

# Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



## **“ESTUDIO DE LAS ALFA-QUIMIOQUINAS EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE NEUROESFERAS OBTENIDAS DE MÉDULA ESPINAL DE RATÓN”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica en el área de especialización  
Toxicología y Diagnóstico Molecular y  
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

**FRANCISCA CRISTI MUÑOZ**

Directores de tesis

Dr. Alejandro Erices Ocampo  
Dra. Jenny Fiedler Temer

**SANTIAGO, CHILE  
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

**FRANCISCA CRISTI MUÑOZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_ de 2012.

**Directores de Tesis:**

Dr. Alejandro Erices O.

\_\_\_\_\_

Dra. Jenny Fiedler T.

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Amalia Sapag M. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dra. Alejandra Álvarez R.

\_\_\_\_\_

Dr. Dante Miranda W.

\_\_\_\_\_

Para mi Coquito

## FINANCIAMIENTO

Esta tesis de magíster se realizó en el laboratorio de Células Troncales y Regeneración Tisular, el cual pertenece a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Fue dirigida por el Dr. Alejandro Erices y la Dra. Jenny Fiedler, y financiada por los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT 1090427
- Núcleo Milenio en Biología Regenerativa (MINREB)

Además contó con el apoyo de la beca de rebaja de arancel del programa de Magíster de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## CONGRESOS

Parte de los experimentos mostrados en esta tesis fueron expuestos en dos congresos internacionales:

- **Cristi F**, Erices A.  $\alpha$ -Chemokines modulate differentiation of Neural Stem Cells from Spinal Cord. 2011. XXV Annual Meeting of Society of Cell Biology of Chile. 1-5 de noviembre de 2011. Puerto Varas, Chile.
- **Cristi F**, Erices A. Estudio de las alfa-quimioquinas en la regulación del proceso de diferenciación de células troncales neurales obtenidas de médula espinal. Congreso ANEB. 9-13 de agosto de 2011. Santiago, Chile.

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas a las cuales debo agradecer y que han hecho que este proceso de mi vida haya estado lleno de aprendizaje y buenos momentos.

En primer lugar a mi tutor, el Dr. Alejandro Erices, por permitirme ser parte de su laboratorio, por enseñarme y guiarme en un comienzo y por darme la autonomía que necesité en el último tiempo.

A la Dra. Jenny Fiedler por aceptar ser mi directora de tesis, por sus significativos consejos y revisiones.

A la comisión evaluadora, especialmente a la Dra. Amalia Sapag, por sus valiosísimas correcciones al escrito.

A todos mis compañeros de laboratorio, particularmente, a Pablo y a Roberto por su colaboración; a Jose por contagiarme todos los días con su alegría; a María Karla y Naty, por sus cariñosos consejos y a la Isi, mi amiga querida, por su contención en todos los aspectos. Todos hicieron que mi estadía en el laboratorio fuera especial y muy gratificante.

A la Dra. Carolina Ribeiro por su enorme apoyo y confianza.

A Don Víctor Troncoso, por su gran disposición. Gracias a su ayuda pude realizar muchos de los experimentos mostrados en esta tesis.

A mis padres, Verónica y Gustavo, porque debido a su esfuerzo y apoyo he llegado a estas instancias. Esto es por ustedes, mil gracias.

A mis queridísimas tías, Yuvinza, Mirna y Mireya, y mis primas, Javiera, Daniela y Romina, porque siempre han creído en mí.

Muy especialmente, a mi hermanita Constanza, por su sinceridad y su cariño incondicional. Gracias por tu paciencia hermanita, te quiero mucho mucho.

Finalmente, le agradezco enormemente a mi pololo Tomás que con todo su amor y comprensión me ha apoyado durante este largo trayecto. No me imagino un compañero mejor que tú.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Células troncales.....	1
1.1.1. Células troncales y regeneración .....	2
1.1.2. Células troncales embrionarias .....	3
1.1.3. Células troncales adultas.....	4
1.2. Factores neurogénicos .....	8
1.3. Quimioquinas.....	10
1.3.1. Quimioquinas en el sistema nervioso .....	12
1.3.2. Alfa - quimioquina CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7.....	13
1.3.3. Alfa - quimioquinas en la neurogénesis en médula espinal.....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
4.1. Materiales .....	18
4.1.1. Medios de cultivo y suplementos .....	18
4.1.2. Proteína recombinante y antagonista farmacológico .....	18
4.1.3. Reactivos para inmunofluorescencia .....	19
4.1.4. Reactivos para los análisis de western blot.....	19
4.1.5. Reactivos para la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa.....	20
4.1.6. Animales.....	22
4.1.7. Líneas celulares .....	22

4.2.	Métodos .....	22
4.2.1.	Cultivos de células troncales neurales .....	22
4.2.2.	Ensayo de diferenciación .....	23
4.2.3.	Extracción de RNA y transcripción inversa .....	23
4.2.4.	Reacción en cadena de la polimerasa .....	24
4.2.5.	Inmunofluorescencia.....	24
4.2.6.	Preparación de extractos de proteínas.....	25
4.2.7.	Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	25
4.2.8.	Electrotransferencia y visualización de proteínas.....	26
4.2.9.	Análisis de western blot.....	26
4.2.10.	Análisis funcionales.....	27
4.2.11.	Imagenología .....	27
4.2.12.	Análisis estadístico .....	27
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1.	Generación de cultivos de CTNs obtenidas a partir de ME de ratón en estadio embrionario E18,5 .....	28
5.2.	Determinación de la presencia de las alfa-quimioquinas y sus receptores correspondientes en ME y en neuroesferas derivadas de ella.....	33
5.3.	Efectos de las alfa-quimioquinas sobre la diferenciación de las CTNs cultivadas como neuroesferas derivadas de la ME .....	39
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1:</b> Proceso de neurogénesis .....	5
<b>FIGURA 2:</b> Clasificación de las cuatro familias de quimioquinas y sus receptores correspondientes .....	11
<b>FIGURA 3:</b> Neuroesferas secundarias cultivadas en suspensión .....	29
<b>FIGURA 4:</b> Presencia de RNAs mensajeros de marcadores neurales en neuroesferas de ME en suspensión .....	30
<b>FIGURA 5:</b> Cambios morfológicos de las neuroesferas durante la adhesión a poli-D-lisina en ausencia de factores mitogénicos .....	31
<b>FIGURA 6:</b> Niveles de RNA mensajero de marcadores neurales en neuroesferas de ME adheridas a poli-D-lisina .....	31
<b>FIGURA 7:</b> Inmunofluorescencia de marcadores neurales en neuroesferas de ME luego de 4 días de diferenciación .....	32
<b>FIGURA 8:</b> Detección de los RNAs mensajeros de la quimioquina CXCL1 y sus receptores CXCR1 y CXCR2 en neuroesferas de ME durante la diferenciación .....	33
<b>FIGURA 9:</b> Detección del RNA mensajero de la quimioquina CXCL12 y el de sus receptores CXCR4 y CXCR7 y las proteínas de ellos en ME .....	34
<b>FIGURA 10:</b> Detección de los RNAs mensajero de CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7 .....	35
<b>FIGURA 11:</b> Detección de los receptores CXCR4 y CXCR7 en neuroesferas a cuatro días de diferenciación .....	36
<b>FIGURA 12:</b> Detección de CXCR4 en las CTNs de la ME .....	37
<b>FIGURA 13:</b> Detección de CXCR7 en las CTNs de la ME .....	38
<b>FIGURA 14:</b> Cambios del RNA mensajero de CXCL12 y sus receptores en neuroesferas de ME durante la diferenciación en dos estadios embrionarios: 14,5 y 18,5 días .....	40
<b>FIGURA 15:</b> Efectos de CXCL12 y AMD3100 en la diferenciación de neuroesferas de ME .....	42



<b>FIGURA 16:</b>	Cuantificación del efecto de CXCL12 y AMD3100 en la diferenciación de neuroesferas de ME .....	43
<b>FIGURA 17:</b>	Modelo tentativo del rol de CXCR4 y CXCR7 en la diferenciación de CTNs de ME.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.....	19
<b>Tabla 2:</b> Anticuerpos utilizados en los análisis de western blot .....	20
<b>Tabla 3:</b> Partidores utilizados en la PCR .....	21

## **ABREVIATURAS**

<b>BDNF</b>	: factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>CNTF</b>	: factor neurotrófico ciliar
<b>CT</b>	: célula troncal
<b>CTN</b>	: célula troncal neural
<b>DMEM</b>	: medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMEM-F12</b>	: mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y nutrientes F12
<b>EGF</b>	: factor de crecimiento epidérmico
<b>FGF</b>	: factor de crecimiento de fibroblastos
<b>GAPDH</b>	: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	: proteína ácida fibrilar glial
<b>MAG</b>	: glicoproteína asociada a mielina
<b>MAP2</b>	: proteína asociada a microtúbulos 2
<b>ME</b>	: médula espinal
<b>NGF</b>	: factor de crecimiento nervioso
<b>pb</b>	: pares de bases
<b>PCR</b>	: reacción en cadena de la polimerasa
<b>SBF</b>	: suero bovino fetal
<b>SDS</b>	: dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SOX2</b>	: factor de transcripción codificado por la región determinante sexual Y-box2
<b>SVZ</b>	: zona subventricular
<b>TGF</b>	: factor de crecimiento transformante
<b>VEGF</b>	: factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

El recambio de elementos celulares en el tejido nervioso es sustentado por la existencia de una célula troncal neural, responsable del proceso de neurogénesis a través del cual se generan neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Recientemente se han identificado algunas quimioquinas con la capacidad de regular el proceso de neurogénesis a partir de una célula troncal neural. En particular, se ha descrito que la alfa-quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 participan en el desarrollo de estructuras del sistema nervioso central y regulan procesos de proliferación y diferenciación en el cerebro adulto. Sin embargo, el rol que cumplen las alfa-quimioquinas y específicamente la quimioquina CXCL12 y sus dos receptores CXCR4 y CXCR7 regulando capacidades funcionales de las células troncales neurales de la médula espinal, aún no está claro.

Por lo anterior, esta tesis postula que **“las alfa-quimioquinas regulan el proceso de diferenciación de células troncales neurales cultivadas como neuroesferas obtenidas de médula espinal de ratones”**. Para evaluar esta hipótesis se utilizaron neuroesferas derivadas de la médula espinal de embriones en estadio E18,5. Se demostró que estas neuroesferas contenían células troncales neurales evaluando las capacidades de autorrenovación y diferenciación. En ellas se determinó que sólo estaba presente el RNA mensajero de la alfa-quimioquina CXCL12 y sus receptores y no el de CXCL1 y sus receptores mediante RT-PCR. De esta manera el estudio se focalizó en CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7. Mediante inmunofluorescencia se detectaron estos receptores en neuroesferas luego de 4 días de diferenciación y se observó que estaban en las células troncales neurales. Finalmente se analizó el proceso de diferenciación, evaluando mediante inmunofluorescencia marcadores de linajes neurales. Se observó que CXCL12 favoreció la diferenciación astrogial sobre la neuronal, comparando la intensidad de fluorescencia de marcadores neurales como GFAP y beta-III-tubulina y que, aparentemente, tanto CXCR4 como CXCR7 participan en el proceso de diferenciación, deducido de los resultados conseguidos con el uso del antagonista de CXCR4, AMD3100.

En consecuencia, es posible proponer a la quimioquina CXCL12 como un blanco terapéutico pudiendo bloquearla en casos de lesión a la médula espinal, donde ésta se ve aumentada, para así impedir que las células troncales endógenas se diferencien a astrocitos.

## **STUDY OF ALPHA-CHEMOKINES IN THE REGULATION OF DIFFERENTIATION OF MOUSE SPINAL CORD NEUROSPHERES**

### **SUMMARY**

The renewal of cells in nervous tissue is sustained by neural stem cells, which are responsible for the neurogenesis that originates neurons, astrocytes and oligodendrocytes. The mechanisms that regulate the functional capabilities of neural stem cells in the spinal cord are unknown. Recently, some chemokines have been identified as regulating factors of neurogenesis of neural stem cells. In particular, the CXCL12 alpha-chemokine and its receptor CXCR4 participate in the development of central nervous system structures and regulate proliferation and differentiation processes in the adult brain. However, the role of alpha-chemokines and specifically of CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7, on the regulation of functional properties of neural stem cells from spinal cord is not clear yet.

With this background, this thesis postulates that **“alpha-chemokines regulates the differentiation of neural stem cells cultured as neurospheres obtained from mouse spinal cord”**. To evaluate this hypothesis, neurospheres from E18,5 mouse spinal cord were used. It was shown that the neurospheres had neural stem cells by assessing their self-renewal and differentiation capabilities. The presence of mRNA of alpha chemokines CXCL1 and CXCL12 and their receptors in neurospheres was evaluated by RT-PCR. Showing that neurospheres have CXCL12 and its receptors mRNA and not CXCL1 and its receptors mRNA. Therefore, the investigation continued with CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7. Both receptors were detected on neural stem cells by immunofluorescence after 4 days of differentiation. Finally, the process of differentiation was analyzed by immunofluorescence of neural markers. The comparison between GFAP and beta-III-tubulin fluorescence intensity indicates that CXCL12 promotes astroglial over neuronal differentiation. Apparently, inferred from the use of the CXCR4 antagonist AMD3100, both CXCR4 and CXCR7 participate in the differentiation of the neural stem cells from spinal cord.

Given the results obtained in this thesis, it is possible to propose CXCL12 as a potential therapeutic target: blocking it to promote neuronal differentiation, for example, in cases of spinal cord injury, in which CXCL12 mRNA is increased; preventing differentiation of neural stem cells to astrocytes.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Células troncales

Las células troncales (CTs) se definen como células que pueden producir continuamente células hijas inalteradas, y que poseen la capacidad de producir células hijas que tienen propiedades diferentes, más restringidas. Estas características definen a las CTs y corresponden a la autorrenovación y al potencial de diferenciación, respectivamente (Hall y Watt, 1989; Smith, 2006). La autorrenovación se refiere a ciclos de división celular que repetidamente generan, al menos, una hija equivalente a la célula madre con capacidad latente de diferenciación. El potencial de diferenciación es el que da cuenta de las opciones de compromiso disponibles para una célula, y puede ser desde totipotente, si es que la célula es capaz de generar un organismo completo, hasta unipotente, si genera sólo un linaje (Smith, 2006).

Durante el desarrollo, las CTs cumplen el rol de construir y formar tejidos y órganos (Liu y cols., 2010). En un organismo adulto, la función de las CTs corresponde al mantenimiento de la homeostasis tisular reemplazando células disfuncionales o senescentes y generando células nuevas durante el tiempo de vida del organismo (Snippert y Clevers, 2011). Además, las CTs tienen una importante función en la reparación de tejidos en caso de lesión reemplazando las células perdidas (Li y Jiang, 2011). La habilidad que tienen las CTs para controlar la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, las distingue de las células neoplásicas.

En mamíferos adultos, las CTs se encuentran en varios tejidos, incluyendo la médula ósea, el músculo esquelético, el intestino, el hígado, la epidermis, y la retina (Nirmalanandhan y Sittampalam, 2009). El hecho de que las CTs sean capaces de diferenciarse en varios tipos celulares (Li D y cols., 2011) es la razón principal por la que han sido utilizadas como modelo para eventuales tratamientos de enfermedades. De esta manera, un amplio rango de CTs provenientes de diferentes fuentes han sido investigadas por su potencial en terapias regenerativas (Hipp y Atala, 2008).

### 1.1.1 Células troncales y regeneración

La identificación, caracterización y purificación de CTs, así como su actual utilización en modelos de terapia celular con las CTs hematopoyéticas, representan un sustento sólido para la aplicación de estas células en terapia regenerativa dirigida al tratamiento de distintas patologías. Así, se ha propuesto que las CTs pueden jugar un rol importante tanto en el tratamiento de enfermedades en las que existe daño tisular agudo, como infartos agudos al miocardio o accidentes cerebrovasculares, como en enfermedades crónicas tales como Alzheimer o Parkinson, diabetes u otras (Ratajczak y cols., 2008).

Dentro de las distintas patologías degenerativas que afectan al sistema nervioso, las lesiones a la médula espinal (ME) constituyen un grupo al que podría aplicarse esta terapia celular. El trauma en la ME resulta en una serie de cambios fisiopatológicos en el tejido: muchas neuronas y oligodendrocitos mueren inmediata o progresivamente, se forman cavidades císticas que junto con los astrocitos reactivos forman una cicatriz glial, muchos axones ascendentes y descendentes son interrumpidos por la lesión y sufren degeneración. También las células inflamatorias invaden el SNC desde la periferia y las microglías residentes del tejido se activan fagocitando los residuos celulares. Todas estas características hacen que la lesión tenga una capacidad regenerativa muy disminuida (Schwab y Bartholdi, 1996).

La investigación epidemiológica ha demostrado que las lesiones a la ME afectan de 10 a 40 personas en un millón por año en países desarrollados como Estados Unidos y los costos económicos asociados a estos pacientes se estiman en billones de dólares anuales. Por otro lado, menos del 1% de las personas que presentan una lesión en la ME recuperan completamente su función neurológica y muchas de estas lesiones se traducen en estados de parálisis parcial o completa (Cadotte y Fehlings, 2011).

Los tratamientos actuales para las lesiones a la ME son sólo paliativos e involucran inmunosupresores esteroidales, cirugías para descomprimir y estabilizar la ME y rehabilitación (Obermair y cols., 2008). Sin embargo, es necesario implementar terapias celulares que ayuden a traspasar los múltiples obstáculos que presentan estas lesiones para la regeneración. Se ha estudiado la opción del trasplante de CTs para que éstas actúen como puente en el sitio de la

lesión, dando un sustrato para las fibras nerviosas nuevas, entregando factores tróficos y reemplazando neuronas y oligodendrocitos perdidos. No obstante, son terapias muy difíciles de adoptar en pacientes con esta lesión por el riesgo de la formación de tumores y el rechazo inmunológico (Willerth y Sakiyama-Elbert, 2008).

De esta manera, un objetivo más a largo plazo es entender la biología y el microambiente de las CTs de la ME para que cuando exista una lesión se logre estimular su proliferación y su diferenciación a nuevas neuronas y oligodendrocitos remielinizantes. La combinación de distintas terapias es la solución para la lograr la mejora funcional en esta enfermedad con una fisiopatología tan multifacética (Obermair y cols., 2008).

### Tipos de células troncales

#### 1.1.2 Células troncales embrionarias

Las CTs embrionarias son células pluripotentes aisladas de la masa interna del blastocito durante los 5 a 8 días posteriores a la fecundación. Estas células se caracterizan por su capacidad ilimitada de autorrenovación, así como sus amplias habilidades para diferenciarse en todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales embrionarias (Martin, 1981). Pese a esta capacidad, el posible uso clínico de estas células se encuentra condicionado por diversos obstáculos que lo restringen. Primero, el método de obtención involucra el uso y destrucción de embriones, lo que representa restricciones éticas y legales que limitan su utilización. Segundo, explicado sobre la base de su alto potencial proliferativo, estas células se caracterizan por una gran capacidad de formación de tumores una vez trasplantadas (Kooreman y Wu, 2010). Finalmente, durante la diferenciación, las células troncales embrionarias presentan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (Drukker, 2004), lo que podría provocar el rechazo por parte del organismo receptor en estrategias de uso alogénico. Por estas razones, aún no es posible que exista una terapia con CTs embrionarias de humanos y por lo tanto ha sido necesario investigar otros tipos de CTs, como las adultas.



### 1.1.3 Células troncales adultas

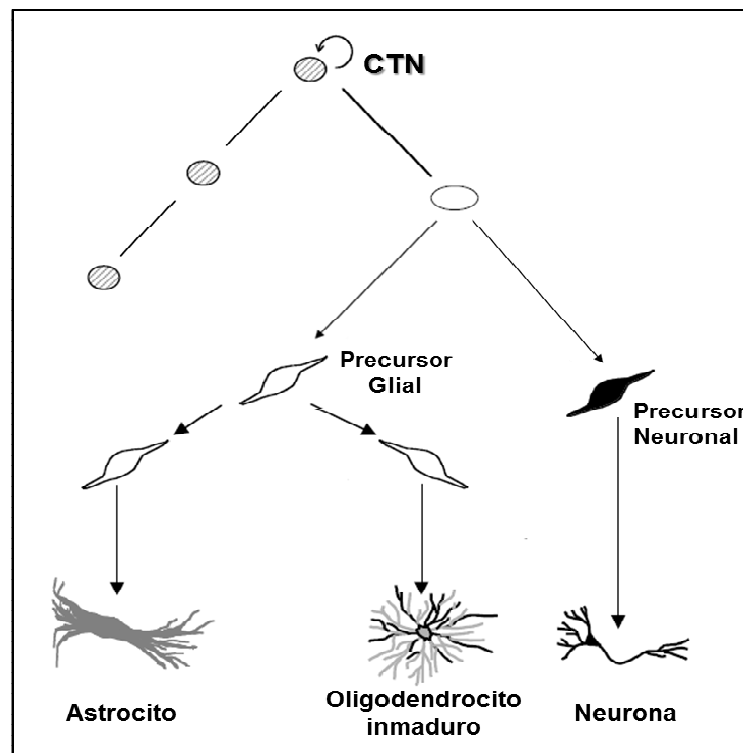
Las CTs adultas son células multipotenciales, es decir, pueden formar múltiples linajes celulares que constituyen un tejido completo (Smith, 2006). Representan la base de la homeostasis de los órganos y de la regeneración que sigue a una herida o lesión (Simons y Clevers, 2011). Las CTs adultas les permiten a la sangre, huesos, epitelios, gametos, músculos y muchos otros tejidos ser renovados con células nuevas a lo largo de la vida (Morrison y Spradling, 2008). Se encuentran en microambientes celulares que les brindan el apoyo físico y señales necesarias para mantener la autorrenovación, microambientes denominados nichos, de los cuales existen varios en el organismo adulto, tales como el hematopoyético (Lilly y cols., 2011) y el epitelial (Ordonez y Di Girolamo, 2011).

Además, las CTs adultas representan una alternativa para el desarrollo del trasplante autólogo de células, en el cual no se produciría el rechazo inmunológico que se puede observar como consecuencia del uso de las CTs embrionarias. Desde el punto de vista biológico, las CTs adultas también brindan mayor seguridad por cuanto no presentan la capacidad tumorigénica. Por otra parte, el posible uso de CTs adultas evita los problemas éticos relacionados con la obtención de las CTs embrionarias.

Existen aplicaciones clínicas establecidas sobre la base de CTs adultas que se han utilizado como reemplazo celular en el sistema hematopoyético en los trasplantes de médula ósea (Jenq y van den Brink, 2010), lo cual representa una clara evidencia de la factibilidad de ser utilizadas con fines terapéuticos. De hecho, actualmente, el trasplante de CTs hematopoyéticas forma parte del esquema terapéutico para algunas enfermedades hemato-oncológicas, así como también para el tratamiento de algunas formas severas de enfermedades inmunológicas. En enfermedades autoinmunes se realiza este trasplante para eliminar el sistema inmune del hospedero y lograr que con el trasplante adquiera uno nuevo que no sea capaz de reconocer los autoantígenos (Rogojan y Frederiksen, 2009). Debido a estas exitosas aplicaciones, la búsqueda de CTs en otros órganos permitió identificar su presencia en el sistema nervioso central, constituyendo éste el primer sistema con órganos sólidos en el que se identificaron CTs adultas.

## Células troncales neurales

El cerebro de un mamífero adulto es un órgano con un bajo recambio celular y escasa capacidad regenerativa frente a un daño, razón por la que durante mucho tiempo se consideró un tejido postmitótico, en el que no existían CTs. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que en el cerebro adulto existen tanto la capacidad de autorrenovación como la de diferenciación por ciertas poblaciones celulares, denominadas actualmente células troncales neurales (CTNs) (Reynolds y Weiss, 1992; Temple y Alvarez-Buylla, 1999).



**Figura 1: Proceso de neurogénesis.** Las CTNs tienen las capacidades de autorrenovación y diferenciación. Al proliferar, la CTN genera otra CTN y precursores neurales con distintos grados de compromiso los que darán origen, finalmente, tanto a neuronas como a células gliales (astrocitos u oligodendrocitos) (Modificado de Grandbarbe y cols., 2003).

Las CTNs son células multipotentes que participan del proceso de neurogénesis. Este proceso ocurre cuando una única CTN es capaz de proliferar para autorrenovarse, manteniendo una población de células indiferenciadas en el tejido y, a la vez, puede generar precursores comprometidos los cuales finalmente darán origen a los tres linajes celulares del sistema nervioso central: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Davis y Temple, 1994) (**Figura 1**).

Las CTNs fueron primero identificadas en el cerebro, específicamente, en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo. Desde la SVZ ellas se dividen para generar progenitores que migran a través de la corriente migratoria rostral para diferenciarse en el bulbo olfatorio y desde la capa subgranular, ellas se dividen para integrar el circuito neural hipocampal (Luskin, 1993; Luskin y Boone, 1994).

En la SVZ, que es donde mejor está caracterizado el nicho neurogénico, estas células poseen características morfológicas y expresan marcadores moleculares compartidos con los astrocitos (Chojnacki y cols., 2009) y su microambiente se compone tanto de células endodimales en reposo como de una combinación heterogénea de células subendodimales que incluyen astrocitos, progenitores neurales, neuroblastos, tanicitos, microglías y vasos sanguíneos (Pastrana y cols., 2009). Todas estas células cumplen un rol fundamental en la mantención del nicho y en la generación de las nuevas células nerviosas. De esta manera, las células endodimales actúan de soporte para los astrocitos, que corresponden a las CTNs. Estos astrocitos a su vez extienden prolongaciones a los vasos sanguíneos y dan origen a las células progenitoras intermedias y a precursores de oligodendrocitos. Las células progenitoras intermedias generan células que poseen un grado mayor de compromiso neuronal, conociéndose como neuroblastos, los cuales migran a través de la corriente migratoria rostral. En conclusión, a partir de las células intermedias o de los precursores de oligodendrocitos es posible generar tanto neuronas como células gliales que son las que finalmente se integrarán al tejido nervioso (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

El aislamiento de las CTNs desde su nicho natural y su mantención *in vitro* han sido problemáticos debido a que se desconocen los factores y contactos celulares requeridos para mantener estas células en su estado fisiológico. Los factores de crecimiento EGF (factor de

crecimiento epidérmico) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) han sido claves para mantener *in vitro* la división prolongada y sostenida de las células con propiedades de CTNs (Conti y cols., 2005). Existen dos formas de cultivar las CTNs, el cultivo en monocapa y el de neuroesferas. En el primero, las células se mantienen adheridas sobre diversas matrices, mientras que en el segundo, las neuroesferas representan agregados celulares que proliferan en condición de suspensión, cada uno derivado de una CTN. Ambas formas de cultivo poseen ventajas; mientras el cultivo en neuroesferas teóricamente recrea mejor una situación fisiológica en la que las células mantienen el contacto celular y con moléculas de matriz extracelular, el cultivo en monocapa logra mantener un potencial de diferenciación más neuronal que glial (Conti y Cattaneo, 2010). Finalmente, cada una de las formas de cultivo tiene sus limitaciones, que surgen por la complejidad del tipo celular que se desea mantener. El cultivo en neuroesferas mantiene una combinación heterogénea de células lo que impide el estudio de poblaciones celulares específicas y el cultivo en monocapa limita la proliferación del cultivo en el tiempo (Sun y cols., 2011). Aparentemente, las neuroesferas son más accesibles por representar la primera forma de cultivo para estudiar las CTNs y por ser la más utilizada (Aguirre y cols., 2010; Reynolds y Weiss, 1992).

### Células troncales neurales de la médula espinal

En la ME adulta, al igual que en el cerebro, se han identificado CTNs. Al cultivar tres zonas diferentes de dicho tejido, médula cervical, torácica y lumbar, en todas se logró la formación de neuroesferas tanto primarias como secundarias al exponerlas a los mitógenos EGF y FGF, comprobándose además que estas células mantienen su potencial de diferenciación (Weiss y cols., 1996). Sin embargo, a diferencia del cerebro, en la ME adulta el número de CTNs es más reducido y no existe una capa subependimal definida que las contenga. Más bien se ha demostrado que, al ser evaluadas *in vitro*, son las células endodimales la fuente primaria de actividad de CTN.

Al estudiar el microambiente o nicho de estas células endodimales, se identificaron tres tipos celulares: células endodimales cuboidales, células endodimales radiales y tanicitos, todas células ciliadas que se encuentran en contacto con el canal central y que en su conjunto se

denominan células endodimales (Meletis y cols., 2008). Este microambiente alrededor del canal central está en cercana asociación con los vasos sanguíneos, pero a diferencia de la SVZ involucra más células endodimales que subendodimales, siendo la distribución de estas células con potencial de CTN más dorsal que ventral dentro del canal central de la ME (Hamilton y cols., 2009).

Estudios recientes se han enfocado en descubrir cuál es la función de cada tipo celular en la ME. Se sabe que los astrocitos dan origen a nuevas neuronas y actúan como CTNs en la zona subventricular (SVZ) y en el giro dentado del hipocampo (Chojnacki y cols., 2009; Pastrana y cols., 2009). En cambio, en la ME, sólo se habían identificado como posibles CTNs a las endodimales, aun cuando en ella existen tres tipos celulares que podrían actuar como CTNs y contribuir al recambio celular: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células endodimales antes mencionadas. Con técnicas de mapeo de destino genético se descubrió que en la ME intacta son los progenitores de oligodendrocitos los que son capaces tanto de autorrenovarse como de generar un número en aumento de oligodendrocitos maduros y no así las células endodimales y los astrocitos, los cuales sólo proliferan para mantener los tamaños de su población. En cambio, en caso de lesión se reclutan los tres tipos celulares para generar su progenie, en sitios complementarios, durante la formación de la cicatriz y la remielinización. Finalmente, se concluyó que sólo las células endodimales muestran una multipotencialidad y actividad de CTNs tanto en médula intacta como dañada (Barnabé-Heider y cols., 2010).

## **1.2 Factores neurogénicos**

El proceso de neurogénesis ha sido descrito principalmente en la SVZ y se ha propuesto que en él participan varios mecanismos que involucran moléculas difusibles de señalización como neurotrofinas, neurotransmisores, neuropéptidos y factores de crecimiento (Bath y Lee, 2010). Dentro de las neurotrofinas clásicas podemos reconocer el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4). Éstas poseen distintos efectos sobre las CTNs, los progenitores neurales o las células diferenciadas, para lo cual interactúan con la familia de receptores de neurotrofinas Trk y p75. De esta manera factores como el BDNF y el NGF regulan la proliferación, supervivencia y

diferenciación de las CTNs (Fiore y cols., 2002; Pencea y cols., 2001). Otros factores neurotróficos también pueden regular la actividad funcional de las CTNs. Entre ellos, el FGF regula la neurogénesis a través de modulación de la proliferación y supervivencia de las CTNs regulando el ciclo celular (Zheng y cols., 2004). De manera similar, el EGF estimula la proliferación de las CTNs en la SVZ y la inhibición de su señalización produce una disminución de la migración de CTNs derivadas de la SVZ en un modelo de inducción por daño tisular (Aguirre y Gallo, 2007). Aunque no es un factor originalmente descrito como neurotrófico, el factor de crecimiento transformante (TGF) también regula la proliferación de células del SVZ y actúa mediante el mismo receptor que EGF, EGFR. Se ha visto que ratones que carecen de TGF- $\alpha$  tienen tasas de proliferación celular disminuidas en la SVZ y menor cantidad de células nacientes en el bulbo olfatorio (Tropepe y cols., 1997). Finalmente, el factor neurotrófico ciliar (CNTF) se sintetiza constitutivamente en el sistema nervioso central, predominantemente en astrocitos, y su receptor se localiza en la SVZ del adulto (Dallner y cols., 2002). Desde el punto de vista funcional, la administración de CNTF estimula la proliferación de las CTN en la SVZ y en el giro dentado (Emsley y Hagg, 2003).

Una fuente complementaria de factores reguladores de la neurogénesis ha sido identificada sobre la base de estudios que caracterizan el microambiente local en zonas con actividad neurogénica. En este sentido, las primeras observaciones que demostraron la existencia de neurogénesis en cerebro adulto identificaron zonas específicas con esta actividad caracterizadas por una estrecha relación con estructuras vasculares (Palmer y cols., 2000). Así, el nicho neurovascular que se encuentra adyacente a las CTNs comprende moléculas de matriz extracelular, factores difusibles y señales circulantes que en conjunto regulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de las CTs (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Morrison y Spradling, 2008; Walker y cols., 2009). Factores clásicamente identificados como reguladores angiogénicos han sido ahora reconocidos también por su capacidad de regular directamente el proceso de neurogénesis. El conjunto de estos factores ha sido agrupado bajo la denominación de angioneurinas (Zacchigna y cols., 2008), entre las cuales se encuentran factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas. Una de las familias de angioneurinas mejor caracterizada en este contexto es la codificada por los distintos genes correspondientes al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los cuales tienen efectos directos sobre la proliferación de las CTNs *in vitro* y la neurogénesis en la SVZ adulta *in vivo* (Sun y cols., 2006; Wittko y cols., 2009).

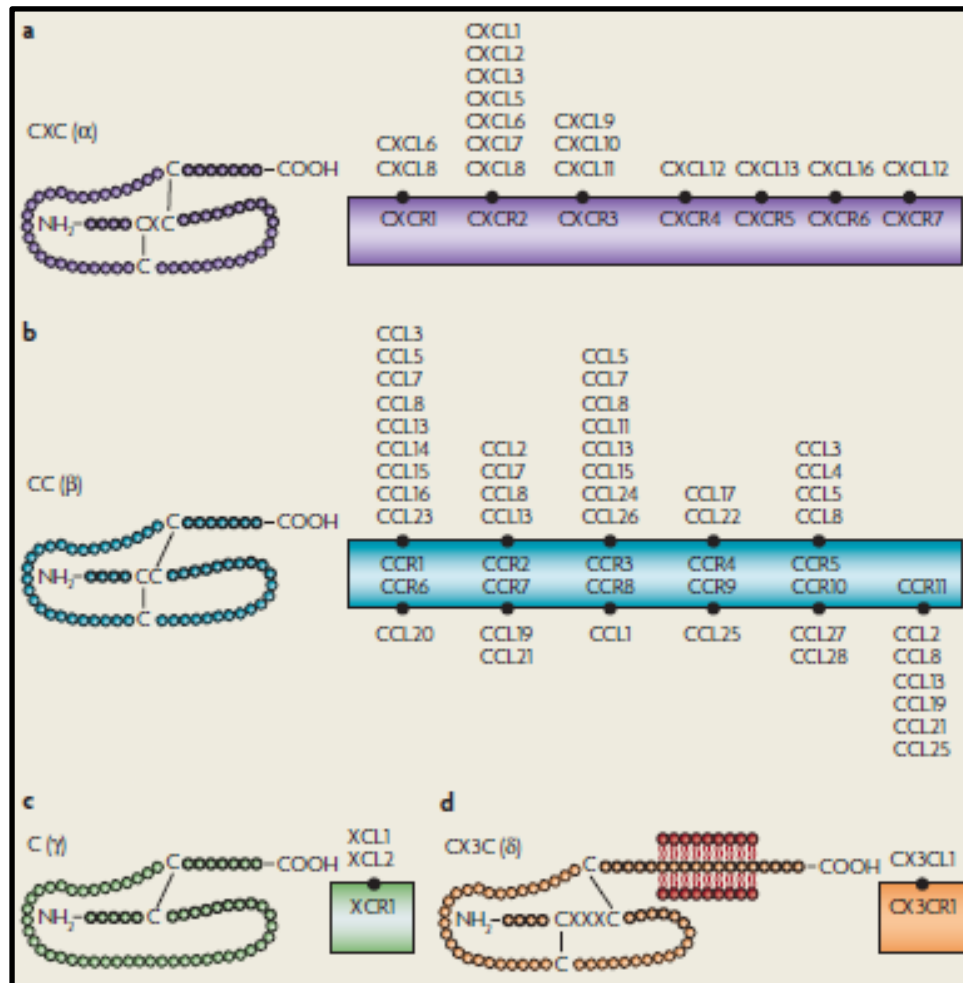
Según lo anterior, la vasculatura puede ser un blanco útil para una posible terapia que induzca la neurogénesis adulta a través de la regulación de la secreción, o uso de factores propios del tejido endotelial. Sin embargo, la composición funcional de angioneurinas en el nicho neurovascular de la ME es desconocida.

### 1.3 Quimioquinas

Las quimioquinas, también clasificadas como angioneurinas, corresponden a una gran familia de proteínas secretadas, con más de 50 miembros. Se caracterizan porque estructuralmente se dividen en cuatro familias distintivas de acuerdo al número de las cisteínas N-terminales conservadas y al espaciamiento entre ellas (**Figura 2**): la subfamilia CXC o alfa-quimioquinas a la que pertenecen CXCL8 o IL-8, CXCL1 o GRO- $\alpha$ , CXCL2 o GRO- $\beta$ , CXCL12 o SDF1 y CXCL10 o IP10, entre otras; la subfamilia CC o beta-quimioquinas que incluye MIP1-a, MIP1-b, MCP1 y RANTES; la subfamilia CX<sub>3</sub>C o delta-quimioquinas de la cual se conoce la fractalkina o CX3CL1 y la subfamilia C o gamma-quimioquinas, representada por dos quimioquinas XCL1 y XCL2 (Rostkne y cols., 2011; Zlotnik y Yoshie, 2000).

Las quimioquinas ejercen su acción biológica a través de receptores de siete dominios de transmembrana, generalmente acoplados a proteína G. Estos receptores son nombrados según su clasificación de subfamilia de quimioquina. Se conocen siete receptores de CXC, desde el CXCR1 al CXCR7, y once receptores de CC, desde el CCR1 al CCR11. Además, existen los receptores llamados CX<sub>3</sub>CR1 y XCR1, que unen fractalkina y las dos gamma-quimioquinas, respectivamente (Bonecchi y cols., 2009).

Las quimioquinas son producidas por una variedad de tipos celulares tanto constitutivamente como en respuesta a estímulos inflamatorios (D'Ambrosio y cols., 2003). Las actividades biológicas de las quimioquinas van desde el control del tráfico leucocitario, en condiciones basales e inflamatorias, a la regulación de hematopoyesis, angiogénesis, arquitectura de tejidos y organogénesis (Rossi y Zlotnik, 2000).



**Figura 2: Clasificación de las cuatro familias de quimioquinas y sus receptores correspondientes.** a.- Familia CXC o alfa-quimioquinas, b.- Familia CC o beta-quimioquinas, c.- Familia C o gamma-quimioquinas y d.- Familia CX3C o delta-quimioquinas. La familia que se estudia en este trabajo es la CXC o alfa-quimioquinas (Rostène y cols., 2007).



### 1.3.1 Quimioquinas en el sistema nervioso

Además de su acción en el sistema inmune, diversos estudios han demostrado que las quimioquinas tienen funciones regulatorias sobre el sistema nervioso (Asensio y Campbell, 1999; Meucci y cols., 1998), encontrándose tanto ellas como sus receptores en neuronas y en células gliales bajo una variedad de condiciones (Miller y cols., 2008). La función que cumplen las quimioquinas en el sistema nervioso ha sido ampliamente estudiada y actualmente se sabe que su participación implica procesos distintos a los clásicamente observados en el sistema inmune. Así, aunque las quimioquinas regulan la migración de células del sistema nervioso, también cumplen funciones específicas en procesos tales como transmisión sináptica y neuroinflamación (Rostène y cols., 2007).

Durante el desarrollo, la aparición de la quimioquina SDF1/CXCL12 y su principal receptor CXCR4 preceden a la aparición del sistema inmune (Huisin y cols., 2003), lo que indica que su función original no se restringe sólo a este sistema. De hecho, a diferencia de otras quimioquinas cuyos niveles aumentan en estados de inflamación, la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 siempre están en altos niveles en muchos tejidos, incluido el sistema nervioso durante el desarrollo y en el estado adulto (Banisadr y cols., 2002; Stumm y cols., 2003). Además, receptores de alfa-quimioquinas como CXCR4 y CXCR3 se encuentran en las regiones neurogénicas de cerebros postnatales, específicamente CXCR4 se colocaliza con marcadores característicos de las CTNs como la nestina (proteína de los filamentos intermedios), el TLX (factor transcripcional importante para la proliferación) y la Ki67 (proteína característica de la división celular) (Tran y cols., 2007). Por otro lado, los ratones knockouts de CXCL12 y CXCR4 son inviábiles y mueren en el estadio E17 con anomalías severas que afectan la migración de precursores neurales en el cerebelo, desarrollo anormal del giro dentado y defectos en la migración de la interneurona en la corteza, además de problemas cardíacos (Ma y cols., 1998).

Funcionalmente, las quimioquinas participan regulando diversos procesos cerebrales. Por ejemplo, se ha descrito que CXCL12 dirige la localización de numerosos tipos celulares en el cerebro durante el desarrollo como las células del gránulo hipocámpal (Bagri y cols., 2002), las células de Cajal Retzius (Paredes y cols., 2006), las neuronas granulares cerebelares (Ma y cols.,

1998; Zou y cols., 1998) y las interneuronas corticales (Stumm y cols., 2003; Tiveron y cols., 2006). CXCL12 también ha sido involucrada en el reclutamiento celular a zonas isquémicas (Schönemeier y cols., 2008b; Stumm y cols., 2002), así como en la regulación de la permanencia o salida del nicho vascular de progenitores de la SVZ (Kokovay y cols., 2010).

Además de la migración se han descrito otras funciones para las quimioquinas, por ejemplo, que las alfa-quimioquinas CXCL1, CXCL6 y CXCL8 regulan la proliferación y la diferenciación de progenitores dopaminérgicos (Edman y cols., 2008), que CXCL12 aumenta la proliferación de progenitores neurales humanos (Wu y cols., 2009) y que la inhibición de CXCR4 modula el ciclo celular de los progenitores neurales de ratón, impidiendo su autorrenovación (Li M y cols., 2011).

### 1.3.2 Alfa - quimioquina CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7

Así como CXCR4 parece ser un importante regulador de la neurogénesis en el cerebro, recientemente se descubrió otro receptor de la quimioquina CXCL12 además de CXCR4: un receptor que hasta el momento era huérfano y que ha sido denominado CXCR7 o RDC1 (Balabanian y cols., 2005). Ratones deficientes en este receptor mueren perinatalmente con defectos severos en el corazón al igual que los knockouts de CXCL12 y CXCR4 (Sierro y cols., 2007). Con el descubrimiento de CXCR7 se abrió un área de investigación para dilucidar su función.

Es factible que CXCR7 tenga alguna función distinta a la de CXCR4, ya que la distribución del mensajero de CXCL12 en el cerebro no es exactamente igual a la del mensajero de CXCR4, y la amplia distribución de la quimioquina sugiere que requiere de un segundo receptor, aunque a nivel de proteína esto no se ha estudiado (Stumm y cols., 2002). La evidencia crece al demostrar que en zonas cerebrales en las que no hay CXCR4, sí hay CXCR7, sugiriendo que CXCL12 puede ejercer efectos independientes de CXCR4, vía CXCR7 (Schönemeier y cols., 2008a).

Al estudiar con más detalle el funcionamiento de estos dos receptores de CXCL12, CXCR4 y CXCR7, y analizando específicamente su señalización, se observó en líneas celulares que aunque ambos receptores son de 7 dominios de transmembrana, la unión de la quimioquina sólo a CXCR4 gatilla la señalización dependiente de proteína  $G_{\alpha i}$ , mientras que la unión a CXCR7 no activa esta señalización (Levoye y cols., 2009). Sin embargo, estudios más recientes de transfección transitoria han caracterizado a CXCR7 como un receptor señalizador que, además de señalizar mediante proteína G, tiene un mecanismo de acción que involucra a la  $\beta$ -arrestina y la posterior estimulación de la cascada de la MAP quinasa (Rajagopal y cols., 2010).

Las funciones de ambos receptores han sido bien estudiadas en líneas celulares de cáncer humano. Se ha visto que la señalización de CXCR7, al igual que la de CXCR4, puede promover la expansión y metástasis de ciertos tipos de tumores y que podría ser un factor de pronóstico y un blanco para el desarrollo de nuevas drogas anticáncer y antimetástasis (Maksym y cols., 2009).

No obstante, a nivel fisiológico son pocos los antecedentes que se manejan con respecto a la interacción de CXCR4 y CXCR7. En pez cebra se ha visto durante el desarrollo que ambos receptores están implicados en la migración de las células del primordio. Mientras un grupo propone que la señalización activa de CXCR7 permite la migración de la línea lateral del primordio (Valentin y cols., 2007), otro grupo plantea que mientras CXCR4 se encuentra en las células germinales, CXCR7 se encuentra en las células adyacentes o somáticas, cumpliendo la función de “receptor señuelo” para generar un gradiente de CXCL12, a través del secuestro del ligando. De esta forma, este gradiente influiría en la función de CXCR4 controlando la disponibilidad del ligando (Boldajipur y cols., 2008).

Esta misma discusión se ha trasladado más recientemente a la migración de otro tipo celular durante el desarrollo, el de las interneuronas corticales. Por una parte, se ha propuesto una función autónoma y señalización activa de CXCR7, regulando el movimiento de la interneurona y el posicionamiento laminar (Wang y cols., 2011), mientras que otras observaciones muestran que CXCR7 sólo actúa regulando la sensibilidad del receptor CXCR4 por la quimioquina (Sánchez-Alcañiz y cols., 2011). Estos antecedentes dan cuenta de la interesante interacción entre ambos receptores la que, por supuesto, necesita ser elucidada.

### 1.3.3 Alfa - quimioquinas en la neurogénesis en médula espinal

Las alfa-quimioquinas CXCL1 y CXCL12 se han descrito como importantes mediadores de enfermedades que afectan a la ME, tales como esclerosis múltiple, encefalomiелitis viral y procesos inflamatorios que se desarrollan luego de una lesión a la ME (Hoskin y cols., 2010; Kang y cols., 2011; Kerstetter y cols., 2009; Rostène y cols., 2007; Rubio y Sanz-Rodriguez, 2007).

En el contexto de neurogénesis, se ha descrito que la quimioquina CXCL1, a través de su receptor CXCR2, promueve la proliferación (Miller, 2002) e inhibe la migración de los precursores de oligodendrocitos de la ME (Tsai y cols., 2002). Además se ha visto que la inhibición de CXCR2 promueve la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos de la ME *in vitro*; asimismo, esta inhibición favorece la remielinización y la mejora funcional en ratones EAE, modelo animal de la esclerosis múltiple (Kerstetter y cols., 2009).

Por otro lado, los roles de CXCL12 y de su receptor CXCR4 en la neurogénesis en la ME se han descrito en mayor detalle. La quimioquina y este receptor están presentes durante el desarrollo de la ME y regulan la migración de precursores neurales en este tejido (Luo y cols., 2005). CXCL12 también regula la trayectoria del axón que nace desde el tubo neural, para lo cual el receptor CXCR4 se encuentra en el axón de la neurona motora, específicamente en los nervios motores dorsales, siguiendo su trayectoria ventral, mientras que su ligando CXCL12 es sintetizado por las células mesenquimáticas que rodean el tubo neural ventral (Lieberam y cols., 2005). No obstante, no se ha evaluado la participación de CXCR7 en estos procesos.

Existen escasos antecedentes respecto del rol que las alfa-quimioquinas puedan tener en el proceso de neurogénesis en la ME y de su participación en eventuales procesos de regeneración de este tejido frente a daño tisular. En este sentido, trabajos recientes muestran que la aplicación de CXCL12 en un modelo de daño de ME aumenta el número de axones del tracto corticoespinal (Opatz y cols., 2009); sin embargo, se desconocen los mecanismos que expliquen este fenómeno.

Sobre la base de los antecedentes presentados, se postula en esta tesis que las **alfa-quimioquinas regulan el proceso de diferenciación de las CTNs de ME**. Específicamente, se evaluó la presencia de las quimioquinas CXCL1 y CXCL12 y sus receptores en las CTNs y su influencia sobre la diferenciación de las CTNs hacia linaje neuronal o glial.

Averiguar el rol que cumplen estas quimioquinas en la neurogénesis de ME resultaría de gran relevancia clínica. Por ejemplo, en casos de lesión a la ME, buscando inducir la diferenciación neuronal de las CTNs endógenas y así impedir la formación de la cicatriz glial, característica de estas lesiones y cuyo desarrollo impide la regeneración (Rolls y cols., 2009). Por otro lado, ahondar en las funciones de estas quimioquinas podría ser de utilidad en problemas graves de desarrollo de la ME, como la espina bífida o enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple. De esta manera las alfa-quimioquinas y su regulación funcional resultan ser de un gran interés biológico, y con este trabajo se espera contribuir a su mayor entendimiento.

## **2. HIPÓTESIS**

Las alfa-quimioquinas regulan el proceso de diferenciación de las células troncales neurales cultivadas como neuroesferas obtenidas de la médula espinal fetal de ratones.

## **3. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de las alfa-quimioquinas sobre el proceso de diferenciación de neuroesferas obtenidas de la médula espinal fetal de ratones.

### **Objetivos Específicos**

1. Generar cultivos de células troncales neurales obtenidas a partir de médula espinal de ratón en estadio embrionario E18,5.
2. Determinar la presencia de las alfa-quimioquinas y sus receptores correspondientes en la médula espinal y en las neuroesferas derivadas de ella.
3. Evaluar los efectos de las alfa-quimioquinas sobre la diferenciación de las células troncales neurales cultivadas como neuroesferas derivadas de la médula espinal.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Medios de cultivo y suplementos

De GIBCO, Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, EE.UU.), se obtuvieron la tripsina (27250-018) y los medios de cultivo DMEM (12800-017) y DMEM/ F12 (12400-024). Se obtuvieron los suplementos del cultivo N2 (17502-048), B27 (17504-044) y albumax (11020-021).

De Hyclone, ThermoScientific (Waltham, MA, EE.UU.), se obtuvo la solución de la mezcla de antibióticos de 10.000 unidades/mL de penicilina y 10.000 µg/mL de estreptomicina (SV30010). También se adquirió de esta empresa el SBF (SH30071.03).

De AppliChem (Darmstadt, Alemania) se adquirió la glucosa D (+) (A1349, 1000).

De SIGMA (St Louis, MO, EE.UU.) se obtuvo la poli-D-lisina 5 mg/mL (P7405).

De R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN, EE.UU.) se adquirieron los factores de crecimiento FGF (3139-FB-025/CF) y EGF (2028-EG-200).

#### 4.1.2 Proteína recombinante y antagonista farmacológico

De GIBCO, Invitrogen Corporation, se obtuvo la proteína recombinante SDF-1 $\alpha$  o CXCL12 (PMC1354).

De SIGMA se adquirió el antagonista del receptor CXCR4, hidrato de octohidroclorito o AMD3100 (A5602- 5MG).

#### 4.1.3 Reactivos para inmunofluorescencia

De Winkler Ltda (Santiago, Chile) se adquirieron el paraformaldehído (PA-11510) y el Tritón 100X (BM-2020).

De Dako Corporation (Glostrup, Dinamarca) se obtuvo la solución de montaje Dako (S3023).

A continuación se detallan los anticuerpos utilizados:

**Tabla 1: Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia**

<i>Antígeno</i>	<i>Código</i>	<i>Marca</i>	<i>Clonalidad</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Secundario</i>
CXCR4	NB600-786	Novus Biologicals	policlonal	conejo	1:100	Alexa- 488
CXCR7	Ab72100	Abcam	policlonal	conejo	1:25	Alexa- 488
GFAP	13-0300	Invitrogen	monoclonal	rata	1:50	Alexa- 488
Beta-III-tubulina	280026	Promega	monoclonal	ratón	1:500	Alexa- 555
SOX2	Ab97959	Abcam	policlonal	conejo	1:50	Alexa- 555

#### 4.1.4 Reactivos para los análisis de western blot

De BIO-RAD (Hercules, CA, EE.UU.) se obtuvo el sistema comercial de cuantificación de proteínas Bio-Rad Protein Assay (500-0001).

De ThermoScientific se adquirieron los sustratos quimioluminiscentes, ECL (32106) y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (88585).

De Winkler son el Tween 20 (TW-1652), TEMED (tetrametiletildiamina) (BM-1970),  $\beta$ -mercaptoetanol (BM-1200), acrilamida (BM-0070) y bis-acrilamida (BM-0280).

De US Biological (San Antonio, TX, EE.UU.), son el SDS (S5010), el Tris base (T8601) y la glicina (G8160).

De SIGMA, se obtuvo el persulfato de amonio (A3678) y el rojo Ponceau S (141194).



En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos utilizados:

**Tabla 2: Anticuerpos utilizados en los análisis de western blot**

<i>Proteína</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Código</i>	<i>Marca</i>	<i>Clonalidad</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>
CXCR4	40 kDa	NB600-786	Novus Biologicals	policlonal	conejo	1:1000
CXCR7	42 kDa	Ab72100	Abcam	policlonal	conejo	1:300

#### 4.1.5 Reactivos para la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

De OMEGA bio-tek (Norcross, GA, EE.UU.), se obtuvo el sistema comercial de extracción de RNA, E.Z.N.A (R6834-02).

De Promega (Madison, WI, EE.UU.) se obtuvo la DNasa libre de RNasa (M610A), el tampón de reacción 10X (M198A) y la solución de término de reacción (M199A). También se obtuvieron los partidores aleatorios 500 µg/mL, (C118A) y la enzima transcriptasa inversa M-MLV y su solución tampón (M170B). Asimismo se obtuvieron la DNA polimerasa GoTaq, la solución de cloruro de magnesio 25 mM y el tampón 5X de la enzima (M8295).

De Jena Bioscience (Jena, Alemania) se obtuvieron las soluciones de nucleótidos, dATP (NU-1001), dCTP (NU-1002), dGTP (NU-1003), dTTP (NU-1004).

De New England BioLabs (Hitchin, Inglaterra) es el marcador de DNA de 100 pares de bases 6X (N3231S).

De Lonza (Basel, Suiza) es la agarosa (50004).

Los partidores se mandaron a sintetizar a IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) (Coralville, IA, EE.UU.) y se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3: *Partidores utilizados en la PCR.*** Se muestran las secuencias de los distintos partidores en sentido 5' → 3'. La temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) se calculó con la fórmula 2• (A + T) + 4• (G + C). S denota partidor sentido y R el partidor inverso.

<i>Partidor</i>	<i>Secuencia 5' → 3'</i>	<i>Tamaño producto (pb)</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>
Sox2_S	GCA GTA CAA CTC CAT GAC CAG	165	64
Sox2_R	GGA GTG GGA AGA GGT AAC		56
Map2_S	AAC ATC AAA CAT TCT GCT GGG	290	60
Map2_R	GAT CTC AGC CCC GTG ATC TA		62
Gfap_S	CGA AGC TAA CGA CTA TCG CC	374	62
Gfap_R	TTG TGA CTT TTT GGC CTT CC		58
Mag_S	GCC CCG AAT TCA GAA TCT TCG G	238	68
Mag_R	TTC TGC ATA CTC AGC CAG C		62
Cxcl1_S	GCT GGG ATT CAC CTC AAG AAC	168	64
Cxcl1_R	TGG GGA CAC CTT TTA GCA TC		60
Cxcl12_S	GCA TCA GTG ACG GTA AAC CAG	171	64
Cxcl12_R	GGG TCA ATG CAC ACT TGT CTG		64
Cxcr1_S	CCT GCA TCA GTG TGG ACC G	604	62
Cxcr1_R	AAC CTC CTT GCG AAC CAG GC		64
Cxcr2_S	CTC CTT GGT GAT GCT GGT C	498	60
Cxcr2_R	CCC GTA GCA GAA CAG CAT G		60
Cxcr4_S	GGA GCA TGA CGG ACA AGT AC	598	62
Cxcr4_R	GAA GGA GTC GAT GCT GAT CC		62
Cxcr7_S	GCA CTG CTA CAT CTT GAA CCT G	386	66
Cxcr7_R	CAC TCC TTG ATG CTG TGC TCG		66
Gapdh_S	CAC CCA GAA GAC TGT GGA TGG	427	66
Gapdh_R	CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG		64

#### 4.1.6 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 en estadio fetal (E14,5 y E18,5), los cuales se trataron de acuerdo a todas las normativas éticas exigidas por la Comisión de Bioseguridad y Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El proyecto FONDECYT 1090427 fue aprobado por CONICYT desde el punto de vista ético.

#### 4.1.7 Líneas celulares

Como controles positivos se utilizaron líneas celulares de linfoblastos humanos de células T (células Jurkat, donación del laboratorio del Dr. Alfonso González) y células de carcinoma epitelial humano (células HeLa, donación del laboratorio de la Dra. Alejandra Álvarez).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cultivos de células troncales neurales

Las CTNs se cultivaron en forma de neuroesferas, estructuras esféricas en suspensión que favorecen la proliferación de las CTNs. Para la generación de las neuroesferas, las médulas espinales obtenidas de embriones de ratones en estadio E18,5, se segmentaron y posteriormente se disociaron mecánicamente durante 15 minutos con pipeta pasteur cuyo orificio extremo fue previamente reducido. Después de contar el número total de células, éstas se resuspendieron a una concentración de 50-100 células/ $\mu$ L en medio (DMEM/F12) suplementado con glucosa (6 mg/mL), albumax (3 mg/mL), N2 (10  $\mu$ L/mL), B27 (20  $\mu$ L/mL) y penicilina/estreptomicina a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. Se agregaron al cultivo los factores de crecimiento (EGF 50 ng/mL, FGF 20 ng/mL) necesarios para la formación de neuroesferas, cada 48 horas. Aproximadamente luego de 7 días se realizó el primer subcultivo. En este procedimiento las neuroesferas se disgregaron para obtener células únicas, con el objetivo de que las CTNs, al estar separadas, volvieran a formar nuevas neuroesferas y así aumentar el número de células del

cultivo. El subcultivo se realizó usando tripsina 0,05% y resuspendiendo en medio DMEM/F12 suplementado con glucosa, albumax, N2 y B27 en presencia de los factores de crecimiento. En condiciones de proliferación, las neuroesferas se mantuvieron en medio fresco con los factores de crecimiento y se expandieron en cada subcultivo para realizar los distintos experimentos.

#### 4.2.2 Ensayo de diferenciación

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las neuroesferas, éstas se resuspendieron en medio DMEM/F12 suplementado con glucosa, albumax, N2 y B27 (sin factores de crecimiento) y se sembraron directamente sobre placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro recubiertas con poli-D-lisina (0,1 mg/mL). Luego de 4 días de cultivo se evaluaron los niveles de RNAs mensajeros y sus productos proteicos relacionados a genes marcadores de linaje, mediante las técnicas de RT-PCR e inmunofluorescencia respectivamente. Los marcadores analizados fueron: para CTN, SOX2 (región sexual determinante Y (SRY), box 2); para neuronas, BetaIII-tubulina y MAP2 (proteína asociada a microtúbulos); para astrocitos, GFAP (proteína ácida fibrilar glial), y para oligodendrocito, MAG (glicoproteína asociada a mielina) y Olig2 (factor de transcripción de oligodendrocito 2).

#### 4.2.3 Extracción de RNA y transcripción inversa

Se extrajo RNA a partir de las médulas espinales y del cultivo de neuroesferas utilizando el sistema comercial EZNA. Se realizó el protocolo indicado por el fabricante, utilizando tampón de lisis TRK, etanol 70%, los tampones de lavado 1 y 2 y la columna de RNA para centrifugación. Brevemente, las neuroesferas (menos de 5 millones de células) se lisaron en 350  $\mu$ L de tampón de lisis TRK y se agregó un volumen igual de etanol 70%, se agregó la muestra a la columna de centrifugación y después de centrifugaciones con los tampones de lavado 1 y 2, el contenido de la columna se eluyó con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Luego de evaluar la concentración y pureza del RNA espectrofotométricamente mediante la determinación de la razón de absorbancia 260/280 nm, se realizó la transcripción inversa con 1  $\mu$ g de RNA. Para ello, se trató el RNA con DNasa (1 unidad) para degradar el DNA contaminante, incubando

durante 40 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción con 1 µL de EDTA 0,02 M. Después de 10 minutos a 65°C se agregaron 0,5 µL de partidores aleatorios (20,8 µg/mL) y luego de 10 minutos a 65°C se agregaron los dNTPs a una concentración final de 0,5 mM y el tampón de la enzima. Las muestras se incubaron a 25°C durante 10 minutos y luego a 42°C durante 2 minutos, se agregó 1 µL de la enzima transcriptasa inversa (1 unidad) y se incubó a 42°C durante 50 minutos y finalmente a 70°C durante 10 minutos. El DNA complementario se guardó a -20°C.

#### 4.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el objetivo de determinar la presencia de los transcritos de los genes que codifican los marcadores neurales, las quimioquinas CXCL1 y CXCL12 y sus receptores CXCR1, CXCR2, CXCR4 y CXCR7 se realizó una PCR. Se amplificó el DNA complementario proveniente de la transcripción inversa. Para ello se tomaron 1-2 µL de la reacción de transcripción inversa, se agregaron el tampón de la enzima (1X), la enzima Taq (1 unidad), dNTPs (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) y los partidores (0,5 µM). Se utilizaron los partidores diseñados que se muestran en la **Tabla 3**. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler. Se utilizó una desnaturación de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a la temperatura de apareamiento (55°C - 60°C), 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos obtenidos de la PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1,5% en TBE 1X (Tris 0,9 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM, pH 8) y para visualizar los amplicones, la electroforesis se realizó en presencia de bromuro de etidio (0,3 µg/mL). Las bandas se visualizaron en un transiluminador BIO RAD 170-8126, utilizando el programa Quantity One de BIO RAD 4.3.1.

#### 4.2.5 Inmunofluorescencia

Para evaluar la distribución y los niveles de las proteínas de interés, se realizaron estudios de inmunofluorescencia en los cultivos de las neuroesferas. Para ello, las neuroesferas se sembraron sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina (0,1 mg/mL) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% en frío durante 20 minutos. Luego se lavaron con PBS 1X (NaCl

137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, pH 7,4) 3 veces, se bloquearon con SBF 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4°C en tampón (PBS 1X, SBF 5% y Tritón 0,05%) que contenía la dilución de los anticuerpos primarios (ver **Tabla 1**). Después se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron durante 2 horas, a temperatura ambiente, en el mismo tampón que contenía el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor. Posteriormente los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X en oscuridad y se montaron con Dako. Finalmente la detección de la proteína de interés se analizó por microscopía de fluorescencia indirecta con un microscopio Nikon E600.

#### 4.2.6 Preparación de extractos de proteínas

Para evaluar los niveles de proteínas, las médulas espinales se lisaron con la solución tampón RIPA (Tris 20 mM, Tritón 1%, glicerol 10%, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4), y el tejido se disgregó con jeringas de 1 mL y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 10.000 rpm. Las proteínas obtenidas se cuantificaron con el método de Bradford (BIO-RAD) utilizando una curva estándar de BSA. Los lisados se mezclaron con tampón de carga (Tris 0,125 M, pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,07%) en una proporción 3:1, se hirvieron durante 10 minutos y luego se almacenaron a -20°C.

#### 4.2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas se resolvieron según su masa molecular mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Se utilizó un gel separador al 10% de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (29,2%-0,8%) en un tampón de Tris 25 mM pH 6,8, SDS 0,4% y un gel concentrador al 3%, de la misma mezcla de acrilamida y bisacrilamida, en un tampón de Tris 75 mM pH 8,8 y SDS 0,4%. Se cargaron 30 µg de proteínas, éstas se concentraron aplicando 85 V y se resolvieron a 110 V (gel separador) en tampón Tris 25 mM pH 8,3, glicina 0,190 mM y SDS 0,1%.

#### 4.2.8 Electrotransferencia y visualización de proteínas

Las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) que previamente se activó durante 5 minutos en metanol, según instrucciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento de transferencia implicó que el gel y la membrana se colocaron entre dos papeles Whatman (BIO-RAD), y dos esponjas dentro de un soporte, el cual se puso en la cámara de transferencia (BIO-RAD) con la membrana en dirección al polo positivo en tampón Tris 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM y metanol 20% durante 1 hora a 400 mA. Para visualizar el resultado de la transferencia de proteínas las membranas se incubaron con rojo Ponceau S 2%. Luego las membranas se lavaron en agua destilada, se bloquearon durante 1 hora en una solución de leche descremada en polvo Svelty 5% en tampón TBS 1X-Tween 20 0,1% y posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos.

#### 4.2.9 Análisis de western blot

Para el análisis de western se incubó la membrana con el anticuerpo primario, (ver **Tabla 2**) diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos con TBS 1X-Tween 20 0,1% y se incubó durante 1 hora con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina (de ratón o conejo) conjugado con peroxidasa de rábano a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana 3 veces con TBS 1X-Tween 20 0,1%. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 5 minutos en la solución quimioluminiscente para el análisis de western, ECL, y se pusieron en contacto con una película de fotografía Kodak-Biomax que posteriormente fue revelada y fijada. Las películas se escanearon y las imágenes se procesaron con la ayuda del programa computacional Adobe Illustrator (Adobe, Irlanda).

#### 4.2.10 Análisis funcionales

Para evaluar el efecto de la alfa-quimioquina CXCL12 sobre los cultivos de CTNs se utilizó la quimioquina recombinante y se analizaron sus efectos en la diferenciación. Las células se sembraron sobre poli-D-lisina y luego de 6 horas las neuroesferas se encontraban adheridas a la matriz. Para la situación control se agregó el vehículo (BSA 0,1%), para la condición con quimioquina ésta se agregó a una concentración de 100 ng/mL. Se determinó el efecto de AMD3100, un antagonista químico del receptor de CXCR4, a una concentración de 2,5 µg/mL. El antagonista se añadió al cultivo 30 minutos antes que la quimioquina. Tanto la quimioquina como el inhibidor se agregaron luego de 2 días nuevamente a los cultivos para que, finalmente, luego de 4 días se finalizara el ensayo de diferenciación fijando las células.

#### 4.2.11 Imagenología

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 y se analizaron con el programa computacional Image J (NIH, EE.UU.), con el cual se cuantificó la intensidad de fluorescencia por cada canal. Las bandas visualizadas en los geles de agarosa se cuantificaron con el programa computacional UN-SCAN-IT (Silk Scientific, EE.UU.).

#### 4.2.12 Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como imágenes representativas o como promedios  $\pm$  SEM de, en la mayoría de los casos, tres experimentos independientes. En el experimento de diferenciación de las neuroesferas (**Figuras 15 y 16**), considerando que cada neuroesfera contiene alrededor de 1000 células, cada neuroesfera se consideró como un n independiente. Los datos se analizaron con el test T de student o ANOVA y la prueba de Tukey según correspondió, para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un  $p \leq 0,05$ .



## 5. RESULTADOS

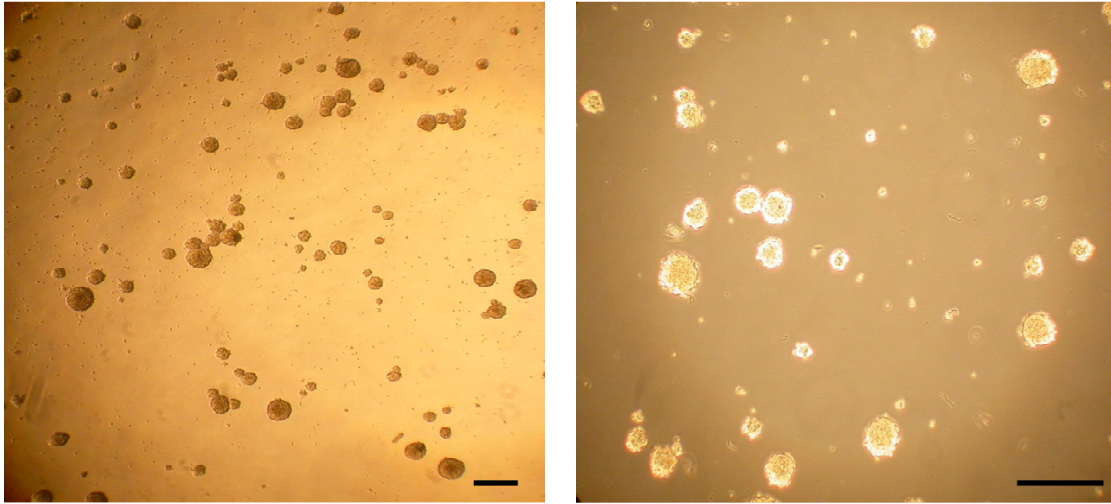
### 5.1. Generación de cultivos de CTNs obtenidas a partir de ME de ratón en estadio embrionario E18,5

#### Obtención de los cultivos

Los cultivos de CTNs de ME se realizaron a partir de ratones en estadio fetal E18,5. Se disectó la ME, se disgregó mecánicamente y las células obtenidas (un promedio de 335.000 células/embrión) se sembraron en medio con los factores mitogénicos EGF a 50 ng/mL y FGF a 20 ng/mL. Luego de 3 a 4 días de cultivo, fue posible observar la formación de neuroesferas, reconocidas como estructuras esféricas características que se forman por las CTNs en cultivo gracias a la presencia de factores de crecimiento. A partir del cultivo primario fue posible disgregar las neuroesferas formadas, lo que se realizó después de una semana en cultivo, permitiendo generar neuroesferas secundarias (**Figura 3**). Se realizaron más de 30 cultivos diferentes, provenientes de distintas hembras preñadas. Luego del primer subcultivo, el número de células obtenidas fue en promedio 1 millón de células por cultivo, lo que se traduce en una reducción del 50% comparado con el número inicial de células de cultivo. Esto ocurre porque el cultivo primario está compuesto por células que finalmente no serán parte de las neuroesferas y porque durante el proceso de subcultivo, que incluye disgregación mecánica y enzimática, se pierde un gran número de células. Por otro lado, no todas las células resultantes logran formar nuevamente una neuroesfera. Pese a esto, la capacidad de formación de nuevas neuroesferas en cada subcultivo fue evidente, lo que corrobora la capacidad de proliferación de algunas de las células que componen esta estructura esférica, característica esencial de una CTN.

#### Caracterización de las neuroesferas

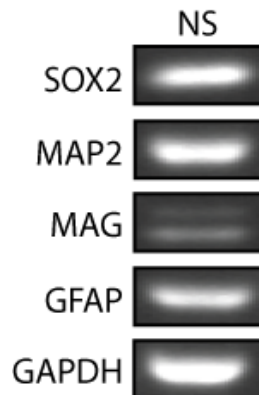
Las CTs se definen como células que tienen la capacidad de autorrenovarse continuamente durante la vida adulta y de producir una progenie funcional y diferenciada, que tendrá las características del órgano del cual derivaron (Hall y Watt, 1989). De manera adicional a la mantención de una capacidad proliferativa, la propiedad de autorrenovación de las CTNs se



**Figura 3: Neuroesferas secundarias cultivadas en suspensión.** Neuroesferas formadas luego del primer subcultivo, después de 3 a 5 días de cultivo. Las imágenes son de dos cultivos diferentes representativos y se obtuvieron de un microscopio de luz invertido con un aumento de 4X (izquierda) y 10X (derecha). La barra indica 250  $\mu\text{m}$ .

comprueba al verificar la presencia del RNA mensajero de proteínas tales como SOX2, un factor transcripcional que define la troncalidad de estas células (Graham y cols., 2003). Mediante RT-PCR fue posible detectar el RNA mensajero de este factor en cultivos secundarios, lo cual significa que en dichas neuroesferas existen CTNs (**Figura 4**). Como control positivo se utilizaron CTNs corticales (no se muestra), modelo ampliamente caracterizado en la literatura y disponible en el laboratorio.

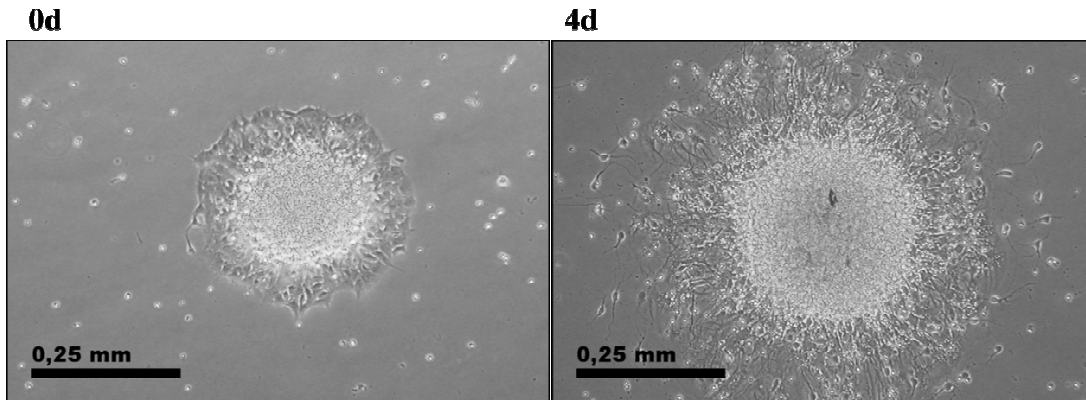
Además, en las neuroesferas mantenidas en condiciones de proliferación, también se detectaron otros RNAs mensajeros presentes en linajes neurales específicos: neurona (proteína asociada a microtúbulos, MAP2), astrocito (proteína ácida fibrilar glial, GFAP) y oligodendrocito (glicoproteína asociada a mielina, MAG) (**Figura 4**). La presencia de estos tres transcritos se traduce en que en la neuroesfera es posible encontrar células neurales con distinto grado de compromiso, así como también CTNs. Estas células más comprometidas podrían ser generadas a partir de una única CTN.



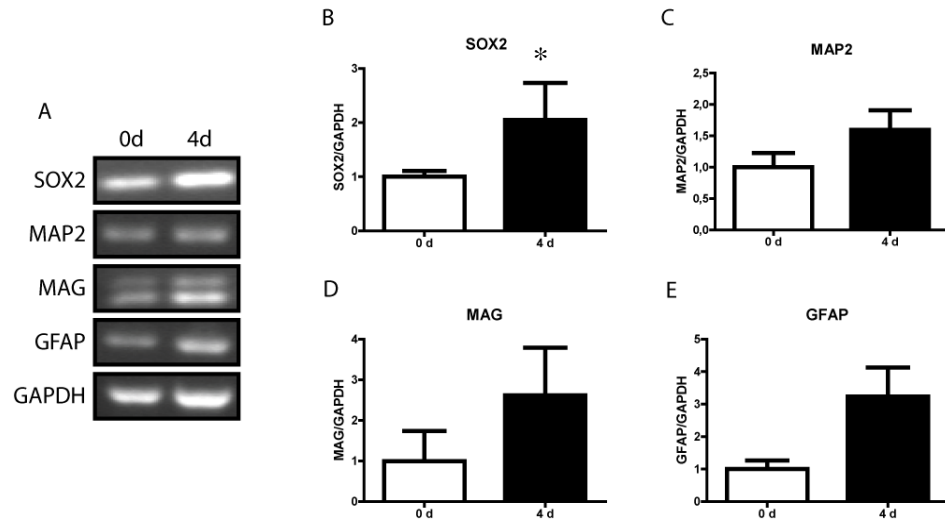
**Figura 4: Presencia de RNAs mensajeros de marcadores neurales en neuroesferas de ME en suspensión.** Las neuroesferas en proliferación o suspensión (NS) se lisaron y el RNA total se extrajo. Se realizó una RT-PCR con partidores específicos para SOX2, MAP2, MAG, GFAP y GAPDH. El gel es representativo de tres experimentos independientes (n=3).

También se puede comprobar la condición de troncalidad de las células presentes en las neuroesferas evaluando su capacidad de diferenciación. En caso de que existan efectivamente CTNs en las neuroesferas, se espera que al permitir su adherencia a una matriz (poli-D lisina) y eliminar los factores mitogénicos del medio, se logre inducir la diferenciación a los tres linajes neurales. Como se muestra en la **Figura 5**, fue posible observar cómo las células de la neuroesfera, al adherirse al sustrato y mantenerse durante 4 días en esta condición, extienden prolongaciones características de células neurales, pudiendo ser éstas de precursores o de neuronas diferenciadas (Mothe y cols., 2011; Shetty y Turner, 1998).

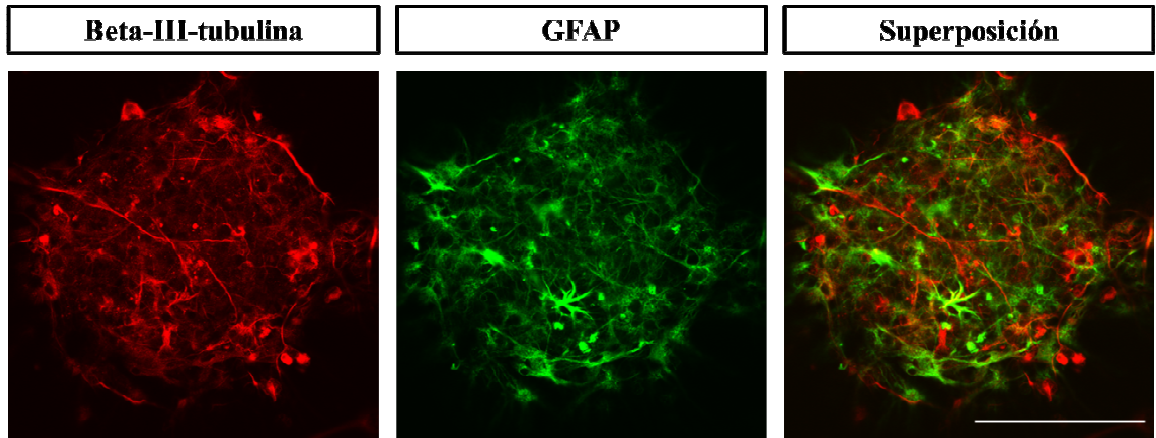
Fue posible sugerir la progresión del proceso de diferenciación basándose en el cambio en los niveles de RNA mensajero de los genes característicos de cada linaje, comparando el momento de adhesión de las neuroesferas a la matriz (0d) con respecto a 4 días de cultivo (4d). Como se observa en la cuantificación de la **Figura 6**, los RNAs mensajeros de las proteínas MAP2, MAG y GFAP aumentan luego de 4 días de adhesión, aunque las diferencias no son significativas. Sólo el transcrito de SOX2 aumenta significativamente con respecto al momento de adhesión a la matriz (**Figura 6B**).



**Figura 5: Cambios morfológicos de las neuroesferas durante la adhesión a poli-D-lisina en ausencia de factores mitogénicos.** Las neuroesferas se fotografiaron inmediatamente después de ponerlas en la matriz (izquierda) y luego de 4 días de cultivo (derecha). La imagen es representativa de 10 experimentos (n=10), que se fotografiaron a través de un microscopio de luz invertido con un aumento de 10X.



**Figura 6: Niveles de RNA mensajero de marcadores neurales en neuroesferas de ME adheridas a poli-D-lisina.** A.- Gel que muestra la amplificación del RNA mensajero de SOX2, MAP2, GFAP y GAPDH por RT-PCR de neuroesferas adheridas a poli-D-lisina a 0 y 4 días. B.- E.- Cuantificación de las bandas del gel mostrado en A mediante el programa computacional UN-SCAN-IT. Las bandas se normalizaron por la intensidad de la amplificación de GAPDH. 0d: neuroesferas al momento de adhesión, 4d: neuroesferas luego de 4 días de diferenciación. (Gel representativo de 3 experimentos (n=3), \*p < 0,05 respecto a 0d, según el test T de student).



**Figura 7: Inmunofluorescencia de marcadores neurales en neuroesferas de ME luego de 4 días de diferenciación.** Las neuroesferas adheridas a poli-D-lisina se fijaron luego de 4 días. Se muestra una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GFAP y anti-beta-III-tubulina. Fotos obtenidas con un microscopio confocal con un aumento de 40X. Imagen representativa de siete experimentos (n=7). La barra indica 100  $\mu\text{m}$ .

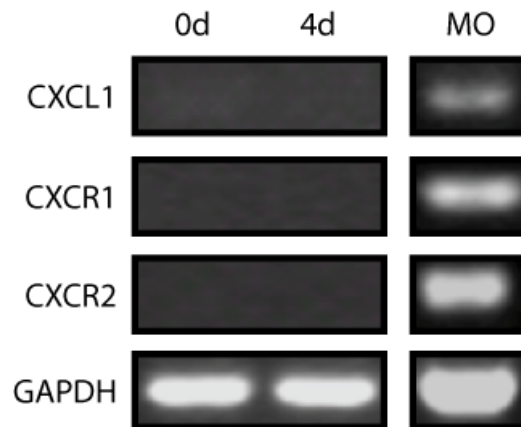
Como una forma de complementar el estudio de diferenciación, la expresión de genes de diferenciación se examinó a nivel de proteínas. Para ello, se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia de los marcadores neurales, beta-III-tubulina (característico de precursores neuronales), GFAP (propio de precursores de astrocitos) y OLIG2 (representativo de los precursores de oligodendrocitos). Como se muestra en la **Figura 7** (OLIG2 no se muestra), fue posible detectarlos. A la vez, se observan claramente dos poblaciones diferentes de células: una positiva para beta-III-tubulina y otra positiva para GFAP. Esto confirma el proceso de diferenciación que sufren estas CTNs al adherirse a la matriz de poli-D-lisina.

Los resultados obtenidos muestran que el modelo de neuroesfera es válido como cultivo de CTNs de ME, ya que es posible mantener células indiferenciadas en condiciones de proliferación (RNA mensajero de SOX2 en las neuroesferas) que junto con la formación de neuroesferas secundarias demuestran la capacidad de autorrenovación. Además, luego de 4 días estimulando la diferenciación, fue posible encontrar progenitores comprometidos a cada uno de los tres linajes neurales, lo que corrobora la capacidad de multipotencialidad, característica de las CTNs.

## 5.2. Determinación de la presencia de las alfa-quimioquinas y sus receptores correspondientes en ME y en neuroesferas derivadas de ella

Para determinar la expresión génica de las alfa-quimioquinas y sus receptores a nivel de mensajero, se analizó la presencia de los respectivos transcritos a través de RT-PCR. Primero, se analizó la presencia de los RNAs mensajeros de la quimioquina CXCL1 y sus receptores CXCR1 y CXCR2. No se detectaron estos mensajeros en las neuroesferas en proceso de diferenciación, pero sí se detectaron utilizando médula ósea de ratón como control positivo (**Figura 8**).

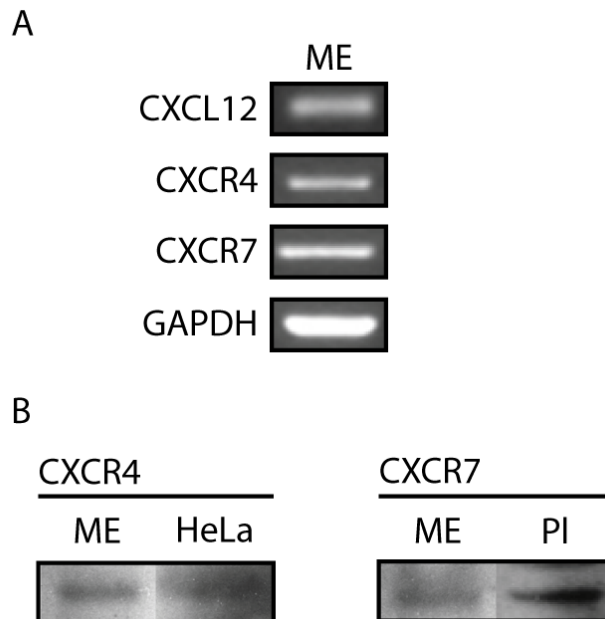
Por el contrario, los RNAs mensajeros de la quimioquina CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7, se detectaron en médula espinal intacta, en neuroesferas en proliferación (suspensión) y en neuroesferas luego de 4 días de diferenciación (**Figuras 9A, 10 y 14**).



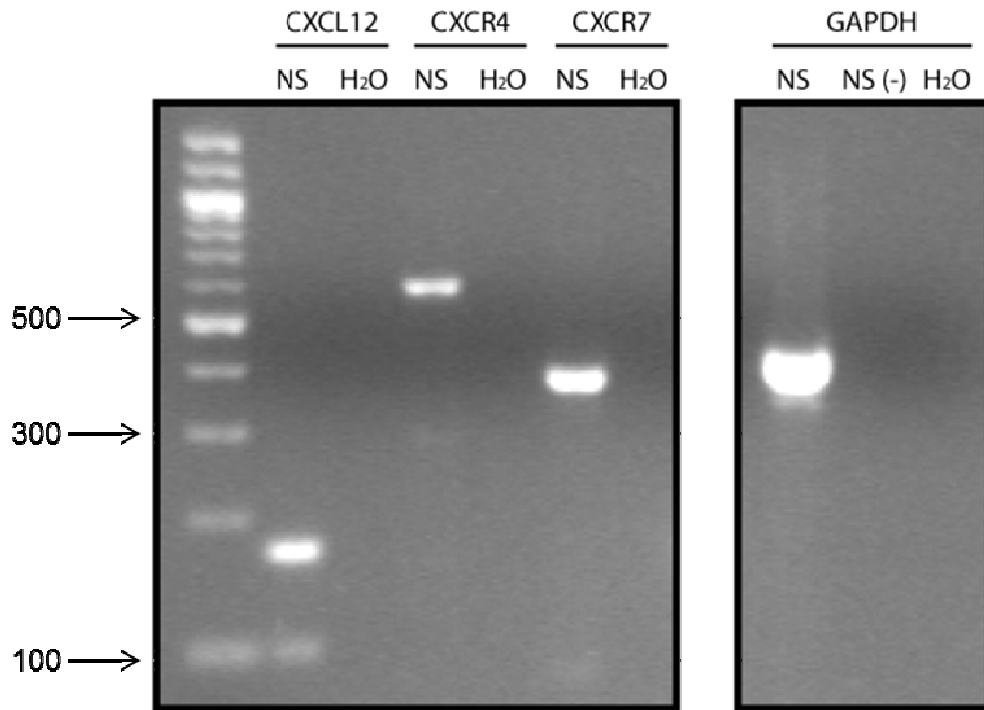
**Figura 8:** *Detección de los RNAs mensajeros de la quimioquina CXCL1 y sus receptores CXCR1 y CXCR2 en neuroesferas de ME durante la diferenciación.* A las neuroesferas al momento de adhesión al sustrato (0d) y luego de 4 días de diferenciación (4d) se les extrajo el RNA y se sometió a RT-PCR con partidores específicos para CXCL1, CXCR1, CXCR2 y GAPDH. Gel obtenido de un experimento (n=1). Además se realizó otra PCR para observar los amplificones en MO, control positivo de la reacción.

Considerando estos resultados, el estudio se focalizó en el análisis de esta última quimioquina, CXCL12, evaluando la presencia de sus receptores tanto en ME intacta como en las neuroesferas.

En extractos de ME intacta se analizó la presencia de los receptores mediante análisis de western (bandas cercanas a los 46 kDa), corroborando el resultado con controles positivos obtenidos de lisado de células HeLa para CXCR4 y de tejido de placenta de ratón para CXCR7. De esta manera, se determinó la presencia de ambos receptores en la ME (**Figura 9B**).



**Figura 9: Detección del RNA mensajero de la quimioquina CXCL12 y el de sus receptores CXCR4 y CXCR7 y las proteínas de ellos en ME.** **A.-** A las ME se les extrajo el RNA y se amplificó mediante RT-PCR con partidores específicos para CXCL12, CXCR4, CXCR7 y GAPDH. Gel de agarosa al 1,5% representativo de tres experimentos. **B.-** El tejido de ME de ratón extraído en el estadio 18,5 se homogeneizó y lisó para obtener el extracto proteico. Luego se realizó un análisis de western con 30 µg de proteína. Las membranas se incubaron con anti-CXCR4 y anti-CXCR7. ME: médula espinal, HeLa: lisado de células HeLa como control positivo para CXCR4, PI: placenta como control positivo para CXCR7. Imágenes representativas de tres experimentos (n=3).

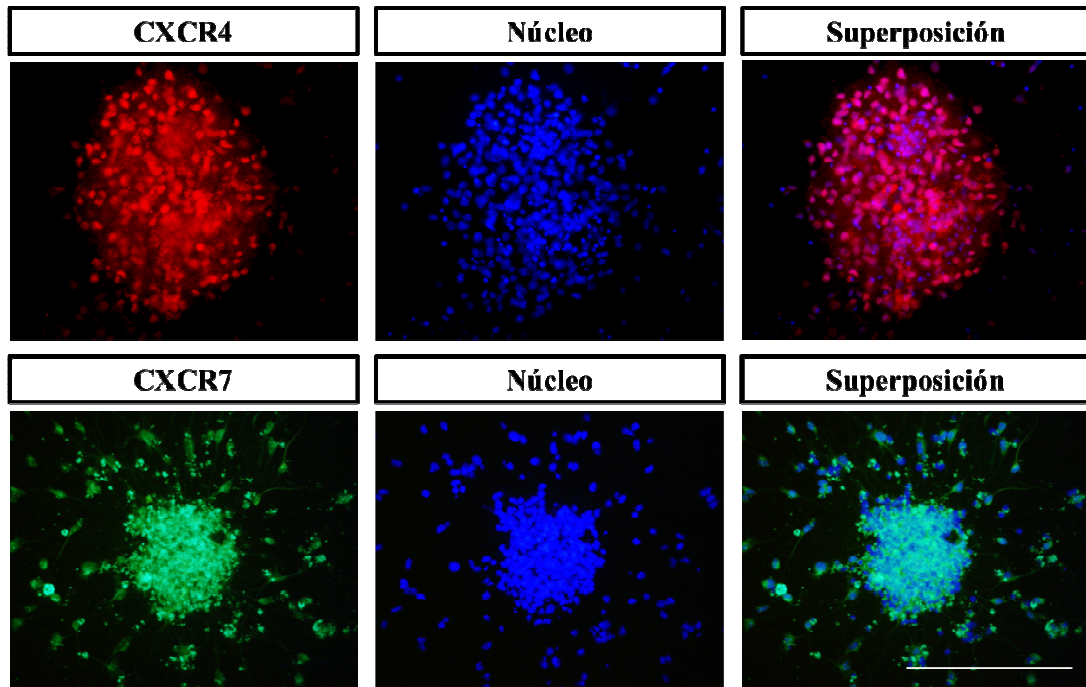


**Figura 10: Detección de los RNAs mensajeros de CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7.** A las neuroesferas en suspensión (NS) se les extrajo el RNA y se amplificó mediante RT-PCR con partidores específicos para CXCL12 (171 pb), CXCR4 (598 pb), CXCR7 (386 pb) y GAPDH (427 pb). NS: Neuroesferas en suspensión, H<sub>2</sub>O: control agua, sin cDNA, NS (-): control sin transcriptasa inversa. Gel de agarosa al 1,5% representativo de tres experimentos (n=3). Las flechas indican el número de pares de bases de los nucleótidos del estándar.

En las neuroesferas con cuatro días de diferenciación se analizó la presencia de los receptores CXCR4 y CXCR7 mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en la **Figura 11**, la inmunorreactividad positiva para el CXCR4 se concentra más en el centro de la neuroesfera, mientras que para el CXCR7 ésta aparece tanto en el centro como en las células de la periferia de la neuroesfera.

Luego de detectar ambos receptores en las neuroesferas con cuatro días de diferenciación, se analizó su eventual presencia en las CTNs de la neuroesfera. Para esto se realizó una inmunofluorescencia luego de 4 días de diferenciación contra SOX2, el factor transcripcional que define la troncalidad de estas células, y contra CXCR4 y CXCR7 (**Figuras 12 y 13**).

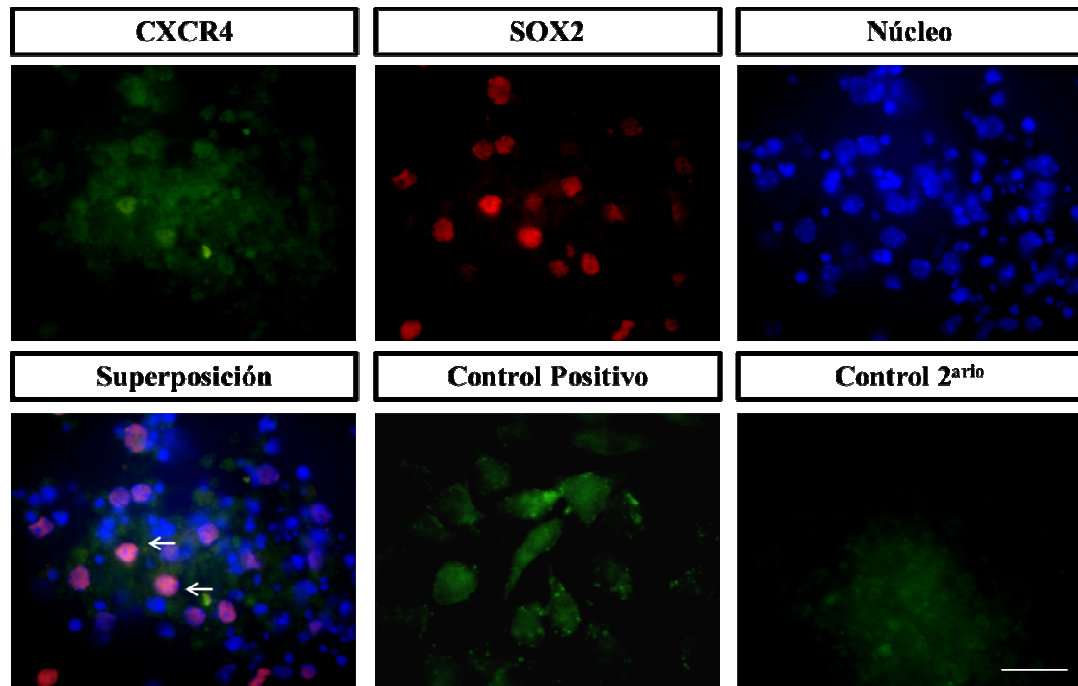




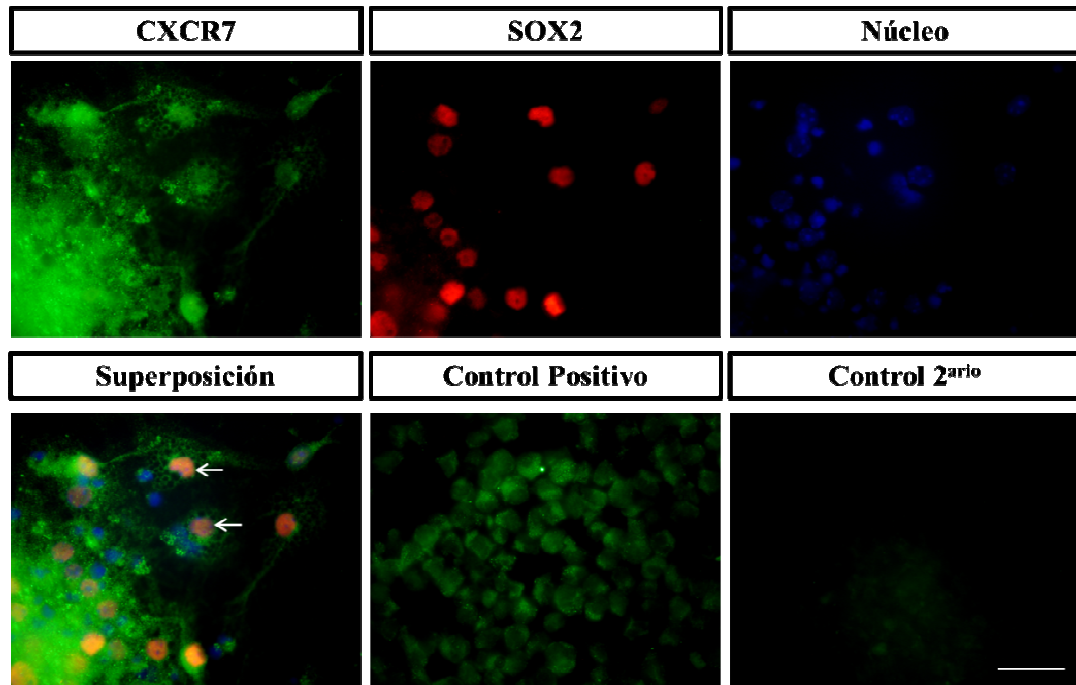
**Figura 11:** *Detección de los receptores CXCR4 y CXCR7 en neuroesferas a cuatro días de diferenciación.* Las neuroesferas se fijaron luego de 4 días de diferenciación y la inmunofluorescencia se realizó con anticuerpos anti-CXCR4 (1:100), anti-CXCR7 (1:25) y tinción de Hoechst para los núcleos. Las fotos se tomaron con un microscopio de epifluorescencia y son representativas de 3 experimentos (n=3) para CXCR4 y de 4 (n=4) para CXCR7. La barra indica 100  $\mu$ m.

Ambas figuras muestran que las células que son positivas para SOX2, aparentemente presentan tanto CXCR4 como CXCR7, deducido por la superposición de las imágenes (ver flechas, **Figuras 12 y 13**). Al analizar las imágenes de las Figuras 12 y 13, es posible notar que la inmunorreactividad de CXCR7 tiene una amplia distribución, e incluso se detecta en las células de la periferia de la neuroesfera, como ya se había notado (**Figura 11**).

El hecho de que tanto en la ME como en las CTNs derivadas de ella, se detecten la quimioquina CXCL12 y sus respectivos receptores, constituye una base importante para considerar un posible rol de esta angioneurina sobre las CTNs.



**Figura 12: Detección de CXCR4 en las CTNs de la ME.** Luego de 4 días de diferenciación las neuroesferas se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CXCR4 (1:50), SOX2 (1:50) y tinción de Hoechst para los núcleos. La imagen que se muestra está tomada en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100X y es representativa de dos experimentos (n=2). El control positivo corresponde a células HeLa. La barra indica 10  $\mu$ m.



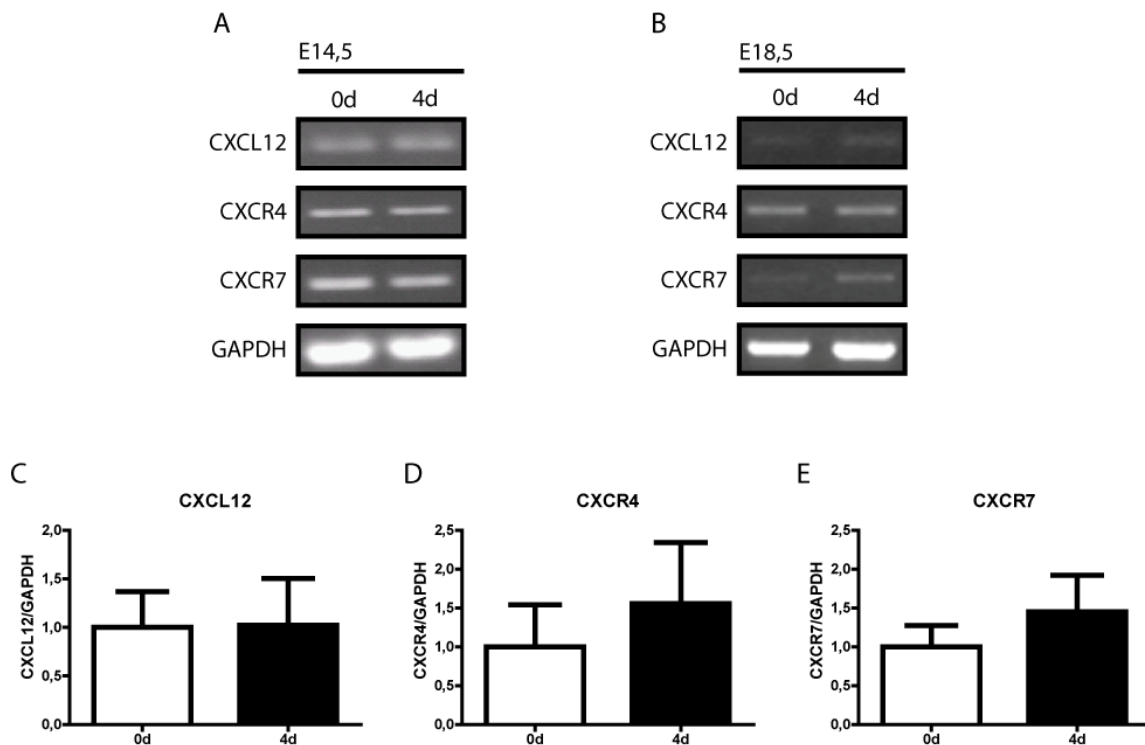
**Figura 13: Detección de CXCR7 en las CTNs de la ME.** Luego de 4 días de diferenciación las neuroesferas se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-CXCR7 (1:25), SOX2 (1:50) y tinción de Hoechst para los núcleos. La imagen que se muestra está tomada en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100X y es representativa de dos experimentos (n=2). El control positivo corresponde a células Jurkat. La barra indica 10  $\mu$ m.

### **5.3. Efectos de las alfa-quimioquinas sobre la diferenciación de las CTNs cultivadas como neuroesferas derivadas de la ME**

Los resultados anteriores muestran que algunas de las células presentes en la neuroesfera producen los transcritos de CXCL12, CXCR4 y CXCR7 y que también presentan los receptores a nivel proteico. De acuerdo a esto se podría plantear que la quimioquina ejerce algún efecto sobre capacidades funcionales de las CTNs tales como proliferación, diferenciación o migración de estas CTNs (Edman y cols., 2008; Li y cols., 2011; Luo y cols., 2005; Wu y cols., 2009). Para evaluar esta hipótesis, un enfoque es determinar el efecto de la proteína agregada exógenamente o de la inhibición farmacológica de sus receptores.

En una primera instancia, se determinó la presencia y los cambios de los RNAs mensajeros de CXCL12, CXCR4 y CXCR7 durante el proceso de diferenciación. Este experimento se realizó con neuroesferas obtenidas de dos estadios embrionarios diferentes, E14,5 y E18,5, como una forma de comparar estadios más tempranos respecto de estadios tardíos del desarrollo de la ME (**Figura 14**). Fue posible observar un aumento en los niveles de RNA mensajero de los receptores CXCR4 y CXCR7 en el estadio 18,5 al comparar las cuantificaciones de los tiempos 0d y 4d de diferenciación. Pese a que las diferencias no son estadísticamente significativas (**Figura 14: C, D y E**), el aumento en los niveles de los RNAs de los receptores y, especialmente, de CXCR7, son notorios. (**Figura 14: B y E**). Estos cambios no se observan en el estadio más temprano (**Figura 14A**), situación que resulta interesante, y que podría sugerir un rol del receptor CXCR7 en la diferenciación de las CTNs en etapas más tardías del desarrollo de la ME.

Para evaluar el efecto de CXCL12 sobre alguna propiedad funcional de las CTNs, se estudiaron los efectos de esta quimioquina sobre la diferenciación de neuroesferas durante 4 días. Considerando los resultados ya obtenidos, se analizaron los efectos sobre diferenciación ya que ambos receptores, tanto CXCR4 como CXCR7, se detectan en las CTNs a los 4 días de diferenciación.



**Figura 14: Cambios del RNA mensajero de CXCL12 y sus receptores en neuroesferas de ME durante la diferenciación en dos estadios embrionarios: 14,5 y 18,5 días.** A y B.- RT-PCR de neuroesferas al momento de adhesión al sustrato y luego de 4 días de diferenciación, en estadios 14,5 y 18,5 respectivamente. Se realizó una RT-PCR con partidores específicos para CXCL12, CXCR4, CXCR7 y GAPDH. Gels representativos de un experimento (n=1) en A y de tres experimentos en B (n=3). C, D y E.- Cuantificación de las bandas del gel mostrado en B mediante el programa computacional UN-SCAN-IT. Las bandas se normalizaron por la intensidad de la amplificación de GAPDH. 0d: neuroesferas al momento de adhesión, 4d: neuroesferas luego de 4 días de diferenciación.

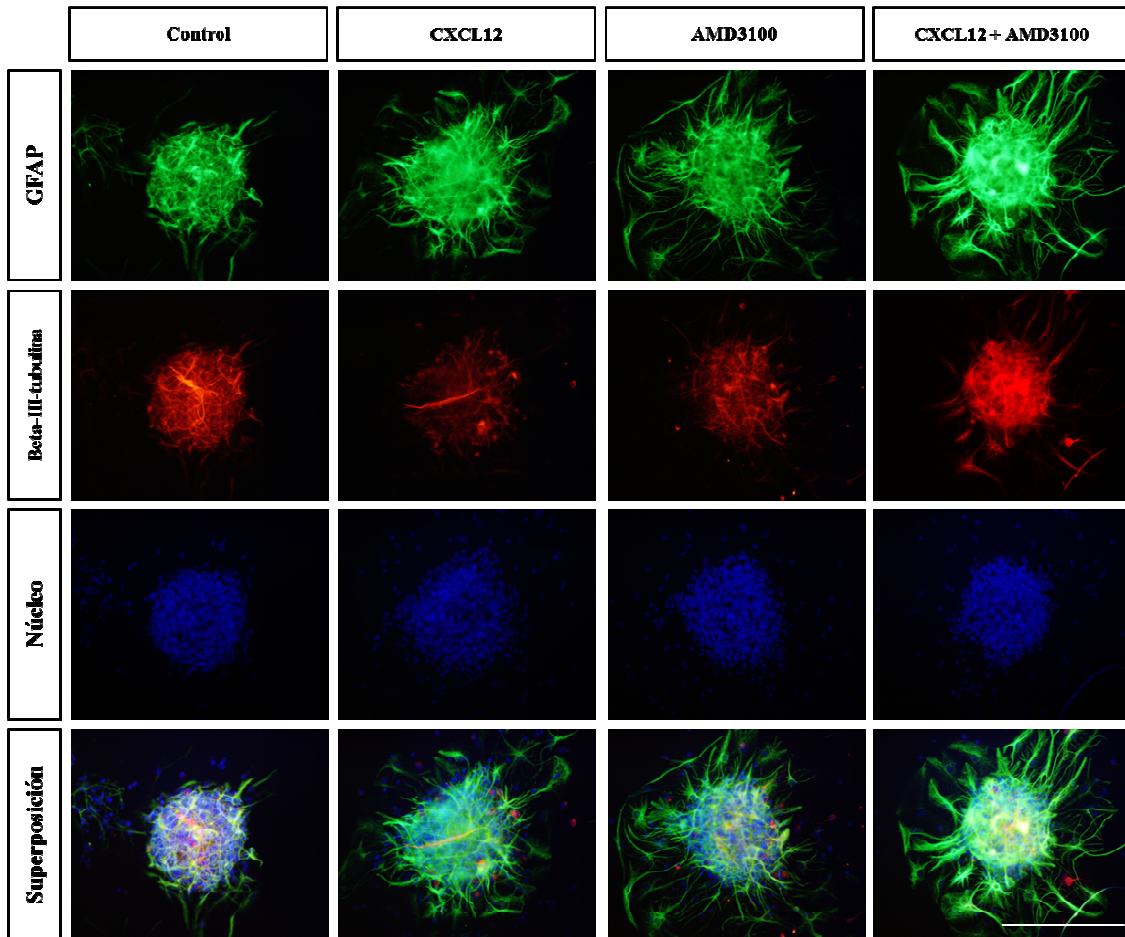
Además, se observó un aumento en los transcritos de los receptores CXCR4 y CXCR7 a los mismos días de diferenciación, lo que sugiere una función de éstos durante el proceso de diferenciación. Al mismo tiempo, para investigar sobre cuál receptor la quimioquina estaría ejerciendo su efecto se utilizó el antagonista farmacológico de CXCR4, AMD3100. Las concentraciones usadas se escogieron en base a lo reportado en la literatura (Li M y cols., 2011; Wu y cols., 2009).

Mediante inmunofluorescencia, se evaluaron los cambios en los niveles de los marcadores de linaje correspondientes a los precursores de astrocitos a partir de la marca obtenida con un anticuerpo anti-GFAP, y a los precursores neuronales a partir de la marca obtenida con un anticuerpo anti- beta-III-tubulina (**Figura 15**). La intensidad de fluorescencia se cuantificó en tres experimentos distintos, cada uno incluyendo entre 40 y 50 neuroesferas. La cuantificación se normalizó por el perímetro de las neuroesferas (**Figuras 16A y B**).

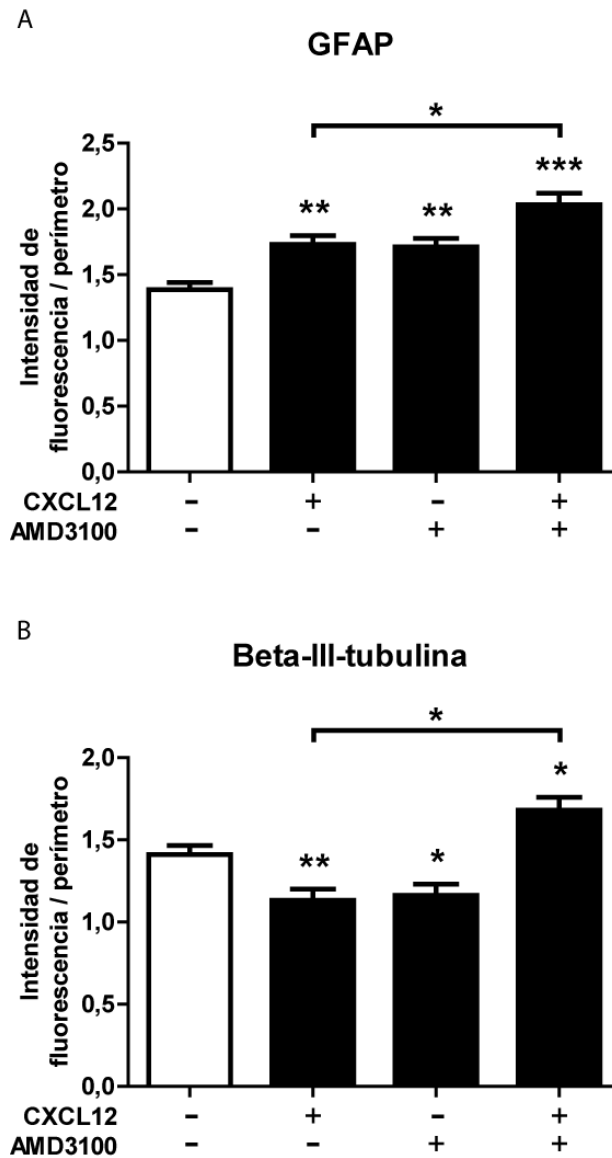
Al analizar los cambios que se observan en la intensidad de fluorescencia de GFAP con las distintas condiciones es posible notar que cuando las neuroesferas se trataron con CXCL12 la intensidad de fluorescencia de GFAP aumentó, es decir, aumentó la diferenciación a astrocito. Luego, cuando se analiza la condición sólo con el antagonista de CXCR4, AMD3100, la diferenciación a astrocito también aumentó con respecto al control. Finalmente, en la cuarta condición, en la que se trataron las neuroesferas con CXCL12 en presencia de AMD3100, la diferenciación astrogliar fue mayor que en las otras tres condiciones (**Figuras 15 y 16A**).

Cuando se analiza la intensidad de fluorescencia de beta-III-tubulina, se observa que ésta disminuyó con el tratamiento con CXCL12, lo que significa que hubo una menor diferenciación neuronal que en el control. Cuando se trataron las neuroesferas con el antagonista de CXCR4, la diferenciación también disminuyó con respecto a la situación control (**Figuras 15 y 16B**). En la condición de quimioquina más AMD3100 la intensidad de fluorescencia de beta-III-tubulina superó al control, indicando que en este caso hubo una mayor diferenciación a neurona.

Los resultados obtenidos muestran que CXCL12 participa regulando el proceso de diferenciación de las CTNs, favoreciendo la diferenciación astrogliar sobre la neuronal. El rol de los receptores CXCR4 y CXCR7 requiere ser elucidado, aunque indudablemente la participación de ambos receptores en el proceso pareciera ser relevante considerando que los niveles de sus RNAs mensajeros aumentan después de 4 días de diferenciación y del efecto que se observa al tratar las neuroesferas con el antagonista de CXCR4, AMD3100.



**Figura 15: Efectos de CXCL12 y AMD3100 en la diferenciación de neuroesferas de ME.** Las neuroesferas adheridas a poli-D-lisina se estimularon durante 4 días con CXCL12 (100 ng/mL) y AMD3100 (2,5 µg/mL). Después de este tiempo se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos anti-GFAP (verde), anti-beta-III-tubulina (rojo) y Hoeschst (azul). Imágenes representativas obtenidas con un microscopio de epifluorescencia a un aumento de 40X. La barra indica 100 µm. Imágenes representativas de al menos 100 neuroesferas por condición en 3 experimentos independientes.



**Figura 16: Cuantificación del efecto de CXCL12 y AMD3100 en la diferenciación de neuroesferas de ME.** A y B. Cuantificaciones de las intensidades de fluorescencia verde (GFAP) y roja (beta-III-tubulina) respectivamente, normalizadas por su perímetro. Las neuroesferas adheridas a poli-D-lisina se estimularon durante 4 días con CXCL12 (100 ng/mL) y AMD3100 (2,5 µg/mL). Después de este tiempo se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con los anticuerpos anti-GFAP (verde), anti-beta-III-tubulina (rojo) y Hoeschst (azul). A partir de las imágenes obtenidas de un microscopio de epifluorescencia se cuantificaron las intensidades de fluorescencia de al menos 100 neuroesferas por condición en 3 experimentos distintos con el programa computacional Image J. Se utilizó como test estadístico ANOVA de una vía y el test de Tukey \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .



## 6. DISCUSIÓN

### Células troncales neurales de médula espinal cultivadas en forma de neuroesferas

Los antecedentes respecto de la presencia y el funcionamiento de las CTs en la ME son escasos. Aunque desde 1996 se sabe que es posible aislar CTs adultas de diferentes secciones de la ME (Weiss y cols., 1996), poco se conoce respecto de mecanismos que regulen sus propiedades funcionales. En este trabajo se obtuvieron CTNs a partir de ME de embriones en estadio E18,5 en un protocolo de aproximadamente 2 horas. La principal limitación fue el rendimiento del cultivo, que fue de 335.000 células/embrión con un promedio de 6 embriones por cultivo. Fue posible subcultivar las neuroesferas por lo menos 4 veces, aunque los experimentos se realizaron en neuroesferas secundarias, ya que a medida que avanzaban los subcultivos las células perdían su capacidad proliferativa. Esto se puede explicar porque en la neuroesfera se favorece la diferenciación de las células en su interior, perdiendo así su troncalidad, lo que haría que a medida que va aumentando el tiempo de cultivo, las células con capacidad de autorrenovación se vayan perdiendo (Conti y Cattaneo, 2010).

Las CTs se definen por su potencial de autorrenovación y su potencial de diferenciación (Hall y Watt, 1989). Se comprobó que las células obtenidas en cultivo en forma de neuroesferas, efectivamente correspondían a CTs, evaluando ambas características. Aunque no se evaluó de manera cuantitativa, la capacidad de autorrenovación se corroboró a través de la formación de neuroesferas secundarias. De manera complementaria, al examinar la presencia de un marcador propio de las CTNs como SOX2, éste se encontraba en las neuroesferas en suspensión (**Figura 4**), lo que comprueba la presencia de estas células en la neuroesfera. Por otra parte, también fue posible encontrar transcritos de genes característicos de precursores neurales más comprometidos a ciertos linajes como MAP2, MAG y GFAP, resultado relevante considerando el modelo de trabajo. La neuroesfera corresponde a una estructura heterogénea en la cual es posible encontrar CTNs así como también progenitores con un grado mayor de compromiso. La heterogeneidad representa para algunos una de las mayores desventajas de este sistema de cultivo, por cuanto no es posible estudiar un tipo celular específico y su respuesta (Conti y Cattaneo, 2010). Esta heterogeneidad, la cual está presente en las neuroesferas generadas como se observó en los

resultados, no necesariamente representa un detrimento en este trabajo. Esto debido a que las interacciones entre los diferentes tipos celulares presentes en la neuroesfera, también representan un modelo más adecuado para estudiar los componentes del nicho neurogénico que son el objeto de estudio en esta tesis.

El potencial de diferenciación se observó, en primera instancia, a través de la visualización de cambios morfológicos evidentes en las neuroesferas adheridas a sustrato y en ausencia de mitógenos. Bajo estas condiciones las células pertenecientes a las neuroesferas extienden prolongaciones aparentemente neurales (**Figura 5**). Si bien la simple observación no permite definir el tipo de prolongaciones, es factible que ellas representen neuritas (Shetty y Turner, 1998) o extensiones propias de progenitores neurales menos comprometidos (Mothe y cols., 2011). En este sentido, los análisis de marcadores de linaje realizados en estos cultivos indican que estas extensiones se asocian tanto a neuronas como glías, sugerido sobre la base de la marcación obtenida por beta-III-tubulina y GFAP respectivamente (**Figuras 7 y 15**). También es probable que algunas prolongaciones sean parte de precursores menos comprometidos (menos diferenciados) o de oligodendrocitos, pero eso no es posible determinarlo con los actuales resultados.

Otra medida de cambios fenotípicos asociados al proceso de diferenciación se observó a través del aumento aparente en los niveles de los transcritos de los genes marcadores de linaje, MAP2, MAG y GFAP (**Figura 6**). Estas observaciones son congruentes con los resultados obtenidos al analizar los niveles de marcadores de linaje a nivel de proteínas como GFAP y beta-III-tubulina (**Figura 7**), lo cual corrobora la capacidad de multipotencialidad de las células que componen la neuroesfera.

Una observación aparentemente contradictoria respecto de los cambios en niveles de los marcadores, resultó del análisis de los niveles del RNA mensajero de SOX2, marcador de CTN, el cual también aumentó durante el proceso de diferenciación cuando teóricamente lo esperable era que disminuyera. Una explicación para este resultado es que al sembrar las neuroesferas en condiciones de diferenciación, la proliferación de las CTNs no se detiene totalmente. En este sentido, observaciones de nuestro laboratorio y la literatura, muestran que durante la transición a un modelo de diferenciación (adhesión a sustrato), también ocurre proliferación (Pollard y cols.,

2006). De igual manera, se vio que el tamaño de las neuroesferas aumenta considerablemente durante el proceso de diferenciación (no se muestra), lo que podría ser indicativo de proliferación. Sin duda, esta proliferación remanente es significativamente menor que la observada en cultivos mantenidos en presencia de mitógenos.

En resumen, fue posible validar el modelo de las neuroesferas de ME de tejido embrionario E18,5 como una forma de cultivo de CTNs. Se pudo observar tanto la característica de autorrenovación como la de diferenciación bajo distintos criterios.

#### Presencia de la alfa-quimioquina CXCL12 y sus receptores en las células troncales neurales de la médula espinal

El nicho neurogénico más estudiado es el de la SVZ de cerebro, en el cual las CTNs se encuentran en contacto con las células progenitoras (Alvarez-Buylla y Lim, 2004) y además en estrecha cercanía con los vasos sanguíneos (Zacchigna y cols., 2008). A partir de esta cercanía es que moléculas que han sido caracterizadas principalmente como angiogénicas, se les haya adjudicado ahora funciones neurogénicas. Se ha visto que moléculas como el VEGF tienen efectos directos sobre las CTNs promoviendo su proliferación, migración, supervivencia y diferenciación neuronal (Sun y cols., 2003; Wang y cols., 2007).

Las quimioquinas son una gran familia de moléculas con funciones angiogénicas y que también se han relacionado con neurogénesis. En particular las alfa-quimioquinas se han involucrado en migración, proliferación y diferenciación de progenitores neurales (Edman y cols., 2008; Li y cols., 2011; Luo y cols., 2005; Wu y cols., 2009). Es por esto que en este trabajo se analizaron las alfa-quimioquinas CXCL1 y CXCL12 con sus respectivos receptores. Dada la ausencia del transcrito de la quimioquina CXCL1 y sus receptores en la ME (no mostrado) y en las neuroesferas (**Figura 8**), el trabajo se concentró en la quimioquina CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7.

La quimioquina CXCL12 se denomina quimioquina homeostática ya que se encuentra constitutivamente en muchos órganos, tales como pulmón, hígado y cerebro (Zlotnik y cols.,

2011). La dupla CXCL12-CXCR4 se ha caracterizado principalmente por su rol en el *homing* de la médula ósea (Sharma y cols., 2011) y por ser CXCR4 el correceptor del virus VIH (Carter y cols., 2011; Moore y cols., 1997).

La investigación de esta dupla también se ha trasladado al ámbito de la neurogénesis, descubriéndose que, en el cerebro, la quimioquina CXCL12 participa regulando proliferación y migración de precursores neurales (Edman y cols., 2008; Li y cols., 2011; Wu cols., 2009). Sin embargo, todos los estudios se han enfocado principalmente en el receptor CXCR4. Esto se debe a que el CXCR7 fue relacionado recientemente a CXCL12, considerándose previamente un receptor huérfano (Balabanian y cols., 2005).

Existen antecedentes que muestran que CXCR4 se encuentra en la ME de rata (Luo y cols., 2005; Opatz y cols., 2009) e incluso en las células endodiales (Tysseling y cols., 2011), las cuales son consideradas las CTNs de la ME. Además se ha descrito que el RNA mensajero de CXCR7 se encuentra en ciertas regiones cerebrales, como en vasos sanguíneos, neuronas maduras y otras estructuras como el bulbo olfatorio, las paredes de los ventrículos laterales (Schönemeier y cols., 2008b) y en el prosencéfalo de ratón (Tiveron y cols., 2010); en líneas celulares neuronales se ha detectado la proteína (Shimizu y cols., 2011). En este trabajo se comprobó la presencia del RNA mensajero y las proteínas de ambos receptores, CXCR4 y CXCR7 en las neuroesferas (**Figuras 10 y 11**). El receptor CXCR4, detectado por inmunofluorescencia, estaría presente sólo al centro de la neuroesfera y en las células SOX2 positivas o CTNs (**Figura 12**). De igual manera, CXCR7 se detectó en las neuroesferas por esta técnica, siendo éste el primer trabajo que demuestra la presencia de este receptor en las CTNs de ME (**Figura 13**). En este sentido, sólo recientemente se ha observado la presencia de CXCR7 en células progenitoras neurales de cerebro (Bakondi y cols., 2011).

Los resultados de esta tesis muestran que el patrón de distribución del receptor CXCR7 abarca hasta las ramificaciones de las neuroesferas (**Figura 11**), formando estructuras complejas y bien definidas (**Figura 13**). El hecho de que CXCR7 tenga una mayor distribución que CXCR4 puede explicarse por el rol mayoritario que se le adjudica a CXCR7, el cual es de receptor señuelo, es decir, actúa como secuestrador de la quimioquina (Naumann y cols., 2010). En este sentido, podría estar ocurriendo, al igual que en el desarrollo del pez cebra, que CXCR7

capturara a CXCL12 y que así las células que tienen CXCR4 mantengan su sensibilidad a los niveles de quimioquina en el ambiente (Boldajipur y cols., 2008). En este caso, las células que presentan CXCR7 estarían en la periferia de la neuroesfera controlando la cantidad de quimioquina que llega efectivamente a las CTNs. No obstante, esta hipótesis requiere ser analizada experimentalmente en estudios posteriores.

Los resultados obtenidos indican que ambos receptores están presentes en las CTNs de la ME y durante la diferenciación, lo que sugiere un rol de CXCL12 actuando sobre sus receptores en este proceso.

#### Rol de CXCL12 y sus receptores en la diferenciación de células troncales neurales de médula espinal

Los estudios sobre las funciones de la quimioquina CXCL12 y sus receptores generalmente están más enfocados a evaluar aquellas funciones que ya se les conoce en el sistema inmune, principalmente en la migración de ciertos tipos celulares. Sin embargo, por las vías de transducción de señales que se activan en respuesta a esta quimioquina, es factible que pueda cumplir otros roles en procesos tales como proliferación, supervivencia o diferenciación (Delgado-Martín y cols., 2011). Sobre esta base, se evaluaron los cambios en los niveles de los mensajeros de CXCL12, CXCR4 y CXCR7 en el proceso de diferenciación y se observaron aumentos importantes, aunque no estadísticamente significativos en los mensajeros de CXCR4 y CXCR7 a 4 días de diferenciación, siendo el aumento de CXCR7 el más notorio (**Figura 14: B, D y E**). Esto podría significar una importante función de este receptor en el proceso. De hecho, se ha descrito que los niveles de transcrito de CXCR7 aumentan durante la diferenciación de neuroesferas de glioma, y no así los niveles de CXCR4 (Hattermann y cols., 2010).

Si es que este receptor tuviese la función de secuestrador, su aumento durante la diferenciación puede ser una forma de regular la cantidad de quimioquina en el entorno y así impedir la desensibilización del receptor CXCR4. Esta idea se basa en el hecho de que con preincubaciones de la quimioquina CXCR4 pierde su actividad (Kolodziej y cols., 2008).

Para ver si efectivamente CXCL12 tiene alguna función en la diferenciación de las CTNs de ME, se evaluó su efecto directo durante el proceso de diferenciación hacia un determinado linaje neural (Edman y cols., 2008). Se analizaron GFAP y beta-III-tubulina como marcadores de precursores astrogliales y neuronales respectivamente (Chen y cols., 2011; Shetty y Turner, 1998). Se observó un aumento en la diferenciación glial con el tratamiento con CXCL12, representada por el aumento en la intensidad de fluorescencia de GFAP (**Figuras 15 y 16A**). En cambio, la diferenciación neuronal, representada por la intensidad de fluorescencia de beta-III-tubulina, disminuyó cuando las neuroesferas se trataron con la quimioquina (**Figuras 15 y 16B**). Estas observaciones sugieren un rol de CXCL12 modulando el proceso de diferenciación, en este caso favoreciendo la diferenciación astrogliar sobre la neuronal.

Teniendo en cuenta esta posible función de CXCL12, es factible pensar en alguna aplicación médica al utilizarla o bloquearla. En este contexto, recientemente se demostró que al utilizar bloqueadores de esta quimioquina luego de un trasplante de CTNs, en un modelo de ratón de la enfermedad esclerosis múltiple, se produjo una disminución de la migración y proliferación de las células trasplantadas (Carbajal y cols., 2010). Por otro lado, CXCL12 también ha sido relacionada a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica regulando migración de progenitores gliales (Luo y cols., 2007). Estas observaciones demuestran la importancia de esta quimioquina y su bloqueo en algunas propiedades funcionales tanto de CTNs como de progenitores y sugiere la posibilidad de ser utilizado como un blanco terapéutico, por ejemplo, en casos de lesión a la médula espinal. Se sabe que luego de 7 días después de la lesión aumentan los niveles del RNA mensajero de CXCL12 (Takeushi y cols., 2007) y que macrófagos CXCR4 positivos migran al sitio de la lesión gracias a la presencia de CXCL12, regulando la respuesta inmune postlesión (Tysseling y cols., 2011). Todos estos antecedentes dan cuenta del importante rol de CXCL12 regulando procesos fisiológicos tanto en caso de lesión a la médula espinal como en enfermedades que degeneran este tejido.

Considerando que los resultados obtenidos muestran la presencia de los dos receptores de CXCL12, como una manera de averiguar cuál de los dos receptores de esta quimioquina participa en el proceso de diferenciación, se utilizó como herramienta un antagonista farmacológico de CXCR4, AMD3100. Se usó este antagonista considerando que CXCR4 es el receptor más descrito y, según la mayoría de los trabajos, el único de los dos receptores que es funcional

(Rajagopal y cols., 2010). Así se establecieron otras dos condiciones experimentales: las neuroesferas tratadas con AMD3100 y con CXCL12 en presencia de este antagonista.

Cuando las neuroesferas se trataron con AMD3100 hubo una mayor diferenciación hacia el linaje astrocítico que en el control, como lo indica el aumento en la detección de la proteína GFAP. Paradojalmente, este efecto resultó aún mayor cuando se utilizó la combinación de antagonista y quimioquina (**Figura 16A**). Si es que el efecto fuese mediado sólo por CXCR4, al utilizar un antagonista la diferenciación debería ser similar al control. Así, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que el antagonista está teniendo un efecto sobre las neuroesferas distinto al esperado, el cual podría ser mediado, probablemente, a través de CXCR7 (**Figura 17A**). Esta posibilidad se basa en antecedentes que confirman el rol de AMD3100 como agonista de CXCR7 a altas concentraciones (Gravel y cols., 2010; Katalatskaya y cols., 2009). Aunque las condiciones experimentales usadas en esta tesis no alcanzan dichas concentraciones, no es posible descartar que algún efecto independiente de CXCR4 sea observado a concentraciones menores de AMD3100, como ha sido descrito en otros trabajos (Bakondi y cols., 2011). La sugerencia de que AMD3100 funcione como agonista de CXCR7 explicaría el aumento en los niveles de GFAP cuando las neuroesferas sólo se tratan con este antagonista. Por otra parte, los resultados sugieren que en las neuroesferas tratadas con la quimioquina en presencia de AMD3100, este antagonista continúa actuando sobre CXCR7 y también CXCL12. Se ha descrito que CXCR7 en algunos modelos señala a través de  $\beta$ -arrestina y en otros mediante proteína G (Luker y cols., 2009; Odemis y cols., 2010). Sin embargo, recientemente se le ha adjudicado otro rol a este receptor, que es el de receptor preferencial, es decir, dependiendo del ligando al cual está expuesto este receptor, puede señalar a través de una vía o la otra (Odemis y cols., 2011; Rajagopal y cols., 2010). En este caso, los ligandos de CXCR7 son, CXCL12 y AMD3100, ambos favoreciendo la diferenciación glial. De esta manera, el aumento en los niveles de GFAP que se observa al tratar las neuroesferas con CXCL12 debería ser producto de la unión de esta quimioquina al CXCR7. El incremento observado por la exposición a AMD3100 sería el resultado de la acción de este antagonista sobre CXCR7 y, cuando están presentes los dos ligandos, se percibiría este efecto aumentado debido a la acción de ambos sobre CXCR7 (**Figuras 16A y 17B**).

Para comprobar si este supuesto es real, habría que utilizar un modelo celular más simple en el que esté presente CXCR7 y no CXCR4 y evaluar la activación de la vía ya sea por la fosforilación de Erk y Akt o el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con cada ligando por separado, CXCL12 y AMD3100, en presencia o ausencia de la toxina pertussis para evaluar la participación de la proteína G, o de un RNA interferente para  $\beta$ -arrestina para analizar su contribución (Odemis y cols., 2011).

Con respecto a la diferenciación neuronal, cuando las neuroesferas se trataron con AMD3100 el nivel de beta-III-tubulina disminuyó con respecto al control. Esto sugiere un efecto de AMD3100 actuando sobre CXCR7 disminuyendo la diferenciación a linaje neuronal, lo mismo que se observó con el tratamiento con CXCL12. Cuando las células se expusieron a CXCL12 en presencia del antagonista, la diferenciación a neurona fue superior incluso al control, lo que podría explicarse, en este caso, por un efecto de CXCL12 sobre CXCR7, ya que al estar bloqueado CXCR4 (por el efecto de AMD3100) la quimioquina actuaría sobre CXCR7, claro que en este caso el efecto de CXCL12 sobre CXCR4 impidiendo diferenciación neuronal es mayor que el que ejerce sobre CXCR7 (**Figuras 16B y 17C**).

Es conveniente decir que el efecto que tenga la quimioquina para estimular la diferenciación hacia algún linaje en particular puede no ser en el mismo tipo celular, ya que, como se había mencionado anteriormente, la neuroesfera es una estructura compacta y heterogénea. Por lo tanto, con los experimentos aquí mostrados es imposible descifrar sobre qué células actúa cada ligando y el efecto final que se observa es a nivel de la población de células que componen la neuroesfera. Este modelo de heterogeneidad celular podría explicar la complejidad del mecanismo transduccional de CXCR4 y CXCR7 que acá se plantea.

En todas las posibles explicaciones anteriores se consideró la dualidad de respuestas que tendrían dos ligandos diferentes, CXCL12 y AMD3100, sobre un mismo receptor CXCR7. Esta interpretación se condice con otros resultados de este trabajo como el aumento en el transcrito de CXCR7 a 4 días de diferenciación (**Figura 14**) y la fuerte presencia de este receptor a los mismos 4 días de diferenciación (**Figuras 11 y 13**).

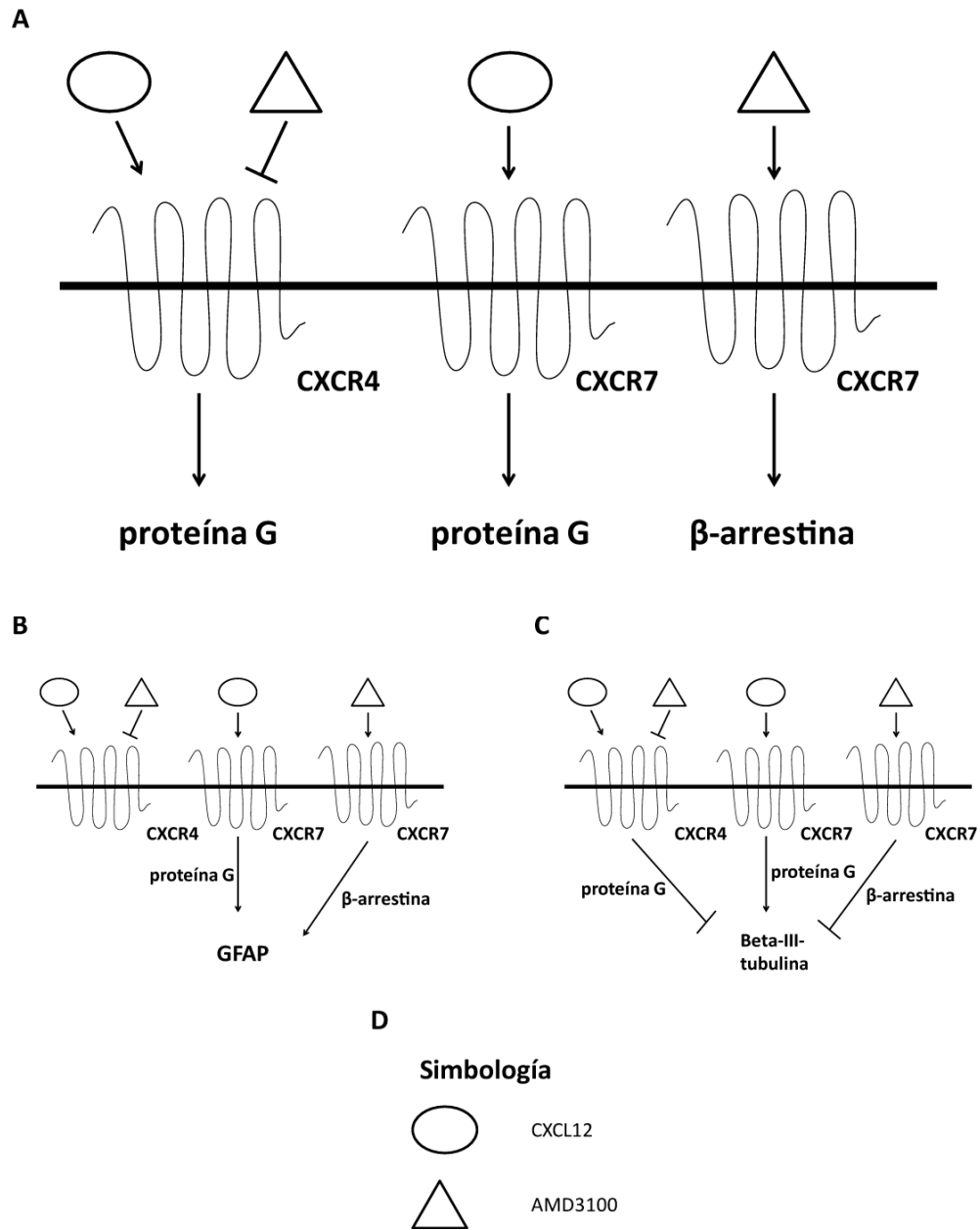


El efecto de AMD3100 sobre CXCR7, favoreciendo la diferenciación astrogial e inhibiendo la neuronal también podría resultar una interesante herramienta terapéutica. Por ser CXCR4 un receptor de suma importancia fisiológica, AMD3100, su antagonista, se desarrolló rápidamente y actualmente es un fármaco (Plerixafor), aprobado por la FDA (administración de alimentos y medicamentos de EE.UU.), para movilizar CTs hematopoyéticas en pacientes con linfomas no Hodgkin y mieloma múltiple (Pusic y DiPersio, 2010). Además ha resultado ser eficiente en inhibir el crecimiento de carcinomas e impedir la metástasis según estudios clínicos y preclínicos (Duda y cols., 2011).

El hecho de que AMD3100 sea un fármaco utilizado actualmente facilita mucho más su uso para otras patologías. Si se utilizase en caso de lesión a la ME, se tendría una situación similar a la obtenida en la cuarta condición experimental, en la que se tratan las neuroesferas con AMD3100 en presencia de la quimioquina. En esta condición la diferenciación tanto a neurona como astrocito se ven aumentadas con respecto al control (**Figuras 16A y B**), esto quiere decir que podría estimularse la diferenciación de las CTNs endógenas utilizando AMD3100 como tratamiento. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales con distintas concentraciones del antagonista para ver si es que alguna de las diferenciaciones se favorece sobre la otra, considerando su posible acción como agonista de CXCR7. Otra alternativa terapéutica sería utilizar otros antagonistas más específicos de CXCR4 como T134 o T140 desarrollados como péptidos anti-VIH (Arakaki y cols., 1999; Tamamura y cols., 1998). Sin embargo, hay que tener presente que otros antagonistas de CXCR4 como TC14012 resultan ser, al igual que AMD3100, agonistas de CXCR7 sin estar relacionados estructuralmente (Gravel y cols., 2010).

Con todo lo expuesto anteriormente, se puede sugerir la gran importancia que tiene la acción de la quimioquina CXCL12 sobre sus receptores CXCR4 y CXCR7 en el proceso de diferenciación de las CTNs de la ME. Esta importancia viene dada, por un lado, por la detección de los receptores mismos y sus RNAs mensajeros en las neuroesferas, específicamente en las CTNs que forman parte de la neuroesfera, y por otro lado, por su función regulando la diferenciación a un linaje neural específico como lo son los astrocitos y las neuronas.

Los resultados analizados constituyen una interesante observación sobre el rol de CXCR7 en la regulación de las CTNs. Por una parte, su presencia y distribución escasamente caracterizada y por otra, su novedosa función como transductor de señales, posiblemente a través de dos vías. Hacen falta más experimentos, como silenciamientos de CXCR4 y CXCR7 y otros enfoques para confirmar el rol de estos receptores durante el proceso de diferenciación. Ello permitirá reconocer y comprender a cabalidad todos los mecanismos moleculares y de transducción de señales que subyacen las acciones de estos receptores en las CTNs, ya que las proyecciones de este trabajo apuntan al desarrollo de eventuales terapias para distintas enfermedades que afectan a la ME en las que participa esta importante quimioquina.



**Figura 17: Modelo tentativo del rol de CXCR4 y CXCR7 en la diferenciación de CTNs de ME.**  
**A.-** Esquema general, efectos de CXCL12 y AMD3100 sobre CXCR4 y CXCR7. Efectos de CXCL12 y AMD3100 sobre **B.-** diferenciación astrogliar y **C.-** diferenciación neuronal. **D.-** simbología.

## 7. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados durante esta tesis se realizaron bajo la hipótesis general de que las alfa-quimioquinas regulan el proceso de diferenciación de las CTNs cultivadas como neuroesferas de ME fetal de ratones.

Los resultados presentados permiten concluir que:

1. Las neuroesferas derivadas de ME presentan los RNAs mensajeros de CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7.
2. Las neuroesferas derivadas de ME no presentan niveles detectables de los RNAs mensajeros de CXCL1 y sus receptores CXCR1 y CXCR2.
3. Las neuroesferas a 4 días de diferenciación presentan los receptores CXCR4 y CXCR7 y éstos se encuentran en las CTNs.
4. CXCL12 favorece la diferenciación astrogliar sobre la neuronal en las neuroesferas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, A. y Gallo, V. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biology* **3**: 209-220 (2007)

Aguirre, A., Rubio, M.E. y Gallo, V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* **467**: 323-327 (2010)

Alvarez-Buylla, A. y Lim, D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**: 683-686 (2004)

Arakaki, R., Tamamura, H., Premanathan, M., Kanbara, K., Ramanan, S., Mochizuki, K., Baba, M., Fujii, N y Nakashima, H. T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *Journal of virology* **73**: 1719-1723 (1999)

Asensio, V.C. y Campbell, I.L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends in Neurosciences* **22**: 504-512 (1999)

Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y.-R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M. y Pleasure, S.J. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* **129**: 4249-4260 (2002)

Bakondi, B., Shimada, I.S., Peterson, B.M. y Spees, J.L. SDF-1 $\alpha$  secreted by human CD133-derived multipotent stromal cells promotes neural progenitor cell survival through CXCR7. *Stem Cells and Development* **20**: 1021-1029 (2011)

Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y. C., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M. y Bachelier, F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 35760-35766 (2005)

Banisadr, G., Fontanges, P., Haour, F., Kitabgi, P., Rostène, W. y Mélik Parsadaniantz, S. Neuroanatomical distribution of CXCR4 in adult rat brain and its localization in cholinergic and dopaminergic neurons. *The European Journal of Neuroscience* **16**: 1661-1671 (2002)

Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F. W., Meletis, K. y Frisé, J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* **7**: 470-482 (2010)

Bath, K.G. y Lee, F.S. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Developmental Neurobiology* **70**: 339-349 (2010)

Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q. y Raz, E. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* **132**: 463-473 (2008)

- Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E. M., Corsi, M. M., Locati, M. y Mantovani, A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience* **14**: 540-551 (2009)
- Cadotte, D.W y Fehlings, M.G. Spinal cord injury: a systematic review of current treatment options. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **469**: 732-741 (2011)
- Carbajal, K.S., Schaumburg, C., Strieter, R., Kane, J. y Lane, T.E. Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11068-11073 (2010)
- Carter, C.C., McNamara, L.A., Onafuwa-Nuga, A., Shackleton, M., Riddell, J., Bixby, D., Savona, M.R., Morrison, S.J. y Collins, K.L. HIV-1 utilizes the CXCR4 chemokine receptor to infect multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Host & Microbe* **9**: 223-234 (2011)
- Chen, Y., Huang, X., Chen, W., Wang, N. y Li, L. Tenuigenin promotes proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells. *Neurochemical Research* **37**: 771-777 (2011)
- Chojnacki, A.K., Mak, G.K. y Weiss, S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nature Reviews. Neuroscience* **10**: 153-163 (2009)
- Conti, L. y Cattaneo, E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience* **11**: 176-187 (2010)
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q-L., Cattaneo, E. y Smith, S. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biology* **3**: 1594-1606 (2005)
- Dallner, C., Woods, A.G., Deller, T., Kirsch, M. y Hofmann, H.-D. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* **37**: 374-378 (2002)
- D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P. y Sinigaglia, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *Journal of Immunological Methods* **273**: 3-13 (2003)
- Davis, A.A. y Temple, S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* **372**: 263-266 (1994)
- Delgado-Martín, C., Escribano, C., Pablos, J.L., Riol-Blanco, L. y Rodríguez-Fernández, J.L. CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, Erk1/2 and mTORC1 to control simultaneously chemotaxis and survival in mature dendritic cells. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 37222-37236 (2011)
- Drukker, M. Immunogenicity of human embryonic stem cells: can we achieve tolerance? *Springer Seminars in Immunopathology* **26**: 201-213 (2004)

- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D. y Jain, R.K. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clinical Cancer Research* **17**: 2074-2080 (2011)
- Edman, L.C., Mira, H., Erices, A., Malmersjö, S., Andersson, E., Uhlén, P. y Arenas, E. Alpha-chemokines regulate proliferation, neurogenesis, and dopaminergic differentiation of ventral midbrain precursors and neurospheres. *Stem Cells* **26**: 1891-1900 (2008)
- Emsley, J.G. y Hagg, T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Experimental Neurology* **183**: 298-310 (2003)
- Fiore, M., Triaca, V., Amendola, T., Tirassa, P. y Aloe, L. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. *Physiology & Behavior* **77**: 437-443 (2002)
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. y Pevny, L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**: 749-765 (2003)
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabé de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., y Mohier, E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**: 1391-1402 (2003)
- Gravel, S., Malouf, C., Boulais, P. E., Berchiche, Y. A., Oishi, S., Fujii, N., Leduc, R., Sinnett, D. y Heveker, N. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 37939-37943 (2010)
- Hall, P.A. y Watt, F.M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**: 619-633 (1989)
- Hamilton, L.K., Truong, M.K.V., Bednarczyk, M.R., Aumont, A. y Fernandes, K.J.L. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* **164**: 1044-1056 (2009)
- Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lucius, R., Mürköster, S. S., Penfold, M. E. T., Schall, T. J., y Mentlein, R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Research* **70**: 3299-3308 (2010)
- Hipp, J. y Atala, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews* **4**: 3-11 (2008)
- Hosking, M.P., Tirota, E., Ransohoff, R.M. y Lane, T.E. CXCR2 signaling protects oligodendrocytes and restricts demyelination in a mouse model of viral-induced demyelination. *PLoS One* **5**: 1-12 (2010)
- Huising, M.O., Stet, R.J.M., Kruiswijk, C.P., Savelkoul, H.F.J. y Lidy Verburg-van Kemenade, B.M. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends in Immunology* **24**: 307-313 (2003)

- Jenq, R.R. y van den Brink, M.R.M. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**: 213-221 (2010)
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y.A., Gravel, S., Limberg, B.J., Rosenbaum, J.S. y Heveker, N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Molecular Pharmacology* **75**: 1240-1247 (2009)
- Kang, J., Jiang, M.H., Min, H.J., Jo, E.-K., Lee, S., Karin, M., Yune, T.Y. y Lee, S.J. IKK- $\beta$ -mediated myeloid cell activation exacerbates inflammation and inhibits recovery after spinal cord injury. *European Journal of Immunology* **41**: 1266-1277 (2011)
- Kerstetter, A.E., Padovani-Claudio, D.A., Bai, L. y Miller, R.H. Inhibition of CXCR2 signaling promotes recovery in models of multiple sclerosis. *Experimental Neurology* **220**: 44-56 (2009)
- Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Lin, G., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q. y Temple, S. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell* **7**: 163-173 (2010)
- Kolodziej, A., Schulz, S., Guyon, A., Wu, D.-F., Pfeiffer, M., Odemis, V., Höllt, V. y Stumm, R. Tonic activation of CXC chemokine receptor 4 in immature granule cells supports neurogenesis in the adult dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* **28**: 4488-4500 (2008)
- Kooreman, N.G. y Wu, J.C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *Journal of the Royal Society* **7**: 753-763 (2010)
- Kriegstein, A. y Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience* **32**: 149-184 (2009)
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F. y Lagane, B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* **113**: 6085-6093 (2009)
- Li, D., Zhou, J., Chowdhury, F., Cheng, J., Wang, N. y Wang, F. Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. *Regenerative Medicine* **6**: 229-240 (2011)
- Li, L. y Jiang, J. Stem cell niches and endogenous electric fields in tissue repair. *Frontiers of Medicine* **5**: 40-44 (2011)
- Li, M., Chang, C.J., Lathia, J.D., Wang, L., Pacent, H.L., Cotleur, A. y Ransohoff, R.M. Chemokine receptor CXCR4 signaling modulates the growth factor-induced cell cycle of self-renewing and multipotent neural progenitor cells. *Glia* **59**: 108-118 (2011)
- Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J. y Jessell, T.M. A CXCL12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron* **47**: 667-679 (2005)



- Lilly, A.J., Johnson, W.E. y Bunce, C.M. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells International* **2011**: 274564-274574 (2011)
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M. y Wagers, A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Current Topics in Developmental Biology* **92**: 367-409 (2010)
- Luker, K.E., Gupta, M., Steele, J.M., Foerster, B.R. y Luker, G.D. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia* **11**: 1022-1035 (2009)
- Luo, Y., Cai, J., Xue, H., Miura, T. y Rao, M.S. Functional SDF1 alpha/CXCR4 signaling in the developing spinal cord. *Journal of Neurochemistry* **93**: 452-462 (2005)
- Luo, Y., Xue, H., Pardo, A. C., Mattson, M. P., Rao, M. S. y Maragakis, N. J. Impaired SDF1/CXCR4 signaling in glial progenitors derived from SOD1(G93A) mice. *Journal of Neuroscience Research* **85**: 2422-2432 (2007)
- Luskin, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**: 173-189 (1993)
- Luskin, M.B. y Boone, M.S. Rate and pattern of migration of lineally-related olfactory bulb interneurons generated postnatally in the subventricular zone of the rat. *Chemical Senses* **19**: 695-714 (1994)
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T. y Springer, T.A. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9448-9453 (1998)
- Maksym, R.B., Tarnowski, M., Grymula, K., Tarnowska, J., Wysoczynski, M., Liu, R., Czerny, B., Ratajczak, J., Kucia, M. y Ratajczak, M.Z. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *European Journal of Pharmacology* **625**: 31-40 (2009)
- Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 7634-7638 (1981)
- Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O. y Frisén, J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biology* **6**: 1494-1507 (2008)
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A.A., Bushell, T.J., Gray, P.W. y Miller, R.J. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14500-14505 (1998)
- Miller, R.H. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology* **67**: 451-467 (2002)

- Miller, R.J., Rostene, W., Apartis, E., Banisadr, G., Biber, K., Milligan, E.D., White, F.A. y Zhang, J. Chemokine action in the nervous system. *The Journal of Neuroscience* **28**: 11792-11795 (2008)
- Moore, J.P., Trkola, A. y Dragic, T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* **9**: 551-562 (1997)
- Morrison, S.J. y Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**: 598-611 (2008)
- Mothe, A.J., Zahir, T., Santaguida, C., Cook, D. y Tator, C.H. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* **6**: 1-13(2011)
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleshwar, H., Raz, E., Zerwes, H.-G., Rot, A y Thelen, M. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* **5**: 1-11 (2010)
- Nirmalanandhan, V.S. y Sittampalam, G.S. Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *Journal of Biomolecular Screening* **14**: 755-768 (2009)
- Obermair, F.J., Schröter, A y Thallmair, M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. *Physiology* **23**: 296-304 (2008)
- Odemis, V., Boosmann, K., Heinen, A., Küry, P. y Engele, J. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *Journal of Cell Science* **123**: 1081-1088 (2010)
- Odemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., Mentlein, R. y Engele, J. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* **60**: 372-381 (2011)
- Opatz, J., Küry, P., Schiwy, N., Järve, A., Estrada, V., Brazda, N., Bosse, F. y Müller, H.W. SDF-1 stimulates neurite growth on inhibitory CNS myelin. *Molecular and Cellular Neurosciences* **40**: 293-300 (2009)
- Ordóñez, P. y Di Girolamo, N. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. *Stem Cells* **30**: 100-107 (2011)
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R. y Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology* **425**: 479-494 (2000)
- Paredes, M.F., Li, G., Berger, O., Baraban, S.C. y Pleasure, S.J. Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *The Journal of Neuroscience* **26**: 9404-9412 (2006)

- Pastrana, E., Cheng, L.-C. y Doetsch, F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6387-6392 (2009)
- Pencea, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J. y Luskin, M.B. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of Neuroscience* **21**: 6706-6717 (2001)
- Pollard, S.M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D. y Smith, A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cerebral Cortex* **16**: 112-120 (2006)
- Pusic, I. y DiPersio, J.F. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Current Opinion in Hematology* **17**: 319-326 (2010)
- Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C. M., Gerard, N.P., Gerard, C. y Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 628-632 (2010)
- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E. K., Wysoczynski, M., Wan, W., Ratajczak, J., Wojakowski, W. y Kucia, M. Hunt for pluripotent stem cell regenerative medicine search for almighty cell. *Journal of Autoimmunity* **30**: 151-162 (2008)
- Reynolds, B.A. y Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**: 1707-1710 (1992)
- Rogojan, C. y Frederiksen, J.L. Hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* **120**: 371-382 (2009)
- Rolls, A., Shechter, R. y Schwartz, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Review. Neuroscience* **10**: 235-241 (2009)
- Rossi, D. y Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* **18**: 217-242 (2000)
- Rostène, W., Guyon, A., Kular, L., Godefroy, D., Barbieri, F., Bajetto, A., Banisadr, G., Callewaere, C., Conductier, G., Rovère, C., Mélik-Parsadaniantz, S. y Florio, T. Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. *Frontiers in Neuroendocrinology* **32**: 10-24 (2011)
- Rostène, W., Kitabgi, P. y Parsadaniantz, S.M. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience* **8**: 895-903 (2007)
- Rubio, N. y Sanz-Rodriguez, F. Induction of the CXCL1 (KC) chemokine in mouse astrocytes by infection with the murine encephalomyelitis virus of Theiler. *Virology* **358**: 98-108 (2007)

- Sánchez-Alcañiz, J.A., Haegel, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., López-Bendito, G., Stumm, R. y Marín, O. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* **69**: 77-90 (2011)
- Schwab, M.E y Bartholdi, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological Reviews* **76**: 319-370 (1996)
- Schönemeier, B., Kolodziej, A., Schulz, S., Jacobs, S., Hoell, V. y Stumm, R. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* **510**: 207-220 (2008a)
- Schönemeier, B., Schulz, S., Hoell, V. y Stumm, R. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *Journal of Neuroimmunology* **198**: 39-45 (2008b)
- Sharma, M., Afrin, F., Satija, N., Tripathi, R.P. y Gangenahalli, G.U. Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Stem Cells and Development* **20**: 933-946 (2011)
- Shetty, A.K. y Turner, D.A. *In vitro* survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neurobiology* **35**: 395-425 (1998)
- Shimizu, S., Brown, M., Sengupta, R., Penfold, M.E. y Meucci, O. CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons. *PLoS One* **6**: 1-14 (2011)
- Sierro, F., Biben, C., Martínez-Muñoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R.P., Martínez-A, C., Mackay, C.R. y Mackay, F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14759-14764 (2007)
- Simons, B.D. y Clevers, H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* **145**: 851-862 (2011)
- Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* **441**: 1060 (2006)
- Snippert, H.J. y Clevers, H. Tracking adult stem cells. *EMBO Reports* **12**: 113-122 (2011)
- Stumm, R.K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M., Kriegstein, J., Höllt, V. y Schulz, S. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *The Journal of Neuroscience* **22**: 5865-5878 (2002)
- Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Höllt, V. y Schulz, S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *The Journal of Neuroscience* **23**: 5123-5130 (2003)

- Sun, T., Wang, X.-J., Xie, S.-S., Zhang, D.-L., Wang, X.-P., Li, B.-Q., Ma, W. y Xin, H. A comparison of proliferative capacity and passaging potential between neural stem and progenitor cells in adherent and neurosphere cultures. *International Journal of Developmental Neuroscience* **29**: 723-731 (2011)
- Sun, Y., Jin, K., Childs, J. T., Xie, L., Mao, X. O. y Greenberg, D.A. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Developmental Biology* **289**: 329-335 (2006)
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A. y Greenberg, D.A. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of Clinical Investigation* **111**: 1843-1851 (2003)
- Tamamura, H., Xu, Y., Hattori, T., Zhang, X., Arakaki, R., Kanbara, K., Omagari, A., Otaka, A., Ibuka, T., Yamamoto, N., Nakashima, H y Fujii, N. A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**: 877-882 (1998)
- Takeuchi, H., Natsume, A., Wakabayashi, T., Aoshima, C., Shimato, S., Ito, M., Ishii, J., Maeda, Y., Hara, M., Kim, S.U. y Yoshida, J. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neuroscience Letters* **426**: 69-74 (2007)
- Temple, S. y Alvarez-Buylla, A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* **9**: 135-141 (1999)
- Tiveron, M.-C., Boutin, C., Daou, P., Moepps, B. y Cremer, H. Expression and function of CXCR7 in the mouse forebrain. *Journal of Neuroimmunology* **224**: 72-79 (2010)
- Tiveron, M.-C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y. L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N y Cremer, H. Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *The Journal of Neuroscience* **26**: 13273-13278 (2006)
- Tran, P.B., Banisadr, G., Ren, D., Chenn, A. y Miller, R.J. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology* **500**: 1007-1033 (2007)
- Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M. y van der Kooy, D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of Neuroscience* **17**: 7850-7859 (1997)
- Tsai, H.-H., Frost, E., To, V., Robinson, S., French-Constant, C., Geertman, R., Ransohoff, R.M. y Miller, R.H. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* **110**: 373-383 (2002)

- Tysseling, V.M., Mithal, D., Sahni, V., Birch, D., Jung, H., Belmadani, A., Miller, R. J., y Kessler, J.A. SDF1 in the dorsal corticospinal tract promotes CXCR4+ cell migration after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation* **8**: 16-24 (2011)
- Valentin, G., Haas, P. y Gilmour, D. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Current Biology* **17**: 1026-1031 (2007)
- Walker, M.R., Patel, K.K. y Stappenbeck, T.S. The stem cell niche. *The Journal of Pathology* **217**: 169-180 (2009)
- Wang, Y., Jin, K., Mao, X. O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H.H. y Greenberg, D.A. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *Journal of Neuroscience Research* **85**: 740-747 (2007)
- Wang, Y., Li, G., Stanco, A., Long, J. E., Crawford, D., Potter, G. B., Pleasure, S.J., Behrens, T. y Rubenstein, J.L.R. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* **69**: 61-76 (2011)
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. y Reynolds, B.A. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of Neuroscience* **16**: 7599-7609 (1996)
- Willerth, S.M. y Sakiyama-Elbert, S.E. Cell therapy for spinal cord regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**: 263-276 (2008)
- Wittko, I.M., Schänzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F.T., Shibuya, M., Raab, S. y Plate, K.H. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* **29**: 8704-8714 (2009)
- Wu, Y. Peng, H., Cui, M., Whitney, N. P., Huang, Y. y Zheng, J.C. CXCL12 increases human neural progenitor cell proliferation through Akt-1/FOXO3a signaling pathway. *Journal of Neurochemistry* **109**: 1157-1167 (2009)
- Zacchigna, S., Lambrechts, D. y Carmeliet, P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* **9**: 169-181 (2008)
- Zheng, W., Nowakowski, R.S. y Vaccarino, F.M. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Developmental Neuroscience* **26**: 181-196 (2004)
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M. y Homey, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature Reviews Immunology* **11**: 597-606 (2011)
- Zlotnik, A. y Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**: 121-127 (2000)
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I. y Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**: 595-599 (1998)