

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“LA SEÑALIZACIÓN DE ANGIOPOYETINAS A TRAVÉS DE RECEPTORES TIE ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES OBTENIDAS DESDE MÉDULA ESPINAL DE RATÓN”

Tesis presentada a Universidad de Chile
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica en el área de
especialización en Bioquímica Clínica Aplicada y
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Pablo Roberto Silva Pinto

Directores de tesis

Dr. Alejandro Erices

Dra. Carmen Romero Osses

SANTIAGO- CHILE

DICIEMBRE-2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

PABLO ROBERTO SILVA PINTO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica Clínica Aplicada y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____ de 2012.

Directores de Tesis:

Dr. Alejandro Erices

Dra. Carmen Romero Osses

Comisión Informante de Tesis:

Dra Jenny Fiedler Temer

Dr. Sergio Lavandero González

Dra. María Margarita Vega Blanco

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos Padres y Familia por dármelo todo.

A mi Yeye por darme todo el cariño, humor y energía.

Tios Toto, Tin, Pepe y Mamanina por su apoyo, esfuerzo, fe y lucas.

A mi Camilita por su amor, paciencia y compañía.

A mis compañeros de la carrera y vida, por ayudarme todos estos años.

A mis AMIGOS, por ser mis hermanos.

Al Dr. A.Erices por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron en todo sentido para realizar esta tesis.

A la bicicleta.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
SUMMARY	X
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CÉLULAS TRONCALES.....	1
1.1.1 ¿QUÉ ES UNA CÉLULA TRONCAL?.....	1
1.1.2 TERAPIAS BASADAS EN CT	2
1.2 CÉLULAS TRONCALES NEURALES.....	4
1.2.1 CTN EN EL CEREBRO.....	5
1.2.2 CTN PRESENTES EN LA MÉDULA ESPINAL.....	6
1.2.3 CTN <i>IN VITRO</i> : MODELO DE NEUROESFERAS.....	7
1.3 CTNS EN UN NICHU NEUROVASCULAR.....	9
1.4 ANGIOPOYETINAS.....	11
2 HIPÓTESIS	14
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GENERAL	14
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	14
4 MATERIALES Y MÉTODOS.	15
4.1 MATERIALES.....	15
4.1.1 ANIMALES	15
4.1.2 LÍNEAS CELULARES	15
4.1.3 MEDIO DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS.....	15
4.1.4 PROTEÍNA RECOMBINANTE	15
4.1.5 INMUNOFLUORESCENCIA	16
4.1.6 WESTERN BLOT.....	16
4.1.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	17
4.1.8 PCR, RT-PCR Y PCR EN TIEMPO REAL (QPCR).....	17
4.2 METODOLOGÍA.....	20
4.2.1 CULTIVO COMO NEUROESFERAS.....	20
4.2.2 CULTIVO EN MONOCAPA.....	20
4.2.3 RT-PCR.....	21
4.2.4 PCR	21
4.2.5 PCR EN TIEMPO REAL (QPCR)	21
4.2.6 INMUNOFLUORESCENCIA	22
4.2.7 EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT).....	22

4.2.8	ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN EN MEDIO SUPLEMENTADO CON ANG1	23
4.2.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	CULTIVOS Y CARACTERIZACIÓN DE CTN AISLADAS DESDE MÉDULA ESPINAL.	24
5.1.1	OBTENCIÓN DE NEUROESFERAS	24
5.1.2	CARACTERIZACIÓN DE NEUROESFERAS	25
5.2	EXPRESIÓN DE ANG1, PERO NO DE TIE2 EN CTN AISLADAS DESDE MÉDULA ESPINAL.	27
5.3	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL TRATAMIENTO CON ANGIOPOYETINA 1 RECOMBINANTE, SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CTN OBTENIDAS DE ME DE RATÓN.	30
5.3.1	ANGIOPOYETINA 1 FAVORECE LA MANTENCIÓN DE LA TRONCALIDAD DE LAS CTN OBTENIDAS DE ME	30
5.3.2	EL TRATAMIENTO CON ANG1 RECOMBINANTE ATENÚA LA DIFERENCIACIÓN GLIAL DE LAS CTN DE ME.....	31
6	DISCUSIÓN.....	33
6.1	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CULTIVOS DE CTN COMO NEUROESFERAS, A PARTIR DE PROGENITORES EXTRAÍDOS DESDE ME.	33
6.2	LAS CTN DERIVADAS DE ME DE RATÓN EXPRESAN ANGIOPOYETINA-1 Y INTEGRINA- B1, PERO NO EL RECEPTOR TIE2.	35
6.3	LAS CTN TRATADAS CON ANG1 RECOMBINANTE MUESTRAN UNA TENDENCIA A MANTENER LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE TRONCALIDAD Y A DISMINUIR LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DIFERENCIACIÓN GLIAL.	37
6.4	PROYECCIONES ENTORNO A LA POSIBLE VÍA DE SEÑALIZACIÓN ANG1/ INTB1 EN CTN DE ME DE RATÓN.	38
7	CONCLUSIONES.....	40
8	BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidad de autorrenovación y diferenciación de una célula troncal neural.....	4
Figura 2. Fuentes de progenitores neurales, cultivos y potencial de diferenciación.	8
Figura 3. Nicho neurovascular presente en el cerebro y médula espinal.	10
Figura 4. Vía de señalización Ang/Tie2.....	13
Figura 5. Neuroesferas como modelo de cultivo de CTN de ME.	24
Figura 6. Neuroesferas expresan distintos marcadores de CTN y progenitores de linaje neuronal y glial.....	25
Figura 7. CTN obtenidas de ME expresan el marcador de origen tisular Hoxb9.	26
Figura 8. CTN expresan marcadores específicos de progenitores neurales y de diferenciación hacia linaje neuronal y glial.	27
Figura 9. CTN expresan Ang1 y el receptor int- β 1, pero no el receptor Tie2.	28
Figura 10. Tie2 no es expresado en neuroesferas en proliferación, ni en neuroesferas en procesos de diferenciación.	29
Figura 11. El receptor Tie2 no es detectado a nivel proteico en CTN de ME.	30
Figura 12. El tratamiento con Ang1 favorece la troncalidad del las CTN derivadas de ME.	31
Figura 13. Cuantificación relativa de la expresión del mRNA los marcadores de diferenciación glial.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia	16
Tabla 2. Partidores utilizados en PCR	18
Tabla 3. Partidores utilizados en PCR en tiempo real.....	19

ABREVIATURAS

Ang	: Angiopoyetina
BDNF	: Factor neurotrófico derivado de cerebro
CNTF	: Factor neurotrófico ciliar
DMEM	: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-F12	: Mezcla 1:1 de Medio Eagle modificado por Dulbecco y nutrientes F12
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
FGF	: Factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	: Proteína ácida fibrilar glial
MAG	: Glicoproteína asociada a mielina
MAP2	: Proteína asociada a microtúbulo 2
ME	: Médula espinal
NGF	: Factor de crecimiento neural
Ngn-1	: Neurogenina 1
Ngn-2	: Neurogenina 2
SBF	: Suero bovino fetal
SDS	: Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SOX2	: SRY-box2, región determinante sexual Y-box2
TEMED	: Tetrametiletilendiamida
VEGF	: Factor de crecimiento endotelial vascular
ZSV	: Zona subventricular
ZSG	: Zona subgranular

RESUMEN

En los últimos años, las células troncales han surgido como una promisoría alternativa de terapia regenerativa en la búsqueda de nuevas estrategias para abordar distintas patologías que involucran un daño celular y la consecuente disfunción de un tejido u órgano. En el caso del sistema nervioso central, el recambio celular se encuentra sustentado sobre una población de células multipotentes denominadas células troncales neurales (CTN). Recientes estudios sugieren que este tipo células troncales está presente en la médula espinal, donde el nicho neurovascular jugaría un rol protagónico en la regulación funcional de CTN presentes a través de moléculas angiogénicas y su señalización. En este contexto, las angiopoyetinas (Angs) han sido relacionadas con mecanismos de neuroprotección y/o neurogénesis en zonas encefálicas, aunque se desconoce su eventual participación en médula espinal (ME).

Sobre la base de estos antecedentes, esta tesis postula que **“Angiopoyetina 1 (Ang1) estimula la diferenciación de CTN aisladas de médula espinal, de manera independiente a su receptor Tie2”**. Para evaluar este postulado se generaron cultivos de neuroesferas a partir de ME de ratones, las cuales fueron validadas como modelo de CTN sobre la base de su potencial de proliferación y diferenciación. En estas neuroesferas se detectó la expresión del mRNA de Ang1, sin embargo fue imposible detectar el mRNA del receptor Tie2 tanto en condiciones proliferativas, como de diferenciación. Finalmente se estudió el eventual rol de Ang1 sobre las CTN, para lo cual se agregó Ang1 recombinante sobre los cultivos, y se evaluaron cambios en los patrones de expresión de los marcadores diferenciación. Los resultados obtenidos indican que las células tratadas con con Ang1 mantendrían la expresión, del marcador de troncalidad, SOX2, en comparación a células con el mismo tiempo de diferenciación, pero sin tratamiento. Paralelamente se observó una disminución de la diferenciación astrocítica, reflejada en la baja de la expresión de GFAP.

Los resultados de este proyecto podrán entregar valiosa información respecto de los mecanismos involucrados en la regulación funcional de CTN en ME y constituir la base de estrategias dirigidas a la posible modulación de un evento de regeneración en este tejido.

SUMMARY

Over the past few years, stem cells have emerged as one promissory alternative of regenerative therapy in the discovery of new therapies to overcome different pathologies than induce tissue or organ malfunction, due to cellular damage. In the case of central nervous system, cellular renewal is sustained by a population of multipotent cells known as neural stem cells (NSC). Recent studies suggest this type of cells are present on the spinal marrow, where the neurovascular center would have an important role on the regulation of the present NSC, through the signaling of angiogenic molecules. In this context, angiopoietins (Angs) have been related with mechanisms of neuroprotection and/or neurogenesis in encephalic zones, although their possible participation in the spinal marrow (SM) is unknown.

Considering this background, this thesis postulates **that “Angiopoietin 1 (Ang1) stimulates the differentiation of neural stem cells (NSC) isolated from spinal marrow, in a Tie2 receptor independent way”**. To evaluate this assumption, neurospheres cultures were grown from mice SM, which were validated as a model of NSC due to their ability to proliferate and differentiate. On these neurospheres, the expression of Ang1 mRNA was detected, however, detection of Tie2 receptor mRNA was impossible, neither on proliferation or differentiation conditions. Finally, the possible role of Ang1 over NSC was studied. In order to do this, recombinant Ang1 was added to the obtained cultures and changes on expression patterns of neural differentiation markers were evaluated. The obtained results indicate that the Ang1 treatment would remain stemness, measure by SOX2 expression, in comparison to cells with the same time of differentiation, but without treatment. At the same time, a decrease in astrocytic differentiation was observed, reflected by the low expression of GFAP.

The results of this project may deliver valuable information with respect of the possible mechanisms involved in functional regulation of NSC in SM and, constitute the foundations for directed strategies to the possible modulation of regeneration events on this tissue..

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una gran expectativa con el promisorio potencial terapéutico que tienen las células troncales (CT) dada su capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. Esta característica podría permitir su futura aplicación clínica para el tratamiento de diferentes patologías caracterizadas por daño celular en distintos tejidos y órganos, tales como hueso, piel, sangre, corazón, músculo, hígado, páncreas, riñón y sistema nervioso. Para este último se postula encontrar eventuales soluciones a enfermedades neurodegenerativas entre las cuales destacan Alzheimer, Parkinson, esclerosis o lesiones agudas a la ME (Mimeault y Batra, 2007; Ucelli et al. 2008; Zacchigna et al. 2008; Lindvall y Kokaia, 2010).

1.1 Células Troncales

1.1.1 ¿Qué es una célula troncal?

Una CT debe cumplir al menos con dos características fundamentales:

1. Capacidad ilimitada de proliferación o autorrenovación, durante el tiempo de vida del organismo, la cual mantiene una población de CT con la misma potencialidad que su predecesora.
2. Potencial de diferenciación, el cual representa la capacidad para generar distintos linajes celulares, generalmente asociados al tejido de residencia de la CT. Esta capacidad puede visualizarse a través de dos posibles mecanismos: divisiones asimétricas, a través de las cuales se generan una CT idéntica a su predecesora y otra célula comprometida a un determinado linaje celular y, divisiones simétricas, proceso que permite generar dos células idénticas comprometidas con una vía de diferenciación específica. (Lajtha 1979; Hall y Watt, 1989; Preston et al. 2003). Las células hijas que exhiben algún grado de compromiso son reconocidas como progenitores, diferenciándose de una CT por tener una menor o nula de capacidad de autorrenovación.

Con respecto a esta última característica, la potencialidad de diferenciación que tiene una CT dependerá del estadio de desarrollo en que el organismo se encuentre. Así, podemos describir que el grado de totipotencialidad lo tienen sólo las células derivadas desde el cigoto, las que podrán llegar a formar un organismo en su totalidad (Thomson, et al. 1998). Luego, con una menor potencialidad, las CT embrionarias (CTE), obtenidas desde la masa interna del blastocisto, son capaces de dar origen a todas las células de un organismo a partir de las tres capas germinales. En un estadio de desarrollo más tardío, podemos encontrar las células troncales adultas, consideradas multipotenciales, pues tienen una limitada capacidad de diferenciarse solo a linajes celulares restringidos por el compromiso de su progenitor, entendiendo que este último, posee una menor capacidad proliferativa y tiene como destino diferenciarse a un tipo celular específico ya determinado. Por ejemplo la CT hematopoyética, la cual da origen a progenitores mieloide y linfoide. Finalmente, también se pueden encontrar en organismos adultos, células capaces de generar solo un tipo de célula, unipotenciales, como por ejemplo CT de la epidermis y las espermatogonias de los testículos (Preston et al. 2003)

Es por estas características que las CT son una importante herramienta de investigación, que busca dilucidar los mecanismos por los cuales los tejidos son mantenidos durante la etapa adulta de los organismos o que participan de la regeneración tisular frente a daño. Ambas capacidades hoy pueden ser evaluadas, incluso en tejidos en donde se pensaba que no existía capacidad de autorrenovación y regeneración, como es el caso del sistema nervioso central (SNC), en donde se ha demostrado tanto la existencia de CT como también que el proceso de neurogénesis ocurre durante la vida adulta (Zhao et al. 2008).

1.1.2 Terapias Basadas en CT

Las aplicaciones terapéuticas de las CT son una promesa que crece rápidamente en el contexto de una medicina regenerativa. En este sentido, las CT pueden ser usadas para curar algunas agresivas y letales enfermedades en humanos. (Barrilleaux et al. 2006; Bryder et al. 2006;

Mimeault y Batra, 2007). Los trasplantes autólogos o alogénicos de CT, combinados con estrategias que involucren el uso de CT endógenas del organismo tienen un potencial terapéutico para combatir patologías donde hay pérdida de función o degeneración de tejidos y órganos. También, a través del uso de CT modificadas genéticamente como vehículos para entregar agentes terapéuticos en tejidos/órganos dañados, se ha buscado tratar diferentes patologías y tipos de cáncer (Asahara y Kawamoto, 2004; Muller et al. 2006; Yu et al 2006; Takahashi y Yamanaka 2006).

Las CT hematopoyéticas, extraídas de la médula ósea, son las CT mejor caracterizadas, y su importancia radica en que son capaces de generar todos los linajes celulares hematopoyéticos. Es por esto que en la actualidad son usadas para trasplantes, tanto autólogos como alogénicos, con que son tratados pacientes con patologías hemato-oncológicas como leucemia o enfermedades autoinmunes (Preston et al. 2003). Otra aplicación de estas células es el uso combinado de éstas con quimioterapias o radiación para tratar pacientes con avanzada metástasis de cánceres no hematológicos, tales como melanomas, retinoblastoma, de riñón, pulmón, cerebro, páncreas, colon, prostático, mamas y ovarios (Mimeault y Batra, 2007). Por otra parte, se ha propuesto y evaluado el uso de este tipo de células en la regeneración de tejidos periféricos a través de la estimulación de una respuesta del sistema inmune y/o la transdiferenciación a células específicas involucradas en reparar tejidos dañados. Así, en el contexto de isquemia en corazón y retina, una revascularización podría ser lograda sobre la base de estas células, proceso que sería responsable de la regeneración local necesaria (Rafii y Lyden 2003).

Finalmente otra importante promesa terapéutica se encuentra en el campo de enfermedades que afectan el SNC, donde recientemente se ha encontrado evidencia de la existencia de células troncales neurales (CTN) en zonas específicas del cerebro y en ME en estadios tempranos de desarrollo (Lindvall. et al. 2004). Sin embargo, en estos últimos casos, aún no es posible disponer de protocolos de uso clínico de estas células. Es por esto último que resulta primordial lograr la caracterización de las distintas moléculas presentes en el microambiente que habitan estas células, ya sean factores de crecimiento, neurogénicos, e incluso angiogénicos, dado que podrían estar determinando la capacidad de proliferación o de diferenciación de una CTN en particular (Dimos et al. 2008).

1.2 Células Troncales Neurales

Las CTN son una población presente durante el desarrollo y estadio adulto del SNC de los mamíferos (Temple 2001; Okano 2002; Conti y Cattaneo, 2010). Éstas pueden diferenciarse, tanto a células de linaje glial como también neuronal y así generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Figura 1). *In vivo*, las CTN se encuentran en microambientes específicos, zonas neurogénicas, caracterizadas por contener CTN, como también progenitores intermediarios, que darán origen a células con un compromiso de diferenciación. Además, en este microambiente también están presentes diversos factores de crecimiento y contactos célula-célula, que sirven como sostén para las células presentes. La presencia de este tipo de células en el SNC de mamíferos adultos, ha revelado que el proceso de neurogénesis persiste durante la vida adulta en ciertas zonas específicas del cerebro como lo son la zona subventricular (ZSV) y zona subgranular (ZSG) del hipocampo aunque en un menor grado en comparación a estados tempranos del desarrollo (Luskin 1993; Kalyani et al. 1998; McKay 1997; Gage 2000; Shihbuddin et al. 2000; Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Estudios recientes sugieren que la ME también contiene CTN, aunque la existencia de un proceso neurogénico en condiciones normales no es totalmente clara (Androutsellis-Theotokis et al. 2010, Barnabé-Heider et al. 2010).

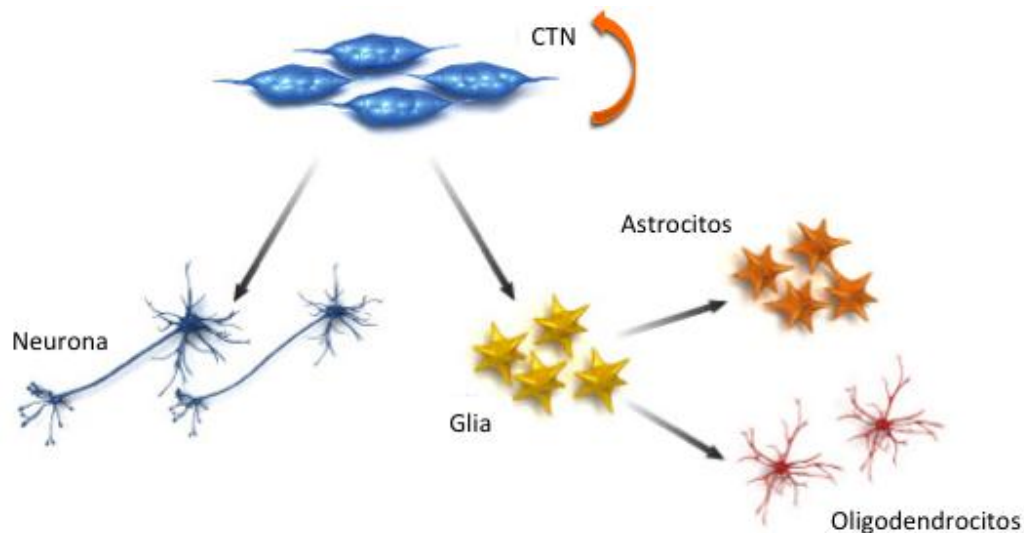


Figura 1. Capacidad de autorrenovación y diferenciación de una célula troncal neural

Una CTN puede mantener su propia población gracias a la capacidad de autorrenovación y a la vez dar origen a células del linaje neuronal y glial.

La neurogénesis en mamíferos comienza con la inducción del neuroectodermo, el cual luego forma la placa neural al día 7.5 del embrión en ratón (E7.5). Luego el plegamiento de este último permite la formación del tubo neural (E8.5). Estas estructuras se encuentran recubiertas por una capa de progenitores neuroepiteliales (Gotz y Huttner, 2005). A partir de estas estructuras se generarán posteriormente los distintos progenitores neuronales que darán origen a las distintas poblaciones de células nerviosas y finalmente al sistema nervioso completo del organismo. Estudios *in vivo* e *in vitro* de los linajes obtenidos de CTN indican la presencia de progenitores intermediarios, ya sea un progenitor neural que dará origen a neuronas y, por otro lado, un progenitor glial, que tienen como destino diferenciarse a astrocito u oligodendrocito (Qian et al. 2000; Okano 2002; Conti y Cattaneo, 2010). Entonces podemos decir que entre una CTN y su progeñie terminal existen algunos progenitores neuronales intermediarios con distintos grados de compromiso hacia una vía de diferenciación, que dan origen a neuronas o bien, a células gliales incluyendo, astrocitos y oligodendrocitos (Kriegstein y Alvarez-Buylla. 2009; Watt y Driskell. 2010).

1.2.1 CTN en el cerebro.

A pesar de la presencia de CTN en el cerebro durante el estadio adulto, el recambio y la regeneración neuronal en todo el SNC es muy baja. Sólo en dos regiones *in vivo* han sido descritas como neurogénicas: la ZSV y ZSG del giro dentado del hipocampo, a partir de las cuales se ha logrado obtener CTN (Shihbuddin et al. 2000; Arvidsson et al 2002; Alvarez-Buylla y Lim. 2004; Androutsellis-Theotokis et al. 2010). La baja capacidad de regeneración en SNC puede ser explicada por: a) factores que se puedan encontrar en el microambiente después de un evento de daño y que inhiben la diferenciación de CTN, b) que el número de progenitores neurales sea muy bajo para lograr la regeneración necesaria ante un daño (Okano, 2002) y, por último, c) que la regeneración no sea suficiente para lograr una mejoría notable en un daño en el SNC. No obstante, se ha observado que bajo ciertas condiciones como la isquemia, se logra inducir la neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos (Yagita et al. 2002).

1.2.2 CTN presentes en la médula espinal.

La existencia de CTN en la ME de mamíferos adultos, permite identificar un nuevo nicho neurogénico, fuera del mencionado a nivel cerebral. Sin embargo, no existe evidencia que éstas tengan el potencial de producir la regeneración necesaria en presencia de una lesión que afecte a este tejido (Horner et al 2000; Okano et al. 2003). Por otra parte, reportes previos indican que las CTN endógenas en la ME proliferan y se diferencian principalmente a astrocitos, pero no a neuronas durante una lesión (Johansson et al. 1999; Horner et al. 2000). Curiosamente, esta última observación, no puede ser atribuida sólo a factores intrínsecos de estas células, ya que cuando éstas son trasplantadas a zonas específicas del SNC en dominios encefálicos, tales como giro dentado del hipocampo y/o ZSV, son capaces de realizar una diferenciación tanto neuronal como también a astrocitos y oligodendrocitos eficiente (Shihabuddin et al. 2000). Esta diferencia se puede deber a una composición particular del microambiente encefálico, por ejemplo, una mayor presencia de proteínas que promueven neurogénesis, como Noggin, que al mismo tiempo inhibe la diferenciación glial. Algunos autores atribuyen esta restricción a la generación *de novo* de neuronas en la ME a distintas señales moleculares, como por ejemplo la señalización vía Notch, la cual estaría involucrado en la disminución de factores transcripcionales, como MASH1, inhibiendo así la diferenciación neuronal (Yamamoto et al. 2001). A estos factores se debe sumar la presencia de otras células nerviosas maduras, como neuronas y células gliales, cuya interacción con CTN podrían estar inhibiendo la diferenciación neuronal. (Johansson et al. 1999; Nakamura et al. 2003).

En el contexto de una lesión en la ME, el microambiente de la zona dañada resulta de vital importancia para el éxito de un tratamiento, ya sea con CTN endógenas o cultivadas *in vitro*, para luego ser trasplantadas. Estudios han reportado que factores como NGF, BDNF y CNTF aumentan durante una lesión en la ME, induciendo una diferenciación sesgada hacia el linaje neuronal por sobre el glial, pero no tendrían efecto para lograr regenerar un daño axonal (Windenfalk et al. 2001). Otros estudios indican que el aumento de CNTF, en conjunto con la baja cantidad de NT3 y BDNF, favorecen la diferenciación hacia astrocitos, oligodendrocitos y a neuronas (Okano et al. 2003). Lo mismo sucede con la presencia de LIF y BMP (Nakashima et al 1999). Otra variable importante para la diferenciación de las CTN presentes, es el aumento de diferentes citoquinas inflamatorias, cuya presencia varía según el tiempo transcurrido luego de

que se produce una lesión en la ME. Por ejemplo, durante el tiempo inmediato luego de un daño en el tejido, se observa un aumento de IL-1 β , IL-6 y TNF α , activando la señalización vía gp130/JAK/STAT, la cual induce la diferenciación astrocítica de las CTN (Bonni et al. 1997; Nakashima et al 1999). Por otro lado, a tiempos muy prolongados luego de la lesión (sobre 14 días), se forma una cicatriz glial que también inhibe la regeneración axonal al impedir el contacto célula-célula entre progenitores neurales y favorecer la diferenciación astrocítica por sobre la neuronal. Estos antecedentes sugieren una ventana temporal en donde las condiciones son la óptimas para la inducción de neurogénesis frente a un daño a la ME. Durante este espacio de tiempo se ha observado un aumento de vasos sanguíneos en la zonas dañadas de la ME (Okano et al. 2003), lo cual sugiere un rol importante de factores angiogénicos provenientes de la nueva vascularización.

1.2.3 CTN *in vitro*: modelo de neuroesferas.

La posibilidad de obtener CTN *in vitro* como neuroesferas (Reynolds y Weiss, 1992; Laywell et al. 1999) o en monocapas (Johe et al. 1996), permite evaluar la capacidad de estas células de autorrenovarse y su potencialidad para generar los distintos linajes celulares (Figura 2). En este sentido, una neuroesfera presenta una heterogeneidad celular, la cual, la asemeja a un nicho neurogénico *in vivo*. Es por esto que se hace necesario caracterizar los tipos celulares que la componen y validar así la naturaleza de una CTN. Para ello se emplean marcadores específicos tempranos y de compromiso a los distintos linajes para identificar el tipo de diferenciación que ocurre. Así, nestina, un filamento intermedio (Hockfield y McKay, 1985; Lendhal et al. 1990), y Sox2, un factor de transcripción (Conti y Cattaneo, 2010), representan marcadores de CTN; en cambio, MAP2, proteína estabilizadora de microtúbulos (Hoeck et al. 2010) y el factor de transcripción Hes 3 (Androutsellis-Theotokis et al. 2010), son marcadores de compromiso al linaje neuronal; GFAP, un filamento intermedio, es utilizado como marcador de astrocitos, y Olig2, un factor de transcripción, evidenciaría una diferenciación hacia oligodendrocitos, entre otros (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

La obtención de mayores cantidades de CTN es de interés tanto para la utilización de éstas en posibles protocolos de trasplantes para tratar daños en el cerebro o ME como también para

realizar estudios que permitan caracterizar sus propiedades (Uemura et al. 2002; Androutsellis-Theotokis et al. 2010).

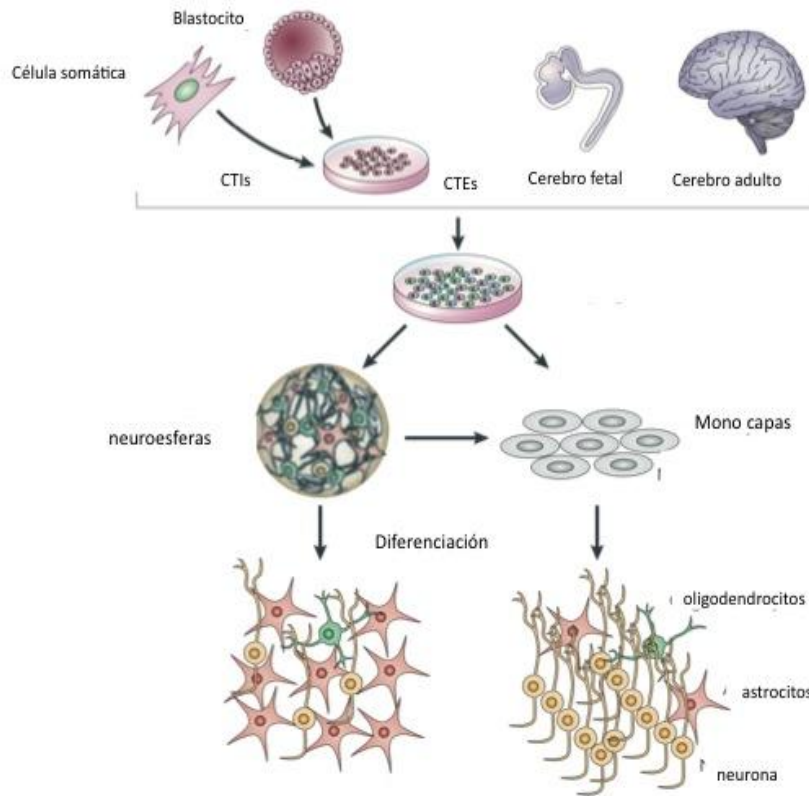


Figura 2. Fuentes de progenitores neurales, cultivos y potencial de diferenciación.

Desde células troncales embrionarias (CTEs), células troncales inducidas (CTIs), cerebro fetal o SNC adulto se aíslan progenitores neurales, los cuales, pueden ser cultivados en forma adherente en monocapa o en suspensión, como neuroesferas. Posteriormente estas CTN se diferencian a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Modificada de Conti y Cattaneo, 2010).

Por otra parte, para obtener cultivos eficientes que permitan un posterior uso terapéutico de estas CT, es importante conocer las moléculas y mecanismos que determinan su diferenciación y la proliferación. Se han descrito reguladores negativos, que mantienen en estado indiferenciado a las CTN y los progenitores derivados de éstas, entre los cuales se incluyen los componentes de la

vía de señalización Notch (activada por Musashi1), que induce a la proliferación de las CTN (Yamamoto et al. 2001; Hitoshi et al. 2002), y algunos factores de crecimiento como EGF y FGF2 (Reynolds y Weiss, 1992; Johe et al. 1996). Por otro lado, como reguladores positivos que inducen una diferenciación de CTN, existe una sinergia entre las vías de transducción gp130/JAK/STAT3 (inducida por el factor inhibitorio de leucemia LIF), y BMP que finalmente induce la diferenciación a astrocitos (Nakashima et al. 2001; Okano et al. 2003). El compromiso para diferenciarse a neuronas estaría regulado por Noggin, una antagonista de BMP, Neurogeninas (Ngn 1 y 2), Neuro D y el factor de transcripción MASH1 (Yamamoto et al. 2001, Okano 2002). Finalmente también existen factores epigenéticos, tales como metilación del DNA y estado estructural de la cromatina, el cual puede ser importante también al momento de determinar el destino de un progenitor neuronal a un linaje específico, ya sea este neuronal, astrocito o oligodendrocito (Takizawa et al. 2001).

1.3 CTNs en un nicho neurovascular.

Debido al desarrollo en paralelo que tiene el sistema nervioso con el sistema vascular y la correlación entre algunas enfermedades neurodegenerativas con anomalías en la señalización de moléculas angiogénicas (Zacchigna et al. 2008), se ha postulado que existen mecanismos moleculares comunes que regulan el desarrollo de ambos sistemas.

Las CTN se encuentran en estos nichos neurovasculares en regiones definidas del SNC, y la neurogénesis ocurre en una cercana relación espacio-temporal con el desarrollo de la vasculatura en estos nichos. Así, la presencia de una red vascular, es una fuente de los factores angiogénicos que podrían estar regulando la autorrenovación, la diferenciación y supervivencia de estos progenitores neurales. (Choi et al. 2007; Zacchigna et al. 2008).

Así, moléculas que tienen un rol conocido en el sistema vascular y que también podrían estar influenciando a CTN, han recibido el nombre de angioneurinas (Zacchigna et al. 2008). Un ejemplo de éstas es VEGF (Figura 3), un conocido factor angiogénico, que se expresa en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso de organismos invertebrados (en estadios en que no existe aún una red vascular) y es determinante para el control de la morfogénesis de las células neuronales. (Popovici et al. 2002; Olofsson y Page. 2005). Entre otros factores

considerados en un principio sólo angiogénicos, están FGF y EGF, que también regulan la supervivencia y la motilidad de las células neuronales en invertebrados (Chao, 2000). También se han descrito, como angiogénicas, a moléculas neurotróficas; tal es el caso del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), de las Neurotrofinas 3 y 4, del factor de crecimiento neural (NGF), del factor neurotrófico ciliar (CNTF), entre otros (Kermani y Hempstead, 2007; Zacchigna et al. 2008).

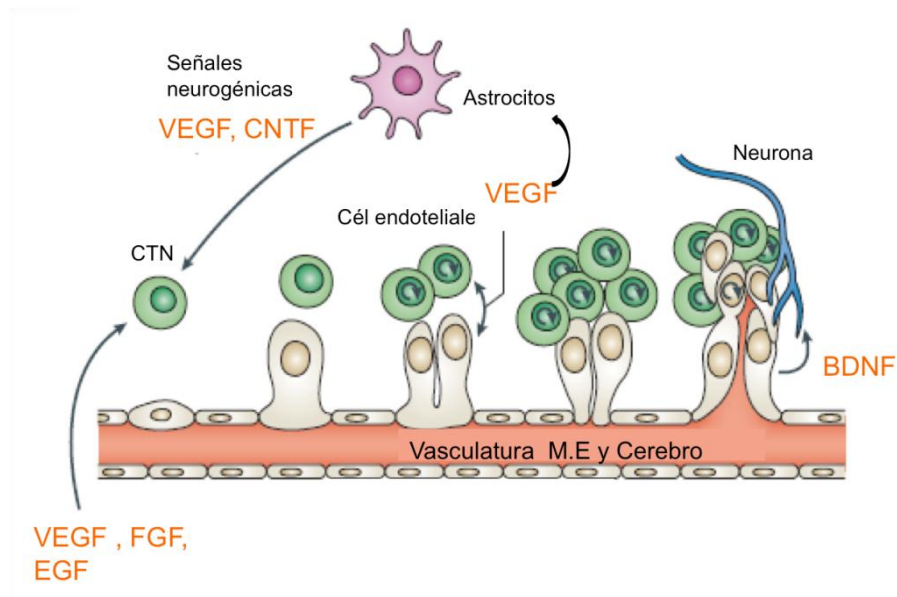


Figura 3. Nicho neurovascular presente en el cerebro y médula espinal.

La abundante vasculatura presente en los nichos neurogénicos, tanto en el cerebro como en ME, hace que a través de moléculas angiogénicas se module el destino de las CTN presentes. (Modificada de Zacchigna et al. 2008).

Dentro de los efectos observados de las angiogénicas sobre el sistema nervioso, encontramos: neuroprotección, neuroregeneración, plasticidad sináptica, entre otras. (Choi et al. 2007; Zacchigna et al. 2008). Las angiogénicas mantienen la integridad de unidades neurovasculares, tal como la barrera hematoencefálica, en donde células endoteliales se encuentran rodeadas por pericitos y células gliales. En este contexto, cualquier perturbación de los mecanismos, tanto moleculares como de las interacciones célula-célula, que regulan estos nichos, conllevan a una disfunción neuronal.

1.4 Angiopoyetinas.

Las angiopoyetinas (Ang) son factores angiogénicos que además de su rol esencial para la formación de vasos sanguíneos (Thomas y Agustin, 2009), son consideradas angioneurinas, ya que se han visto involucradas en neurogénesis y/o neuroprotección. Sin embargo los mecanismos que explican su rol en el sistema nervioso, no han sido completamente establecidos (Ohab et al. 2006; Zacchigna et al. 2008).

Actualmente se conocen 4 Ang, pero son las Ang1 y Ang2, las que han sido mejor caracterizadas. Ambas codificadas por genes independientes, corresponden a ligandos para los receptores Tie1 y Tie2. Estructuralmente estas Ang poseen dos dominios: por un extremo un dominio sobre enrollado N-terminal y, por el otro, un extremo C-terminal que contiene un dominio de tipo fibrinógeno, esencial para la posterior activación de los receptores Tie. Las Ang son secretadas como glicoproteínas y tiene un peso molecular de 75kDa. Por otro lado, los receptores Tie1 y Tie2, tienen un peso molecular aproximado de 135 y 150 kDa respectivamente. Éstos poseen un pequeño dominio intracelular tirosina quinasa y, extracelularmente, 3 dominios del tipo inmunoglobulina (Ig), más un dominio de tipo EGF y, finalmente, otro de tipo fibronectina, (Thomas y Agustin, 2009) necesario para la unión a su ligando.

Existe evidencia que Ang1, junto con su receptor Tie2 expresado por CTN de la ZSV, está involucrado, en la organización neuronal del cerebro durante el desarrollo de ratones y promueve el crecimiento de neuritas desde células de los ganglios de la raíz dorsal *in vitro* (Kosacka et al. 2005; Ward et al. 2005; Yun et al. 2009). También se ha descrito que Ang1 induce la diferenciación neuronal a través de la vía de señalización Akt (Figura 4) (Yun et al. 2009). Además, se postula que Ang1 puede interactuar con células neuronales de manera independiente a los receptores Tie, por medio de integrinas (Int) expresadas en la superficie de estas últimas (Figura 4) (Ward et al. 2005; Thomas y Agustin, 2009). A su vez, la inyección intraventricular de Ang2 aumenta el número de CTN adultas, a través de la activación del factor de transcripción Hes3, el cual, se encuentra regulado por Notch. Esta vía de señalización se encuentra ampliamente distribuída en distintas zonas neurogénicas del SNC de ratas adultas y

primates (Androutsellis-Theotokis et al. 2010). *In vitro*, se ha observado que el mecanismo que mantiene la autorrenovación de CTN, involucra la fosforilación de STAT3 inducida por Ang2, evento que induce la expresión del factor de transcripción Hes3. Esto tiene como consecuencia la expresión de sonic hedgehog (Shh), el cual podría estar a la vez estimulando la liberación de Ang2 (Pola et al. 2001), estableciéndose un circuito de retroalimentación positiva regulada por esta vía de señalización. *In vivo*, cuando ratas adultas (3-6 meses) fueron tratadas con Ang2 se observó una estimulación de la expansión de CTNs aisladas de ME, observándose un aumento considerable del número de colonias en cultivos en monocapas para estas células (Androutsellis-Theotokis et al. 2010).

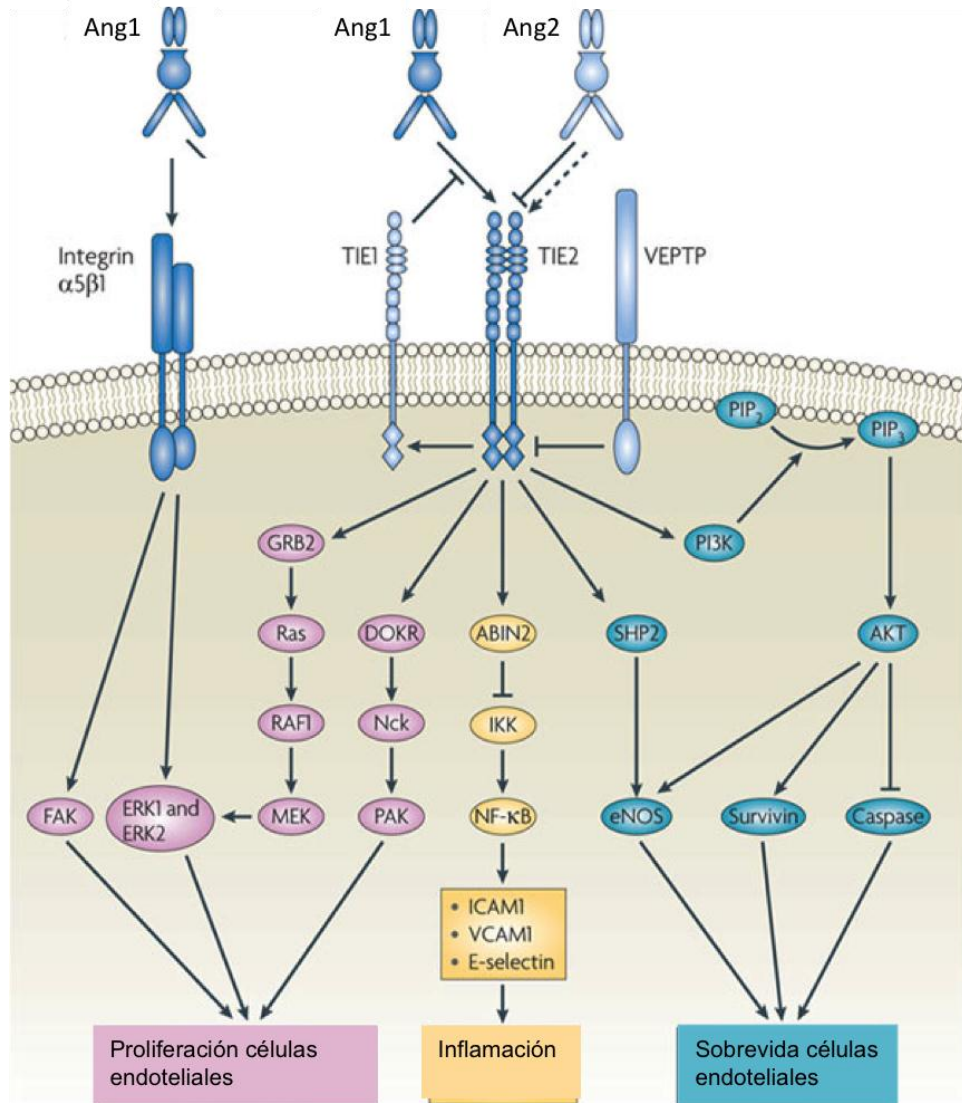


Figura 4. Vía de señalización Ang/Tie2.

Tie2 es positivamente activado por Ang1, mientras Ang2 y Tie1 se encuentran antagonizando esta señalización. La regulación de esta cascada de distintos intermediarios moleculares determinan diversos procesos como de inflamación, además de proliferación, migración y sobrevida celular (modificada de Huang et al. 2010).

Sobre la base de estos antecedentes es posible pensar que las vías de señalización Ang/Tie, o bien Ang/Int (Figura 4) modulan protagónicamente el destino de una CTN en el nicho neurovascular presente en la ME, influyendo sobre su diferenciación a hacia células de linaje glial, como también neuronal.

2 HIPÓTESIS

Angiopoyetina 1 estimula la diferenciación de CTN aisladas de médula espinal de ratón, de manera independiente a Tie2.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de Angiopoyetina 1 sobre la capacidad de diferenciación de CTN aisladas de médula espinal de ratón.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer y caracterizar cultivos de CTN de ME de embriones de ratones en estadio 18.5 (E18.5), evaluando la efectividad de cultivos como neuroesferas en condiciones de proliferación y diferenciación.
- 2.- Analizar la expresión génica de Angiopoyetina 1 y sus receptores (Tie 2 y $\text{Int}\beta 1$) en las CTN, a nivel de mRNAs
- 3.- Evaluar el efecto *in vitro* de Angiopoyetina 1 sobre la diferenciación de CTN de ME utilizando Angiopoyetina recombinante.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIALES

4.1.1 Animales

Se utilizaron ratones C57bl6 en estadio fetal 18.5 días post fecundación (E18.5), los cuales, se trataron de acuerdo a todas las normativas éticas exigidas por la Comisión de Bioseguridad y Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El proyecto FONDECYT 1090427, desde el punto de vista ético, fue revisado y aprobado por Conicyt.

4.1.2 Líneas celulares

Células endoteliales humanas EA.hy como control positivo de expresión de Ang1 y de los receptores Tie2 y Intβ1, las cuales fueron cultivadas en el laboratorio de Células Troncales y Regeneración Tisular del Dr. Alejandro Erices O.

4.1.3 Medio de cultivo y suplementos

Los siguientes reactivos se obtuvieron desde GIBCO, Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, EEUU); tripsina (n° catálogo: 27250-018), DMEM (n°catálogo: 12800-017), DMEM/ F12 (n° catálogo: 12400-024), N2 (n°catálogo: 17502-048), B27 (n°catálogo: 17504-044) y albumax (n° catálogo: 11020-021). Desde AppliChem (Darnstadt, Alemania) glucosa D (+) (n°catálogo: A1349,1000). De SIGMA (St Louis Mo, EEUU) poli-D-lisina 5 mg/mL (n°catálogo: P7405) De R&D SYSTEMS (Minneapolis, EEUU) FGF (n°catálogo: 3139-FB-025/CF) y EGF (n°catálogo: 2028-EG-200). Desde Hyclone, Thermo Scientific (Miami, EEUU), penicilina/estreptomina (10.000 unidades/mL penicilina y 10.000 µg/mL de estreptomina, n° catálogo: SV30010) y suero fetal de bovino (n°catálogo: SH30071.03).

4.1.4 Proteína recombinante

De R&D Systems se obtuvo la proteína recombinante humana, Angiopoyetina-1 (Ang1), la cual fue derivada de una línea celular de mieloma de ratón (n° de catalogo 923-AN).

4.1.5 Inmunofluorescencia

De marca Dako Corporation (Carpintería, CA, EEUU) medio de montaje Dako (n°catálogo: S3023), Desde Winkler Ltda (Santiago, Chile) paraformaldehído (n°catálogo: PA-11510) y Tritón 100X (n°catálogo: BM-2020).

Anticuerpos usados en inmunofluorescencia, tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia

Antígeno	Código	Marca	Clonalidad y origen	Dilución de trabajo
Nestina	Ab81093	Abcam	policlonal conejo	1:200
GFAP	13-0300	Invitrogen	Monoclonal rata	1:50
β III-tubulina	280026	Promega	Monoclonal ratón	1:250

4.1.6 Western Blot

De la marca Thermo scientific, sustratos quimioluminiscentes, ECL (n°catálogo: 32106), membrana fluoruro de polivinilideno (PVDF), (n°catálogo: 88585). De BIO-RAD (California, EEUU) Bio-Rad Protein Assay (n°catálogo: 500-0001) De US Biological (Texas, EEUU), SDS (n°catálogo: S5010), Tris base (n°catálogo: T8601) y glicina (n°catálogo: G8160). De Winkler son el Tween 20 (n°catálogo: TW-1652), TEMED (n°catálogo: BM-1970), β -mercaptoetanol (n°catálogo: BM-1200), Acrilamida (n°catálogo: BM-0070) y Bis-acrilamida (n° catálogo: BM-0280). De SIGMA, persulfato de amonio (n°catálogo: A3678), solución Ponceau S (n°catálogo: 141194). Anticuerpo anti-Tie2 del fabricante BD Pharmingen (n°catálogo: 357039) y anticuerpo de cabra, anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidada, marca Jackson I.R. (n° catálogo: 111-035-003).

4.1.7 Extracción de RNA total

De OMEGA bio-tek (Norcross, Georgia, EEUU), Kit de extracción de RNA E.Z.N.A (n°catálogo: R6834-02).

4.1.8 PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR).

De Promega (Madison, EEUU), DNasa libre de RNasa (n°catálogo: M610A), tampón 10X (n° catálogo: M198A) y solución STOP (n°catálogo: M199A), random primers 500µg/mL, (n°catálogo: C118A), transcriptasa inversa, tampón inverso (n°catálogo: M170B), GoTaq, cloruro de magnesio 25 mM y tampón 5X Go Taq (n°catálogo: M8295). De Jena Bioscience (Jena, Alemania), nucleótidos, dATP (n°catálogo: NU-1001), dCTP (n°catálogo: NU-1002), dGTP (n°catálogo: NU-1003), dTTP (n°catálogo: NU-1004) Del fabricante Stragene Brilliant, SYBR Green QPCR Master Mix. De New England BioLabs (Ipswich, EEUU), marcador de DNA de 100 pares de bases 6X (n°catálogo: N3231S). De Lonza (Portsmouth, EEUU) es la agarosa (n°catálogo: 50004). Partidores en reacciones de PCR (tabla 2) y qPCR (tabla 3) fueron obtenidos desde IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.).

Tabla 2. Partidores utilizados en PCR

Gen	Partidor directo	Partidor reverso	Tamaño Producto (pb)
Ang 1	CCTTCAAGGCTTGGTTTCTCG	CCCAAGCCAATATTCACCAGAG	421
Ang 2	CAGCTGCCGATCTTCCTCC	GGCTTCCACATCAGTCAGTTTCC	289
Tie 1	CTTCTTTCGGCTCATCGTGCG	CAGCGGGTGCCAGTGAATC	148
Tie 2	TCCAAGGATGCCTCTGCTCTC	CACCATCCCAGCCACTGTG	323
Nestina	CAGGCTTCTCTTGGCTTTCCTG	GGTGAGGGTTGAGGGGTGG	438
GFAP	CGAAGCTAACGACTATCGCC	TTGTGACTTTTTGGCCTTCC	373
Sox2	GCAGTACAACCTCCATGACCAG	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC	169
MAP2	AACATCAAACATTCTGCTGGG	GATCTCAGCCCCGTGATCTA	291
GAPDH	CACCCAGAAGACTGTGGATGG	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	428

Tabla 3. Partidores utilizados en PCR en tiempo real.

Gen	Partidor directo	Partidor reverso	Tamaño Producto (pb)
Ang 1	GTCACACAGGGACAGCAGG	CCACAGGCATCGAACCACC	139
Tie 2	CAGCTCTGAGCCTTACTTTGGG	CTCTTGGAGGAGGGAGTCCG	242
Nestina	GGCACACCTCAAGATGTCCC	CTGGTCCTCTGGTATCCCAAGG	163
SOX2	GCAGTACAACCTCCATGACCAG	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC	169
GFAP	CTCAATGCTGGCTTCAAGGAGAC	CGCCTTGTTTTGCTGTTCCAGG	117
Olig2	CCAGAGCCAGGTTCTCCTCC	GCGACTAGACACCAGGCTGG	136
Integrina β 1	GTGAACAAAACCTGCACCAGCC	CACCAAGTTTCCCATCTCCAGC	249
GAPDH	CAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC	203

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Cultivo como Neuroesferas

Las CTN se obtuvieron de ME de embriones E18.5 de ratones (C-57b6) según adaptaciones de protocolos previamente descritos (Shihabuddin, 2008). Brevemente, la ME disectada fue disgregada mecánicamente utilizando pipetas Pasteur. Las células así obtenidas fueron resuspendidas y sembradas a una densidad de 50.000 células/cm² en medio DMEM/F12 suplementado con 6 mg/ml glucosa, 3 mg/ml Albumax, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF, 2% B27, 1% N2 y 50 U/mL Penicilina/50 µg/mL Estreptomina. Los factores mitogénicos fueron suplementados cada dos días. Luego de 7 días en condiciones de proliferación, las neuroesferas en suspensión fueron disgregadas mecánicamente con pipeta Pasteur y/o enzimáticamente utilizando Tripsina 0.05 %, generando subcultivos a partir de células únicas, resuspendidas en medio fresco en las condiciones previamente descritas.

4.2.2 Cultivo en Monocapa

Con el objetivo de evaluar la diferenciación de las CTN, las neuroesferas fueron sembradas en cristales previamente recubiertos con Poli-D-lisina para permitir su adhesión. Para inducir diferenciación se utilizó el mismo medio previamente descrito, pero sin factores mitogénicos. Las células adheridas permanecieron en las diferentes condiciones de tratamiento por un periodo de 4 días, para luego ser fijadas y analizar la expresión de distintos marcadores de linaje a través de RT-PCR, qPCR y inmunofluorescencia.

4.2.3 RT-PCR

Para evaluar la expresión de marcadores de CTNs en las neuroesferas obtenidas desde ME, se aisló el RNA total con el kit de extracción de RNA E.Z.N.A según indicaciones del fabricante, posteriormente el material genético fue cuantificado por densidad óptica medida a 260 nm y su pureza evaluada con la razón de 260/280 nm. Además, su integridad se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Luego, el cDNA es obtenido por retrotranscripción de 1 µg de RNA utilizando Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), para lo cual, las muestras se trataron previamente con 1µl de DNAsa (1U/µl, Promega). El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C.

4.2.4 PCR

La reacción de PCR se realizó con 1-2 µl de cDNA templado, 1,2 µl MgCl₂ (25mM), 0.16 µl dNTPs (25 mM) 0,1 µl TaqDNA-polimerasa (5000 U /ml, Promega), tampón 5X y 1µl de cada partidor. El programa ingresado en el termociclador utilizado (MyGene TM Series Peltier Thermal Cycler) constaba de los siguientes pasos: denaturación de 5 minutos a 94°C, amplificación de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C (también se evaluó la eficiencia de la reacción en el intervalo de 50°C y 60°C), 1 minuto a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Como marcadores de interés, se analizó la expresión de Nestina y SOX2; como marcadores de progenitor neuronal, GFAP como marcador de diferenciación a astrocitos, MAG como indicador de oligodendrocitos y MAP2 como marcador de diferenciación neuronal (ver tabla2). Además, se analizó la presencia de Angs, tanto como de sus posibles receptores Tie e integrinaβ1. El producto amplificado en la reacción fue observado en un transiluminador utilizando un gel de agarosa al 1% y tinción con BrEt. Como control positivo de la reacción se utilizó la amplificación del gen constitutivo GAPDH.

4.2.5 PCR en tiempo real (qPCR)

Para evaluar diferencias cuantitativas en la expresión de los distintos marcadores, Ang1 y receptores, se realizó qPCR utilizando los partidores listados en la tabla 3. El qPCR se llevó a cabo con Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stragene) y utilizando el termociclador, Mx3000P, del mismo fabricante. A la mezcla antes mencionada, se agregó, para cada reacción, 1µl de cada uno de los partidores de interés, listados en la tabla 3, 2µl de cDNA templado y el

flouróforo ROX, el cual, actúa como normalizador entre las distintas reacciones. Cada cuantificación se realizó por triplicado. Para cada cuantificación, el equipo calculó los valores de amplificación relativa (C_t , *Cycle Threshold*), de cada gen de interés; éstos se contrastaron con los valores de amplificación del control utilizado y se normalizaron con la amplificación del gen constitutivo según el modelo matemático $\Delta\Delta C_t$, corregido por Pfaffl (Pfaffl 2001).

4.2.6 Inmunofluorescencia

Las neuroesferas fueron caracterizadas mediante marcación con anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos asociados a los distintos linajes de diferenciación. Para este propósito fueron fijadas con PFA 4% por 20 min. a temperatura ambiente, luego fueron permeabilizadas y bloqueadas con 0,3% Tritón + SFB 10% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se realizó toda la noche a 4°C, con diluciones en la misma solución de bloqueo anteriormente descrita según: 1:200 anti-Nestina (policlonal conejo, Abcam), 1:50 anti-GFAP (monoclonal rata, Invitrogen), más 1:250 β 3-Tubulina (monoclonal ratón, Promega). Luego de lavar con PBS, el anticuerpo secundario correspondiente, fue incubado por 1 hora a temperatura ambiente: Alexa Fluor 488 burro anti-rata, Alexa Fluor 555 burro anti-ratón, Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo. Después de un último lavado con PBS, las muestras se incubaron con Hoechst durante 5 minutos a temperatura ambiente para la marcación de núcleos. Finalmente los cristales fueron montados con “medio de montaje para fluorescencia”, Dako Según corresponda, las muestras se analizaron por microscopía de epifluorescencia.

4.2.7 Expresión proteica (Western blot)

Para evaluar la expresión proteica del receptor Tie2 en los progenitores, las neuroesferas fueron lisadas con tampón 1% SDS, 62,5mM Tris pH 6,8, 10% glicerol. Adicionalmente se obtuvieron proteínas de placenta de ratón como control positivo. La concentración de proteína obtenida se midió a través del kit Bio-Rad Protein Assay, basado en el método de Bradford. Entonces, 60 μ g de proteína de cada muestra fueron tratados con tampón de carga (6X) y calentadas a 95°C por 5 minutos, luego, se separaron mediante gel acrilamida/bisacrilamida 8% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y, a continuación, se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. Para evitar uniones inespecíficas en la inmunodetección, la membrana se incubó con solución

bloqueo de leche descremada 5% en PBS-Tween 0.05% (PBS-T), posterior a esto, se realizó la primera incubación por 2 horas con anti-Tie2 (BD Pharmingen) a una dilución de 1:500. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-T y luego incubadas toda la noche con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidada, anti-IgG de ratón (Jackson I.R.) en una dilución 1:5000. El revelado se realizó usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo).

4.2.8 Ensayo de diferenciación en medio suplementado con Ang1

Luego de obtener un promedio de 50 neuroesferas para cada condición, éstas fueron sembradas sobre poli-D-lisina utilizando un medio sin los mitogénos EGF y FGF, induciendo así, su diferenciación por un periodo de 4 días. Con el fin de medir el efecto de Ang1 sobre este proceso de diferenciación, se agregaron 500 ng/ml de esta proteína recombinante. Como control negativo de esta condición, sólo se agregó PBS. Una vez finalizado el periodo de diferenciación de 4 días, se extrajo el RNA de las células fijadas, el cual fue amplificado por qPCR, cuya cuantificación relativa obtenida en las distintas condiciones fue analizada y comparada.

4.2.9 Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden a imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las cantidades relativas de cada marcador utilizado en el ensayo de diferenciación fueron calculadas por medio del método $\Delta\Delta Ct$. Se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA de una vía y Tukey con una significancia $p \leq 0.05$

5 RESULTADOS

5.1 Cultivos y caracterización de CTN aisladas desde médula espinal.

5.1.1 Obtención de neuroesferas

A partir de ME de embriones de ratón de estadio 18.5, se logró obtener neuroesferas, morfológicamente correctas (Figura 5). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones proliferativas, administrando cada 2 días los mitógenos (EGF y FGF). Luego de 7 días, los cultivos fueron disgregados con el objeto de obtener subcultivos a partir de progenitores únicos, con lo que se logra un cultivo más limpio y con más CTN presentes. Las neuroesferas obtenidas fueron mantenidas en condiciones proliferativas en suspensión (Figura 5, A y B) o bien, en condiciones adherentes (Figura 5, C y D), con el fin de inducir su diferenciación.

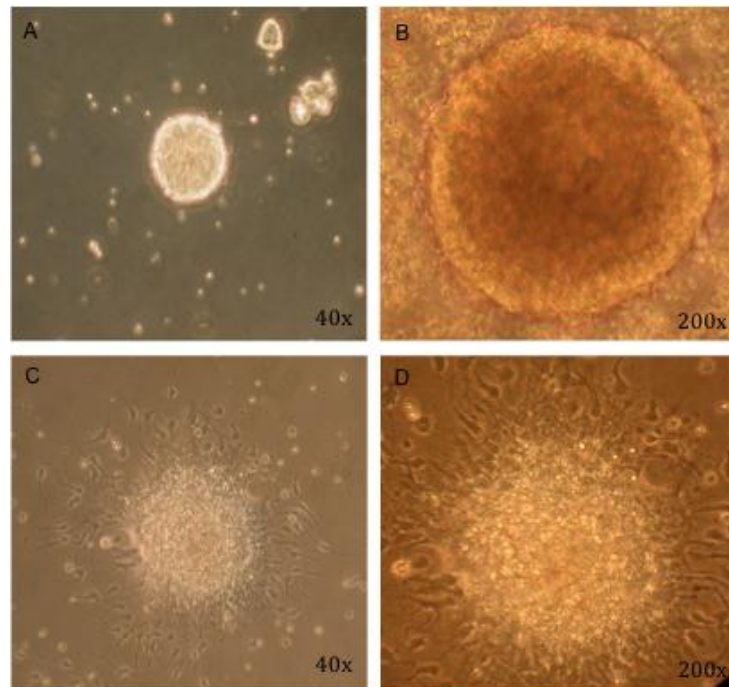


Figura 5. Neuroesferas como modelo de cultivo de CTN de ME.

A y B. cultivos de CTN como neuroesferas en suspensión. C y D: neuroesferas adheridas en poli-D-lisina. Ambos casos observados por microscopía de contraste de fases.

5.1.2 Caracterización de neuroesferas

La presencia de progenitores neurales integrando una neuroesfera en condiciones proliferativas, se confirmó por la presencia de RNA mensajero de Nestina y Sox2 (Figura 6). También se comprobó que en una neuroesfera existen progenitores gliales, específicamente comprometidos con una diferenciación hacia astrocitos y oligodendrocitos, al observar los transcritos de GFAP y Mag respectivamente. Finalmente se evaluó la presencia de progenitores comprometidos a diferenciarse a neuronas, la cual, fue positiva ya que existe expresión del RNA mensajero de MAP2. A través de RT-PCR se detectó la expresión de todos los transcritos indicados (Figura 6). La expresión de este conjunto de genes es representativa de una neuroesfera que contiene CTN con capacidad de autorrenovación y diferenciación, lo que se refleja en la coexistencia de distintos tipos de progenitores en su estructura. Esta observación permite concluir que contamos efectivamente con una población heterogénea de CTN, lo cual, es una característica fundamental del modelo de neuroesferas como tal.

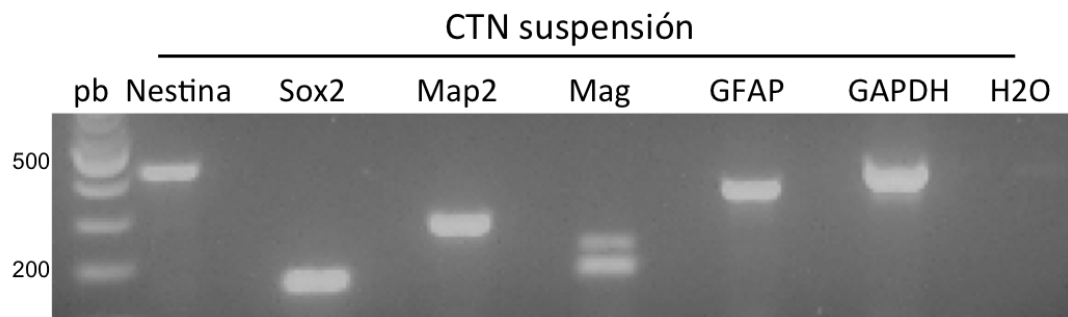


Figura 6. Neuroesferas expresan distintos marcadores de CTN y progenitores de linaje neuronal y glial.

En la figura se muestra la expresión de los distintos marcadores de linaje encontrados en neuroesferas en suspensión. La asociación del marcador con un linaje es la siguiente: Nestina: progenitor neural, Sox2: progenitor neural, Map2: neuronal, Mag: oligodendrocítico, GFAP: astrocítico y GAPDH: gen constitutivo, utilizado como control positivo interno. (n=4, imagen representativa)

Adicionalmente, se verificó que el origen tisular de las neuroesferas obtenidas fuera efectivamente la ME. Para esto se analizó la expresión del RNA mensajero de Hoxb9, un marcador de localización específico para la región de la ME (Onorati et al. 2011). En la figura 7 se observó que este marcador es positivo para la muestra obtenida de ME (ME), pero negativa para CTN aisladas desde la corteza cerebral(CO).

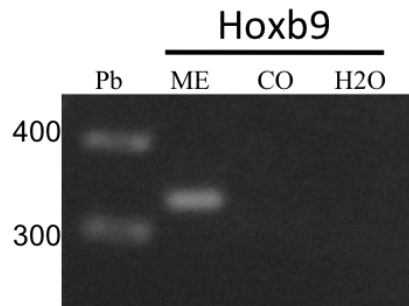


Figura 7. CTN obtenidas de ME expresan el marcador de origen tisular Hoxb9. mRNA de Hoxb9, marcador del origen de las CTN; su presencia indica la procedencia las CTN desde la ME; ME: neuroesferas de origen ME; CO: neuroesferas de origen corteza cerebral y H2O: agua. (n=3, imagen representativa).

Finalmente, luego de lo observado en el análisis de RNA mensajero, y para corroborar la presencia de distintos linajes de CTN presentes en una neuroesfera, se evaluó la expresión de marcadores a nivel de proteínas. Así, se detectó la expresión de estos marcadores, tanto de progenitores neurales, tal como lo es Nestina (Figura 8B), como también marcadores de los diferentes linajes encontrados en una neuroesfera en condiciones de diferenciación, como GFAP, marcador astrocítico (Figura 8E) y tubulina- β 3, marcador de diferenciación neuronal (Figura 8F). Por otra parte, resulta interesante destacar que la distribución de los distintos marcadores sugiere que los progenitores se distribuyen aparentemente de forma homogénea en el centro de la neuroesfera, mientras que células ya comprometidas ocupan localizaciones en territorios más periféricos (Figura 8C y 8G respectivamente).

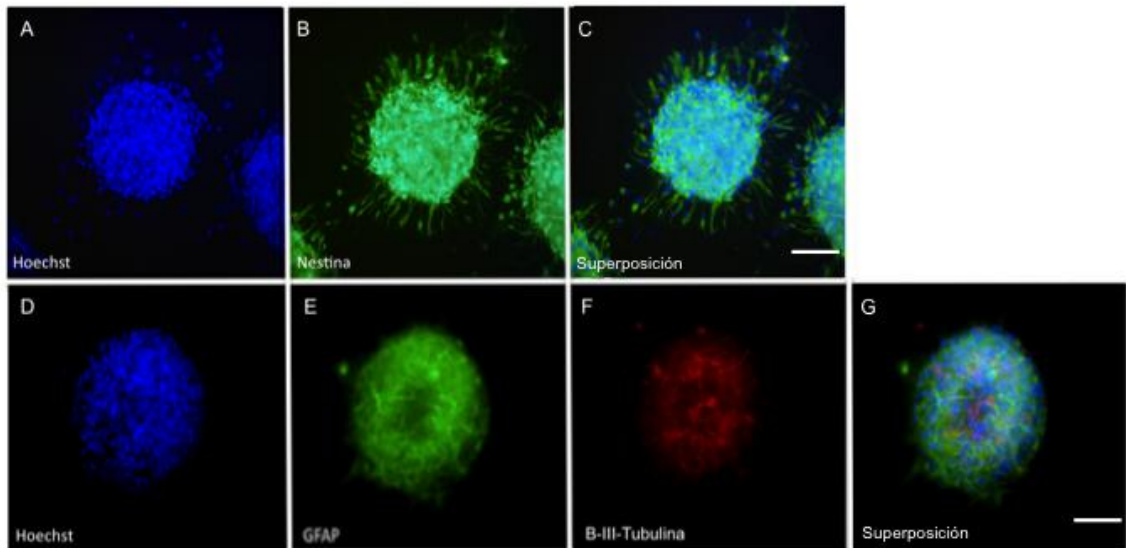


Figura 8. CTN expresan marcadores específicos de progenitores neurales y de diferenciación hacia linaje neuronal y glial.

Inmunofluorescencia para los marcadores de progenitor neural (B), linaje astrocítico (E), neuronal (F), Hoechst se utilizó como marcador de núcleo celular (A y D), superposición (C y G). La línea indica 100 μ m (n=4, imágenes representativas).

Esto confirmó, a nivel de RNA mensajero y proteínas, que las neuroesferas obtenidas están conformadas por una población heterogénea de precursores, lo cual, coincide con lo descrito en la literatura para este tipo de cultivo en condiciones proliferativas (en suspensión) e incluso luego de 4 días de diferenciación.

5.2 Expresión de Ang1, pero no de Tie2 en CTN aisladas desde médula espinal.

Se estudió la posible participación del sistema Ang1/Tie2 en la regulación funcional de CTNs de ME. En una primera instancia se evaluó la expresión del RNA mensajero del ligando Ang1 por parte de las neuroesferas utilizadas. Así, a través de RT-PCR, se confirmó la presencia del mRNA correspondiente, tanto en neuroesferas en suspensión (Figura 9A), como también luego de 0 días y 4 días en condiciones de diferenciación (Figura 9B). Esta observación, en conjunto con otros antecedentes de la literatura, sugiere que Ang1 puede estar cumpliendo un rol funcional en CTNs y/o células diferenciadas a partir de ella. En este sentido, no se logró amplificar el mRNA de Tie2, correspondiente al receptor clásico de Ang1, en ninguna de las

condiciones de cultivo. Sin embargo, sí se observa expresión de Tie2 en los controles positivos utilizados, células endoteliales EAhy (Figura 9C) y en muestra de placenta de ratón (no se muestra). Considerando que integrina- β 1 (Int β 1) ha sido descrita como un receptor alternativo para Ang1 (Carlsson et al. 2001), también se analizó la expresión de este receptor en neuroesferas. La expresión del mRNA de Int β 1 fue positiva tanto en neuroesferas en suspensión como también en condiciones de diferenciación (Figuras 9A y 9B). La integridad del RNA utilizado para obtener los cDNA evaluados se muestra en la figura 9D.

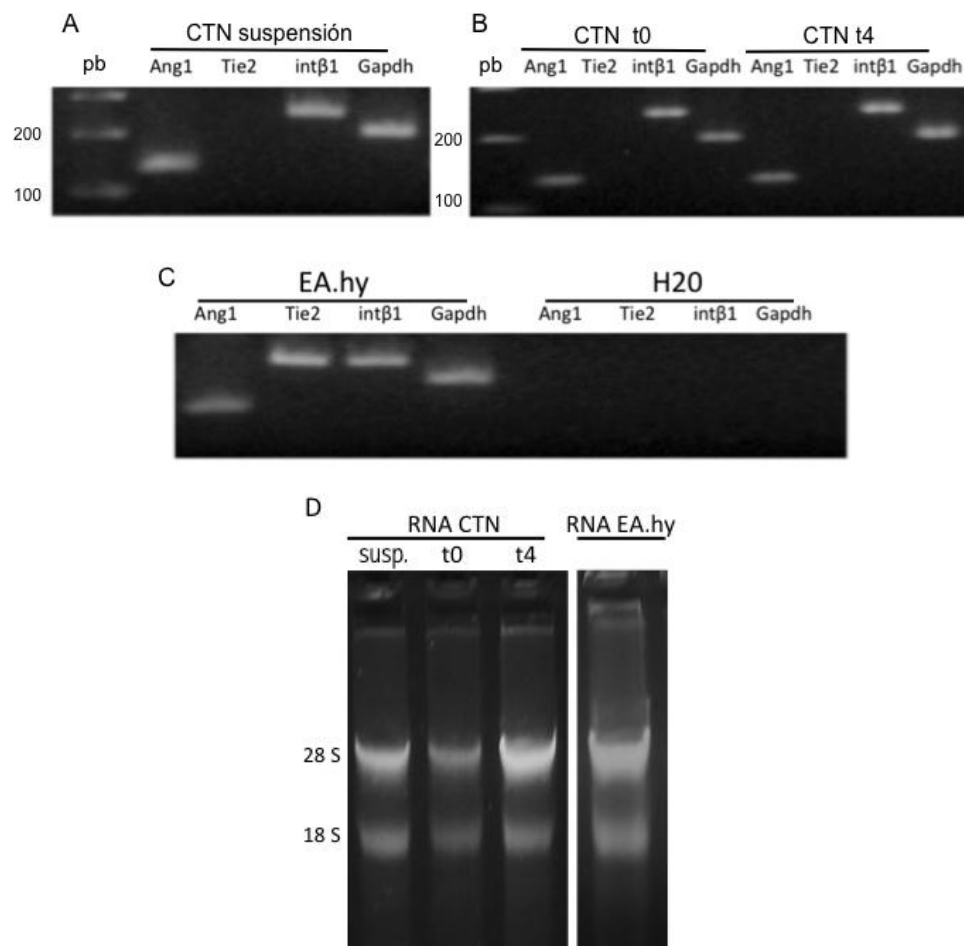


Figura 9. CTN expresan Ang1 y el receptor int- β 1, pero no el receptor Tie2.

Neuroesferas en suspensión y bajo condiciones de diferenciación (adheridas 0 y 4 días) expresan Ang1, Integrina- β 1, pero no el receptor Tie2 (A y B). Como control positivo se utilizó células endoteliales EA.hy (C), para todos los casos GAPDH como control de carga y agua como control negativo. Integridad de RNA de las muestras utilizadas, susp. (CTN en suspensión) (D). (n=4, imágenes representativas).

Con el fin de detectar el mRNA del receptor Tie2, adicionalmente se realizó un qPCR (Figura 10). Sin embargo, la cantidades del amplicón obtenido no son significativas, en ambas condiciones evaluadas (suspensión y adhesión) y se encuentran muy por debajo en comparación con los resultados obtenidos en las células endoteliales (EA.hy), utilizadas como control positivo. Como control de amplificación y normalizador se utilizó GAPDH para todos los cDNA evaluados (Figura 10B) y como control de especificidad se muestra las curvas de disociación obtenidas para Tie2 (Figura 10C).

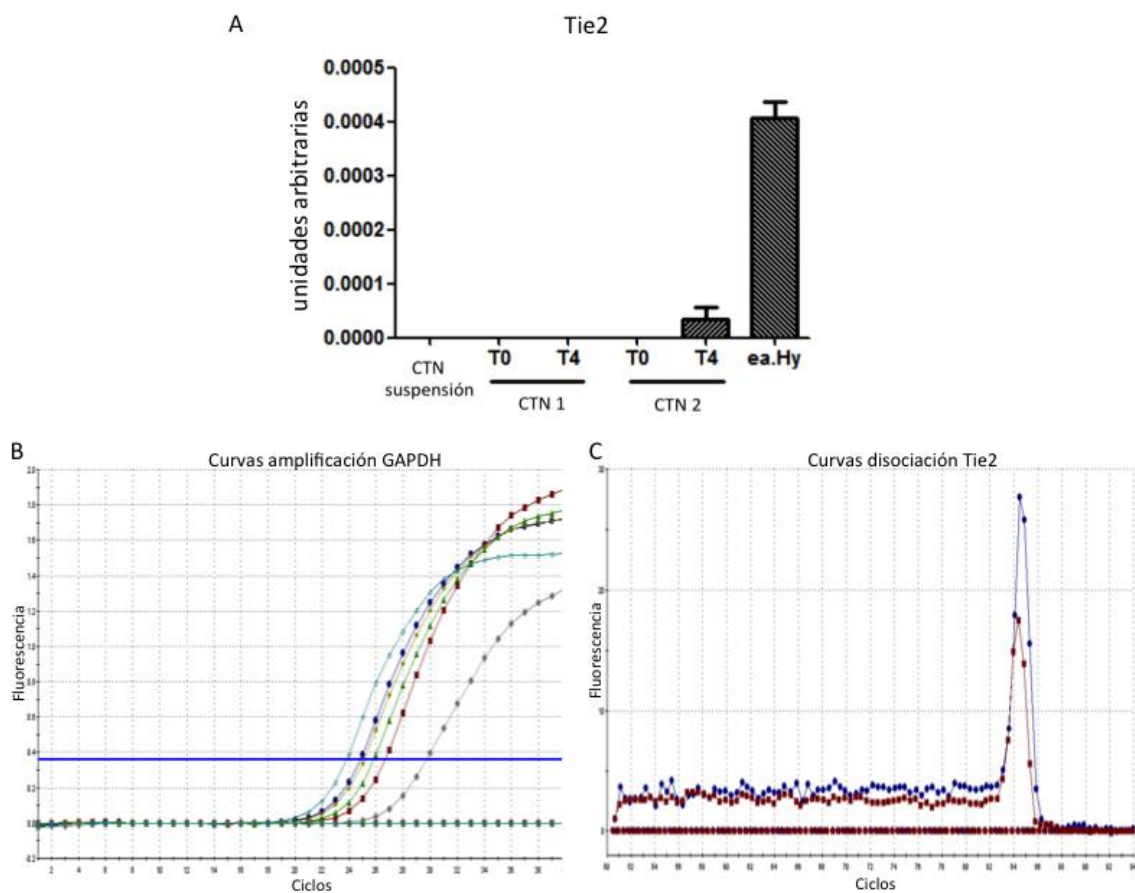


Figura 10. Tie2 no es expresado en neuroesferas en proliferación, ni en neuroesferas en procesos de diferenciación.

Cuantificación relativa obtenida por qPCR, donde se determinó la cantidad relativa del mRNA de Tie2, en muestras de neuroesferas en condiciones de proliferación y diferenciación (CTN1 y CTN2, correspondientes a 0 y 4 días de cultivo respectivamente). Como control positivo se utilizó células endoteliales humanas ea.Hy (A), curvas de amplificación GAPDH (B) y curvas de disociación para Tie2 (C). (n=2, experimento por triplicado)

De manera congruente a lo observado a través de RT-PCR y qPCR, la detección de la expresión del receptor Tie2 en neuroesferas, fue negativa a nivel de proteínas. Como se observa en la figura 11, donde sí se detectó Tie2 en un extracto de proteínas totales de placenta de ratón, pero no en la muestra de neuroesferas utilizadas. Teniendo en cuenta implicaciones técnicas, tales como la baja eficiencia observada del anticuerpo anti-Tie2 al realizar Western blot, como también la disponibilidad de células endoteliales ea.Hy, se decidió no repetir esta técnica con células ea.Hy como control positivo adicional para Western blot.

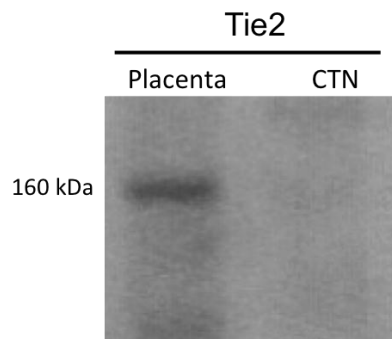


Figura 11. El receptor Tie2 no es detectado a nivel proteico en CTN de ME.

Western blot, en donde se observó la presencia de Tie2 a nivel de proteína, las muestras utilizadas corresponden a neuroesferas en suspensión (CTN) y extracto de proteínas totales de placenta como control positivo (n=3, imagen representativa)

5.3 Evaluación *in vitro* del tratamiento con Angiopoyetina 1 recombinante, sobre la diferenciación de las CTN obtenidas de ME de ratón.

5.3.1 Angiopoyetina 1 favorece la mantención de la troncalidad de las CTN obtenidas de ME

Se comparó cuantitativamente a través de qPCR los niveles de expresión del mRNA de SOX2, el cual, es indicador de troncalidad. Como se muestra en la figura 12, luego de 4 días de diferenciación, las células sin tratamiento (T4) pierden expresión de este marcador, lo cual sería congruente con el curso del proceso de diferenciación. Sin embargo en las células tratadas con Ang1 recombinante (T4+Ang), se evidenció una expresión de SOX2 levemente mayor en

comparación a las sin tratamiento (T4), sugiriendo que estas células mantienen su troncalidad a pesar de encontrarse en condiciones que favorecen la diferenciación.

5.3.2 El tratamiento con Ang1 recombinante atenúa la diferenciación glial de las CTN de ME

La diferenciación astrocítica, representada por el nivel de expresión del marcador GFAP, luego de 4 días en condiciones de diferenciación las células con tratamiento (T4+Ang), disminuyó en comparación a las células sin tratamiento con Ang1 (T4) (Figura 13A), indicando que la diferenciación hacia este linaje tiende a ser atenuada por Ang1 en las CTN evaluadas.

Finalmente, en la Figura 13B, se muestra la cuantificación obtenida del marcador de diferenciación oligodendrocítica, OLIG2, para el cual no se encontraron diferencias en los niveles de expresión en las condiciones evaluadas.

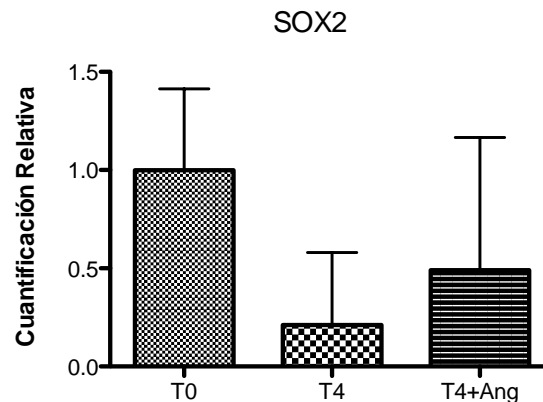


Figura 12. El tratamiento con Ang1 favorece la troncalidad del las CTN derivadas de ME.

Cuantificación relativa de la expresión del mRNA de SOX2, obtenida por qPCR: en el grafico se compara la cantidad de transcrito detectado entre neuroesferas adheridas sin tiempo de diferenciación (T0), neuroesferas luego de 4 días de diferenciación sin tratamiento con Ang1 (T4) y neuroesferas luego de 4 días de diferenciación con tratamiento con 500 ng/ml de Ang1 (T4+Ang). En la condición control T4 se agregó solo PBS (vehículo). No se encontraron diferencias significativas utilizando las pruebas estadísticas de ANOVA de una vía y Tukey $p \leq 0.05$ (n=3, experimento realizado por triplicado).

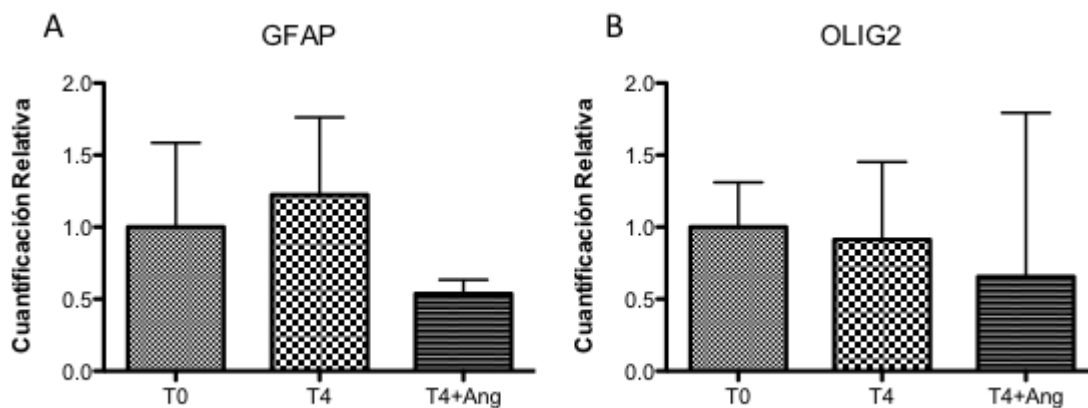


Figura 13. Cuantificación relativa de la expresión del mRNA los marcadores de diferenciación glial.

En (A) se compara la expresión del marcador de linaje astrocítico GFAP y en (B) se muestra la expresión detectada del marcador de linaje oligodendrocítico, OLIG2. Para ambos marcadores se compararon neuroesferas adheridas en las siguientes condiciones: sin tiempo de diferenciación (T0), neuroesferas luego de 4 días de diferenciación sin tratamiento con Ang1 (T4) y neuroesferas luego de 4 días de diferenciación con tratamiento con 500 ng/ml de Ang1 (T4+Ang). En la condición control T4 se agregó solo PBS (vehículo). No se encontraron diferencias significativas utilizando las pruebas estadísticas de ANOVA de una vía y Tukey $p \leq 0.05$ ($n=3$, experimento realizado por triplicado).

El análisis estadístico de los datos obtenidos para los 3 marcadores evaluados, indica que no hay diferencias significativas entre ninguna de las condiciones experimentales, esto se explica por la variabilidad de detección de los niveles de expresión de mRNA obtenida en 3 experimentos independientes.

6 DISCUSIÓN

Numerosos son los trabajos que estudian la regeneración neuronal a partir de CTN (Hockfield y McKay et al. 1985; Shihbuddin et al. 2000; Okano 2002; Alvarez-Buylla y Lim. 2004; Conti y Cattaneo, 2010), sin embargo la gran mayoría de éstos, enfocaron sus esfuerzos en elucidar el cómo se regula la neurogénesis en el cerebro, específicamente en la ZSV y en la ZSG del giro dentado del hipocampo. El trabajo realizado durante el desarrollo de esta tesis tuvo como objetivo, ampliar la escasa información que existe sobre las CTN que residen en la ME (Androutsellis-Theotokis et al. 2010, Barnabé-Heider et al. 2010), con el fin de mejorar y caracterizar el cultivo como neuroesferas de estas células, y conocer como la diferenciación de estas CTN podría estar influenciada por moléculas angiogénicas, como las son las Angs, a las cuales se les han atribuido roles neurogénicos, pero solo en zonas encefálicas ya mencionadas (Rosa et al. 2010).

6.1 Obtención y caracterización cultivos de CTN como neuroesferas, a partir de progenitores extraídos desde ME.

Los resultados obtenidos demostraron que el protocolo empleado para iniciar el cultivo de CTN como neuroesferas es reproducible. A partir de CT aisladas desde ME de ratones C-57 en estadio 18.5 días post fecundación, se lograron cultivos de 350.000 células en promedio por embrión utilizado. La morfología de las neuroesferas obtenidas (Figura 5) se corresponde con la descrita en la literatura (Reynolds y Weiss, 1992; Laywell et al. 1999). Adicionalmente a esto, se evaluó la capacidad de generar nuevos subcultivos, así se observó que el rendimiento de formación de nuevas neuroesferas, el cual desde el inicio fue bajo, disminuyó conforme a la cantidad de subcultivos realizados. Esto es indicativo de una disminución de la troncalidad de las células presentes en las neuroesferas, la cual, puede ser explicada por el proceso de diferenciación que normalmente ocurre en este tipo de cultivo. (Campos 2004; Conti y Cattaneo, 2010).

Aunque no ha sido directamente cuantificada, la autorrenovación de las CTN se evidenció por la capacidad de generar nuevos subcultivos a partir de células únicas y por la expresión de los marcadores, Nestina y SOX2 (Figura 6), ambos considerados específicos para determinar progenitores neurales. A su vez, la capacidad de diferenciación de las CTN fue confirmada al encontrar los transcritos de MAP2, marcador de linaje neuronal, como también los de MAG y GFAP, marcadores de linaje glial (Figura 6). De manera complementaria, el proceso de diferenciación se evidenció al observar la morfología de las células adheridas en poli-D-lisina (Figura 5), en las cuales se detectaron claramente la aparición de prolongaciones características de una diferenciación neuronal (Temple 2001; Rosa 2010). Finalmente con el objetivo de corroborar la coexistencia de progenitores y de células comprometidas con un linaje particular, se analizó la expresión de marcadores a través de inmunofluorescencia, con lo que se logró detectar a nivel de proteínas, el marcador de progenitor neural Nestina (figura 8B), como también los marcadores de diferenciación neuronal, tubulina- β 3 (Figura 8F) y astrocítica, GFAP (Figura 8E). Adicionalmente se evaluó la expresión de Hoxb9 como marcador de procedencia específica de tejido de ME, el cual no es expresado en neuroesferas derivadas de corteza cerebral (Figura 7). Con lo que se confirmó la presencia de CTN en una zona del SNC distinta a las comúnmente descritas.

Así quedó demostrado que las neuroesferas obtenidas presentan una heterogeneidad celular en su estructura (Reynolds y Weiss 1992; Laywell et al. 1999), lo que hace difícil ensayar una posible condición experimental sobre una población celular en particular. Sin embargo esta estructura tridimensional proporciona un microambiente que podría ser similar al encontrado en las zonas neurogénicas, en donde las interacciones célula-célula y con la matriz extracelular son de gran importancia para la proliferación y diferenciación de las CTN.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados hasta ahora mencionados, se pudo afirmar que las neuroesferas obtenidas representan un modelo de cultivo de CTN de ME de ratón, en donde se mantienen las dos características fundamentales de una CTN: la capacidad de autorrenovación y su potencialidad de diferenciación. Con respecto a la autorrenovación, se observó que ésta

disminuye conforme se realizan nuevos subcultivos, lo que puede ser explicado por el proceso de diferenciación que debe estar ocurriendo o bien por la pérdida progenitores debido al proceso de disgregación tanto mecánica como enzimática de las neuroesferas formadas. Así, con el propósito de mejorar el rendimiento de este tipo de cultivos, se puede pensar en realizar los subcultivos en un periodo de tiempo menor a 7 días y así se trabajaría con neuroesferas de menor tamaño, con las que se podría realizar una disgregación menos agresiva y solo enzimática. Con respecto a lo observado al analizar el perfil de marcadores de CTN, como también de diferenciación, se puede afirmar que una neuroesfera expresa la totalidad de los marcadores evaluados, confirmando la heterogeneidad celular que posee, y a la vez la expresión dinámica de los marcadores utilizados, de la cual se espera que cambie conforme a la nueva población celular en distintos estadios de diferenciación. De manera complementaria a lo observado, se podría ensayar la funcionalidad de los distintos progenitores presentes, realizando electrofisiología a las neuroesferas obtenidas.

6.2 Las CTN derivadas de ME de ratón expresan Angiopoyetina-1 y Integrina- β 1, pero no el receptor Tie2.

El desarrollo de la sistema nervioso en mamíferos ocurre de forma paralela a la formación del sistema vascular e incluso existe una correlación espacial entre la red nerviosa y vascular, dando origen a compartimientos neurovasculares en donde los vasos sanguíneos presentes, a través de moléculas conocidas por su rol angiogénico, como VEGF, estarían regulando de manera importante la neurogénesis que podría estar ocurriendo (Zacchigna et al. 2008). Estas últimas aproximaciones han sido principalmente estudiadas en las zonas neurogénicas descritas del cerebro (ZSV y ZSG) (Alvarez-Buylla y Lim 2004).

Las angiopoyetinas, son moléculas angiogénicas a las que también se les ha otorgado propiedades neurogénicas. Tal es el caso de la Ang1 sobre las CTN derivadas de la ZSV, en

donde se ha evidenciado que promueve la proliferación y la diferenciación de los progenitores vía el receptor Tie2 (Yun et al. 2009; Rosa 2010).

En el presente trabajo se logró detectar el mRNA del ligando Ang1 tanto en CTN en condiciones proliferativas (Figura 9A) como también en células en proceso de diferenciación (Figura 9B). Estos resultados demuestran por primera vez la presencia de este transcrito en CTN derivadas de ME. De manera complementaria a lo expuesto, podría ser relevante confirmar la expresión a nivel de proteína de Ang1; esto se podría llevar a cabo utilizando técnicas de inmunofluorescencia y/o western blot.

Por otro lado, fue imposible detectar el mRNA de el receptor Tie2 en condiciones proliferativas, como tampoco en neuroesferas luego de 4 días de diferenciación; para este propósito se utilizaron técnicas de RT-PCR (Figura 9A y 9B) y en busca de una mayor sensibilidad de detección, PCR cuantitativo (Figura 10). En este sentido, se realizó western blot con el fin de encontrar el receptor a nivel de proteína, pero no fue posible detectar Tie2 (Figura 11), lo cual es congruente con lo observado a nivel de mRNA utilizando las técnicas de PCR y qPCR. Estos resultados se contraponen con los descritos en la literatura en donde las CTN de la ZSV, sí expresarían el receptor Tie2 (Yun et al. 2009; Androutsellis-Theotokis et al. 2010; Rosa 2010). Sin embargo existen reportes en los cuales se postula que Ang1 podría actuar de manera independiente al receptor Tie2, ya que en ausencia de este último, Ang1 utilizaría como receptor a moléculas de adhesión como las integrinas (Carlson et al. 2001; Ward et al. 2005; Thomas y Agustín 2009; Chen et al. 2009)

En conjunto a estos antecedentes y los resultados obtenidos, se decidió evaluar la expresión de Integrina- $\beta 1$ (Int $\beta 1$) como un receptor alternativo para Ang1. Esta interacción entre Ang1/Int $\beta 1$ estaría participando en procesos protectivos ante isquemia cardiaca (Lee et al. 2011), en regeneración de vasculatura necesaria en ME luego de una lesión (Han et al. 2010), en neurogénesis (Wojcik-Stanaszek et al. 2011) e incluso en supervivencia y proliferación de células de linaje neural (Clarsson et al. 2001, Ward et al. 2005; Chen et al. 2009). Estas observaciones han permitido postular un rol neurotrófico de Ang1 ejercido a través de $\beta 1$ -integrina y de forma

independiente a Tie2. Esta última alternativa adquiere relevancia al observar los resultados de este trabajo en donde la presencia del mRNA de integrina- β 1 en las CTN de ME es positiva tanto para aquellas en cultivo en suspensión (Figura 9A) como para las células luego de 4 días en condiciones de diferenciación (Figura 9B).

6.3 Las CTN tratadas con Ang1 recombinante muestran una tendencia a mantener la expresión del marcador de troncalidad y a disminuir la expresión de marcadores diferenciación glial.

En las CTN derivadas de la ZSV, a la Ang1 se le atribuye un efecto pro neurogénico, favoreciendo la diferenciación neuronal por sobre la glial (Kosacka et al. 2005; Yun et al. 2009; Androutsellis-Theotokis et al. 2010; Rosa 2010), lo que a la vez significa, la pérdida de la troncalidad de los progenitores tratados con esta angioneurina.

El ensayo funcional realizado en este trabajo, sugiere un rol de Ang1 sobre el proceso de diferenciación de las CTN derivadas de ME, aunque de manera independiente al receptor Tie2. Se observó, utilizando PCR cuantitativo, un cambio en el patrón de diferenciación de los progenitores, ya que agregando Ang1 recombinante a los cultivos en condiciones de diferenciación, la población celular obtenida luego de 4 días de tratamiento (T4 + Ang), presenta una tendencia a mantener la expresión del marcador de troncalidad, SOX2 (Figura 12). Por otro lado, la disminución de SOX2 luego de 4 días de diferenciación en las células sin tratamiento con Ang1 (T4) (Figura 12), se podría explicar por el proceso de diferenciación que estaría ocurriendo en esta población. Este efecto de Ang1 sobre la diferenciación de las CTN, en donde la troncalidad de los progenitores pareciera tender a aumentar en comparación a la situación control, no ha sido previamente descrito, siendo el efecto neurogénico el más observado. Con el propósito de confirmar este efecto sobre la diferenciación de las CTN de ME, se podría evaluar la expresión del mRNA de otro marcador de troncalidad como Nestina o bien, detectar la expresión proteica de los marcadores SOX2 y Nestina a través de inmunofluorescencia.

De manera complementaria, también se cuantificó (por PCR cuantitativo) lo que ocurría con la diferenciación glial; para esto se utilizó GFAP como marcador de diferenciación astrocítica, observando que luego de 4 días de diferenciación, este marcador tiende a aumentar levemente en las células no tratadas con Ang1 (Figura 13A). Sin embargo el tratamiento con Ang1, atenúa este aumento (Figura 13A). Este resultado indicaría que Ang1 podría inhibir la diferenciación astrocítica que normalmente se esperaría observar luego de 4 días de diferenciación. En este mismo sentido, también se cuantificó el marcador de diferenciación oligodendrocítica, OLIG2, cuya detección fue similar entre las células al inicio del experimento y luego de 4 días de diferenciación sin tratamiento con Ang1 (Figura 13B), lo que sugiere una baja diferenciación a este linaje luego de 4 días adheridas a poli-D-lisina y sin factores mitogénicos. Finalmente, la expresión de este marcador parece no cambiar cuando las células son tratadas con Ang1 (Figura 13B), lo cual podría significar que Ang1 no afecta la diferenciación hacia este linaje glial (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

6.4 Proyecciones entorno a la posible vía de señalización Ang1/ Int β 1 en CTN de ME de ratón.

Los resultados obtenidos hasta el momento, representarían evidencia adicional a la escasa existente respecto a la expresión de moléculas angiogénicas y sus respectivos receptores en CTN de sistema nervioso, particularmente en ME. La presencia del ligando Ang1, tanto en condiciones proliferativas como también durante el proceso de diferenciación, permite postular que ella podría participar de la regulación de éstos. Considerando los resultados que descartan la expresión de Tie2, la presencia de integrina- β 1 en los progenitores obtenidos, adquiere importancia dado que podría representar un nuevo posible mecanismo de acción. Eventuales resultados de ensayos funcionales propuestos podrían validar un nuevo rol de Ang1 sobre las propiedades funcionales de CTN derivadas de ME, de manera independiente a su receptor convencional. De ser así, esta sería la primera vez que se postularía una vía de señalización a través del sistema Ang1/Int- β 1 en células troncales del sistema nervioso central

Para confirmar que efectivamente Ang1 estaría señalizando luego de su interacción con Integrina- β 1, se propone bloquear directamente Ang1 con un anticuerpo contra esta última o, en caso de no disponer de un anticuerpo adecuado para este propósito, se intentará lograr una condición en donde la cantidad de Ang1 se vea disminuida (knockdown). Esto se lograría bloqueando la expresión de Ang1 en las CTN obtenidas, utilizando un siRNA contra el ligando.

De igual manera, para evaluar que la especificidad de interacción es a través de integrina- β 1, un ensayo funcional alternativo puede ser bloquear la posible función como receptor que ésta puede estar realizando, utilizando un anticuerpo bloqueante contra integrina- β 1 o con la ayuda de un siRNA, disminuir directamente la expresión de integrina- β 1 a fin de validar su posible participación en una respuesta a Ang1.

Si de alguna manera Ang1 está teniendo un efecto notorio sobre la diferenciación de las CTN de ME y sí luego del bloqueo de la interacción entre Ang1 y integrina- β 1 se genera la pérdida del efecto observado, se podría explicar que este fenómeno es independiente de Tie2 en el modelo utilizado en este trabajo.

7 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir:

- Las células que integran una neuroesfera derivada de ME expresan marcadores de CTN, al igual que marcadores de diferenciación a linajes neurales y gliales, tanto a nivel de mRNA como también de proteínas. Además expresan Hoxb9 como marcador de procedencia específica de tejido de ME.
- CTN de ME expresan mRNA del ligando Ang1 e integrina- β 1 en condiciones proliferativas, como también en células en proceso de diferenciación.
- No se detectó el receptor Tie2, lo cual fue evaluado a nivel de mRNAs y proteínas.
- La diferenciación de las CTN no parece ser afectada por Ang1.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Buylla A y Lim D. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 41: 683-686 (2004)
- Androutsellis-Theotokis A, Rueger M, Park D, Boyd J, Padmanabhan R, Campanati L, Stewart C, LeFranc Y, Plenz D, Walbridge S, Lonser R, McKay R. Angiogenic factors stimulate growth of adult neural stem cells. *Plos One*. 5: 1-7 (2010)
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 8: 963-970. (2002)
- Asahara T, y Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 287: C572-C579 (2004).
- Barnabé-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, Takebayashi H, Pfrieder FW, Meletis K, Frisen J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*. 7: 470-482 (2010)
- Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ. y O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng*. 12: 3007-3019 (2006)
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the Jak/Stat-signaling pathway. *Science*. 278: 477-483 (1997)
- Bryder D, Rossi, DJ y Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol*. 169: 338-346 (2006)
- Campos L. Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res* 78: 761-769 (2004)
- Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre P, Mrksich M, and Morla A. Direct Cell Adhesion to the Angiopoietins Mediated by Integrins. *J Biol Chem* 276 (28). 26516-26525 (2001)
- Chao MV. Trofic factor: an evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J. Neurosci*. 59: 353-355 (2000)
- Chen X, Wen F, Tung C, Ward N. Angiopoietin-1 induces neurite outgrowth of PC12 cells in a Tie2-independent, beta1-integrin-dependent manner. *Neurosci Res*. 64 (4). 348-354 (2009)
- Choi JS, Kim HY, Cha JH, Choi JY, Park SI, Jeong CH, Jeun SS, Lee MY. Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Flt-1 and Flk-1 Following Acute Spinal Cord Contusion in Rats. *J Histochem Cytochem*. 55: 821-830 (2007)
- Conti L y Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities. *Nature*. 11: 176-187 (2010)

- Dimos JT, Kit TR, Niakan L, Weisenthal H, Mitsumoto W, Chung GF, Croft, G, Saphier R, Leibel R, Goland H, Wichterle C, Henderson K. Eggen. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218–1221 (2008)
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433–1438 (2000)
- Gotz M y Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 777–788 (2005)
- Hall P y Watt F. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106: 619-633 (1989)
- Han S, Sheila A, Srinivas S, Mahoney E, Gerald J, Tran P, Benton R, Maddie M, D'Souza S, Whittemore S, y Hagg T. Rescuing vasculature with intravenous angiopoietin-1 and alpha v beta 3 integrin peptide is protective after spinal cord injury. *Brain* 133: 1026-1042 (2010)
- Hitoshi S, Alexon T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. Notch pathway molecules are essential for the maintenance but not the generation of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* 16: 846–858 (2002)
- Hoeck JD, Jandke A, Blake SM, Nye E, Spencer-Dene B, Brandner S, Behrens A. Fbw7 controls neural stem cell differentiation and progenitor apoptosis via Notch and c-Jun. *Nat Neurosci.* 13:1365-1372 (2010)
- Hockfield S y McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5: 3310–3328 (1985)
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, L J Thal, F H Gage, Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J. Neuroscience* 20: 2218–2228 (2000)
- Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 10: 575-585 (2010)
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25–34. (1999)
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10: 3129–3140 (1996)
- Kalyani AJ, Piper D, Mujtaba T, Lucero MT, Rao MS. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J Neurosci* 18: 7856-7868 (1998)

- Kermani P y Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 17: 140–143 (2007)
- Kosacka J, Figiel M, Engele J, Hilbig H, Majewski M, Spanel-Borowski K. Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for Tie-2 receptor, *Cell Tissue Res.* 320: 11–19 (2005)
- Kriegstein A y Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Rev. Neuroscience.* 32: 149-184 (2009)
- Lajtha LG. Stem cell concepts. *Nouv Rev Fr Hematol.* 21: 59-65 (1979)
- Laywell ED, Kukekov G y Steindler DA. Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp. Neurol.* 156: 430–433 (1999).
- Lee S, Joo-Yun W, Hae-Young L, Ho-Jae L, Seock-Won Y, Lee J, Chung-Hyun C , Hyun-Jai , Seil O, In-Ho C, y Hyo-Soo K. Angiopoietin-1 protects heart against ischemia/reperfusion injury through VE-cadherin dephosphorylation and myocardial integrin- β 1/ERK/caspase-9 phosphorylation cascade. *Mol Med* 17: (9-10) 1095-1106 (2011)
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585–595 (1990)
- Lindvall O, Kokaia K, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med.* 10: 42-50 (2004)
- Lindvall O y Kokaia K. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation?. *J Clin Invest.* 120: 29-40 (2010)
- Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173–189 (1993)
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276: 66-71 (1997)
- Mimeault M. y Batra SK. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics— Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. *Nature* 82: 252-264 (2007)
- Muller FJ, Snyder EY y Loring, JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat. Rev. Neuroscience* 7: 75–84 (2006)
- Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS. Difference in cytokine gene expression profile between acutely and secondary injured adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* 184: 313–325 (2003)

- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Synergistic signaling in fetal brain by STAT3–Smad 1 complex bridged by p300. *Science* 284: 479–482 (1999)
- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mousebrain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5868–5873 (2001)
- Ohab, JJ, Fleming S, Blesch A y Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 26: 13007–13016 (2006).
- Okano H. Stem cell biology of central nervous system. *J Neurosci* 69: 668-707 (2002)
- Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S ,Iwanami A, Toyama Y. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14: 191–198 (2003)
- Olofsson B y Page DT. Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev. Biol.* 279: 233–243 (2005)
- Onorati M, Binetti M, Conti L, Camnasio S, Calabrese G, Albieri I, Febo F, Toselli M, Biella G, Martynoga B, Guillemot F, Consalez G, Cattaneo E. Preservation of positional identity in fetus-derived neural stem (NS) cells from different mouse central nervous system compartments. *Cell. Mol. Life Sci.* vol. 68 (10). 1769-1783 (2011)
- Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *NAR.* 29: 2003-2007 (2001)
- Pola R, Ling L E, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, R B Pepinsky, R Shapiro, F R Taylor, D P Baker, T Asahara, J M Isner. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 7: 706–711 (2001)
- Popovici C, Isnardon D, Birnbaum D y Roubin R. *Caenorhabditis elegans* receptors related to mammalian vascular endothelial growth factor receptors are expressed in neural cells. *Neurosci. Lett.* 329: 116–120 (2002)
- Preston S, Alison M, Forbes S, Dirkze N, Poulson R, Wright N. The new stem cell biology: something for everyone. *JClin Pathol: Mol Pathol* 56: 86-96 (2003)
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28: 69–80 (2000)
- Rafii S y Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 9: 702-712 (2003)

- Rosa A, Gon J, Cortes L, Bernardino L, Agasse F. The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells. *J Neurosci* :30 4573-4584 (2010)
- Reynolds BA y Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707–1710 (1992)
- Shihabuddin LS, Homer PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyms. *J Neuroscience* 20: 8727-8735 (2000)
- Shihabuddin LS. Adult Rodent Spinal Cord-Derived Neural Stem Cells: Isolation and Characterization. *Neural Stem Cell, Method and Protocols*, 2ª edición:67-78 (2008)
- Takahashi K y Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676 (2006)
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1:749–758 (2001)
- Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 414: 112– 117. (2001)
- Thomas M y Augustin H. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis *Angiogenesis* 12: 125–137 (2009)
- Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V y Jones J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147 (1998)
- Ucelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8: 726-736 (2008)
- Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos DG, Nishikawa S. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clinical Invest.* 110: 1619-1628 (2002)
- Ward T, Putoczki K, Mearow TL, Ivanco DJ, Dumont J. Vascular-specific growth factor angiopoietin 1 is involved in the organization of neuronal processes, *J. Comp. Neurol.* 482: 244–256 (2005)
- Watt F y Driskell R. The therapeutic potential of stem cells *Phil. Trans. R. Soc. B* 365: 155–163 (2010)
- Widenfalk J, Lundstromer K, Jubran M, Brene S, Olson L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neuroscience*, 21: 3457–3475 (2001)

- Wojcik-Stanaszek L, Gregor A, Zalewska T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71: (1) 103-112 (2011)
- Yagita, Y, Kitagawa K, Sasaki, T., Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Differential expression of Musashi1 and Nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res* 69: 750–756. (2002)
- Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* 276: 45031–45040 (2001)
- Yu J, Sun X, Yuan X, Lee J, Snyder E, Yu J. Immunomodulatory neural stem cells for brain tumour therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6: 1255–1262 (2006)
- Yun B, Ming C, Zhijun M, Li S, Qihua H, Xiaoyan Z, Fengrong C, Junjun X. Ectopic expression of angiopoietin-1 promotes neuronal differentiation in neural progenitor cells through the Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 378: 296–301 (2009)
- Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Neuroscience* 9: 169-181 (2008)
- Zhao C, Deng W, Gage FH Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645–660 (2008)