



1 - MICROSCOPIA LIGHT-SHEET EN 3D (LSFM) PARA EL ESTUDIO DEL RECAMBIO CELULAR EN UN MODELO DE ENANISMO HIPOFISARIO

A. Pradilla-Dieste^{1,2}, J.A. Graça Fonseca^{1,2}, S. Pérez-Romero^{1,2}, M. Suárez Fariña^{1,2}, M. García-Lavandeira^{1,2}, H. Rodríguez³, L.M. Muñiz⁴ y C.V. Álvarez^{1,2}

¹Grupo Neoplasia y Diferenciación Endocrina. Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS). Universidad de Santiago de Compostela. ²Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela. ³Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Santiago de Compostela. ⁴Miltenyi Biotec S.L.

Resumen

Introducción: La microscopía de fluorescencia Light-Sheet (LSFM) permite la observación de órganos clarificados enteros, pero la aplicación en órganos endocrinos presenta un reto. Las necesidades hormonales en diferentes etapas de la vida como la pubertad o la lactancia requieren de gran plasticidad por parte de la hipófisis. Esta plasticidad en parte podría deberse a un reclutamiento de las células madre del nicho de células madre (GPS). Un marcador clave de las células GPS es GFRA2. El ratón KO para Gfra2 es de menor tamaño, y nos propusimos evaluar un posible enanismo hipofisario y una alteración del recambio a partir del nicho de células madre como posible causa. Utilizando para ello la microscopía LSF.

Métodos: Se estudio detalladamente tanto la talla como el peso de estos animales. Además, se evaluó IGF-1 en sangre periférica. Desarrollamos la técnica LSFM combinado protocolos establecidos con modificaciones que nos permitieron conseguir un elevado grado de transparencia. Elegimos marcadores relevantes en la fisiología hipofisaria, como GH (hormona producida en células somatotropas) o Sox2 (marcador de células madre y progenitoras), junto a marcadores de traceado (*tracing*), como EGFP.

Resultados: Los ratones KO para Gfra2 tienen tamaño reducido y niveles de IGF-1 significativamente menores, confirmando el enanismo hipofisario. La hipófisis es más pequeña en el ratón KO, pero la distribución de las poblaciones de las 5 células endocrinas se mantiene. Nuestra adaptación del protocolo de clarificado y tinción nos ha permitido la obtención de hipófisis transparentes con tinciones convincentes.

Conclusiones: La microscopía LSFM se convierte en una herramienta clave para el estudio funcional de la renovación celular en la hipófisis, y su alteración en enfermedades endocrinas.

Financiación: este proyecto ha sido financiado por el programa nacional de la Agencia Estatal de Investigación con la participación de fondos FEDER, a Clara V Álvarez (PID2019-110437RB-I00).