

UCH-FC
MAG-B
0775
C.1



**Efecto paracrino de Células troncales Mesenquimáticas de la
Gelatina de Wharton (WJ-MSC) en células endoteliales
mediado por factores angiogénicos no-clásicos: Rol de
Netrinas y su receptor Neogenina-1”**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

María Carolina Ortiz Rojo

Septiembre, 2013

Director(a) de Tesis: Dra. Verónica Palma

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

MARIA CAROLINA ORTÍZ ROJO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 04 DE Junio 2013

Director de Tesis:
Dra. Verónica Palma

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Álvaro Glavic

Dr. Juan Pablo Rodríguez

.....
.....
.....



[Handwritten signature]
[Handwritten signature]



A mi familia maravillosa por todo su amor y comprensión en cada día, cada minuto y cada segundo de mi existencia, los amo profunda e infinitamente....

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota." Madre Teresa de Calcuta.

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Carolina, nací hace 26 años en la ciudad de Antofagasta, en una familia poco convencional pero rodeada de mucho amor. Cuando tenía menos de un año, llegué junto a mi familia a Santiago. Desde pequeña me sentí atraída por el conocimiento y el arte del saber, sentía curiosidad por muchas cosas y áreas diversas. En el colegio siempre me gustó la parte humanista y poder expresar a través de las palabras, es por estas razones que el periodismo siempre me llamó la atención. Sin embargo al llegar a primero medio, gracias a una profesora en particular, aprendí a amar las ciencias, especialmente la biología. En mi afán por encontrar una ocupación que me permitiera contribuir en algo a la sociedad, elegí la biotecnología, claro que entrar no fue fácil. Luego de un paso por bachillerato en la Universidad de Chile, donde pasé un tiempo maravilloso que me permitió conocer otras realidades muy distintas a la mía, entré a la facultad de ciencias a estudiar esta carrera a ratos difícil pero muy gratificante. Sin duda fue un tiempo de mucho aprendizaje, en una facultad rica en conocimiento y mentes brillantes. Luego de terminar decidí entrar al Programa de Magíster con el objetivo de seguir creciendo como profesional, si bien este período tuvo momentos de dulce y de agraz, finalmente logró llegar a buen término y me permitió crecer como científica. Sin duda soy una agradecida de la vida, me siento afortunada por todo lo que me ha dado, empezando por familia, mis amigos y toda la gente que me ha puesto en el camino, sin ellos definitivamente no sería la persona que soy.



AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa quiero agradecer en primer lugar a mi tutora, la doctora Verónica Palma, por haber sido mi guía durante todo este tiempo, por haberme acogido, confiado en mí y haberme dado con mucha generosidad las herramientas necesarias para lograr este trabajo. Quiero agradecer también a Cynthia quien trabajó intensamente conmigo, y tuvo la mejor disposición al momento de compartir conmigo sus conocimientos. Agradezco también a los integrantes del grupo mesenquimáticas, Gabi, Cata, Mati, por su ayuda en todo este tiempo. Así como también a Sergio, Geri, Lucho, Pauli y Pablo por su buena onda.

Y de manera especial quiero agradecer a mis amigos del lab, mis amigos del alma y pilares durante todo este tiempo, Andreita, Sami y Nata. Sin duda no hubiera sido lo mismo sin ustedes. Gracias por su alegría, por hacerme reír hasta llorar tantas veces, por escucharme y compartir conmigo sus penas y alegrías, porque bastaba con mirar su rostro para transformar un día malo en un día bueno. Agradezco a la vida haberlos puesto en mi camino ya que personas como ustedes es difícil de encontrar en estos días. Sin duda con su amistad me llevo un enorme tesoro que me acompañara por siempre...

No puedo dejar de darle las gracias a mi familia maravillosa que siempre me ha apoyado en cada nuevo desafío que he emprendido. A mis amigos de la universidad y de la vida, por su contención e incondicionalidad, los quiero infinitamente...

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Los sistemas nervioso y vascular exhiben similitudes a nivel molecular y estructural.....	1
1.2. Netrinas y sus receptores en guía axonal y angiogénesis.....	4
1.3. Neogenina-1: ¿el eslabón perdido?	11
1.4. Células troncales mesenquimáticas, WJ-MSC y efecto proangiogénico.....	13
1.5. Hipoxia y producción de factores angiogénicos	16
2. HIPÓTESIS.....	20
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. MATERIALES.....	21
4.1.1. Cultivos celulares.....	21
4.1.2. Líneas celulares.....	21
4.1.3. RT-PCR y Síntesis ADN Complementario.....	21

4.1.4. Western Blot.....	22
4.1.5. Inmunofluorescencia.....	23
4.1.6.- Transducción estable.....	23
4.1.7. Citometría de flujo.....	24
4.1.8. Plasmidios.....	24
4.1.9. Ensayos de angiogénesis.....	24
4.1.10. RT-PCR y Síntesis ADN Complementario.....	25
4.1.11. Inmunohistoquímica.....	25
4.2. MÉTODOS.....	26
4.2.1. Aislamiento de células troncales mesenquimáticas humanas desde la gelatina de Wharton de cordón umbilical y exposición a hipoxia experimental.....	26
4.2.2. Aislamiento y cultivo de células HUVEC.....	27
4.2.3. Precipitación de medios condicionados.....	27
4.2.4. Inmunohistoquímica de cordón umbilical humano.....	28
4.2.5. Extracción RNA con trizol.....	29
4.2.6. SINTESIS DE cDNA	29
4.2.7. RT-PCR.....	30
4.2.8. Western Blot (WB).....	30
4.2.9. Inmunofluorescencia.....	31
4.2.10. Generación de partículas lentivirales shNEO-1.....	32
4.2.11. Silenciamiento de Neogenina-1 en HUVEC y generación de cultivos establemente transducidos mediante selección por puromicina.....	32
4.2.12. Ensayo de migración <i>scratch</i>	33
4.2.13. Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	34
4.2.14. Citometría de flujo.....	34
4.2.15. Análisis estadístico.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Evaluación de la expresión de Netrina-1, Netrina-4 y RGMa en WJ-MSc tanto	

en normoxia como en hipoxia, así como de Neogenina-1 y DCC en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano.....	36
5.1.1. WJ-MSC expresan factores angiogénicos no clásicos (Netrina-4, Netrina-1).....	36
5.1.2. En hipoxia Netrina-1 aumenta en el medio condicionado de WJ-MSC...	38
5.1.3. Células endoteliales de la vena de cordón umbilical (HUVEC) expresan el receptor canónico de Netrinas Neogenina-1 pero no DCC, así como también la subunidad β_1 del receptor no canónico $\alpha_3\beta_1$	39
5.2. Estudio del efecto angiogénico de medio condicionado de WJ-MSC y los ligandos de Neogenina-1, RGMa y Netrina-1, mediante ensayos de migración y <i>wound healing</i> en células endoteliales HUVEC.....	41
5.2.1. El medio condicionado de WJ-MSC induce la migración de células endoteliales.....	42
5.2.2. Netrina-1 pero no RGMa induce la migración de células endoteliales HUVEC.....	45
5.2.3. El medio condicionado de WJ-MSC promueve la formación de túbulos en células endoteliales.....	47
5.2.4. Netrina-1 y RGMa inducen angiogénesis <i>in vitro</i> en procesos angiogénicos en células endoteliales.....	48
5.3. Determinación del efecto de Neogenina-1 en la angiogénesis de HUVEC mediante experimentos de pérdida y ganancia de función de Neogenina-1 y/o su(s) ligando(s).....	50
5.3.1. La transducción con lentivirus y posterior selección con puromicina permite silenciar de manera estable Neogenina-1 en células endoteliale...50	50
5.3.2. El silenciamiento de Neogenina-1 aumenta la migración de células endoteliales en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC.....	51
5.3.3. El silenciamiento de Neogenina-1 aumenta de manera significativa la capacidad de células endoteliales de formar túbulos en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC.....	52

5.3.4. El silenciamiento de Neogenina-1 aumenta de manera significativa la capacidad de células endoteliales de formar túbulos y de migrar en respuesta al ligando de Neogenina-1, Netrina-1.....	53
6. DISCUSIÓN.....	55
7. CONCLUSIONES.....	68
8. BIBLIOGRAFÍA.....	69
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Similitudes anatómicas entre los sistemas nervioso y vascular.....	1
Figura 2. Pares similares de receptor-ligando participan en la guía de conos de crecimiento axonal y células endoteliales de la punta.....	3
Figura 3. Netrinas y sus receptores regulan tanto la orientación axonal como el desarrollo de vasos sanguíneos.....	5
Figura 4. Estructura de Neogenina-1 y sus ligandos RGM y Netrina.....	12
Figura 5. Obtención de partículas lentivirales shNEO-1.....	33
Figura 6. Los ligandos de NEO-1, Netrina-1, Netrina-4 y en menor medida RGMa, son detectados en la gelatina de Wharton en cortes de cordón umbilical.....	36
Figura 7. WJ-MSC expresan los ligandos de NEO-1.....	37
Figura 8. La expresión de los ligandos de NEO-1 no cambia en condiciones hipóxicas pero Netrina-1 aumenta en el medio condicionado.....	39
Figura 9. Neogenina-1 pero no DCC es detectada en el endotelio de la vena del cordón umbilical.....	40
Figura 10. Células endoteliales derivadas de cordón umbilical (HUVEC) expresan el receptor de Netrinas, Neogenina-1.....	41
Figura 11. Netrina-1 y Netrina-4 están presentes en el medio de crecimiento de WJ- MSC.....	42
Figura 12. El medio condicionado (CM) de WJ-MSC promueve la migración de células endoteliales <i>in vitro</i>	43
Figura 13. El medio condicionado (CM) de WJ-MSC cultivadas en hipoxia promueve en mayor medida la migración de células endoteliales <i>in vitro</i>	45
Figura 14. Netrina-1 induce la migración de células endoteliales <i>in vitro</i>	46
Figura 15. RGMa, a diferencia de Netrina-1, no tiene efectos sobre la migración de células endoteliales.....	47
Figura 16. El medio condicionado de WJ-MSC promueve la angiogénesis <i>in vitro</i>	48
Figura 17. Netrina-1 induce la angiogénesis <i>in vitro</i> de manera dosis dependiente.....	49
Figura 18. RGMa induce la angiogénesis <i>in vitro</i>	50

Figura 19. Generación de una línea de células endoteliales con silenciamiento estable para NEO-1	51
Figura 20. El silenciamiento de Neogenina-1 resulta en un aumento en la migración de células endoteliales en respuesta medios condicionados de WJ-MSC.....	52
Figura 21. Neogenina-1 modula la angiogénesis <i>in vitro</i> inducida por WJ-MSC CM.....	53
Figura 22. Neogenina-1 modula la angiogénesis <i>in vitro</i> inducida por Netrina-1.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores usados para RT-PCR.....	21
--	----

ABREVIATURAS

DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCC	: <i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
EC	: Célula endotelial
EGF	: Factor de crecimiento epidérmico
EGM-2	: Medio de crecimiento endotelial 2
FGF	: Factor de crecimiento fibroblástico
FN	: Fibronectina
GAPDH	: Glutaraldehído 3-fosfato des- hidrogenasa
GFP	: Proteína fluorescente verde
HRE	: Elemento de respuesta a HIF
HUAEC	: Células endoteliales de la arteria de cordón umbilical
HUVEC	: Células endoteliales de la vena de cordón umbilical
HIF-1α	: Factor inducible por hipoxia 1-alfa
Ig	: Inmunoglobulina
IHQ	: Inmunohistoquímica
Kb	: Kilobase
kDa	: Kilodalton
kd	: Knock-down
KO	: <i>Knock-out</i>
MSC	: Células troncales mesenquimáticas
NBCS	: Suero de ternero recién nacido
NEO-1	: Neogenina-1
NEO-1-kd	: <i>Knock down</i> para NEO-1
ng	: Nanogramos
NTN-1	: Netrina-1
NTN-4	: Netrina-4
PBS	: Búfer fosfato salino
PDGF	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA	: Paraformaldehído
PGF	: Factor de crecimiento placentario
RGMa	: Molécula de guía repulsiva A
RNA	: Ácido ribonucleico
rpm	: Revoluciones por minuto
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SFB	: Suero fetal bovino
UNC5	: <i>Uncoordinated 5</i>
VECs	: Células endoteliales vasculares
VEGF	: Factor de crecimiento endotelial vascular
VSMCs	: Células vasculares de músculo liso
WB	: Western Blot
WJ-CM	: Medio condicionado de WJ-MS
WJ-MS	: Células troncales mesenquimáticas de la Gelatina de Wharton

RESUMEN

La angiogénesis es el proceso en el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y es dependiente de la presencia de factores angiogénicos clásicos tales como VEGF, PDGF-A y Angiogenina. Muchos de estos factores tróficos son secretados por un tipo particular de células -las células troncales mesenquimáticas (MSCs)-por lo cual la terapia utilizando MSCs constituye una opción atractiva para el tratamiento de isquemia y la reparación tisular. Las Netrinas y las proteínas RGM fueron originalmente descritas como moléculas de guía axonal pero recientemente se ha planteado que participan en angiogénesis. Estas proteínas, actuando a través de sus receptores DCC, UNC5 o Neogenina-1, promueven o inhiben procesos angiogénicos dependiendo del contexto fisiológico en el cual se encuentren.

La expresión de estos ligandos en MSC es aún desconocida por lo que en este estudio se evaluó la presencia de Netrina-1, Netrina-4 así como RGMA en células troncales mesenquimáticas de la gelatina de Wharton (WJ-MSC). Además, se determinó la presencia de estos ligandos en el medio condicionado por 48 horas de WJ-MSC. Se obtuvo que tanto Netrina-1 y 4 como RGMA son expresados por las células de Wharton. Netrina-1 está presente en el medio condicionado de las mismas. El hecho de que WJ-MSC produzcan moléculas de guía axonal como potenciales reguladores angiogénicos nos motivó a estudiar si las WJ-MSC tenían la capacidad de inducir angiogénesis en células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC). Se determinó que el medio condicionado de WJ-MSC promueve tanto la migración como la formación de túbulos en células endoteliales de manera significativa. Más aún, demostramos que tanto Netrina-1 como RGMA por sí solos son capaces de inducir procesos angiogénicos en células endoteliales. Esto sugiere que el efecto paracrino de WJ-MSC se debe en parte a la presencia de estos factores, quedando por resolver aún en qué grado contribuyen a las diferentes etapas del proceso angiogénico.

Finalmente nos interesó determinar la contribución de los receptores de Netrinas, en particular del receptor Neogenina-1, a la angiogénesis inducida por el medio condicionado de WJ-MSC y Netrina-1. Para ello, realizamos experimentos de pérdida de función utilizando células HUVEC establemente *knock down* para Neogenina-1. En células HUVEC, transducidas con shNeogenina-1, la capacidad de formar túbulos en respuesta al medio condicionado y a Netrina-1 aumentó con respecto a células control. Interesantemente, su capacidad migratoria no se vio afectada de manera significativa en respuesta a estos estímulos. Estos datos sugieren fuertemente que Neogenina-1 en su interacción con Netrina-1 tendría un efecto antiangiogénico, inhibiendo específicamente el proceso de formación de túbulos, lo que nos lleva a sugerir que estos dos procesos, migración celular y formación de túbulos, estarían mediados por vías de señalización diferentes. Los efectos pro-angiogénicos de Netrina-1 en tanto estarían siendo mediados por otro receptor, aún no identificado, más afín por Netrinas que Neogenina-1. Concentraciones altas de Netrina-1 en tanto permitirían su unión a Neogenina-1 promoviendo un efecto opuesto al que genera la interacción Netrina-1/receptor desconocido y por ende disminuyendo el efecto angiogénico global de Netrina-1. Sin embargo, no podemos descartar una potencial función *pro*-angiogénica de Neogenina-1, dado que RGMa-cuyo único receptor conocido es Neogenina-1-sí induce procesos angiogénicos *in vitro*.

Resumiendo, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que las WJ-MSC producen factores angiogénicos no-canónicos-Netrina-1 y RGMa- y que Neogenina-1 participa activamente en regular la angiogénesis inducida por éstos ligandos. Surge la necesidad de profundizar en los mecanismos de acción y en la búsqueda de otros potenciales receptores angiogénicos que se unan a Netrina-1. Sin duda estos resultados serán de mucha utilidad para desarrollar y/o optimizar estrategias terapéuticas tendientes a manipular procesos angiogénicos.

ABSTRACT

Angiogenesis, the process whereby new blood vessels are formed from preexisting ones, depends on the presence of classical angiogenic factors such as VEGF, PDGF-A and Angiogenin. Many of these trophic factors are secreted by a specific type of cells -mesenchymal stem cells ("MSCs")- making the therapy using MSCs an attractive option for the treatment of ischemia and tissular repair. Netrins and RGMs were originally described as axonal guidance molecules but recently have also been proposed to be involved in angiogenesis. These proteins, by acting through their receptors DCC, UNC5 or Neogenin-1, promote or inhibit angiogenesis depending on their physiological context.

The expression of these ligands by MSC is still unknown so in this study we evaluated the presence of Netrin-1, Netrin-4 and RGMa in Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC). We found that Wharton cells produce Netrin-1 and 4 as well as RGMa. Even more, Netrin-1 is present in the conditioned medium of these cells. The fact that WJ-MSC produce axonal guidance molecules as potential angiogenic regulators motivated us to study whether WJ-MSC had the ability to induce angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We determined that the conditioned medium of WJ-MSC strongly promotes not only the migration but also the formation of tubules in endothelial cells. Moreover, we demonstrated that both Netrin-1 and RGMa have the capacity to induce angiogenic processes on endothelial cells. This suggests that the paracrine effect of WJ-MSC is in part due to the presence of these factors, leaving unresolved in which extent they contribute to the different stages of the angiogenic process.

Finally, we were interested in the contribution of the Neogenin-1 receptor in the angiogenesis induced by the conditioned medium of WJ-MSC and Netrin-1. In order to accomplish this, we performed loss of function experiments using HUVEC cells stably knocked down for Neogenin-1. In HUVEC cells transduced with a shNeogenin-1, the

ability to form tubules in response to the conditioned medium and to Netrin-1 was increased compared to the control. Interestingly, migratory ability of HUVEC was not affected significantly in response to these stimuli. These findings strongly suggest that the interaction of Neogenin-1 with Netrin-1 has an anti-angiogenic effect, inhibiting specifically the process of forming tubules but not the cellular migration of endothelial cells. This finding leads us to suggest that different signalling pathways would mediate these two processes, cellular migration and the formation of tubules. The pro-angiogenic effects of Netrin-1 would be controlled by a so far not identified receptor, most probably displaying a higher affinity for Netrin-1. High concentrations of Netrin-1 would allow its binding to Neogenin-1 resulting in an opposing effect and hence decreasing the global angiogenic effect of Netrin-1. However, given that RGMa- whose only known receptor-1 is Neogenin-1- induces angiogenic processes *in vitro*, Neogenin-1 also could potentially act as a *pro*-angiogenic mediator in its interaction with RGMa.

Summarizing the results of this thesis, we conclude that WJ-MSC produce non-canonical angiogenic factors- Netrin-1 and RGMa- and that Neogenin-1 is actively involved in regulating angiogenesis induced by these ligands. The need for further studies of the action mechanisms and the search of new angiogenic receptor of Netrin-1 arises. Undoubtedly our results will be very useful to develop and/or optimize therapeutic strategies aimed for manipulating angiogenic processes.

1. INTRODUCCIÓN

a) Los sistemas nervioso y vascular exhiben similitudes a nivel molecular y estructural

Las similitudes anatómicas entre nervios y vasos sanguíneos han sido reconocidas desde hace siglos. Vesalius fue el primero en describirlas a nivel macroscópico y observar que vasos sanguíneos y nervios están co-alineados y siguen un patrón similar (figura 1A) (Vesalius, 1543). Más de cuatro siglos después de la observación hecha por Vesalius, la evidencia hoy muestra que neuronas y vasos co-dirigen su ordenamiento espacial (*patterning*) para lograr un alineamiento preciso a nivel anatómico. Para que tal orientación tenga lugar, neuronas y vasos sanguíneos en extensión deben sentir las señales químicas del medio ambiente en el cual se encuentran. Esto lo logran mediante estructuras celulares especializadas llamadas cono de crecimiento axonal y la célula endotelial punta, encontradas en neuronas y vasos sanguíneos, respectivamente (figura 1B) (Tam & Watts, 2009).

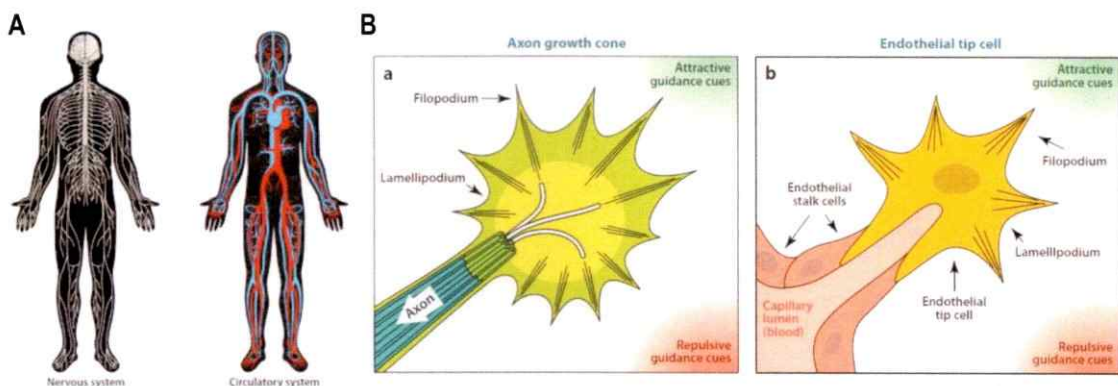


Figura 1. Similitudes anatómicas entre los sistemas nervioso y vascular. **A** Representación de los patrones compartidos entre las redes vascular y nerviosa en el cuerpo humano. Evidencia reciente indica que los vasos sanguíneos y neuronas dirigen su extensión usando mecanismos moleculares compartidos, lo cual resulta en última instancia en la formación de redes con patrones similares. **B** Representación del cono de crecimiento axonal y la célula endotelial punta (*tip cell*). Las proyecciones celulares de los axones y del endotelio encargadas de guiar su crecimiento, comparten características morfológicas. El movimiento de las células endoteliales hacia la señal angiogénica es ordenado, esto se debe a la selección de una célula conocida como célula punta (*tip cell*) que guiará dicho movimiento para formar nuevos vasos sanguíneos. Aunque la célula es una entidad celular separada del vaso sanguíneo en crecimiento, es el

análogo funcional del cono de crecimiento axonal. Se piensa que tanto filopodios como lamelopodios del cono de crecimiento en expansión y de la célula punta, forman el motor que impulsa físicamente las células hacia las señales atractivas (verde) y las aleja de las repulsivas (rojo) a medida que neuronas y vasos sanguíneos sensan su medio ambiente (Tam & Watts, 2010).

La primera descripción del cono de crecimiento axonal fue realizada el año 1906 (Cajal y col, 1906). Éste corresponde a una estructura que se encuentra en la punta de los axones en desarrollo y es capaz de sensar y responder a las señales de su medio ambiente local (de Castro y col, 2007). Específicamente, el cono de crecimiento axonal, se encuentra al término del eje axonal y consiste en gran parte en maquinaria citoesquelética (figura 1B).

Mas de cien años después de la descripción original de Cajal del cono de crecimiento axonal, se describió una estructura similar en los brotes angiogénicos de los vasos sanguíneos en crecimiento en la retina murina (Gerhardt y col, 2003). Esta estructura se compone de una célula especializada que se encuentra en el extremo en crecimiento de los vasos en extensión, llamada célula endotelial punta (figura 1B). Las células de la punta, al igual que los conos de crecimiento axonal, son estructuras ricas en actina, que dinámicamente sensan su medio ambiente cuando brotan desde la vasculatura preexistente.

El paralelismo celular entre el cono de crecimiento axonal de una neurona, y la célula de la punta presente en un vaso sanguíneo angiogénico, sugiere que estas estructuras, responden de manera similar a las señales químicas provenientes de sus respectivos medio ambientes. En 1963, Roger Sperry enunció la hipótesis de la quimioespecificidad. Ésta postula que las señales químicas producidas por un tejido blanco dirigen la orientación del sistema nervioso en desarrollo y en regeneración, lo cual resulta en la formación de una red neuronal altamente organizada (Sperry, 1963). A partir de esta idea, surgió la interrogante acerca de si los vasos sanguíneos en crecimiento respondían también a señales químicas resultando en un desarrollo estereotipado como aquél observado en el sistema nervioso.

En el sistema nervioso, el *patterning* de los nervios se logra mediante una variedad de pistas y señales desde el ambiente cercano que dirigen la navegación axonal. Las cuatro clases principales de moléculas de guía axonal son: efrinas, semaforinas, Netrinas y *slits* (figura 2). Estas moléculas median interacciones repulsivas o atractivas con los conos de crecimiento vía receptores específicos expresados en su superficie. Estudios recientes, han evaluado la hipótesis de la quimioespecificidad a nivel molecular y han dado evidencia concluyente de que estos mismos factores no solo participan dentro del contexto del sistema nervioso, sino que también, tienen un rol en la orientación y *patterning* del sistema vascular en desarrollo (Bouvier y col, 2008; Larrivee y col, 2007; Lu y col, 2004; Wang y col, 1998; Gale y col, 2001; Shin y col, 2001; Capparuccia & Tamagnone, 2009). Una prueba convincente de ello es que receptores de estas moléculas que se encuentran en el cono de crecimiento axonal, se expresan también en la célula endotelial punta (figura 2).

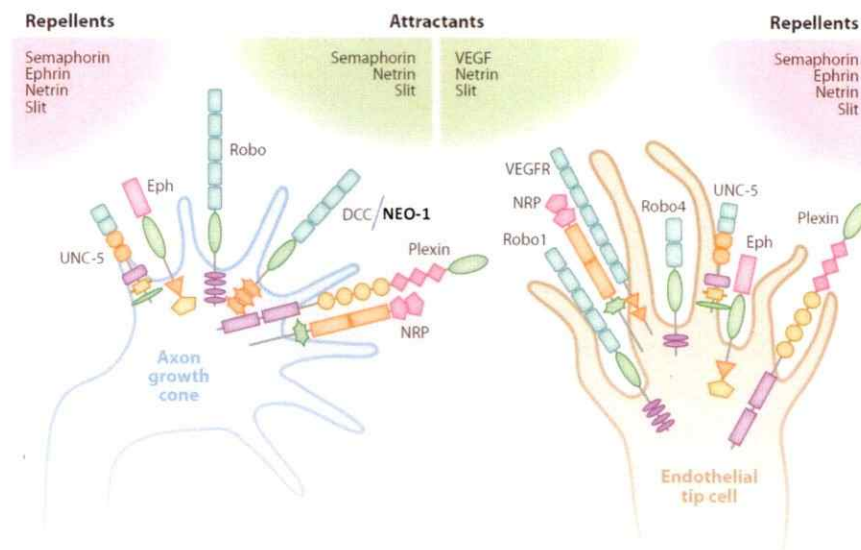


Figura 2. Participación de pares similares de receptor-ligando participan en la guía de conos de crecimiento axonal y células endoteliales punta. La señalización por efrinas es principalmente repulsiva tanto para el cono en crecimiento como para las células endoteliales punta, del mismo modo que la mediada por semaforinas. Las Netrinas en tanto, pueden actuar como quimioattractantes o quimiorepelentes dependiendo de su contexto celular y el receptor al cual se unan. DCC, *Deleted in Colorectal Cancer*; NEO-1, Neogenina1; NRP, *Neuropilin*; Robo, *Roundabout*; UNC-5, *Uncoordinated-5*; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; VEGFR, Receptor de VEGF (Modificado a partir de Melani & Weinstein, 2010).

b) Netrinas y sus receptores en guía axonal y angiogénesis

Dentro de las ya mencionadas moléculas de guía axonal, una de las más estudiadas son las Netrinas. Las Netrinas constituyen una familia de proteínas secretadas altamente conservadas y estructuralmente similares a las lamininas, las cuales corresponden a componentes estructurales de la membrana basal de los tejidos. La familia de las Netrinas posee una secuencia proteica de 600 aminoácidos con una masa molecular de 70 kDa aproximadamente. Entre las características compartidas por las Netrinas, se debe mencionar que los dominios N-terminal contienen regiones altamente homólogas a los dominios V y VI de las lamininas (Cirulli & Yebra, 2007). Al igual que éstas, el dominio V de las Netrinas contiene tres repeticiones similares a EGF. Por el contrario, el dominio C-terminal de las Netrinas, no guarda homología con las lamininas (Cirulli & Yebra, 2007).

El primer miembro de la familia Netrina identificado fue UNC-6, caracterizado en *C. elegans* e implicado en la guía circunferencial de axones y células. Fue descrito en uno de los varios mutantes de *C. elegans* con distintos fenotipos de descoordinación (Ishii y col, 1992; Serafini y col, 1994). El miembro que da nombre a la familia es Netrina-, primeramente identificada en cerebro de pollo como la molécula responsable de la actividad quimiotáctica y promotora del crecimiento axonal que posee la placa del piso de la médula espinal (Serafini y col, 1994). Esta proteína de 78 kDa muestra alta afinidad por membranas celulares, aunque su actividad se presenta tanto en forma soluble como asociada a membranas y su estructura es similar a la proteína UNC-6. Poco tiempo después de caracterizado UNC-6, se describió a Netrina-A y Netrina-B en *Drosophila melanogaster*. En vertebrados, por su parte, después de Netrina-1, se identificaron las Netrinas-2 y 3. Todas ellas estructuralmente similares a la cadena γ de las lamininas. Posteriormente se identificó otra Netrina más distante en ratón y humano, llamada Netrina-4 o β , dada su homología con la cadena β de las lamininas (Cirulli y col, 2007).

En todas las especies en las cuales han sido identificadas, se ha demostrado que

las Netrinas participan en la guía axonal, de ahí el origen de su nombre, el cual deriva de la palabra sánscrita *netr*: *el que guía*. Las Netrinas actúan como guías de orientación bifuncionales; pueden atraer algunos axones y repeler a otros, según los receptores que estén involucrados.

Entre los receptores de la familia de las Netrinas, podemos mencionar la familia DCC (del inglés, *Deleted in Colorectal Cancer*) y familia de UNC5. La familia DCC, está conformada por los receptores DCC y Neogenina-1, mientras que la familia UNC5 comprende 4 miembros, UNC5A-D. Los receptores DCC se componen de un dominio extracelular que contienen 6 repeticiones fibronectina tipo 3 (FN3) y 4 repeticiones inmunoglobulinas (Ig), un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene 3 dominios acuñados P1, P2 y P3 (figura 3).

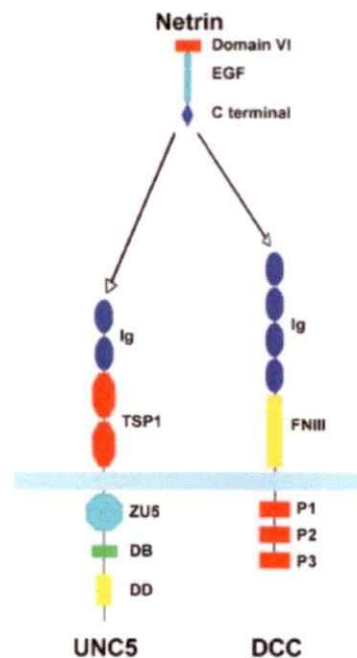


Figura 3. Netrinas y sus receptores regulan tanto la orientación axonal como el desarrollo de vasos sanguíneos. El ligando Netrina se muestra en la parte superior, mientras que sus receptores (UNC5, DCC) en la inferior. DB indica dominio de unión a DCC; DD, dominio de muerte, FNIII, Fibronectina tipo 3-like; Ig dominio inmunoglobulina; P1/2/3, regiones conservadas en el dominio citoplasmático de DCC; TSP1, trombospondina-1-like; ZU5, zona occludens-1-like. (Tomado de Larrivé y col, 2009).

El dominio intracelular de DCC contiene varios sitios putativos de unión a proteína, y fosforilación (Moore, 2007). El dominio de unión a Netrina-1 se localiza en uno de los repetidos de fibronectina tipo 3, aunque es aún incierto cuál de ellos se une a Netrina-1 (Bennet y col, 2007; Geisbrecht y col, 2003). La familia UNC5 comprende un grupo de receptores de transmembrana compuestos de dos dominios inmunglobulina y dos trombospondina en la región extracelular. La región intracelular, por su parte, contiene un dominio de unión a DCC y un dominio de muerte (figura 3). El dominio de unión de Netrina-1 en los receptores UNC5 según lo reportado en la literatura se localiza en las repeticiones Ig (Geisbrecht y col, 2003).

A2b, receptor adenosina, por su parte, también ha demostrado ser un receptor de Netrina-1, pero su función en mediar los efectos de Netrina-1 *in vivo* aún es desconocida (Corset y col, 2000; Stein y col, 2001). Finalmente, las integrinas $\alpha_6\beta_4$ y $\alpha_3\beta_1$ también se han sugerido como receptores de Netrina en células endoteliales y se ha visto que median la adhesión celular y la migración en respuesta a Netrina-1 (Yebra y col, 2003).

Durante la embriogénesis, Netrina-1 es secretada desde las células de la línea media ventral del sistema nervioso central y atrae axones comisurales hacia ella. También puede repeler otros tipos axonales, incluyendo los axones motores trocleares en los vertebrados. La atracción hacia Netrina-1 es mediada por la activación de la familia DCC como ha sido demostrado en experimentos genéticos de pérdida de función. En ratones deficientes en Netrina-1 o DCC, los axones comisurales quedan detenidos y son incapaces de alcanzar la línea media. La repulsión en respuesta a Netrina-1, requiere la señalización a través de homodímeros del receptor UNC5 o heterodímeros UNC5-DCC. En *Xenopus*, la atracción mediada por DCC de los axones espinales, es convertida en repulsión por la expresión ectópica de la familia de receptores UNC5, un mecanismo dependiente de la interacción entre las fracciones citoplasmáticos de ambos receptores. UNC5 puede también mediar la repulsión en ausencia de DCC, aunque en rango menor (Hong y col, 1999).

Del mismo modo que en guía axonal, las Netrinas pueden tener actividad bifuncional en procesos angiogénicos. Diversos grupos han reportado que pueden tener acciones tanto repulsivas como atractivas sobre células endoteliales pero el papel que cumplen los receptores en esta respuesta bifuncional ha sido escasamente estudiado. Recientemente, se ha reportado un rol anti-angiogénico para Netrina-1 *in vitro* y Netrina-4 *in vivo* (Lejmi y col, 2008). En este trabajo, se observó que Netrina-4 es sobreexpresada en células endoteliales angiogénicas luego de la estimulación a largo plazo con VEGF. Por otro lado, se reportó que Netrina-1 (1000 ng/ml) o Netrina-4 (10, 100 y 1000 ng/ml) inhibían la migración de células endoteliales inducida por VEGF *in vitro*. Netrina-4 recombinante, también impedía la angiogénesis patológica en ensayos de formación de nuevos vasos en Matrigel y de neovascularización coroidal inducida por láser. Al mismo tiempo, la sobreexpresión de Netrina-4 en células tumorales de cáncer de próstata de la línea PC3 reducía la neovascularización y el crecimiento tumoral de aquellas células transfectadas con Netrina-4 en comparación con los controles tumorales sin transfectar era significativamente menor (Lejmi, 2008).

Se demostró también que Netrina-1 tenía efectos anti-angiogénicos en embriones de pollo, donde al transplantar líneas celulares que expresaban Netrina-1 humana o de pollo en diferentes etapas de su desarrollo, la angiogénesis se veía impedida. Este fenómeno era observado en todas las etapas estudiadas (Bouvier y col, 2008).

Si bien los trabajos anteriormente descritos dan cuenta de un rol anti-angiogénico de las Netrinas, otro grupo de estudios sugieren, por el contrario que las Netrinas podrían tener un rol pro-angiogénico. En uno de estos trabajos, se demostró que Netrina-1 estimulaba la proliferación (10 – 100 ng/ml) y migración (10- 200 ng/ml) de ECs vasculares (VECs) y células vasculares de músculo liso (VSMCs) de manera dosis dependiente. Así como también, que promovía la adhesión de VMSC *in vitro* y la angiogénesis *in vivo* en ensayos de membrana corolantoídea (1 µg) y micro-bolsillo corneal (200 ng) (Park y col, 2004). Es importante hacer notar que el receptor de Netrina en VECs no fue identificado en este estudio ni tampoco en una investigación posterior.

En otro trabajo se observó que tanto Netrina-1 como Netrina-4 estimulaban la proliferación, migración y la formación de túbulos en HMVECs *in vitro*, y que esta estimulación era independiente de los receptores conocidos de Netrinas (Neogenina-1, DCC y la familia UNC5) (Wilson y col, 2006).

En otro reporte del año 2006, se planteó que Netrina-1 promovía la angiogénesis a través del aumento en la producción de óxido nítrico (NO) dependiente de la óxido nítrico sintasa (eNOS) (Nguyen & Cai 2006). En este artículo, se planteó que la exposición de células ECs de la aorta de bovino a Netrina-1 (10 -100 ng/ml) resultaba en un aumento en la producción de NO de manera dosis dependiente, mientras que la angiogénesis estimulada por Netrina-1 se veía inhibida con un quelante de NO (PTIO). Ellos demostraron además, que la producción de NO, ocurría por la unión de Netrina-1 al receptor DCC, lo que generaba la activación de la vía ERK1/2-eNOS (Nguyen & Cai 2006).

Se ha demostrado también un rol pro-angiogénico de Netrina-1 en el cerebro adulto de ratón. Específicamente, se determinó que la sobreexpresión de Netrina-1 vía un vector viral adenoasociado (AAV-NT-1), en experimentos *in vitro* estimulaba la proliferación y migración de ECs humanas cerebrales y SMCs humanas aórticas. *In vivo* por su parte promovía la neovascularización focal (Fan y col, 2008). Además, la administración intracerebral de Netrina-4 luego de una oclusión de la arteria cerebral media (modelo de ataque cerebral), llevaba a un aumento en la densidad de vasos sanguíneos, a proliferación endotelial y a una mejora en el comportamiento una semana luego del infarto (Hoang y col, 2008). Adicionalmente, en otro estudio se demostró que Netrina-1 (100 ng/ml) promovía la viabilidad, proliferación, migración y formación de túbulos en HUVECs. Estos resultados eran drásticamente reducidos al utilizar un shRNA para Netrina-1 (Xi y col, 2011).

En el caso de Netrina-4, su rol pro-angiogénico también ha sido investigado por diversos autores. En un estudio del año 2011, se identificó *netrina-4* como un gen

expresado en células endoteliales y requerido para el desarrollo de los vasos sanguíneos en etapas embrionarias en el modelo de pez cebra (Lambert y col, 2011). Los datos *in vitro* mostraron que Netrina-4 era necesaria para la supervivencia, proliferación y angiogénesis en células endoteliales y que estas actividades eran mediadas por proteínas comunes involucradas en vías de señalización que llevan a la supervivencia y proliferación celular, esto es, Akt y ERK1/2. Más aún, demostraron que Netrina-4 tiene actividad pro-angiogénica *in vitro* usando un ensayo de angiogénesis en 3D, así como también *in vivo* en el desarrollo embrionario de pez cebra y vieron que ambos efectos eran al menos en parte mediados por la activación de proteínas quinasas. Finalmente, sus resultados demostraron que Netrina-4 inducía la proliferación y supervivencia tanto en HUVECs como HUAECs de manera dosis y tiempo dependiente. Es importante destacar que en la discusión de este trabajo, los autores hacen mención a que no fueron capaces de identificar el receptor de Netrina-4 que mediaba estos efectos en células endoteliales usando la estrategia de RNA de interferencia.

Otro trabajo que apoya el rol pro-angiogénico de Netrina-4, surge en el contexto de linfo-angiogénesis (Larrieu y col, 2010). Aquí, los autores evidencian que Netrina-4 funciona como un factor pro-linfoangiogénico. Demostraron que Netrina-4 induce la proliferación, supervivencia y migración de células endoteliales linfáticas a través de la activación de las vías de señalización MAPquinasa p42/p44, Akt/PI3 quinasa y mTor. Demostraron además que si bien tanto Neogenina-1 como UNC5B se expresaban en las células endoteliales linfáticas, su silenciamiento mediante RNA de interferencia no suprimía los efectos biológicos inducidos por Netrina-4. Además, la sobreexpresión de Netrina-4 en piel de ratón o tumores de mama humanos, aumentaba la densidad de los vasos linfáticos. Finalmente, demostraron que ratones transplantados con tumores que sobre-expresaban Netrina-4, desarrollaban más metástasis dado que presentaban una permeabilidad linfática mayor.

Si bien en este artículo, los investigadores no identificaron el receptor involucrado, un año más tarde, este mismo grupo publicó un estudio donde identificaban

a la integrina $\alpha_6\beta_1$ como la responsable de mediar los efectos biológicos de Netrina-4 en el contexto de sistema linfático (Larrieu y col, 2011). Específicamente, demostraron que esta integrina era expresada por las células endoteliales y se unía a Netrina-4 en una manera dosis dependiente. La inhibición de cualquiera de las subunidades de la integrina, suprimía la migración celular, adhesión y contacto focal inducidos por Netrina-4. Además, la fosforilación de la familia de las quinasas Src, efectores de la migración de células endoteliales, también era impedida por la inhibición de α_6 o β_1 . Finalmente, demostraron que Netrina-4 y la integrina $\alpha_6\beta_1$ colocalizaban en la vasculatura embrionaria, intestinal y tumoral, siendo de esta manera, los primeros en demostrar que las Netrinas señalizan en el endotelio a través de receptores no-canónicos.

Si bien los resultados obtenidos en los trabajos que estudian el rol de Netrinas en el contexto angiogénico es contradictoria, cabe recordar que en el sistema nervioso, las Netrinas actúan como señales bifuncionales y este mismo rol dual puede explicarse en estos resultados aparentemente opuestos. Evidencias recientes indican que un factor que podría estar dando cuenta de la respuesta diferencial hacia las Netrinas, sería la concentración de las mismas, dado que en concentraciones bajas promueve la atracción y en altas, la repulsión. Este fenómeno queda de manifiesto en una publicación reciente donde se reportó la acción dual en la concentración-dependiente de Netrina-1 al modular procesos de angiogénesis (Yang y col, 2007). Estos investigadores, encontraron que Netrina-1 podría tanto estimular como inhibir la proliferación o la migración de HUVECs *in vitro*. Específicamente, las concentraciones más bajas estimulaban dichos procesos mientras que las más altas, los inhibían. De manera similar, se observó un aumento o inhibición de concentración dependiente de Netrina-1 durante la neogénesis corneal *in vivo* (Yang y col, 2007).

Aunque hay consenso de que estas proteínas participan en procesos angiogénicos, los receptores que median estos efectos, aún no han sido plenamente identificados. La mayor parte de la información existente hasta la fecha, sugiere un rol para los receptores DCC y UNC5 principalmente. Sin embargo ésta no es concluyente, y

no se pueden atribuir todos los efectos observados a estos dos receptores, especialmente cuando dichos efectos se dan en tipos de células endoteliales que no expresan estos receptores. Más aún, diversos trabajos son concluyentes en afirmar que en HUVEC, células utilizadas ampliamente como modelo de célula endotelial, no expresan el receptor DCC (Castets y col, 2009; Lejmi y col, 2008).

c) Neogenina-1: ¿el eslabón perdido?

Neogenina-1 es uno de los receptores conocidos de las Netrinas y si bien su rol en sistema nervioso ha sido bien documentado, no sucede lo mismo en un contexto angiogénico, donde ha sido escasamente estudiado en comparación con otros receptores como DCC y UNC5B. Neogenina-1 es miembro de los receptores de transmembrana de la familia de las inmunoglobulinas (ver figura 4). Es homólogo de DCC, y al igual que éste, es prominentemente expresado por neuronas en diferenciación en el sistema nervioso central (Vielmetter y col, 1994). Sin embargo, Neogenina-1 no sólo se expresa en el sistema nervioso central, sino que también en una variedad de otros tejidos durante el desarrollo embrionario, tales como el músculo cardíaco, el epitelio y el mesénquima pulmonar, intestinal y estomacal. Además, está presente en el epitelio pancreático, mesénquima de la glándula adrenal y riñón, cartílago en diferenciación ósea, en el músculo liso vascular y tejido conectivo de extremidades y de la cara (Fitzgerald y col, 2006).

Además de unirse a ligandos de la familia de las Netrinas, Neogenina-1 es también receptor de la familia de las moléculas de guía repulsiva RGM (del inglés, *Repulsive Guidance Molecule*), una glicoproteína unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) sin homología a otras moléculas de guía axonal (Wilson & Key, 2006). A la fecha se han descrito 3 miembros para esta familia en vertebrados RGMa, RGMb y RGMc. RGMa y RGMb se expresan particularmente en el sistema nervioso central adulto, RGMc se expresa en musculatura esquelética, hígado y miocardio y RGMb adicionalmente se expresa en cartílago. Sin embargo, RGMa ha sido el ligando de la familia más estudiado

tanto dentro como fuera del sistema nervioso.

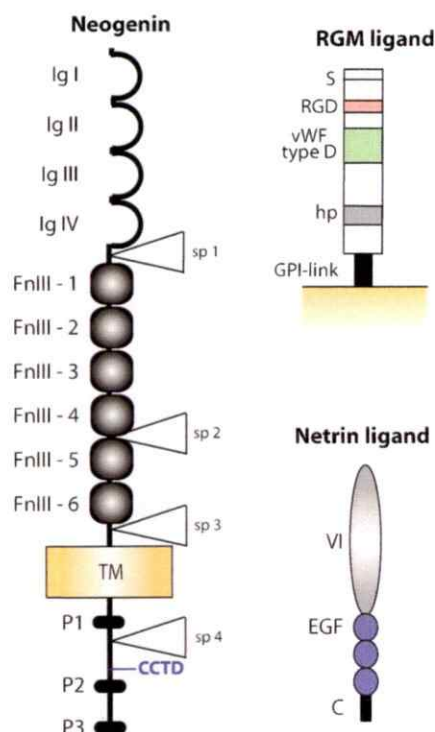


Figura 4. Estructura de Neogenina-1 y sus ligandos RGM y Netrina. Neogenina-1 consiste en cuatro *loops Ig-like* y 6 repeticiones FnIII, un dominio transmembrana (TM) y una región intracelular con tres dominios P. Hay al menos 4 sitios de *splicing*, y una secuencia consenso caspasa-3- CCTD. RGM contiene un péptido señal N-terminal (S), y un motivo RGD (implicado en la interacción célula-célula), un dominio parcial del factor von Willebard (vWF) tipo D, una región hidrofóbica (hp) y un dominio de anclaje GPI C-terminal. Las Netrinas 1-4 son proteínas secretadas que contienen un péptido señal amino terminal, seguido de un dominio globular VI similar a laminina y tres repeticiones EGF, V-1, V-2, V-3. El dominio C-terminal de Netrinas, muestra la mayor variación entre las especies y es similar a los dominios encontrados en la familia del complemento y en Frizzled. RGM contiene un péptido señal N-terminal (S), y un motivo RGD (implicado en la interacción célula-célula), un dominio parcial del factor von Willebard (vWF) tipo D, una región hidrofóbica (hp) y un dominio de anclaje GPI C-terminal (Wilson & Key, 2006).

La información existente en la literatura acerca de la implicancia de Neogenina-1 y la angiogénesis mediada a través de las Netrinas es limitada. Si bien hay trabajos que hablan de un nexo entre Neogenina-1 y angiogénesis (Lejmi y col, 2008; Eveno y col, 2009), éstos se enfocan principalmente en Netrina-4, sin hacer mención a Netrina-1 o RGMa. Específicamente, Lejmi y colaboradores reportaron que el efecto

antiangiogénico de Netrina-4 previamente mencionado, era a través de la unión de Netrina a Neogenina-1 y el reclutamiento de UNC5B. Ellos demostraron que en células endoteliales (HUAEC) estimuladas con VEGF, Netrina-4 se unía a Neogenina-1. Esta unión, promovía el reclutamiento de UNC5B por parte de Neogenina-1 y silenciamiento de cualquiera de estos dos receptores, anulaba el efecto inhibitorio de Netrina-4 sobre la migración de EC (Lejmi y col, 2008).

Eveno y colaboradores por su parte, también describen un efecto antiangiogénico de Netrina-4 en un contexto tumoral. En primera instancia, ellos determinaron la expresión de Neogenina-1 a nivel de proteína mediante Western blot en células HUVEC. Posteriormente y para investigar la implicancia del receptor Neogenina-1 en la actividad antiangiogénica de Netrina-4, utilizaron un ensayo de formación de túbulos en células endoteliales HUVEC co-cultivadas con la línea tumoral LS174, la cual produce Netrina-4. Ellos observaron que en presencia de un anticuerpo bloqueante de Neogenina-1, el número de túbulos se veía dramáticamente aumentado en comparación con la condición sin bloquear, sugiriendo que Neogenina-1 media la actividad anti-angiogénica de la Netrina-4 secretada por las células LS174 (Eveno y col, 2009).

d) Células troncales mesenquimáticas, WJ-MSC y efecto proangiogénico

Las células troncales mesenquimáticas o MSCs (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*) son células multipotenciales presentes tanto en la etapa fetal como adulta de un individuo (Troyer & Weiss, 2008). Se encuentran en ciertos fluidos y en el estroma de distintos tejidos del organismo, como por ejemplo en la médula ósea (Ucelli, 2008), grasa (Kolf, 2008), líquido amniótico (Sessarego, 2008), endometrio (Gargett y col, 2009), cordón umbilical (CU) (Troyer & Weiss, 2008), pulpa dentaria (Gronthos y col, 2008) y ligamento periodontal (Liu y col, 2008) entre otros.

Las MSCs son definidas como células que en condiciones de cultivo crecen en monocapas, presentando una morfología fibroblastoide, con capacidad de

autorrenovación y de diferenciación *in vitro* a distintos linajes tales como el tejido adiposo, óseo y cartílago (Dominici y col, 2006; Kolf, y col, 2007; Pittenger y col, 1999). Adicionalmente, se ha descrito que estas células pueden *trans*-diferenciarse *in vitro* a células de los tres linajes embrionarios, como por ejemplo, células nerviosas (Kopen y col, 1999), endoteliales (Orlic, 2001) y hepáticas (Lagasse y col, 2000) entre otras (Jiang y col, 2002).

El rol fisiológico de las MSC es mantener la homeostasis tisular, permitiendo el recambio celular que ocurre normalmente en los tejidos a través de la diferenciación a células con la identidad de dicho órgano. Adicionalmente, en los casos donde existe daño, las MSC secretan factores de crecimiento que permiten la regeneración de la zona afectada mediante la atracción de otras células progenitoras o estimulando a las células residentes para la formación de nuevas estructuras, tales como la generación de vasos sanguíneos (Stappenbeck & Miyoshi, 2009).

En modelos animales, se ha visto que el trasplante de MSC, específicamente de aquellas derivadas de médula ósea (BM-MS), a través de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) promueve la angiogénesis terapéutica en un modelo de isquemia del miembro inferior de manera paracrina (Al-Khaldi y col, 2003a; 2003b). Además las BM-MS secretan los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento transformantes (TGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), angiopoietina, angiogenina e interleuquina-8 (IL-8) (Folkman & Shing, 1992; Yancopoulos y col, 2000). Entre estos factores, VEGF es un factor de crecimiento crítico para la formación de vasos sanguíneos y se ha demostrado que promueve el crecimiento de células vasculares endoteliales derivados de arterias, venas y vasos linfáticos (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Como evidencia adicional al potencial uso de BM-MS humanas como fuente de células productoras de VEGF, en el año 2008 se demostró que este potencial se mantenía *in vivo*, cuando estas células eran transplantadas en ratones inmunodeficientes (Kagiwada y col, 2008). Estos datos, nos permiten inferir que las MSC pueden funcionar no sólo como unidades de reemplazo de aquellas células

que han expirado en tejidos mesenquimáticos, sino que también pueden tener efectos tróficos sobre células que están en su vecindad, sin generar nuevos fenotipos diferenciados y en consecuencia, también influir en la regeneración de células o tejidos meramente por un efecto de factor bioactivo.

Con todos estos antecedentes, podemos concluir que la terapia basada en células surge como una opción prometedora para el tratamiento de enfermedades clínicas y aunque los datos a la fecha indican que las MSCs utilizadas para estos fines son obtenidas principalmente a partir de células mononucleares derivadas de médula ósea adulta (Chavakis y col, 2010), el uso de células de otras fuentes además de las de médula ósea se ha sugerido como estrategia para el desarrollo de enfoques aún más eficientes.

Con respecto a este último punto, las células troncales mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton (WJ-MS), se han reportado como una fuente alternativa valiosa para la terapia de células troncales adultas. La gelatina de Wharton es el tejido conectivo que rodea los vasos umbilicales en el cordón e incluye las regiones perivascular, intervascular (matriz) y sub-amnion. No requiere un procedimiento invasivo para su aislamiento en comparación con aquellas MSCs derivadas de médula ósea. Además, WJ-MS son células jóvenes comparadas con las MSCs derivadas de médula ósea adulta y exhiben una tasa de proliferación y capacidad de autorrenovación mayores. Las WJ-MS se adhieren a un sustrato plástico, expresan los marcadores característicos de MSC y pueden diferenciarse a células de linaje mesodérmico incluyendo adipocitos, condrocitos y osteocitos *in vitro* (Karahuseyinoglu y col, 2007). Entre las características positivas que las hace útiles en protocolos clínicos, se encuentran el hecho de que expresan bajos niveles del complejo de histocompatibilidad clase I y clase II (Sarugaser y col, 2005; Lupatov y col, 2006) y poseen propiedades inmunes que las hacen ser toleradas en caso de trasplantes alogénicos (Weiss y col, 2008).

Respecto al potencial pro-angiogénico de estas células, esto fue evaluado por Choi y colaboradores sólo recientemente. Los autores encontraron que las WJ-MSC liberan una variedad de proteínas que estimulan la angiogénesis, incluyendo, angiogenina, IGFBP-3, IL-8 y MCP-1, que promueven las funciones de las células endoteliales. Además, demostraron que pueden reclutar células endoteliales del huésped hacia una matriz con WJ-MSC implantada *in vivo* y más aún, formar vasos sanguíneos de pequeño calibre. Por otra parte, se confirmó el efecto terapéutico *in vivo* de WJ-MSC en un modelo de animal isquémico demostrando que hay una inducción de la neovascularización y una recuperación del flujo sanguíneo en la extremidad isquémica luego del trasplante de WJ-MSC. Finalmente, en este estudio, se observó que el medio condicionado de WJ-MSC indujo la proliferación, migración y formación de túbulos en células endoteliales (Choi y col, 2013).

e) Hipoxia y producción de factores angiogénicos

Actualmente, con el fin de optimizar una eventual aplicación terapéutica de las MSCs en procesos angiogénicos, los estudios se han enfocado en aumentar la expresión y secreción de factores angiogénicos de estas células. Hoy en día, hay consenso en que en condiciones de oxígeno limitantes, es decir, hipóxicas, el efecto angiogénico de estas células es mayor.

HIF-1 es un factor de transcripción maestro que regula la expresión de varios genes implicados en angiogénesis, los cuales entre otras cosas, previenen la apoptosis e inducen la migración y *homing* de células al sitio de la isquemia. HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β (Jiang y col, 1996 y Wang y col, 1995). Si bien tanto HIF-1 α y HIF-1 β se expresan constitutivamente, en condiciones de normoxia (concentración fisiológica de oxígeno) HIF-1 α es continuamente degradado. En hipoxia, la degradación de HIF-1 α es inhibida, lo cual resulta en la acumulación de la proteína, la dimerización con HIF-1- β , la unión a los

elementos de respuesta a hipoxia (HREs) dentro de los genes blanco y la activación de la transcripción vía el reclutamiento de p300 y CBP (Poellinger & Johnson, 2004).

Luego de la caracterización molecular de varios factores angiogénicos, estudios relevantes de principios de los noventa, mostraron que la hipoxia podría inducir la expresión del mRNA del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kourembanas y col, 1990) y VEGF en cultivo (Shweiki y col, 1992). Se demostró además que en los tumores, la expresión de *VEGF* se ve substancialmente aumentada en zonas que rodean el centro necrótico, sugiriendo un mecanismo por el cual el microambiente hipóxico puede estimular la angiogénesis tumoral (Shweiki y col, 1992; Plate y col, 1992).

HIF-1 α tiene un rol crítico en la angiogénesis al activar la transcripción de genes que codifican factores de crecimiento angiogénicos *ANGPT1* y *ANGPT2*, además de los ya mencionados *VEGF* y *PDGF* (Kelly y col, 2003 y Pugh y col, 2003). HIF-1 α activa directamente la transcripción del gen *VEGF* al unirse a un HRE (Forsythe y col, 1996), mientras que para *ANGPT1*, *ANGPT2*, *PGF* y *PDGFB*, no se sabe si la regulación es directa o indirecta. La regulación de estos genes es sorprendentemente específica según el tipo celular. En hipoxia, la expresión de *ANGPT2* es inducida en ECs arteriales, reprimida en células de musculo liso y se mantiene invariable en fibroblastos cardíacos y miocitos, mientras que *VEGF* es inducido en los cuatro tipos celulares (Kelly y col, 2003).

Con respecto a hipoxia y MSC, Razban y colaboradores, observaron que en condiciones hipóxicas, la expresión de *VEGF* en MSCs derivadas de la médula ósea, se veía aumentada con respecto a una condición de normoxia, pero esta expresión aumentaba aún más en células que sobreexpresan HIF-1 α (Razban y col, 2008). Esta observación concuerda con lo reportado en la literatura referente a que *VEGF* es inducido en hipoxia y también con el hecho demostrado de que *VEGF* es regulado

directamente por HIF ya que en su secuencia génica posee sitios HRE (Carmeliet y col, 2011).

Por otra parte, ha sido reportado que las BM-MSCs, protegen a los cardiomiocitos a través de la sobreexpresión de *VEGF-A* bajo condiciones de cultivo hipóxicas, y que este efecto es mediado por la activación del factor HIF-1 α . Esto es de particular interés cuando se considera que luego del trasplante al miocardio infartado, las células se encuentran en un medioambiente isquémico caracterizado por la reducción de O₂ y la privación de nutrientes que pueden hacer peligrar su viabilidad (Dai y col, 2007).

Li y colaboradores por su parte encontraron que la estimulación *ex vivo* con hipoxia leve (2% de oxígeno) de BM-MSCs, aumentaba el nivel de *VEGF* y la diferenciación endotelial. Más aún, la recuperación del flujo sanguíneo en la pierna isquémica tratada con aquellas células expuestas a hipoxia era mayor que en aquellos implantados con células cultivadas en normoxia. Estos resultados indican que un aumento en la actividad de la angiogénesis terapéutica puede ser inducida por la preestimulación hipóxica de las células mesenquimáticas previo a la implantación (Li y col, 2002).

Respecto a los nuevos factores angiogénicos mencionados anteriormente y su relación con hipoxia prácticamente no se dispone de información en la literatura actual. Existe sólo un trabajo del año 2009 en el cual se relaciona la producción de Netrina-1 e hipoxia en el contexto de la inflamación (Rosenberg y col, 2009). Específicamente, es sabido que Netrina-1 está ligada a la coordinación de las respuestas inflamatorias. Dado que las superficies mucosas son particularmente propensas a la inflamación causada por hipoxia, ellos determinaron la función de Netrina-1 en la inflamación inducida por hipoxia y detectaron una inducción del gen que codifica para Netrina-1 (*NTNI*), dependiente del factor HIF-1 α en epitelios hipóxicos así como en líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano, específicamente Caco-2 y T84. Además, encontraron

sitios putativos de unión a este factor de transcripción en el promotor del gen de *NTN1*. Para evaluar la influencia de hipoxia y HIF-1 α en la expresión de *NTN1*, utilizaron constructos reporteros de luciferasa dirigidos por diferentes fragmentos del promotor. Las células transfectadas de manera transiente con el promotor *full-length*, al ser expuestas a hipoxia (2% oxígeno durante 24 horas) mostraron 4 veces más actividad luciferasa que sus controles normoxia. En contraste, las células transfectadas con el promotor truncado de *NTN1*, que carecía del sitio HRE, no respondían a la condición de hipoxia. Finalmente, utilizando la técnica de inmunoprecipitación de cromatina, demostraron que la hipoxia inducía la unión de HIF-1 α al sitio HRE putativo en el promotor de *NTN1*.

Resumiendo la información descrita hasta el momento, la angiogénesis es un proceso altamente dependiente de la presencia de factores angiogénicos clásicos tales como VEGF. Sin embargo, evidencia reciente indica que ciertas proteínas de guía axonal, entre ellas, aquellas pertenecientes a la familia de las Netrinas, a través de sus receptores Neogenina-1, DCC y UNC5 promueve o inhiben la angiogénesis dependiendo del contexto fisiológico en que se encuentren. Por otra parte, es ampliamente sabido que las células troncales mesenquimáticas producen factores angiogénicos clásicos. Sin embargo, la presencia de la familia de las Netrinas en estas células no ha sido explorada hasta la fecha y menos aún la contribución de los receptores en cuanto a modular la respuesta anti o pro-angiogénica. Es por esta razón que en esta tesis, se pretende dilucidar si células WJ-MSC producen factores angiogénicos no canónicos y si además inducen la angiogénesis de manera paracrina en las células endoteliales al actuar sobre uno de los receptores de estos factores no-canónicos, específicamente, Neogenina-1.

2. HIPÓTESIS

WJ-MSC producen factores angiogénicos no clásicos, entre ellos, Netrinas, los cuales se ven aumentados en hipoxia y son capaces de inducir angiogénesis de manera paracrina actuando en células HUVEC a través de alguno de sus receptores canónicos, particularmente, Neogenina-1.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Dilucidar si WJ-MSC producen factores angiogénicos no clásicos y si estos son capaces de inducir angiogénesis de manera paracrina en células HUVEC a través de alguno de sus receptores canónicos, particularmente, Neogenina-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Evaluar la expresión de los ligandos Netrina-1, Netrina 4 y RGMa en WJ-MSC tanto en normoxia como en hipoxia, así como de sus receptores canónicos en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC).

3.2.2 Evaluar el efecto angiogénico de medio condicionado de WJ-MSC y los ligandos de Neogenina-1, RGMa y Netrina-1, mediante ensayos de migración y *wound healing* en HUVEC.

3.2.3 Determinar la contribución al proceso angiogénico de Neogenina-1 mediante ensayos de migración y formación de túbulos, en experimentos de pérdida de función de Neogenina-1 en HUVEC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Cultivos Celulares

- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), n° catálogo 12800-017, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Penicilina/Streptomycin 10.000 U/mL / 10.000 ug/mL, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).
- Suero Bovino Fetal (SBF), n° catálogo 10437-028, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Suero de ternera recién nacido (NBCS), n° catálogo 16010-159, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Tripsina/EDTA 10X, Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- Medio M199 Medium n° catálogo 31100-035 Invitrogen (New York, New York, E.E.U.U.).
- L-Glutamina n° catálogo G8540, Sigma (Taufkirchen, Germany)
- Gelatina n° catálogo 1040700500, Merck.
- Bicarbonato de sodio, n° catálogo 1063291000, Merck.
- Colagenasa tipo 2, n° de catálogo 41h12762, Worthington (Lakewood, NJ).

4.1.2 Líneas Celulares

- Caco-2 corresponden a células de adenocarcinoma epitelial colorectal humano, ATCC. Gentilmente donadas por el laboratorio del Dr. Tulio Núñez.
- HEK 293 originadas desde riñón embrionario humano, ATCC.
- SH-SY5Y corresponden a células de neuroblastoma humano, provenientes de una metástasis en médula ósea, ATCC.

4.1.3 RT-PCR y Síntesis ADN Complementario

- Sistema comercial GoTaq, Promega (San Luis Obispo, California, E.E.U.U.)
- RNA-Solv, Omega Bio-tek (Norcross, Georgia, E.E.U.U.).

Tabla 1: partidores usados para RT-PCR

GEN	Partidor 5'-3'	Fragmento (pb)
<i>NTN-1</i>	FW 5'- TGC AAG AAG GAC TAT GCC GT -3' RV 5'- GCT CGT GCC CTG CTT ATA CAC-3'	108
<i>NTN-4</i>	FW 5'- TCA GCA CAA CAC AGA AGG ACA GTA TTG-3' RV 5'- TCA GCA CAA CAC AGA AGG ACA GTA TTG-3'	111

<i>RGMa</i>	FW 5'- ATG GAT GGG TAT GGG GAG AG-3' RV 5'- TGC ACT TGA GGA TCT TGC AC-3'	116
<i>NEO-1</i>	FW 5'- TCA TCA AAT TGA CGT GGC GGA-3' RV 5'- TGT ACA CGG TCG CTG GCA TTA-3'	168
<i>GAPDH</i>	FW 5'- TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' RV 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	87

4.1.4 Western Blot

- Tampón de lisis celular: SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 5 mM pH 6,8
- Inhibidor de Proteasas Halt TM Protease & Phosfatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).
- Tampón de carga 6X: Tris-HCl 1M, pH 6,8, glicerol 3%, SDS 10%, azul de bromofenol $1,8 \times 10^{-4}$ M, β -mercaptoetanol 0,7 M.
- Tampón de corrida: Tris Base 25 mM, Glicina 0,19 M, SDS 0,1%.
- Tampón de transferencia: Tris Base 48 mM, 39 mM, SDS 0,37%, metanol 20%.
- Solución de bloqueo: leche descremada al 5 ó 1% disuelta en solución TBS-Tween.
- Solución de lavado: TBS-Tween al 0,1%.
- TBS: Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4.
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina-1, n° de catálogo sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-HIF-1 α n° de catálogo 610958, BD Transduction Laboratories (BD Bioscience).
- Anticuerpo primario: anti-DCC, n° de catálogo sc-6535, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-Netrina- 1, n° de catálogo sc-20786, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-Netrina 4, n° de catálogo HYR01, R & D Systems.
- Anticuerpo primario: anti-RGM-A, n° de catálogo AF2459, R & D Systems.
- Anticuerpo control de carga: β -actina, n° de catálogo A5316, Sigma Taufkirchen, Germany.
- Anticuerpo secundario: HRP-anti Goat, n° de catálogo sc-2020. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo secundario: HRP-anti Rabbit, n° de catálogo 111-036-003. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc (PA, USA).
- Anticuerpo secundario: HRP-anti Mouse, n° de catálogo 115-036-003. Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc (PA, USA).
- Reactivo de quimioluminiscencia: Pierce ECL Western Blotting, Thermo Scientific (Miami, Florida, E.E.U.U.).

4.1.5 InmunoFluorescencia

- Paraformaldehído (PFA) al 4% Merck. Darmstadt, Germany.
- Solución PBS-Tween X-100 al 0.1% (PBST).
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina 1, n° de catálogo sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo secundario: IgG Alexa Fluor ® 555 Donkey anti-goat, n° de catálogo A21432, Invitrogen (New York, EEUU).
- Solución de bloqueo: Suero de caballo preparado al 5% en PBST.
- Gel de montaje: Gel/Mount, n° de catálogo M01/V6, Biomed.
- Anticuerpo primario: anti-Netrina 4, n° de catálogo HYR01, R & D Systems.
- Anticuerpo primario: anti-Netrina 1, n° de catálogo sc-20786, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-RGM-A, n° de catálogo AF2459, R & D Systems.
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina-1, n° de catálogo sc-15337, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo secundario: IgG FITC Goat anti-rabbit, n° de catálogo cat. 81-6111, Invitrogen (New York, EEUU).
- Anticuerpo secundario: IgG Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat, n° de catálogo A21447 Invitrogen (New York, EEUU).
- Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Sigma (Taufkirchen, Germany)

4.1.6 Transducción estable

- HEBS: 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.00
- CaCl₂ 1 mM
- Poli-lisina, Sigma. Taufkirchen, Germany.
- Agua Bidestilada, Laboratorios Sanderson, Fresenius Kabi. Santiago, Chile
- Puromicina
- Medio Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2 BulletKit EBM-2 plus SingleQuots of growth supplements) n° de catálogo CC-3162, Lonza. Basel, Switzerland

4.1.7 Plasmidios

- pCMV-VSV-G (plásmido que codifica para la proteína VSV-G de la cápside viral), Openbiosystems, Huntsville, AL.
- p8.91 (plásmido que codifica las proteínas de replicación viral), Openbiosystems, Huntsville, AL.
- pGIPZ-shRNA (plásmido que contiene la secuencia de interferencia, además del marcador de selección GFP), Openbiosystems, Huntsville, AL.

4.1.8 Citometría de flujo

- Buffer tinción (PBS 1% SFB)
- BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit, BD Bioscience
- PFA 1%
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina 1, n° de catálogo sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo secundario: IgG FITC Goat anti-rabbit, n° de catálogo 81-6111, Invitrogen (New York, EEUU).
- Anticuerpo secundario: IgG Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat, n° de catálogo A21447 Invitrogen (New York, EEUU).
- Anticuerpo primario: anti-Netrina 4, n° de catálogo, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- Anticuerpo primario: anti-Netrina- 1, n° de catálogo sc-20786, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-RGM-A, n° de catálogo AF2459, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- Anticuerpo Anti- CD31 PECAM-1, n° de catálogo 555446, BD Pharmingen (Erembodegem, Belgium)
- Anticuerpo anti-CD29 PE-Cy5, n° de catálogo 559882, BD Pharmingen (Erembodegem, Belgium)

4.1.9 Ensayos de angiogénesis

- Matrigel Basement Membrane Matrix, n° de catálogo 354234 BD Bioscience (Erembodegem, Belgium)
- Gelatina 1%, Merck. Darmstadt, Germany.
- Netrina-1 humana recombinante n° de catálogo 6419-N1-025/CF, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- RGMa humano recombinante n° de catálogo 2459-RM, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- Medio Endothelial Basal Medium (EBM) n° de catálogo CC-3121, Lonza (Basel, Switzerland)
- Medio Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2 BulletKit EBM-2 plus SingleQuots of growth supplements) n° de catálogo CC-3162, Lonza ((Basel, Switzerland)
- DMEM
- VEGF humano recombinante n° de catálogo PH9391, Invitrogen (New York, EEUU).

4.1.10 Inmunohistoquímica

- Parafina, Merck. Darmstadt, Germany.

- Alcian Blue
- Metanol 100%, Merck. Darmstadt, Germany.
- NeoClear, Merck. Darmstadt, Germany.
- Anticuerpo primario: anti-Netrina 4, n° de catálogo HYR01, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- Anticuerpo primario: anti-Netrina- 1, n° catálogo sc-20786, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-RGM-A, n° de catálogo AF2459, R & D Systems (Minneapolis, MN, USA).
- Anticuerpo primario: anti-Neogenina 1, n° catálogo sc-6536, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Anticuerpo primario: anti-DCC, n° catálogo sc-6535, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, E.E.U.U.).
- Solución citrato pH 3-3,3, Vector Biosystems (USA)
- Solución de suero de caballo 5% Vector Biosystems (USA)
- solución AB (Vectastain)
- ImmPact DAB, Vector
- Medio de montaje Entellan, Merck. Darmstadt, Germany.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Aislamiento de células troncales mesenquimáticas humanas desde la gelatina de Wharton de cordón umbilical y exposición a hipoxia experimental.

Los cordones umbilicales usados para la extracción de WJ-MSC fueron facilitados por el banco de células madre público a través de la empresa VidaCel previo consentimiento informado de los donantes en el marco de una colaboración (proyecto FONDEF D09I1047). Estos cordones corresponden a madres con parto de término y sin enfermedades asociadas. En menos de 24 horas fueron procesados en el Laboratorio de Células Troncales y Regeneración Tisular, del departamento de Biología Celular y Molecular perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Chile o en el laboratorio de Células Troncales & Biología del Desarrollo de la Dra. Palma. El cordón umbilical fue cortado en trozos de 0,5 - 1 cm de longitud e incubado con colagenasa 0,1% por 12-15 horas a 37 °C con agitación con el fin de disgregar el tejido. A continuación, la suspensión celular se pasó por un filtro de 100 µm, el sobrenadante fue desechado y las células se lavaron en PBS 1X para luego ser rescatadas mediante centrifugación a 1200 g por 10 minutos. Luego del recuento con azul de Tripán, las células fueron sembradas en DMEM-10% FBS (aproximadamente 1 millón de células por placa de 100 mm, en 10 mL de medio) y mantenidas en esta condición durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Luego de este período, se descartaron las células no adherentes y el cultivo fue incubado a 37°C, con 5% CO₂, en 21% de oxígeno (normoxia) o 2% de oxígeno (en experimentos de hipoxia). La condición de hipoxia se mantuvo en una incubadora especial conectado a inyectores de CO₂ y N₂, en el cual, el N₂ relativo era aumentado para lograr la concentración de O₂ deseada. El medio fue cambiado cada 2 a 3 días. Para la realización de esta tesis se utilizaron 10 muestras de cordón umbilical y todos los cultivos primarios de WJ-MSC se utilizaron entre pasajes 2-6.

4.2.2 Aislamiento y cultivo de células HUVEC

Los cordones umbilicales usados para la obtención de HUVEC fueron facilitados por el banco de células madre público en colaboración con VidaCel, previo consentimiento informado de los donantes y procesados en el laboratorio de la Dra. Palma. Brevemente, la vena umbilical fue lavada con PBS 1X tibio y las células endoteliales fueron aisladas por digestión con Colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (0.2 mg/mL, 10 minutos) y cultivadas 37°C, 5% CO₂ hasta el pasaje 6 en medio M199 (M199) suplementado con 10% NBCS; 10% SFB, 3.2 mM de L-glutamina y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina en placas de petri plástica de 6 o 10 cm cubiertas con gelatina (1% v/v) a 37°C en una atmósfera 5% CO₂ hasta alcanzar 100% de confluencia, la cual fue estimada por observación directa bajo el microscopio de luz. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. El número de células se determinó usando una cámara de Neubauer. Para confirmar la naturaleza endotelial de las células en cultivo se consideró el criterio de forma celular tipo empedrado ('cobblestone') y la expresión de CD-31 (PECAM-1). Para la realización de esta tesis se contó con 20 cultivos independientes de células HUVEC

4.2.3 Precipitación de medios condicionados

Medios condicionados de células WJ-MSc fueron colectados luego de 48 horas de cultivo en condiciones libres de suero, concentrados y analizados por Western Blot junto a un extracto total de proteínas. Para concentrarlos, fueron distribuidos en alícuotas de 1 mL. Se agregaron 500 µl de metanol a -20°C y luego se agitó en vórtex durante 30 segundos, a continuación, se agregaron 125 µl de cloroformo y se agitó nuevamente en vórtex durante 20 segundos. Se centrifugó el medio a 14.000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se recuperó la interfase y ésta fue resuspendida en 20 µl de buffer de carga. Los *pellets* fueron congelados a -20 °C hasta el momento de su uso.

4.2.4 Inmunohistoquímica de cordón umbilical humano

Para los estudios inmunohistoquímicos, se obtuvieron pequeños trozos de cordón umbilical, los cuales fueron lavados con PBS frío, luego de lo cual fueron fijados en paraformaldehído (4% en PBS) por un período de 18 a 24 horas. A continuación, los trozos fueron lavados con PBS 1X 3 veces durante períodos de 10 minutos para retirar el exceso de PFA. Luego, el tejido fue sometido a deshidratación en un gradiente de alcoholes, incubando la muestra en soluciones de metanol de 30°, 50°, 80°, 90° y 100° durante 30 minutos cada una. Una vez deshidratado el tejido, fue tratado con aclarador NeoClear (Merck) durante 2 horas, recambiándolo a la hora. Finalmente, para embeber el tejido, los trozos de cordón fueron tratados con parafina durante 3 horas, siendo recambiada ésta cada hora. Y finalmente dejadas en parafina toda la noche en estufa a 60°C. Una vez listos, las muestras fueron embebidas en tacos de parafina, al día siguiente cortadas con micrótopo en secciones de 15 a 20 μm de espesor, y montados en placas xilanizadas. Para realizar la tinción, los cortes fueron desparafinados, sometiéndolos a 60°C durante 20 minutos y pasándolos posteriormente por xilol y por un gradiente descendiente de alcoholes. Teniendo los cortes desparafinados, se realizó una incubación con solución citrato pH 3-3,5 para desenmascarar el antígeno (Vector Biosystems) durante 30 minutos a 80°C, seguido de la eliminación de la peroxidasa endógena por medio de la solución que contenía: 3% H_2O_2 , 50% Metanol en Tampón Fosfato (PBS, por el acrónimo en inglés). Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS. Al término de este paso, se bloquearon las proteínas inespecíficas, incubando con una solución de suero de caballo al 5% en PBS (Vector Biosystems) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con anticuerpo secundario, se procedió a lavar con PBS y posteriormente, se incubó en solución AB (Vectastain) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un último lavado antes del revelado. El proceso de revelado se realizó incubando con una solución de DAB en su diluyente (ImmPact DAB, Vector). Posteriormente, se deshidrataron las muestras, lavando en concentraciones crecientes de etanol a partir de

agua, luego, se lavó con xilol 3 veces, para luego montar con Entellan (Merck). Las muestras fueron observadas en microscopio óptico Olympus BX51 y fotografiadas con los objetivos de 10 y 20x.

4.2.5 Extracción RNA con trizol

Se limpió el mesón de trabajo con RNaseZap (Ambion). Posteriormente se homogenizó e incubó el lisado de células contenido en 1 ml de Trizol (Invitrogen) por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 μ L de cloroformo frío (Vetec Analytical Reagents). Se agitó por inmersión durante 15 segundos y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se extrajo la fase acuosa (superior) y se transfirió a un tubo *ependorf* limpio con 500 μ l de isopropanol frío (Vetec Analytical Reagents). Luego de esto, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol frío al 75%. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el etanol y se secó el *pellet* a temperatura ambiente cuidando que no se resecara. Se resuspendió el *pellet* en 50 μ L de agua libre de nucleasas. Se midió concentración RNA ($1OD_{260\text{ nm}}=40\text{ ng/ul}$) en nanodrop (Equilab). La presencia de contaminantes proteicos fue evaluada según la razón $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (valores entre 1.7 -2.0). Se guardó a -80°C hasta la preparación de cDNA.

4.2.6 SINTESIS DE cDNA

Previo a la reacción de síntesis de cDNA, el RNA se trató con DNAasa a fin de eliminar cualquier interferencia por posibles trazas de DNA genómico. La reacción se llevó a cabo en una mezcla que contenía 1 μ g de RNA, 1U de DNasa I (Promega), Buffer DNasa I 1X (Promega) y agua libre de nucleasas tratada con DEPC en un volumen final de 10 μ l. La solución fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionó 1 μ L de DNAasa *stop solution* e incubó por 10 minutos a 65°C.

El cDNA se obtuvo a partir de una reacción llevada a cabo por una enzima

retrotranscriptasa RT Minus (200U/uL, Thermo). Para ello, se utilizó como cebador Random primers (Promega) a una concentración final de 20 µg/ml y 2 mM de dNTPs. La reacción se trató con 0,5 U/µL de enzima inhibidora de RNasas (RNasin; Promega). Se mantuvo a 37°C por 1 hora, seguido de una incubación por 15 minutos a 70°C. El cDNA se mantuvo a -20°C hasta su posterior uso.

4.2.7 RT-PCR

Para determinar cantidades relativas de algunos mRNA de interés, se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. La reacción semicuantitativa se llevó a cabo en una mezcla que contenía 1µL de cDNA, Buffer de reacción 1X (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 0,4 µM primers (Invitrogen) y 0,1 mM dNTPs (Promega) en un volumen final de 25 µL. La secuencia de los partidores utilizados se encuentra resumida en la Tabla 1. La reacción se realizó con las siguientes condiciones: (a) 95°C por 5 minutos; (b) 35 ciclos de amplificación de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y (c) una extensión final de 10 minutos a 72°C. En cada experimento, se utilizó control sin RT y control negativo, que corresponde a agua libre de nucleasas.

4.2.8 Western Blot (WB)

Las células se lisaron con tampón de lisis suplementado con inhibidor de proteasas, se homogenizaron con jeringa tuberculina y se cuantificaron las muestras para la obtención de la concentración de las proteínas por sistema comercial *Bio-Rad DC Protein Assay*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente fueron calentadas durante 5 minutos a 95°C en tampón de carga 6X. Se cargaron 20 µg de proteína en un gel al 12% acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de corrida aplicando voltaje constante de 100 V durante 90 minutos. La electrotransferencia de proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia durante 2 horas a 400 mA. Para la visualización de las proteínas transferidas se usó el colorante Rojo Ponceau. Para la inmunodetección de proteínas, la

membrana se bloqueó toda la noche con solución de bloqueo a 4°C en agitación. Después, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-Neogenina-1 diluido (1:200), Netrina-1, Netrina-4 y RGMa en solución de bloqueo al 1, 5, 5, 1% respectivamente, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación moderada. Luego, la membrana se lavó con solución de lavado tres veces 10 minutos con agitación fuerte. Se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a HRP anti-goat diluido (1:2000) y anti-rabbit durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos en solución de lavado y se procedió a revelar con el reactivo quimioluminiscente *Pierce ECL Western Blotting*.

4.2.9 Inmunofluorescencia

Para la detección de los ligandos de Neogenina-1 en WJ-MSC, se sembraron 1×10^4 células en placas de 24 pocillos. A las 24 horas de crecimiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% a 4°C por 15 minutos. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS frío durante 5 minutos y el mismo procedimiento se realizó con PBS/Tween. Se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente con solución de bloqueo toda la noche a 4°C en cámara una húmeda. Se lavó tres veces con PBS/Tween durante 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, 1 hora a temperatura ambiente preparado en solución de bloqueo. Se lavó tres veces con PBS/Tween durante 5 minutos y se incubó con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que tiñe preferentemente el DNA doble durante 3 minutos diluido en PBS, se lavó dos veces con PBS para finalmente proceder a montar con reactivo GelMount. Se dejó secar toda la noche en oscuridad. Para detectar Neogenina-1 en HUVEC (~90% de confluencia) fueron crecidas sobre portaobjetos adosado a pocillos Lab-Tek® (Nunc, Naperville, IL, USA). Luego fueron lavadas con Hank's-glicina 0.125 M (3 veces durante 10 minutos cada vez) y permeabilizadas con Tritón 0.1% en Hank's-glicina 0.125 M por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas en solución de bloqueo (Hank's-glicina, Tritón 0.1% y BSA 1%) por 30 minutos a temperatura

ambiente y luego incubadas con el anticuerpo primario anti-NEO-1 preparado en solución de bloqueo, e incubadas por 12-16 horas a 4°C en una cámara húmeda y oscura. Las células fueron lavadas con Hank's (3 veces durante 10 minutos). Luego de esto, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo IgG Alexa Fluor® 555 Donkey anti-goat por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Para identificar los núcleos se utilizó diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 10 µg/ml en Hank's, 5 minutos) que tiñe preferentemente el DNA doble hebra. Finalmente las células fueron cubiertas con medio de montaje y cubreobjetos para su conservación y posterior análisis. Tanto para WJ-MSC como para HUVEC, las células marcadas fueron visualizadas usando un microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M (Carl Zeiss).

4.2.10 Generación de partículas lentivirales shNEO-1

La generación de las partículas lentivirales usadas para la transducción estable y silenciamiento de Neogenina-1 en HUVEC se llevó a cabo en células empaquetadoras HEK293T. Para ello, se sembraron 1,5E6 células en DMEM con 10% de suero sin antibióticos en placas de cultivo de 10 cm de diámetro tratadas previamente con poli-L-Lisina (Sigma Aldrich). Luego fueron co-transfectaron usando CaCl₂ con los plásmidos VSVG (7µg), CMVΔ8.91 (13µg) y PGIPZ (13µg). Este último contiene la secuencia *target* shNEO-1 o shSCR en el caso control, además de la expresión reportera de la proteína TurboGFP. A las 48 horas se recolectó el medio de las células transfectadas, el cual contenía las partículas virales. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 500 xg por 5 minutos a 4°C, pasados a través de un filtro de 0,4 µm y congelados a -80 ° C hasta su posterior uso. Un esquema resumen se puede observar en la figura 5.

4.2.11 Silenciamiento de Neogenina-1 en HUVEC y generación de cultivos establemente transducidos mediante selección por puromicina

Para la generación de un cultivo celular HUVEC estable *knock-down* (*kd*) para Neogenina-1, se agregaron 1,5 mL de sobrenadante viral junto con 1,5 mL de EGM-2 a

150.000 células en suspensión en pasaje uno, las cuales fueron cultivadas en placas de 6 pocillos. 48 horas después de la infección, las células fueron observadas al microscopio para corroborar la presencia de células GFP positivas. Las células transducidas fueron seleccionadas con puromicina en EGM-2 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siguiendo un protocolo desarrollado en el laboratorio y esquematizado en la figura 5.

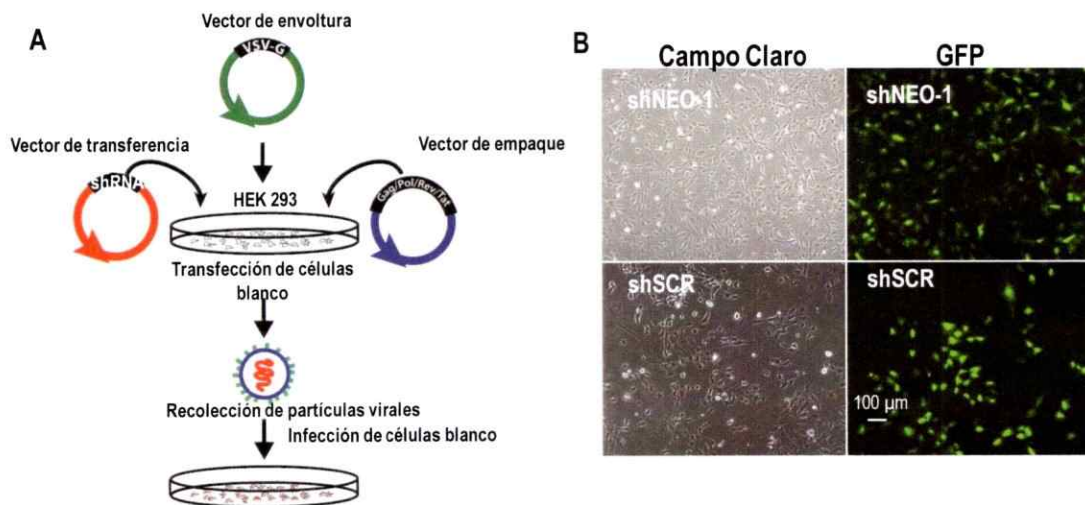


Figura 5. Obtención de partículas lentivirales shNEO-1. **A** El proceso de producir lentivirus infeccioso transgénico, se resume en el esquema. Tres plásmidos son transfectados en la línea celular HEK293: un vector de transferencia que codifica para el shNEO-1 o shSCR (control), un vector de empaque y un vector que codifica para proteínas de la cápside. Luego del cambio de medio y un breve período de incubación, el sobrenadante con el virus es recuperado, filtrado y almacenado a -80°C hasta su posterior uso. **B** Se muestran células HUVEC transducidas con shSCR y shNEO-1, las células están transducidas ya que presentan marca GFP. No se observan diferencias morfológicas entre las células control y aquellas *kd* para Neogenina-1.

4.2.12 Ensayo de migración *scratch*

La migración celular fue evaluada usando el ensayo de *scratch* (también conocido como *wound healing assay*). Para ello HUVEC en pasajes tempranos (2 a 6), fueron sembrados en placas de 24 pocillos (150.000 células por pocillo) en EGM-2 hasta alcanzar la confluencia en un período de 12 horas. Posteriormente se realizó con una punta de pipeta, una bifurcación en la monocapa celular a lo largo de cada pocillo, creando una “raya” o herida abierta libre de células. Las células desplazadas fueron removidas lavando con PBS 1X. El medio EGM-2 fue reemplazado por los medios

condicionados de WJ-MSC o ligandos Netrina-1 y RGMa recombinantes según el caso correspondiente. La migración hacia el área de la herida fue documentada mediante fotografías tomadas en microscopio Leica MZ 12 con cámara digital AxioVision incorporada, con un aumento de 10X a las 0, 3 y 8 horas post-*scratch*. La cuantificación de la migración se realizó con el programa ImageJ (NIH Image). Para cada condición se obtuvieron cuadruplicados.

4.2.13 Ensayo de angiogénesis *in vitro*

Para evaluar la inducción de angiogénesis por parte de los medios condicionados de las WJ-MSC o los ligandos recombinantes de Neogenina-1, se usó el ensayo de formación de túbulos en Matrigel (BD Biosciences). Para ello, el día previo al experimento, placa de 96-pocillos, puntas de 200 μ L y Matrigel fueron mantenidas durante toda la noche a 4°C. Cabe mencionar que se utilizaron células HUVEC en pasajes tempranos previamente deprivadas de suero. Brevemente, pocillos de una placa de 96 pocillos, fueron cubiertos con Matrigel e incubadas a 37 °C durante 1 hora. Luego las células previamente resuspendidas en el medio condicionado de WJ-MSC de 48 horas, o los recombinantes RGMa/Netrina-1, fueron sembradas sobre el Matrigel ya gelificado (40.000 células por pocillo). Como control positivo se utilizó el medio EGM-2. La formación de los túbulos fue observada y fotografiada en microscopio Leica MZ 12 con cámara digital AxioVision incorporada, con un aumento de 10X luego de incubación a 37 °C en cámara húmeda con 5% de CO₂ durante 3 a 5 horas. La angiogénesis fue cuantificada contando el número de puntos de ramificación en cada pocillo, considerando un punto de ramificación como la intersección entre dos o más extensiones. Para cada condición se obtuvieron cuadruplicados.

4.2.14 Citometría de flujo

Para la detección de antígenos de superficie (RGMa, CD31), las células fueron despegadas mecánicamente utilizando *cell scraper* e incubadas con el anticuerpo

primario por 20 minutos en un volumen final de 100 μ l. Luego de lo cual, fueron lavadas 3 veces con buffer tinción (PBS 1% SFB) e incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo en un volumen final de 100 μ l. Para la detección de los antígenos intracelulares (Neogenina-1, Netrina-1, Netrina-4), las células fueron despegadas incubándolas 5 minutos con tripsina 1X y tratadas con el kit *BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization* (BD Bioscience). Brevemente, las células fueron incubadas con 250 μ l de la solución de Fijación/Permeabilización y fueron lavadas dos veces con el buffer *Perm/Wash*. A continuación, se incubaron con la solución de anticuerpo primario diluido en buffer *Perm/Wash* durante 30 minutos, luego de dos lavados con este mismo buffer, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo. Finalmente, las células fueron fijadas en PFA 1% y posteriormente pasadas en el equipo FACSCalibur (BD Biosciences). Los análisis se realizaron usando el software FlowJo.

4.2.15 Análisis estadístico.

Para comparar la significancia entre las diferencias de los grupos estudiados se usó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey para variables no paramétricas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$. El análisis de la relación entre las variables se realizó con el software Graph Pad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la expresión de Netrina-1, Netrina-4 y RGMa en WJ-MSC tanto en normoxia como en hipoxia, así como de Neogenina-1 y DCC en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano.

5.1.1 WJ-MSC expresan factores angiogénicos no clásicos (Netrina-4, Netrina-1)

El primer objetivo de este estudio, consistió en determinar la expresión de factores angiogénicos no clásicos, principalmente Netrinas, en células mesenquimáticas presentes en la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Esto fue evaluado tanto en cortes de cordón umbilical mediante tinción inmunohistoquímica como en cultivos celulares mediante RT-PCR, citometría de flujo y Western blot. Como se observa en la figura 6, se detectó la presencia de Netrina-1, Netrina-4 y RGMa en secciones transversales de cordón umbilical de 12 μm de espesor.

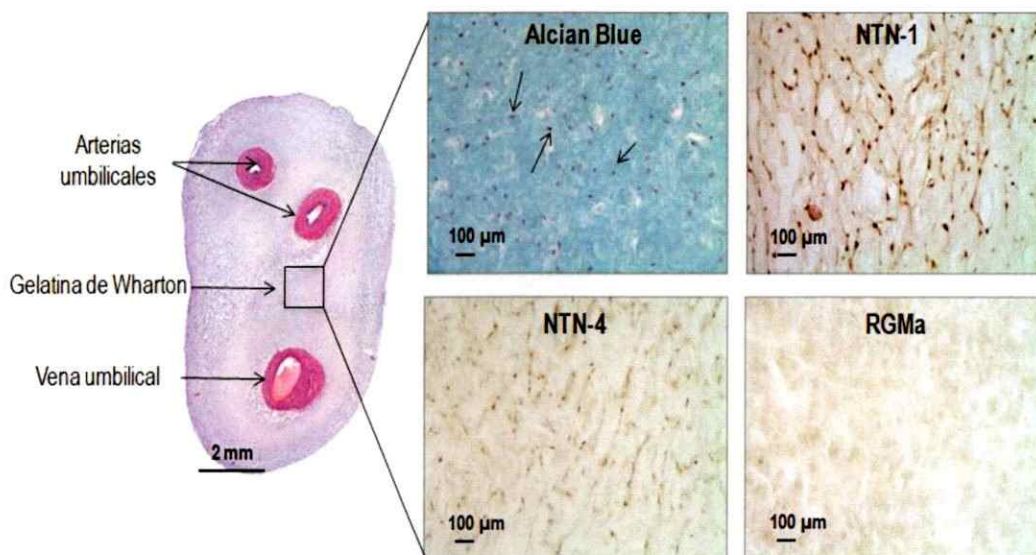


Figura 6. Los ligandos de Neogenina-1, Netrina-1, Netrina-4 y RGMa, son detectados en la gelatina de Wharton en cortes de cordón umbilical. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunohistoquímicas donde se revela la expresión de los ligandos de Neogenina-1, Netrina 1, Netrina 4 y RGMa. Además se muestra tinción con el colorante Alcian Blue, afín por proteoglicanos; los núcleos se indican con flechas. NTN-1 (Netrina-1); NTN-4 (Netrina- 4); RGMa (Molécula de acción repulsiva).

Posteriormente, se determinó la expresión de los ligandos anteriormente mencionados en cultivos primarios de WJ-MSc, previamente caracterizadas en nuestro laboratorio (tesis de pregrado de Ingeniería en Biotecnología de Samuel Martínez, 2012). Se midió a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR y a nivel proteico mediante Western Blot (WB), citometría de flujo e inmunofluorescencia (IF). De manera concordante con el resultado anterior, observamos que WJ-MSc expresan Netrina-1, Netrina-4 y RGMa (figura 7). En el caso de la citometría de flujo, Netrina-1 y Netrina-4 fueron evaluados a nivel intracelular y esta expresión fue homogénea en el cultivo celular. En el caso de RGMa, cuando se evaluó a nivel extracelular (figura 7C) se observaron dos poblaciones celulares, una de las cuales no presentaba RGMa en la membrana y otra menor que sí lo hacía. Sin embargo, a nivel intracelular se vio una expresión homogénea en todas las células (figura suplementaria 4).

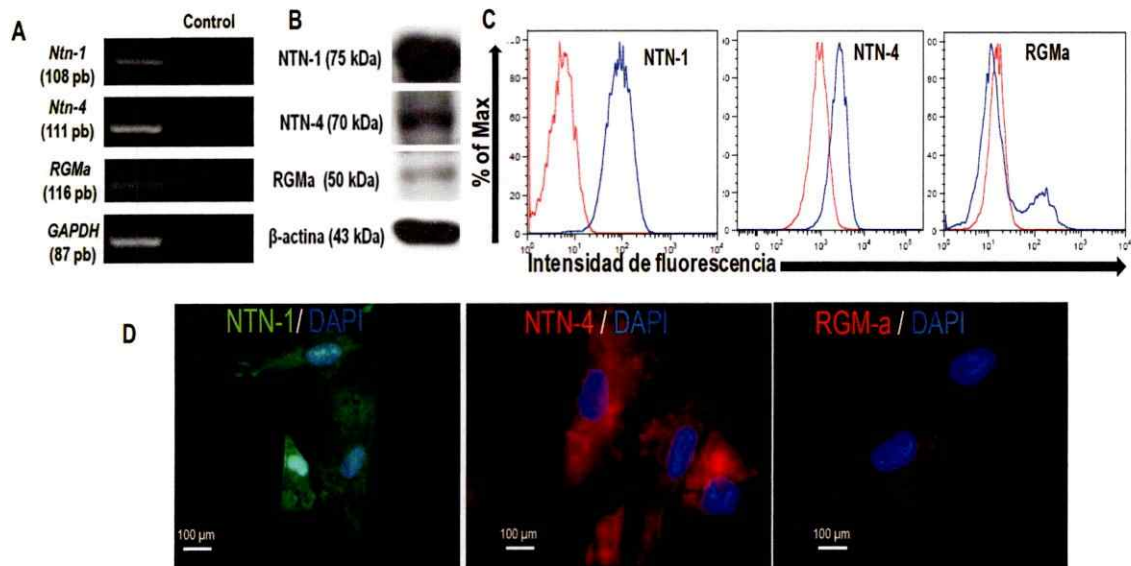


Figura 7. WJ-MSc expresan los ligandos de Neogenina-1. La expresión de ligandos de Neogenina-1 en cultivos primarios de WJ-MSc fue confirmada mediante diversas técnicas experimentales. **A** Se muestra el nivel transcripcional de *Netrina-1*, *Netrina-4* y *RGMa*. Como control de carga se utilizó *GAPDH*. **B** Western Blot de las proteínas Netrina-1, Netrina-4 y RGMa. Se usó como control de carga β -actina. **C** Citometría de flujo donde el histograma azul representa la condición con anticuerpo mientras que el rojo muestra el control sin primario. Para RGMa las células fueron cosechadas usando rastrillo, manteniendo la integridad de las moléculas de superficie. Para Netrina-1 y 4, las células fueron cosechadas enzimáticamente. **D** Imágenes representativas de IF de cultivos primarios de WJ-MSc para los ligandos de Neogenina-1. La contra-tinción con DAPI permite identificar los núcleos celulares.

5.1.2 La presencia de Netrina-1 es mayor en el medio condicionado de WJ-MSC cultivadas en hipoxia en comparación con normoxia

Es sabido que la expresión de factores angiogénicos clásicos tales como VEGF, es inducida en situaciones de hipoxia. Por dicha razón, consideramos importante estudiar la inducción de Netrinas y RGMA en condiciones de hipoxia, esto es, concentraciones de oxígeno al 2%. *Netrina-1* aumento su expresión a nivel de mRNA en condiciones hipóxicas(ver figura suplementaria 5). Sin embargo, como se aprecia en la figura 8A, a nivel de proteína, evaluado mediante Western Blot, no se observó una diferencia en los niveles de *Netrina-1*, *Netrina-4* o RGMA en los lisados totales de WJ-MSC sometidas a hipoxia durante 48 horas con respecto al control normoxia, como sí se observó en la expresión del factor angiogénico clásico, VEGF, el cual se ve aumentado en hipoxia. Este resultado fue confirmado con una técnica más sensible como lo es la citometría de flujo (8B) donde tampoco se observaron cambios entre una condición y otra. A modo de control de la técnica, utilizamos células de la línea tumoral Caco-2 que muestran un aumento en la expresión de *Netrina-1* cuando son sometidas a hipoxia, tal como está documentado en la literatura (Rosenberger y col, 2009). Para corroborar que las células efectivamente estaban respondiendo a la baja concentración de oxígeno, se evaluó mediante WB la inducción del factor de transcripción HIF-1 α a las 6 horas de tratamiento con hipoxia (8A). Además del extracto celular, se evaluó mediante WB el medio condicionado por 48 horas de las células cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia (figura suplementaria 6B). Si bien no se obtuvo un aumento en la expresión de *Netrina-1* en el lisado total en condiciones de hipoxia (ver cuantificación en figura suplementaria 6A), interesantemente sí hubo un aumento de esta proteína en el medio condicionado de WJ-MSC en condiciones de oxígeno del 2%, con respecto al 21% de oxígeno como se muestra en la figura 8C.

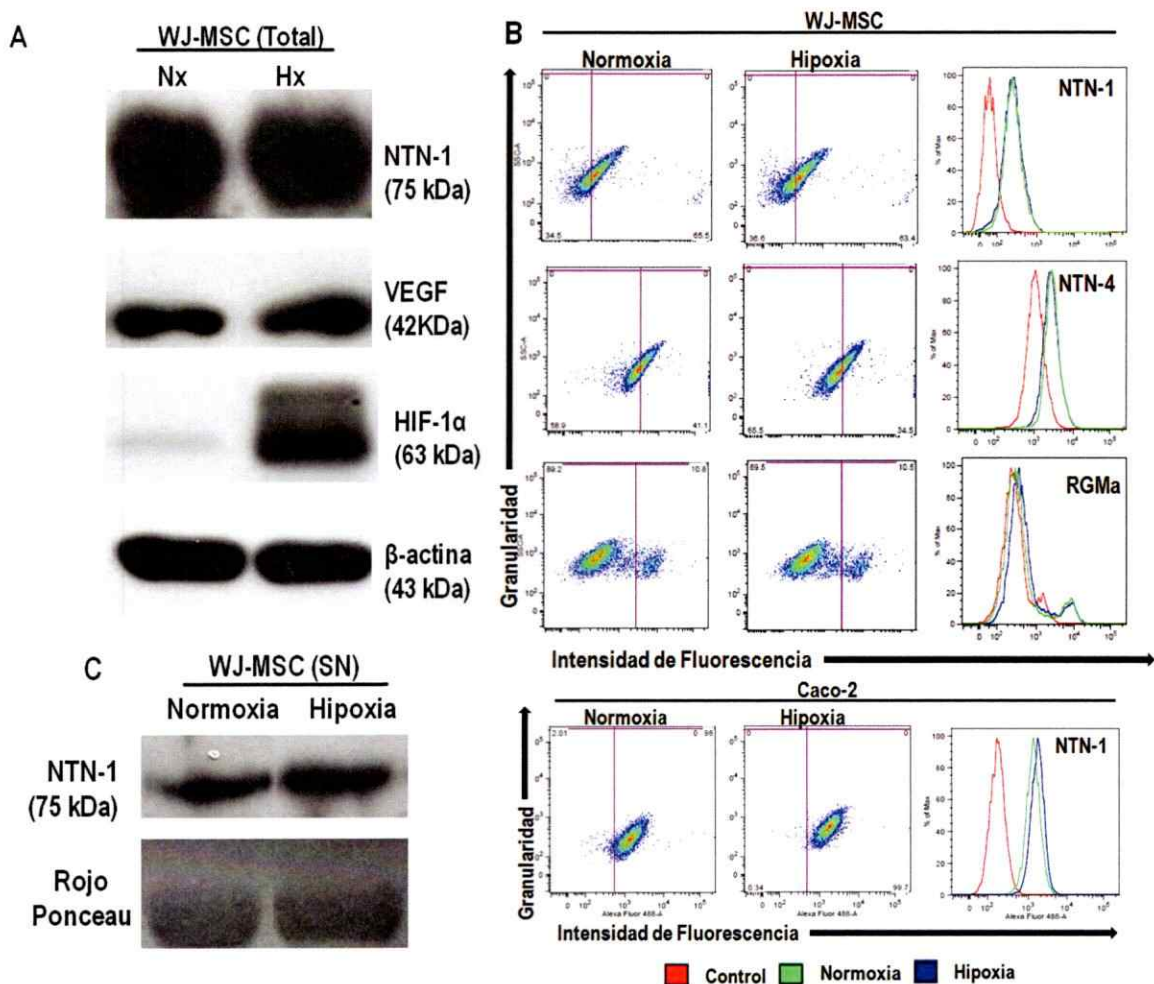


Figura 8. En condiciones hipóxicas hay mayor presencia de Neutrina-1 en el medio condicionado de WJ-MSC. **A** Se evaluó la expresión de ligandos de Neogenina-1, Neutrina-1, Neutrina-4 y RGMa, así como VEGF y el factor de transcripción HIF-1 α en normoxia e hipoxia mediante Western Blot. Como control de carga se utilizó β -actina. Todas las proteínas fueron evaluadas 48 horas luego del inicio del experimento, excepto HIF-1 α , el cual fue medido a las 6 horas. **B** El resultado anterior fue confirmado mediante citometría de flujo. Se muestran los *density plots* representativos para ambas condiciones-normoxia e hipoxia- así como los histogramas correspondientes. Como control de la técnica se utilizaron células de la línea Caco-2. **C** Western Blot de Neutrina-1 en medios condicionados de WJ-MSC (libres de suero) tratadas en normoxia e hipoxia en duplicado. Como control de carga se utilizó la tinción con rojo Ponceau. SN, sobrenadante.

5.1.3 Células endoteliales de la vena de cordón umbilical (HUVEC) expresan el receptor canónico de Netrinas Neogenina-1 pero no DCC, así como también la subunidad β_1 del receptor no canónico $\alpha_3\beta_1$

Lo siguiente fue evaluar la expresión de los receptores conocidos de Netrinas, Neogenina-1 y DCC en células HUVEC tanto en cortes de cordón umbilical mediante IHQ como en cultivos celulares primarios. Como se observa en la figura 9, Neogenina-1, pero no DCC, fue detectada en las células que recubren la vena de cordón umbilical.

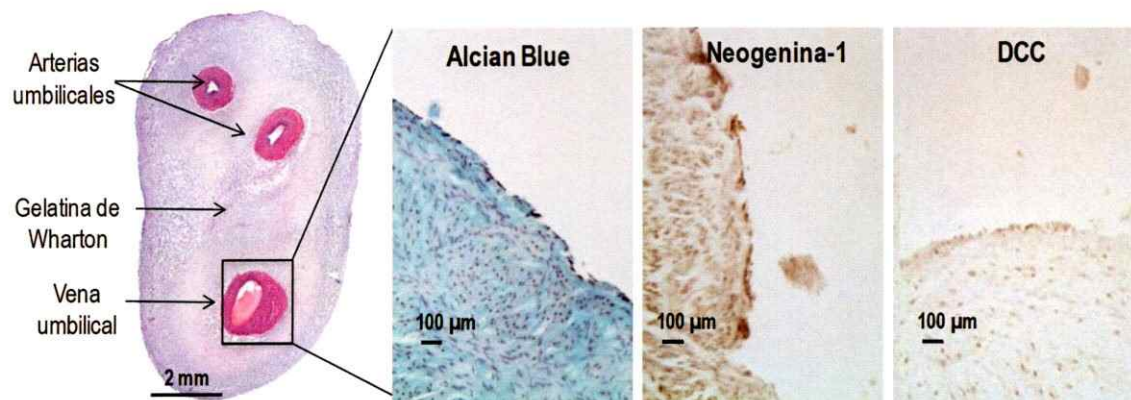


Figura 9. Neogenina-1 pero no así DCC es detectada en el endotelio de cordón umbilical humano. Se muestran imágenes representativas de tinciones inmunohistoquímicas de la zona de la vena del cordón umbilical. Se observa Neogenina-1 presente en células endoteliales revistiendo la vena umbilical. Sin embargo, DCC no es detectada.

Una vez evaluada la expresión en cortes de cordón, se evaluó la expresión de Neogenina-1, en cultivos primarios de HUVEC a nivel de RNA mensajero, mediante RT-PCR y a nivel de proteína mediante WB, citometría de flujo e inmunofluorescencia, corroborando lo observado anteriormente mediante IHQ (figura 10A, B, C y D).

También se estudió la expresión del homólogo de Neogenina-1, DCC, el cual no fue detectado mediante WB (figura 10E). Además, se estudió la expresión de una de las subunidades de la integrina $\alpha_3\beta_1$, la que ha sido descrita como uno de los receptores no canónicos de ciertas Netrinas, específicamente, se ha demostrado que media los efectos pro-angiogénicos de Netrina-4 en el contexto de linfo-angiogénesis (Larrieu y col,

2011). A modo de control de pureza de los cultivos, se midió en los cultivos primarios de HUVEC el marcador de células endoteliales CD31. Como se aprecia en la figura 10F y 10G, el 100% del cultivo expresa la subunidad β_1 (CD29) y corresponden a células endoteliales, dado que expresan CD31.

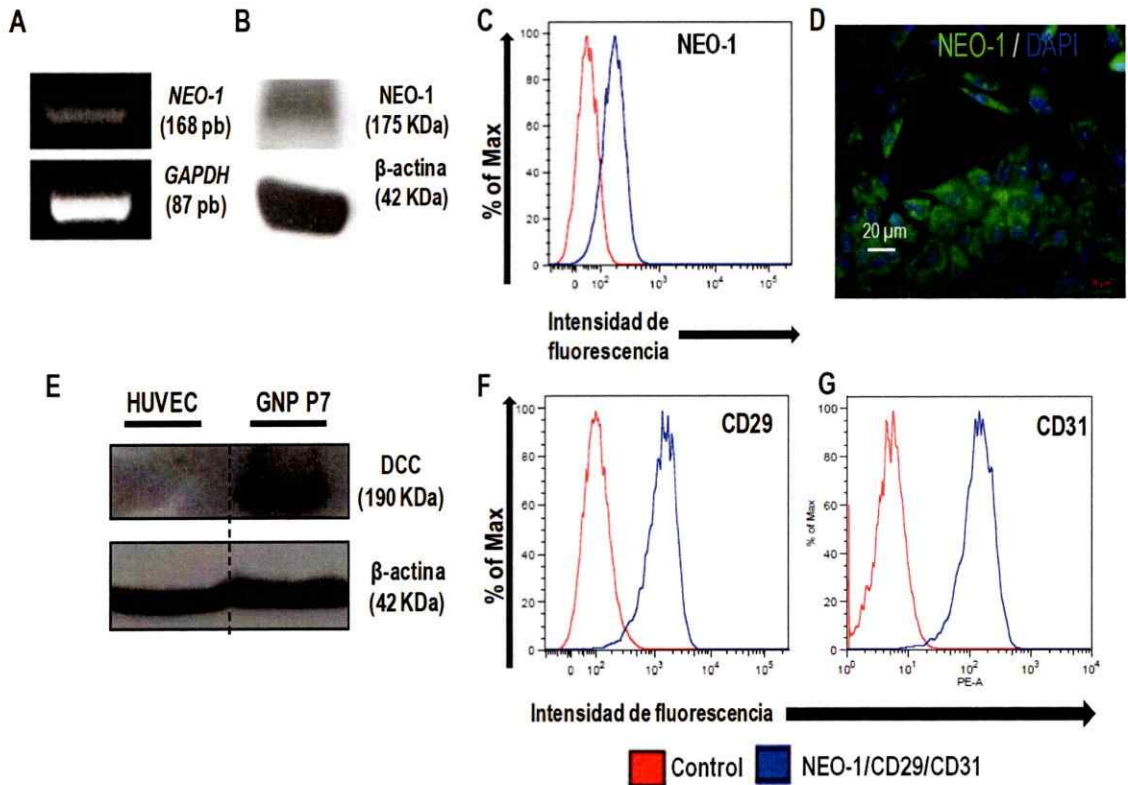


Figura 10. Células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano (HUVEC) expresan los receptores de Netrin, Neogenina-1 y la subunidad de integrinas β_1 , pero no así a DCC. **A** Se muestra el nivel transcripcional del gen *Neogenina-1*. Como control de carga se utilizó *GAPDH*. **B** Western Blot que muestra la expresión de la proteína Neogenina-1. Se usó como control de carga β -actina. **C** Citometría de flujo para Neogenina-1 confirmando el resultado obtenido mediante Western Blot. **D** Inmunofluorescencia para Neogenina-1 la cual muestra una distribución punteada y homogénea de la proteína (visualizada en verde), acompañada de contra-tinción DAPI (en azul) para la identificación de los núcleos celulares. **E** WB para DCC en HUVEC. Como control positivo de DCC se usaron células neuronales granulares precursoras (GNP) de ratón en día postnatal 7 (P7) y como control de carga β -actina. **F** Citometría de flujo para CD29, una de las subunidades de la integrina $\alpha_3\beta_1$. **G** Como control para el aislamiento de HUVEC se evaluó por citometría de flujo el marcador de células endoteliales CD31. NEO-1, Neogenina-1; DCC, *Deleted in colorectal cancer*.

5.2 Estudio del efecto angiogénico de medio condicionado de WJ-MSC y los ligandos de Neogenina-1, RGMa y Netrina-1, mediante ensayos de migración y formación de túbulos en células endoteliales HUVEC

Una vez caracterizado el modelo de estudio, esto es, WJ-MSC y HUVEC, lo siguiente fue evaluar la capacidad de los medios condicionados de WJ-MSC de inducir procesos angiogénicos en HUVEC tales como la migración celular mediante el ensayo de *wound healing* o cierre de la herida, y la angiogénesis *in vitro* a través del ensayo de formación de túbulos en matrices (tales como colágeno o matrigel). Cabe mencionar, que todos estos experimentos, fueron realizados con medios condicionados obtenidos en condiciones libre de suero, ya que es sabido que éste contiene gran cantidad de proteínas que pueden enmascarar el efecto de aquellas secretadas por WJ-MSC. Además, se demostró que el suero utilizado en el crecimiento de las células, contiene gran cantidad de Netrinas, tanto la 1 como la 4, incluso aquel suero que ha sido inactivado por calor (figura 11).

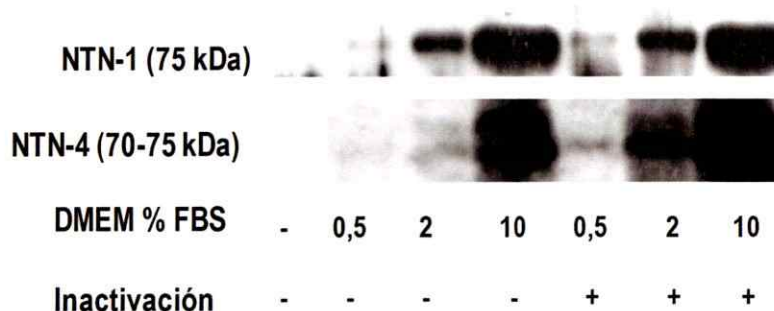


Figura 11. Netrina-1 y Netrina-4 están presentes en el medio de crecimiento de WJ-MSC. En cada carril se muestra la expresión de Netrina-1 y Netrina-4 presente en el medio de cultivo DMEM con concentraciones crecientes de suero fetal bovino (inactivado y sin inactivar) en un gel poliacrilamida-SDS al 12%.

5.2.1. El medio condicionado de WJ-MSC induce la migración de células endoteliales

En primer lugar, se evaluó la capacidad de medios condicionados por 48 horas de WJ-MSC de inducir la migración de células endoteliales usando el ensayo de *wound healing*. Se tomaron fotografías a las 0, 3, 8 y 24 horas de realizada la herida. En la figura 12A, se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones

evaluadas a las 8 y 24 horas, esto es, medio condicionado, control, correspondiente a DMEM solo y control positivo, en este caso VEGF (40 ng/mL). En 12B, se muestra la cuantificación de las condiciones anteriormente mencionadas, donde se graficó el área a las 8 y a las 24 horas, normalizada con respecto al área de la herida en el tiempo cero. A las 8 horas ya existe una diferencia significativa en cuanto al área de la herida de aquellas células tratadas con el medio condicionado, con respecto al control. Esto estaría dando cuenta del efecto angiogénico paracrino de las WJ-MSC sobre las células endoteliales, en este caso HUVEC. Este hecho, se hace aún más evidente a las 24 horas donde en la condición medio condicionado existe un cierre casi total de la herida, al igual que para el control positivo correspondiente a VEGF, mientras que el control no existe mayor variación con respecto al área al tiempo cero.

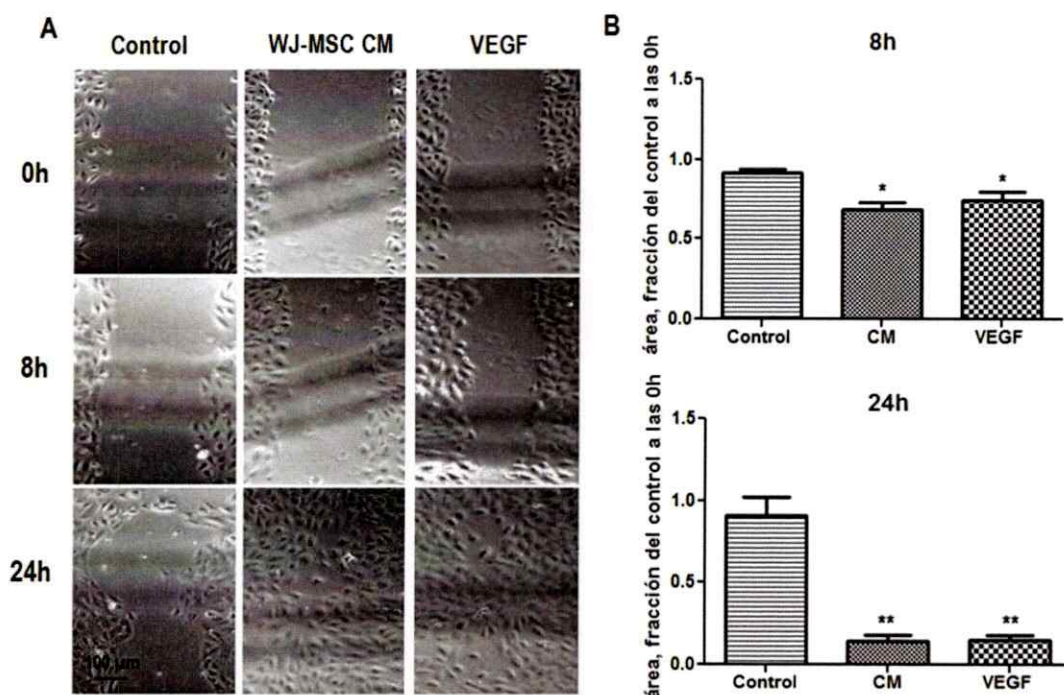


Figura 12. El medio condicionado (CM) de WJ-MSC promueve la migración de células endoteliales *in vitro*. El efecto paracrino de WJ-MSC fue evaluado mediante un ensayo de *scratch* utilizando el medio condicionado (de 48 horas de cultivo) en células endoteliales HUVEC. VEGF (40 ng/mL) fue usado como control positivo mientras que el control corresponde a medio DMEM solo. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición a las 0, 8 y 24 horas. **B** Cuantificación de las imágenes mostradas en **A** indicando diferencias significativas respecto al control. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; $n=4$).

Además de estudiar el efecto del medio condicionado de células WJ crecidas al 20% de oxígeno y dado que anteriormente obtuvimos que Netrina-1 aumentaba en el medio condicionado en hipoxia, probamos si la exposición de las WJ-MSC a condiciones de oxígeno al 2%, podía aumentar su capacidad paracrina en la inducción de la migración de las células endoteliales. Se encontró que las células HUVEC presentaron una leve mayor movilidad celular cuando se administró el sobrenadante proveniente de WJ-MSC expuestas a hipoxia, versus aquellas cultivadas en condiciones de normoxia (figura 13), aunque estas diferencias no resultaron ser significativas. Cabe mencionar que existe una variabilidad inherente al hecho que se trabaja con cultivos primarios. En el experimento anterior, transcurridas 24 horas, las células aún estaban en buenas condiciones y seguían migrando. En este experimento utilizamos células HUVEC provenientes de un cordón distinto del anterior, y a las 24 horas, las células estaban muy estresadas y entrando en apoptosis, incluso con el control positivo VEGF. Hay que resaltar el hecho además de que todos estos experimentos son realizados sin suero, y si bien algunos tipos celulares, entre ellos WJ-MSC resisten esta condición por períodos prolongados, no sucede lo mismo con las HUVEC, las cuales necesitan suero para sobrevivir (Raymond y col, 2004).

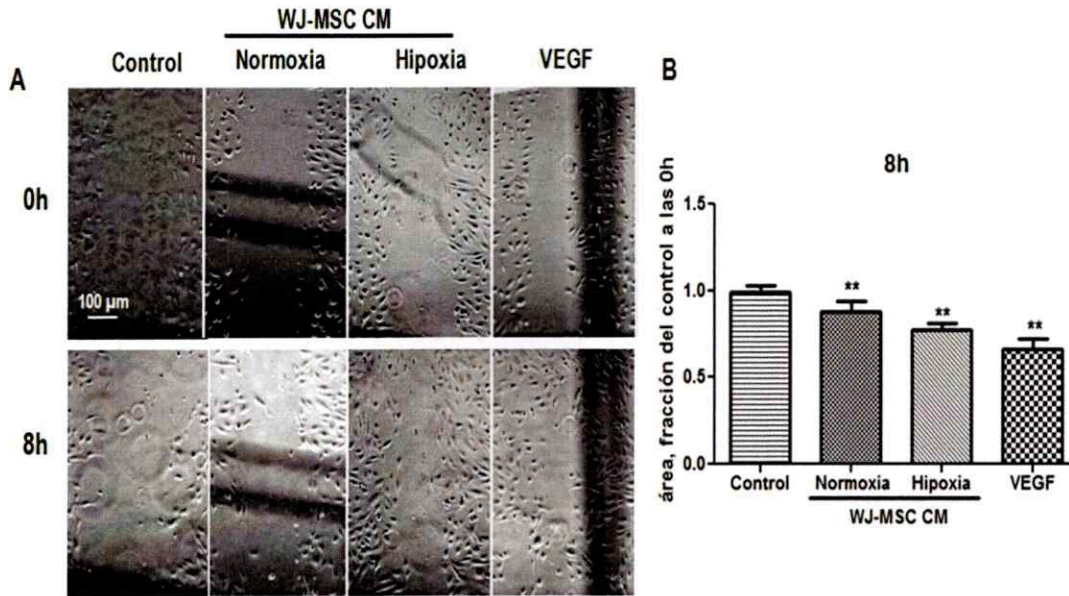


Figura 13. El medio condicionado (CM) de WJ-MSC cultivadas en hipoxia promueve la migración de células endoteliales *in vitro* de manera similar a aquellas cultivadas en normoxia. Se comparó el efecto del medio condicionado de WJ-MSC cultivadas en normoxia y en hipoxia (durante 48 horas) mediante un ensayo de *scratch* en células endoteliales. VEGF (40ng/mL) fue usado como control positivo, mientras que el control corresponde a medio DMEM solo. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición a las 0 y 8 horas. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A indicando diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n=4$).

Una vez evaluado lo anterior, y dado que quedó demostrado que células WJ-MSC producen además de factores angiogénicos clásicos, factores angiogénicos no clásicos, específicamente las Netrinas, se estudió la capacidad de Netrina-1 de inducir la migración de HUVEC a distintas concentraciones, utilizando el mismo ensayo anteriormente descrito.

5.2.2 Netrina-1 pero no RGMa induce la migración de células endoteliales HUVEC

Como se muestra en la figura 14, si bien en todas las concentraciones estudiadas, se redujo considerablemente el área de la herida en un tiempo de 8 horas, sólo se obtuvieron diferencias significativas a las concentraciones más bajas de ligando, esto es, a 10 y 100 ng/mL cuando fue comparado con la situación control. Cabe mencionar que la estimulación con Netrina-1 indujo la migración de HUVEC (59,6 % con 100 ng/mL de Netrina-1) de manera similar a VEGF (60% en presencia de 40 ng/mL de VEGF)

comparado con aquellas células incubadas en ausencia de factores de crecimiento (86% en el caso del control). Los resultados obtenidos en este experimento, son concordantes con otros trabajos donde muestran el efecto pro-angiogénico de Netrina-1 (Wilson y col, 2006; Park y col, 2004).

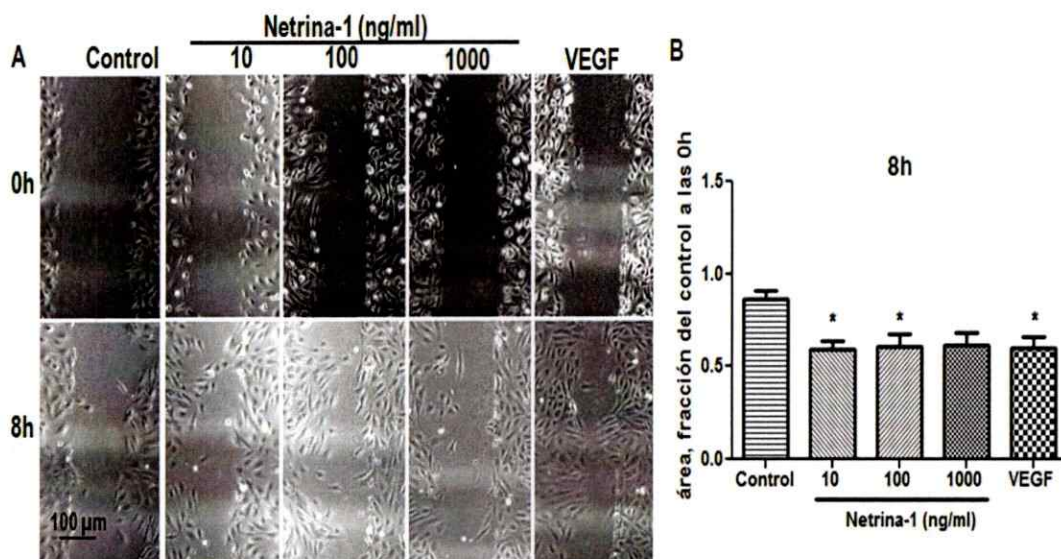


Figura 14. Netrina-1 induce la migración de células endoteliales *in vitro*. Se muestra el efecto de Netrina-1 a diferentes concentraciones (10-1000 ng/ml) sobre la migración de HUVEC mediante un ensayo de *scratch*. VEGF (40ng/mL) fue usado como control positivo, mientras que el control corresponde a medio EBM solo. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental al inicio del experimento y a las 8 horas después. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A indicando diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$; $n=4$)

Si bien las Netrinas son los ligandos de Neogenina-1 más estudiados en contextos angiogénicos, nos pareció interesante investigar el efecto de otro de los ligandos de este receptor como es RGMa, en la inducción de la migración de estas células endoteliales. Esta glicoproteína de tipo repulsiva, no tiene una homología significativa con otras moléculas de guía axonal y su afinidad por Neogenina-1 es alrededor de 10 veces mayor que la de Netrinas (Wilson y Key, 2007). Si bien ha sido ampliamente estudiada en contextos de sistema nervioso, no hay información en la literatura acerca de una función en el contexto de la angiogénesis.

Del mismo modo que para Netrina-1, se realizó un ensayo de *wound healing*, con concentraciones crecientes de RGMa. Sin embargo, a diferencia de lo obtenido con Netrina-1, no se observó una inducción en la migración de células endoteliales a ninguna de las concentraciones de RGMa estudiadas, con respecto al control.

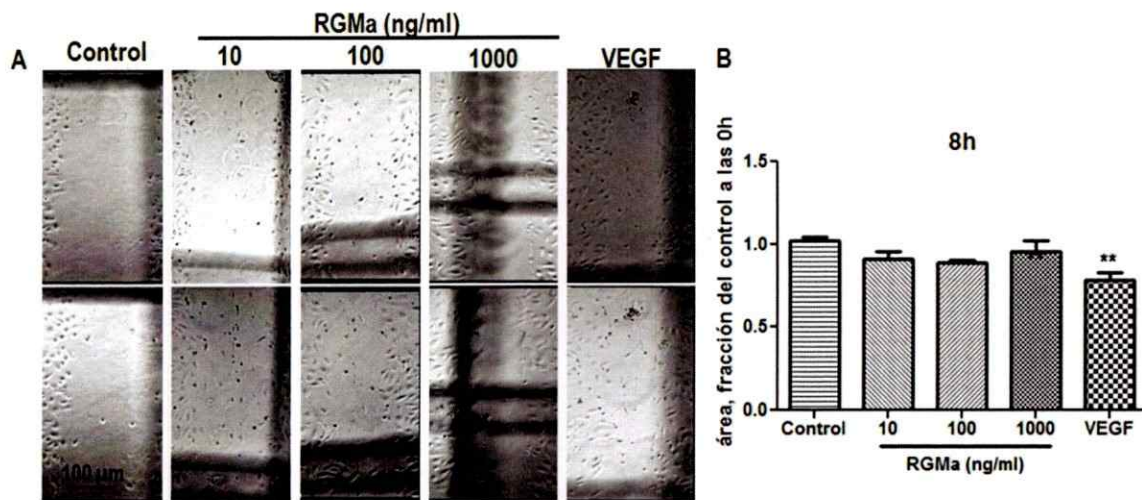


Figura 15. RGMa, a diferencia de Netrina-1, no tiene efectos sobre la migración de células endoteliales. Para determinar el efecto del ligando de neogenina-1, RGMa sobre la migración de HUVEC, se realizó un ensayo de *scratch* donde las células fueron tratadas durante 8 horas en medio libre de suero con diferentes concentraciones de RGMa como se indica. VEGF (40ng/mL) fue usado como control positivo, mientras que el control corresponde a medio EBM solo. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición a las 0 y 8 horas después de realizar la herida. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A indicando que solo VEGF presenta diferencias significativas respecto al control (** $p < 0,01$; $n=4$).

5.2.3 El medio condicionado de WJ-MSC promueve la formación de túbulos en células endoteliales.

Como método alternativo para estudiar la capacidad angiogénica del medio condicionado de WJ-MSC, se utilizó el ensayo de formación de túbulos en dos dimensiones, el que permite observar la organización de células endoteliales en una estructura tubular, semejante a un vaso sanguíneo, en respuesta a diferentes estímulos. Del mismo modo que en experimentos de *wound healing*, se estudió el efecto del medio condicionado de WJ-MSC a las 48 horas en ausencia de suero sobre la formación de túbulos en células endoteliales (HUVEC). Obtuvimos que estos medios condicionados

de 48 horas indujeron la formación de túbulos de HUVEC sembradas en Matrigel de manera significativamente mayor que el control (DMEM solo), en un período de aproximadamente tres horas. Este efecto, se puede ver en la figura 16A donde se muestran imágenes representativas de cada condición. Como control positivo del experimento se utilizó el medio de crecimiento EGM-2, el cual además de contener suero al 2%, contiene factores angiogénicos comunes tales como EGF, FGF-b y VEGF.

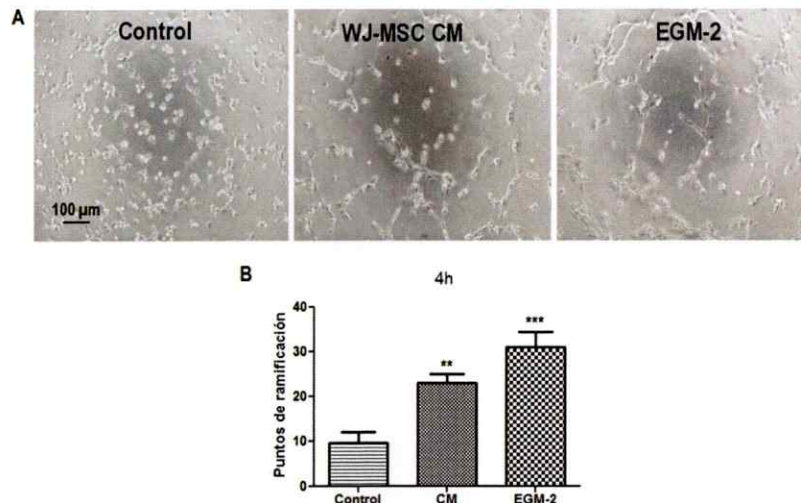


Figura 16. El medio condicionado de WJ-MSC promueve la angiogénesis *in vitro*. El efecto del medio condicionado de WJ-MSC fue determinado usando un ensayo de formación de túbulos. HUVEC fueron sembradas en Matrigel en presencia del medio condicionado de WJ-MSC (WJ-MSC CM) durante 4 horas. Como control positivo se utilizó medio endotelial EGM-2 rico en factores angiogénicos. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A indicando diferencias significativas respecto al control. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; $n=4$).

5.2.4 *Netrina-1* y *RGMa* inducen angiogénesis *in vitro* en procesos angiogénicos en células endoteliales.

A continuación se estudió el efecto de los ligandos *RGMa* y *Netrina-1* en la angiogénesis *in vitro* en células endoteliales, utilizando el ensayo de formación de túbulos. Se estudiaron concentraciones crecientes de ambos ligandos. En el caso de *Netrina-1*, como se observa en la figura 17, y concordante con los resultados obtenidos en el ensayo de migración, la angiogénesis se indujo de una manera dosis dependiente. A dosis más bajas el efecto angiogénico de *Netrina-1* es mayor que a dosis altas, como

se muestra en la cuantificación en la figura 17B. En el caso de RGMa, como se muestra en la figura 18 y de manera inesperada, obtuvimos que esta proteína recombinante, también tenía un efecto pro-angiogénico sobre células endoteliales, pero a diferencia de Netrina-1, el efecto sólo fue significativo a las dosis más altas, a 100 y 1000 ng/ml. Dado que el único receptor conocido de RGMa es Neogenina-1, este hallazgo confirma la presencia de este receptor en las HUVEC.

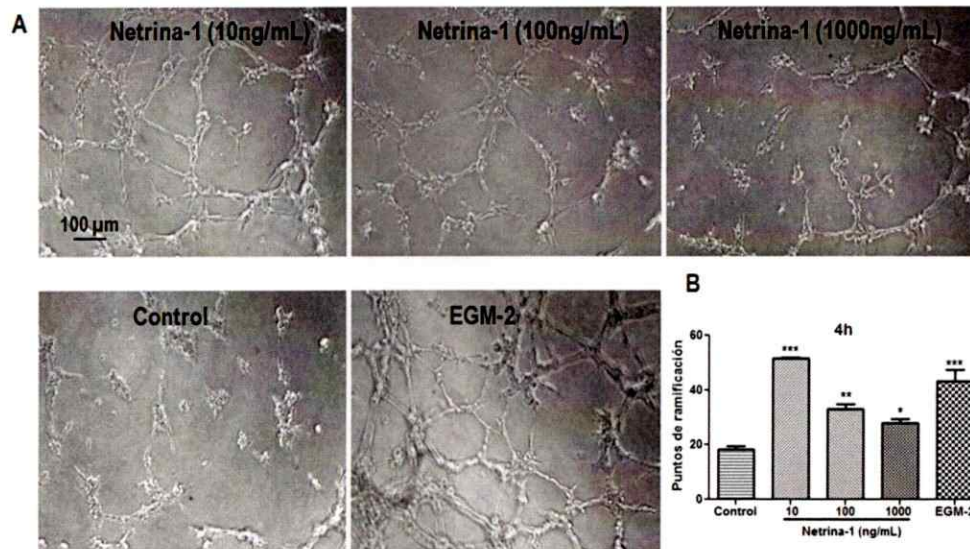


Figura 17. Netrina-1 induce la angiogénesis *in vitro*. El efecto de Netrina-1 en la angiogénesis *in vitro*, se determinó usando un ensayo de formación de túbulos. Las células fueron tratadas durante 8 horas con diferentes concentraciones de Netrina-1, como se indica en la figura, en medio libre de suero. Como control positivo se utilizó medio endotelial EGM-2 rico en factores angiogénicos. **A** Se muestran imágenes representativas de cada condición. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; $n=6$).

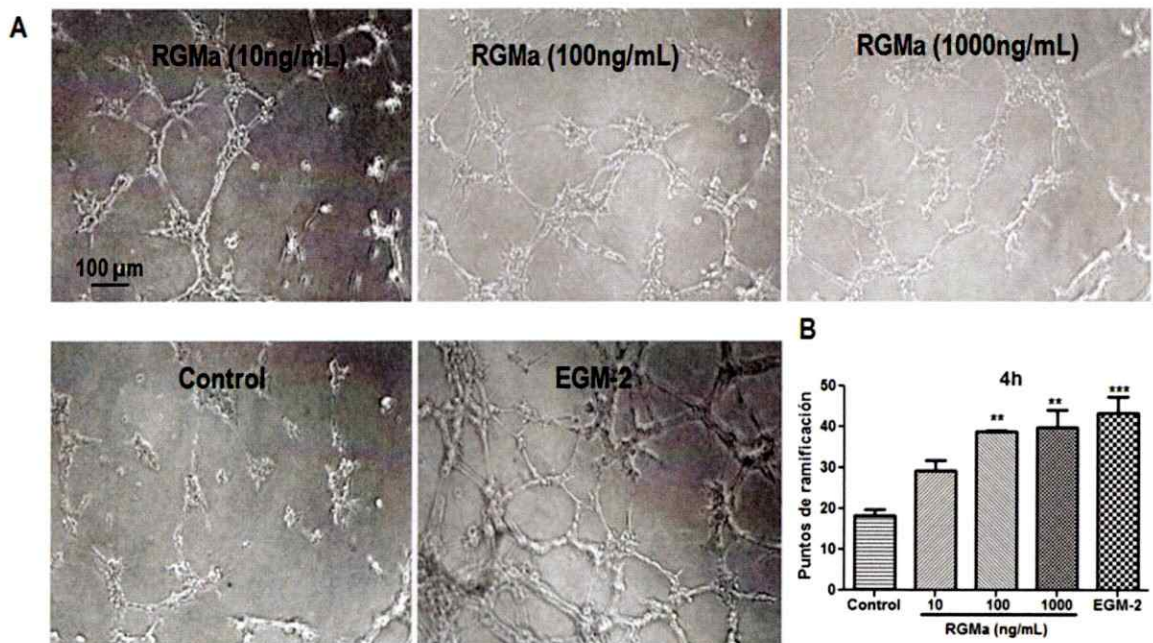


Figura 18. RGMa induce la angiogénesis *in vitro*. A El efecto de RGMa en la angiogénesis *in vitro*, se determinó usando un ensayo de formación de túbulos. Las células fueron privadas de suero por 8 horas previo al experimento y sembradas en Matrigel tratadas durante 4 horas con diferentes concentraciones de RGMa como se indica en la figura. Como control positivo se utilizó medio endotelial EGM-2 rico en factores angiogénicos. Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. B Cuantificación de los resultados mostrados en A. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$; $n=3$).

5.3 Determinar la contribución al proceso angiogénico de Neogenina-1 mediante ensayos de migración y formación de túbulos, en experimentos de pérdida de función de Neogenina-1 en HUVEC.

5.3.1 La transducción con lentivirus y posterior selección con puromicina permite silenciar de manera estable Neogenina-1 en células endoteliales.

Habiendo descartado la participación del receptor DCC en la modulación del proceso angiogénico en las HUVEC por no ser expresado por estas células, el último objetivo de este estudio, consistió en estudiar específicamente la contribución del receptor Neogenina-1 en la angiogénesis inducida de manera paracrina por WJ-MSC. La estrategia utilizada consistió en silenciar esta proteína utilizando un shRNA específico contra Neogenina-1. El protocolo con el cual se obtuvieron las partículas

lentivirales shNEO-1 y shSCR en el caso control, se ilustra en la figura 19. Cabe mencionar que el plásmido que contenía el shRNA, además de esta secuencia interferente, codificaba para la proteína fluorescente verde GFP, y para su selección un gen de resistencia a puromicina. De esta manera, fue posible evaluar la eficiencia de la transducción, contabilizando el número de células GFP⁺ y mediante la selección con puromicina, fue posible obtener un cultivo estable *kd* para NEO-1 con una eficiencia de 100% tanto para shSCR como shNEO-1 (figura 5, sección materiales y métodos).

La disminución en los niveles de Neogenina-1 en aquellas células transducidas con shNEO-1 en comparación con aquellas shSCR se verificó mediante WB (figura 19).

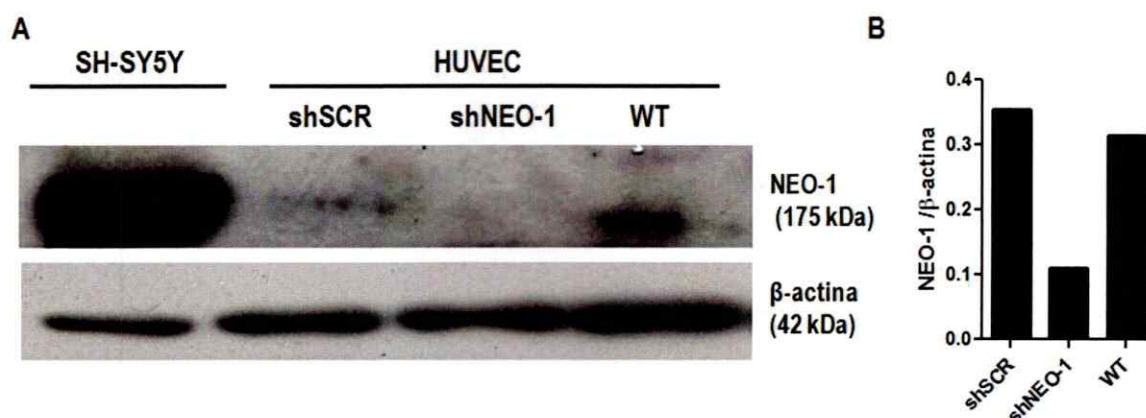


Figura 19. Generación de una línea de células endoteliales con silenciamiento estable para Neogenina-1. **A** Mediante Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-Neogenina-1, se confirmó la disminución en la expresión de la proteína en las células endoteliales NEO-1-*kd*. Como control positivo se utilizó la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual expresa altos niveles de Neogenina-1. Se muestra también β -actina como control de carga. **B** Cuantificación de lo mostrado en A por densitometría. n=1. NEO-1, Neogenina-1; WT, HUVEC sin transducir.

Para corroborar la acción del shRNA en el silenciamiento de Neogenina-1, estas partículas lentivirales fueron probadas en la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH, la cual expresa mayores niveles de Neogenina-1 que células HUVEC y en la cual se obtuvo una disminución significativa de los niveles de proteínas en células transducidas con shNEO-1 en relación a su control shSCR (figura suplementaria 8).

5.3.2 El silenciamiento de Neogenina-1 no tiene efectos significativos en la migración de células endoteliales en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC

Una vez obtenida la transducción estable de las células endoteliales con shNEO-1 y shSCR se procedió a evaluar la inducción de la migración usando medios condicionados de WJ-MSC de 48 horas libre de suero. Se observó que si bien en células NEO-1 *kd* había un leve aumento en la migración con respecto a aquellas shSCR en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC, estas diferencias no fueron significativas. Estos resultados, se muestran en la figura 20A y la cuantificación realizada para los tiempos 3 y 8 horas, en 20B.

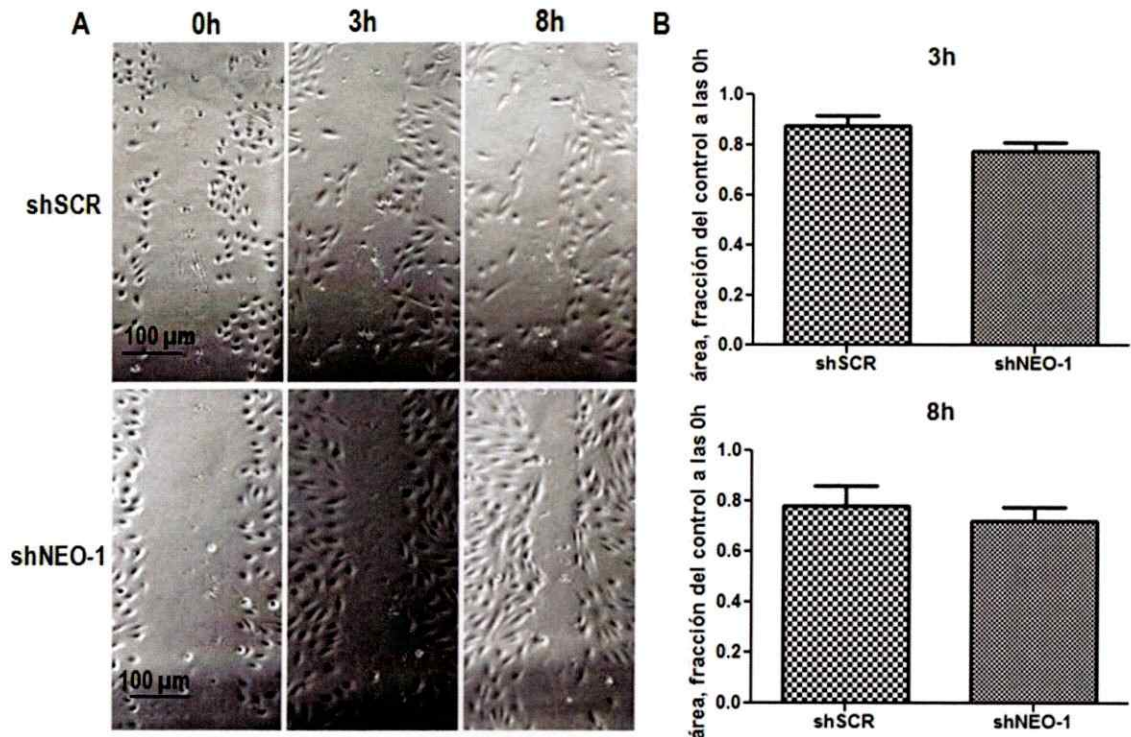


Figura 20. El silenciamiento de Neogenina-1 no tiene efectos en la migración de células endoteliales en respuesta a medios condicionados de WJ-MSC. **A** Se evaluó el rol de Neogenina-1 en la migración de HUVEC en un ensayo de *scratch* con WJ-MSC. Se muestran imágenes representativas de cada condición experimental a los tiempos indicados. **B** Cuantificación de lo mostrado en A, n=4.

5.3.3 El silenciamiento de neogenina-1 aumenta de manera significativa la capacidad de células endoteliales de formar túbulos en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC

A continuación, se evaluó en un ensayo de formación de túbulos el efecto de la disminución de Neogenina-1 en HUVEC en la angiogénesis inducida por el medio condicionado de WJ-MSC. Como se aprecia en la figura 21, se observó una diferencia significativa en el número de puntos de ramificación en aquellas células shNEO-1 con respecto a shSCR con el estímulo, específicamente, las ramificaciones. En la figura 21B se muestra la cuantificación de lo mostrado en A. Por lo tanto, la angiogénesis *in vitro* fue significativamente mayor en células shNEO-1. Esto contrasta con el resultado anterior donde no se observaron cambios en aquellas células shNEO-1 y shSCR en la migración frente al medio condicionado. Por ende se sugiere que la migración y la formación de túbulos serían procesos independientes y Neogenina-1 estaría participando activamente en modular este último aparentemente.



Figura 21. Neogenina-1 modula la angiogénesis *in vitro* inducida por WJ-MSC CM. Mediante ensayos de formación de túbulos se encontró que el silenciamiento de Neogenina-1 aumenta la formación de túbulos inducida por el medio condicionado de WJ-MSC (WJ-MSC CM). **A** Imágenes representativas de la formación de túbulos en los diferentes grupos experimentales. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A (***) $p < 0,0001$; $n = 4$).

5.3.4 El silenciamiento de Neogenina-1 aumenta de manera significativa la capacidad de células endoteliales de formar túbulos y de migrar en respuesta al ligando de Neogenina-1, Netrina-1

Dado que anteriormente observamos que frente al medio condicionado de WJ- MSC, aquellas células NEO-1-*kd*, exhiben una mayor formación de túbulos que aquellas silvestres, y dado que Netrina-1 está presente en el medio de WJ- MSC, nos pareció interesante dilucidar el comportamiento de células transducidas con shNEO-1 frente a Netrina-1 en el proceso de formación de túbulos. Obtuvimos que cuando no está presente Neogenina-1 en el sistema, las células exhiben mayor angiogénesis en respuesta a Netrina-1 (10 ng/ml) al formar significativamente mayor cantidad de túbulos (figura 22) que aquellas células control (HUVEC shSCR). Estos resultados, nuevamente confirman lo obtenido previamente, respecto a una acción moduladora de Neogenina-1 en este proceso. Referente a Netrina-1, los datos sugieren que la interacción con Neogenina-1, sería anti-angiogénica ya que disminuye su efecto inductor de angiogénesis. Es probable por tanto que Neogenina-1 participe en el proceso de manera antagonica a él o los receptores que median el efecto pro-angiogénico de Netrina-1.

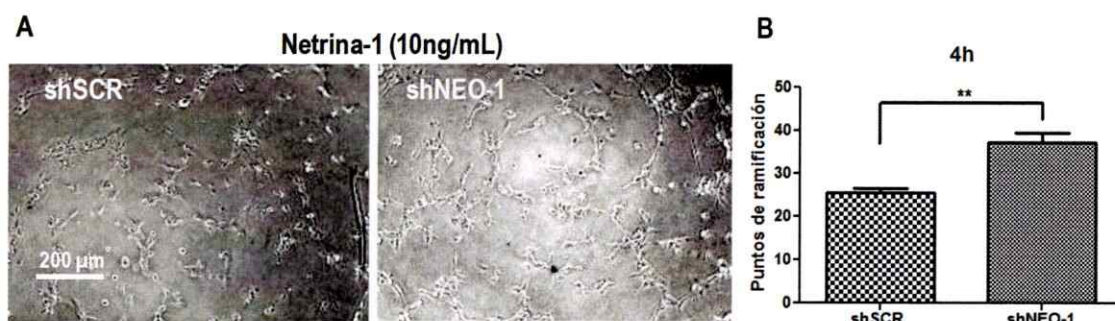


Figura 22. Neogenina-1 modula la angiogénesis *in vitro* inducida por Netrina-1. Mediante ensayos de formación de túbulos se encontró que el silenciamiento de Neogenina-1 aumenta la formación de túbulos inducida por Netrina-1. **A** Imágenes representativas de la formación de túbulos en los diferentes grupos experimentales. **B** Cuantificación de los resultados mostrados en A (** $p < 0,01$, $n=3$).

6. DISCUSIÓN

Hoy en día, la terapia basada en células madres tiene un rol importante en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades. Dentro del repertorio de posibilidades inmunoterapéuticas, se ha demostrado que las células madre tienen efectos significativos en la angiogénesis. Dado la importancia que conlleva este proceso celular, actualmente numerosos estudios están enfocados en descubrir nuevos factores angiogénicos. Entre los que se han encontrado, destaca la familia de proteínas de las Netrinas. Éstas corresponden a moléculas originalmente identificadas en el sistema nervioso en el contexto de una función en guía axonal, pero que hoy en día se sabe que además tienen una función angiogénica. Tanto así que estudios recientes sugieren que estas moléculas podrían convertirse en blancos terapéuticos en el tratamiento de diversas patologías ya sea para estimular la angiogénesis, como en el caso de la diabetes, o para inhibirla, como en el caso del cáncer (Eveno y col, 2011; Natch y col, 2008).

Si bien la fuente principal de células madre mesenquimáticas utilizada con fines terapéuticos y de tipo investigativo corresponde a aquella proveniente de la médula ósea, se ha demostrado que células madres mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical, producen también factores de crecimiento y citoquinas capaces de promover la angiogénesis de manera paracrina. Con el objetivo de indagar si el efecto terapéutico de estas células puede explicarse en parte por la presencia de factores angiogénicos no clásicos en el medio condicionado, en esta tesis se estudió la expresión de las Netrinas y RGMA en las WJ-MSc y la particular contribución del receptor de Netrinas, Neogenina-1, en la mediación de este proceso.

Como primer objetivo, se evaluaron los ligandos Netrina-1, Netrina-4 y RGMA en WJ-MSc y sus receptores Neogenina-1 y DCC en HUVEC a través de variadas técnicas de biología celular e IHQ en secciones de cordón umbilical y cultivos celulares. Además, se determinó la presencia de estos ligandos en el medio condicionado por 48 horas de WJ-MSc. Se obtuvo que tanto Netrina-1 y 4 como RGMA eran expresados por

las células de Wharton. Más aún, Netrina-1 estaba presente en el medio condicionado de las mismas. Cabe destacar que en todas las muestras de cordón analizadas, las cantidades de estos ligandos, tanto a nivel de extracto celular como de medio condicionado, eran altamente variables, expresándose fuertemente en algunas muestras y débilmente en otras. Esta variabilidad observada se corresponde con resultados de arreglos de proteoma de nuestro laboratorio, los cuales dan cuenta de la existencia de grandes diferencias en cuanto al perfil de proteínas expresado por diferentes muestras de WJ-MSC (resultados no publicados, Gabriela Zavala). Estas diferencias también fueron observadas en los ensayos funcionales, ya que el medio condicionado de algunos cordones inducía mayor respuesta angiogénica que otros. Si bien todos los cordones umbilicales utilizados en este estudio son de término y sin enfermedades asociadas, desconocemos otros antecedentes de los donantes que puedan dar cuenta de esta alta variabilidad. Sin embargo, una posible proyección de este trabajo, sería utilizar un método de muestreo o *screening* que nos permitiese identificar *a priori* aquellas muestras con un mayor potencial angiogénico. En nuestro caso, una opción podría ser la detección de Netrina-1 en el medio condicionado de los cordones mediante la técnica de ELISA.

Dado que la mayoría de los trabajos referentes a Netrinas y Neogenina-1, se centran en Netrina-4, y no en Netrina-1, decidimos enfocar nuestro estudio en este ligando en particular. RGMa, si bien corresponde a una molécula no relacionado con las Netrinas también es ligando de Neogenina-1 por lo cual nos pareció interesante estudiarla en este contexto, además de que su participación en procesos angiogénesis a la fecha no ha sido descrita.

Por otra parte, es sabido que en condiciones de hipoxia, aumenta la expresión de ciertos factores angiogénicos, siendo el caso más estudiado VEGF. Por lo cual, se investigó si esta sobreexpresión también se daba en factores angiogénicos no clásicos en el contexto de WJ-MSC. Para ello, se compararon cultivos celulares crecidos a concentraciones normales de oxígeno (20%), versus aquellos sometidos a hipoxia (2%). Nosotros no detectamos diferencias en la expresión de los ligandos estudiados en ambas

condiciones a nivel de extracto celular mediante citometría de flujo ni Western Blot, aunque para *Netrina-1* observamos mediante RT-PCR una tendencia en la cual, había una mayor inducción de *Netrina-1* en condiciones de hipoxia (figura suplementaria 5). Referente a estos resultados, si bien en la literatura, no hay información referente a una inducción de *Netrina-4* o *RGMA* en hipoxia, hay un artículo (Rosenberg y col, 2009), que relaciona la inducción de *Netrina-1* con hipoxia, específicamente en el contexto de la inflamación de la mucosa intestinal. En primera instancia y usando líneas de células tumorales de colon, estos investigadores encontraron una robusta inducción de *Netrina-1* en células epiteliales cultivadas en ambiente hipóxico, y más aún, ellos confirmaron que esta inducción era dependiente de HIF-1 α e identificaron sitios putativos de unión a este factor de transcripción (HRE; elementos de respuesta a HIF-1 α). Es por esto que nosotros decidimos utilizar células de la línea CaCo-2 como control de la inducción de *Netrina-1* en WJ-MSC frente a hipoxia. Si bien determinamos mediante citometría de flujo, una sobreexpresión de esta molécula en CaCo-2, no fue posible observar lo mismo en WJ-MSC, donde no hubo cambios entre una condición y otra, corroborando los resultados obtenidos previamente mediante WB.

Dado lo anterior, decidimos examinar el medio condicionado de WJ-MSC tratadas en hipoxia, para lo cual se utilizó un protocolo de precipitación de proteínas que nos permitió concentrar el medio y detectar *Netrina-1* (figura suplementaria 6B). Los datos obtenidos sugieren que hay mayor presencia de *Netrina-1* en el medio condicionado en las células que fueron expuestas a hipoxia comparada con aquellas expuestas a normoxia. Sin embargo no se observaron diferencias a nivel proteico en el extracto celular entre una condición y otra en el caso de WJ-MSC. Por tanto, es factible que efectivamente *Netrina-1* sea producida en mayor cantidad en hipoxia pero dado que es secretada rápidamente al medio, el medir esta proteína en la célula, no nos da cuenta de su sobreexpresión como si lo hace el medio condicionado. Cabe mencionar que es poco probable que haya habido muerte celular que pudiera dar cuenta de un aumento de *Netrina-1* en el caso de la condición hipoxia, dado que el cultivo de estas células en condiciones hipóxicas imita su microambiente natural. Más aún, se ha demostrado que la

capacidad proliferativa de las MSC hipóxicas es mayor en comparación con el cultivo en normoxia. Este efecto se correlaciona además con un daño y muerte celulares significativamente reducidos bajo condiciones de hipoxia así como también con la existencia de mínimas diferencias en la apoptosis entre ambas condiciones (Lavrentieva y col, 2010).

Una vez confirmada la expresión de los ligandos de Neogenina-1 en WJ-MSK y su medio condicionado, se investigó la expresión de este receptor en células endoteliales, así como también otros de los receptores canónicos de Netrinas. Se encontró que HUVEC expresan Neogenina-1, además de UNC5C y UNC5B (figura suplementaria 7) pero no DCC, otro receptor conocido de las Netrinas, y homólogo de Neogenina-1.

Referente a DCC, la información en la literatura coincide en que este receptor no está presente en HUVEC (Lejmi y col, 2008). Sin embargo, en el caso de Neogenina-1, no hay un consenso respecto a su expresión en este tipo de células endoteliales. En gran parte de los artículos al respecto, la presencia de este receptor es solo evaluada mediante RT-PCR y comparada con los niveles de expresión de otros tejidos como cerebro, donde Neogenina-1 es fuertemente expresado. A partir de esto, se afirma que la expresión de Neogenina-1 es casi indetectable. Sin embargo, un par de trabajos sí demuestran la expresión de Neogenina-1 en HUVEC, más aún, uno de ellos no sólo a nivel de RNA mensajero sino también a nivel de proteína mediante WB (Eveno y col, 2011; Lejmi y col, 2008).

Cabe mencionar que si bien las células utilizadas en todos estos trabajos corresponden a células endoteliales de la vena de cordón umbilical, en la mayor parte de ellos no se utilizan cultivos primarios como en este trabajo sino que líneas celulares disponibles comercialmente. Esto último representa una diferencia importante que podría explicar en parte la discrepancia entre los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación. La amplia variedad de técnicas que utilizamos para detectar la

presencia de Neogenina-1 en estas células nos permite asegurar inequívocamente que los cultivos primarios HUVEC expresan este receptor.

Por otra parte, el hecho de que WJ-MSC produzcan, además de factores angiogénicos clásicos tales como VEGF, FGF, EGF, etc., moléculas de guía axonal como potenciales reguladores pro-angiogénicos, representa un hallazgo novedoso que no ha sido documentado en la literatura hasta el momento y cobra vital importancia en potenciales aproximaciones clínicas que buscan estimular procesos angiogénicos mediante el uso de este tipo de células.

Una vez caracterizado el modelo de estudio, lo siguiente fue determinar si las WJ-MSC, al igual que otras poblaciones de células madre mesenquimáticas, tenían capacidad de inducir angiogénesis en HUVEC y si los ligandos de Neogenina-1 podían contribuir a este proceso. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones *in vitro* muy caracterizadas: el ensayo de *scratch* que nos permitió evaluar la migración frente a diferentes estímulos a tiempos cortos, y el ensayo de formación de túbulos, que da cuenta de la angiogénesis *in vitro*. En estos experimentos, se encontró que el medio condicionado de WJ-MSC promueve tanto la migración como la formación de túbulos en células endoteliales de manera significativa. Nosotros estudiamos además, qué sucedía con el medio condicionado de WJ-MSC obtenido en condiciones de hipoxia al 2% de oxígeno. Dado que numerosas fuentes indican que factores angiogénicos clásicos tales como VEGF (Brlacu y col, 2013; Razban y col, 2012; Li y col, 2002) aumentan en condiciones de hipoxia, nosotros esperábamos obtener diferencias significativas en los ensayos de angiogénesis *in vitro* con respecto a normoxia, sin embargo, esto no sucedió así. Cabe mencionar que si bien VEGF está presente en el medio condicionado de las WJ-MSC (tesis de PhD Srta. Gabriela Zavala, no publicada), no es el factor angiogénico que más se expresa, lo cual podría explicar el no haber obtenido diferencias tan marcadas. Probablemente los factores que se producen en mayor cantidad, no son regulados por hipoxia. Este resultado está en concordancia con el trabajo reciente de Brlacu y colaboradores. Estos investigadores confirmaron un aumento en la expresión

de VEGF en hipoxia en comparación con normoxia en MSC de ratón, y vieron que estas células secretaban altos niveles de citoquinas pro y antiangiogénicas y éstas últimas seguían siendo producidas en condiciones normóxicas aunque en niveles más bajos. Esto último demuestra que las MSCs preservan sus propiedades innatas al ser sometidas a hipoxia. De manera interesante y concordante con nuestro trabajo, en ensayo de migración utilizando células endoteliales (EC) y medios condicionados de MSCs de médula ósea en condiciones de normoxia e hipoxia, ellos vieron que el medio condicionado tenía propiedades quimioattractantes sobre las ECs. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los medios normóxico e hipóxico, más aún, éste último era menos eficiente en inducir la migración que su contraparte normóxico (Burlacu y col, 2013). Una posible explicación que los autores postulan para justificar este resultado involucra la acción de la quimioquina SDF-1, dado que tiene un efecto quimioattractante sobre las células progenitoras endoteliales durante la adultez (Zheng y col, 2007). Los autores vieron que esta proteína disminuía en BM-MSCs hipóxicas, no sólo a través de mRNA sino también mediante ELISA lo cual podría explicar la menor capacidad quimiotáctica exhibida por el medio hipóxico comparado con el normóxico en las ECs (Burlacu y col, 2013).

El hecho de que estas células sean capaces de promover procesos angiogénicos *in vitro*, está acorde con variados trabajos que reportan el efecto paracrino de las células troncales en general, principalmente las BM-MSC, en la inducción de angiogénesis ya sea *in vitro* o *in vivo* (Duffy y col, 2009; Wu y col, 2007). Si bien este efecto se ha atribuido principalmente a la expresión de factores angiogénicos clásicos tales como VEGF o FGF-2 por parte de estas células, nuestros resultados permiten postular que no se puede descartar la influencia de otros factores menos estudiados pero presentes en los medios condicionados, como lo son las ya mencionadas Netrinas.

Con respecto a Netrina-1 y Netrina-4, su rol en procesos angiogénicos es materia de intenso debate, algunos trabajos señalan una función pro-angiogénica mientras que otros por el contrario dan argumentos que sugieren un rol anti-angiogénico. El escenario

es aún más complejo dado que la función de estos ligandos es altamente dependiente del contexto celular, del receptor a través del cual ejercen su función y de sus concentraciones relativas. En nuestro caso encontramos que Netrina-1 por sí sola, promueve la migración y la angiogénesis *in vitro* en células endoteliales (HUVEC) y este efecto es mayor a bajas concentraciones. Estos resultados concuerdan con la información documentada en algunos trabajos que sugieren un rol pro-angiogénico de Netrina-1 (Wilson y col, 2006; Park y col, 2004), al igual que para el caso de Netrina-4, (Lambert y col, 2011), y se contradicen con aquellos que reportan una inhibición de la angiogénesis con estos ligandos. Sin embargo, es importante mencionar que estudios previos han analizado el efecto de Netrinas en células endoteliales incubadas en presencia de medio de crecimiento endotelial completo. En esta tesis nosotros demostramos que ambas Netrinas están presentes en el suero (contenido en el medio completo). Es por esta razón, que nosotros llevamos a cabo nuestros experimentos en ausencia de suero y en células previamente deprivadas de suero en el caso de los experimentos de angiogénesis *in vitro*. Más aún, el efecto anti-angiogénico óptimo en estudios previos se ha observado con concentraciones muy elevadas de Netrina-4, esto es, 400 ng/mL-6 µg/mL (Lejmi y col, 2008) y 10-50 µg/mL (Natch y col, 2009). El efecto pro-angiogénico óptimo que nosotros obtuvimos en el caso de Netrina-1, fue entre 10 y 100 ng/mL, lo cual es concordante con las concentraciones fisiológicas de estos ligandos (50-500 ng/mL) (Wilson y col, 2006). Por tanto, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que las Netrinas estimulan células endoteliales *in vitro* a bajas concentraciones pero las inhiben a dosis más altas y con el hecho de que células de la vena umbilical (HUVEC) o endoteliales de la arteria umbilical (HUAEC), muestren *in vitro*, una respuesta bifásica a Netrina-1.

Argumentos a favor del rol pro-angiogénico de Netrina-1 se explican por el efecto de este ligando en el contexto de glioblastoma (Shimizu y col, 2012). Específicamente, luego de identificar Netrina-1 como una molécula que promovía la invasión de glioblastoma, estos investigadores concluyeron que la vía de señalización gatillada por Netrina-1 incluía la activación de RhoA y el elemento de respuesta a AMP

cíclico (CREB). Es altamente probable que estas mismas vías de señalización den cuenta del efecto promigratorio observado en nuestros experimentos con HUVEC en presencia de Netrina-1; ciertamente una línea de investigación que habrá que abordar en un futuro próximo. Otros trabajos que apoyan nuestros resultados obtenidos *in vitro* han demostrado el rol pro-angiogénico de Netrina- 1 *in vivo*. De manera interesante, Fan y colaboradores (Fan y col, 2008) demostraron que la hiperestimulación con Netrina-1 era capaz de promover la neovascularización focal en el cerebro adulto *in vivo*. Sin embargo, a diferencia de la inducción de la microvasculatura observada con VEGF, los vasos recién formados inducidos por Netrina-1, mostraban más bien un fenotipo arterial. El hecho de que Netrina-1 principalmente promueva la formación de grandes vasos sanguíneos, mientras que VEGF generalmente aumente el crecimiento de los microvasos, sugiere que Netrina-1 y VEGF promueven la angiogénesis a través de vías independientes.

Otra de las moléculas de guía axonal expresada por WJ-MSC es RGMa. Si bien, a diferencia de lo que sucede con las Netrinas, en la actualidad no hay información que sugiera un rol como factor angiogénico para esta proteína, y si bien tampoco posee similitud estructural ni de secuencia con las Netrinas, nosotros encontramos que es capaz de inducir angiogénesis *in vitro* en células endoteliales. Sin embargo, en este caso, el efecto era directamente proporcional a la concentración de ligando en el medio. Esto es, el efecto era observado a dosis altas de RGMa (entre 100 y 1000 ng/mL). El papel de RGMa ha sido ampliamente estudiado principalmente en el contexto del sistema nervioso. Recientes estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que Neogenina-1 media una respuesta quimiorrepulsiva en procesos de guía axonal, en respuesta a RGMa. En nuestro caso, si bien observamos un efecto con RGMa, en experimentos de formación de túbulos, esto no fue así en experimentos de migración, donde no obtuvimos diferencias significativas en cuanto a la movilidad de HUVEC con RGMa. Si bien estos últimos resultados se contradicen con el efecto quimiorrepulsivo de RGMa observado en el sistema nervioso, estas diferencias podrían explicarse por el contexto en el cual ligando y receptor se encuentran, esto es sistema nervioso *versus* interacción célula

mesenquimática-célula endotelial. Cabe destacar que el hecho de que células HUVEC respondan a RGMa, corrobora lo obtenido anteriormente en cuanto a la expresión del receptor de Neogenina-1 en estas células, dado que a diferencia de las Netrinas, que se unen a diferentes receptores además de Neogenina-1, RGMa se une exclusivamente a Neogenina-1, por lo cual cualquier efecto observado, debe ser mediado necesariamente por este receptor.

Resumiendo los resultados de los primeros dos objetivos de este trabajo, nosotros encontramos que WJ-MSC expresan Netrina-4, Netrina-1 y RGMa y más aún, demostramos que estos dos últimos ligandos por sí solos son capaces de inducir procesos angiogénicos en células endoteliales. Esto sugiere que el efecto paracrino de WJ-MSC se debe en parte a la presencia de estos factores, descritos clásicamente en sistema nervioso, quedando por resolver aún en qué grado contribuyen al proceso pro-angiogénico. Para ello, proponemos realizar experimentos en presencia de inhibidores de receptores de VEGF o usar RNAs de interferencia para Netrina-1 y/o Netrina-4 en las WJ-MSC y evaluar cómo afectan estos tratamientos, su capacidad de inducir angiogénesis.

El tercer objetivo de esta tesis consistió en el estudio de la contribución del receptor Neogenina-1, a la angiogénesis inducida por el medio condicionado de WJ-MSC y Netrina-1. Para ello, realizamos experimentos de pérdida de función utilizando células HUVEC establemente *kd* para Neogenina-1. Desarrollamos de manera exitosa un protocolo que nos permitió transducir con una eficiencia del 100% nuestros cultivos, en circunstancias que la literatura reporta que la transducción es extremadamente complicada e ineficiente en estas células. Encontramos que cuando Neogenina-1 no estaba presente en células HUVEC, la capacidad de formar túbulos en respuesta al medio condicionado y a Netrina-1 estaba aumentada con respecto a células control. Interesantemente, su capacidad migratoria no se vio afectada de manera significativa en respuesta a estos estímulos. Estos datos sugieren fuertemente que Neogenina-1 en su interacción con Netrina-1 tendría un efecto antiangiogénico, inhibiendo específicamente

el proceso de formación de túbulos y no la migración celular de células endoteliales, en respuesta al medio condicionado de WJ-MSC y Netrina-1. Esto último, nos lleva a pensar que estos dos procesos, migración celular y formación de túbulos, estarían mediados por vías de señalización diferentes y sería concordante con el hecho de que en la angiogénesis fisiológica estos procesos están separados temporalmente, ocurriendo primero la migración celular y posteriormente la organización de células endoteliales en estructuras tubulares.

Si bien hay pocos trabajos sobre el rol de Neogenina-1 en el sistema vascular, un par de artículos abordan el posible papel de este receptor y, concordante con lo obtenido por nuestro grupo, también atribuyen un efecto anti-angiogénico a Neogenina-1 (Eveno y col, 2011). Sin embargo, cabe mencionar que el contexto en el cual se sitúan corresponde a situaciones patológicas específicamente, neoplásicas. Si bien este contexto se aleja de nuestro modelo de estudio, no deja de ser interesante el indagar en el rol de nuevas moléculas angiogénicas y sus receptores en el contexto del cáncer. Sin duda la angiogénesis podría estar en la base de varias estrategias terapéuticas, en particular para el tratamiento del cáncer. En efecto, el inhibir la angiogénesis podría obstruir a las células tumorales, evitar su propagación y la posterior formación de metástasis. En este sentido, se han emprendido ensayos terapéuticos y algunos han llevado al desarrollo de drogas cuyo blanco es VEGF (Castets y Mehlen, 2010). Sin embargo, estudios recientes han indicado que los cánceres humanos pueden adquirir resistencia luego de tratamientos anti-VEGF, agravando la situación patológica (Helfrich y col, 2010; Huang y col, 2010; Priceman y col, 2010) y sumado a lo anterior está el hecho que la inhibición de la función de VEGF lleva a severos efectos secundarios (Eremina y col, 2008). Por tanto, el encontrar nuevos blancos terapéuticos como factores angiogénicos no clásicos o sus receptores, cobra mayor importancia en el desarrollo de estrategias anti-tumorales. En efecto, se ha demostrado una ganancia en la producción de Netrina-1 autocrina en un gran porcentaje de cánceres de tipo agresivos (Delloye-Bourgeois y col, 2009; Delloye-Bourgeois 2009b; Fitamant y col, 2008). Sin embargo, el interés de Netrina-1 como blanco en patologías angiogénicas, no debe restringirse a

terapias para combatir el cáncer y sería interesante explorarla en más de un nivel. En primer lugar, tratamientos anti-Netrina-1 podrían ayudar a rescatar desordenes caracterizados por defectos en los vasos, como se ha propuesto anteriormente para las vasculopatías diabéticas o para defectos en la perfusión inducidos por isquemia. En segundo lugar, la medición de Netrina-1 podría ser una vía terapéutica prometedora en enfermedades causadas por una angiogénesis excesiva (Castets y Mehlen, 2010).

Dado que la familia de las Netrinas está recibiendo especial atención como potencial blanco en el tratamiento del cáncer, sería interesante demostrar también, que la sobreexpresión de Neogenina-1 disminuye la capacidad angiogénica y, por ende, el crecimiento de ciertos tumores que producen Netrinas de manera autocrina. Sin embargo, no se puede dejar de mencionar que este último planteamiento estaría en contradicción con aquellos trabajos que han descrito a Neogenina-1 y otros receptores de Netrinas como “receptores de dependencia”. Este concepto se refiere a aquellos receptores de transmembrana que son activos en ausencia de su ligando, induciendo apoptosis y actuando por lo tanto como potenciales supresor de tumores. Datos recientes apoyan la idea de que las señales pro-apoptóticas de DCC y UNC5 son un mecanismos de amparo en regular el crecimiento tumoral y la metástasis (Chen y col, 1999; Mehlen y col, 1998). En ese sentido, una ventaja selectiva del tumoral es inactivar esta señal pro-apoptótica presente en el receptor de dependencia en ausencia de su ligando. El rol de Netrina-1 como señal de supervivencia ha sido descrito durante el desarrollo del sistema nervioso (Furne y col, 2008; Tang y col, 2008), y más recientemente, durante la angiogénesis presente en el desarrollo (Castets y col, 2009). De manera interesante, Castets y colaboradores, demostraron que Netrina-1 actuaba como un factor de supervivencia para células endoteliales, bloqueando los efectos pro-apoptóticos del receptor de dependencia UNC5B y sus efectores de muerte río abajo, la quinasa serina/treonina DAPK. El efecto de Netrina-1 sobre el desarrollo de vasos sanguíneos, podía ser reproducido con inhibidores de caspasa en ensayos *ex vivo* y tanto la inhibición de la actividad caspasa como el silenciamiento del receptor UNC5B y el silenciamiento de DAPK, eran suficientes para rescatar los defectos vasculares inducidos por la ausencia

de Netrina-1 en el pez cebra, sugiriendo que el efecto pro-apoptótico de UN5B sin ligando y el rol de sobrevivencia de Netrina-1 en células endoteliales modula finamente los procesos angiogénicos, al menos durante el desarrollo. Ellos postulan además, que la ganancia de Netrina-1 en células epiteliales tumorales puede tener dos efectos aditivos, inhibir la muerte celular inducida por el receptor de dependencia (Fitamant y col, 2008) y favorecer el mantenimiento de vasos sanguíneos y/o su desarrollo y consecuentemente promover la progresión del cáncer.

Resumiendo los resultados de la última parte de este estudio, nosotros demostramos el medio condicionado de WJ-MSC y las moléculas de guía axonal, RGMA y Netrina-1, tienen un efecto paracrino angiogénico sobre células HUVEC, y que al silenciar Neogenina-1 este efecto paracrino se hace aún más evidente, al menos para el proceso angiogénico de formación de túbulos. Esto último nos lleva a pensar por añadidura que los efectos pro-angiogénicos de Netrina-1 y del medio condicionado de WJ-MSC estarían siendo mediados por otro receptor que no es Neogenina-1 y posiblemente pueda ser un receptor no canónico, tal como una integrina, la cual sabemos se expresa en HUVEC. Pero dado que RGMA sí induce procesos angiogénicos *in vitro*, Neogenina-1 también podría actuar como mediador pro-angiogénico en su interacción con RGMA. Todo lo anterior, nos lleva a esbozar un modelo hipotético (figura 23) en el cual, tenemos que células endoteliales HUVEC expresan tanto receptores canónicos de Netrinas (Neogenina-1, UNC5) como no canónicos (integrinas). En su interacción con un receptor no identificado que probablemente presenta mayor afinidad por Netrina-1 que Neogenina-1, Netrina-1 tiene un efecto que favorece la angiogénesis. Esta hipótesis, se corresponde con datos de literatura que dan inclusive cuenta de la expresión de UNC5 y DCC y que sin embargo atribuyen la función pro-angiogénica de Netrinas a un receptor desconocido (Wilson y col, 2006). Referente a esto último, se ha propuesto como receptores alternativos, las integrinas $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$, que se ha demostrado actúan como receptores de Netrinas en células epiteliales (Yebra y col, 2003). Hay antecedentes que dan cuenta de un efecto biológico por parte de estos receptores en su interacción con Netrinas (Larrieu y col, 2011). Dado que nosotros encontramos

expresión de la integrina $\beta 1$ (CD29) en células, postulamos que en nuestro modelo el receptor alternativo que mediaría las acciones pro-angiogénicas de Netrina-1, posiblemente corresponda a uno del tipo integrinas. Siguiendo con nuestro mecanismo hipotético, planteamos que cuando las concentraciones de Netrina-1 aumentan y el receptor desconocido se ve saturado, Netrina-1 comenzaría a unirse a Neogenina-1 ejerciendo un efecto opuesto que contrarrestaría el efecto angiogénico de la interacción Netrina-1/receptor desconocido, mencionada anteriormente. Esto explicaría por qué mientras mayores son las dosis de Netrina-1, menor es la respuesta exhibida por las células endoteliales en cuanto a la formación de túbulos. Con respecto a esto último, es bien sabido que en el contexto del sistema nervioso Neogenina-1 puede interactuar intracelularmente con receptores de la familia UNC5 ejerciendo una acción de tipo repulsiva y algo similar se ha descrito en contextos angiogénicos, para el ligando Netrina-4 (Lejmi y col, 2008). Por lo cual una posible hipótesis es que en este contexto, la acción anti-angiogénica de la interacción Neogenina-1/Netrina-1 estaría en parte mediada por receptores UNC5, dos de los cuales (UNC5B y UNC5C) en efecto son expresados por células HUVEC (figura suplementaria 7). Sin embargo, no podemos afirmar que Neogenina-1 como tal sea un receptor anti-angiogénico, dado que como se observó en el experimento con dosis crecientes de RGMa, la formación de túbulos se ve favorecida ante la presencia de este ligando, por lo cual, en nuestro modelo, la interacción del par Neogenina-1/RGMa sería pro-angiogénica.

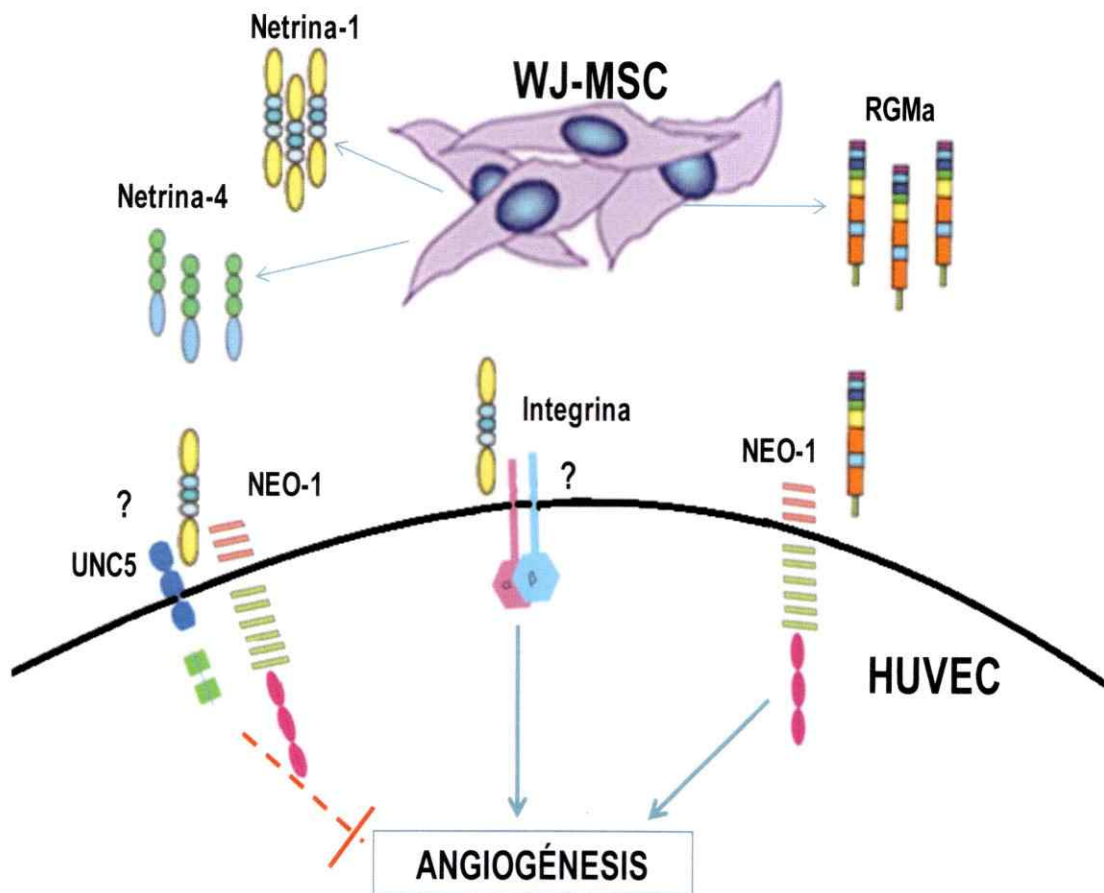


Figura 23. Modelo especulativo del mecanismo involucrado en la interacción W-MSC-HUVEC. WJ-MSC expresan los factores angiogénicos no clásicos, Netrina-1, Netrina-4 y RGMa. Células HUVEC expresan tanto receptores canónicos (Neogenina-1 y UNC5) como no canónicos (integrinas) de Netrinas. En su interacción con Neogenina-1, Netrina-1 tiene un efecto anti-angiogénico, posiblemente mediado a través de la interacción intracelular con otro receptor, probablemente, de la familia UNC5 (Lejmi y col, 2008). Sin embargo Netrina-1 puede actuar también de manera pro-angiogénica y este efecto podría estar mediado por un receptor del tipo no canónico como son las integrinas. Finalmente, los datos obtenidos sugieren que RGMa en su interacción con Neogenina-1, tendría un efecto pro-angiogénico.

Los resultados recopilados nos permiten concluir que el rol del receptor Neogenina-1 básicamente es contexto dependiente, es decir su efecto global depende de la presencia de otros receptores y ligandos. Los datos sugieren la existencia de un balance de receptores de Netrinas ejerciendo efectos antagónicos, algunos inhibiendo y otros promoviendo procesos angiogénicos. Concluimos que la función de las Netrinas sobre las células endoteliales es mucho más compleja que la de otros factores

endoteliales como VEGF. Sumado al hecho de que el sistema probablemente esté compuesto por una multiplicidad de receptores, las Netrinas son proteínas similares a lamininas (Schneiders y col, 2007), por lo cual, la membrana extracelular podría regular las concentraciones locales de Netrinas, actuando como un reservorio de factores de crecimiento o actuar inclusive como co-receptor (Stanco y col, 2009).

Resumiendo los resultados obtenidos en esta tesis, nosotros encontramos que WJ-MSc producen factores angiogénicos no-canónicos, lo cual no había sido descrito anteriormente. Demostramos además que Neogenina-1 participa activamente en regular la angiogénesis inducida por el medio condicionado de WJ-MSc y sus ligandos Netrina-1 y RGMA. Toda esta información es de suma relevancia para el conocimiento actual que se tiene del potencial terapéutico de las células mesenquimáticas troncales y de las Netrinas. Profundizar en estos estudios podría ser de mucha utilidad para desarrollar y/o optimizar estrategias terapéuticas tendientes a manipular procesos angiogénicos.

7. CONCLUSIONES

- Células mesenquimáticas derivadas de la gelatina de Wharton producen factores angiogénicos no clásicos, entre ellos Netrina-1, Netrina-4 y RGMa, los cuales podría dar cuenta en parte del potencial pro-angiogénico observado *in vitro*.
- El efecto pro o anti angiogénico del receptor Neogenina-1 es contexto dependiente. Los datos obtenidos sugieren que al menos en nuestro modelo de estudio, en su interacción con Netrina-1 actuaría de manera anti-angiogénica, mientras que en su interacción con RGMa sería pro-angiogénico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, et al (2003a). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischaemia model. *Ann Thorac Surg* 75:204–209.
- 2) Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, et al (2003b). Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response *in vivo*. *Gene Ther* 10:621–629.
- 3) Bennett KL, Bradshaw J, Youngman T, Rodgers J, Greenfield B, Aruffo A, Linsley PS (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. *J Biol Chem* 272:26940–26946.
- 4) Bouvree K, Larrivee B, Lv X, Yuan L, DeLafarge B, et al (2008). Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. *Dev Biol* 318:172–183.
- 5) Burlacu A, Grigorescu G, Rosca AM, Preda MB, Simionescu M (2013). Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis *in vitro*. *Stem Cells Dev* 15:22(4):643-53.
- 6) Capparuccia L, Tamagnone L (2009). Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment—two sides of a coin. *J Cell Sci* 122:1723–1736.
- 7) Carmeliet P, Jain RK (2011). Off molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298–307.
- 8) Castets M, Coissieux MM, Delloye-Bourgeois C, et al (2009). Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Dev Cell* 16:614-620.
- 9) Castets M, Mehlen P (2010). Netrin-1 role in angiogenesis: To be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle* 9:1466-1471.
- 10) Cirulli V, Yebra M (2007). Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:296–306.
- 11) Conway EM, Collen D and Carmeliet P (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521.

- 12) Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyses E, Chedotal A, Mehlen P (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407:747–750.
- 13) Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, et al (1999). Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 18:2747–2754.
- 14) Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, Ahn HY, Yang PI, Shin JC, Joe YA (2013). Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 3:560-570.
- 15) Dai Y, Xu M, Wang Y, Pasha Z, Li T, Ashraf M (2007). HIF-1 α induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 42:1036-1044.
- 16) de Castro F, López-Mascaraque L, De Carlos JA (2007). Cajal: lessons on brain development. *Brain Res Rev* 55:481–89.
- 17) Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin MA, et al (2009a). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206:833-47.
- 18) Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedoux R, Firlej V, et al (2009b). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:237-47.
- 19) Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem RM (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A*. 9:2459-70
- 20) Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE (2008). VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 358:1129–1136.
- 21) Eveno, C., Broqueres-You, D., Feron, J. G., Rampanou, A., Tijeras-Raballand, A., Ropert, S., Leconte, L., Levy, B. I., and Pocard, M (2011). Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *The American*

journal of pathology 178:1861-1869.

- 22) Fan YF, Shen FX, Chen Y, et al (2008). Overexpression of netrin-1 induces neovascularization in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1543-1551.
- 23) Ferrara N, Davis-Smyth T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25.
- 24) Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, et al (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4850-5.
- 25) Fitzgerald DP, Seaman C, Cooper HM (2006). Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn* 6:1720-5
- 26) Folkman J, Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934.
- 27) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.
- 28) Furne C, Rama N, Corset V, et al (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14465-14470.
- 29) Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, et al (2001). Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 230:151-160.
- 30) Gargett CE, Schawab KE, Zilwood RPM, et al (2009). Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 6:1136-1145.
- 31) Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ (2003). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 278:32561-32568.
- 32) Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161:1163-1177.
- 33) Gronthos S, Brahim J, Li W, et al (2002). Stem cell properties of human dental

- pulp stem cells. *J Dent Res* 8:531-535.
- 34) Helfrich I, Scheffrahn I, Bartling S, Weis J, von Felbert V, Middleton M, Kato M, Ergun S, Schadendorf D (2010). Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* 207:491–503.
- 35) Hoang S, Liauw J, Choi M, Choi M, Guzman RG, Steinberg GK (2008). Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:385–397.
- 36) Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927–941.
- 37) Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, Kahnoski R, Futreal PA, Furge KA, Teh BT (2010). Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 70:1063–1071.
- 38) Ishii N, Wadsworth W.G, Stern B.D, Culotti J.G and Hedgecock EM (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9:873–881.
- 39) Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271:1172–1180.
- 40) Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771-17778.
- 41) Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhard RL, Schwartz R, Keeney d, Ortiz-Gonzalez X, Reyes M, Lenvik T, Lund , Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Lowk W, Largaespada D, Verfaillie C (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
- 42) Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, et al (2008). Human mesenchymal stem

- cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 4:184-19.
- 43) Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25:319–331.
- 44) Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, et al (2003). Cell type specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93:1074-1081.
- 45) Kolf C, Cho E, Tuan R (2007). Mesenchymal stromal cells Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9:1-10.
- 46) Kopen G, Prockop D, Phinney, D (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:10711–10716.
- 47) Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL (1999). Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209:254-267.
- 48) Kourembanas S, Hanna RL and Faller DV (1990). Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor β -chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* 86:670-674.
- 49) Lagasse, E. et al (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med* 6:1229–1234.
- 50) Lambert E, Coissieux MM, Laudet V, Mehlen P (2012). Netrin-4 acts as a pro-angiogenic factor during zebrafish development. *J Biol Chem* 6:3987-99.
- 51) Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Thomas KR, Li DY (2010). Netrin-4 induces lymphangiogenesis *in vivo*. *Blood* 115:5418–5426.
- 52) Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Thomas KR, and Li DY (2011). Netrin-4 activates endothelial integrin $\alpha_6\beta_1$. *Circ Res* 109:770–774.

- 53) Larrivée B, Freitas C, Suchting S, Brunet I, Eichmann A (2009). Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. *Circ Res* 4:428-41.
- 54) Lavrentieva A, Major I, Kasper C, Hass R (2010). Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 8:1-9.
- 55) Lejmi E, Leconte L, Pedron-Mazoyer S, Ropert S, Raoul W, Lavalette S, Bouras I, Feron JG, Maitre-Boube M, Assayag F, Feumi C, Alemany M, Jie TX, Merkulova T, Poupon MF, Ruchoux MM, Tobelem G, Sennlaub F, Plouet J (2008). Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of UNC5B. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12491–12496.
- 56) Li Q, Yao D, Ma J, et al (2011). Transplantation of MSCs in Combination with Netrin-1 Improves Neoangiogenesis in a Rat Model of Hind Limb Ischemia. *Journal of Surgical Research* 166:162–169.
- 57) Li TS, Hamano K, Suzuki K, Ito H, Zempo N, Matsuzaki M (2002). Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:468–473.
- 58) Liu Y, Zheng Y, Ding G, et al (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* 4:1065-73.
- 59) Lu X, le Noble F, Yuan L, Jiang Q, de Lafarge B, et al (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432:179–86.
- 60) Lupatov AY, Karalkin PA, Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Yarygin VN, Yarygin KN (2006). Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med* 142:521–526.
- 61) Ly N.P et al (2005). Netrin-1 inhibits leukocyte migration *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14729–14734.
- 62) Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, et al (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395:801–804.
- 63) Melani M, Weinstein BM (2010). Common factors regulating patterning of the nervous and vascular systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* 10:639–665.

- 64) Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE (2007). Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:17–31.
- 65) Nacht M, St Martin T. B, Byrn A, Klinger KW, Teicher B. A, Madden SL, and Jiang Y (2009). *Exp Cell Res* 315:784-794.
- 66) Nguyen A, Cai H (2006). Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC dependent ERK1/2-eNOS feed- forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6530-6535.
- 67) Orlic, D. et al (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701–705.
- 68) Park KW, Crouse D, Lee M, et al (2004). The axonal attractant netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16210-16215.
- 69) Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284:143-149.
- 70) Plate KH, Breier G, Weich HA and Risau W (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 359: 854-848.
- 71) Poellinger L, Johnson RS (2004). HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 14:81-85.
- 72) Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, Johnson M, Lusic AJ, Cohen DA, Iruela-Arispe ML, Wu L (2010). Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* 115:1461–1471.
- 73) Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684.
- 74) Ramón y Cajal S (1906). The structure and connexions of neurons. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-lecture.pdf
- 75) Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, Pshezhetsky AV, Hebert MJ (2004). Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VMSC. *FASEB J*

18:705–707.

- 76) Razban V, Sahebqadam A, Soleimani M, Ahmadi H, Massumi M, Khajeh S, Ghaedi M, Arjmand S, Najavand S, Khoshdel A (2012). *Biores Open Access* 4:174-183.
- 77) Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998). HIF-1a is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17:3005-3015.
- 78) Rosenberger P, et al (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat Immunol* 10:195–202.
- 79) Ruas JL, Poellinger L, Pereira T (2005). Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* 118:301–311.
- 80) Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23:220–229.
- 81) Serafini T, Kennedy T.E, Galko M.J, Mirzayan C, Jessell T.M, and Tessier-Lavigne M (1994). The netrins define a family of axon promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- 82) Sessarego N, Parodi A, Podesta M, et al (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Hematologica* 3: 339-346.
- 83) Schneiders FI, Maertens B, Bose K, et al (2007). Binding of netrin-4 to laminin short arms regulates basement membrane assembly. *J Biol Chem* 33:23750-23758.
- 84) Shimizu A, Nakayama H, Wang P, König C, Akino T, Sandlund J, Coma S, Italiano JE Jr, Mammoto A, Bielenberg DR, Klagsbrun M (2013). Netrin-1 Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis by Multiple Pathways Including Activation of RhoA, Cathepsin B, and cAMP-response Element-binding Protein. *J Biol Chem* 4:2210-2222.
- 85) Shin D, Garcia-Cardena G, Hayashi S, Gerety S, Asahara T, et al (2001). Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and

- venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* 230:139–50.
- 86) Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- 87) Sperry RW (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad. Sci USA* 50:703–10.
- 88) Stanco A, Szekeres C, Patel N, et al (2009). Netrin-1- α 3 β 1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 18:7595-7600.
- 89) Stappenbeck T, Miyoshi H (2009). The Role of Stromal Stem Cells in Tissue Regeneration and Wound Repair. *Science* 324:1665-1669.
- 90) Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M (2001). Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 291:1976 –1982.
- 91) Tam SJ, Watts RJ (2010). Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 33:379-408.
- 92) Tang X, Jang SW, Okada M, et al (2008). Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. *Nat Cell Biol* 10:698–706.
- 93) Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, et al (2003). Defective brain development in mice lacking the Hif-1 α gene in neural cells. *Mol Cell Biol* 23:6739-6749.
- 94) Troyer D, Weiss M (2008). Concise Review: Wharton’s Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cells* 26:591–599.
- 95) Vesalius A (1543). *De Humani Corporis Fabrica*. Basel: Oporinus
- 96) Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM. & Dreyer WJ (1994). Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumour suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol* 127:2009–2020.

- 97) Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev In* 8:726-736.
- 98) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510-5514.
- 99) Wilson BD, Masaaki L, Park KW, et al (2006). Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* 313:640-644.
- 100) Wilson N, Key B (2007). Neogenin: one receptor, many functions. *The Int J Biochem Cell Biol* 39:874-878.
- 101) Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25:2648-2659
- 102) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248.
- 103) Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V (2003). Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 5:695-707.
- 104) Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H (2007). "Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway". *J Cardiovasc Pharmacol* 3:274-80.

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura suplementaria 1. Control negativo de la inmunohistoquímica de cordón umbilical humano. Los tejidos fueron sujetos al mismo procedimiento de inmunohistoquímica, pero sin agregar anticuerpo primario. **A** Gelatina de Wharton. **B** Vena umbilical.

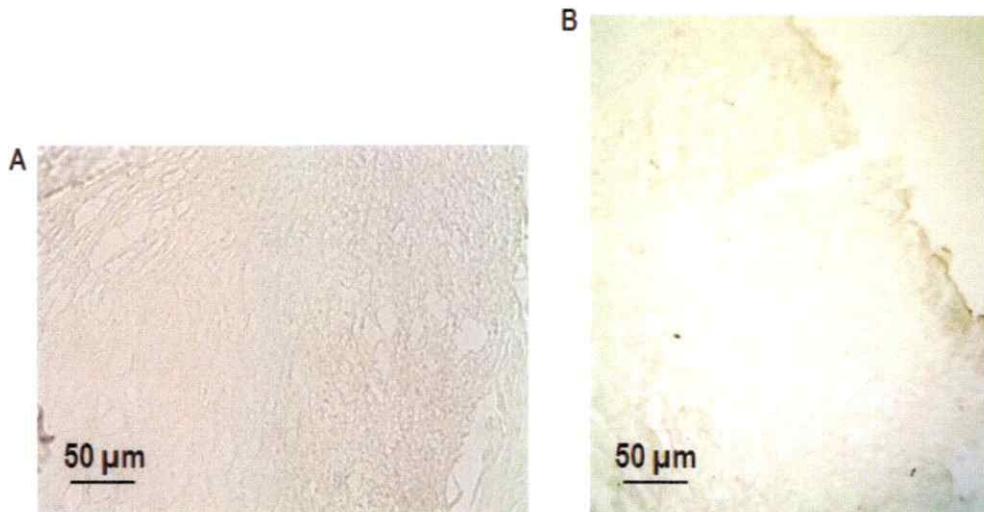


Figura suplementaria 2. Control negativo de la inmunofluorescencia de WJ-MSC. Se muestran las inmunofluorescencias para los ligandos de NEO-1 sin anticuerpo primario. En azul se visualizan los núcleos celulares. **A** Anticuerpo secundario anti-rabbit (verde). **B** Anticuerpo secundario anti-goat (rojo).

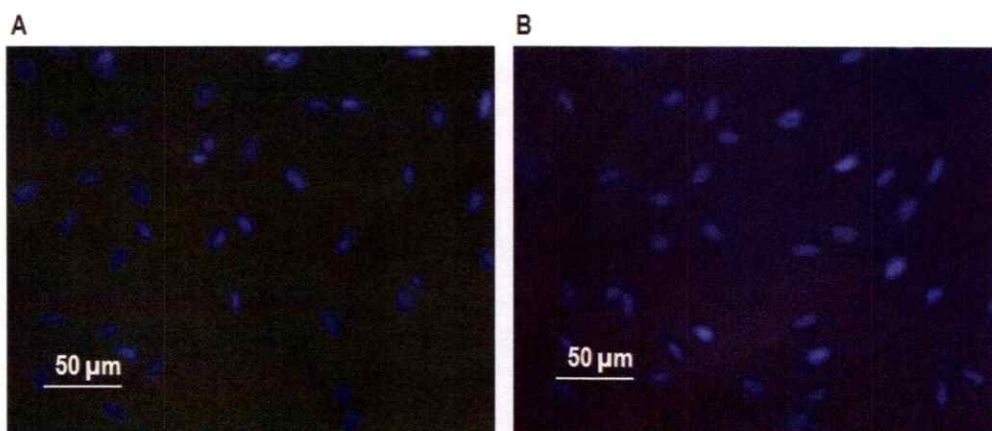


Figura suplementaria 3. Control negativo de la inmunofluorescencia de Neogenina-1 en HUVEC. Se muestran la inmunofluorescencias para Neogenina-1 sin anticuerpo primario, utilizando un anticuerpo secundario anti-rabbit (verde). En azul se visualizan los núcleos celulares.

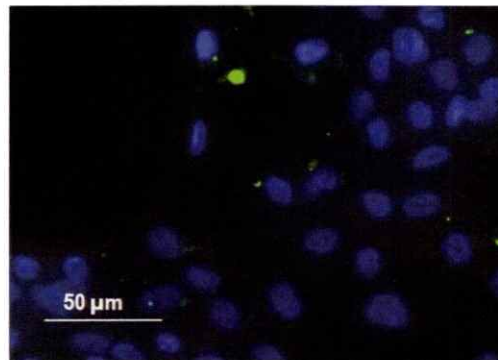


Figura suplementaria 4. Expresión de RGMa intracelular en WJ-MSc. Se evaluó la expresión de RGMa intracelular en cultivos primarios de WJ-MSc. A diferencia de la tinción de superficie, la población es homogénea para la expresión intracelular de RGMa.

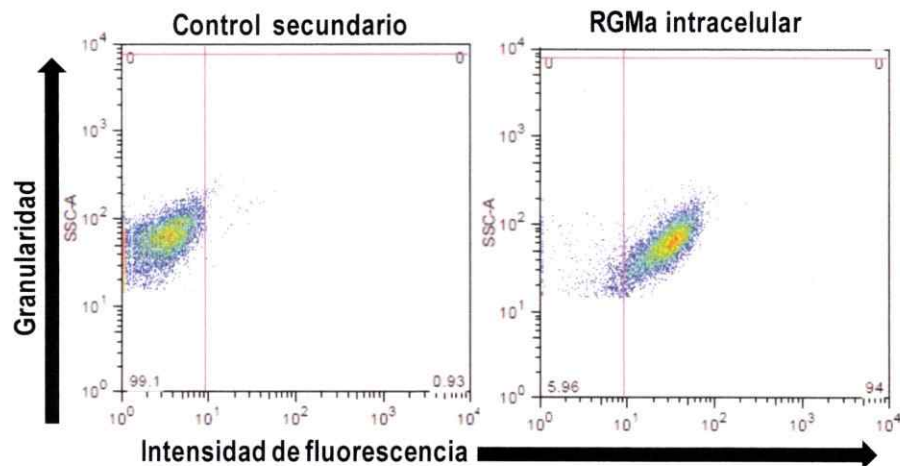


Figura suplementaria 5. Expresión de Netrina-1 en normoxia e hipoxia mediante RT-PCR. **A** Se evaluó la expresión de Netrina-1 mediante RT-PCR 48 horas post-inducción de hipoxia. Como control de carga se utilizó GAPDH. Además se muestra el control correspondiente a la reacción de RT-PCR sin templado. **B** Cuantificación de lo mostrado en A.

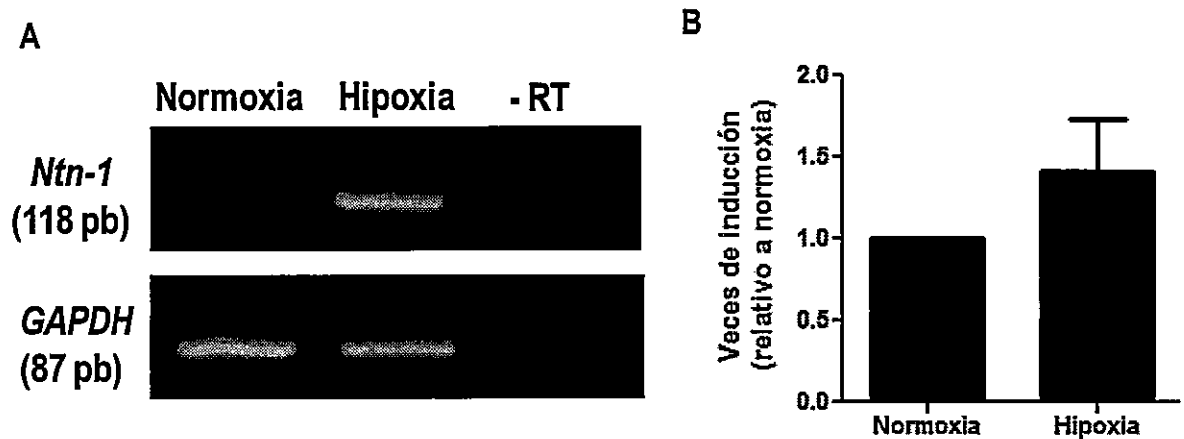


Figura suplementaria 6. Netrina-1 en condiciones de hipoxia. **A** Cuantificación de la expresión de Netrina-1 evaluada mediante WB en condiciones de hipoxia y normoxia a nivel de extracto celular. Los datos fueron normalizados a la proteína β -actina y son presentados como veces de inducción relativos a los resultados obtenidos en normoxia. **B** Cuantificación de la presencia de Netrina-1 en el medio condicionado de WJ-MSC evaluada mediante WB en condiciones de hipoxia y normoxia (* $p < 0,05$; $n=3$).

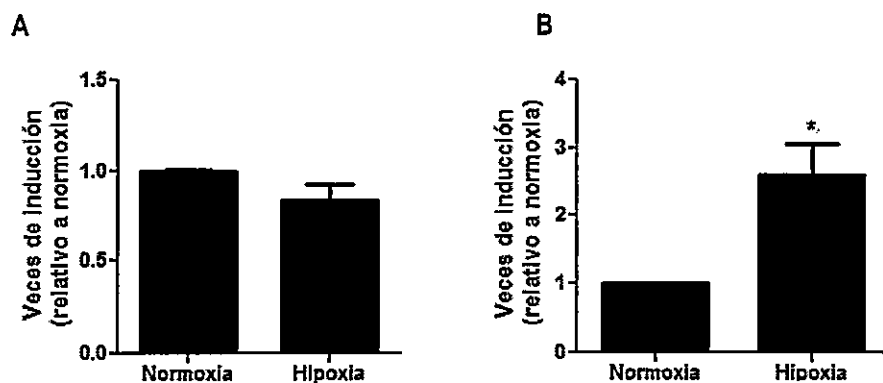


Figura suplementaria 7. Expresión de los receptores canónicos de Netrinas, *UNC5B* y *UNC5C*. Como control de carga se utilizó *GAPDH*.

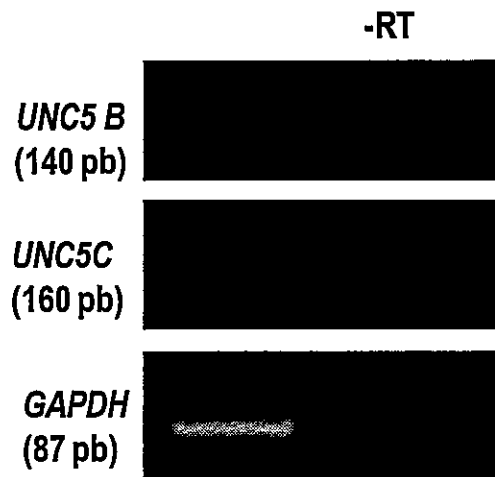


Figura suplementaria 8. Transducción de la línea de neuroblastoma SK-H-SH con partículas lentivirales shNEO-1 y shSCR. A modo de control de la efectividad de las partículas lentivirales usadas en los experimentos de silenciamiento de NEO-1 en HUVEC, se transdujo la línea de neuroblastoma SK-N-SH con dichas partículas. A Mediante Western Blot se confirmó la disminución en la expresión de la proteína en la línea celular transducida con shNEO-1 con respecto al control shSCR. Se muestra α -tubulina como control de carga. **B** Cuantificación de lo mostrado en A.

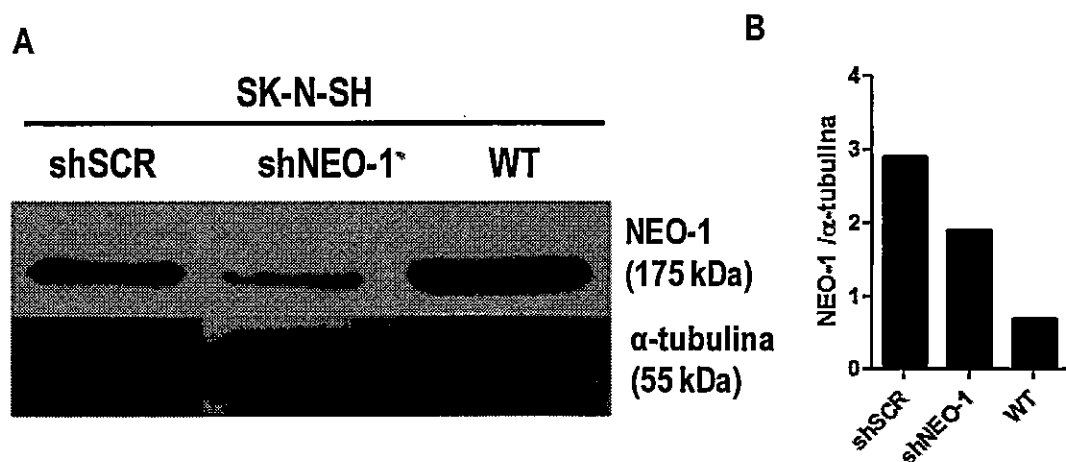


Figura suplementaria 9. Controles del experimento de formación de túbulos usando medio condicionado de WJ-MSC. Se muestra la cuantificación del control del experimento correspondiente a DMEM (control) y EGM-2 (control positivo) y se observa que no hay diferencias significativas entre células HUVEC shSCR y shNEO-1.

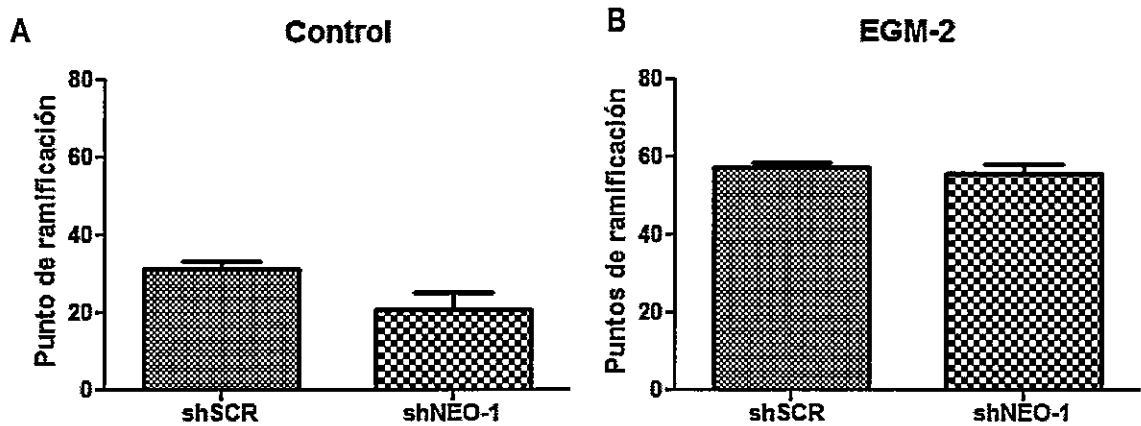


Figura suplementaria 10. Controles del experimento de formación de túbulos usando Netrina-1 recombinante. Se muestra la cuantificación del control del experimento correspondiente a DMEM control) y EGM-2 (control positivo) donde se observa que no hay diferencias significativas entre células HUVEC shSCR y shNEO-1.

