

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES
NEURALES DE MÉDULA ESPINAL MURINA Y SU
EXPRESIÓN DE VEGF/VEGFRS”.**

ROBERTO FERNANDO VERA SALAZAR

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
MÉDICAS
MENCION NEUROCIENCIAS**

Director de Tesis: Prof. Alejandro Erices Ocampo PhD.

2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por el candidato

ROBERTO FERNANDO VERA SALAZAR

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como
requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas y
Médicas con mención en Neurociencias en el Examen de Defensa
de Tesis rendido el día (fecha día, mes, año)**

**Prof. Alejandro Erices Ocampo PhD.
Director de Tesis
(Pontificia Universidad Católica de Chile)**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Verónica Palma PhD. Prof. Manuel Kukuljan PhD.

Prof. Julieta González PhD Prof. Paola Morales PhD.

**Prof. Jimena Sierralta PhD
Presidente Comisión**

Dedicatoria

Quisiera dedicar sentidamente estos años de esfuerzo académico y personal:

A mis abuelos:

Bernardina Bermúdez Sandoval

Rafael Jesús Salazar Salazar

Porque desde su más genuina simpleza, vieron siempre en la educación una forma de progreso personal.

A mi madre:

Inés del C. Salazar Bermúdez, quien inculcó en mí con amor y rigor de docente, la importancia del estudio y perfeccionamiento continuo.

A mi hija Josefa Paz:

“Te dejo este escrito, como testimonio material, de que todo lo que se empieza se debe terminar, no importa cuántos obstáculos te pongan por delante.”

Agradecimientos.

En primer lugar, agradezco a mi esposa por su amor y paciencia. Por esas palabras de aliento y abrazos en momentos en que quise abandonar. Por ser capaz de postergarse en aquellos fines de semana en que preparé un escrito, una presentación o estudiaba.

Agradezco la valiosa ayuda de profesores y compañeros de aula y laboratorio, que leyeron y aportaron juicio crítico a este escrito y a mis experimentos. A todos ellos, infinitas gracias por explicar una y tantas veces, aspectos técnicos que me fueron muy áridos.

Entregar esta tesis y cumplir con las formalidades, requirió de perseverancia y disciplina, sin embargo además, de cierta dosis de entendimiento de aspectos administrativos que le son propios a una universidad tan burocrática y compleja como la Universidad de Chile. Comprender sus recovecos, la lucha de egos de mis guías y profesores, además de los vicios propios del quehacer científico, sólo fue posible en virtud de las gratificantes conversaciones de pasillo y oficina que sostuve con el profesor Diego Bustamante Cádiz. Su simpleza en el lenguaje y su franca intención de ayuda, contribuyó desde mi perspectiva, mucho más que la labor de un guía de tesis. Al profesor Bustamante debo, el ponderar en su justa medida mis resultados y que los mismos, muy poco tienen que ver con la asistencia de profesores.

Índice

	Págs.
Resúmen.....	
Abstract.....	
Abreviaturas usadas.....	
I. Introducción.....	
1. Células troncales y regeneración.....	
2. Tipos de células troncales.....	
2.1. Células troncales embrionarias.....	
2.2. Células troncales adultas.....	
2.3. Células troncales neurales.....	
2.4. Modelos de cultivos experimentales con células troncales.....	
2.5. Células troncales neurales de médula espinal.....	
2.6. Trauma raquimedular y activación de células troncales neurales.....	
2.7. Nicho neurovascular.....	
3. VEGF: estructura y función.....	
4. VEGF en sistema nervioso.....	
II. Hipótesis.....	
III. Objetivos.....	
Objetivo general.....	
Objetivos específicos.....	
IV. Materiales y métodos.....	
1. Materiales.....	
1.1 Reactivos.....	
1.1.1 Medio de cultivo.....	
1.1.2 Suplementos.....	
1.1.3 Proteína recombinante e inhibidor.....	
1.1.4 Inmunofluorescencia.....	
1.1.5 Western Blot.....	
1.1.6 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	
1. Animales.....	
2. Cultivos de CTN.....	
3. Análisis de expresión génica.....	
4. Análisis funcionales.....	

5. Análisis estadístico.....	
V.Resultados.....	
Obtención de los cultivos.....	
VI. Conclusiones.....	
VII. Discusión.....	
VIII. Bibliografía.....	

Resumen

Recientes investigaciones sobre células troncales (CT), sugieren que pueden ser consideradas como alternativa en terapia regenerativa. Lo anterior, fundamentado en las características esenciales de estas células: potencial de autorrenovación y capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares. Por ello resulta atractivo considerar a las CT para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, como por ejemplo, las lesiones agudas de la médula espinal (ME), las cuales en la actualidad no poseen un tratamiento efectivo.

Dentro de los factores que regulan la funcionalidad de células troncales neurales (CTN), recientemente se ha descrito la participación de angioneurinas, familia de moléculas consideradas clásicamente como angiogénicas, que conforman parte del nicho neurovascular y pueden regular la actividad de precursores neurales. Un importante representante de esta familia es el factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF), el cual fue identificado inicialmente por sus propiedades angiogénicas, crecimiento óseo y funciones reproductivas, hoy se le atribuyen efectos sobre el proceso neurogénico en el sistema nervioso central (SNC) encefálico. Específicamente se ha visto que VEGF-A y su receptor Flk-1 participan en el desarrollo de estructuras del SNC y regulan funciones de proliferación y diferenciación de CTN a nivel encefálico.

Sin embargo, el rol que cumple VEGF, y en particular VEGF-A y sus receptores, en el desarrollo y homeostasis tisular de la ME aún no está claro. Considerando estos antecedentes, esta tesis postula que la *médula espinal murina posee CTN que expresan VEGF y sus receptores*. Dicha expresión, puede dar cuenta de la capacidad de este factor, tanto en el proceso de diferenciación de CTN, como en los procesos de regeneración después de un trauma medular. Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos de: a) caracterización de CTN provenientes de ME murina; b) evaluación de la expresión de *Vegf-A* y sus receptores (*Flt1*, *Flk1*, neuropilina 1 (NRP1) y neuropilina 2 (NRP2)) a nivel de mRNA y proteínas en muestras de ME y cultivos de CTN generadas a partir de ésta, y c) estudios de inhibición de actividad de *Vegf*-receptor y su efecto sobre la diferenciación de CTN.

Usando el modelo de estudio de formación de neuroesferas, esta tesis ha demostrado, que existen CTN en ME murina, las cuales expresan *Vegf-A* y *Vegf-B*, y al menos uno de sus principales receptores (*Flt-1*), además *Nrp-1* y *Nrp-2*, correceptores de *Vegf*. Finalmente, los estudios de inhibición de la actividad *Vegf*-receptor sugieren resultados compatibles con la funcionalidad de esta vía de señalización, en CTN en cultivo y con efectos sobre la diferenciación de CTN.

Resultados como los presentados en esta tesis, ayudarán a entender el funcionamiento de las CTN de ME, constituyéndose en un aporte para futuras investigaciones, destinadas a eventuales aproximaciones clínicas dentro del contexto de medicina regenerativa.

Abstract:

Among the factors that regulate neural stem cell (NSC) function, recently described the involvement of angioneurins, family of molecules classically considered as angiogenics, which form part of the neurovascular niche and can regulate the activity of neural precursors. An important representative of this family is derived growth factor (VEGF), which was initially identified by its angiogenic properties, bone growth and reproductive functions, today attributed effects on neurogenic process in the central nervous system (CNS) brain. Specifically we have seen that VEGF-A and its receptor Flk-1 involved in the development of CNS structures and functions regulate proliferation and differentiation of brain at NSC.

However, the role played by VEGF, particularly VEGF-A and its receptors in development and tissue homeostasis of the ME is not yet clear. Considering this background, this thesis postulates that the NSC of murine spinal cord expressing VEGF and its receptors. The expression, may account for the ability of this factor, both in the differentiation process of NSC, as in the regeneration processes after a spinal cord trauma.

To test this hypothesis test were performed:

- a) Characterization of NSCs from murine spinal cord.
- b) Evaluation of *Vegf-a* expression and its receptors (*Flt-1* and *Flk-1*) and co-receptors (*neuropilin 1* and *neuropilin 2*) at the level of mRNA and protein in tissue samples and cultures of NSCs generated from it.
- c) Assays of inhibition of VEGF-receptor activity and its effect on the adhesion and differentiation of NSCs.

Finally, it is hoped that VEGF and its receptors are expressed by NSCs.

Abreviaturas usadas en este texto: (orden alfabético)

CT: célula troncal.

CTN o NSC: célula troncal neural o neural stem cells

DCX: doblecortina.

FLK-1: receptor de VEGF tipo dos.

FLT-1: receptor de VEGF tipo uno.

GAPDH: gliceraldehido 3 - fosfato deshidrogenasa.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

ME: médula espinal.

NE: neuroesferas.

NeuN: antígeno nuclear neuronal.

Nrp1 y Nrp2: neuropilina uno y neuropilina dos.

Olig2: oligodendrocito dos.

PECAM: molécula de adhesión celular expresado en células endoteliales y plaquetas.

SNC: sistema nervioso central.

VEGF/VEGFRs: eje VEGF y sus receptores.

VEGF-A, VEGF-B: factor de crecimiento derivado del endotelio vascular.

Tubulina : alfa tubulina.

III tubulina: beta tres tubulina.

I. Introducción.

1. Células troncales y regeneración.

Parte de la amplia variedad de enfermedades que afectan al ser humano, tienen su origen en la degeneración y muerte celular, ya sea de manera aguda o crónica, determinando deterioro tisular. Actualmente, una de las técnicas utilizadas para reparar y regenerar los tejidos son los trasplantes, sin embargo, éstos no están exentos de complicaciones y de limitaciones importantes, tales como la escasez de donantes y la posibilidad real de rechazo del órgano trasplantado.

Con la terapia regenerativa, se generan nuevas esperanzas de reparar tejidos dañados, mediante el uso de mecanismos similares a los que, de forma natural, usa el organismo para mantener y renovar las poblaciones celulares dañadas o envejecidas. La destrucción aguda de grandes cantidades de tejido, impone a los mecanismos intrínsecos del organismo un gran desafío en términos de reparación tisular. Es dentro de este contexto, donde el uso clínico de células troncales neurales (CTN) adquieren un tremendo interés, el cual se fundamenta en el potencial terapéutico de estas células, para un amplio grupo de enfermedades que incluye patologías neurodegenerativas tanto crónicas, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o esclerosis, como también daño agudo de estructuras nobles como es el daño raquímedular (Lindvall, O. y cols., 2004; Uccelli, A. y cols., 2008; Zacchigna, S. y cols., 2008). Una célula troncal (CT) está definida por dos características fundamentales, por un lado posee capacidad de autorrenovación (self-renewal), que representa la habilidad de proliferar, mediante ciclos de división celular haciendo copias idénticas y equivalentes a la CT, y por otro poseen potencial de diferenciación, que representa la capacidad para generar distintos tipos celulares maduros.

2. Tipos de células troncales.

2.1. Células troncales embrionarias

Son células pluripotentes y por definición aisladas desde la masa interna del blastocisto a los días 5-8 posteriores a la fecundación. Se caracterizan por su capacidad ilimitada de autorrenovación y por sus habilidades para diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales embrionarias (Martin, G.R., 1981). A pesar de esta capacidad, el eventual uso clínico de estas células se encuentra limitado dado su método de obtención, el cual involucra necesariamente el uso y destrucción de embriones, lo cual a su vez impone importantes barreras de tipo éticas y legales que hacen muy difícil su utilización. Por otro lado, y considerando su alto potencial proliferativo, estas células poseen una alta tasa de formación de tumores una vez que son trasplantadas, lo que se traduce en que resultan inviables para su

aplicación clínica (Wu, Y., 2010). Por ello, el uso clínico de estas CT embrionarias en modelos humanos es impracticable, lo cual en la actualidad, ha dado paso a realizar experimentación utilizando CT adultas.

2.2. Células troncales adultas

Las CT adultas pueden ser obtenidas a partir de distintos tejidos de un organismo y a diferencia de las embrionarias, tienen un potencial de diferenciación más restringido (son multipotentes) y menor capacidad de autorrenovación. Son reconocidas a partir del tejido del cual son obtenidas, así por ejemplo, la célula troncal hematopoyética, obtenida a partir de la médula ósea, es responsable del proceso hematopoyético, siendo además el único tipo de CT con una aplicación clínica actualmente establecida (Bonde, J. y cols., 2004). La figura 1 ilustra en forma sencilla, el origen de CT embrionarias y otros ejemplos de tejidos desde donde ha sido posible actualmente establecer la presencia de CT en organismos adultos.

Las CT adultas se localizan en microambientes celulares, los cuales aportan el apoyo físico y de señales necesarias para mantener la autorrenovación. Estos microambientes se denominan nichos, de los cuales existen varios en el organismo adulto, tales como el hematopoyético o el epitelial (Lilly, A.J., y cols., 2011).

Dadas las exitosas aplicaciones clínicas de las CT adultas hematopoyéticas, la búsqueda de CT en otros órganos, ha permitido identificar su presencia en el SNC, denominadas posteriormente, células troncales neurales (CTN) (Snyder, E.Y., y cols., 1992).

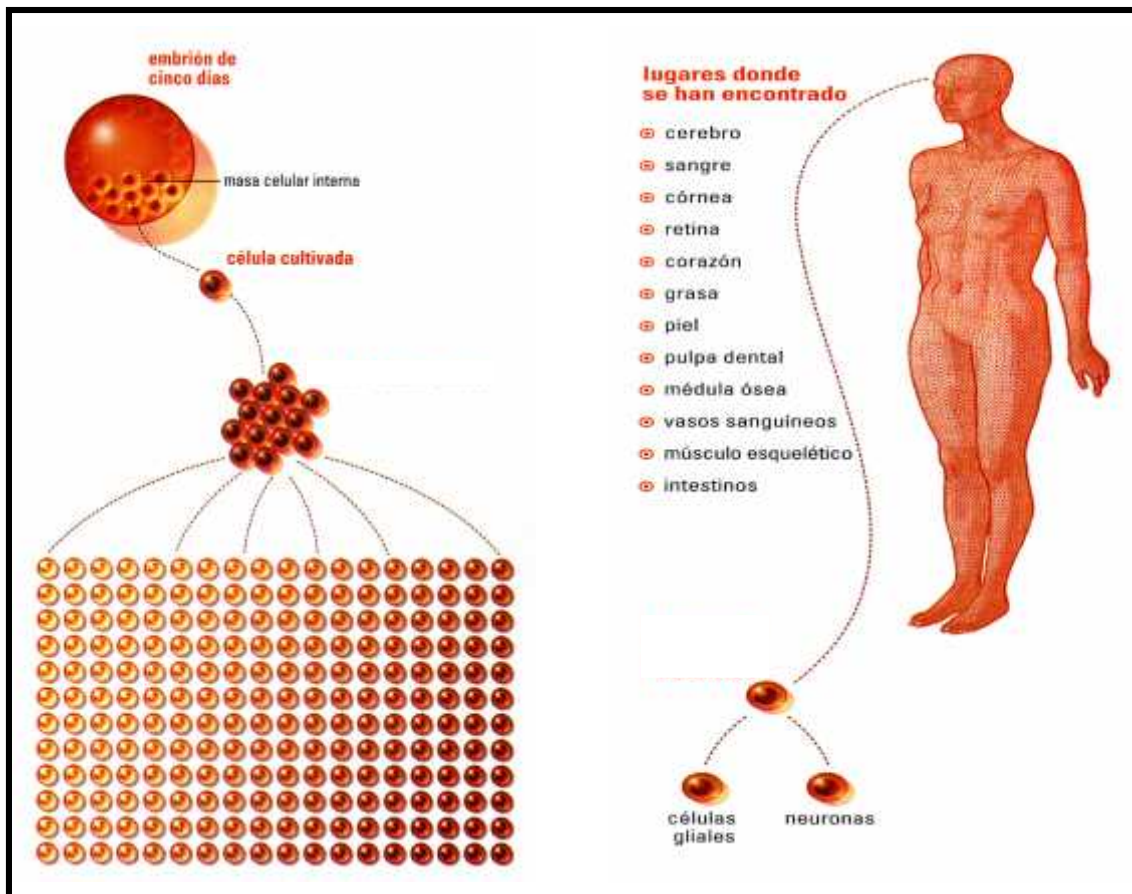


Figura 1. Origen de las CT embrionarias y adultas. Mientras las CT embrionarias son obtenidas de la masa interna del blastocisto (entre el día 5 y 8 post fecundación; izquierda), las CT adultas pueden ser obtenidas a partir de diferentes tejidos del organismo adulto. Ambas CT, mediante técnicas *in vitro*, pueden proliferar y diferenciarse. A partir de CT adultas provenientes del cerebro adulto, pueden generarse por diferenciación celular, células del linaje glial (astrocitos y oligodendrocitos) y neuronas. (Modificado de www.ntgo.com. 2005).

2.3. Células troncales neurales.

Recientemente se ha descrito que el cerebro de mamífero adulto, posee células con capacidad de autorrenovación y de diferenciación, dichas células son denominadas actualmente CTN (Reynolds, B.A., y Weiss, S., 1992; Temple, S., y Alvarez-Buylla, A., 1999). Las CTN (ó NSCs por sus siglas en inglés), corresponden a una población de células, con capacidad de generar los distintos linajes celulares del tejido nervioso: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, F.H., 2003) (Fig.2).

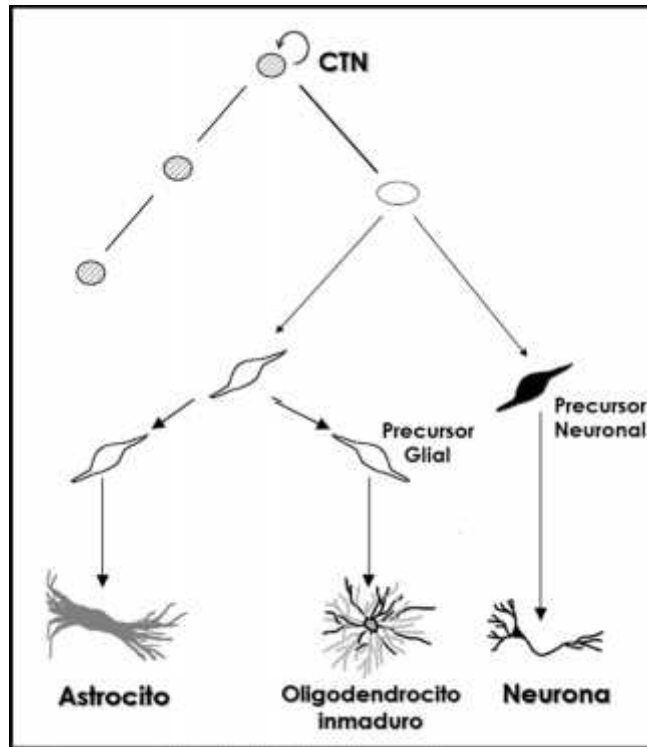


Figura 2. Diferenciación de una célula troncal neural. Al proliferar las CTN dan origen a células idénticas a ellas y a células comprometidas hacia distintos linajes celulares. (Modificado de Gage, 2003).

Si bien es conocido su rol durante el proceso de desarrollo del SNC, hoy también está claramente establecido, que existe neurogénesis en tejido nervioso de organismos adultos, proceso que se sustenta en la presencia de células troncales no diferenciadas en dicho tejido (Zhao, C., y cols., 2008; Tashiro, A., y cols., 2007).

Las CTN, fueron identificadas primeramente a nivel encefálico, específicamente en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y en el giro dentado del hipocampo, donde ellas se dividen para generar progenitores que migran a través de la corriente migratoria rostral, para diferenciarse en el bulbo olfatorio o para integrarse al circuito neuronal hipocampal circundante respectivamente (Van Praag, H., y cols. 2002; Campos, L.S., 2004). La ZSV, es donde mejor está caracterizado el nicho neurogénico, su microambiente esta compuesto tanto de células endodiales en reposo, como de una combinación heterogénea de células subependimales, (astrocitos, progenitores neurales, neuroblastos, tanicitos, microglías y vasos sanguíneos) (Pastrana, E., y cols., 2009). La función de estas células es la mantención del nicho y la generación de las nuevas células nerviosas. Por su parte los astrocitos, poseen prolongaciones a vasos sanguíneos circundantes y dan origen a las células progenitoras intermedias y a precursores de oligodendrocitos. Las células progenitoras intermedias, a su vez, generan células que poseen un grado mayor de compromiso neuronal, conocidas como neuroblastos, los que migran a través

de la corriente migratoria rostral. Así, a partir de las células intermedias o los neuroblastos es posible generar tanto neuronas, como células gliales que son las que finalmente se integrarán al tejido nervioso (Kriegstein, A., y Alvarez-Buylla, A., 2009). Por otro lado, la presencia de CTN en adultos, sugiere que el sistema nervioso posee la capacidad para regenerarse a través de mecanismos endógenos, los cuales a su vez pueden ser estimulados por estrés, daño o enfermedad (Olson, A.K., y cols., 2006; Wang, Y., y cols., 2007).

Sin embargo, la capacidad de recambio celular de este tejido es muy limitada, especialmente frente a requerimientos secundarios a daño tisular, a pesar de la existencia de las CTN. Aparentemente estas células son incapaces de una respuesta que permita una regeneración completa frente a daño de gran magnitud, debido al bajo número de éstas células (Wang, Y., y cols., 2007).

2.4. Modelos de cultivos experimentales con células troncales.

Experimentalmente, hoy se sabe que hay dos formas de cultivar las CTN, por un lado, el cultivo en monocapa y por otro el cultivo de neuroesferas (NE). El cultivo en monocapa, permite mantener las células adheridas sobre diversas matrices, por su parte, el cultivo de NE representa agregados celulares tridimensionales, que proliferan en condición de suspensión. A ambas alternativas experimentales de cultivos, se les reconocen ventajas y las hacen muy atractivas a la hora de cultivar CTN. El uso del cultivo en NE, en teoría imita mejor una situación fisiológica, en la cual las células en presencia de matriz extracelular mantienen el contacto. Por su parte el cultivo en monocapa, logra mantener un potencial de diferenciación más marcado hacía neurona que a glia (Conti, L., y cols., 2010).

Cuando el cultivo de CTN se realiza usando el modelo de NE, se debe tener en cuenta que ellas mantienen una combinación heterogénea de células, lo cual dificulta el análisis de poblaciones celulares específicas, por su parte, cuando el cultivo celular se hace usando el modelo en monocapa, éste limita la proliferación del cultivo en el tiempo, (Steiner, D., y cols., 2010).

En el estudio de las CTN, la evidencia sugiere que las aproximaciones, utilizando el modelo de cultivo de NE obtiene, aparentemente, mejores resultados (Hamilton, L.K., y cols., 2009).

2.5. Células troncales neurales de médula espinal.

Uno de los aspectos más interesantes que dice relación con el estudio de CTN es que, al igual que en cerebro, en médula espinal (ME) adulta, recientemente se han identificado CTN. La evidencia demuestra, que al realizar por separado cultivos en suspensión de CTN de tres zonas diferentes de ME: médula cervical, torácica y lumbar, en cada una de ellas, se logró la formación NE, tanto primarias como secundarias al exponerlas a los mitógenos EGF y FGF, comprobando así que estas células mantienen su potencial de autorrenovación (Weiss, S., y cols., 1996).

Sin embargo, a diferencia del cerebro, en la ME adulta no existe una capa subependimal definida que contenga las CTN. Más bien, se ha demostrado que, al ser evaluadas *in vitro*, son las células endimales la fuente primaria de actividad de CTN (Álvarez- Buylla, A., y cols., 2003).

Un estudio del microambiente o nicho de estas células endimales, permitió identificar tres tipos celulares: células endimales cuboidales, células endimales radiales y tanicitos, todas células ciliadas que se encuentran en contacto con el canal central (canal endimario o endimario) y que en su conjunto se denominan células endimales. (Meletis, K., y cols., 2008). Este microambiente alrededor del canal central de la ME adulta, está en cercana asociación con las vasos sanguíneos, pero, a diferencia de la ZSV encefálica, involucra más células endimales que sub-ependimales, con un patrón de distribución de estas células con potencial de CTN, más dorsal que ventral dentro del canal central de la ME (Figura y 3) (Hamilton, L.K., y cols., 2009).

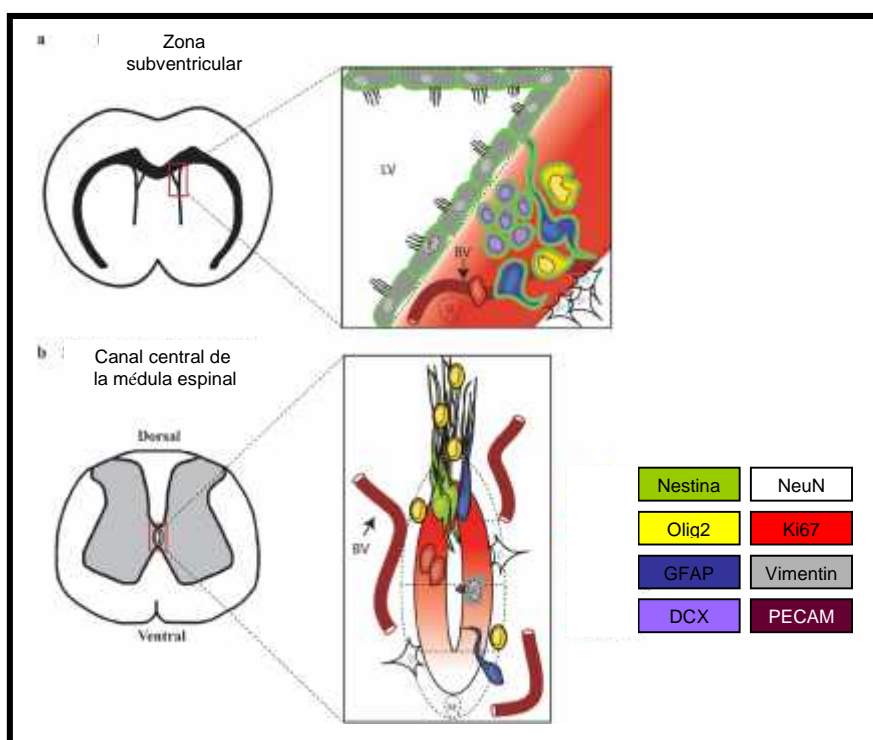


Figura 3. Comparación de la ubicación de CTN en la zona subventricular (ZSV) del cerebro y en canal endoventricular de ME. (BV, vasos sanguíneos). **A:** En la ZSV, los ventrículos laterales están delineados con células endoventriculares ciliadas (E) que expresan vimentina (gris) y nestina (verde). Las células proliferativas (rojo) están aisladas en la zona sub-endoventricular y están cerca de vasos sanguíneos que expresan la molécula de adhesión celular expresado en células endoteliales y plaquetas (PECAM) en un gradiente dorso- ventral (gradiente rojo). Dentro de la zona endoventricular hay astrocitos que expresan proteína gliofibrilar ácida (GFAP, azul), progenitores que expresan factor de transcripción oligodendrocítico 2 (Olig2, amarillo) y neuroblastos que expresan Doblecortina (DCX, violeta), los cuales co-expresan nestina. Las neuronas que expresan proteína nuclear específica nuclear (NeuN, blanco), están localizadas debajo de la zona subendoventricular y no proliferan. **B:** En ME, el canal central está delineado con células endoventriculares ciliadas que expresan vimentina. Hay células nestina(+)s y vimentina(+)s en el asta dorsal que poseen proyecciones basales extensas. Dentro de la zona subendoventricular hay neuronas NeuN(+)s y astrocitos GFAP(+)s y progenitores de oligodendrocitos Olig2(+)s. Las células Olig2(+)s se observan a menudo a lo largo de los procesos basales de las células endoteliales. (Hamilton, L.K., y cols., 2009).

Dado que se ha descrito que los astrocitos dan origen a nuevas neuronas y actúan como CTN en la ZSV y en el giro dentado del hipocampo (Pastrana, E., y cols., 2009; Chojnacki, A.K., y cols., 2009), recientes investigaciones se han centrado en descubrir cuál es la función de cada tipo celular (astrocitos, oligodendrocitos y células endoventriculares), en la ME.

En este sentido, reciente evidencia muestra que en la ME intacta, son los progenitores de oligodendrocitos los capaces de dar cuenta tanto de autorrenovación, como de generar un número en aumento de oligodendrocitos maduros; no así las células endoventriculares y astrocitos, las cuales sólo proliferan para mantener los tamaños de su población. Sin embargo, en caso de lesión de ME, 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 endoventriculares muestran una multipotencialidad y actividad de CTN tanto en ME intacta como dañada. (Barnabé-Heider, F., y cols., 2010).

2.6. Trauma raquímedular y activación de células troncales neurales.

La principal limitante en la capacidad de regeneración de la ME, se relaciona con el desarrollo de un proceso de cicatrización glial, en el cual la zona de daño es reemplazado por tejido fibroso.

Se han descrito tres zonas en ME donde ocurre proliferación celular post injuria (Horky,

L.L., y cols., 2006):

- a. Región peri endimaria (en concordancia con lo mostrado en la figura 3)
- b. El parénquima y
- c. La periferia.

Se ha establecido por otra parte, que es posible aislar un número importante de CTN a partir de ME lesionada, sugiriendo que las CTN progenitoras proliferan en respuesta a daño. Sin embargo, la eficiencia de este proceso no sería suficiente para restablecer la funcionalidad de tejido (Xu, Y., y cols., 2006).

Dada la existencia de CTN en ME, es posible considerar la posibilidad de estrategias de terapia celular basadas, ya sea, en la activación de las células endógenas o en el uso de CTN u otras células troncales exógenas, como alternativas terapéuticas frente a lesiones de ME. Así algunos estudios, han evaluado la posibilidad de trasplantar distintos tipos de CT, estableciendo la factibilidad de dicha aproximación, aunque mostrando distintos resultados (Brüstle, O., 1999; Deshpande, D.M., y cols., 2006; Nandoe Tewarie, R.S., y cols., 2009). En algunos casos la estrategia busca reemplazar la población celular que se pierde tras el daño tisular, mientras que otras se basan en el uso de células como fuente de factores tróficos que regulen la actividad de las CTN endógenas. En este último contexto es posible postular que, una apropiada combinación de factores de crecimiento, podrá ejercer funciones neuroprotectoras o también activadoras de procesos de proliferación y/o diferenciación celular de las CTN. La identificación de factores con posibles efectos reguladores de la actividad funcional de las CTN de ME, representa valiosa información tanto para comprender los mecanismos involucrados en la progresión del daño, como para el diseño de estrategias terapéuticas.

En este sentido, estudios han evaluado cambios en la expresión de receptores de factores angiogénicos (VEGFR, Tie2) con posterioridad al daño de ME, observaciones que sugieren la eventual participación de los respectivos ligandos (VEGF, angiopoyetina) en la evolución del proceso (Herrera, J.J., 2010).

2.7. Nicho neurovascular.

Las redes vasculares y neuronales, se estructuran sobre la base de una estrecha relación anatómica y funcional tanto durante el desarrollo como la vida adulta. Existe un desarrollo paralelo de los sistemas nervioso y vascular durante la embriogénesis y los periodos tempranos de vida, observándose una importante interacción entre estos dos sistemas (Carmeliet, P., y Tessier-Lavigne, M., 2005).

Al respecto, recientes estudios establecen una funcionalidad cruzada entre los sistemas vascular y nervioso (sistema neurovascular), siendo el ejemplo mas clásico la barrera hemato

encefálica (BHE) que protege el delicado SNC de cambios celulares y metabólicos del entorno (Lambrecht, D., y Carmeliet, P., 2006). La relevancia de esta relación, resulta evidente en casos en los cuales la disfunción de una de estas redes altera invariablemente el funcionamiento de la otra (Greenberg, D.A., y Jin, K., 2005). El desarrollo y mantención de ambas redes, es dependiente de progenitores celulares específicos de cada linaje, aunque también se ha postulado la posible existencia de un precursor común (Álvarez-Buylla, A., y cols. 2005). Los mecanismos moleculares y celulares asociados al desarrollo y funcionalidad de ambos sistemas se encuentran bien definidos (Cleaver, O.K., y Melton, D.A., 2003; Caplice, N.M., y Doyle, B., 2005) y, como era de esperar por tan estrecha relación, en los últimos años se ha podido establecer, que comparten distintos sistemas de señalización que regulan sus procesos de proliferación, diferenciación o migración celular, entre otros (Carmeliet, P., y Tessier-Levigne, M., 2005; Eichmann, A., y cols., 2005).

El conjunto de mecanismos que participa de la comunicación entre células progenitoras neurales y endoteliales, forma estructuralmente el nicho neurovascular, el cual se compone de ambos linajes celulares y un conjunto de moléculas tanto solubles como de matriz extracelular.

Por su parte las CTN se encuentran yuxtapuestas a las células endoteliales, y el proceso de neurogénesis se desarrolla fundamentalmente alrededor de los capilares, lo cual supone, que ambos tipos celulares eventualmente se exponen y responden al mismo tipo de señales (Palmer, T.D., y cols., 2000; Alvarez – Buylla, A., y Lim, D.A., 2004; Jin, K., y cols., 2002; Shen, Q., y cols., 2004). Factores angiogénicos clásicos como VEGF, BDNF, angiopoyetina, efrinas y semaforinas entre otros, forman parte de las señales responsables del desarrollo y mantención de ambos sistemas (Carmeliet, P., 2005; Eichmann, A., y cols., 2005). Los factores angiogénicos que exhiben este efecto dual han sido denominados angioneurinas o, desde la perspectiva del efecto sobre el proceso neurogénico, factores neurotróficos no canónicos de origen angiogénico (Zacchigna, S., y cols, 2008)

3. VEGF: estructura y función.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína reguladora clave del proceso de angiogénesis y mantención de vasos sanguíneos durante embriogénesis, crecimiento óseo y funciones reproductivas (Vieira, J., 2010). En este contexto, la regulación de la expresión de VEGF en respuesta a hipoxia, constituye una de sus principales características como factor en respuesta a daño tisular. Sin embargo, esta última característica también lo involucra en procesos angiogénicos patológicos asociados a tumores, desordenes neovasculares oculares y otras condiciones patológicas (Ferrara, N., 2003).

El gen *Vegf-a* humano esta organizado en 8 exones separado de 7 intrones y como

producto de su transcripción, se han detectado actualmente seis isoformas diferentes: *VEGF*₁₂₁, *VEGF*₁₄₅, *VEGF*₁₆₅, *VEGF*₁₈₃, *VEGF*₁₈₉ y *VEGF*₂₀₆ (indicando los números la cantidad de aminoácidos), cuyo producto es secretado como una proteína homodimérica. Una organización estructural similar se encuentra en el genoma murino (*VEGF*₁₂₀, *VEGF*₁₄₄, *VEGF*₁₆₄, *VEGF*₁₈₂, *VEGF*₁₈₈ y *VEGF*₂₀₅) (Tischer, E., y cols., 1991; Houck, K.A., Y cols., 1991; Ferrara, N. y cols., 2003). La mayoría de las células producen preferentemente las isoformas *VEGF*₁₂₁, *VEGF*₁₆₅ y *VEGF*₁₈₉. Las isoformas *VEGF*₁₄₅ y *VEGF*₂₀₆ son muy raras en comparación con las restantes isoformas, ya que están prácticamente restringidas en su producción a células de origen placentario (Robinson, C.J., y cols., 2001)

La actividad biológica de VEGF, depende fundamentalmente de 3 tipos de receptores, pertenecientes a la familia de receptores tirosina kinasa: VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (FLK-1 o KDR) y VEGFR3 (FLT-4) (Ferrara, N. y cols 2003; Roskoski, R. 2008). La principal función de VEGF es promover crecimiento de células endoteliales, (Figura 6) regulando tanto la formación como mantención de vasos sanguíneos (por medio de FLT-1 y FLK-1) y linfáticos (atribuido a FLT- 4, no mostrado en la figura).

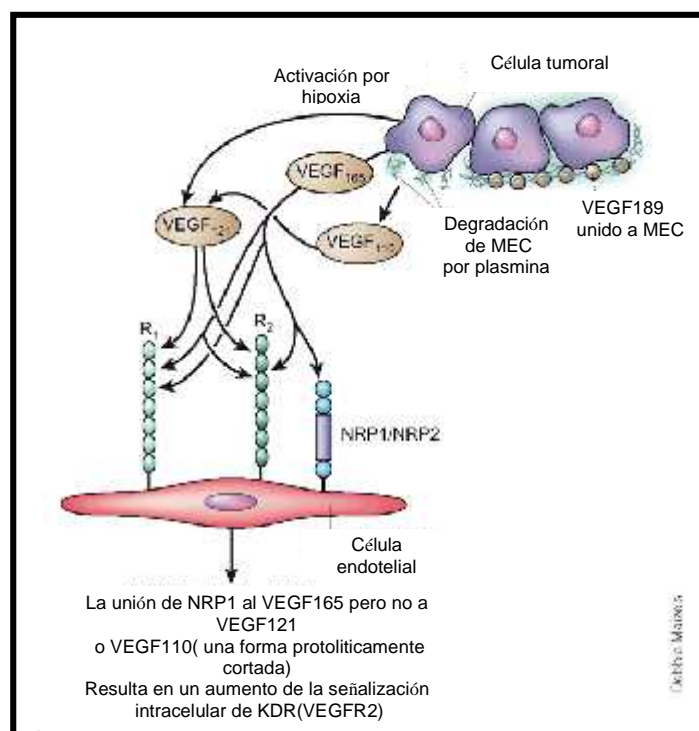


Figura 4. VEGF y receptores. En respuesta a una variedad de estímulos, las isoformas difusibles de VEGF: *VEGF*₁₂₁ y *VEGF*₁₆₅ son liberadas por una variedad de células normales y tumorales y que podrían unirse a FLT-1 (o R1) y a FLK-1 (o R2). *VEGF*₁₆₅ pero no *VEGF*₁₂₁, también interactúan con NRP1 y NRP2. Esta unión resulta en aumento de la señalización dependiente de FLK-1 en células endoteliales. Seguida de generación de plasmina y degradación

de la matriz extracelular (MEC), VEGF₁₈₉ es cortada en un extremo COOH y el fragmento terminal NH₂ es difusible y bioactivo. (Modificado de Ferrara N., 2003).

4. VEGF en sistema nervioso

Estudios *in vivo* han demostrado que VEGF tiene efectos directos sobre distintos tipos celulares neurales, incluyendo tanto precursores como células maduras. Existen evidencias que sugieren que la infusión intracerebrovascular de VEGF, induce neurogénesis post isquemia y además regula la migración de nuevas células hacia territorio dañado, a fin de reemplazar a las células muertas (Wang, Y., y cols., 2007). Por su parte, ha sido posible establecer que en ratones que expresan niveles disminuidos de VEGF, éstos presentan degeneración de neuronas motoras, condición muy similar a lo que sucede en esclerosis lateral amiotrófica (Schmidt, N., y cols., 2009).

Este tipo de análisis, también demuestra la expresión y activación de los respectivos receptores en este tipo de células. Sobre esta base, distintas patologías neurodegenerativas muestran una contribución del eje VEGF-VEGFRs en el progreso de dicha condición (Carmeliet, P., y Tessier-Lavigne, M., 2005) y también sugieren la posibilidad de modular los niveles de este factor como una opción terapéutica (Wang, Y., y cols., 2007)

En células aisladas, VEGF tiene un importante rol regulador de la sobrevivencia de cultivos celulares hipocámpales, corticales, cerebelosos, granulares, neuronas dopaminérgicas, autonómicas y sensoriales bajo diferentes condiciones de estrés (Greenberg, D.A., Y Jin, K., 2004; Storkebaum, E., y Carmeliet, P., 2004). Por otra parte, en neuronas corticales primarias, VEGF incrementa la expresión de marcadores de microtúbulos neuronales, TUJ1 y MAP-2, sugiriendo que VEGF regula crecimiento, desarrollo y estabilidad estructural de las neuronas (Rosenstein, J.M., y cols., 2003). En particular, respecto de progenitores neurales, VEGF regula eventos neurogénicos, durante la formación de linajes celulares de las distintas capas germinales, a partir de células troncales embrionarias (Kim, B.K., y cols., 2006).

De manera similar, se ha reportado que este factor puede tener efectos diferenciales sobre distintas subpoblaciones de CTN generadas a partir de células troncales embrionarias, regulando la proliferación y sobrevivencia de éstas a través de FLK-1 (Wada, T., y cols., 2006).

VEGF ha sido asociado a distintas condiciones patológicas neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson, Alzheimer o infartos cerebrales. Sobre esa base, se ha propuesto su posible uso como factor terapéutico (Pogue, A.I., y Lukiw, W.J., 2004; Slokovic, B.V., 2005; Lee, S., y cols, 2007). El eventual rol de este factor, en neurodegeneración a nivel de ME ha sido menos explorado, pero interesantes estudios muestran cambios en los niveles tanto de VEGF como sus receptores en modelos de daño de este tejido (Azzouz, M., y cols, 2004; Lambrecht, D.

y Carmeliet, P. 2006; Choi, J.S., y cols, 2007). Sin embargo, el rol específico que este factor puede ejercer sobre CTN derivadas de ME es desconocido.

Tomando en cuenta los antecedentes presentados anteriormente, es posible postular que las CTN de ME pueden ser reguladas funcionalmente por factores angiogénicos, en particular VEGF. En este trabajo, se propuso evaluar dicha hipótesis a través de ensayos funcionales. Específicamente, se evaluó la presencia de VEGF en las CTN y luego estudiar el eventual efecto de este factor en la diferenciación de estas CTN.

II. Hipótesis.

Las células troncales neurales obtenidas a partir de médula espinal de ratones de estadio E18.5 expresan VEGF y sus receptores.

III. Objetivos.

Objetivo general.

Estudiar la expresión de VEGF y sus receptores en células troncales neurales obtenidas de médula espinal de ratón E18.5.

Objetivos específicos.

1. Establecer cultivos de neuroesferas a partir de médula espinal de ratones en estadio E18.5.
2. Evaluar la expresión VEGF y sus respectivos receptores en médula espinal y en neuroesferas generadas a partir de este tejido, a nivel de RNA mensajeros y proteínas.
3. Analizar el efecto de VEGF sobre el proceso de diferenciación de células troncales neurales y sobre la integridad estructural de las neuroesferas.

IV. Materiales y métodos

1. Materiales

1.1 Reactivos

1.1.1 Medio de cultivo

De GIBCO, Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, EEUU) se obtuvo la tripsina (n° catálogo: 27250-018), los medios de cultivo DMEM (n° catálogo: 12800-017) y DMEM/ F12 (n° catálogo: 12400-024).

1.1.2 Suplementos

N2 (n° catálogo: 17502-048), B27 (n° catálogo: 17504-044) y albumax (n° catálogo: 11020-021).

De Hyclone, Thermo Scientific (Miami, EEUU), se obtuvo la solución de la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (10.000 unidades/mL penicilina y 10.000 µg/mL de estreptomicina, n° catálogo: SV30010), suero fetal de bovino (n° catálogo: SH30071.03)

De AppliChem (Darnstadt, Alemania) se adquirió la glucosa D (+) (n° catálogo: A1349, 1000).

De SIGMA (St Louis Mo, EEUU) se obtuvo la poli-D-lisina 5 mg/mL (n° catálogo: P7405)

De R&D SYSTEMS (Minneapolis, EEUU) se adquirieron los factores de crecimiento FGF (n° catálogo: 3139-FB-025/CF) y EGF (n° catálogo: 2028-EG-200)

1.1.3 Proteína recombinante e inhibidor

De GIBCO, Invitrogen Corporation se obtuvo la proteína recombinante VEGF (n° catálogo: PMG0114)

De Calbiochem se adquirió el antagonista del receptor FLT-1 y FLK-1, CBO-P11 (n° catálogo: D00112065)

1.1.4 Inmunofluorescencia

De Winkler Ltda (Santiago, Chile) se adquirió el paraformaldehído (n°catálogo: PA-11510) y Tritón X- 100 (n°catálogo: BM-2020).

De Dako Corporation (Carpintería, CA, EEUU) se obtuvo la solución de montaje Dako (n°catálogo: S3023)

Detalle de los anticuerpos utilizados:

Tabla1: Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia

Antígeno	Código	Marca	Clonalidad y origen	Concentración
GFAP	13-0300	Invitrogen	Monoclonal rata	1:50
III-tubulina	280026	Promega	Monoclonal ratón	1:2000
Nestina	Ab81093	Abcam	Policlonal conejo	1:500

1.1.5 Western Blot.

De BIO-RAD (California, EEUU) se obtuvo el kit de cuantificación de proteínas Bio-Rad Protein Assay (n°catálogo: 500-0001)

De Thermo Scientific se adquirieron los sustratos quimioluminiscentes, ECL (n°catálogo: 32106) y la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, n°catálogo: 88585)

De Winkler son el Tween 20 (n°catálogo: TW-1652), TEMED (n°catálogo: BM-1970), - acrilamida (n°catálogo: BM-0280).

De US Biological (Texas, EEUU), son el SDS (n°catálogo: S5010), Tris base (n°catálogo: T8601) y glicina (n°catálogo: G8160).

De SIGMA, se obtuvo persulfato de amonio (n°catálogo: A3678) y rojo Ponceau S (n°catálogo: 141194)

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en Western Blot

Detalle de los anticuerpos utilizados:

Antígeno	Marca	Clonalidad
VEGF	Abcam	Policlonal conejo
FLT-1	Abcam	Monoclonal conejo

1.1.6 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

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

De Promega (Madison, EEUU) se obtuvo la DNasa libre de RNasa (n°catálogo: M610A), el tampón de reacción 10X (n° catálogo: M198A) y solución de término de reacción (n°catálogo: M199A). También se obtuvieron los random primers 500µg/mL, (n°catálogo: C118A) y el kit de la enzima transcriptasa inversa y su solución tampón (n°catálogo: M170B). Asimismo se obtuvo la enzima GoTaq, la solución de cloruro de magnesio 25 mM y el tampón 5X de la enzima (n°catálogo: M8295)

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

De New England BioLabs (Ipswich, EEUU) es el marcador de DNA de 100 pares de bases 6X (n°catálogo: N3231S)

De Lonza (Portsmouth, EEUU) es la agarosa (n°catálogo: 50004)

Tabla 3: Partidores utilizados en PCR

Gene	Secuencia	Tamaño(bp)
VegfA_AE_F	GCG GAT CAA ACC TCA CCA AAG C	413
VegfA_AE_R	GCG TGG TGG TGA CAT GGT TAA TC	
VegfB_AE_F	GCC TCT GAG CAT GGA ACT CA	347
VegfB_AE_R	GGA GTG GGA TGG ATG ATG TCA	
Flt-1_AE_F	GAA AGT CGT TCA AGC CTC TGC	372
Flt-1_AE_R	TGA GCT GCT GAC ACT GTC TAG	
Flk-1_AE_F	GTC TTT CGG TGT GTT GCT CTG	509
Flk-1_AE_R	TCT GTC TGG CTG TCA TCT GG	
Nrp1_AE_F	CAA GTG GAC CTG GGA GAT GA	412
Nrp1_AE_R	CCT CCT GTG AGC TGG AAG TC	
Np2_F_AE	GAG AAG CCA GCA AGA TCC ACC	442
Np2_R_AE	CTC TGG AAA CCC TGG AGA TTC A	
GAPDH_AE_F	CAC CCA GAA GAC TGT GGA TGG	425
GAPDH_AE_R	CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG	
m_Nestin_F	CAG GCT TCT CTT GGC TTT CCT G	438
m_Nestin_R	GGT GAG GGT TGA GGG GTG G	
m_MAP2_F	AAC ATC AAA CAT TCT GCT GGG	290
m_MAP2_R	GAT CTC AGC CCC GTG ATC TA	
m_GFAP_F	CGA AGC TAA CGA CTA TCG CC	178
m_GFAP_R	TTG TGA CTT TTT GGC CTT CC	
Sox2_F	GCA GTA CAA CTC CAT GAC CAG	169
Sox2_R	GGA GTG GGA AGA GGT AAC	
m_MAG_f	GCC CCG AAT TCA GAA TCT TCG G	238
m_MAG_r	TTC TGC ATA CTC AGC CAG C	

2. Animales:

Para la obtención de CTN se utilizaron embriones de ratones C57BL/6J de estadio 18.5 y ratones de dos meses de edad, los cuales estaban disponibles en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los animales fueron tratados de acuerdo y bajo la supervisión del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas y siguiendo la normativa de CONICYT respecto del manejo de animales (total de 35 ratonas preñadas en estadio 18.5 dpc, de cuyos embriones fue posible obtener 28 cultivos primarios).

3. Cultivos de CTN:

La generación de cultivos de CTN en forma de NE se realizó según protocolos previamente descritos y que se están implementando en el laboratorio. Brevemente, las muestras de ME se obtuvieron de embriones de ratones en estadio 18.5 dpc, (días post-coito) y de ratones

de dos meses de edad. Se removió y disoció la ME mediante digestión mecánica y enzimática con pipetas Pasteur y tripsina (0.05%, Invitrogen) respectivamente y resuspendida en 50.000 células/ml en un medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementada con B27 (Invitrogen), penicilina/streptomina (Invitrogen), 5 µg/ml de heparina, 20 ng/ml bFGF y 50ng/ml EGF (R&D SYSTEMS). Los factores de crecimiento fueron adicionados dos veces por semana. Después de 7 días en cultivo, las NE obtenidas, fueron disociadas para obtener células individuales usando tripsina/EDTA (Invitrogen) y resuspendidas en 50.000 células/ml en medio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado con B27, penicilina/streptomina, 200µM de L-Glutamina, 2µg/ml heparina, 20ng/ml bFGF y 50ng/ml EGF. Para evaluar la diferenciación, las NE fueron resuspendidas en medio neurobasal suplementado con B27, penicilina/streptomina, 40µM de L-Glutamina y se sembraron directamente sobre poli-D-lisina (10µg/ml) por 4 días. Posteriormente las células fueron fijadas y se evaluó la expresión de marcadores de linaje por inmunofluorescencia. Los marcadores de linaje utilizados fueron nestina (CTN), BIII tubulina (neurona) y GFAP (glia).

4. Análisis de expresión génica

RT-PCR: muestras de tejidos o NE en cultivo fueron procesadas para obtener RNA total con el kit EZNA Total RNA Kit I (Omega BioTek), según instrucciones del fabricante. 1 µg de RNA se trató con DNAasa para eliminar posible contaminación con DNA genómico y posteriormente se retrotranscribió para ser almacenado como cDNA. La expresión de los ARN mensajeros de *Vegf* y sus receptores (*flt-1*, *flk1* y *NRP1* y *NRP2*) se evaluó con partidores específicos diseñados y disponibles en el laboratorio.

Western-blot: extractos proteicos de ME o NE fueron separados por geles SDS-PAGE, transferidos a membrana de PVDF y analizados por inmunoblot para la detección de *Vegf* y sus respectivos receptores. Los anticuerpos conejo anti-*Vegf*, anti-*Flk-1*, anti-Neuropilina1 y el anticuerpo monoclonal anti-*Flt-1* están disponibles en el laboratorio (Abcam). Para el revelado se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidada de rabano dirigido contra inmunoglobulinas de ratón o conejo (Jackson Immuno Research), y la señal fue visualizada usando método quimioluminiscente (Pierce ECL Western Blotting Substrate).

Inmunofluorescencia: para evaluar la expresión de marcadores de diferenciación se realizaron estudios por inmunofluorescencia en NE obtenidas desde ME. Las CTN fueron procesadas por fijación con paraformaldehído al 4%, 30 minutos en frío. Las muestras fueron posteriormente lavadas, permeabilizadas y bloqueadas con 0,05% Triton X-100 y suero fetal bovino (SFB), considerando 2 partes de Triton X-100 y una parte de SFB, e incubadas con los anticuerpos primarios (BIII tubulina anti ratón 1/2000 Promega) correspondientes. Para la

detección se utilizó anticuerpos secundarios, conjugados con AlexaFluor (Invitrogen), contratinción con DAPI (Molecular Probes) y analizados por microscopia de fluorescencia. Un procedimiento similar se utilizó para evaluar la expresión de los marcadores de diferenciación.

Las muestras fueron analizadas con el program Image J, para el análisis de las NEs positivas para el anticuerpo de interés (III tubulina) en microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron capturadas por una cámara Nikon donde se procedió al conteo de NE formadas.

5. Análisis funcionales: para evaluar el efecto de VEGF sobre los cultivos de CTN se analizaron sus efectos sobre el proceso de diferenciación y sobre las características estructurales de las NE. Para ello, las células fueron sembradas sobre poli-D lisina y luego de seis horas de adhesión se agregó un vehículo (DMSO). Una segunda condición experimental contempló el uso de un inhibidor de los receptores de VEGF (FLT-1 y FLK-1), (CBO-P11, Calbiochem) a una concentración de 10 μ M, para finalmente establecer una tercera y última condición,(ligando más inhibidor), se agregó VEGF a una concentración de 0,2 nM más el inhibidor CBO-P11(10 μ M). El inhibidor se agregó al cultivo media hora antes que VEGF. Tanto VEGF, como el inhibidor se agregaron al inicio del ensayo y por única vez. Posterior a cuatro días, se finalizó el ensayo de diferenciación, procediendo a fijar las células.

6. Análisis estadístico: tanto el número de NE formadas por condición experimental, como aquellas NE positivas para III tubulina, se presentan como promedios +/- SEM de dos experimentos independientes (cada uno en duplicado). Para determinar el nivel de significancia de los resultados, se utilizó ANOVA de una vía, considerando $p < 0.01$.

V. Resultados

1. Obtención de los cultivos.

Con el objetivo de generar cultivos de NE a partir de ME de ratones, inicialmente se procedió a utilizar animales de dos meses de edad. Posterior a la disgregación enzimática del tejido de ME, se generó un cultivo de células únicas, las que fueron mantenidas en medio neurobasal por siete días. De esta forma se obtuvieron cultivos de agregados celulares con bordes irregulares y en poca cantidad, las cuales, aún cuando lograron crecer y constituir NE, se descartaron para servir de modelo de estudio en esta investigación. Además, las escasas NE formadas, fueron inviables para su manipulación *in vitro* (extracción de RNA, proteínas). La figura 5 muestra una imagen de los cultivos de NE obtenidas después de dos semanas, utilizando cinco ratones distintos. Es posible notar fácilmente la no constitución de NE, por el contrario, aun cuando varios cultivos fueron mantenidos por más de una semana, llegando incluso a un segundo subcultivo, sólo fue posible notar células únicas y agregados celulares de formas no esféricas.

En consecuencia, lo anterior implicó en la práctica, dejar de utilizar los ratones de este estadio y enfocar la obtención de cultivos de NE a partir de ratones de estadio fetal 18.5 dpc.

En un intento por tratar de explicar estos resultados, en los ratones de dos meses, antecedentes en la literatura sugieren que factores intrínsecos secretados por las mismas NE, por ejemplo proteína morfogénica ósea (o BMP por sus siglas en inglés), impiden a los progenitores proliferar, afectando la formación de neuroesferas por cultivo (Bonaguidi et al., 2008).

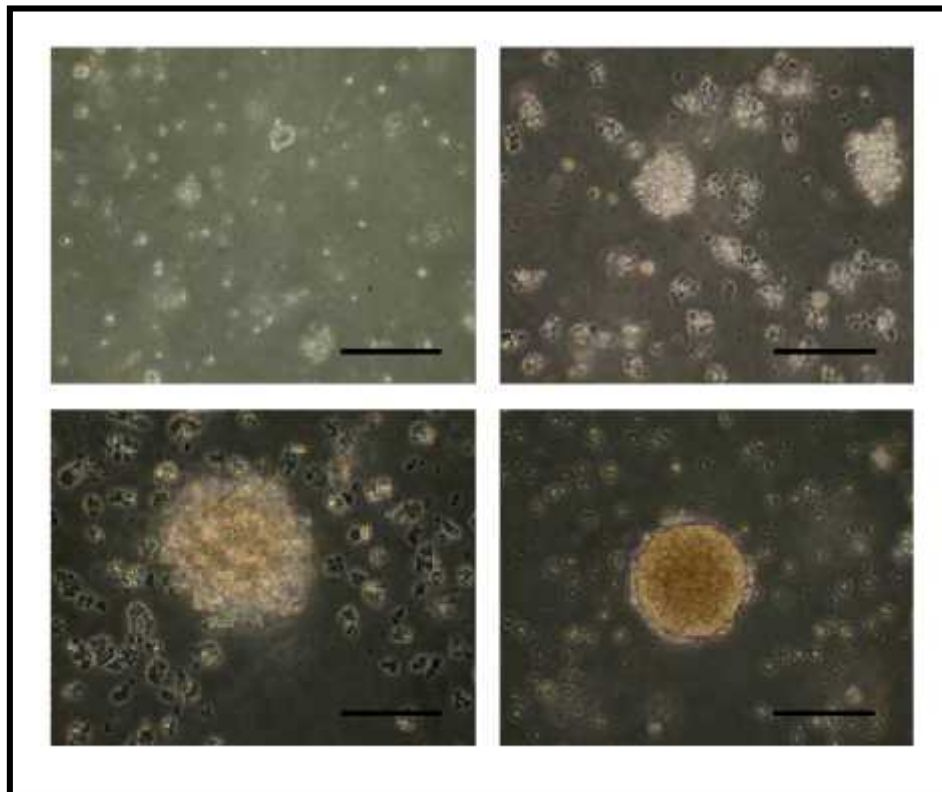


Figura 5. Imágenes de cultivos de NE provenientes de células de ME de ratones de dos meses de edad. Las células no logran formar suficiente cantidad de NE y permanecen como células únicas. Las escasas NE formadas (recuadro inferior derecho), resultan insuficientes para su manipulación *in vitro* (extracción de mRNA). Imágenes superiores corresponden a cultivo primario (de izq. a der. 10x y 20x), mientras que las inferiores a cultivo secundario, (40x c/u) obtenidas por medio de microscopio de luz invertido. Imágenes representativas. La barra corresponde a 250 μ m.

Así mediante el uso de la metodología descrita anteriormente, se cultivaron células de ME de ratones de estadio 18.5, con un promedio de 450.000 células por embrión, las que posterior a tres a cuatro días en presencia de factores mitogénicos, forman NE, reconocidas como modelo de estudio de CTN. (Figuras 6A y 6B). A partir del cultivo primario fue posible así mismo, proceder a disgregar las NE formadas después de una semana en cultivo, de esta forma, se generaron NE secundarias. En ésta experiencia, fue posible realizar más de treinta cultivos diferentes provenientes de distintas hembras preñadas. En la gran mayoría de estos, se obtuvo alrededor de un millón de células a partir del primer subcultivo, lo cual representa una reducción del cincuenta por ciento, si se compara con el número inicial de células de cultivo. Este rendimiento puede ser explicado en parte, porque el cultivo primario posee células que no constituyen NE y además

porque el proceso de subcultivo, que incluye disgregación mecánica y enzimática, impone una gran pérdida en el número de células. Al mismo tiempo, no todas las células resultantes lograron formar nuevamente una NE. Pese a esto, la capacidad de formación de nuevas NE en cada subcultivo fue muy clara, lo que da cuenta de la capacidad de proliferación de algunas de las células que componen esta estructura, una característica esencial de las CTN.

Una vez obtenidas las NE éstas fueron subcultivadas y expandidas para posteriormente ser utilizadas en los experimentos de caracterización de CTN. Para ello y con posterioridad a un segundo subcultivo, se analizó la expresión de marcadores moleculares de CTN (Sox2: célula troncal indiferenciada y Nestina: precursor neural) y de diferenciación hacia linajes neurales (MAP2: neurona, MAG: oligodendrocitos y GFAP: astrocitos) a nivel de mRNA por medio de RT-PCR. Así, se pudo detectar que las CTN expresan, a nivel de mensajeros, los genes: Sox-2, Nestina, MAP2, MAG y GFAP (Figura 7).

Al mismo tiempo y congruente con estas observaciones, se obtuvo la expresión de marcadores a nivel de proteínas por medio de inmunofluorescencia (Figura 8), detectándose que las CTN expresan los marcadores Nestina, III tubulina y GFAP, mediante el uso de un modelo experimental de cuatro días de diferenciación de las CTN.

Estas observaciones concuerdan con la descripción de NE, que se pueden generar a partir de otras zonas de tejido nervioso (Piao et al., 2006), lo cual sugiere que el procedimiento usado en estos experimentos con el objetivo de aislar CTN desde ME es el correcto. La presencia, a nivel de mRNA, de marcadores de células troncales (Sox-2 y Nestina) y células con un grado de compromiso hacia linaje neural (MAP2, MAG y GFAP), representan una medida de su potencial de troncalidad y pluripotencialidad respectivamente, la cual es reforzada por las observaciones obtenidas en el ensayo de diferenciación.

Concordante con los escasos reportes publicados actualmente (Kelly, T.K., et al 2010; Hamilton, L.K., et al., 2009), que establecen la presencia de CTN en ME de ratón, los resultados suman antecedentes para apoyar la idea de considerar a la ME como un nicho neurovascular.

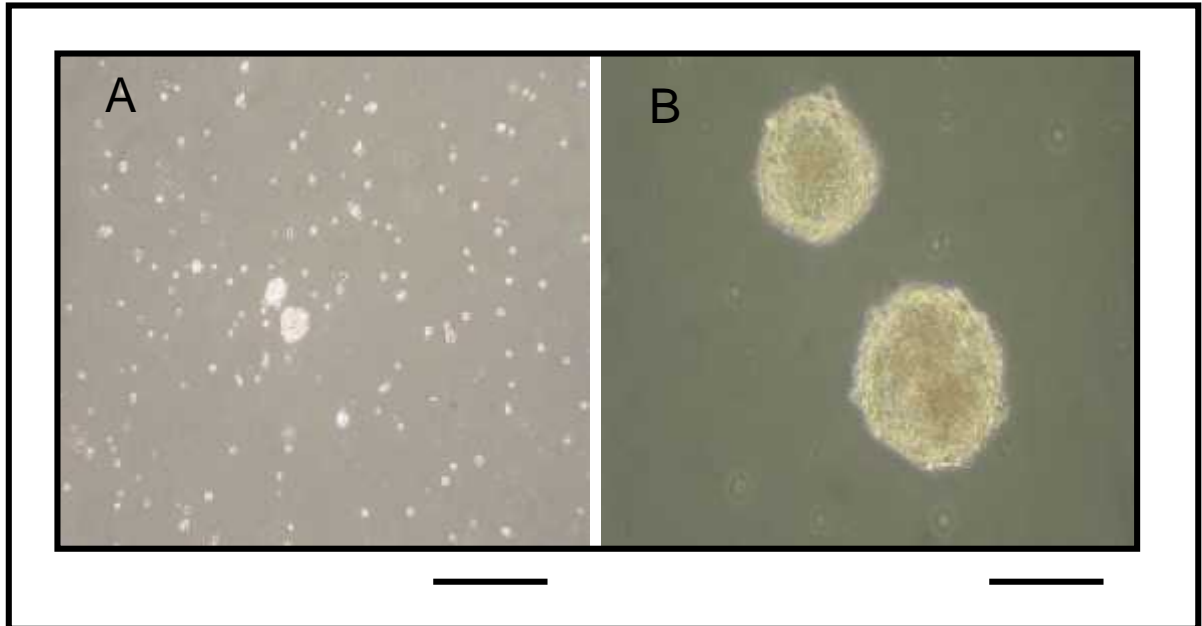


Figura 6. Cultivos de NEs obtenidas de un primer subcultivo a partir de cultivos primarios de ME de ratones de estadio 18.5. **A**: imagen representativa con un aumento de 10X, aun es posible visualizar un número importante de células únicas. **B**: amplificación 40X donde es posible notar con claridad la estructura de la NE en suspensión (estructura esférica, bode bien definido no adherido). Imagen representativa de más de treinta cultivos diferentes, obtenida por microscopio de luz invertido. Las barras indican 250µm.

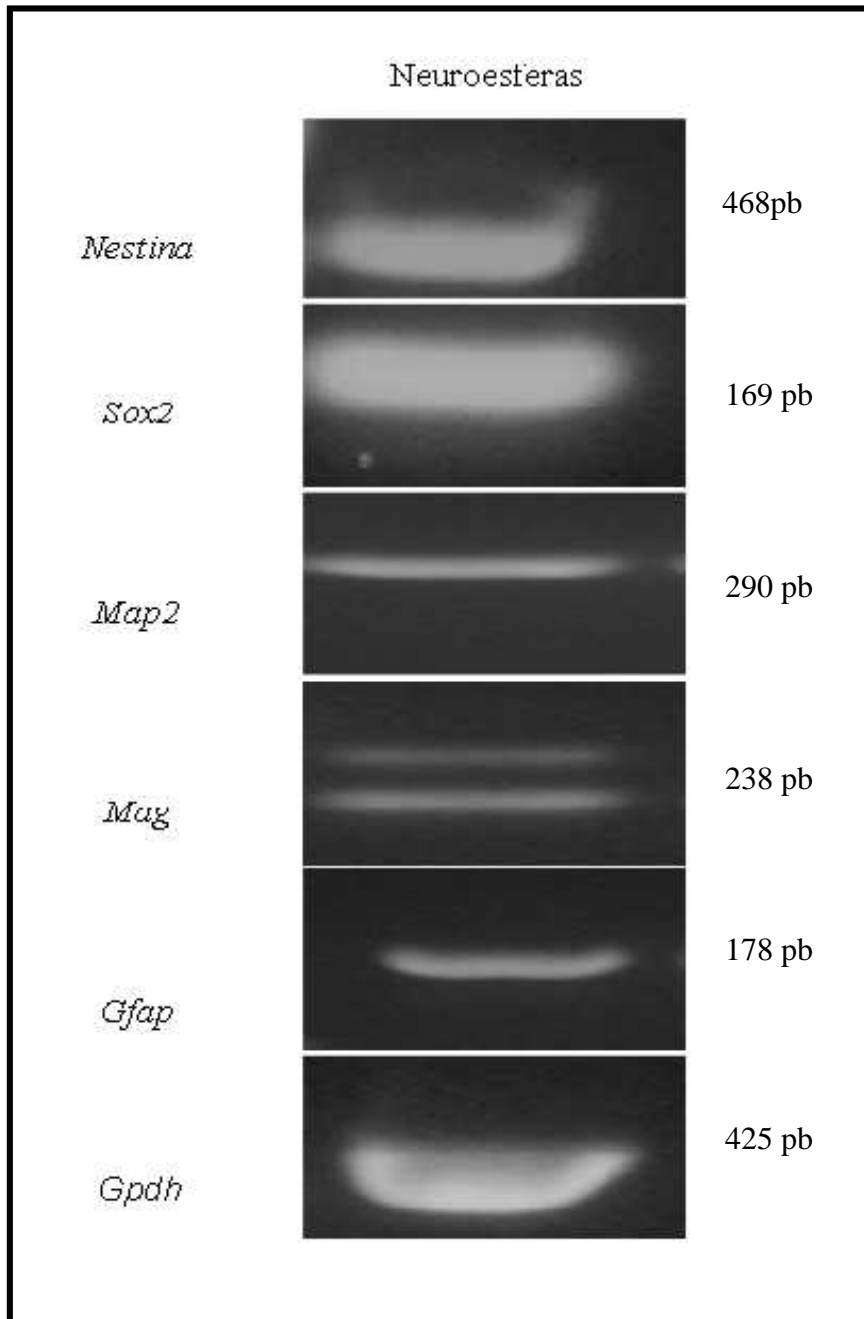


Figura 7. Caracterización de CTN de ME de ratón. En cultivos en suspensión, las células expresan marcadores moleculares de CTN (*Sox2*: célula troncal indiferenciada y *Nestina*: precursor neural) y de diferenciación hacia linajes neurales (*MAP2*: neurona, *MAG*: oligodendrocitos y *GFAP*: astrocitos) a nivel de mRNA por medio de RT-PCR. Imagen de gel representativo, correspondiente a tres experimentos independientes.

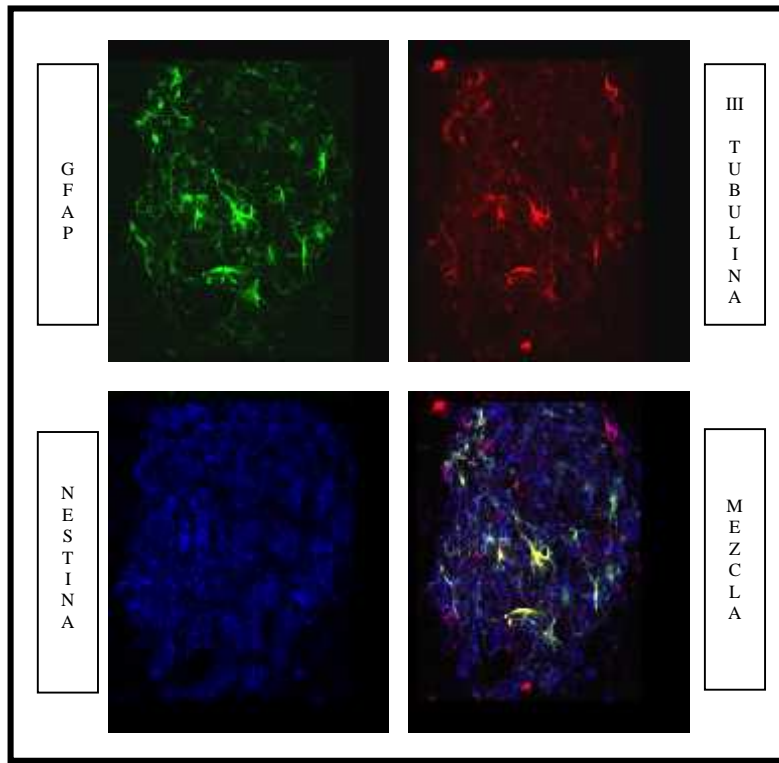


Figura 8. Expresión de anticuerpos en NE de ME de ratón. Posterior a cuatro días adheridas a poli-D-lisina las NE fueron fijadas. La inmunofluorescencia muestra expresión a nivel de proteínas de GFAP, -III-tubulina y nestina. Fotos obtenidas por medio de microscopia confocal con un aumento 60X. Imagen representativa correspondiente a un experimento.

Una vez, generados los cultivos de NE y caracterizadas las células como CTN, se procedió a estudiar la expresión de VEGF y sus receptores a nivel de mRNA y proteína a través de RT-PCR y western blot respectivamente, utilizando para ello muestras obtenidas de ME y NE derivadas de este tejido. Los resultados muestran expresión, a nivel de mensajero de dos de las cuatro isoformas descritas para VEGF-A: VEGF₁₂₀ (difusible) y VEGF₁₆₄ (difusible/asociado a matriz extracelular), tanto en muestra de tejido de ME como en NE (Figura 9). Por otro lado, sólo en muestras de ME fue posible obtener expresión de mensajeros para los receptores FLT-1 y FLK-1. Así mismo, en cultivos de NE, sólo se detectó la expresión del mensajero del receptor FLT-1. En el nivel de expresión de proteínas (Figura 10), se detectó expresión de dos de las cuatro isoformas de VEGF-A, tanto en un modelo de NE de cuatro días de diferenciación, como en muestra de tejido de ME. Sin embargo, en estos análisis, no fue posible detectar, en las muestras analizadas, la expresión de ninguno de los receptores de VEGF.

Ha sido descrito además que la función de VEGF-A puede ser modulada por otros tipos de VEGF, como así también por la presencia de correceptores, (Ferrara, N., 2003). Por ello, adicionalmente se evaluó la expresión de VEGF-B y los correceptores neuropilina 1 (Nrp1) y neuropilina 2 (Nrp2). Los resultados muestran la expresión del mensajero de VEGF-B y de los correceptores, tanto en muestras de tejido y como en NE (Figura 11)

Además se observó que la expresión a nivel de proteína de *Vegf-A* se mantiene luego de cuatro días de diferenciación (Figura 10), lo que sugiere que al igual que lo descrito en nichos neurovasculares encefálicos el rol VEGF podría tener un rol en el proceso de diferenciación y/o proliferación de CTN.

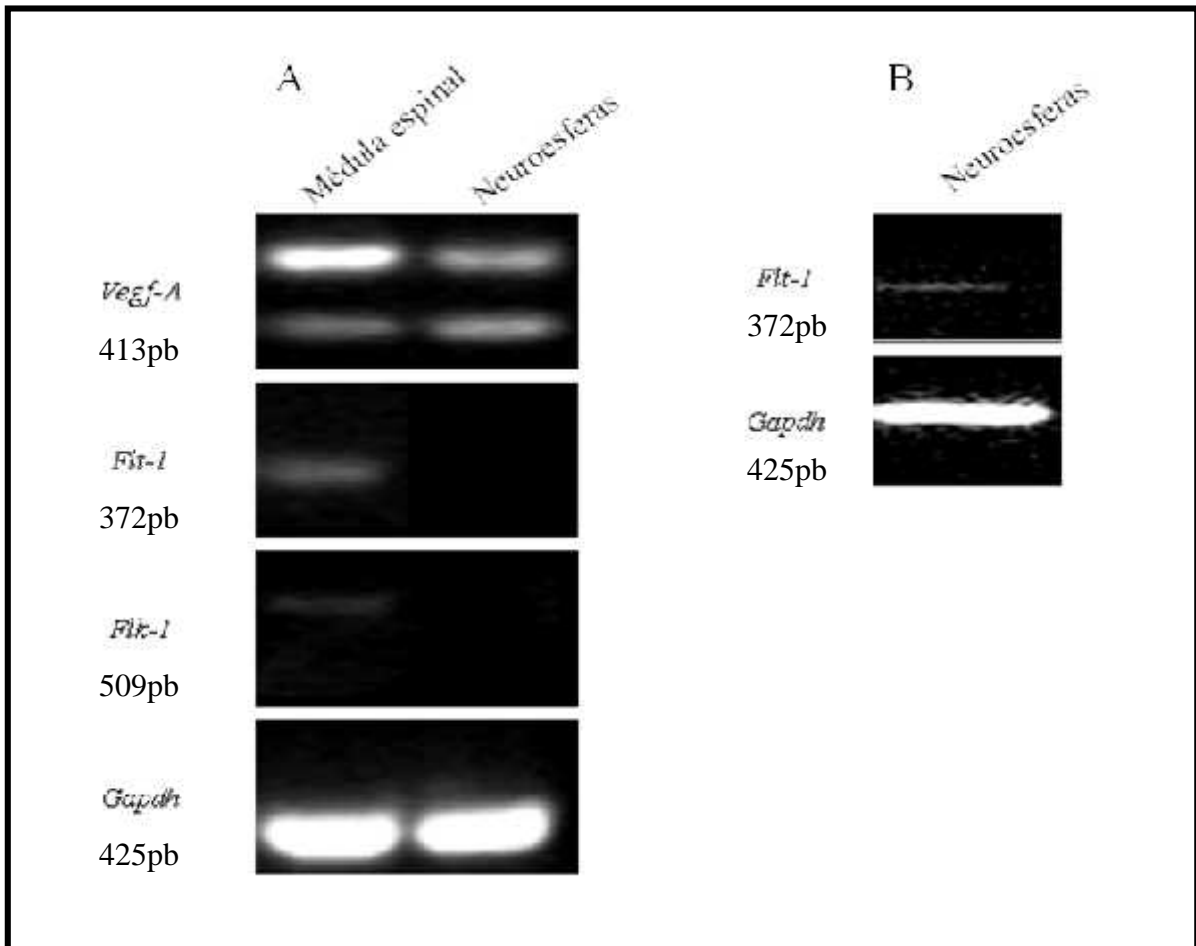


Figura 9. Expresión a nivel de mensajeros de *Vegf-A* y los receptores *Flt-1* y *Flk-1* por RT-PCR. A: En muestras de tejido de ME, tanto el ligando como sus principales receptores se expresan a nivel de mensajeros. En el caso de *Vegf-A* se expresan dos de las cuatro isoformas más conocidas: *Vegf₁₂₀* y *Vegf₁₆₄*. B: Mientras que en cultivo de NE sólo fue posible la detección del receptor *Flt-1*. A: corresponde a gel representativo de un total de tres experimentos independientes (30 ciclos totales). B: imágenes representativas de dos experimentos independientes (35 ciclos totales). *Gapdh* como control de carga (gen constitutivo).

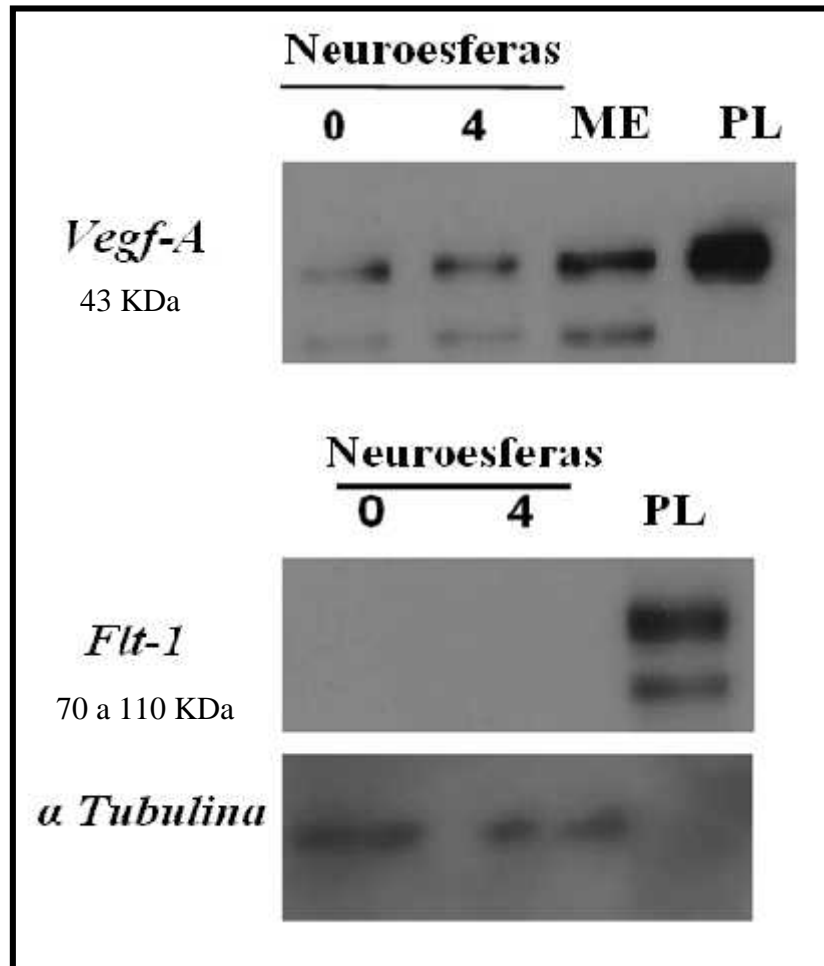


Figura 10. Expresión de la proteína (Western blot) de *Vegf-A* en un modelo de diferenciación. Fue posible observar expresión de dos de las cuatro isoformas de *Vegf-A*, tanto en modelo de NEs de cuatro días de diferenciación, como así también en muestras de tejido de ME. No fue posible detectar expresión del receptor *Flt-1*. Imagen correspondiente a un experimento, usando placenta (PL) como control positivo y alfa α -tubulina como gen constitutivo.

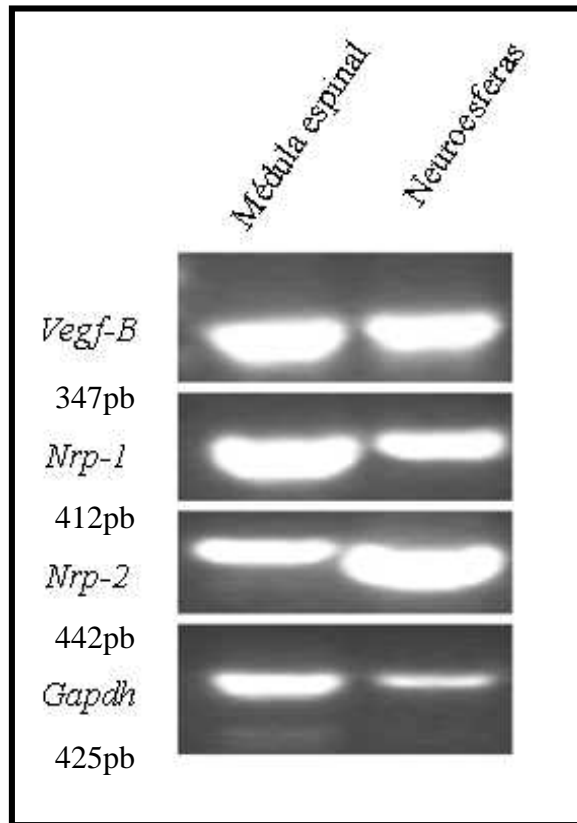


Figura 11. Expresión de mensajeros de *Vegf-B* y neuropilinas (Nrp). Tanto en muestras de tejido de ME como en cultivos de NEs fue posible la detección del mensajero de *Vegf-B*, (un gen homólogo de *Vegf-A*), como de los cofactores de Vegf, *Nrp-1* y *Nrp-2*. Imagen representativa de tres experimentos independientes. *Gapdh* como gen constitutivo. (30 ciclos totales).

Teniendo en consideración los resultados anteriores (Figuras 9, 10 y 11), en que se muestra que las CTN en cultivo, expresan el mRNA y la proteína de VEGF, como también, al menos el mRNA de uno de sus receptores, *Flt-1*, se procedió a utilizar un inhibidor farmacológico de receptores de VEGF (CBO-P11, inhibidor de FLT-1 y FLK-1) para explorar su papel funcional. Lo anterior con el objetivo de poder detectar por un lado, el eventual rol de la expresión endógena de VEGF, sobre el número de NE y por otro, evaluar un posible rol sobre aspectos funcionales en las NE durante el proceso de diferenciación espontánea, hacia el linaje neural. Para ello, en una primera aproximación, se evaluó y se determinó el número de NE luego de cuatro días de cultivo, y se cuantificó la expresión de un marcador de diferenciación neural (III tubulina) mediante el conteo de NE positivas para esta proteína.

Respecto del posible rol de la expresión endógena de VEGF sobre el proceso de diferenciación de células troncales de ME hacia un linaje neuronal, las NE fueron cultivadas en condiciones de diferenciación hacia linaje neural durante cuatro días, cuantificándose dicha diferenciación, como porcentaje de NE III tubulina. La figura 12 muestra que la

marca para esta proteína disminuye respecto de la situación control (panel superior), al bloquear los receptores de VEGF (panel central), para luego revertir esa tendencia cuando se adiciona VEGF exógeno (panel inferior). Los resultados cuantitativos permiten observar que, haciendo uso del inhibidor de los receptores de VEGF se produjo una disminución significativa del número de NE, respecto de la condición control, reduciéndose desde un 45,0% a un 42,75% para posteriormente y en forma significativa revertir esta disminución mediante el bloqueo de los receptores de VEGF llegando a un 61,5% (Figura 13 A). Por otro lado, la marca para α -tubulina pasa de 52,6% en condición control (sólo presencia de un vehículo) a un 23,4%. Congruente con los resultados previos, el efecto observado al inhibir los receptores con el uso de CBO-P11, logró ser revertido por la adición de VEGF exógeno, alcanzando incluso un significativo aumento respecto de la condición control (64,7% v/s 52,6% respectivamente) (Figura 13 B).

En conjunto, estas observaciones apuntan a considerar al eje VEGF/VEGFRs como un importante factor dentro de la homeostasia de las CTN de ME de ratón.

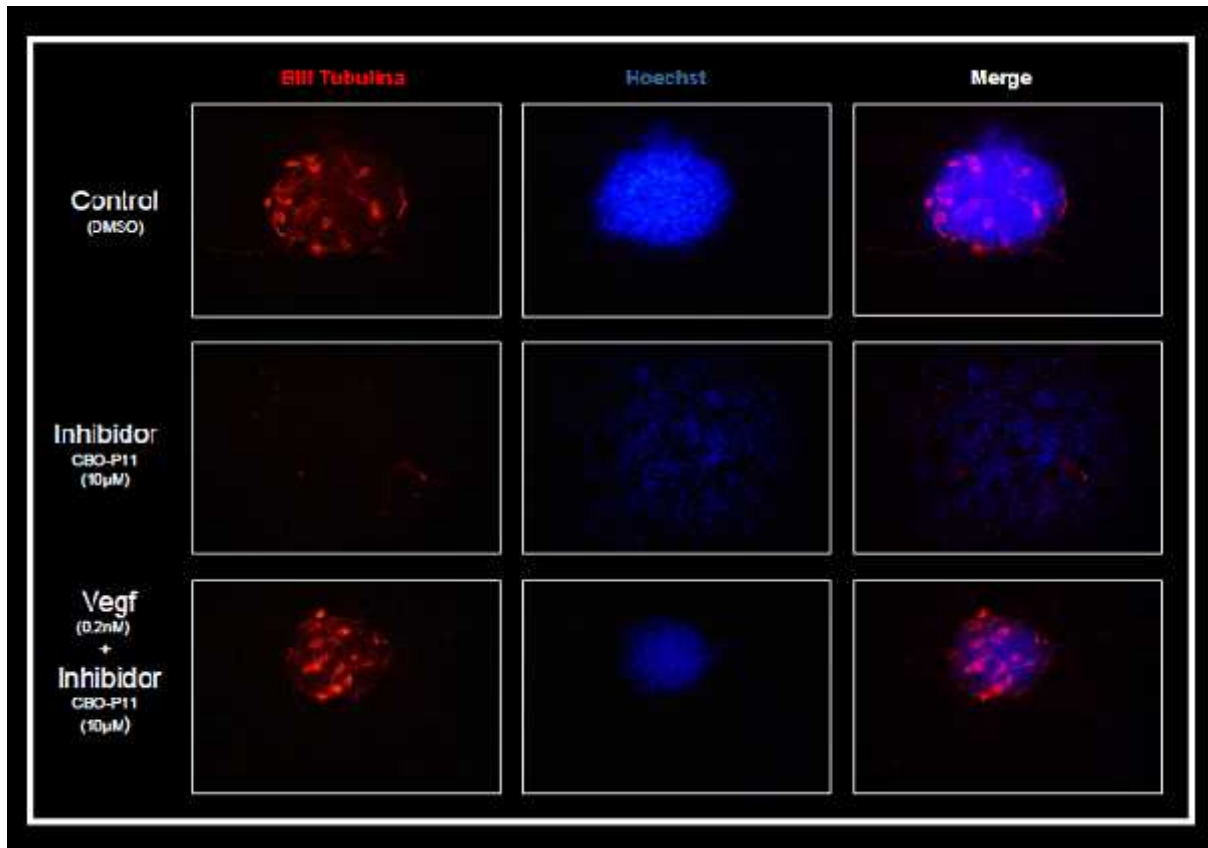


Figura 12. Efecto de VEGF sobre el proceso de diferenciación de células troncales neurales. Las NE de médula espinal, cultivadas en condiciones de diferenciación, fueron mantenidas en presencia de vehículo (control), de un inhibidor de los receptores de VEGF (CBO-P11) o de VEGF en presencia del inhibidor (VEGF + CBO-P11), en las concentraciones indicadas. Luego de 4 días de diferenciación, se analizó la expresión del marcador de diferenciación neuronal (β III tubulina), a través de microscopía de epifluorescencia (40X); Hoechst (núcleos). Imágenes representativas de 2 experimentos realizados en duplicado.

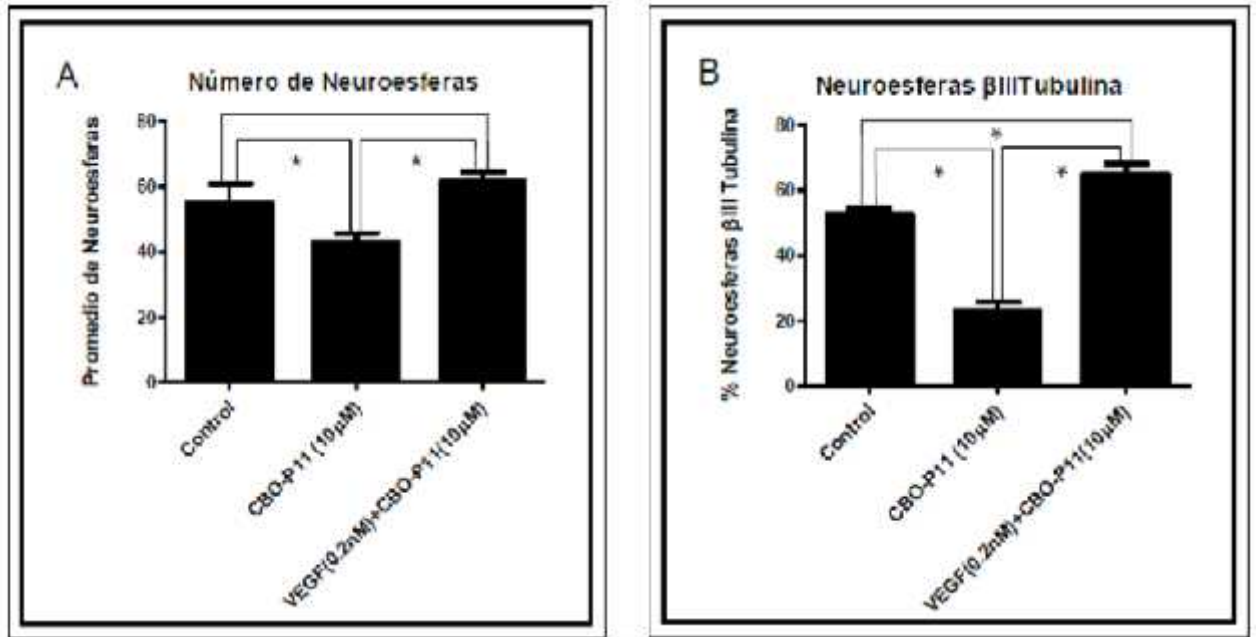


Figura 13. Efecto de VEGF sobre células troncales neurales de médula espinal. Las NE fueron cultivadas usando sólo vehículo (Control), un inhibidor de los receptores de VEGF (CBO-P11) y VEGF en presencia del inhibidor en las concentraciones indicadas. Luego de cuatro días de diferenciación tanto el número (A) como el porcentaje de NE III tubulina positivas respecto del total de NE en cultivo (B) fue cuantificado analizando imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia. * $P < 0,01$. Test Anova una vía. (n=4)

VI. Conclusiones.

1. La médula espinal murina puede ser considerada un nicho neurogénico en base a la presencia de CTNs encontradas en ratones de estadio fetal E18.5.
2. El eje VEGF/VEGFRs puede ser considerado uno de los factores de homeostasis de las CTNs dentro del nicho neurovascular de médula espinal murina de estadio E18.5
3. No es descartable la participación sinérgica de otros factores de crecimiento implicados en los procesos estudiados y analizados.

VII. Discusión.

Esta investigación ha mostrado que la ME de ratón posee CTN, las cuales a su vez, expresan VEGF-A, VEGF-B, Nrp-1 y Nrp2 y al menos uno de sus receptores (FLT-1) a nivel de mRNA. Respecto de estos últimos, es interesante notar que Nrp1 y Nrp2 son reconocidos correceptores de plexinas, relevantes en el desarrollo y funcionalidad del sistema nervioso, y también correceptores de FLT-1 y FLK-1, lo cual sugiere la funcionalidad del eje VEGF/VEGFRs en el tejido y edad estudiado. Por otro lado, estos resultados concuerdan con lo reportado en sistema nervioso, en el sentido que neuropilinas y receptores de VEGF están presentes e interactúan formando complejos claves en desarrollo (Erskine et al., 2011).

Uno de los principales desafíos enfrentados en el inicio de esta investigación dice relación con la obtención de cultivos de NE. Un primer intento, consideró animales de dos meses de edad, los cuales, no generaron NE en cantidades suficientes como para permitir la realización de los ensayos de caracterización y expresión génica del eje VEGF/VEGFRs. En resumen, la insuficiente formación de NE usando ratones de dos meses de edad, podría deberse a razones de la naturaleza intrínseca de las CTN de ME de ratón de éste estadio, sin embargo, son necesarios futuros estudios que apunten en esta dirección, para llegar a conclusiones más determinantes.

Junto con lo anterior, uno de los aspectos también relevantes dentro de estos experimentos, dice relación con la dificultad en detectar la expresión de ambos receptores de VEGF en cultivos de NE. A este respecto, parece no haber mayores dificultades al momento de analizar a nivel de mRNA y proteínas el ligando y sus principales receptores, en muestras de tejido de ME. Una explicación a esto, podría deberse a que el tejido de ME a diferencia de los cultivos de NE, posee células no sólo de tipo neural, sino además provenientes de vasos sanguíneos periféricos propios del tejido, es decir, no sólo las CTN son analizadas en ensayos de expresión génica, cuando se considera al tejido de ME, sino además, por ejemplo, células endoteliales. Quizás por ello, la expresión de mRNA e incluso de proteínas tanto del ligando, como de los receptores, resulta ser evidente en tejido de ME, y no en cultivos de NE. Alternativamente esto podría sugerir la existencia de mecanismos autocrinos y/o paracrinos de acción del ligando.

Considerando los resultados de esta tesis, que muestran la expresión del receptor FLT-1 a nivel de RNA mensajero, como así también otros antecedentes, que muestran a éste receptor como un regulador de diferenciación de CTN (Wittko, I.M., 2009), las observaciones descritas podrían ser interpretadas sobre la base del bloqueo de este receptor

en los cultivos de NE derivadas de ME. Lo anterior constituye un novedoso antecedente, ya que la eventual participación de esta vía de señalización no ha sido reportada a nivel de CTN de este tejido.

Adicionalmente esta tesis muestra una primera aproximación experimental, en la cual, se evaluó el bloqueo de receptores de VEGF en CTN de ME, sobre la variación en el número promedio de NE posterior a 4 días de diferenciación espontánea. Aún cuando el método de conteo es muy simple y se realizó sobre la base de criterios de conservación de la forma de NE, estos resultados podrían sugerir que el eje VEGF/VEGFRs, tendría un rol en regular positivamente el proceso de diferenciación de CTN de ME hacia el linaje neural. Al respecto es interesante destacar que, aun bajo condiciones de inhibición de la señalización de VEGF, existe un porcentaje de NE III tubulina positivas, lo cual indicaría que VEGF y los receptores FLT-1 y FLK-1 estarían involucrados en el proceso de diferenciación de CTN en conjunto con otros reguladores de este proceso. Por otro lado, el efecto atribuido a VEGF exógeno sobre CTN aun bajo condiciones de inhibición de sus receptores, también apunta hacia la idea de considerar la posibilidad de eventuales mecanismos alternativos de señalización. Así también y sin ser excluyente con lo anterior, alternativamente es posible especular que este eje pudiera estar involucrado en modificar el fenómeno de proliferación de CTN, hecho que por lo demás, esta muy bien respaldado por estudios realizados con este mismo modelo experimental (Campos et al., 2004) y en otras zonas del sistema nervioso central como por ejemplo ZSV, (Jin et al., 2002). Al respecto, estos y otros estudios, concuerdan en que la propiedad de proliferación de estas CTN se ve profundamente afectado cuando se interviene en la homeostasis de estas células, por ello, y aun cuando no fue el propósito de esta tesis evaluar el efecto de VEGF sobre la proliferación de CTN de ME, es un aspecto que debe ser considerado para explicar en parte estos resultados. Así mismo, no es descartable sostener que este eje podría estar involucrado en mediar fenómenos de adhesión y/o migración de las células que constituyen la NE, de manera similar a lo que se ha descrito en otros modelos celulares (Matsumoto et al. 2002). Así los resultados aquí presentados, sugieren que la expresión endógena de VEGF en NE de ME, podría regular funcionalmente propiedades de las células que la integran. Sin embargo, si el efecto observado en la disminución en el número de NE promedio usando el inhibidor de receptores de VEGF, se debe a que las células que conforman la NE sufren alteración de sus propiedades adhesivas, proliferativas, han migrado o eventualmente mueren y en consecuencia, se visualizan menos NE, es materia que merece ser revisada, observando por ejemplo, la presencia/ausencia de moléculas de adhesión celular en CTN y cómo responden al uso del inhibidor de receptores de VEGF. Siguiendo ésta misma línea argumental en el sentido de que eventualmente el

bloqueo de receptores de VEGF sea responsable de interferir con procesos de adhesión celular, reportes en la literatura señalan que en células endoteliales el eje VEGF/FLT-1/FAK media procesos de adhesión célula a célula, (Liu ZY y cols., 1999). A este respecto parece plausible especular que en CTN eventualmente, este eje pudiera mediar el proceso adhesivo, para ello, futuros estudios deberían incluir, por ejemplo, evaluar mecanismos de transducción de señales río abajo de la unión de VEGF a sus receptores.

A su vez, no es descartable del todo, pensar que hay otros factores de crecimiento cuyas vías de señalización estén mediando la respuesta observada en estos experimentos, es decir, que pudiera existir una acción conjunta de dos o más factores de crecimiento involucrados en la disminución en el número promedio de NE y/o en el proceso de diferenciación hacia linaje neuronal. Fuertemente sugerente, resulta pensar en factores de crecimiento como EGF y bFGF para ser incluidos en futuros estudios. Aún cuando se trata de resultados muy preliminares para sostener estas observaciones con absoluta certeza, los mismos constituyen un aporte en el contexto de entender la funcionalidad de CTN de ME.

Como ya se ha dicho y junto con lo anterior, esta tesis mostró los resultados observados al inhibir los receptores de VEGF usando un modelo de diferenciación espontánea de NE por 4 días. Estos sugerirían que el eje VEGF/VEGFR podría eventualmente regular positivamente la diferenciación hacia el componente neural de CTN. Esto último debe ponderarse cuidadosamente, pues sólo se estudia la diferenciación hacia un linaje específico con el uso de un único marcador. A este respecto, los intentos experimentales de esta tesis, consideraron inicialmente el análisis de otros marcadores como GFAP o SOX2, sin embargo, los datos más concluyentes en términos cualitativos y cuantitativos, provinieron finalmente de los recogidos del análisis del marcador de diferenciación neural III tubulina. La explicación a lo anterior, obedece más a cuestiones de orden metodológico, ya que los registros de ambos anticuerpos (GFAP y SOX2) a nivel de fluorescencia mostraron patrones dispersos de expresión en todos los intentos realizados (4) y fueron descartados para el análisis, por considerarse poco creíbles para análisis de troncalidad (SOX2) y de diferenciación (GFAP). Por ello, este ensayo en este sentido, no puede aportar antecedentes adicionales en torno a que VEGF tenga algún rol en la diferenciación hacia otros linajes neurales. Adicionalmente, es necesario mencionar que el tiempo de diferenciación de CTN elegido aquí, responde a mostrar una ventana de tiempo menor a los reportados en la literatura. Fue muy claro notar que al finalizar los 4 días de diferenciación las NE se habían adherido a la matriz y en base a ello, se procedió a realizar el análisis de diferenciación en ese punto, para observar si las CTN de ME presentaban evidencia de estar comprometiéndose hacia el linaje neural (NE III tubulina positivas)

durante esta ventana temporal. Futuras experiencias en torno a evaluar diferenciación de CTN de ME deberían considerar distintos tiempos, tomando el periodo de 4 días como uno de ellos, así también incluir marcadores de diferenciación de CTN, más tardíos como por ejemplo NeuN. Lo anterior se sustenta en el antecedente preliminar aportado por esta tesis, en el sentido de que las CTN de ME expresan VEGF al cabo de este periodo de 4 días de diferenciación y es por tanto posible pensar en estudiar el rol del eje VEGF/VEGFRs en periodos como este. Adicionalmente, la presencia de neuropilinas en CTN de ME, podría sugerir que hay participación, aun no definida, de parte de cofactores que se expresan en estas CTN.

Finalmente, resultará de gran valor, volver a intentar en el futuro, estudiar en más detalle, la funcionalidad de las CTN de ME utilizando este modelo experimental, de modo de acercarse a conocer el rol de este y otros factores de crecimiento involucrados.

VIII. Bibliografía

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

Azzouz, M., Ralph, G.S., Storkebaum, E., Walmsley, L.E., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Carmeliet, P., Mazarakis, N.D., (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429:413-417.

Barami, K., (2008). Relationship of neural stem cells with their vascular Niche: Implications in the malignant progression of gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 15:1193-1197.

Barnabé-Heider, F., Frisé, J., (2010). Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 3:16-23.

Bonde, J., Hess, D.A., Nolte, J.A., (2004) Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol.* 11: 392-398.

Brüstle, O., (1999). Building brains: neural chimeras in the study of nervous system development and repair. *Rev Brain Pathol.* 9: 527-545.

Campos, L.S., (2004). Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res.* 78:761-769.

Caplice, N.M., Doyle, B., (2005). Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells.*14: 122-139.

Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193-200.

Conti, L., et al. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology* 3: e283.

Choi, J.S., Kim, H.Y., Cha, J.H., Choi, J.Y., Park, S.I., Jeong, C.H., Jeun, S.S., Lee, M.Y., (2007) Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors. Flt-1 and Flk-1 following acute spinal cord contusion in rats. *J Histochem Cytochem.* 55: 821-830.

Chojnacki, A.K., Mak, G.K., & Weiss, S., (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nature reviews. Neuroscience* 10: 153- 163.

Deshpande, D.M., Kim, Y.S., Martinez, T., Carmen, J., Dike, S., Shats, I., Rubin, L.L., Drummond, J., Krishnan, C., Hoke, A., Maragakis, N., Shefner, J., Rothstein, J.D., Kerr, D.A., (2006) Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol.* 60:32-44.

Eichmann, A., Le Noble, F., Auterio, M., Carmeliet P., (2005) Guidance of vascular and neural network formation. *Curr Opin Neurobiol.*15:108-115.

- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J., (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9: 669- 674.
- Gage, F.H., (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438.
- Gage, F.H. (2003). Brain, repair yourself. *Scientific American* 289: 46-53.
- Greenberg, D.A., Jin, K., (2004). Experiencing VEGF. *Nat Genet.* 36: 792-793.
- Greenberg D.A., Jin, K., (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438: 954-959.
- Hamilton, L.K., Truong, K.V., Bednarczyk, M.R., Aumot, A., Fernades, J.L., (2009) 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.
- Herrera, J.J., Sundberg, L.M., Zentilin, L., Giacca, M., Narayana, P.A., 2010 Sustained expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 improves blood-spinal cord barrier integrity and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* Nov;27 (11):2067-76.
- Horky, L.L., Galimi, F., Gage, F.H., Horner, P.J., (2006). Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J.Comp.Neurol.* 498:525-538.
- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li B, Leung DW. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol* 5: 1806-1814.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A., (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:11946-11950.
- Kim, B.K., Kim, S.E., Shim, J.H., Woo, D.H., Gil, J.E., Kim, J.H., (2006) Neurogenic effect of vascular endothelial growth factor during germ layer formation of human embryologic stem cells. *FEBS Lett.*; 580: 5869-5874.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H., (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* Nov;126(21):4895-902.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A., (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32: 149-184.
- Lambrechts, D., Carmeliet, P., (2006) VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim Biophys Acta.* 1762: 1109-1121.
- Lee, H.J., Kim, K.S., Park, I.H., Kim, S.U., (2007) Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. *PLoS One.* 2:e156.
- Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int.* 2011;2011:274564.

- Lindvall, O., Kokaia, Z., (2010) Stem cells in human neurodegenerative disorders-time for clinical translation? *J Clin Invest.* 120: 29-40.
- Liu, Z.Y., Ganju, R.K., Wang, J.F., Schweitzer, K., Weksler, B., Avraham, S., Groopman, J.E., (1997) Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood.* Sep 15;90(6):2253-22539.
- Martin, G.R., (1981). 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.
- Meletis, K., et al. (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS biology* 6: e182.
- Nandoe Tewaie, R.S., Hurtado, A., Bartels, R.H., Grotenhuis, A., Oudega, M., (2009) Stem Cell-Based Therapies for spinal cord Injury. *J Spinal Cord Med.* 32: 105-114.
- Olson, A.K., Eadie, B.D., Ernst, C., Christie, B.R., (2006) Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways *Hippocampus.* 16: 250-260.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H., (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 425: 479-494.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., & Doetsch, F., (2009). 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.
- Pogue, A.I., Lukiw, W.J., (2004) Angiogenic signaling in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 15: 1507-1510.
- Reynolds. B.A., Weiss, S., (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 27; 255:1707-1710.
- Robinson, C.J., Stringer, S.E., (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.*;114:853-865. Review.
- Rosenstein, J.M., Mani, N., Khaibullin, A., Krum, J., (2003) Neurotrophic effect of vascular endothelial growth factor in organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci.* 23:11036-11044.
- Roskoski, Jr R., (2008). VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 375: 287-291.
- Schmidt, N., Koeder, D., Messing, M., Mueller Franz-Josef., Aboody, K.S., Kim, S.U., Black, P.M., Carroll, R.S., Westphal, M., Lamszus, K., (2009). Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche. *Brain Res.* 1268: 24-37.

- Shen, Q., Godrie, S.K., Jim, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304: 1338-1340.
- Steiner, D., et al.(2010). Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nature biotechnology* 28, 361-4.
- Storkebaum, E., Carmeliet, P., (2004) VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 113:14-18.
- Smith, A., (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441: 1060.
- Snyder, E.Y., *et al.* (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68, 33-51.
- Tashiro, A., Makino, H., Gage, F.H., (2007). Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. *J Neurosci* 27:3252-3259
- Temple, S., Alvarez-Buylla, A., (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*; 9:135-41. Review.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., Abraham, J.A., (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 226: 11947-11954.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145-1147
- Ucelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease. *Nat. Rev Immunol.* 8. 726-736.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., (2002). Functional neurogenesis in adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vieira, J.M., Ruhrberg, C., Schwarz, Q., (2010) VEGF receptor signaling in vertebrate development. *Organogenesis.*6:97-106 .
- Wada, T., Haigh, J.J., Ema, M., Hitoshi, S., Chaddh, R., Rossant, J., Nagy, A., Van der Kooy, D., (2006) Vascular Endothelial growth factor directly inhibits primitive neural stem cell survival but promotes definitive neural stem cell survival. *J Neurosci.* 26: 6803-6812.
- Wang, Y., Jin, K., Mao, X.O., Xie, L., Banwait, S., Marti, H., Greenberg, D.A., (2007) VEGF-over expressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res.* 85:740-747.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., and Reynolds, B.R., (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 16: 7599-7609.

Wu, Y., *et al.* (2012) CXCL12 increases human neural progenitor cell proliferation through Akt-1/FOXO3a signaling pathway. *Journal of neurochemistry* 109: 1157-1167.

Xu, Y., Kitada, M., Yamauchi, M., Dezawa, M. (2006). Increase in bFGF-responsive neural progenitor population following contusion injury of the adult rodent spinal cord. *Neurosci Lett.* 39: 174-179.

Zacchigna, S., Lambrechts, D., Carmeliet, P. (2008) Neurovascular signaling defect in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 169-181.

Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645-660.

Zlokovic, B.V., (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28: 202-8.