajo sugieren que la diferenciación y la proliferación de las neuronas GT1-1 se regulan de diversas maneras. Nuestros datos muestran al menos tres tipos diferentes de regulación de éstos procesos. En el primero de ellos se observa que mientras se promueve un evento de la diferenciación, la proliferación se inhibe; a éste tipo de regulación se le puede calificar como inversa. En el segundo ejemplo de regulación observada, la proliferación se inhibe mientras que un evento de la diferenciación no se modifica, por lo que se le puede considerar una regulación excluyente. Como último ejemplo, se observa que tanto la diferenciación como la proliferación se pueden estimular simultáneamente; ésta podría ser una regulación paralela. En la Tabla 1, se representan los distintos tipos de regulación descritos anteriormente, resultantes de los diferentes tratamientos utilizados:

TABLA 1

Tratamiento	Diferenciación		Proliferación	Regulación
	Neuritas	ARNm GnRH		
TPA, Forscolina	+	-	-	Inversa
NGF	0	0	-	Excluyente
IGF-1, TGF α , EGF	0	+	-	Excluyente
bFGF	+	+	+	Paralela

+Efecto positivo

-Efecto negativo

0 Sin efecto

Retomando la hipótesis de J. M. Marshall (1995) planteada en el Apéndice 2 de ésta tesis, un mismo estímulo, como lo es en este trabajo cualquiera de los factores de crecimiento, puede desencadenar tanto la diferenciación como la proliferación celular, involucrando a las mismas vías de señalización. Nuestros resultados no demuestran los mecanismos intracelulares que acoplan los factores de crecimiento para que las neuronas GT1-1 proliferen y

se diferencien, pero sí plantean diversas opciones a través de las cuales ambos procesos pueden ocurrir. Para poder presentar éstas opciones, a continuación, se discuten los posibles mecanismos que involucran el TPA, la forskolina y los diversos factores de crecimiento utilizados en éste trabajo, en la regulación de la diferenciación y la división de las neuronas GT1-1.

El tratamiento con TPA favorece la extensión de neuritas de las células GT1-1, al igual que la expresión del mRNA del Ag T. Con éste fármaco también se observa una disminución en la tasa de división celular (determinada por la incorporación de ^3H -imidina) y en la expresión del mRNA de GnRH. Estos resultados permiten suponer que la PKC juega un papel importante en eventos de la diferenciación de las células GT1-1. Los distintos efectos observados en la expresión de GnRH (regulada por el promotor endógeno) y del Ag T (regulada por el promotor transgénico), hacen suponer que existen diferencias en la regulación de ambos promotores. El mismo efecto inhibitorio del TPA sobre la expresión de GnRH, que nuestros datos muestran, ya ha sido reportado previamente (Wetsel, W.C. et al, 1993 y Bruder, J.M. et al, 1992), pero se desconocen los mecanismos a través de los cuales ocurre. El grupo de Cescnjac, et al (1993) propone que un posible regulador de la transcripción de GnRH puede ser fos, ya que este trabajo reporta un incremento en la expresión de fos en células GT1-7 como respuesta a la adición de TPA. Esta propuesta se fortalece con evidencias del grupo de Bruder J.M. (1994) en las que se reporta la presencia de un sitio altamente inhibitorio del promotor de GnRH, y que se localiza de la posición -126 a la -73. En éste sitio se encuentra una secuencia AP1, la cual responde a factores de la transcripción como fos y jun (Esquema 2). Hasta el momento, la posible explicación a la disminución en la expresión de GnRH de células GT1 en respuesta a TPA, es el efecto de fos sobre la secuencia AP1 de una región inhibidora del promotor. Este probable mecanismo de acción del TPA, no va de acuerdo con nuestro resultado de que favorece la expresión del Ag T. La posible explicación a esta discrepancia, es que, como ya se mencionó, tanto el promotor endógeno como el transgénico, se regulan de manera diferente porque no son iguales.

Como puede observarse en el Esquema 2, el promotor transgénico tiene una delección en la región que abarca de la posición -1172 a la -441. Reportes del grupo de Kepa, J.K. (1992) muestran que existe un sitio altamente inhibitorio del promotor de GnRH localizado de la posición -1031 a la -903, (Esquema 2).

Podemos suponer entonces, que el TPA también ejerce efecto sobre este sitio inhibitorio. Por lo tanto, como ésta última región no se encuentra en el promotor transgénico, se observa la expresión del Ag T en consecuencia a la adición del TPA; mientras que, en el caso del promotor endógeno, como si está presente, se inhibe la expresión de GnRH. En el caso del promotor transgénico, también existe la posibilidad de que el TPA actúe sobre sitios activadores, ya que la expresión del Ag T es superior a los niveles basales. Uno de éstos posibles sitios, como puede verse en el Esquema 2, es el que abarca de la posición -2987 a la -1031 (Kepa, J.K. et al, 1992). Por otro lado, este incremento en la expresión del Ag T es inconsistente con la disminución observada en la proliferación celular por efecto del TPA. Esta discrepancia puede explicarse en base a que las células se están diferenciando, y el mismo evento de la diferenciación puede ser el pivote de señales inhibitorias para la proliferación celular. Además, se desconocen qué fragmentos del Ag T se están expresando en las células GT1-1 en respuesta al TPA. Este sería un dato relevante, ya que los efectos mitogénicos y transformadores del Ag T, pueden ir por separado y presentarse a través de fragmentos distintos del mismo (Watson, J.D. et al, 1987). Entonces, es posible que la expresión del Ag T que detectamos en respuesta al TPA, sea de fragmentos que no están involucrados con la proliferación celular.

En el Esquema 3A, se representan los principales efectos ejercidos por el TPA sobre la diferenciación y la división de las células GT1-1, así como los posibles mecanismos involucrados para tales efectos mencionados en los párrafos anteriores.

El efecto del TPA sobre las neuronas GnRHérgicas GT1 es un claro ejemplo de regulación inversa, ya que se favorecen eventos diferenciadores, mientras que se inhiben eventos mitogénicos.

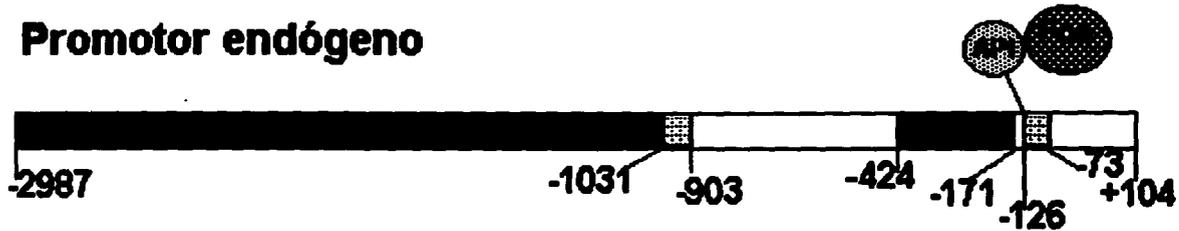
Otra opción de la regulación de la diferenciación y la proliferación de las células GT1 es presentada por la forskolina. El tratamiento con este fármaco favorece la extensión de neuritas en longitud, más no en número; y por otro lado inhibe la tasa de división celular, la expresión de GnRH y la expresión del Ag T de las neuronas GT1-1. En base a estos resultados se puede decir que la vía de la PKA está involucrada de manera secundaria en un evento de la diferenciación de las neuronas GnRHérgicas, el cual es cualitativamente distinto al efecto que se observa con el TPA. Consideramos la vía de la PKA secundaria, porque favorece únicamente la longitud de los procesos extendidos, y además porque

el tratamiento de forskolina en conjunto con el TPA, no potencia el efecto del TPA solo. La promoción por la forskolina de éste evento de la diferenciación puede ser la responsable de la inhibición en la proliferación de las células, ya que el mismo proceso diferenciador puede desencadenar señales inhibitorias de la mitosis. Por el efecto que se observa sobre el promotor endógeno y el promotor transgénico, se puede suponer que la vía de la PKA actúa sobre sitios inhibitorios localizados en ambos promotores. Por consiguiente, la inhibición en la expresión del Ag T, también puede explicar la inhibición observada en la proliferación celular. En el Esquema 3B se resúmen los efectos de la forskolina descritos anteriormente.

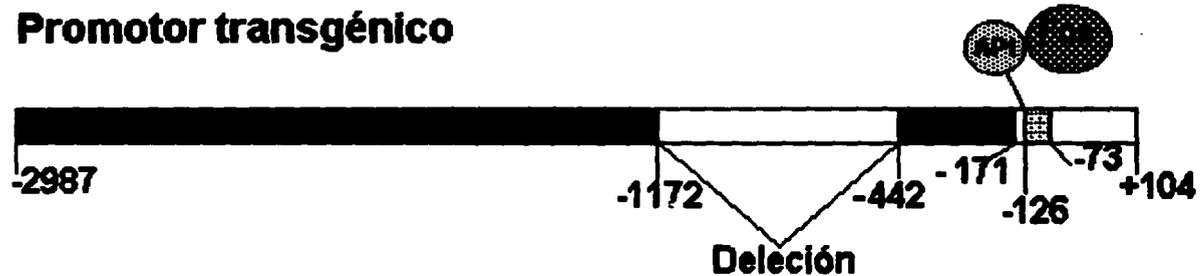
Al igual que como ocurre con el TPA, los efectos de la forskolina son otro ejemplo de la regulación inversa de la división y la diferenciación de las células GT1-1.

ESQUEMA 2: PROMOTOR DE GnRH

Promotor endógeno



Promotor transgénico



 Región inhibidora

 Región activadora

Las opciones de regulación de la diferenciación y la proliferación de las células GT1, presentadas por los distintos factores de crecimiento utilizados en éste trabajo se mencionan a continuación:

Con el bFGF se observa un incremento en el número de neuritas extendidas, se promueve la proliferación celular al igual que la expresión de GnRH y del Ag T. Estos resultados son consistentes con reportes recientes de Tsai P. et al (1995), en los que demuestran efectos similares del bFGF sobre la extensión de neuritas en células GT1-7. En éste mismo trabajo se reporta la presencia de los receptores 1 y 3 para el bFGF sobre éstas células. Este último dato refuerza nuestros resultados obtenidos sobre la diferenciación de las células GT1-1 en el sentido de que el bFGF puede ser un factor diferenciador de éstas neuronas. Sin embargo, existen discrepancias entre los resultados de la proliferación celular de este grupo y los nuestros, ya que ellos reportan que el bFGF no incrementa la tasa de división celular, mientras que nuestros resultados muestran lo contrario. Esta discrepancia se podría explicar en base a diferencias metodológicas o a la diferencia en la clona de células GT1 utilizadas por ambos grupos. Sin embargo, el incremento que observamos en la expresión del Ag T con el tratamiento del bFGF es consistente con nuestros resultados de incremento en la proliferación de las células GT1-1. Por otro lado, el grupo de Tsai, P. también reporta un incremento en los niveles de las MAPK p42 y p44 de las células GT1-7 en respuesta al bFGF, y en base a éste resultado, consideran la vía de las MAPK como una posible ruta del efecto diferenciador del bFGF. Pero, si retomamos nuevamente la hipótesis de J. M. Marshall, y de acuerdo con nuestros resultados, la vía de las MAPK también puede estar involucrada con la división celular de las neuronas GT1.

Los siguientes resultados proponen otras opciones de mecanismos, además de los mencionados anteriormente, por los que el bFGF estaría actuando sobre la diferenciación y la división de las células GT1-1: los tratamientos del **bFGF + TPA** y del **bFGF + TPA + Forscolina** disminuyen el número de neuritas extendidas con respecto a las células que fueron tratadas únicamente con el TPA y el tratamiento del **bFGF + Forscolina**, no modifica el efecto de la forscolina sola. Estos resultados nos permiten plantear dos hipótesis con respecto a las rutas de señalización utilizadas por el bFGF. En la primera, el bFGF podría estar utilizando como ruta diferenciadora la vía de la PKC, y cuando se sobreactiva ésta vía, se produce una regulación negativa sobre la

misma observada con la disminución en la extensión de neuritas. Esta regulación negativa sobre la PKC es un efecto bien conocido que se presenta al sobreactivarla con el TPA (Adams, J.C. et al, 1989). Resultados no mostrados en esta tesis, demuestran que el TPA ejerce una regulación positiva sobre la PKC en las células GT1-1, ya que al utilizar inhibidores de la cinasa C, como es el caso de la estaurosporina, se abole el efecto ejercido por el TPA sobre la extensión de procesos. En la segunda hipótesis se plantea que el bFGF utiliza vías diferenciadoras que van en paralelo con la vía de la PKC. Estas rutas son desconocidas hasta el momento, pero nuestros datos permiten indicar que la vía de la PKA no está involucrada en éste proceso, ya que el tratamiento con forskolina no modifica los efectos ejercidos por el bFGF y viceversa.

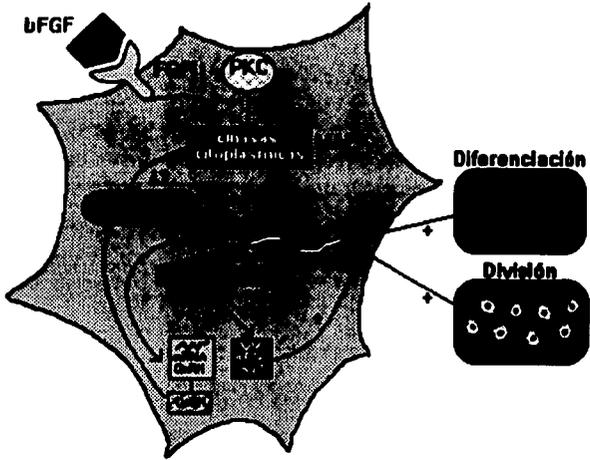
Retomando los resultados del incremento en la expresión de GnRH y del Ag T por el bFGF, surge ahora el planteamiento de la regulación del promotor endógeno y del transgénico por el bFGF. Considerando los promotores de GnRH representados en el Esquema 2, el bFGF podría actuar sobre sitios activadores localizados en ambos promotores como puede ser el localizado en la región de -2987 a -1031 o el que comprende de la región -424 a -171. En el Esquema 4A, se resumen los efectos del bFGF descritos en el texto, así como los posibles mecanismos de señalización involucrados para los mismos.

Estos resultados sugieren que el bFGF ejerce un regulación paralela de la diferenciación y la proliferación de las neuronas GT1-1.

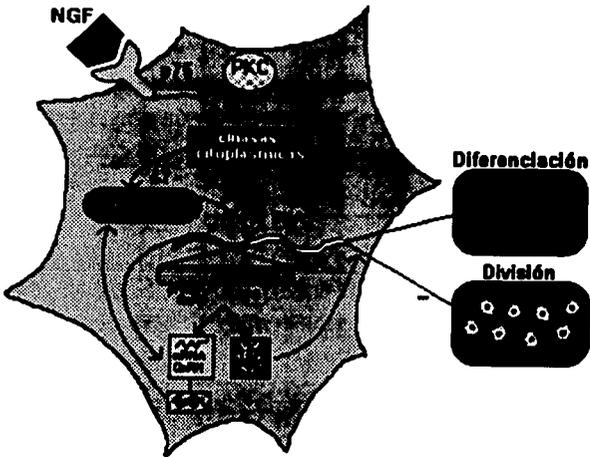
Continuando con las opciones de regulación que los diversos factores de crecimiento presentan sobre la diferenciación y la proliferación de las neuronas GT1-1, se muestra a continuación el efecto ejercido por el NGF. Este factor de crecimiento no promueve la extensión de neuritas, ni la expresión de GnRH y del Ag T de las neuronas GT1-1. A diferencia de estos resultados, ejerce un ligero efecto inhibitorio sobre la tasa de división de éstas células. Estos datos van de acuerdo con el hallazgo del grupo de Zhou, J. et al (1994) en cuyo trabajo reporta que las células GT1-7 presentan una baja densidad del receptor de alta afinidad para el NGF (trkA). El efecto inhibitorio ejercido sobre la proliferación celular, puede explicarse entonces, a través del receptor de baja afinidad para este factor de crecimiento (p75), o bien a través de los efectos ejercidos por una pequeña población del trkA localizado en las células GT1-1. En el Esquema 4B, se representan los efectos del NGF descritos anteriormente.

De acuerdo a estos resultados, el NGF regula de manera inhibitoria, eventos proliferativos, sin modificar eventos diferenciadores de las neuronas GT1-1.

A



B



ESQUEMA 4

En relación a los efectos ejercidos por el IGF-1 sobre la diferenciación y la proliferación de las células GT1, tenemos que: no promueve la extensión de neuritas, inhibe su tasa de división celular, al igual que la expresión del Ag T e incrementa la expresión de GnRH con respecto a las células control. Cuando se realizan tratamientos conjuntos de éste factor de crecimiento con el TPA, se potencia el efecto promotor sobre la extensión de neuritas del TPA solo. Por otro lado, el grupo de Olson, B.R. (1995) reportó recientemente que las células GT1-7 expresan el receptor para el IGF-1 (IGF-1R). Este trabajo también demuestra que el IGF-1 incrementa el número de células GT1-7 y no se observa secreción de GnRH en respuesta a este factor de crecimiento. El efecto potenciador del IGF-1 sobre la extensión de neuritas extendidas por el TPA de nuestros resultados, sugiere que este factor de crecimiento podría activar a la PKC. El hallazgo de la expresión del IGF-1R sobre las células GT1 sugiere que éste factor de crecimiento puede regular diferentes eventos de éstas neuronas, y por lo tanto el efecto activador de la PKC que suponemos, se refuerza. La discrepancia observada en el efecto del IGF-1 sobre la proliferación celular entre el trabajo del grupo de Olson, B.R. y el nuestro, podría quizás deberse a las metodologías utilizadas para determinar la tasa de división celular de las neuronas GT1. Además, nuestro resultado es consistente con la disminución que observamos en la expresión del Ag T, la cual explica entonces, la disminución en la proliferación celular.

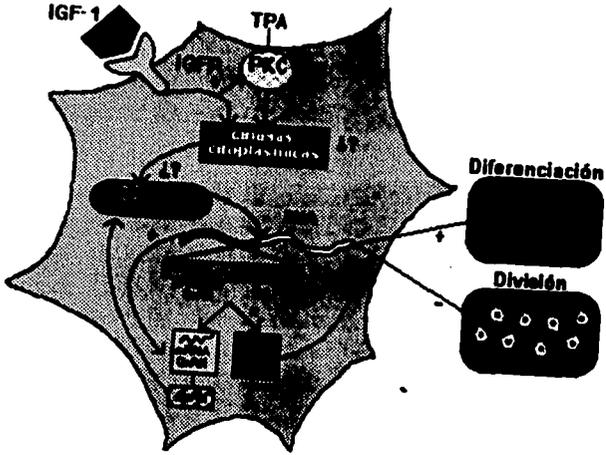
Retomando nuestros resultados, en los que se observa una disminución en la expresión del Ag T, mientras que la expresión de GnRH aumenta en respuesta al IGF-1, podemos especular el siguiente mecanismo de acción de éste factor de crecimiento: considerando que la transcripción génica es un evento que requiere de la estructura tridimensional del ADN ya que ciertas regiones del genoma favorecen la exposición de otras para regular la transcripción (Alberts, B. et al, 1994), entonces, en el caso del promotor endógeno, la transducción de señales desencadenada por el IGF-1, ejerce sus efectos sobre regiones expuestas activadoras de la transcripción, y en el caso del promotor transgénico y como éste presenta una deleción (Esquema 2), posiblemente el arreglo que adquiere el ADN debido a la misma expone regiones inhibitoras y por lo tanto, se detecta una disminución en la expresión el Ag T. Los efectos del IGF-1 se representan en el Esquema 5A.

La regulación observada por el IGF-1, es un ejemplo más de regulación excluyente, ya que inhibe eventos proliferativos, sin modificar eventos diferenciadores.

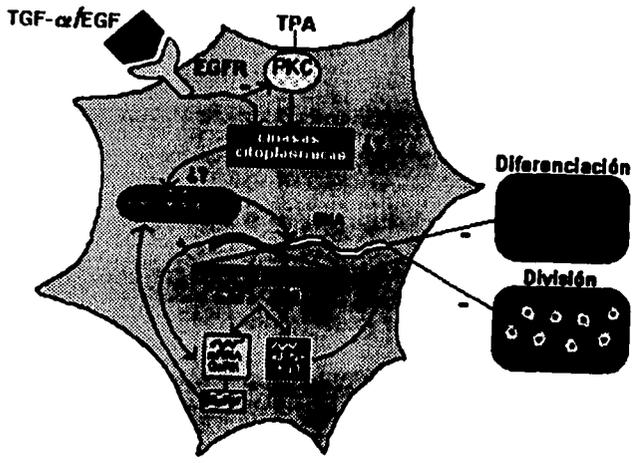
Para finalizar con las opciones de regulación sobre la proliferación y la división de las neuronas GT1, que presentan nuestros resultados, se discutirán los efectos que ejercen sobre tales eventos el TGF- α y el EGF. Con ambos factores de crecimiento no se observa efecto sobre el número de neuritas extendidas en las células GT1-1, inhiben la tasa de división de las mismas al igual que la expresión del Ag T, e incrementan la expresión de GnRH. El tratamiento en conjunto de éstos polipéptidos con el TPA, inhibe considerablemente la extensión de neuritas en comparación con el tratamiento del TPA solo. Los resultados son similares con cualquiera de los dos factores de crecimiento, consistentes con el hecho de que se unen al mismo receptor (ver Apéndice 1). Por el efecto inhibitorio observado con el tratamiento de **TGF- α /EGF + TPA** sobre la extensión de neuritas, podemos sugerir que éstos factores de crecimiento regulan a la PKC. Nuestros datos no determinan el tipo de regulación, ya que lo pueden hacer inhibiéndola, y por lo tanto no se observa extensión de neuritas, o bien sobreactivándola, y como resultado se obtiene una regulación negativa de ésta vía. La disminución observada en la expresión del Ag T, supone que éste es el mecanismo que utilizan el TGF- α o el EGF para inhibir la tasa de división celular. De manera semejante a como ocurre con el IGF-1, se observa que a pesar de que el TGF- α o el EGF inhiben la expresión del Ag T, incrementan la expresión de GnRH. Por consiguiente, la regulación ejercida por éstos polipéptidos sobre los dos promotores, se explicaría de manera similar a como probablemente ocurre con el IGF-1. En el Esquema 5B se representan los principales efectos del TGF- α o el EGF sobre la proliferación y la diferenciación de las células GT1-1.

Los resultados anteriores, muestran que el TGF- α o el EGF, pueden regular de manera excluyente la diferenciación y la proliferación de las neuronas GT1-1, ya que no modifican la extensión de neuritas, pero inhiben la tasa de división celular.

A



B



ESQUEMA 5

VII.- CONCLUSIONES

Los resultados presentados en éste trabajo muestran tres diferentes clases de regulación de la proliferación y la diferenciación de las neuronas GT1-1. En la primera de ellas, se promueve un proceso, mientras que el otro se inhibe, por lo que se le puede considerar como regulación inversa. Esta clase de regulación es ejemplificada con el efecto del TPA y la forskolina sobre las células GT1-1. En la segunda clase de regulación observada, se presenta la inhibición de la división celular, mientras que la diferenciación no se modifica en alguno de los parámetros utilizados. Esta clase de regulación acontece con el IGF-1, el NGF, el TGF- α y el EGF, y se le puede calificar como regulación excluyente. Finalmente, se observa una clase de regulación paralela, en la que se favorecen tanto eventos diferenciadores como mitogénicos. Esta regulación es la que se presenta con el bFGF.

Nuestros datos también indican que la PKC es una vía importante de la diferenciación de las neuronas GT1-1, y que algunos de los factores de crecimiento utilizados en éste trabajo la involucran para regular la diferenciación y la proliferación de éstas células. En el caso del TGF- α o el EGF, la vía de la PKC podría ser una de las rutas responsables de la inhibición ejercida por los mismos sobre la diferenciación, y en el caso del bFGF podría promover los efectos del mismo sobre la extensión de neuritas.

Por último, el efecto sobre la expresión del Ag T tanto inhibitorio, que ejercen el IGF-1, el TGF- α o el EGF, como activador, como ocurre en el caso del bFGF, sugiere que probablemente *in vivo*, la regulación que ejercen estos factores de crecimiento sobre la proliferación y la diferenciación de las neuronas GnRHérgicas es diferente a la regulación que se observa en las neuronas GT1-1.

APENDICE 1

Factores de Crecimiento: estructura, función y receptores

Los polipéptidos denominados factores de crecimiento son un grupo amplio de mensajeros extracelulares que juegan un papel clave en la función mitogénica y diferenciadora de la mayoría de las células eucarióticas, incluyendo a las del SNC.

En este apéndice se mencionan las principales características de diversos factores de crecimiento cuyos efectos se analizan en este trabajo.

A) Factor de Crecimiento Neural (NGF)

A pesar de que el NGF se descubrió hace más de 40 años por el grupo de Levi-Montalcini, R. (1987), su mecanismo de acción y la atribución de diversas funciones se han revelado en los últimos años. Denominado como un factor neurotrófico por excelencia (por ejercer principalmente su actividad sobre células neuronales), el NGF junto con el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3, 4 y 5 (NT-3, NT-4 y NT-5) conforman la denominada familia de neurotrofinas ya que ejercen efectos semejantes, y como se verá más adelante, se unen a receptores homólogos (Bradshaw, R.A. et al, 1993 y Ebendal, T., 1992). Recientemente se aisló una nueva molécula en el pez *Xiphophorus* denominada NT-6, que probablemente es otro miembro de esta familia (Barbacid, M., 1995).

Una de las principales funciones atribuidas a estas proteínas es la regulación de la sobrevivencia de neuronas simpáticas, nociceptivas, termoceptivas, propioceptivas y colinérgicas del cerebro basal anterior (Davies, A.M., 1994). De igual forma, se ha estudiado el efecto diferenciador de estas neurotrofinas en diversas líneas celulares, como se verá posteriormente.

El NGF se sintetiza como un precursor largo de 305 aminoácidos denominado prepro-NGF. La proteína madura se genera por acción proteolítica. Esta última contiene 118 aminoácidos y se agrupa en dímeros.

La similitud en la secuencia de aminoácidos de este factor de crecimiento entre distintas especies (incluyendo aves, anfibios y mamíferos) es muy alta (66-98%). Su estructura secundaria comprende siete hojas B las cuales forman tres pares antiparalelos.

La actividad biológica del NGF se localiza en la denominada subunidad B o complejo 2.5 S (denominado así por el método de separación) que es el compuesto por los dímeros de NGF, y se encuentra dentro de un complejo mayor denominado complejo 7 S (Bradshaw, R.A. et al, 1993 y Ebendal, T., 1992).

*** Receptor para el NGF (NGFR)**

Las neurotrofinas ejercen sus efectos a través de receptores localizados en la membrana plasmática. La acción del NGF es mediada por sitios de unión de alta afinidad, y también se une a sitios de baja afinidad, como ocurre con una glicoproteína de 75 KDa (p75), a la cual se le conoce como el receptor para NGF de baja afinidad. La unión de baja afinidad de todas las neurotrofinas se realiza por este receptor (Chao, M., 1994).

Recientemente, se encontró un receptor de 140 KDa, el cual se une con alta afinidad al NGF. Este receptor es codificado por un protooncogene perteneciente a la familia de genes *trk*, ya que codifican para proteínas con actividad de cinasas de tirosina. En base a este criterio, al receptor para NGF se le denominó *trkA*. Otros miembros de esta familia de genes, codifican proteínas que se unen a las otras neurotrofinas con alta afinidad: *trkB* se une a BDNF, a NT-4 y a NT-5; mientras que *trkC* se une a NT-3 (Barbacid, M., 1994 y 1995 y Kaplan, D.R. y Stephens, R., 1994).

Entre los receptores *trk* se presenta una alta homología estructural. Un ejemplo de lo anterior, son los dominios que comparten: el péptido señal, el grupo de cisteínas 1, la región rica en leucinas, el grupo de cisteínas 2, los dominios semejantes a las inmunoglobulinas, la región transmembranal, juxtamembranal y el dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosina. Ya se han clonado diversas isoformas de estos receptores.

**** Transducción de señales por el NGFR**

El *trkA* se activa cuando se une al NGF. Parte de la activación requiere que se formen dímeros u oligómeros del receptor, y posterior a la formación de los mismos, se presenta la autofosforilación de los residuos de tirosina. Hasta el momento, se han identificado varios sustratos de este receptor. Estos incluyen: de la vía de los fosoinositidos a la fosfolipasa C γ (PLC- γ) y a la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3 K). De la vía de Ras a la proteína adaptadora SHC (proteína con

dominio de homología a *src*), a la misma proteína Ras, a RasGAP, y a otras proteínas involucradas con el intercambio de nucleótidos de guanina. La señal desencadenada por la activación de este receptor activa a diversas cinasas que fosforilan residuos de tirosina, de serina y de treonina en diversas proteínas. En el caso del *trkA* se activa la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK), y en respuesta a éstas, se activan otras cinasas denominadas ERK (cinasas reguladas por señal extracelular), entre las que se encuentran ERK1, ERK2, al igual que RSK, Raf-1 y B-Raf. Estas últimas proteínas median principalmente el efecto del NGF sobre la mitosis (Kaplan, D.R. y Stephens, R., 1994).

Con respecto al efecto que ejerce el receptor p75, se le han atribuido funciones reguladoras del mantenimiento y sobrevivencia de neuronas simpáticas; estos resultados no están del todo claros, y de igual forma se desconoce el mecanismo de señalización intracelular mediante el cual las lleva a cabo (Chao, M., 1994).

B) Factor de Crecimiento de fibroblastos básico(bFGF)

Este factor de crecimiento junto con otros ocho polipéptidos conforman familia de los factores de crecimiento de fibroblastos. Desde hace más de cincuenta años se conoce la existencia de algunos de estos factores, característicos en un principio por ser responsables de la sobrevivencia y reproducción de fibroblastos en cultivo. Fué en la década de los 80's, cuando se logró purificar a dos de estas moléculas, denominadas de acuerdo a su punto isoeléctrico como factor de crecimiento ácido de fibroblastos (aFGF) y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (Eckenstein, F.P., 1994 y Gospodarowicz, D., 1990). En esta misma década se reportó un importante efecto estimulador de los mismos sobre la división y sobrevivencia de diversos tipos de neuronas, e incluso de astrocitos.

Estos dos factores de crecimiento presentan un 55% de similitud en su secuencia de aminoácidos, la cual comprende 155 residuos con un peso molecular aproximado de 18 000 Da, aunque se ha reportado la existencia de formas más largas. Al bFGF se le ha llamado por comodidad en la nomenclatura como FGF-2. Al igual que otros miembros de la familia, carece de un péptido señal en la región N-terminal lo que hace suponer la existencia de una vía secretora del mismo poco común (Eckenstein, F.P., 1994).

La acción mitogénica y diferenciadora de este factor se ha reportado en casi todos los tipos celulares estudiados y en diversas líneas celulares. En el SNC, los niveles de este polipéptido son altos (Gospodarowicz, D., 1990).

*** Receptor para el bFGF (bFGFR)**

El bFGF se une a dos tipos de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad. Al igual que como ocurre con la mayoría de los factores de crecimiento, el receptor de alta afinidad para este factor contiene actividad intrínseca de cinasa de tirosina y tiene un peso molecular entre 125 y 165 KDa. Se han reportado cuatro distintos receptores de alta afinidad para esta familia de factores de crecimiento, cuya estructura es muy similar: contienen aproximadamente 820 aminoácidos de largo, la región extracelular está formada por un péptido señal hidrofóbico, seguido por tres dominios semejantes a las inmunoglobulinas, contienen una región transmembranal hidrofóbica y una región intracelular con actividad de cinasa de tirosina.

Hasta el momento, se ha encontrado la presencia de tres de estos receptores en el SNC (Jaye, M. et al, 1992 y Eckenstein, F.P., 1994).

Los FGFs se unen también de manera específica a la heparina y al ácido de heparano, tanto en la membrana plasmática de las células como en la matriz extracelular. A estas uniones se les denomina de baja afinidad, pero son necesarias para que se presenten las de alta afinidad, aunque el mecanismo mediante el cual esto ocurre no es bien conocido. Se propone que la heparina produce un cambio conformacional en el factor de crecimiento, el cual permite la interacción del mismo con el receptor de alta afinidad (Jaye, M. et al, 1992 y Eckenstein, F.P., 1994).

**** Transducción de señales por el bFGFR**

El mecanismo de activación del receptor de bFGF de alta afinidad es similar al resto de receptores con actividad de cinasa de tirosina. La unión del ligando en el dominio extracelular induce la oligomerización del receptor, lo que resulta en la interacción del dominio citoplásmico de la cinasa y la autofosforilación del receptor a través de un mecanismo denominado transfosforilación, en el cual la cinasa de un receptor fosforila a la del otro y viceversa. Hasta el momento, solo se ha identificado una sola proteína

fosforilada por este receptor, la PLC- γ 1, la cual se ha mostrado que interactúa con un residuo de tirosina fosforilado en el receptor a través de un dominio SH2 (región 2 de homología a src) localizado en la enzima. No es clara la función que ejerce esta proteína en la transducción de señales del bFGFR, ya que no se ha reportado la hidrólisis de fosfoinosítidos como respuesta a la activación de la PLC- γ 1. Faltan por identificarse muchos posibles sustratos para este receptor y determinar de que manera regula, mediante fosforilaciones, funciones mitogénicas y diferenciadoras (Johnson, D.E. et al, 1993).

C) Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (IGF-1)

Este factor de crecimiento, en conjunto con la insulina y el factor de crecimiento tipo insulina 2 (IGF-2) componen en base a los efectos que ejercen, la denominada familia de la insulina. Tanto el IGF-1 como el IGF-2 son hormonas que consisten en una cadena polipéptica sencilla que presentan un alto grado de similitud entre sí.

El IGF-1 contiene una secuencia de 70 aminoácidos, y al igual que la mayoría de los factores de crecimiento, se encuentra altamente conservado entre diversas especies.

El efecto de este factor de crecimiento sobre la diferenciación y la división neuronal ha cobrado gran interés desde que se descubrió su síntesis en el SNC al igual que la de su receptor (De Pablo, et al, 1995 y Heyner, S. et al, 1990).

*** Receptor para el IGF-1 (IGF-1R)**

Es muy semejante al receptor para la insulina. Consta de un tetrámero glicosilado compuesto por dos subunidades α extracelulares, las cuales se unen entre sí a través de puentes disulfuro, y por dos subunidades B, las cuales son transmembranales y poseen un dominio citoplásmico donde se localiza la actividad de cinasa de tirosina. Las subunidades B, también se unen mediante puentes disulfuro con las α . El receptor para el IGF-2 es muy diferente estructuralmente a este último, pero puede unir con baja afinidad al IGF-1 (De Pablo, et al, 1995; Heyner, S. et al, 1990 y White, M.F. et al, 1994).

**** Transducción de señales por el IGF-1R**

Los efectos biológicos de este receptor comienzan cuando el IGF-1 se une a la subunidad α , en segundos se autofosforilan las subunidades B y a través de la fosforilación de diversos sustratos la señal llega al citoplasma y al núcleo. El sustrato mejor conocido para este receptor es el denominado como sustrato para el receptor de la insulina 1 (IRS-1), el cual ejerce su función uniéndose a los dominios SH2 de diversas proteínas, como la PI-3 K y la GRB-2 (proteína adaptadora citoplásmica que se une a una molécula que interviene en el intercambio de nucleótidos de guanina denominada SOS), la cual activa a la proteína Ras. La activación de esta última vía y la de la PI-3 K, resultan en la regulación de señales involucradas con la proliferación, la diferenciación y el metabolismo celular (De Pablo, et al, 1995 y White, M.F. et al, 1994).

D) Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Transformante α (TGF- α)

Estos factores son importantes para el crecimiento y proliferación de diversos tipos celulares, principalmente en eventos tempranos del desarrollo embrionario. El factor de crecimiento transformante- α se descubrió porque presenta una actividad semejante a la del EGF, y al igual que como ocurre con otras proteínas, se le denominó péptido relacionado al EGF. Ambos factores se unen al mismo receptor, al cual se le llama receptor para EGF, ya que en un principio solo se conocía a este último como su ligando. En algunos casos el TGF- α se une con mayor afinidad al receptor que el propio EGF.

A pesar de que se sintetiza en grandes cantidades y en una gran variedad de células, al EGF no se le ha podido atribuir alguna función fisiológica endógena, ya que no se produce en zonas específicas.

El principal efecto ejercido por estos factores es la proliferación celular, pero también están involucrados en muchos otros eventos celulares no relacionados con este proceso. Dentro del Sistema Nervioso, las funciones reportadas por estos polipéptidos son: inducción de la proliferación de astrocitos, glia, astroglia, aumento en la producción de proteína mielina básica, estimulación de la sobrevivencia neuronal y de la extensión de procesos, y un incremento en la actividad de tirosina hidroxilasa (Partanen, A.M., 1990).

En relación a la estructura de estos factores, el TGF- α está compuesto por 50 aminoácidos que conforman una sola cadena polipeptídica. Se forma a partir de un precursor de 160 aminoácidos. La estructura del EGF es semejante a la de este último ya que está compuesto por una cadena sencilla de 53 aminoácidos, solo que el EGF es formado por un precursor de 1 200 residuos.

A diferencia del EGF, el TGF- α es liberado extracelularmente por células tumorales, las cuales pueden ser líneas celulares derivadas de tumores, o por aquellas que sufrieron transformación química o viral.

Las características que definen a los péptidos relacionados con el EGF son: la capacidad para mimetizar las acciones biológicas del EGF y competir con el receptor para el mismo (EGF-R). Otros miembros pertenecientes a ésta familia son la amphiregulina, los factores de crecimiento del virus Pox, el péptido viral de vaccinia, etc. (Partanen, A.M., 1990 y Tam, J.P., 1985).

*** Receptor para el EGF (EGF-R)**

El EGF-R se encuentra en una gran variedad de tipos celulares. Presenta un peso molecular de 131 600 Da, y consta de una simple cadena polipeptídica de 1 186 aminoácidos.

El dominio extracelular de este receptor está formado por dos regiones ricas en cisteínas las cuales pueden formar puentes disulfuro. También presenta un alto contenido de carbohidratos. Por ambas características, esta región es muy resistente a la proteólisis.

El dominio citoplasmático del EGF-R, al igual que otros receptores con actividad de cinasa de tirosina, es el que presenta esta función de fosforilación y es considerado como el sistema efector primario en el proceso de señalización transmembranal ya que va a transmitir y amplificar la señal extracelular producida por la unión del factor de crecimiento. El residuo de treonina 654, es un sitio de fosforilación para la cinasa de proteínas C (PKC). Este receptor puede utilizar tanto ATP (trifosfato de adenosina) como GTP (trifosfato de guanosina) como donadores de fosfatos. La mayor parte de la región carboxi-terminal contiene secuencias que no se encuentran en otros receptores con esta actividad, y contiene los principales sitios de autofosforilación (Carpenter, G., 1987).

**** Transducción de señales por el EGF-R**

Existen dos modelos que explican la activación de la cinasa: el primero se basa en que la unión del ligando altera la interacción del dominio externo con el de la membrana, y esto ocasiona ligeros cambios en la posición del dominio transmembranal resultando en una interacción indirecta del dominio de la cinasa. En el segundo modelo, y de manera semejante a lo mencionado para los otros factores de crecimiento, se propone que la unión del ligando induce la agregación de los receptores, y que este proceso está involucrado con la activación de la cinasa de tirosina.

Se ha demostrado que este receptor se puede regular por la PKC, ya que en estudios de transmodulación, se ha observado que al activar a la misma con ésteres de forbol como es el caso del TPA, se detecta una disminución en la capacidad de unión por el EGF, y una atenuación de la actividad de la cinasa. Estudios de curvas Scatchard, revelan que el tratamiento con TPA disminuye el número de receptores mediante la internalización de los mismos. La manera mediante la cual atenúa al receptor, es fosforilando el residuo de treonina 654.

Dentro de los sustratos que se fosforilan por acción de este receptor está la PLC γ , la cual se ha observado que activa la vía de hidrólisis de los fosfolípidos y la movilización intracelular de Ca $^{2+}$ en respuesta a la unión del ligando, también actúa sobre diversas cinasas de la vía de Ras, promueve el intercambio Na $^{+}$ /H $^{+}$, al igual que la expresión de c-fos y c-myc. Este receptor fosforila a muchos otros sustratos intracelulares cuya función no es conocida. *In vitro* se ha observado que fosforila la porción mediana del antígeno T (Carpenter, G., 1987 y Ullrich, A., 1990).

APENDICE 2

División y diferenciación celular

Para poder comprender mejor los mecanismos mediante los cuales los factores de crecimiento ejercen sus efectos sobre la división y la diferenciación en las neuronas GnRHérgicas, es necesario establecer algunos de los eventos básicos que acontecen en estos fenómenos de manera muy general.

A) División celular

El proceso de la división celular consiste en la duplicación del contenido genómico y la posterior división. Por éstas razones y para facilitar su estudio, el ciclo celular se ha fraccionado convencionalmente en distintas fases, las cuales se describen a continuación: en la fase G_1 , la célula se encuentra en un periodo de restricción, ya que en base a los estímulos del medio, puede o no iniciar la división celular al entrar en la fase S . El periodo G_1 puede durar varias horas. En la fase S , la célula sintetiza ADN; este periodo dura varias horas también. Posterior a esta fase, se presenta un periodo denominado G_2 , en el cual en base a la señales extracelulares, la célula puede entrar a la siguiente mitosis y, por lo tanto terminar el ciclo celular, o bien, puede permanecer en ésta fase. En la mitosis, denominada también fase M se presenta la división del núcleo celular y es el periodo del ciclo con menor duración en el tiempo. Los factores de crecimiento son algunos de los estímulos extracelulares que regulan las fases G_1 y G_2 del ciclo celular.

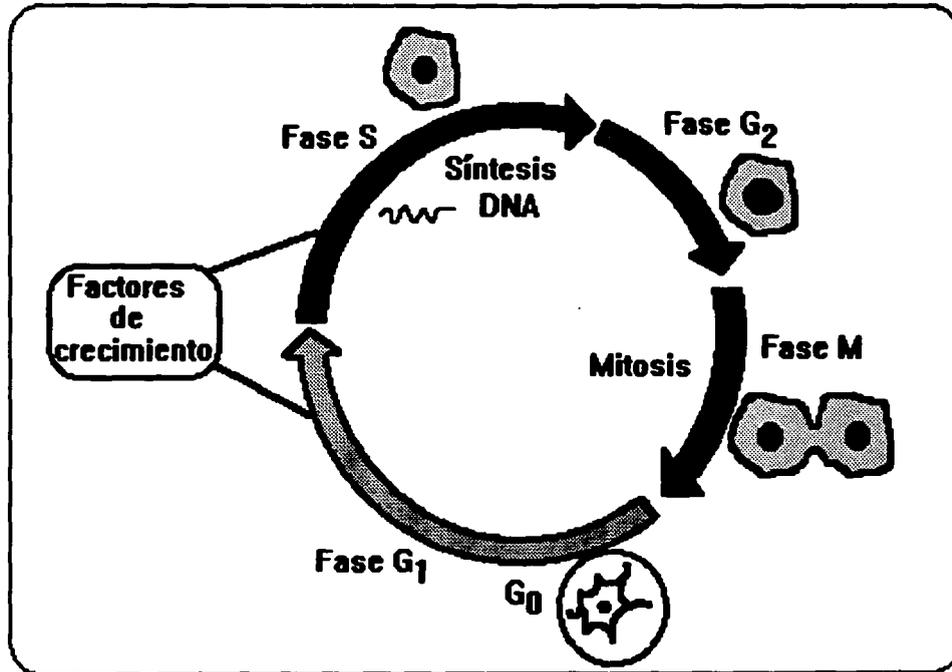
Antes de que la célula entre en el ciclo, se presenta un periodo de reposo conocido como G_0 . Durante ésta fase la célula no se divide y puede durar desde horas hasta años, este es el caso de la mayoría de las neuronas, que permanecen en este estado una vez que terminaron su proceso de diferenciación. La duración de cada una de las fase anteriores es variable, ya que depende del tipo celular del que se trate (Xeros, N., 1962, reviado en Alberts, B. et al, 1994).

La regulación ejercida por los distintos factores de crecimiento se da a diversos niveles del ciclo y es dependiente del sistema de segundos mensajeros al que esté acoplado el receptor para estos polipéptidos (ver Apéndice 1 de Factores de Crecimiento). En términos generales se puede decir que algunos factores de crecimiento actúan sobre la mitosis, sin dejar que la célula pase de G_1 , y otros intervienen en la síntesis de DNA (Fase S) pero no en la Fase M (Alberts,

B. et al, 1994). En el Esquema 6 se representan los principales procesos del ciclo celular descritos anteriormente.

De acuerdo a resultados obtenidos con la línea de fibroblastos 3T3 al añadir el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la proliferación celular involucra los siguientes eventos celulares: como respuesta temprana, se presenta el flujo iónico de Na^+ , K^+ y H^+ a través de la membrana plasmática, estimulándose básicamente la entrada de Na^+ en la célula. También se activa la bomba de Na^+/K^+ y por consiguiente se incrementa la concentración intracelular de K^+ . Se presenta una salida de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares; esta respuesta es consecuencia de la activación de diversas vías de señalización intracelular, como acontece con la vía de la PKC. De igual forma, se incrementan los niveles celulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), al cual se le considera como una de las principales señales necesarias para iniciar la síntesis de DNA. Además de la activación de señales membranales y citosólicas, también se activan diversos mecanismos nucleares, como lo es el incremento en la expresión de varios oncogenes como *c-fos* y *c-myc*, necesarios para que se dé la síntesis de DNA (Rozengurt, E., 1986).

ESQUEMA 3: Ciclo celular



8) Diferenciación celular

Por el hecho de ser un evento primordial del desarrollo de los eucariotes, la diferenciación involucra un fino mecanismo de regulación, en donde la represión y la expresión génica, dentro de un contexto espacio-temporal son muy importantes. Este patrón de regulación de genes da como resultado un mecanismo con el cual sobrevive todo un organismo y no una célula individual.

El control de la expresión génica diferenciada está regulado por diversos factores y se presenta a distintos niveles y, de igual forma, la célula responde con diversos mecanismos. Dentro de los principales factores externos que regulan la diferenciación encontramos: hormonas proteicas y esteroides, factores de crecimiento, contactos célula-célula o matriz extracelular-célula, señales nutricionales, estrés calórico, sustancias tóxicas, productos de hemorragia o inflamación, etc. Los diferentes niveles en los que la célula responde a todas estas señales son: 1) transcripción de genes, 2) procesamiento del ARNm, 3) estabilización del transcrito, 4) traducción del ARNm y 5) modificaciones postranscripcionales. Debido a que los factores de crecimiento son algunas de los estímulos diferenciadores, a partir de este momento se enfatizará la función que ejercen los mismos sobre este evento (Darnell, J., 1990).

Como se mencionó anteriormente, cuando un factor de crecimiento es reconocido por su receptor, este complejo se internaliza y se degrada rápidamente. Antes de que esto ocurra, se desencadenan una serie de eventos intracelulares acoplados a distintos sistemas de transducción. Las principales respuestas que desarrolla la célula son: intercambio Na^+/H^+ , entrada de Ca^{2+} extracelular, activación de la fosfolipasa C, transporte de glucosa y aminoácidos, fosforilación de múltiples sustratos sobre residuos de serina y treonina, incremento de cAMP intracelular, activación de las cinasas Janus (JAK) y la vía de Ras, etc. (Cross, M., 1991). Muchos de éstos mecanismos también se presentan en la proliferación celular, por lo que la diferenciación y la mitosis pueden compartir las mismas vías de señalización intracelular, es decir, una célula puede responder con división o diferenciación ante un mismo estímulo, o bien, estímulos distintos pueden ejercer funciones opuestas utilizando una misma vía.

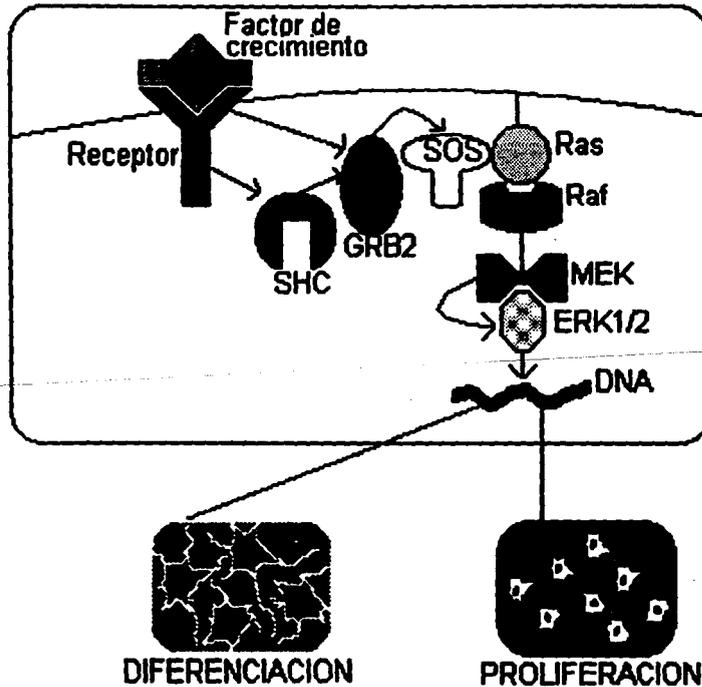
Hasta este momento, podemos conjuntar estos dos eventos celulares regulados por una sola señal extracelular: los factores de crecimiento. Como ya se mencionó, se desconocen los mecanismos en vertebrados mediante los cuales una célula, en base al estímulo de los factores de crecimiento, se divide o prolifera. En *C. elegans* y *D. melanogaster* los mecanismos que promueven estos procesos son bien conocidos, ya que la estimulación de ciertas regiones del genoma es el pivote para que se presente uno u otro evento.

Recientemente, se propuso un modelo que explica como un factor de crecimiento puede ser mitogénico o diferenciador en base a la activación de la vía de Ras. Para comprender mejor ésta última regulación, en el Esquema 7, se representan los principales eventos intracelulares que ocurren en esta vía, los cuales se describen a continuación: el receptor para un determinado factor de crecimiento se activa cuando se une a su ligando. Se ha propuesto que ésta unión es la señal para la activación de Ras, la cual se puede presentar indirectamente a través de diversas proteínas como puede ocurrir con la proteína adaptadora Grb2 (la cual se va a unir al complejo SOS) o bien a través de la proteína SHC (que se va a unir a Grb2). Como se observa en el esquema, Ras activa a Raf (que es una MAPK) y ésta última activa, entre otras proteínas, a las cinasas activadas por mitógeno (MEK), las cuales activan a las ERK1 y ERK2, proteínas involucradas en la diferenciación y la proliferación (Hill, C.S. et al, 1995; Marshall, C.J., 1995).

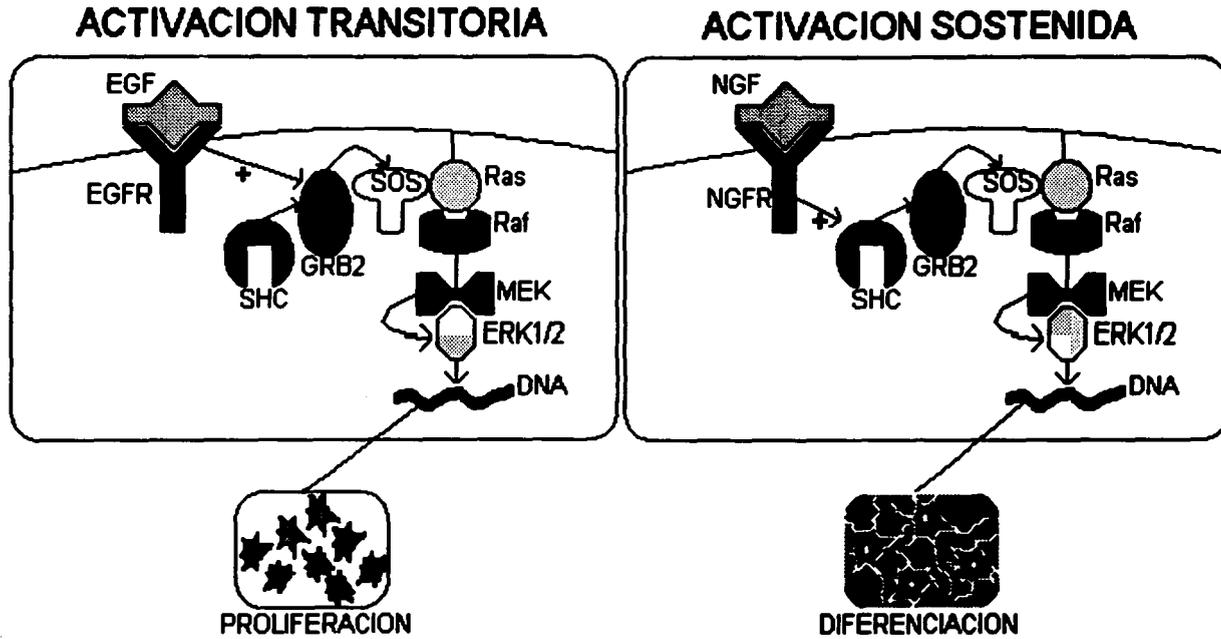
En el modelo propuesto, la regulación que ejerce el factor de crecimiento para ser mitogénico o diferenciador, reside en el tiempo de activación de ERK1 y ERK2. Esto se estudió en células PC12, las cuales en respuesta al EGF proliferan y en presencia del NGF se diferencian extendiendo procesos. Se observó que la activación de las ERK ejercida por el EGF en éstas células es transitoria, es decir, que duran activadas poco tiempo, mientras que en el caso del NGF esta activación es sostenida (Esquema 8). La posible explicación que se presenta en base a éste modelo, es el tipo de activación de Ras. El EGF lo hace activando Grb2, y el NGF lo realiza a través de la proteína SHC (Hill, C.S. et al, 1995 y Marshall, C.J., 1995).

A pesar de que el modelo anterior, trata de dar una explicación al hecho de que una misma vía puede desencadenar funciones distintas, ésta área es poco conocida y se tienen pocos datos al respecto, ya que generalmente se ha tratado de adjudicar alguna función en específico a determinada vía de señalización.

ESQUEMA 7 Vía de Ras



ESQUEMA 8



VIII.- REFERENCIAS

Adams, J.C. and Gullick, W.J. (1989). Differences in phorbol-ester-induced down regulation of protein kinase C between cell lines. *Biochem J*: 257, 905-911.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London.

Barbacid, M. (1994). The trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology*: 25 (11), 1386-1403.

Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. *Current Opinion in Neurobiology*: 7, 148-155.

Bradsahw, R.A., Blundell, T.L., Lapatto, R., McDonald, N.Q. y Murray-Rust, J. (1993). Nerve growth factor revisited. *TIBS*: 18, 48-52.

Bruder, J.M and Wierman, M.E. (1994). Evidence for transcriptional inhibition of GnRH gene expression by phorbol ester at a proximal promotor region. *Molecular and Cellular Endocrinology*: 99, 177-182.

Bruder, J.M., Krebs, W.D., Nett, T.M. y Wierman, M.E. (1992). Phorbol ester activation of the Protein Kinase C pathway inhibits gonadotropin-releasing hormone gene expression. *Endocrinology*: 131 (6), 2552-2558.

Carpenter, G. (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.*: 56, 881-894.

Cesnjaj, M., Krsmanovic, L.Z., Catt, K. y Stojilkovic, S. (1993). Autocrine induction of *c-fos* expression in GT1 neuronal cells by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*: 133 (8), 3042-3045.

Cross, M., y Dexter, T.M. (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*: 64, 271-280.

Chao, M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *Journal of Neurobiology*: 25 (11), 1373-1385.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*: 162, 156-159.

Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. Scientific, American Books, Inc., USA.

Davies, A. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *Journal of Neurobiology*: 25 (11), 1334-1348.

De Pablo, F. y de la Rosa, E.J. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *TINS*: 18 (3), 143-150.

Ebendal, T. (1992). Function and evolution in the NGF family and its receptors. *Journal of Neuroscience Research*: 32, 461-470.

Eckenstein, F.P. (1994). Fibroblast growth factors receptors in the nervous system. *Journal of Neurobiology*: 25 (11), 1467-1480.

Everett, J.W. (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En "The physiology of the reproduction". Knobil, E. y Neill, J. eds. Raven Press, New York, NY, USA.

Fallon, J.H., Seroogy, K.B., Loughlin, S.E., Morrison, R.S., Bradshaw, R.A., Knauer, D.J. y Cunningham, D.D. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: localization and development (1984). *Science*: 224, 1107-1109.

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem*: 132, 6-13.

Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. En "The physiology of the reproduction". Knobil, E. y Neill, J. eds. Raven Press, New York, NY, USA.

Furmanski, P., Silverman, D.J., y Lubin, M. (1971). Expression of differentiated functions in mouse neuroblastoma mediated by dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate. *Nature*: 233, 413-415.

Gospodarowicz, D. (1990). Fibroblast growth factor and its involvement in developmental process. En "Growth factors and development". Nilsen-Hamilton, M. ed. Academic Press, Inc. Current Topics in Developmental Biology: 24.

Greene, L.A., y Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 73 (7), 2424-2428.

Harris, G.W. (1948). Neural control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.*: 28, 139.

Heyner, S., Farber, M. y Roseblum, I.Y. (1990). The insulin family of peptides in early mammalian development. En "Growth factors and development". Nilsen-Hamilton, M. ed. Academic Press, Inc. Current Topics in Developmental Biology: 24.

Hill, C.S. y Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*: 80, 199-211.

Huff, K., End, D., y Guroff, G. (1981). Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *The Journal of Cell Biology*: 88, 189-198.

Jaye, M., Schlessinger, J. y Dionne, C.A. (1992). Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1135, 185-199.

Johnson, D.E. y Williams, L.T. (1993). Structural y functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer Research*: 60, 1-41.

Kaplan, D.R. y Stephens R.M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the *trk* receptor. *Journal of Neurobiology*: 25 (11), 1404-1417.

Kepa, J., Wang, C., Neeley, C., Reynolds, M.V., Gordon, D.F., Wood, W.M. and Wierman, M.E. (1992). Structure of the rat gonadotropin releasing hormone (rGnRH) gene promotor and functional analysis in hypothalamic cells. *Nucleic Acids Research*: 20 (6), 1393-1399.

Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S., Mertz, L.M., Tomin, M. y Catt, K.J. (1993). Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 90, 3908-3912.

Levi-Motalcni, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*: 237, 1154-1162.

Mahachoklertwattana P., Sanchez J., Kaplan S.L. y Grumbach M.M. (1994) NMDA receptors mediate the release of GnRH by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1). *Endocrinology* : 134, 1023-1030.

Marshall, C.J. (1985). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*: 80, 179-185.

Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H. y Weiner, R.I. (1992). Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 89, 1852-1855.

Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H. y Weiner, R.I. (1994). Biphasic adrenergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology*: 59, 420-425.

Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H. y Weiner, R.I. (a1992). β 1-adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology*: 131 (3), 1397-1402.

Martínez de la Escalera, G., Gallo, F., Choi, A.L.H. y Weiner, R.I. (b1992). Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology*: 131 (6), 2965-2971.

Mattsson, M.E.K., Enberg, G., Ruusala, A.I., Hall, K. y Pahlman, S. (1986). Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation. *J Cell Biol*: 102, 1949-1954.

Melcangi, R.C., Galbiati, M., Messi, E., Piva, F., Martini, L. y Motta, M. (1995). Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: Is transforming growth factor- β the principle involved?. *Endocrinology*: 136 (2), 679-686.

Mellon, P., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, A.C., Roberts, J.L. y Weinwer, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*: 5, 1-10.

Noris, G., Hol, D., Clapp, C. y Martínez de la Escalera, G. (1995). Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1-1 cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolisis. *Endocrinology*: 136, 2967-2973.

Ojeda, S.R., Urbanski, H.F., Costa, M.E., Hill, D.F., y Moholt-Siebert, M. (1990). Involvement of transforming growth factor α in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 87, 9698-9702.

Oliver, G. y Schafer E.A. (1895). On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs. *J.Physiol*: 18, 277.

Olson, B., Scott, D.C., Wetsel, W., Elliot, S., Tomic, M., Stojilkovic, S., Nieman, L. and Wray, S. (1995). Effects os insulin growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic Gt1-7 cell line. *Neuroendocrinology*: 62, 155-165.

Page, R.B. (1994). The anatomy of the hypothalamo-hypophyseal complex. En "The physiology of the reproduction". Knobil, E. y Neill, J. eds. Raven Press, New York, NY, USA.

Pahlman, S., Odelstad L., Larsson, E., Grotte, G. y Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer*: 28, 583-589.

Partanen, A-M. (1990). Epidermal growth factor and transforming growth factor- α in the development of epithelial-mesenchymal organs of the mouse. En "Growth factors and development". Nilsen-Hamilton, M. ed. Academic Press, Inc. Current Topics in Developmental Biology: 24.

Popa, G.T. y Fielding, V. (1930). A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. *J. Anatom. (London)*: 65, 88-91.

Rabinovsky, E.D., Le, W., y McManaman, J.L. (1992). Differential effects of neurotrophic factors on neurotransmitter development in the IMR-32 human neuroblastoma cell line. *The Journal of Neuroscience*: 12 (1), 171-179.

Rozengurt, E. (1986). Early signals in the mitogenic response. *Science*: 234, 161-166.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Schubert, D.S., Heunemann, S. y Kiddokoro, Y. (1977). Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 74, 2579-2583.

Silverman, A.-J., Livne, I. Y Witkin, J.W. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. En "The physiology of the reproduction". Knobil, E. y Neill, J. eds. Raven Press, New York, NY, USA.

Smith, P.E. y Engle, E.T. (1927). Experimental evidence regarding the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *American Journal of Anatom*: 40, 159-217.

Tam, J.P. (1985). Physiological effects of transforming growth factor α in the newborn mouse. *Science*: 229, 673-675.

Togari, A., Baker, D., Dickens, G., y Guroff, G. (1983). The neurite promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 114 (3), 1189-1193.

Tsai, P., Werner, S. and Weiner, R.I. (1995). Basic fibroblast growth factor is a neurotropic factor in GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Endocrinology*: 136 (9), 3831-3839.

Ulrich, A., y Schelessinger. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*: 61, 203-212.

Weiner, R.I., Wetsel, W., Goldsmith, P., Martínez de la Escalera, G., Windle, J., Padula, C., Choi, A., Negro-Vilar, A. y Mellon, P. (1992). Gonadotropin-releasing-hormone neuronal cell lines. En Ganong, W.F., Martini, L. (eds) *Frontiers in neuroendocrinology*. Raven press, new York, Vol (2) 13: 95-119.

Wetsel, W.C., Eraly, S.A., Whyte, D.B. y Mellon, P.L. (1993). Regulation of gonadotropin-releasing hormone by Protein Kinase-A and -C in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology*: 132 (6), 2360-2370.

Wetsel, W.C., Valença, M.M., Merchenthaler, I., Liposits, Z., López, F.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L. y Negro-Vilar, A. (1992). Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 89, 4149-4153.

White, M.F. y Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system . *The Journal of Biological Chemistry*: 269 (1), 1-4.

Xeros, N. (1962). Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature*: 194, 682-683.

Zhou, J., Holtzman, D.M., Weiner, R.I. y Mobley, W.C. (1994). Expression of trkA confers neuronlike responsiveness to nerve growth factor on an immortalized hypothalamic cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 91, 1-5.