

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología



Papel del Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) en la Neurogénesis del Epitelio Olfatorio de Rata Adulta

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en el
cumplimiento de los requisitos para optar al título de Ingeniero en
Biotecnología Molecular**

Estefanía María Belén López Arenas

25 de noviembre del 2008

Tutor: Dra. Lorena Sulz Echeverría _____

Tutor: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña _____

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología



Papel del Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) en la Neurogénesis del Epitelio Olfatorio de Rata Adulta

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en el
cumplimiento de los requisitos para optar al título de Ingeniero en
Biotecnología Molecular**

Estefanía María Belén López Arenas

25 de noviembre del 2008

Tutor: Dra. Lorena Sulz Echeverría _____

Tutor: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña _____

UCH - FC
Biotecnología
L864
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

ESTEFANÍA MARÍA BELÉN LÓPEZ ARENAS

Papel de Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) en la Neurogénesis del Epitelio Olfatorio de Rata Adulta

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña
Director Seminario de Título

Dra. Lorena Sulz Echeverría
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dr. Cristian González-Billaault
Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Corrector

Autobiografía



Mi nombre es Estefanía López Arenas, nací el 2 de Diciembre de 1982 en la ciudad de Valdivia, rápidamente me cambie a lo que sería mi hogar durante toda mi vida, la pequeña ciudad de La Ligua más específicamente el pueblo de Valle Hermoso.

Estudí la enseñanza Básica y media en el Colegio Santa María de La Ligua, en el colegio tuve las mismas compañeras y la misma profesora durante toda mi estadía.

Cuando terminé cuarto medio ingrese a la Universidad de Chile, al programa de Bachillerato y posteriormente a Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Además de mi trabajo en el laboratorio, me gusta mucho hacer deporte, especialmente los que están relacionados con el mar, como bucear o nadar, también practique futbol y basquetbol.

Más bien mi mayor pasión es estar en al aire libre, por donde me lleve la vida.

RESUMEN

Papel de LIF en la Neurogénesis del Epitelio Olfatorio de Rata Adulta.

En el epitelio olfatorio, las neuronas olfatorias se regeneran durante toda la vida. El Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) es una citoquina que actúa como agente mitogénico de los precursores neuronales. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que el óxido nítrico (NO), un segundo mensajero gaseoso producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), induce la proliferación de los precursores neuronales. Lo anterior sugiere que el NO podría actuar como un segundo mensajero del LIF, mediante un aumento de la expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS). El objetivo de este trabajo fue determinar si los precursores neuronales del epitelio olfatorio expresan el receptor de LIF (LIF-R) y si LIF induce la expresión de iNOS. Para esto se utilizaron cultivos primarios de precursores neuronales del epitelio olfatorio de rata que fueron tratados con LIF (20ng/mL) por 24 horas. Se determinó la expresión de LIF-R e iNOS mediante RT-PCR e inmunofluorescencia indirecta. Los resultados obtenidos indican que la expresión de LIF-R e iNOS aumentó en 45,28 y 95,48 % respectivamente, en relación a los tratamientos controles (medio mínimo sin factores de crecimiento y medio con EGF). Estos resultados fueron corroborados por inmunofluorescencia. Lo anterior confirma que los precursores neuronales expresan LIF-R y que el LIF induce la expresión de iNOS, sugiriendo que el óxido nítrico mediaría el efecto de LIF sobre la proliferación de los precursores neuronales en la neurogénesis del epitelio olfatorio.

ABSTRACT

In the olfactory Epithelium, the olfactory neurons regenerate during the entire lifetime. The Leukemia Inhibitor Factor (LIF) is a cytokine that promotes the proliferation of the neuronal precursors. Previous results obtained in our laboratory demonstrated that nitric oxide (NO), a second messenger produced by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), induce proliferation of the neuronal precursors. This suggests that the NO could act as a second messenger of LIF. That leads to the expression of the inducible NOS isoform (iNOS). The aim of this work was to determine whether neuronal precursors express LIF receptor (LIF-R) and whether LIF treatment induces the expression of iNOS. Using primary cultures of olfactory neuronal precursors treated with LIF (20 ng/ μ L) for 24 hours, the LIF-R and iNOS expression was determined by RT-PCR and indirect immunofluorescence. The LIF-R and iNOS expression increased in 45.28 and 95.48% respectively, respect to the control treatments (DMEN-F12 and EGF). Results that were corroborated by immunofluorescence. These results confirm that neural precursors express LIF-R and that LIF induces the expression of iNOS, suggesting that nitric oxide would mediate the LIF effect over neuronal precursor cells proliferation during the neurogenesis of the olfactory epithelium.

INDICE

	Pag.
1. Título	1
2. Resumen	2
3. Abstract	3
4. Marco Teórico	6
5. Planteamiento del Problema	12
1.-Hipótesis	12
2.-Objetivo: general	12
Específicos	12
6. Materiales y Métodos	12
Materiales	12
1.-Animales y cultivo celular	12
2.-Ácidos nucleicos	12
3.-Enzimas	13
4.-Inmunofluorescencia	13
Métodos	14
Estandarización de Técnicas	14
1.-Cultivo Celular	14
2.-Extracción de RNA	15
a.- Método de Shomczysky-Sashi	15
b.- Método de Trizol	16

c.- Método Qiagen RNeasy Mini Kit	16
3.-Síntesis de cDNA a partir de RNA	17
4.-Reacción de PCR	18
5.-Electroforesis de ácidos nucleicos	19
6.-Inmunofluorescencia	19
7.-Protocolo experimental	
Expresión de LIF-R e iNOS en presencia de LIF	19
7. Resultados	20
1.-Estandarización de cultivo primario	20
2.- Purificación de RNA	22
3.- Estandarización de RT-PCR	23
4.-Expresión de LIF-R en presencia de LIF	24
5.- Expresión de iNOS en presencia de LIF	25
6.-Detección de iNOS y LIF-R por inmunofluorescencia	26
8. Discusión	29
9. Conclusión	31
10. Referencias	32

Índice de Figuras

Marco teorico	Pag.
Figura 1. Diagrama de proliferación de los precursores neuronales (Dannette y Nicolay, 2006).	12
Figura 2. Modelo de diferenciación de las células horizontales basales (HBS). En el epitelio Olfatorio las HBS darían origen a todos los tipos celulares. BG: células de Bowman; GBS: células basales globosas; ORN: neurona receptora olfatoria; SUS: células de soporte (Iwai y Zhou, 2008).	13
Figura 3. Modelo propuesto para el efecto de LIF en los precursores neuronales.	16
Resultados	
Figura 4. Cultivo primario de epitelio olfatorio de rata, 5 días de cultivo en medio con EGF (25 ng/μL). (a) Placa de 35 mm, (b) Placa de 1,9 mm (4 pocillos). Barra: 50μm.	29
Figura 5. Purificación de RNA por 3 métodos distintos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.	31
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.(a) Control de carga. RT-PCR con partidores para YWHAZ. (b) RT-PCR con partidores para LIF-R, para tratamientos por 24 horas. Medio mínimo, EGF y LIF.	33
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 2%. (a) control de carga RT-PCR con partidores para YWHAZ. (b) RT-PCR con partidos para iNOS para 3 tratamientos medio mínimo, EGF y LIF.	36
Figura 8. Inmunofluorescencia con doble marcaje iNOS en rojo y LIF-R en verde (a) medio mínimo (b) medio con EGF(25 ng/μl). Azul, tinción nuclear con DAPI. Aumento 40x.	37
Figura 9. Inmunofluorescencia con doble marcaje; iNOS en rojo y LIF-R en verde, de cultivos tratados con LIF (20 ng/μl) por 24 horas. Azul, tinción nuclear con DAPI. Aumento 40x.	38

Tablas

Materiales y métodos	Pag.
Materiales	
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en cada uno de los pasos especificados.	18
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en cada uno de los pasos especificados.	19
Métodos	
Tabla 3. Programa de amplificación por PCR para los partidores utilizados.	25
Resultados	
Tabla 4. Datos obtenidos del conteo de células.	27
Tabla 5. Concentración de RNA obtenida a través de los distintos métodos de extracción.	30

Gráficos

Resultados	
Grafico I. Cantidad de células por cm ² para las placas de 1,9mm (4 pocillos) y 35mm respectivamente.* significativamente diferentes, p < 0,05 test de students. ANOVA.	28
Grafico II. Porcentaje de expresión de LIF-R con respecto al control de carga (YWHAZ), para 3 tratamientos: MM: medio mínimo; EGF y LIF. Sin diferencias significativas entre los grupos.	33
Grafico III. Porcentaje de expresión de iNOS en relación al control de carga (YWHAZ), para 3 tratamientos: MM: medio mínimo; EGF y LIF. * Diferencias significativas entre los grupos, p<0,05, ANOVA.	36

Abreviaturas

ADN	: Acido desoxiribonucleico
ACIII	: Adhenil ciclase III olfatoria
ARN	: Acido ribonucleico
BDNF	: Factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro
BSA	: Suero albumina de bovino
CNTF	: Factor neurotrofico ciliar
CK-14	: Citokeratina 14
CT-1	: Cardiotrofina-1
DEPC	: Dietil pirocarbonato
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
Et-brx	: Bromuro de etidio
FGF-2	: Factor de crecimiento fibroblastico 2
FCS	: Suero fetal bovino
GBC	: Células globosas basales
GAP-43	: Proteína 43 asociada a crecimiento
HBC	: Células horizontales basales
IL-6	: Interleuquina-6
IL-1	: Interleukina-1
IGF-1	: Factor de crecimiento insulínico
ITS	: Insulina-transferrina selenio
JAK/STAT	: Janus quinasa (jaks)/ traductores de señales y activadores de la transcripción (STAT)
LIF	: Factor inhibidor de la Leucemia
LIF-R	: Receptor del factor inhibidor de la Leucemia
MM	: Medio Mínimo DMEN/F-12 + ITS
NO	: Oxido nítrico
NOS	: Oxido nítrico sintasa
eNOS	: Oxido nítrico sintasa endotelial
iNOS	: Oxido nítrico sintasa inducible
nNOS	: Oxido nítrico sintasa neural
NGF	: Factor de crecimiento nervioso
NT-3	: Neurotrofina 3
nCAM	: Molécula de adhesión celular neural
OLF 442	: Línea celular derivada de progenitores neuronales olfatorios
OMP	: Proteína marcadora olfatoria
OnM	: Oncostatina

ORNs	: Neuronas olfatorias
PCR	: Reacción de la polimerasa en cadena
RT-PCR	: Transcripción reversa y reacción de la polimerasa en cadena
PFA	: Paraformaldehído
PBS	: Tampón fosfato salino
TβIII	: Tubulina específica neuronal
TGF-β2	: Factor de crecimiento transformante β2
YWHAZ	: Proteína de activación zeta péptido tirosina 3-monooxygenasa/triptófano 5-monooxygenasa gen, control de carga PCR.
ZSV	: Zona subventricular

MARCO TEORICO

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan nuevas células nerviosas. Este proceso ocurre activamente en estadios tempranos del desarrollo, pero va disminuyendo a medida que los individuos llegan a la adultez, condición en que solo se produce en lugares específicos del sistema nervioso como el hipocampo, epitelio olfatorio y bulbo olfatorio (Altman y cols, 1965; Erikson y cols, 1998; Gould y cols, 1998; Graziadei, 1973; Moulton, 1974; Graziadei y Monti Graziadei 1979).

El proceso de neurogénesis involucra la proliferación de precursores neuronales desde las células troncales, para luego migrar y diferenciarse a neuronas postmitóticas. Las células troncales son células totipotenciales, es decir, son capaces de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo, o multipotenciales, las cuales tienen un compromiso celular y pueden dar origen a diversos tipos celulares de un tejido determinado. Por ejemplo, los precursores neuronales pueden dar origen a todas las células del sistema nervioso; neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En cultivo, las células troncales nerviosas forman neuroesferas, éstas son colonias de células derivadas de una única célula troncal y que presentan características típicas de las células troncales como son renovación y multipotencialidad (Reynolds y Weiss, 1992). Hasta hace poco se pensaba que en mamíferos la neurogénesis solo ocurría en períodos del desarrollo embrionario, durante el cual se generan los diferentes tipos de células nerviosas. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que existe generación de nuevas neuronas en algunas zonas del sistema nervioso de animales adultos.

La neurogénesis en mamíferos adultos se describió por primera vez en el hipocampo de ratas y, más recientemente, se ha encontrado también en el giro dentado de primates (Erikson y cols, 1998; Gould y cols, 1998). Se ha planteado que la neurogénesis en adulto permitiría aumentar el número de neuronas en la población total y/o reemplazar neuronas muertas (Gould y Tanapat, 1997). La capacidad de reemplazar las neuronas perdidas en el adulto es una de las características que diferencian al epitelio olfatorio, junto al bulbo olfatorio y al hipocampo, del resto del sistema nervioso. En el cerebro se generan localmente nuevas células granulares en el giro dentado del hipocampo, entre el borde del hilio y las capas de células granulares, mientras que en la zona subventricular (ZSV) se generan neuronas que migran hacia el bulbo olfatorio y que se diferencian en interneuronas y células glomerulares (Lois y Alvarez-Buylla, 1993).

El epitelio olfatorio se encuentra en contacto directo con el medio externo, por lo que constantemente pierde neuronas olfatorias (ORNs). El epitelio es pseudoestratificado y está compuesto de varios tipos celulares, como células basales, células de soporte y neuronas sensoriales (ORNs). Estas últimas transducen los odorantes y conducen impulsos eléctricos desde la nariz hacia el bulbo olfatorio del cerebro. A su vez se distinguen dos tipos de células basales, las globosas (GBC) y las horizontales (HBC). Las células basales globosas han sido identificadas como precursores neuronales y serían las encargadas de dar origen tanto a las neuronas sensoriales como a las células de soporte (Dannette y Nicolay, 2006) (figura 1) de manera que durante la vida adulta las ORNs mueren y son reemplazadas por nuevas neuronas, existiendo así una constante renovación. Recientemente se han identificado a las HBC como progenitores multipotenciales del

epitelio olfatorio, proponiéndose que estas células serían las encargadas de dar origen a las células basales globosas, que a su vez dan origen a las neuronas olfatorias. También las HBC podrían dar origen a otros tipos celulares del epitelio, como células de Bowman y células de soporte (figura 2) (Iwai y Zhou, 2008).

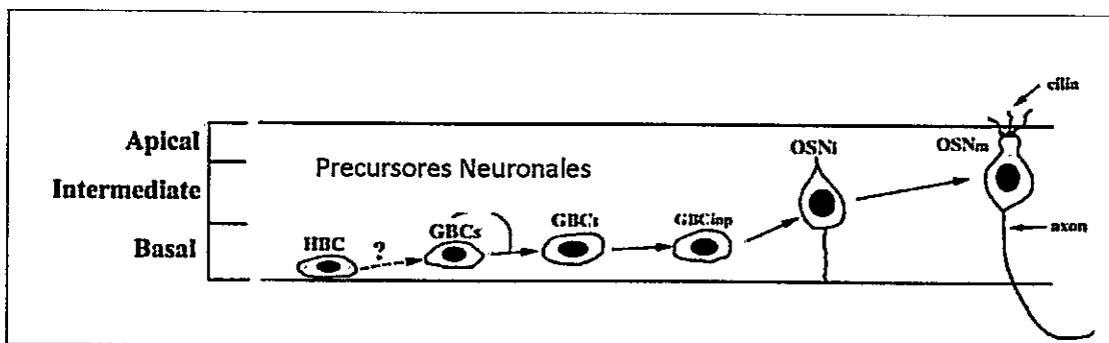


Figura 1. Diagrama de proliferación de los precursores neuronales (Dannette y Nicolay, 2006).

En el estudio de la neurogénesis se han identificado diversos factores que participarían induciendo la proliferación de estas células. Entre estos factores se encuentra el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor inhibidor de la Leucemia (LIF); este último factor sería liberado por las ORNs en apoptosis (Getchell y cols, 2002). Entre los factores que inducen la diferenciación neuronal, se encuentra el factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la dopamina, el factor de crecimiento transformante- β 2 (TGF- β 2) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). En este sentido se ha propuesto que los factores de crecimiento tienen un papel crítico en la regulación de la neurogénesis durante el desarrollo del sistema nervioso central. La expresión de algunos factores de crecimiento y sus receptores continúa

durante la vida adulta en diversas regiones del sistema nervioso, que incluyen el hipocampo, la zona subventricular y el epitelio olfatorio (Rev. por Mackay-Sim, 1999).

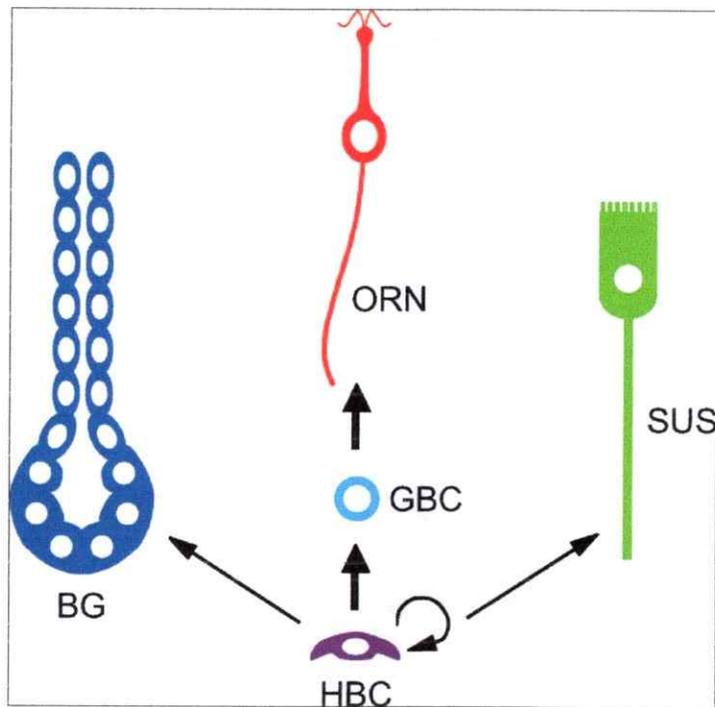


Figura 2. Modelo de diferenciación de las células horizontales basales (HBS). En el epitelio Olfatorio las HBS darían origen a todos los tipos celulares. BG: células de Bowman; GBS: células basales globosas; ORN: neurona receptora olfatoria; SUS: células de soporte (Iwai y Zhou, 2008).

Las neuronas en diferenciación expresan distintos marcadores moleculares, según el estado en el que se encuentren. Las células troncales expresan citoqueratina-14 (CK14), mientras que las neuronas postmitóticas expresan la molécula de adhesión celular neural (nCAM). Las neuronas en proceso de diferenciación inicialmente expresan la tubulina específica neuronal (T β iii) y la proteína 43 asociada a crecimiento (GAP43). Cuando están maduras, las neuronas pierden la inmunoreactividad para GAP43 y expresan marcadores

típicos de neuronas olfatorias maduras, como la OMP, la galactosa-nCAM (gal-nCAM) (Pays y cols, 2000) y componentes de la cascada de transducción, como la ACIII y receptores para odorantes.

El factor inhibidor de la Leucemia (LIF) es una citoquina que pertenece a la familia de la interleuquina-6 (IL-6), que incluye además a IL-1, al factor neurotrófico ciliar (CNTF), a Cardiotrofina-1 (CT-1) y a Oncostatina (OnM). Los receptores de estas citoquinas comparten en común la subunidad gp 130. Se han descrito 2 efectos contradictorios para LIF sobre las células troncales nerviosas. Por un lado, se ha reportado que LIF (o CNTF) actúan directamente sobre las células troncales induciendo su diferenciación hacia astrocitos; y que el tratamiento de células precursoras con LIF inhibe la formación de neuroesferas (Pitman y cols, 2004; Hermanson y cols, 2002).

Por el otro lado, la vía de señalización LIF también ha sido implicada en la proliferación de las células troncales nerviosas. En la ZSV del embrión de ratón, la señalización vía gp 130 induce la duplicación de las células progenitoras (Hatta y cols, 2002). Además, en el ratón, la infusión de CNTF en los ventrículos laterales incrementa el número de células formadoras de neuroesferas (Shimazaki y cols, 2001). LIF ha sido implicado en la regeneración del epitelio, promoviendo la proliferación de las células precursoras nerviosas. Cuando se destruye el epitelio olfatorio mediante bulbectomía u otro procedimiento, las ORN en apoptosis liberan rápida y transitoriamente LIF (Nan y cols, 2001; Moon y cols, 2002; Bauer y cols, 2003). Además el receptor de LIF (gp130/LIFR) se expresa también transitoriamente en las células basales, en los axones de las neuronas en degeneración y en macrófagos infiltrados en el estroma. Se ha descrito que los

macrófagos pueden infiltrarse en el epitelio como respuesta a un daño y fagocitar las ORNs en apoptosis las cuales secretan citoquinas como LIF, promoviendo así el desarrollo de nuevas neuronas (Susuki y cols, 1995; Nan y cols, 2001). Recientemente se ha sugerido que la disminución de macrófagos en el epitelio olfatorio produce un incremento de la muerte neuronal y una disminución de la neurogénesis (Borders, 2007). Involucrando a LIF en la proliferación de las células basales y la inhibición de la diferenciación de las ORNs *in vitro* e *in vivo* (Nan y Getchell, 2001).

Resultados de nuestro laboratorio indican que el óxido nítrico (NO), actúa como un agente mitógeno de los precursores neuronales, por lo que podría ser uno de los segundos mensajeros involucrados en los efectos proliferativos de LIF. El NO es un radical libre, producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), a partir del aminoácido L-arginina. Se han descrito 3 isoformas de esta enzima, la isoforma inducible (iNOS), la cual es independiente de la concentración intracelular de calcio, la isoforma epitelial (eNOS) y la isoforma neural (nNOS), ambas dependientes de calcio. Resultados preliminares muestran que luego de dañar el epitelio olfatorio mediante la aplicación intranasal de ZnSO₄, iNOS se expresa en forma transitoria en las células basales y en las células del estroma, que podrían corresponder a las células gliales que rodean los axones de las ORNs o a macrófagos infiltrados del estroma. Además observamos que en cultivos primarios de precursores neuronales, una baja expresión de iNOS se correlaciona con una baja proliferación celular. La inhibición de la iNOS y nNOS induce una disminución de la proliferación de las células precursoras, efecto opuesto al provocado por el NO exógeno. Esa idea es apoyada por el hecho que el curso temporal de la expresión de LIF y su

receptor, la localización de este último, y su efecto proliferativo sobre las células basales coinciden con lo observado por nosotros para iNOS.

En el sistema inmune y otros sistemas la expresión de iNOS es inducida por citoquinas, entre ellas LIF, a través de la vía JAK/STAT (Kleinert H y cols, 2003). Así mismo, se ha descrito que LIF ejerce el efecto proliferativo y anti-diferenciativo en el epitelio olfatorio mediante la cascada de transducción JAK/STAT3. (Moon y cols, 2002).

Con estos antecedentes se puede postular que LIF induce la expresión de la iNOS, lo cual posteriormente llevaría a una producción de NO por los precursores neuronales (figura 3). Esta memoria de título se enfocará en determinar si LIF induce la expresión de iNOS en precursores neuronales del epitelio olfatorio.

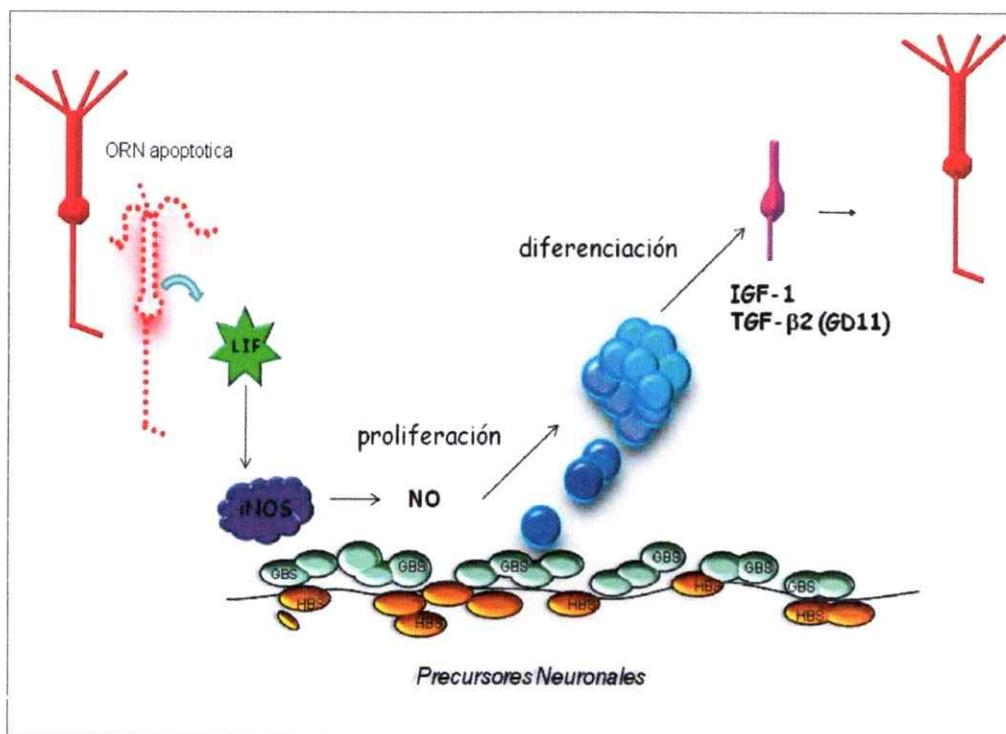


Figura 3. Modelo propuesto para el efecto de LIF en los precursores neuronales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. HIPOTESIS

LIF induce la expresión de iNOS en los precursores neuronales del epitelio olfatorio

B. OBJETIVO

General

Determinar si LIF induce la expresión de iNOS durante la neurogénesis en el epitelio olfatorio *in vitro*.

Específicos

- 1) Optimizar los métodos de cultivos primarios de precursores neuronales de epitelio olfatorio, purificación de RNA y RT-PCR
- 2) Determinar si los precursores neuronales expresan el receptor de LIF (LIF-R) *in vitro*
- 3) Determinar si LIF induce la expresión de iNOS en los precursores neuronales *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

1. Animales y Cultivo celular

Los precursores neuronales fueron obtenidas a partir de cultivos primarios de epitelio olfatorio de ratas macho (20 a 30 días) los cuales fueron cultivados 5 días en medio DMEM/F12 con ITS (insulina-transferrina-selenio) suplementado con EGF 25ng/ μ L. También se utilizó la línea celular OLF 442, derivadas de precursores neuronales de ratón, obtenidas desde el laboratorio del Dr. Mackay-Sim, Brisbane, Australia. Estas células

fueron cultivadas en medio DMEM/F12 + FCS (suero fetal bovino) al 10% a 37°C (MacDonald y cols, 1996).

2. Ácidos Nucleicos

Como estándar de tamaño molecular se utilizó Bench top 100pb Ladder (Promega), dNTP 100mM (Invitrogen), Hexameros (Amersham). Los Partidores utilizados para las reacciones de PCR fueron fabricados por Integrated DNA Technologies (IDTdna) a través de la empresa Fermelo (tabla 1). El kit utilizado para la purificación de RNA fue RNeasy Kit y RNase-free Dnase (Qiagen).

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Función
LIF-RECEPTOR(LIR-r) forward	GGAGAAAGGTTCTTCAAACAGCAG	Partidor
LIF-RECEPTOR (LIF-r) reverse	CTCAGTGTCTTCTGGGATATGTCAG	Partidor
iNOS forward	CTTTCTGGCAGCAGCGGCTC	Partidor
iNOS reverse	GCTCCTCGTAAGTTCAGC	Partidor
YWHAZ forward	GTCATCTTGGAGGGTCGTCT	Partidor, control de carga
YWHAZ reverse	GCTTCTTGGTATGCTTGCTGT	Partidor, Control de carga

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en cada uno de los pasos especificados.

3. Enzimas

Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: SuperScript II Reverse Transcriptase, Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen), Dispasa II (Boeringer).

4. Inmunofluorescencia.

Los anticuerpos utilizados y su función se detallan en la tabla 2.

Nombre	Descripción	Marca	Función
LIF-R	LIF-R ratón	Sigma	Anticuerpo primario
iNOS	iNOS conejo	Sigma	Anticuerpo primario
cabra anti-ratón	cabra anti-ratón alexa 488nm, verde	Molecular Probes	Anticuerpo secundario
cabra anti-conejo	cabra anti-conejo alexa 594nm, rojo	Molecular Probes	Anticuerpo secundario

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en cada uno de los pasos especificados

Métodos

Estandarización de Técnicas

1. Cultivo celular

Para realizar el cultivo celular se extrajo la mucosa olfatoria septal de cuatro ratas machos de 20 a 30 días, el tejido obtenido se lavó 3 veces en solución salina Hank's (Invitrogen), se incubó con la enzima Dispasa II por 45 minutos a 37°C y posteriormente se separó el epitelio de la lámina propia raspando con una espátula fina. Las células epiteliales obtenidas se disociaron mecánicamente con una pipeta de aspiración y se centrifugaron por 5 minutos a 300xg. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio DMEM/F-12 con ITS y EGF 25 ng/ μ L, se plaquearon a una concentración de 5.000 células por placa de 35 mm (8.8 cm²), fueron crecidas por 5 días con cambio de medio al tercer día. En estas condiciones el cultivo consta principalmente de precursores

neuronales y en un menor grado de células troncales y células de soporte (Feron y cols, 1999).

Las células OLF 442 son células inmortalizadas derivadas de precursores neuronales de ratón, las cuales fueron utilizadas para estandarizar los métodos de extracción de RNA.

Conteo de Células.

Las células del epitelio olfatorio fueron crecidas en dos tipos de placas. Las placas utilizadas fueron 1.9 mm (cuatro pocillos) (Nunc) y de 35mm (Nunc). Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss OX10 VERT 200M) con un objetivo de 10x. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, con el promedio de las células, tomando en cuenta cuatro cuadrantes.

Para calcular el número de células obtenidas se ocuparon las siguientes formulas.

$$\frac{\text{numero de células}}{\text{numero de cuadrantes}} \times 10^{-2} = X \times 10^6 \frac{\text{cel}}{\text{mL}}$$

$$\frac{\text{numero de } \frac{\text{cel}}{\text{mL}}}{\text{superficie (cm}^2\text{)}} = X \times \frac{10^6 \text{ cel}}{\text{mL}}$$

Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas con el test de t-student, considerandose un p-value de $p < 0,05$ como nivel de significancia. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 4.0.3 (GraphPad Software Inc).

2. Extracción de RNA

Debido a bajo número de células obtenidas desde los cultivos primarios de precursores neuronales de epitelio olfatorio, elegimos un método de extracción de RNA que permitiera obtener RNA en mayor cantidad y calidad. Se probaron tres protocolos distintos: Schomzysky-Sashi, Trizol y RNeasy mini kit. Para probar los protocolos se utilizó la línea celular OLF442, la cual permite obtener un gran número de células en un corto tiempo. Las células OLF442 fueron cultivadas en placas de 35 mm hasta confluencia y cosechadas con tripsina-EDTA 10X. Las células colectadas fueron centrifugadas a 300xg por 5 minutos y se tomaron 1×10^6 células para la realización de cada protocolo.

a. Método de Schomczysky-Sashi

Las células OLF442 fueron centrifugadas y se agregó 500 μ L de solución de Schomczysky (solución D +151 μ L de β -mercapto etanol; acetato de Na 2M pH 4,0; fenol ácido, para 10mL: 1mL: 10mL respectivamente), más 5 μ L de perlas de vidrio. (Por cada 50 mL de solución D, se agregaron 360 μ L de β -mercapto etanol). Se agitó a velocidad máxima por 5 minutos, luego se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 0,2 μ L de cloroformo (0,2 mL por cada 1 mL de solución de Schomczysky), se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se lavó con fenol: cloroformo (desde este punto en adelante todo estuvo tratado con DEPC), para luego centrifugar a 10.000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa obtenida a un tubo limpio y se agregaron un volumen de isopropanol. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó

nuevamente por 10 minutos a 4°C y el precipitado obtenido fue lavado con etanol al 75% y secado por 1 hora a 37°C. El RNA obtenido se resuspendió en 40 µL de agua tratada con DEPC y fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

b. Método de Trizol

Las células fueron colectadas y homogenizadas en presencia de 1 mL de Trizol, luego se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió 0,2 mL de cloroformo por 1 mL de Trizol. Las muestras fueron transferidas a un tubo limpio y se agitó por 15 s, se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, posteriormente se centrifugó 12.000xg por 2 a 3 minutos. Esta centrifugación separó una fase roja fenol-cloroformo, una interface y una fase superior transparente donde se encontraba el RNA. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el RNA de la fase acuosa con alcohol isopropílico (se usó 0,5 mL de alcohol isopropílico por 1 mL de Trizol), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, para posteriormente centrifugar a 12.000xg por 10 minutos a una temperatura entre 2 a 8°C. Se descartó el sobrenadante, el precipitado obtenido fue lavado con etanol al 75% (se agregó 1 mL de etanol por cada 1 mL de Trizol), y se centrifugo a 7.500xg por 5 minutos. Finalmente el precipitado fue resuspendido en 40 µL de agua DEPC. El RNA obtenido fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

c. Método Qiagen RNeasy mini Kit.

Se agregó a cada muestra 200 μL de buffers RTL (10 μL de B-mercaptoetanol/mL de RTL), luego las muestras se pasaron por una aguja 20g 10 veces, se agregó etanol al 70 % (grado biología molecular en H_2O libre de RNasa), se transfirió a las columnas RNeasy en tubos de 2 mL y se centrifugó a por 15 s a 13.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, luego se lavó dos veces con buffers RW1 por 15 s a 13.000 rpm y se incubó por 15 minutos con DNasa 1. Posteriormente se lavó la columna con buffer RW1 a 13.000 rpm por 15 s y con buffer RPE dos veces a 13.000 rpm por 15 s y 2 minutos, respectivamente. Finalmente, se eluyó el RNA en 40 μL de agua RNasa-free (del kit) centrifugando 1 minuto a 13.000 rpm.

Para todos los métodos de extracción de RNA se cuantificó la cantidad de RNA por espectrofotometría a 260 nm y la calidad de los RNA obtenidos por la relación 260/280 utilizando el equipo Shimatzu UV 150-02 Spectrophotometer. También se chequeo la calidad de los RNA por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3. Síntesis de cDNA a partir de RNA

A partir de los RNA obtenidos se realizó la síntesis de cDNA. Para esto se utilizó la siguiente mezcla:

Hexámeros (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1 μL
DNTP's (10mM)	2 μL
H_2O	3 μL
RNA (1000 ng)	20 μL

Se Completó hasta un volumen de 26 μL , luego incubó a 65°C por 10 minutos y transfiriéndose inmediatamente a hielo donde se agregó lo siguiente:

5x first strand buffers	8 μL
0,1 M DTT	4 μL
RNasin 40U/ μL	1 μL
Transcriptasa reversa 200 U/ μL	1 μL

Se obtuvo un volumen final de 40 μL , el cual se incubó por 1 hora a 42°C, y luego a 75°C por 10 minutos para inactivar la transcriptasa reversa.

4. Reacción de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó la siguiente mezcla, la reacción fue llevada a cabo en termociclador (Applied Biosystems 2027). Como control de carga se utilizó partidores YWHAZ (proteína de activación zeta péptido tirosina 3-monooxygenasa/triptófano 5-monooxygenasa)

H ₂ O	12,56 μL
MgCl ₂ (50mM)	1 μL
10x PCR rxn buffers	2 μL
Primers forward (10mM)	0,8 μL
Primers reverse (10mM)	0,8 μL
DNA (400 ng)	2 μL
TAq 5U/ μL	0,2 μL

Los ciclos de amplificación utilizados para los distintos partidores se detallan en la tabla 3.

LIF-R	iNOS	YWHAZ
94°C → 5 min	94°C → 5 min	94°C → 5 min
94°C → 30 seg	94°C → 30 seg	94°C → 30 seg
59°C → 30 seg	65°C → 30 seg	55°C → 30 seg
72°C → 30 seg	72°C → 30 seg	72°C → 30 seg
72°C → 10 min	72°C → 10 min	72°C → 10 min
} 40 ciclos	} 40 ciclos	} 40 ciclos

Tabla 3. Programa de amplificación por PCR para los partidores utilizados.

5. Electroforesis de Ácidos nucleicos

Tanto las moléculas purificadas de RNA, como los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con et-brx, se utilizó buffer de carga 6x (0,25% de bromofenol, 30% de glicerol, 15% de ficoll) para cada una de muestras y como buffer de corrida se utilizó TAE 1x (44,5 nM ácido bórico, 44,5 nM Tris, 1M EDTA, pH 8.0). La cuantificación se realizó por densitografía óptica utilizando el software NIH Image J (Rasband, 1997) los resultados fueron expresados como porcentaje de expresión, respecto al control de carga \pm SEM. Para determinar diferencias significativas entre los grupos se utilizo el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, se consideraron diferencias significativas a un valor de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 4.0.3 (GrapdhPad Software Inc).

6. Inmunofluorescencia

Se crecieron cultivos primarios de epitelio olfatorio de rata, en cubreobjetos circulares de vidrio cubiertos con colágeno IV (5ug/mL). Después de los respectivos tratamientos, las células fueron fijadas con PFA al 4% en PBS y lavadas 3 veces con PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente los cubreobjetos fueron incubados en solución de bloqueo (2% BSA, 10% suero normal de cabra 5%, 0,1 tritón x-100 en PBS) por 1 h, seguido de los anticuerpos primarios anti LIF-R (1:250) e iNOS (1:125) por toda la noche. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario cabra-anti-ratón (alexa 488 verde) 1:500 y cabra anti-conejo (alexa 594 rojo) 1:500 por 1 hora en oscuridad, para finalmente hacer una tinción nuclear con Dapi 1:7000. Las muestras fueron montadas con Fluoromount (Electron Microscopy Sciences) y observadas con un objetivo de 40x en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss OX10 VERT 200M.

7. Protocolo Experimental

Expresión de LIF-R e iNOS en presencia de LIF

Para determinar la expresión de LIF-R e iNOS en presencia de LIF, los cultivos primarios fueron crecidos por 5 días en medio DMEM/F-12 con ITS y EGF 25 ng/ μ L; posteriormente se reemplazó el EGF por LIF 20 ng/ μ L y se incubó por 24 h. Después del tratamiento con LIF, las células fueron colectadas y se analizó la expresión de LIF-R e iNOS por RT-PCR e inmunofluorescencia, según lo descrito en Materiales y Métodos.

RESULTADOS

1. Estandarización de cultivo primario

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los precursores neuronales obtenidos en el cultivo primario de epitelio olfatorio de rata, las células se crecieron en dos tipos de placas, y se comparó la cantidad de células que se obtuvo en cada caso. Los resultados del conteo de células se muestran en la tabla 4.

Los resultados obtenidos mostraron que en la placa de 35mm (Nunc) crece un mayor número de células por cm^2 que en la placa de 4 pocillos, la cantidad de células obtenidas en la placa de 35mm es alrededor de 4,5 veces más que en la placa de 4 pocillos (grafico I, $p < 0,05$). Por lo tanto se eligió este tipo de placa para realizar los cultivos primarios y así poder tener una mayor cantidad de células.

Cultivo	Placa de 4 pocillos		Placa 35mm	
	cel/mL	cel/ cm^2	cel/mL	cel/ cm^2
1	42.500	16.776	142.500	97.159
2	62.500	4.112	115.000	6.534
3	45.000	5.921	207.500	23.579
4	32.500	4.276	127.500	16.776
promedio	45.625	7.771	148.125	36.012
desviación estándar	12.479	6.059	41.149	41.362
error estándar de la media	3.120	1.515	10.287	10.341

Tabla 4. Datos obtenidos del conteo de células

Por otra parte, se observó que las células que crecieron en la placa de 35 mm tienden a crecer juntas, formando aglomeraciones, en cambio en la placa de cuatro pocillos solamente se encuentran células en forma discreta y en menor cantidad (figura 4, n= 4).

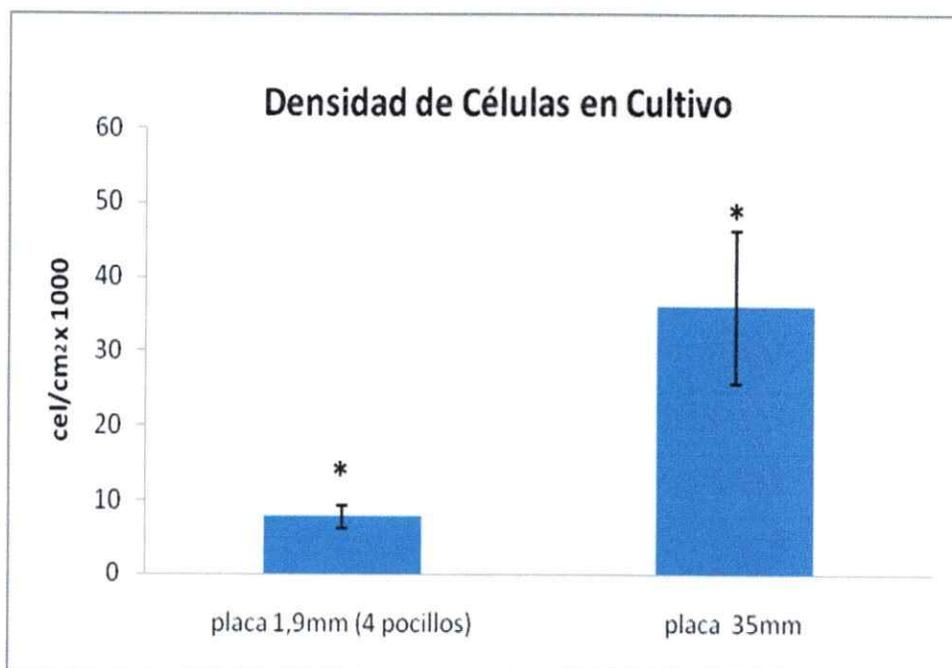


Grafico I. Cantidad de células por cm² para las placas de 1,9 mm (4 pocillos) y 35 mm respectivamente. * significativamente diferentes, p<0,05 test de t-Student

(a)

(b)

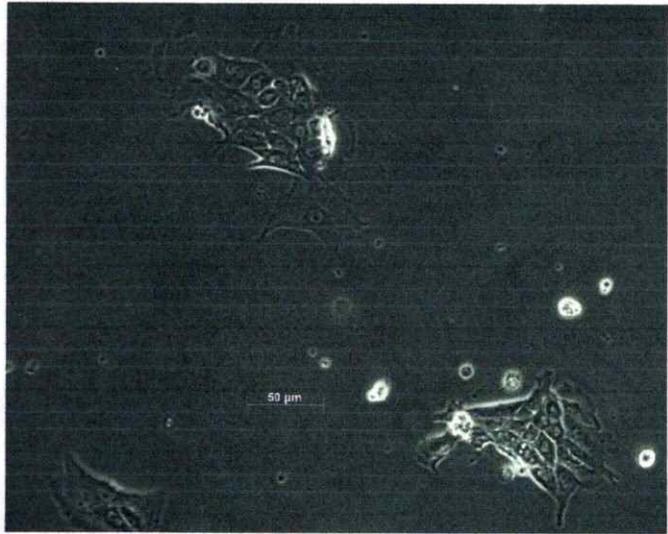
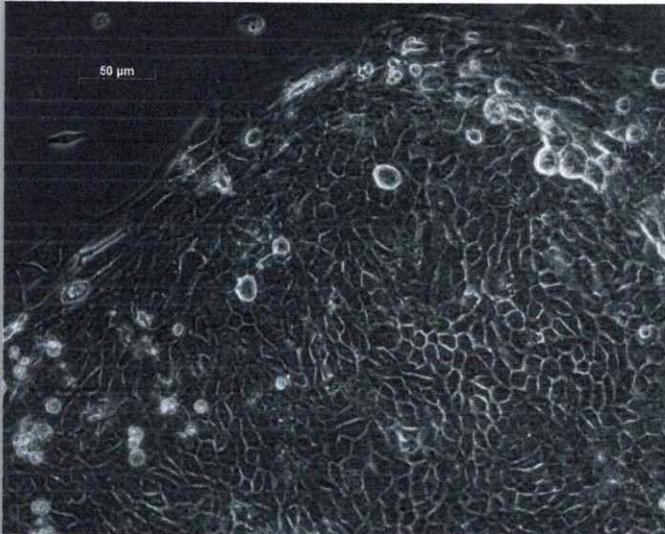


Figura 4. Cultivo primario de epitelio olfatorio de rata, 5 días de cultivo en medio con EGF (25 ng/ μ L). (a) Placa de 35 mm, (b) Placa de 1,9 mm (4 pocillos). Barra: 50 μ m

2. Purificación de RNA

Debido a que la cantidad de células obtenidas a través de este tipo de cultivo es baja, (aproximadamente 40.000 células), se realizaron extracciones por 3 métodos distintos, de manera de determinar con cuál de estos se obtenía la mayor cantidad de RNA; el método de Schomzysky-Sashi; extracción por Trizol y extracción por Qiagen RNeasy mini Kit. Los RNA obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría a 260 nm y su fueron chequeados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Muestra	Absorbancia 260nm	Concentración de RNA (ng/ μ L)
Qiagen RNeasy mini Kit	0,253	1.012
Trizol	0,094	376
Schomzysky-Sashi	0,092	368

Tabla 5. Concentración de RNA obtenida a través de los distintos métodos de extracción.

Las mayores cantidades de RNA fueron obtenidas a través de la extracción por Qiagen RNeasy mini Kit, que fue alrededor de 3 veces la cantidad de RNA obtenida por el método de Schomzysky-Sashi y por el método del Trizol. Se analizó la presencia de DNA genómico en las muestras de RNA por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los resultados muestran que en la extracción por Schomzysky-Sashi y Trizol contenían contaminaciones con DNA genómico y no se observó la presencia de bandas ribosomales debido a la baja concentración obtenida. En el caso de extracción por Qiagen RNeasy mini Kit, no contenían contaminación por ADN genómico, y se observaron bandas ribosomales (figura 5). Por lo tanto, la extracción por kit fue elegida para las posteriores purificaciones de RNA.

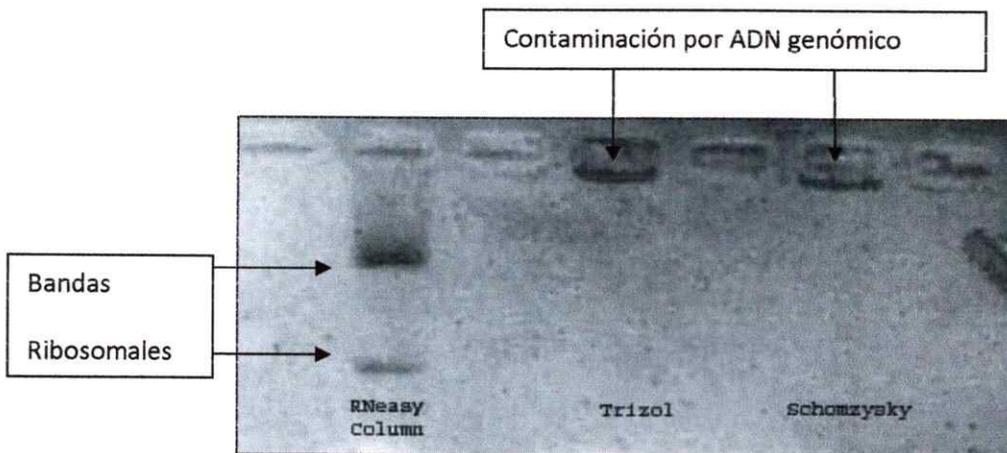


Figura 5. Purificación de RNA por 3 métodos distintos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3. Estandarización de RT-PCR

Para llevar a cabo la transcripción reversa y la amplificación por PCR se probaron distintas mezclas de los reactivos utilizados, de manera de optimizar ambas reacciones. Para la transcripción reversa el criterio utilizado fue la obtención de aproximadamente 1.000 ng de cDNA. El cDNA obtenido se midió por espectrofotometría a 260 nm; la relación 260/280 debía estar entre 1,5-2,0. Bajo estos criterios se utilizó la reacción que se encuentra descrita en la sección 2 de Materiales y Métodos.

Para la reacción de PCR se probaron distintos volúmenes de reacción y distintas concentraciones de magnesio de manera de optimizar la amplificación. Las concentraciones de cDNA de también fueron analizadas. Finalmente se utilizó una concentración final de magnesio de 25 μ M y aproximadamente 400 ng de cDNA, para un volumen final de reacción de 20 μ L; esta reacción esta descrita en la sección 2 de Materiales y Métodos.

4. Determinación de la expresión de LIF-R en presencia de LIF.

Para determinar la presencia del receptor de LIF en cultivos primarios de epitelio olfatorio de rata, se crecieron las células en tres condiciones experimentales: medio mínimo (DMEM/F-12 + ITS); medio mínimo con EGF 25 ng/μl; medio mínimo con LIF 20 ng/μl por 24 horas. Las células fueron colectadas y se extrajo el RNA utilizando el kit RNeasy. Se estudió la expresión de LIF-R por RT-PCR utilizando partidores específicos (tabla 1). Como control de carga se utilizaron partidores para YWHAZ (proteína de activación zeta péptido tirosina 3-monooxygenasa/triptófano 5-monooxygenasa, gen house-keeping). Los resultados muestran que en los cultivos tratados con ITS y EGF no se expresa el LIF-R, en cambio los cultivos tratado con LIF (20 ng/μl) se observó una leve expresión del receptor (figura 6). La cuantificación de los resultados mostró que la expresión de LIF-R para los tres tratamientos fue: $22,92 \pm 6,5\%$ medio mínimo; $20,99 \pm 3,7\%$ para medio con EGF y $45,28 \pm 6,8$ para medio con LIF. Se observó una tendencia al aumento de la expresión de LIF-R en presencia de LIF en relación a los tratamientos controles, (medio mínimo y medio con EGF; Gráfico II, n=4).

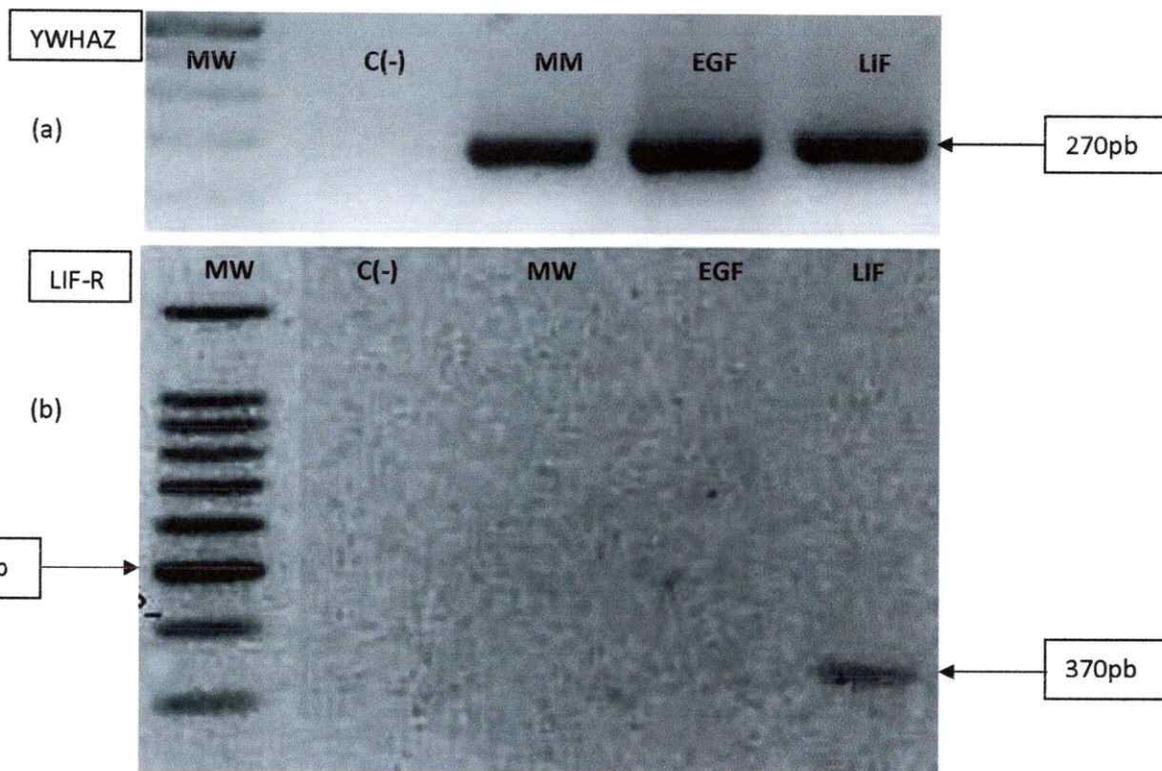


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. (a) Control de carga. RT-PCR con partidores para YWHAZ. (b) RT-PCR con partidores para LIF-R, para tratamientos por 24 horas. Medio mínimo, EGF y LIF.

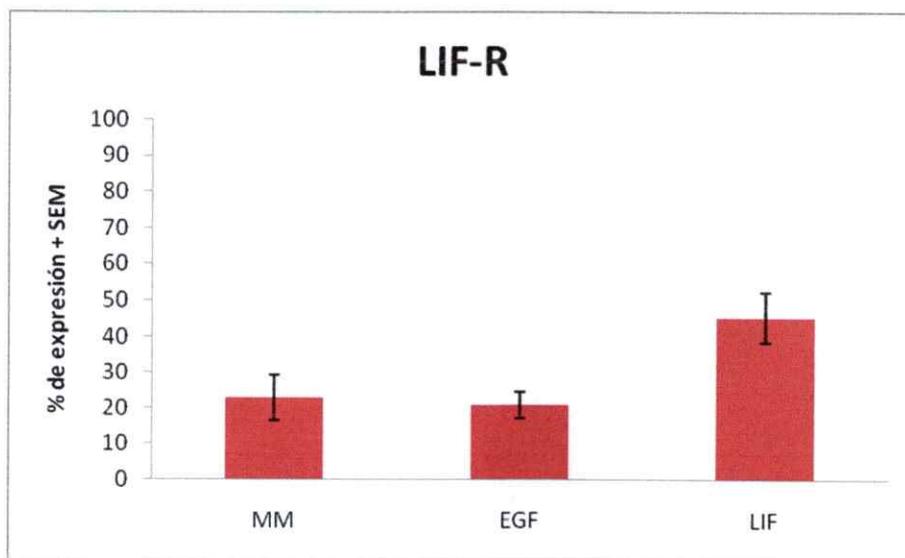


Grafico II. Porcentaje de expresión de LIF-R con respecto al control de carga (YWHAZ), para 3 tratamientos: MM: medio mínimo; EGF y LIF. Sin diferencias significativas entre los grupos.

5. Expresión de iNOS en presencia de LIF.

Para determinar si LIF induce la expresión de iNOS, se realizaron cultivos primarios de epitelio olfatorio de rata, los cuales fueron crecidos por 24 horas en 3 medios diferentes, medio mínimo (DMEM/F-12 + ITS), medio mínimo con EGF (25 ng/ μ l), y medio mínimo mas LIF (20 ng/ μ l). Se extrajo el RNA de las células colectadas utilizando el Kit RNeasy, la expresión de iNOS se determino por RT-PCR ocupando partidores para iNOS (tabla 1), como control de carga se ocuparon partidores para YWHAZ. Los resultados mostraron una débil expresión de iNOS en cultivos que fueron tratados por 24 horas con medio mínimo y con EGF (figura 7), en cambio el cultivo que fue tratado con LIF, mostró una mayor expresión de iNOS (figura 7). La cuantificación de este aumento determinó que el aumento de la expresión en cada uno de los tratamientos fue la siguiente: 28, 61 \pm 6,7% medio mínimo; 63,01 \pm 8,4 medio con EGF y 95,48 \pm 3,8% medio con LIF, observándose un aumento en la expresión de iNOS de 70,4% en relación al cultivo control crecido en medio mínimo (grafico III, n= 4).

6. Detección de iNOS y LIF-R por inmunofluorescencia.

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por RT-PCR, se estudió la expresión de LIF-R e iNOS por inmunofluorescencia indirecta. Los cultivos primarios de epitelio olfatorio de rata fueron crecidos en cubreobjetos de vidrio cubiertos con colágeno IV y crecidos por 24 horas con: medio mínimo (DMEM/F-12 + ITS); medio mínimo con EGF (25 ng/ μ l); medio mínimo más LIF (20 ng/ μ l). Posteriormente las células fueron fijadas con PFA 4% en PBS por 5 minutos y se realizó un doble marcaje con anticuerpos para LIF-R e iNOS. Los resultados fueron analizados en el microscopio invertido de epifluorescencia (Carl Zeiss OX10 VERT 200M) ocupando el objetivo de 40x. Al igual que lo obtenido en los experimentos de RT-PCR; se observó una débil tinción en las células crecidas en medio mínimo y medio con EGF (figuras 8a y 8 b). En los cultivos tratados con LIF, en cambio se observó una fuerte tinción para iNOS y LIF-R (figura 9).

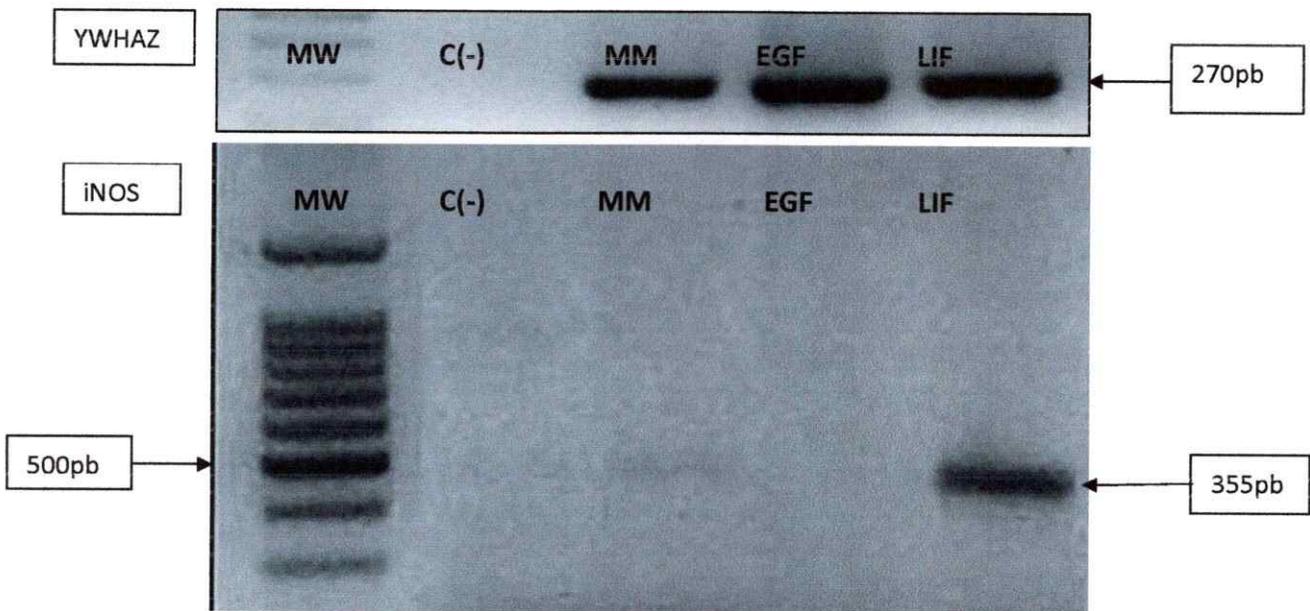


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 2%. (a) control de carga RT-PCR con partidores para YWHAZ. (b) RT-PCR con partidos para iNOS para 3 tratamientos medio mínimo, EGF y LIF.

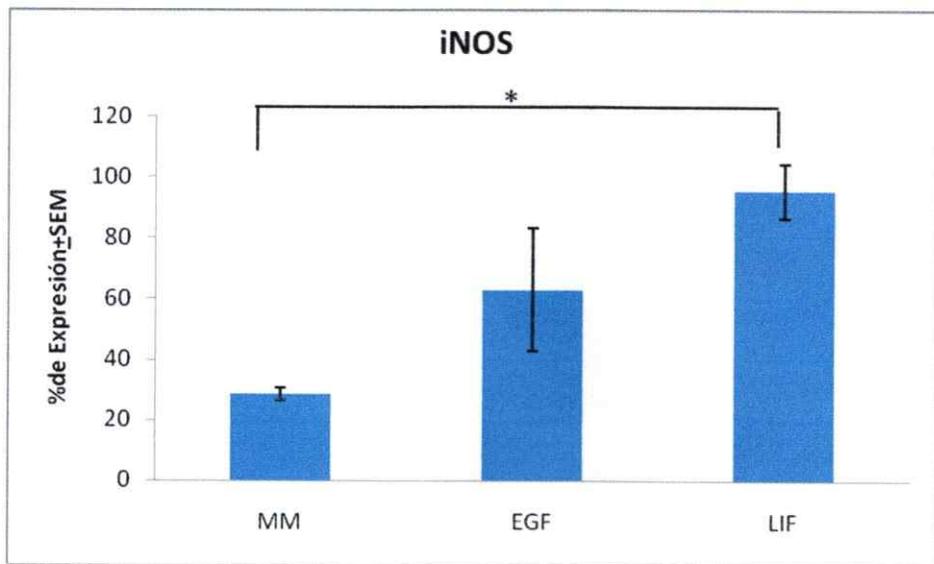


Grafico III. Porcentaje de expresión de iNOS en relación al control de carga (YWHAZ), para 3 tratamientos: MM: medio mínimo; EGF y LIF. * diferencias significativas entre los grupos, $p < 0,05$, ANOVA.

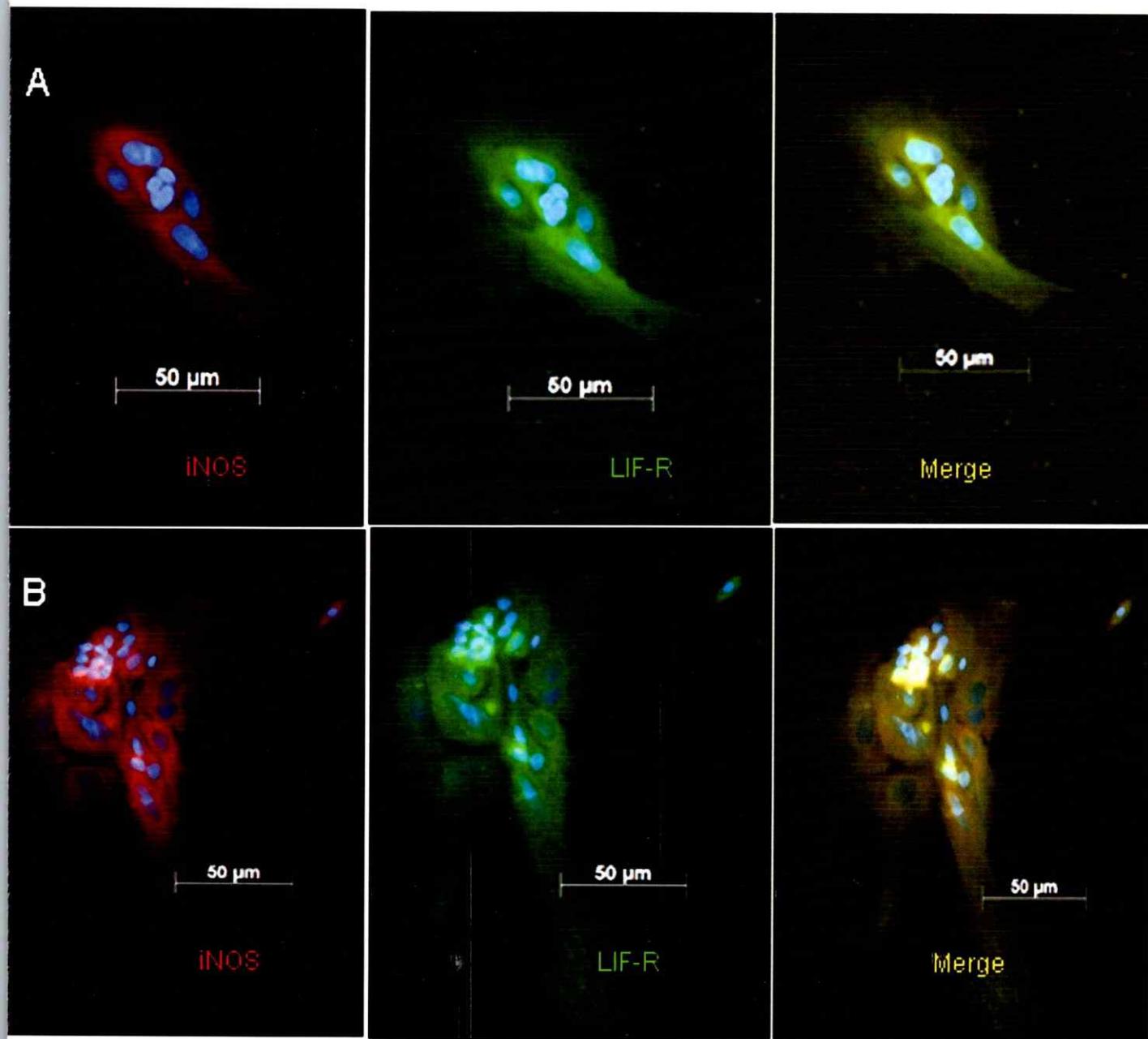


Figura 8 :Inmunofluorescencia con doble marcaje para iNOS en rojo y LIF-R en verde. A. Medio Mínimo B. Medio con EGF (25ng/ul).Azul, tinción nuclear con DAPI. Aumento 40x.

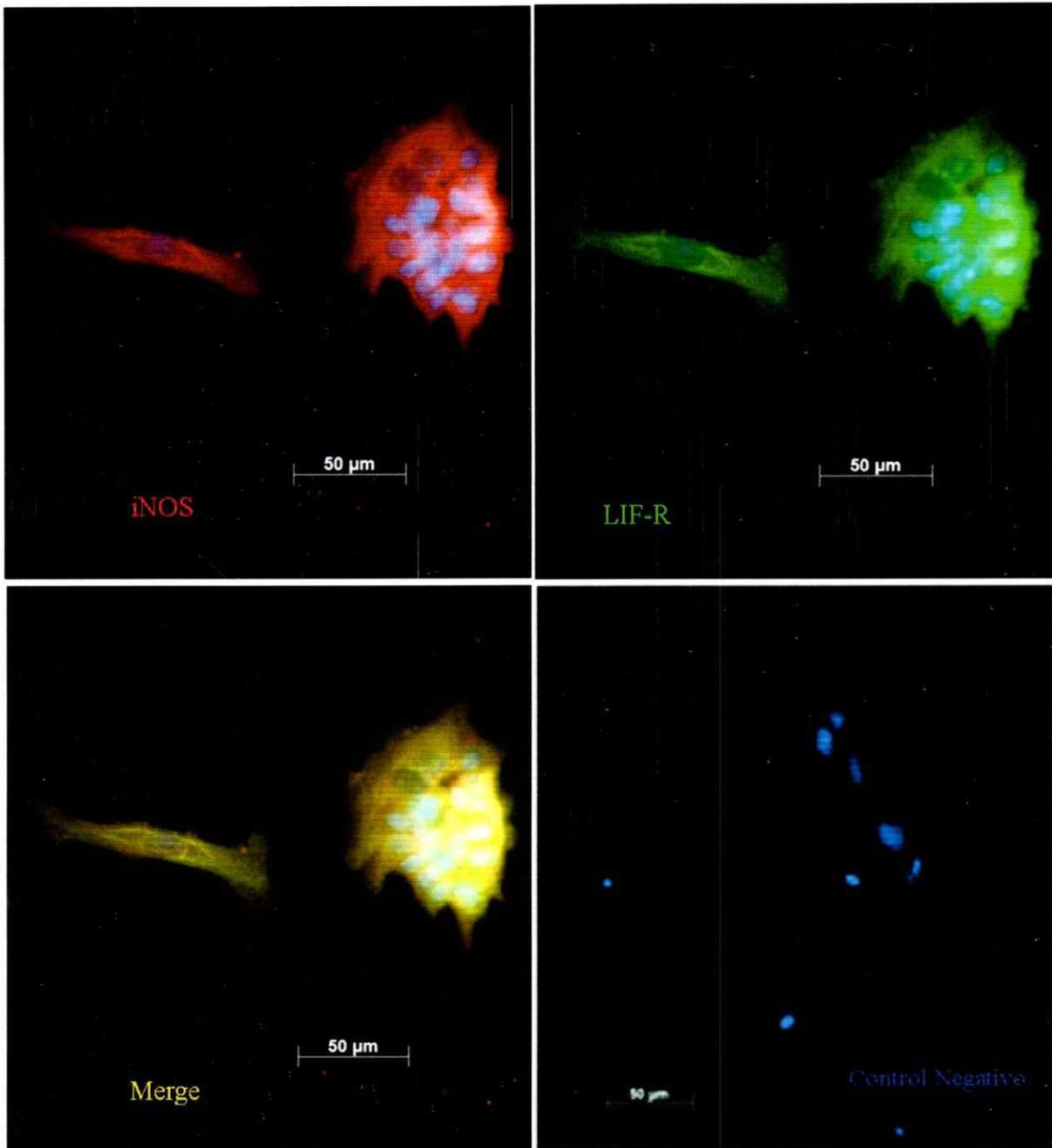


Figura 9: Inmunofluorescencia con doble marcaje; iNOS en rojo y LIF-R en verde, de cultivos tratados con LIF (20ng/uL) por 24 horas. Azul tinción nuclear con DAPI. Aumento 40x

DISCUSION

La vía por la cual se produce la generación de nuevas neuronas en el epitelio olfatorio en animales adultos es un proceso complejo, que involucra una gran cantidad de factores, los cuales deben actuar concertadamente de manera de hacer que los precursores neuronales proliferen y posteriormente se diferencien, dando origen a nuevas neuronas olfatorias.

En este trabajo analizamos la participación de una citoquina, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) en la neurogénesis en el epitelio olfatorio. Este factor sería liberado por las neuronas apoptóticas y difundiría hacia las capas basales del epitelio, estimulando la proliferación (Getchell y cols, 2002). LIF, al igual que lo que se observa en el sistema inmune, induciría la expresión de iNOS. Esta enzima a su vez genera óxido nítrico, promoviendo la proliferación de los precursores neuronales.

En este trabajo primeramente optimizamos el cultivo celular de precursores primarios, de forma de obtener la mayor cantidad de células de donde extraer RNA. Para esto las células fueron cultivadas en dos tipos de placas, placa de 35mm y placa de 4 pocillos (1,9mm por pocillo). Los resultados muestran que la mayor cantidad de células fueron obtenidas en la placa de 35 mm. Esto podría deberse a que este tipo de placa presenta una mayor superficie donde las células pueden adherirse y crecer en forma de cúmulos de células. En cambio, la placa de 1,9 mm presenta una menor superficie, por lo cual el crecimiento de las células solo se produce en forma aislada, sin la formación de cúmulos. Además las citoquinas y factores de crecimiento que están involucrados en el

desarrollo neuronal pueden ser secretados por las células precursoras, particularmente el LIF aplicado endógenamente en cultivos de neuroesferas produce que estas células secreten más LIF de manera que esta citoquina puede actuar sobre las misma célula o sobre células vecinas por un mecanismo autocrino/paracrino. Este mecanismo de acción podría explicar el crecimiento en cúmulos observado en los cultivos de precursores neuronales, particularmente este tipo de crecimiento es observado en los tratamientos con LIF (figura 9) (Baver, Kerr y Patterson 2007).

Luego elegimos un método de extracción de RNA de alta eficiencia, ya que los cultivos primarios de precursores neuronales se obtienen en un número reducido de células, era necesario obtener la mayor cantidad de RNA y de la mejor calidad posible. Se probaron 3 métodos de extracción. Los mejores resultados se obtuvieron con el Kit de extracción Qiagen RNeasy, por lo tanto éste fue el elegido para ser usado en los experimentos posteriores.

De acuerdo a la hipótesis de este trabajo, si LIF induce la expresión de iNOS, los precursores neuronales debieran expresar el receptor de LIF. Los resultados obtenidos con RT-PCR indicaron que los cultivos primarios de precursores neuronales crecidos en los medios controles (medio mínimo y con EGF) muestran una expresión basal del mensajero de LIF-R (21% con respecto al control de carga) y que en presencia de LIF su expresión tiende a aumentar a $45,28 \pm 6,8\%$. Además, bajo estas condiciones experimentales, se detectó la expresión de LIF-R por inmunofluorescencia, lo que confirma que el receptor se encuentra presente en las membranas celulares de los cultivos de precursores neuronales.

Los resultados obtenidos por RT-PCR para iNOS indican que en presencia de LIF se induce un gran incremento en la expresión de esta proteína ($95,48 \pm 3,8$ % de aumento, $p < 0,05$). Este resultado fue corroborado a través de doble inmunofluorescencia, en la cual se observó una marca de gran intensidad para iNOS, en relación a los tratamientos controles utilizados (figura 8 y 9) confirmando que LIF aumenta la expresión de iNOS a nivel de la proteína.

Además, se observó que los cultivos tratados con medio mínimo y con medio con EGF son positivos para iNOS y LIF-R, aunque las marcas obtenidas en estos casos fueron tenues, lo que hace suponer que existiría una expresión basal de ambas proteínas, y que en presencia de LIF aumentan su expresión.

Los resultados obtenidos en esta memoria de título sugieren que el LIF induce la expresión de la iNOS y que este evento podría desencadenar posteriormente la proliferación de los precursores neuronales a través del incremento de los niveles de óxido nítrico. Por lo tanto en este trabajo hemos encontrado evidencias que sugieren la vía por la cual LIF induciría la proliferación de los precursores neuronales en el epitelio olfatorio.

CONCLUSIÓN

El LIF induce la expresión de iNOS en los precursores neuronales de epitelio olfatorio. Esto podría tener gran relevancia ya que iNOS y el óxido nítrico participan en la neurogénesis del epitelio, induciendo la proliferación de los precursores neuronales. Por lo tanto en este trabajo hemos encontrado evidencias que sugieren que el óxido nítrico puede ser un elemento río abajo de la acción de LIF, activando la proliferación de los precursores neuronales del epitelio olfatorio.

REFERENCIAS

Altman J, Das GD. (1965) .Autorradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogénesis inrats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.

Aaron S, Bordes, Marilyn L. (2007). Macrophage depletion in the murine olfactory epithelium leads to increased neuronal death and decreased neurogenesis. *J. of comparative neurology* 501:206-218.

Baver S, Kerr j, Patterson P. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, diases and injury. *Nature reviews*, volume 8: 221-232

Bauer S, Rasika S, Han J, Mauduit C, Raccurt M, Morel G, Jourdan F, Benahmed M, Moyses E, Patterson PH (2003).Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci.* 23:1792-1803.

Cameron HA, McKay R (1998) Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 8: 677-680.

Dannette J, Nicolay, J Ronald, and Adil J(2006). Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Celular and Molecular Neurobiology*, 26:803-821.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317.

Ferón F, Mackay-Sim A, Andrieu JL, Matthaei KI, Holley A, Sicard G (1999) Stress induces neurogenesis in nonneuronal cell cultures of adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 88: 571-583.

Getchell TV, Shah DS, Partin JV, Subhedar NK, Getchell ML. (2002) Leukemia inhibitory factor mRNA expression is upregulated in macrophages and olfactory receptor neurons after target ablation. *J Neurosci Res*;67 (2):246-254.

Getchell M.L., H Li, R.A. Vaishnav, A.S. Borders (2006). Temporal gene expression profiles of target-ablated olfactory epithelium in mice with disrupted expression of scavenger receptor A: Impact on macrophages. *Physiol Genomics* 27:245-263.

Gould E, Tanapat P (1997). Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80: 427-436. ,

- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3168-3171.
- Graziadei PP (1973). Cell dynamics in the olfactory mucosa. *Tissue Cell* 5: 113-131.
- Graziadei PP, Levine RR, Monti Graziadei GA (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 4: 713-727.
- Harding J, Graziadei PP, Monti Graziadei GA, Margolis FL (1977) Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res.* 132 :11-28.
- Hatta T, Moriyama K, Nakashima K, Taga T, Otani H (2002). The Role of gp130 in cerebral cortical development: in vivo functional analysis in a mouse exo utero system. *J Neurosci.* 22:5516-5524.
- Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld MG (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature.* 419:934-939.
- Iwai N, Zhou Z.(2008). Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 26:1298-1306.
- Kim EJ, Simpson PJ, Park DJ, Liu BQ, Ronnett GV, Moon C. (2005). Leukemia inhibitory factor is a proliferative factor for olfactory sensory neurons. *Neuroreport.* 16:25-28. Erratum in: *Neuroreport.* 2005;16:311.
- Kim SJ, Chun JY, Kim MS.(2000). Insulin stimulates production of nitric oxide via ERK in osteoblast cells.*Biochem Biophys Res Commun.* 27:712-718.
- Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* 384:1343-1364.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90:2074-2077.
- MacDonald, K. P., Mackay-Sim, A., Bushell, G. R., and Bartlett, P. F. (1996). Olfactory neuronal cell lines generated by retroviral insertion of the n-myc oncogene display different developmental phenotypes. *J Neurosci Res* 45, 237-47.
- Mackay-Sim A.(1999). Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Progress in Neurobiology* 62 (2000) 527-559.

McCurdy R, Feron F, McGrath and Mackay-Sim A. Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I (2001). *European Journal of Neuroscience* 22:1581-1588.

Moon C, Yoo JY, Matarazzo V, Sung YK, Kim EJ, Ronnett GV. (2002). Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;99:9015-9020.

Moulton DG (1974). Dynamics of cell populations in the olfactory epithelium. *Ann N Y Acad Sci* 237: 52-61.

Murrell W, Feron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. (2005). Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn.* 233:496-515.

Nan B, Getchell ML, Partin JV, Getchell TV (2001). Leukemia inhibitory factor, interleukin-6, and their receptors are expressed transiently in the olfactory mucosa after target ablation. *J Comp Neurol.*;435:60-77.

Newman MP, Feron F, Mackay-Sim A (2000). Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience.* 99:343-350.

Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB (1996). Expression of EGFR-, p75NGFR-, and PSTAIR (cdc2)-like immunoreactivity by proliferating cells in the adult rat hippocampal formation and forebrain. *Dev Neurosci* 18: 199-209.

Pays L, Schwarting G. (2000) Gal-NCAM is a differentially expressed marker for mature sensory neurons in the rat olfactory system. *J Neurobiol*; 43:173-185.

Pitman M, Emery B, Binder M, Wang S, Butzkueven H, Kilpatrick TJ (2004). LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal. *Mol Cell Neurosci.* 27:255-266.

Rasband, W S, ImageJ, U. S. National institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255:1707-1710.

Seroogy KB, Gall CM, Lee DC, Kornblum HI (1995). Proliferative zones of postnatal rat brain express epidermal growth factor receptor mRNA. *Brain Res* 670: 157-164.

Shimazaki T, Shingo T, Weiss S (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.*21:7642-7653.

Suzuki Y, Takeda M, Farbman AI. 1995. Phagocytic cells in the rat olfactory epithelium after bulbectomy. *Exp Neurol* 136:225-233.