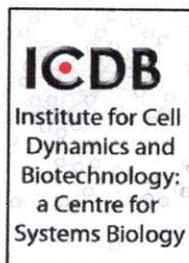


UCH-FC
MAG-BMCN
L864
C.21

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología



***Papel de LIF en la Proliferación
de Precursores
Neuronales de Epitelio Olfatorio de
Rata Adulta.***

Estefanía María Belén López Arenas



Directores de Tesis: Lorena Sülz Echeverría
 Juan Bacigalupo Vicuña

Facultad de ciencias
Universidad de Chile
Informe de Aprobación
Tesis de Magister

Se informa a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

Estefania Maria Belen Lopez Arenas

Ha sido aprobado por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, el Examen de Defensa privada de Tesis Rendido el día 30 de Agosto del 2010.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña



Dra. Lorena Sulz Echeverría



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez



Dra. Verónica Palma



Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi hija Helena que es la antorcha que ilumina cuando me encuentro en la oscuridad, el sol que me despierta en la mañana y la fortaleza que tengo para caminar por esta larga vida.

Una lagartija sobre el tejado

¿Quién le dio alas para volar?



Biografía



Mi ciudad natal está muy lejos de aquí en un pueblo pequeño donde el sol alumbra todos los días y la brisa del mar refresca por la tardes. Estudie en mi querido colegio Santa Maria de La Ligua, hasta 4° medio, luego ingrese al programa de Bachillerato de la Universidad de Chile y continué mis estudios en Ingeniería en Biotecnología Molecular la cual termine el año 2008.

Para poder continuar con mi perfeccionamiento entre al programa de Magister con mención en Ciencias Biológicas como una manera de dilucidar mis inquietudes científicas y además estudiar más profundamente el tema que me interesaba que es la neurogénesis en estados adultos.



Agradecimientos

Agradezco a Juan y Lorena por guiarme y apoyarme en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mi familia por su cariño incondicional y a mis amigos por estar siempre a mi lado.

Agradezco Dios por su infinita sabiduría, muchas gracias a todos los que estuvieron conmigo.

Beca tesista Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología

Proyecto MIDEPLAN ICM P05-001-F.

Proyecto Fondecyt 1100682



Resumen

La generación de nuevas neuronas se denomina neurogénesis. En individuos adultos este proceso ocurre sólo en lugares específicos del sistema nervioso, tales como el hipocampo, la zona subventricular (SVZ) y el epitelio olfatorio. En este último, el proceso de neurogénesis involucra la proliferación de precursores neuronales que provienen de las células troncales que se encuentran en la capa basal del epitelio, estos precursores migran y se diferencian hasta neuronas sensoriales maduras. Se han identificado diferentes factores involucrados en la neurogénesis, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). El LIF es una citoquina hematopoyética que ha sido implicada en la regeneración del epitelio olfatorio estimulando la proliferación de los precursores neuronales. Resultados obtenidos con cultivos primarios de precursores neuronales del epitelio olfatorio indican que LIF actuaría aumentando la expresión de iNOS, sugiriendo que el óxido nítrico (NO) podría ser un segundo mensajero de LIF. El objetivo de esta tesis fue determinar si LIF estimula la proliferación de los precursores neuronales y células troncales del epitelio olfatorio, a través de un aumento de la expresión de iNOS. Como modelo experimental se utilizaron cultivos de células derivadas de neuroesferas. En estas células se evaluó la expresión de iNOS, además de la proliferación y diferenciación celular en respuesta a LIF. Nuestros resultados indican que las células derivadas de neuroesferas, expresan el receptor de LIF (LIFR) e iNOS en respuesta al tratamiento con LIF. Además LIF incrementa en 26% la proliferación celular en comparación a los tratamientos controles, efecto que es revertido por la inhibición de la vía LIF-LIFR-iNOS y es rescatado con NO exógeno. También se evaluó el efecto de LIF sobre la diferenciación celular, encontrándose que LIF no tiene un papel claro en la diferenciación hacia un destino celular determinado, como son neuronas o glías, lo que confirma que esta citoquina actúa principalmente promoviendo la proliferación celular. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que LIF actúa a través de la inducción de iNOS con el consiguiente aumento de NO, estimulando la proliferación de los precursores neuronales del epitelio olfatorio.



Abstract

The generation of new neurons is called neurogenesis. This process only occurs in specific locations in adult nervous system, such as the hippocampus, the subventricular zone (SVZ) and the olfactory epithelium. In this latter tissue, neurogenesis regulation by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and leukemia inhibitory factor (LIF) has been reported. LIF is a hematopoietic cytokine that has been implicated in the regeneration of the olfactory epithelium, stimulating neuronal precursor cells proliferation. Results obtained with neural precursors in primary cultures indicate that LIF induces iNOS expression, suggesting that NO may be a second messenger of LIF signalling. The aim of this thesis was to determine whether LIF increases the neural precursor cell proliferation in the olfactory epithelium, through stimulation of iNOS expression. The neurosphere culture assay was used as experimental model, and LIF effects over iNOS expression, cell proliferation and cell differentiation were evaluated. Under LIF treatment, the neurospheres derived cells expressed LIF receptor (LIFR) and iNOS. Also, LIF increased in 26% cell proliferation compared to the control cells, inhibition of the LIF-LIFR-iNOS pathway decreased cell proliferation, an effect that reverted by a nitric oxide donor. We also evaluated LIF effects over cell differentiation, finding no clear effect of LIF over the differentiation to a particular cell fate, such as neurons or glia, confirming that this cytokine acts primarily promoting cell proliferation. Taking all together, the results of this thesis strongly suggest that LIF acts inducing iNOS expression, with the consequent increase of NO, stimulating olfactory epithelium neural precursor cell proliferation.



Índice

Resumen	2
Abstract	3
1.-Antecedentes Bibliográficos	11
1.1.-Marco teórico	11
2.-Hipótesis	16
3.-Objetivos	16
4.-Materiales	17
4.1.-Cultivo celular	17
4.2.-Ácidos Nucleicos	17
4.3.-Enzimas	18
4.4.-Inmunofluorescencia.	18
5.-Métodos	19
5.1.-Cultivo de Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta	19
5.2.-Extracción de RNA por RNeasy mini Kit.	21
5.3.-Síntesis de cDNA a partir de RNA.....	22
5.4.-Reacción de PCR.....	22
5.5.-Electroforesis de Ácidos Nucleicos	23
5.6.-Protocolos de Inmunofluorescencia.....	23
a)Inmunofluorescencia Indirecta.....	23
b)Inmunofluorescencia BrdU	24
c)Inmunofluorescencia por Citometría de Flujo	24
5.7.-Protocolos Experimentales.....	25
a)Análisis de Células derivadas de Neuroesferas.	25
b)Análisis de SOX-2 en presencia de LIF por RT-PCR ; Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo.....	25
d)Análisis de la Expresión de iNOS bloqueando la vía LIF-LIFR-iNOS.	26
e)Curso temporal de la expresión de iNOS en presencia de LIF	27
f)Efecto de LIF sobre la Proliferación de Células derivadas de Neuroesferas	27
g)Efecto de LIF sobre la Diferenciación de las Células derivadas de Neuroesferas...	28
6.-Resultados	30
6.1.-Obtención de Células derivadas de Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta.....	30
6.2.-Análisis de la Expresión de SOX-2 en Células derivadas de Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta.	32
6.4.-Expresión temporal de iNOS mediada por LIF.....	38
6.5.-Análisis de la expresión de iNOS bloqueando la vía LIF-LIFR-iNOS.....	40
6.5.-Efecto de LIF sobre la Proliferación de Células derivadas de Neuroesferas.....	41
7.- Discusión	49
8.- Referencias.	54



Figuras

- Figura 1. Epitelio olfatorio, esquema que muestra los diferentes tipos celulares que conforman este tejido pseudoestratificado.* 10
- Figura 2. Modelo de diferenciación de las células precursoras basales en el epitelio olfatorio.* 11
- Figura 3. Inducción de iNOS por la citoquina LIF. Esquema representativo del mecanismo de acción de LIF mediante la vía JAK/STAT3.* 13
- Figura 4. Expresión de iNOS inducida por LIF en el epitelio olfatorio. Esquema representativo de la Hipótesis.* 14
- Figura 5. Método de obtención de Neuroesferas en Cultivos de Precursores Neuronales de Rata adulta.* 20
- Figura 6. Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta. Contraste de fase 20X.* 29
- Figura 7. Comparación entre Células derivadas de Neuroesferas y la Línea Celular OLF 442. Contraste de fase 40X.* 30
- Figura 8. Análisis FACs de Células derivadas de Neuroesferas.* 31
- Figura 9. Expresión de SOX-2 mediada por LIF. Inmunofluorescencia con anti-SOX-2 (violeta), tinción nuclear con DAPI (azul).* 32
- Figura 10. Expresión de SOX-2. Cuantificación de inmunofluorescencias.* 32
- Figura 11. Expresión celular SOX-2 por Citometría de Flujo.* 33
- Figura 12. Expresión de LIFR inducida por LIF. Inmunofluorescencia con anti-LIFR (verde); tinción nuclear con DAPI (azul).* 34
- Figura 13. Expresión de iNOS inducida por LIF. Inmunofluorescencia con anti- iNOS (rojo), tinción nuclear con DAPI (azul).* 35
- Figura 14. Coexpresión de LIFR e iNOS en tratamiento con LIF. Inmunofluorescencia con anti- iNOS (rojo) y anti-LIFR (verde); tinción nuclear con DAPI (azul).* 35
- Figura 15. Expresión de iNOS y electroforesis en gel de agarosa al 2%.* 35

<i>Figura 16. Gráfico de cuantificación de los mRNA de LIFR inducida por LIF.</i>	36
<i>Figura 17. Gráfico de cuantificación de los mRNA de iNOS inducida por LIF.</i>	36
<i>Figura 18. Expresión de iNOS por Citometría de Flujo.</i>	37
<i>Figura 19. Expresión de iNOS a 0, 6, 12 y 24 horas de tratamiento con LIF. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.</i>	38
<i>Figura 20. Gráfico de la cuantificación de los mRNA de la expresión temporal de iNOS en presencia de LIF.</i>	38
<i>Figura 21. Curso temporal de la expresión de iNOS. Inmunofluorescencia con anti-iNOS (rojo), tinción nuclear con DAPI (azul).</i>	39
<i>Figura 22. Efecto del anticuerpo bloqueador de LIFR sobre la expresión de iNOS. Inmunofluorescencia con anti-iNOS (rojo) y anti-LIFR, tinción nuclear (DAPI).</i>	39
<i>Figura 23. Gráfico de proliferación temporal inducida por LIF, resultados obtenidos por conteo celular.</i>	40
<i>Figura 24. Inmunofluorescencia con anti Brdu (verde), tinción nuclear con DAPI (azul).</i>	41
<i>Figura 25. Efecto de la Alteración de la vía LIF-iNOS-NO sobre la Proliferación de las Células derivadas de Neuroesferas. Inmunofluorescencia con anti Brdu(verde), tinción nuclear con DAPI (azul).</i>	42
<i>Figura 26. Gráfico de la Cuantificación Proliferación en las Células tratadas con LIF y con Inhibidores de la vía LIF-iNOS-NO.</i>	43
<i>Figura 27. Expresión de los mRNA de TUB-β3 y GFAP por RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.</i>	44
<i>Figura 28. Gráfico de cuantificación de la expresión de los mRNA de TUB-β3 y GFAP.</i>	45
<i>Figura 29. Efecto de LIF sobre la diferenciación de las Células derivadas de Neuroesferas. Inmunofluorescencia contra TUB-β3 (verde) y GFAP (rojo).</i>	46
<i>Figura 30. Porcentaje de Expresión de Marcadores de Diferenciación en Células derivadas de Neuroesferas. Cuantificación de los resultados obtenidos por Citometría de Flujo.</i>	47
<i>Figura 31. Expresión de Marcadores de Diferenciación en Células derivadas</i>	



<i>de Neuroesferas. Cuantificación de los resultados obtenidos por Citometría de Flujo.</i>	47
Tablas	
<i>Tabla 1. Partidores utilizados en las reacciones de PCRs.</i>	17
<i>Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunofluorescencias.</i>	18
<i>Tabla 3. Anticuerpos Secundarios utilizados en las inmunofluorescencias.</i>	18
<i>Tabla 4. Ciclos de amplificación por PCR para los partidores de LIF-R, iNOS y YWHAZ.</i>	25
<i>Tabla 5. Ciclos de amplificación por PCR para los partidores de TUB-β3, GFAP y YWHAZ.</i>	28
<i>Tabla 6. Porcentaje de proliferación inducido por LIF.</i>	42
<i>Tabla 7. Porcentaje de expresión para marcadores de diferenciación neuronales (TUB-B3) y glial (GFAP).</i>	43

Abreviaturas

ADN	: Ácido desoxiribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
BDNF	: Factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro
BSA	: Suero albúmina de bovino
BrdU	: 5-Bromo-2-deoxyuridine
CNTF	: Factor neurotrófico ciliar
CK-14	: Citokeratina 14
CT-1	: Cardiotrofina-1
DEPC	: Dietil pirocarbonato
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
Et-brx	: Bromuro de etidio
FGF-2	: Factor de crecimiento fibroblástico 2
FCS	: Suero fetal bovino
GBC	: Células Globosas Basales
GFAP	: Proteína ácida Fibrilar Glial
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	: Óxido nítrico
NOS	: Óxido nítrico sintasa
eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial
iNOS	: Óxido nítrico sintasa inducible
nNOS	: Óxido nítrico sintasa neural
NGF	: Factor de crecimiento nervioso
NT-3	: Neurotrofina 3
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
SOX-2	: Región marcadora de sexoY-box 2
TβIII	: Tubulina específica neuronal
TGF-β2	: Factor de crecimiento transformante β2
YWHAZ	: Proteína de activación zeta péptido tirosina 3- monooxygenasa/triptófano 5-monooxygenasa .
ZSV	: Zona subventricular

1.- Antecedentes Bibliográficos

1.1.- Marco teórico

El proceso de generación de nuevas neuronas se denomina neurogénesis. Este proceso ocurre activamente en estadios tempranos del desarrollo y va disminuyendo a medida que los individuos llegan a la adultez. Sin embargo, en el sistema nervioso existen zonas que conservan la capacidad neurogénica, tales como el hipocampo, la zona subventricular (ZSV) y el epitelio olfatorio. (Altman y cols., 1965; Erikson y cols., 1998; Gould y cols., 1998; Graziadei, 1973; Moulton, 1974; Graziadei y cols., 1979).

El epitelio olfatorio es un epitelio pseudoestratificado, compuesto por varios tipos celulares como células basales, encargadas de la regeneración del tejido, las células de soporte o sustentaculares y las Neuronas Receptoras Olfatorias (ORNs). Las ORNs se encuentran en contacto directo con el medio externo, lo que las hace susceptibles de daño por componentes tóxicos del medio ambiente, y requieren ser reemplazadas constantemente. Las células troncales responsables de este recambio se encuentran en las capas basales del epitelio, las cuales proliferan, migran y se diferencian a neuronas olfatorias adultas (Figura 1). Las células troncales basales son multipotenciales, es decir, pueden dar origen a varios tipos celulares del sistema nervioso como son las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos.

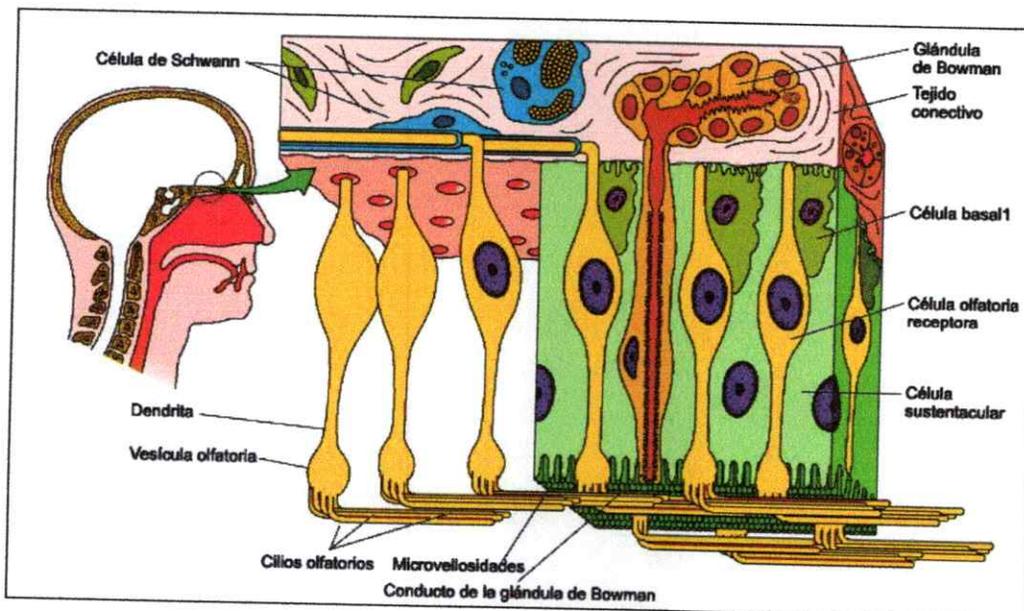


Figura 1. Esquema del epitelio olfatorio Humano. Se representan los diferentes tipos celulares que conforman el epitelio pseudoestratificado. Células Basales; Células Sustentaculares; Células Receptoras Olfatorias. (Modificado de e-ciencias.com).

En cultivo, las células troncales neuronales pueden formar neuroesferas. Estas son colonias de células en suspensión derivadas de una única célula troncal, las que presentan características típicas de las células troncales, como son autorrenovación y multipotencialidad (Reynolds y Weiss, 1992). Los ensayos de neuroesferas han sido ampliamente utilizados en el estudio de la biología de las células troncales neuronales en mamíferos adultos (Kinoshita y cols., 2009; Murrell y cols., 2005; Palma y cols., 2005).

En el epitelio olfatorio se han identificado dos tipos de células basales responsables del recambio celular, las células basales horizontales (HBC) y las células basales globosas (GBC). Se ha descrito a las HBC como las células troncales del epitelio olfatorio. Este tipo celular daría origen a las GBC, las que posteriormente se diferenciarían a neuronas olfatorias, células glandulares y células de soporte. (Figura 2) (Iwai y Zhou, 2008).

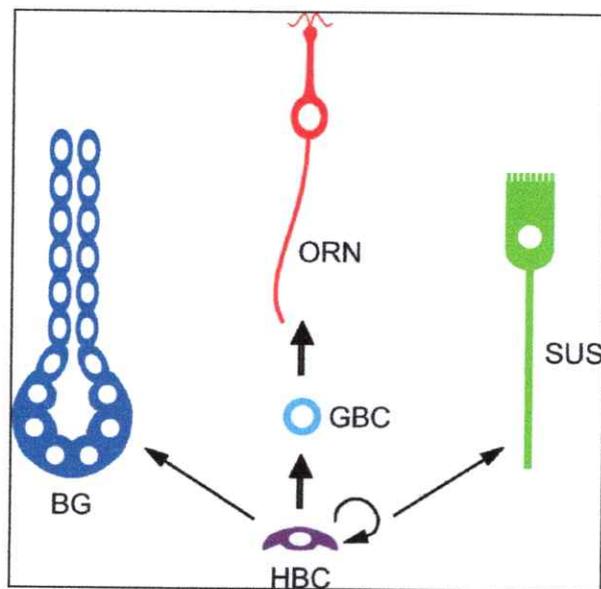


Figura 2. Modelo de Diferenciación en el epitelio olfatorio. Las células horizontales basales (HBS) dan origen a los tipos celulares del epitelio olfatorio. BG: células de Bowman; GBS: células basales globosas; ORN: neurona receptora olfatoria; SUS: células sustentaculares (Iwai y Zhou, 2008).

Existen diversos factores que participan en el proceso de neurogénesis en el epitelio olfatorio y que regulan los procesos de proliferación y diferenciación de los precursores neuronales. Entre los factores involucrados en procesos proliferativos se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), Sonic Hedgehog (Shh) (Ruiz i Altalba y cols., 2002) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), este último es liberado por las neuronas

de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), Sonic Hedgehog (Shh) (Ruiz i Altalba y cols., 2002) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), este último es liberado por las neuronas olfatorias en apoptosis (Getchell y cols., 2002). 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) han sido relacionados con los procesos de diferenciación.

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 la Cardiotrofina-1 (CT-1) y a Oncostantina (OnM). Todas estas citoquinas comparten la subunidad GP-130 en sus co-receptores. Se han descrito efectos contradictorios del LIF sobre las células troncales neurales. Por una parte, se ha reportado que LIF (o CNTF) actúa directamente sobre las células troncales neurales de embriones de ratón induciendo su diferenciación hacia astrocitos e inhibiendo la formación de neuroesferas (Pitman y cols., 2004; Hermanson y cols., 2002). También la vía de señalización de LIF ha sido implicada en la proliferación de las células troncales nerviosas. En la ZSV de 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).

En el epitelio olfatorio, LIF ha sido relacionado con la mantención y la proliferación de los precursores neuronales. En experimentos realizados *in vivo* en donde se daña el epitelio olfatorio, ya sea de forma física, química o por bulbectomía, la expresión de LIF es inducida rápidamente en macrófagos infiltrados y en las ORNs (Bauer y cols., 2003; Getchell y cols., 2002), lo que resulta en un aumento de la neurogénesis en el epitelio dañado (Takaki y cols., 2006). Consecuente con esto, el receptor de LIF es expresado por las células basales del epitelio olfatorio (Kim y cols., 2005). Experimentos *in vitro* muestran que el tratamiento con LIF induce la proliferación de los precursores neuronales del epitelio olfatorio (Sato y Yoshida 1997; Kim y cols., 2005). Estos antecedentes indican que el LIF sería producido por las neuronas olfatorias en apoptosis, estimulando la proliferación de las células progenitoras neuronales como parte de un mecanismo de reparación en respuesta al daño.

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. 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 (Figura 3) (Kleinert y cols., 2003). Así mismo, se ha descrito que LIF induce la proliferación e inhibe la diferenciación celular en el epitelio olfatorio mediante la cascada de transducción JAK/STAT3. (Moon y cols., 2002).

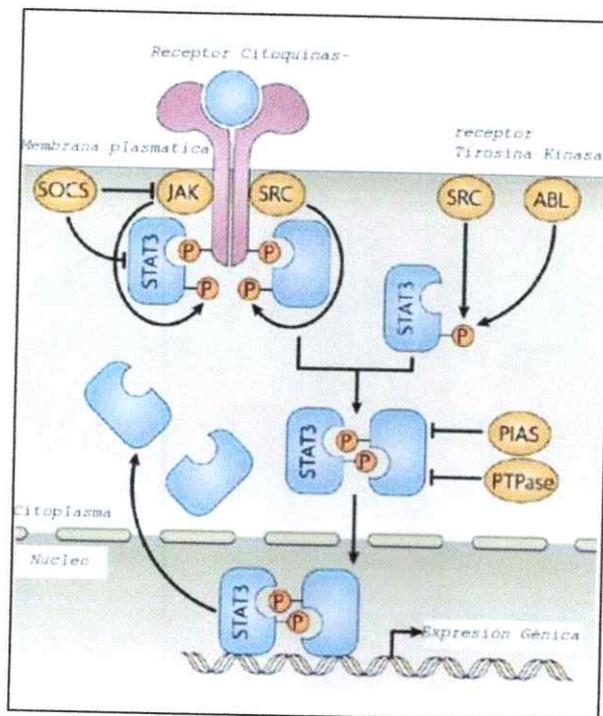


Figura 3. Vía de transducción de la familia de citoquinas IL-6. LIF actúa mediante la vía JAK/STAT-3, en el cual al entrar en contacto con el receptor de citoquina, se activa la proteína JAK, este a su vez fosforila a STAT-3, la que dimeriza y se transloca al núcleo, activando la expresión de iNOS. (Patanias LC, 2005).

Resultados de nuestro laboratorio indican que el óxido nítrico (NO) actúa como un agente mitógeno de los precursores neuronales olfatorios (Sulz y cols., 2009), por lo que podría ser uno de los segundos mensajeros involucrados en los efectos proliferativos de LIF. Además, en cultivos primarios de precursores neuronales, una baja expresión de iNOS se correlaciona con una baja proliferación celular. La inhibición de la iNOS induce una disminución de la proliferación de las células precursoras, efecto opuesto al provocado por el NO exógeno (Sulz y cols., 2009). Estudios preliminares muestran que luego de dañar el

epitelio olfatorio mediante la aplicación intranasal de $ZnSO_4$, la 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 (no mostrado).

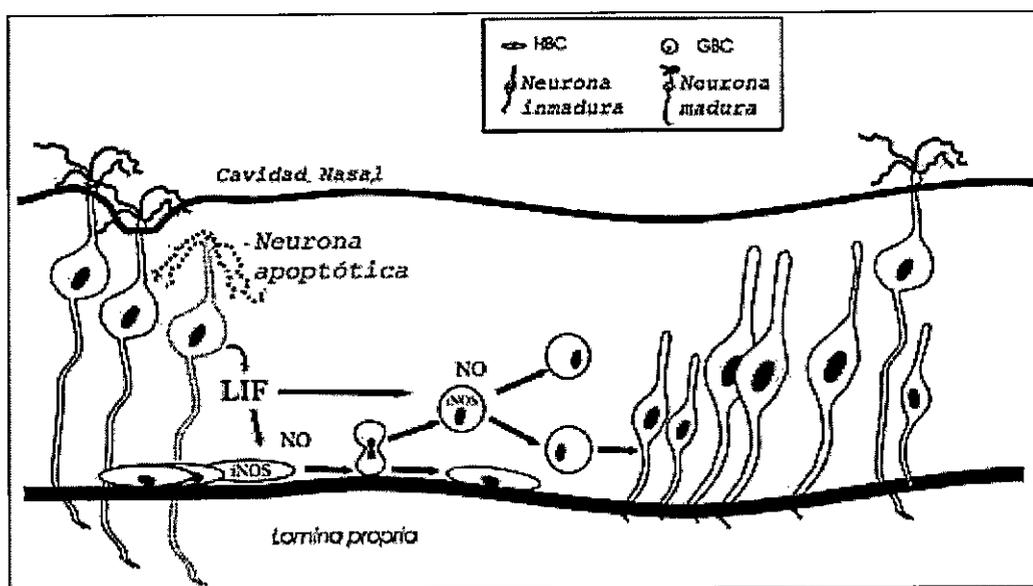


Figura 4. Expresión de iNOS inducida por LIF en el epitelio olfatorio. LIF sería liberado por las neuronas en apoptosis, difundiendo hasta las capas basales del epitelio donde activaría la expresión de iNOS. (Modificado de Sulz y Bacigalupo, 2006).

El objetivo de esta tesis fue analizar si el LIF induce la proliferación en células derivadas de neuroesferas de rata adulta mediante la inducción de la expresión iNOS (Figura 4). Para esto se utilizaron cultivos de células derivadas de neuroesferas y se analizó si estas células expresan LIFR e iNOS. Además se examinó si las células expresaban marcadores propios de precursores neuronales como SOX-2 (Komitova y cols., 2005). La proliferación celular se estudió por conteo celular y por la incorporación de 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU). Para evaluar el posible papel de LIF en la diferenciación, se analizó la expresión por RT-PCR e inmunofluorescencia de la expresión de TuB- β 3 como marcador de neuronas (Buddensiek y cols., 2010) y de GFAP como marcador de glías (Sievers y cols., 1994).

2.- Hipótesis

LIF Produce un Aumento en la Proliferación Celular en Células Troncales del Epitelio Olfatorio de Rata Adulta mediante la Inducción de la Expresión de iNOS.

3.- Objetivos

1. Determinar si LIF produce un aumento en la proliferación celular mediante la inducción de la expresión de iNOS en cultivos de células derivadas de neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta.
2. Analizar la expresión del marcador de precursores neuronales SOX-2 en células derivadas de neuroesferas de epitelio olfatorio.
3. Analizar la expresión de iNOS utilizando bloqueadores de la vía LIF-LIFR-iNOS.
4. Analizar si LIF tiene algún efecto sobre la diferenciación celular mediante la inducción de iNOS en cultivos de células derivadas de neuroesferas de epitelio olfatorio de rata adulta.

4.- Materiales

4.1.- Cultivo celular

Se utilizaron dos tipos celulares; células derivadas de neuroesferas que fueron obtenidas a partir de cultivos primarios de dos ratas macho de 25 días de edad y la línea celular OLF 442, células derivadas de precursores neuronales de ratón obtenidas desde el laboratorio del Dr. Mackay-Sim, Brisbane, Australia. (MacDonald y cols., 1996). Se utilizó medio de cultivo DMEM/F-12 (Gibco) con ITS 1x (insulina-transferrina-selenio) (Gibco) más Penicilina/estreptomicina (100 mg/mL) (Sigma). Se utilizaron diferentes factores de crecimiento y bloqueadores farmacológicos, los cuales se detallan a continuación.

- a) Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) (Sigma).
- b) Factor de Crecimiento Fibroblástico-2 (FGF-2) (Chemicom).
- c) Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) (Chemicom).
- d) L-NIL Dihydrochloride, inhibidor de la iNOS (Calbiochem).
- e) SNAP, dador de NO (Sigma).
- f) Anticuerpo bloqueador Anti-LIFR (Cabra) (R&D system).

4.2.- Ácidos Nucleicos

Para realizar la extracción de mRNA se utilizó RNeasy mini Kit y RNase-free Dnase ambos Quiagen. Para las síntesis de cDNA y PCR se utilizaron dNTP's 100mM (Invitrogen), Hexameros (Amersham) y H₂O libre de nucleasas (Promega). El estándar de peso molecular que se utilizó en las electroforesis fue Bench top 100pb Ladder (Promega).

Los partidores utilizados para las reacciones de PCR fueron fabricados por Integrated DNA Technologies (IDT Dna) a través de la empresa Fermelo (Tabla 1).

<i>Nombre de Partidor</i>	<i>Función</i>	<i>Secuencia 5'----- 3'</i>
LIF-R	Receptor de LIF	5-GGAGAAAGGTTCTTCAAACAGCAG-3 5-CTCAGTGTCTTCTGGGATATGTCAG-3
iNOS	Oxido Nítrico Sintasa Inducible	5-CTTTCTGGCAGCAGCGGCTC-3 5-GCTCCTCGTAAGTTCAGC-3
YWHAZ	Control de Carga	5-GTCATCTTGGAGGGTCTGTCT-3 5-GCTTCTTGGTATGCTTGCTGT-3
GFAP	Proteína ácida Fibrilar Glial Marcador Glial	5- CCTGGGCTTCTCAACCTGGA-3 5-CTCCACACCAGGCTGCTTGA-3
TUB-β3	Tubulina Beta 3 Marcador Neuronal	5-TGCCCTCACCCAAAGTGTC-3 5-AGGTCCCCGTAGGTGGGTGT-3

Tabla 1. Partidores utilizados para las reacciones de PCRs.

4.3.-Enzimas

En cultivo celular se ocuparon las siguientes enzimas:

- a) Tripsina EDTA (100 mg/mL) (Sigma).
- b) Colagenasa (5 µg/mL) (Sigma).
- c) Dispasa II (10 ng/mL) (Boeringer).
- d) Tryp E (100 mg/mL) (Gibco).

Para la síntesis de cDNA y PCR se utilizaron las enzimas: SuperScript II Reverse Transcriptase, Taq DNA polymerase recombinant ambas Invitrogen, RNAsin (Promega).

4.4.- Inmunofluorescencia.

Para las inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes materiales.

- a) Cubreobjetos circulares y portaobjetos de vidrio.
- b) PFA al 4% en PBS, pH 7,4.
- c) Tampón fosfato salino (PBS).
- d) BSA al 2%, Triton X-100.
- e) Suero de Cabra (Sigma), Suero de Conejo (Sigma), Suero de Burro (Sigma).
- f) Medio de montaje Fluoromont (Electron Microscopy Sciencies)

La Tabla 2 detalla los anticuerpos primarios utilizados y la Tabla 3 detalla los anticuerpos secundarios utilizados.

<i>Nombre</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
α -LIF- R cabra	1:400	R&D-System
α - iNOS Conejo	1:500	Sigma
α -TUB- β 3 Ratón	1:400	Sigma
α -GFAP Conejo	1:1000	Chemicom
α -SoX-2 Conejo	1:200	Chemicom
α -BrdU Ratón	1:200	Dako

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para las inmunofluorescencias.

<i>Nombre</i>	<i>Dilución</i>	<i>Marca</i>
cabra anti-ratón	1:500 Alexa fluor 488	Molecular Probes
cabra anti-conejo	1:500 Alexa fluor 594	Molecular Probes
Burro anti- ratón	1:500 Alexa fluor 488	Molecular Probes
Burro anti-cabra	1:500 Alexa Fluor 488	Molecular Probes

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para las inmunofluorescencias.

5.- Métodos

5.1.- Cultivo de Neuroesferas de Epitelio Olfatorio de Rata Adulta { XE "Cultivo de Neuroesferas de Epitelio Olfatorio de Rata Adulta" }

Para realizar el cultivo de neuroesferas se extrajo la mucosa olfatoria septal de ratas macho de 25 días de edad, el tejido obtenido fue lavado 3 veces con solución salina Hank's (Invitrogen), posteriormente se incubó el tejido con la enzima Dispasa II (10 ng/mL) por 40 minutos a 37°C. Una vez terminada la incubación, el epitelio se raspó con una espátula fina, con el fin de separar las células del epitelio de la lámina propia, las células obtenidas en este proceso se centrifugaron por 5 minutos a 14000 rpm.

Por otro lado la lámina propia se incubó con la enzima colagenasa (5 μ g/mL), a 37°C en agitación por 5 minutos y luego se disoció mecánicamente con una micropipeta (P-1000 Gilson), las células obtenidas se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos.

Las células del epitelio y de la lámina propia se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM/F-12 + FCS al 10% y ambos pellets se juntaron, obteniéndose un volumen de 2 mL, el que se sembró en una placa de 6 pocillos (35 mm por pocillo, (Nunc)). Al día siguiente se sacó 1 mL de la placa y se transfirió a un pocillo continuo para lograr que un mayor número de células se adhieran a la superficie de la placa, y se completó el volumen con medio fresco DMEM/F-12 + FCS al 10 %. Estas células se dejaron crecer a 37 °C con cambio de medio cada 2 o 3 días, hasta confluencia. Una vez confluentes las células fueron cambiadas sucesivamente a botellas de cultivo de 75 mL, 125 mL y 175 mL (Nunc), obteniéndose alrededor de 10×10^6 células.

Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos tratada con poli-lisina (8.3 ng/mL) a una densidad de 400.000 células por pocillo en medio DMEM/F-12 + EGF (50 ng/mL) + FGF-2 (25 ng/mL). En esta etapa luego de aproximadamente 7 días de cultivo se observó la formación de neuroesferas, las que fueron seleccionadas por tamaño (~ 100 μ m) (Deleyrolle and Reynolds, 2009) mediante la succión con una micropipeta (P-200) bajo lupa con un aumento de 4X.

Las neuroesferas colectadas se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos, se incubaron en 500 μ L de la enzima Tryp E (Gibco) por 10 minutos con agitación y luego se disociaron mecánicamente con una micropipeta (P-200), hasta que ya no se observaron conglomerados de células. Las células obtenidas se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos, y se sembraron en una placa de 35 mm (Nunc) en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% para que crecieran nuevamente.

Al llegar a este punto las células completaron alrededor de 2 meses de cultivo, obteniéndose neuroesferas primarias. Para evitar la posible contaminación con otras células fue necesario repetir el proceso de expansión en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% y de selección en medio DMEM/F-12 + EGF 50 ng/mL+ FGF-2 25 ng/mL. En las células utilizadas para los experimentos, el proceso de expansión y de selección se llevó a cabo 3 veces, completándose un tiempo total de cultivo de 9 meses. (Figura 5).

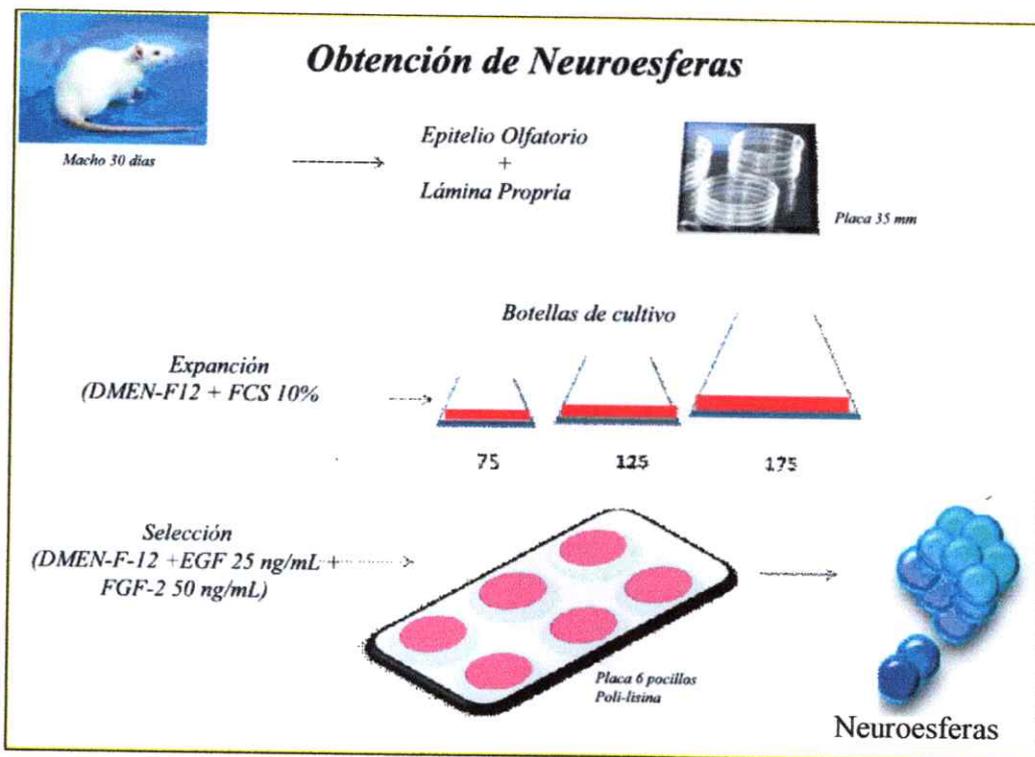


Figura 5. Protocolo de obtención de Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta. A partir de una rata adulta, se aislaron las células del epitelio y de la lamina propia, se realizaron dos etapas; expansión en medio DMEM/F-12 + FCS al 10%: Selección DMEM/F-12 + EGF (50 ng/mL) + FGF-2 (25 ng/mL).

5.2.- Extracción de RNA por RNeasy mini Kit.

A cada muestra de células se le agregó 200 μ L de tampón RTL (10 μ L de B-mercaptoetanol/mL de RTL). Luego las muestras se homogenizaron con repetidos pasajes por una aguja 20 G, se agregó etanol al 70% (grado biología molecular en H₂O libre de RNasa), se transfirieron a las columnas RNeasy en tubos de 2 mL y se centrifugaron por 15 s a 13.000 rpm.

Se descartó el sobrenadante, luego se lavó dos veces con tampón RW1 por 15 segundos 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 segundos y con buffer RPE dos veces a 13.000 rpm por 15 s y 2 minutos, respectivamente. Finalmente, se eluyó el RNA en 40 μ L de agua libre de RNasa (del kit) centrifugando 1 minuto a 13.000 rpm.

degradación de los RNAs obtenidos, estos fueron inmediatamente transcritos a cDNA por transcripción reversa como se describe a continuación.

5.3.- Síntesis de cDNA a partir de RNA

A partir de los RNA obtenidos se realizó la síntesis de cDNA utilizando la siguiente reacción:

- Hexámeros (1µg/µL) 1 µL
- DNTP's (10mM) 2 µL
- H₂O 3 µL
- RNA (1000 ng) 20 µL

Se completó hasta un volumen de 26 µL, luego se incubó a 65°C por 10 minutos y se transfirió a hielo inmediatamente. Posteriormente se realizó la siguiente reacción:

- 5x first strand buffers 8 µL
- 0,1 M DTT 4 µL
- RNasin 40 U/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.

Una vez obtenidas los cDNAs se realizaron PCRs ocupando los partidores de interés. La concentración de cDNAs utilizada fue de alrededor de 400 ng, utilizando esta concentración en todas las reacciones.

5.4.-Reacción de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizó la siguiente reacción:

- H₂O 12,5 µL
- MgCL₂ (50 mM) 1 µL
- 10x PCR rxn tampones 2 µL
- Primers forward (10 mM) 0,8 µL

- Primers reverse (10 mM) 0,8 μ L
- DNA (400 ng) 2 μ L
- TAq 5 U/ μ L 0,2 μ L

5.5.- 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 ficol) 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 utilizó el test de ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett, se consideraron diferencias significativas a un valor de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 5.0. (GraphPad Software Inc).

5.6.- Protocolos inmunofluorescencia

a) Inmunofluorescencia indirecta

Células crecidas en cubreobjetos circulares cubiertas con colágeno IV fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% por 5 minutos, lavadas 3 veces con PBS, pH 7,4 e incubadas con solución de bloqueo (2% BSA, 10% suero de cabra, 0,1 % Triton-X 100) por una hora. Luego se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 hora en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:7000) por 5 minutos y se lavó 3 veces con PBS. Las muestras se montaron en portaobjetos ocupando como medio de montaje Fluoromount (Electron Microscopy Sciences). Estas muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss OX10 VERT 200M.

b) Inmunofluorescencia de BrdU

Células crecidas en cubreobjetos circulares cubiertas con colágeno IV (5 mg/mL) se incubaron con BrdU por 6 horas (2,5 ng/mL). Las células fueron fijadas con PFA al 4% por 10 minutos y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS-Triton X-100 0,1% (PBT) por 5 minutos. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos con HCl 2N a temperatura ambiente seguido de 3 lavados con PBT por 5 minutos, 3 lavados con buffer Borato 0,1 M pH 8.5 durante 5 minutos y finalmente tres lavados con PBT por 5 minutos. Las células se incubaron con solución de bloqueo (2% BSA, 10% suero de cabra, 0.01% Triton-X100) por una hora. Como anticuerpo primario se ocupó anti-BrdU (Ratón, Dako) 1:200, el que se dejó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBT por 5 minutos seguido de la incubación con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón 1:500 Alexa-Fluor 488 nm (Molecular Probes) por una hora. Los núcleos fueron teñidos con DAPI 1:7000 por 5 minutos y se lavó 3 veces con PBT por 5 minutos. Las inmunofluorescencias fueron montadas en portaobjetos ocupando como medio de montaje Fluoromount (Electron Microscopy Sciences).

c) Inmunofluorescencia por Citometría de Flujo

Células fueron crecidas en placas de 6 pocillos en medio DMEM/F-12 + FCS al 10 % y luego fueron incubadas con los tratamientos correspondientes por 24 horas. Para analizar las muestras en el citómetro de flujo, las células deben estar en suspensión por lo que fueron sacadas de las placas con Tripsina-EDTA 10X, por 15 minutos, posteriormente se centrifugo por 5 minutos a 800 rpm. El pellet obtenido fue fijado por 10 min en 300 µL de PFA al 4%, luego se centrifugó a 1300 rpm por 3 minutos; las células fueron lavadas 3 veces en 300 µL de PBS 1X + FCS al 2%. Posteriormente, se bloqueó durante dos horas con solución de bloqueo (2% BSA, 10% Suero de cabra, 0.01% Triton-X 100) seguido de la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, en agitación toda la noche, a 4°C. Las células se lavaron nuevamente 3 veces con PBS 1X + FCS al 2% y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente por una hora, con agitación y en oscuridad. Finalmente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X + FCS 2% y se analizaron por citometría de flujo (BD FACS Canto II Flow Cytometer) en el laboratorio de la Dr Maria Rosa Bono.

5.7.- Protocolos Experimentales

a) Análisis de Células derivadas de Neuroesferas.

Se estudió por citometría de flujo, el tamaño y morfología de las células obtenidas a partir de las neuroesferas. Para esto las células se crecieron en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% a 37°C en una placa de 100 mm hasta confluencia, y se tomaron 1×10^6 células, las que se pusieron en PBS + FCS al 2% para ser analizadas.

La morfología celular se estudió también por microscopía; las células fueron fotografiadas en el microscopio de epifluorescencia utilizando contraste de fase con aumentos de 20x y 40x.

b) Análisis de SOX-2 en presencia de LIF por RT-PCR; Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo.

Con el objetivo de estudiar el carácter multipotencial de las células derivadas de neuroesferas, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de la región marcadora de sexoY-box 2 (SOX-2). Se sembraron 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con cubreobjetos circulares de vidrio cubiertos con colágeno IV (5 mg/mL) en medio DMEM/F-12 + FCS al 10%. Las células se crecieron durante 24 horas y posteriormente se realizaron los siguientes tratamientos durante otras 24 horas:

- Medio DMEM/F-12 (medio mínimo)
- Medio DMEM/F-12 + EGF (25 ng/mL)
- Medio DMEM/F-12 + LIF (20 ng/mL)

Posteriormente las células se fijaron en PFA 4% en PBS y se realizó la inmunofluorescencia ocupando anti SOX-2 (Chemicom) como anticuerpo primario.

c) Expresión de iNOS y LIFR por RT-PCR; Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo.

Para determinar la expresión de LIFR e iNOS, las células fueron crecidas en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% en placas de 6 pocillos, por 24 horas y posteriormente tratadas

bajo las mismas condiciones descritas en el punto b). Luego de 24 horas, las células se extrajeron de la placa con Tripsina-EDTA 10X y se centrifugaron a 1400 rpm por 5 minutos. Se realizó la extracción de RNA del pellet celular obtenido ocupando el RNeasy mini Kit (Quiagen), estos RNAs fueron transcritos a cDNA por transcripción reversa y se realizaron PCRs para iNOS, LIFR y el control de carga YWHAZ. Todos los PCRs fueron realizados en 25 ciclos, los programas de amplificación por PCR se detallan en la Tabla 4.

<i>LIF-R</i>	<i>iNOS</i>	<i>YWHAZ</i>
<p>5 94°C 94°C 25 ciclos 59°C 72°C 72°C 0:30 0:30 10</p>	<p>5 94°C 94°C 25 ciclos 65°C 72°C 72°C 0:30 0:30 10</p>	<p>5 94°C 94°C 25 ciclos 55°C 72°C 72°C 0:30 0:30 10</p>

Tabla 4. Ciclos de amplificación por PCR para los partidores de LIF-R, iNOS y YWHAZ.

La expresión de iNOS y LIFR se estudió también por inmunofluorescencia, las células se sembraron a una densidad de 300.000 cels./pocillo en cubreobjetos circulares de vidrio cubiertos con colágeno IV (5 µg/mL) y fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que en el punto anterior. Posteriormente las células fueron fijadas con PFA al 4%, para así realizar la inmunofluorescencia, con anticuerpos anti-iNOS y anti-LIFR.

d) Análisis de la Expresión de iNOS bloqueando la vía LIF-LIFR-iNOS.

Se estudio el efecto del bloqueo del receptor de LIF sobre la expresión de iNOS mediante inmunofluorescencia. Para esto se utilizó un anticuerpo bloqueador dirigido contra el LIFR (Taupin y cols., 1999). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de vidrio circulares cubiertas de colágeno IV (5 mg/mL) a una densidad de 300.000 cels./pocillo y fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% por 24 horas, luego

las células se incubaron en medio mínimo y se agregó el anticuerpo bloqueador de LIFR (40 ng/mL) (R&D System) por 6 horas. Posteriormente, se agregó LIF (20 ng/mL) al medio y se incubó por 24 horas a 37°C, como control se utilizaron células incubadas con LIF (20 ng/mL) por 24 horas en ausencia del anticuerpo bloqueador. Las células fueron posteriormente fijadas y procesadas para inmunofluorescencia de LIFR e iNOS.

e) Curso temporal de la expresión de iNOS en presencia de LIF

Para determinar el tiempo óptimo de tratamiento con LIF, las células se crecieron en DMEM/F-12 + FCS al 10% hasta un 70% de confluencia, posteriormente se incubaron con medio DMEM/F-12 + LIF (20 ng/mL) a 37°C por 0, 6, 12 y 24 horas; la expresión de iNOS fue detectada por RT-PCR e inmunofluorescencia ocupando partidores y anticuerpos específicos para esta proteína.

f) Efecto de LIF sobre la Proliferación de Células derivadas de Neuroesferas

Para estudiar el efecto de LIF sobre la proliferación celular, se ocuparon dos métodos:

1.- Conteo celular: Las células fueron sembradas en placas de 60 mm a una densidad de 100.000 células por placa y se incubaron a 37°C por 0, 12, 20, 24, 31, 48 y 72 horas en tres tratamientos:

- Medio DMEM/F-12 (medio mínimo).
- Medio DMEM/F-12 + EGF (25 ng/mL).
- Medio DMEM/F-12 + LIF (20 ng/mL).

2.- Incorporación de BrdU: Las células se sembraron a una densidad de 150.000 cels./pocillo y fueron crecidas en cubreobjetos circulares en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% en placas de 6 pocillos por 24 horas, antes de ser sometidas a los tratamientos experimentales. Además de los tres tratamientos anteriores, se utilizaron los siguientes bloqueadores de la vía LIF-iNOS:

a) Anticuerpo bloqueador del receptor de LIF (anti-LIFR). Se preincubó por 6 horas con el anticuerpo bloqueador a una concentración de 40 ng/mL antes del tratamiento con LIF (20 ng/mL) por 24 horas a 37°C.

b) El bloqueador de la iNOS, L-NIL (20 µM), incubado por 6 horas previo al tratamiento con LIF (20 ng/mL) por 24 horas a 37 °C.

c) - L-NIL (20 µM) incubado por 6 horas antes del tratamiento con LIF (20 ng/mL) y el dador de NO, SNAP (50 µM) agregado junto con LIF.

Seis horas antes de la fijación de las células se dio un pulso de BrdU (2,5 ng/mL), posteriormente las células se fijaron con PFA al 4% y se realizó la inmunofluorescencia con anti-BrdU según lo descrito anteriormente, se evaluó la proliferación como la razón entre los núcleos positivos BrdU y los núcleos totales teñidos con DAPI.

g) Efecto de LIF sobre la diferenciación de las Células derivadas de Neuroesferas

Para estudiar los efectos de LIF sobre la diferenciación de los precursores se ocuparon marcadores de diferenciación como Tubulina- β3 (Tub-β3) para neuronas y GFAP para glias; estos marcadores se detectaron a nivel de mRNA mediante RT-PCR y de proteína por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Se diseñaron partidores específicos para cada marcador, los que están detallados en la tabla 2 en la sección de materiales.

Las células derivadas de neuroesferas fueron crecidas en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000 cels/pocillo por 24 horas a 37°C; posteriormente se realizaron tres tratamientos durante 24 horas mas, los que se describen a continuación.

- Medio DMEM/F-12 (medio mínimo).
- Medio DMEM/F-12 + EGF (25 ng/mL).
- Medio DMEM/F-12 + LIF (20 ng/mL).

Las células fueron cosechadas con Tripsina-EDTA 10X y posteriormente centrifugadas a 1400 rpm por 5 minutos. Con el pellet celular obtenido se realizó la extracción de RNA, estos RNAs fueron transcritos a cDNA por transcripción reversa y se realizaron PCRs para

Tub- β 3, GFAP y el control de carga YWHAZ. Todos los PCRs se realizaron por 25 ciclos, los programas de amplificación por PCR se detallan en la Tabla 5.

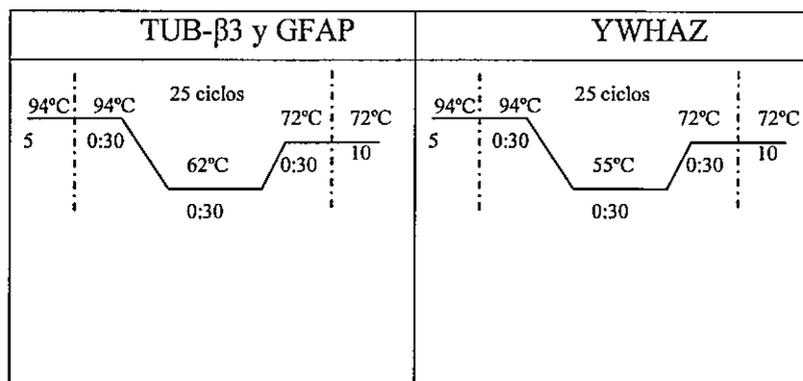


Tabla 5. Ciclos de amplificación por PCR para los partidores de TUB- β 3, GFAP y YWHAZ

Para las inmunofluorescencias y citometría de flujo se sembraron 300.000 cels./pocillo en cubreobjetos circulares cubiertas de colágeno IV las que fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 + FCS al 10% en placa de 6 pocillos por 24 horas; posteriormente se realizaron los mismos tratamientos que para los PCR. Las células fueron fijadas con PFA al 4%, y procesadas para inmunofluorescencia y citometría, con anticuerpos anti-TUB- β 3 y anti-GFAP.

6.- Resultados

6.1.- Obtención de Células Derivadas de Neuroesferas de Epitelio Olfatorio de Rata Adulta.

Los cultivos de neuroesferas se realizaron según lo descrito en materiales y métodos. Las células pasaron por la etapa de expansión y de selección tres veces para asegurar la homogeneidad de las células. La morfología de las neuroesferas obtenidas se muestran en la figura 6, en la que se observan dos imágenes distintas de contraste de fase 20x, estas aglomeraciones de células se caracterizan por crecer formando una esfera que se mantiene en suspensión: Las neuroesferas con un diámetro aproximado de 100 μm fueron seleccionadas mediante succión con una micropipeta (P-200) y disociadas para volver a sembrarlas, obteniéndose células (figura 7) que fueron sometidas a los tratamientos experimentales.

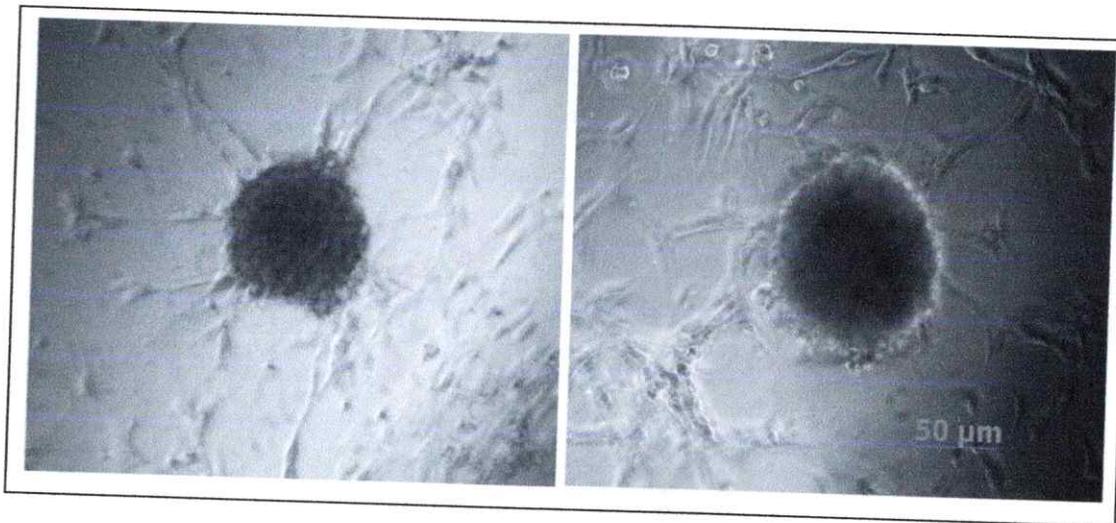


Figura 6. Neuroesferas de epitelio olfatorio de Rata Adulta crecidas en medio mínimo + EGF (25 ng/mL) + FGF-2 (50 ng/mL). Imagen de contraste de fase 20X.

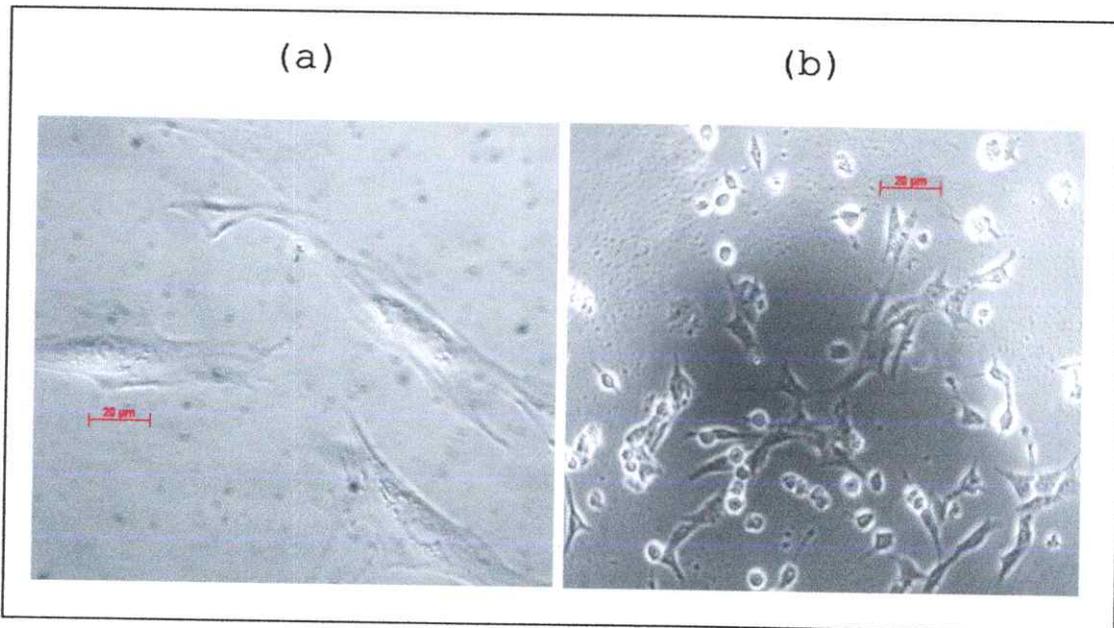


Figura 7. Comparación entre Células obtenidas a partir de Neuroesferas y la Línea Celular OLF-442 crecidas en medio DMEM F-12 + FCS al 10% a 37°C por 48 horas. (a) Células derivadas de Neuroesferas; (b) Línea Celular OLF-442.

Cuando se comparan las células derivadas de neuroesferas (Figura 7(a)) con la línea celular OLF-442 (Figura 7(b)) se observan ciertas diferencias. Aunque ambos tipos celulares provienen del epitelio olfatorio, la línea OLF-442 es una línea artificial inmortalizada a través de la inserción del gen *n-myc* (MacDonald, 1996). Estas células presentan un tamaño $\approx 10 \mu\text{m}$ con pequeñas ramificaciones, en cambio las células derivadas de neuroesferas, que corresponden a una línea celular seleccionada, tienen un tamaño de aproximadamente $15 \mu\text{m}$ y largas extensiones citoplasmáticas.

Para determinar si la población de células de neuroesferas es homogénea, en tamaño y morfología celular fueron analizadas por citometría de flujo (FACs). Los resultados indicaron que las células obtenidas son de un tamaño similar y una estructura externa común (figura 8). Por lo tanto, después de casi 9 meses de cultivo se puede afirmar que la población celular obtenida es homogénea, de rápido crecimiento y con capacidad de propagación a través de varios pasajes.

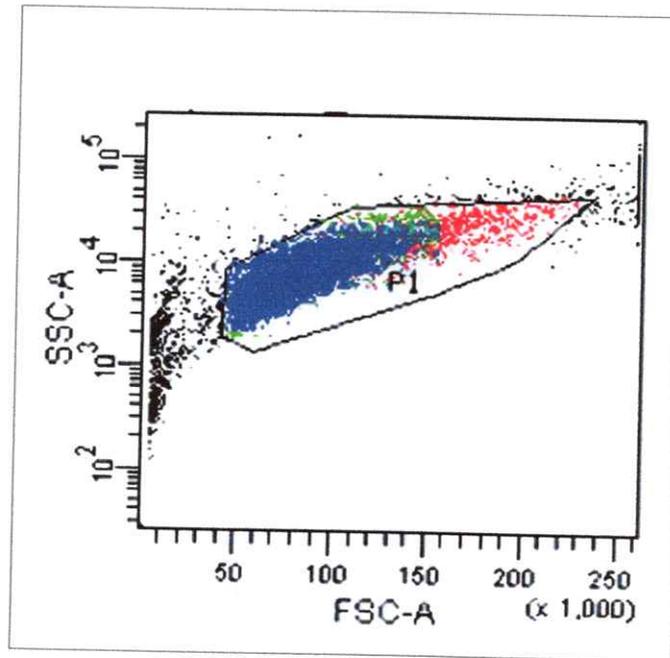


Figura 8. Análisis de Tamaño y Morfología celulares por FACs en Células derivadas de Neuroesferas. En azul se observa la población P1 la cual fue analizada.

6.2.- Análisis de la Expresión de SOX-2 en Células derivadas de Neuroesferas de Epitelio Olfatorio de Rata Adulta.

Para analizar la multipotencialidad de las células obtenidas, se estudió por inmunofluorescencia la expresión del marcador de precursores neuronales SOX-2, ya que este marcador es un factor de transcripción cuya función es el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre no diferenciadas (Chen y cols., 2007; Li y cols., 2001). Se examinó SOX-2 bajo las mismas condiciones utilizadas para estudiar la expresión de iNOS: medio mínimo, EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) por 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9; en ella se observa una clara marca positiva para SOX-2 en los tres tratamientos realizados (n= 4). Se determinó que en las células tratadas con medio mínimo se produce una disminución de la expresión de SOX-2 de un 6,45 % en relación en tratamiento con EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) (Figura 10). Este efecto ha sido ampliamente descrito en la literatura (Li y cols., 2009). En ausencia de factores de crecimiento, las células tienden a diferenciarse; en cambio, en las células tratadas con LIF la expresión de SOX-2 se mantiene constante comparada con el control positivo con EGF. En los resultados obtenidos por FACs para la expresión de SOX-2, observamos que la

cantidad de células que expresan SOX-2 no varía (Figura 11 (a)), en cambio cuando se analizó la intensidad de fluorescencia se observa un aumento de 2,1 veces de LIF sobre el tratamiento con medio mínimo (* $p > 0,005$) (n=3) (Figura 11 (b)).

Este resultado indica que LIF no promueve la diferenciación celular, y que su rol sería inducir la proliferación celular, como ha sido descrito anteriormente en otros sistemas (Takaki y cols., 2006).

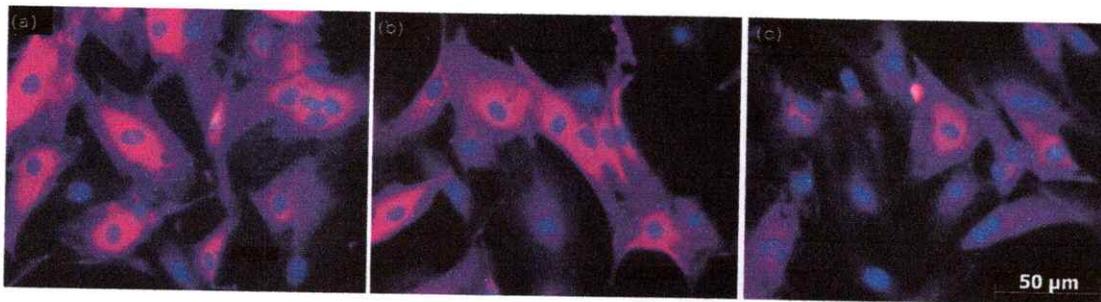


Figura 9. Expresión de SOX-2. (a) Medio mínimo; (b) EGF (25 ng/mL); (c) LIF (20 ng/mL) por 24 horas. Inmunofluorescencia anti-SOX-2 (violeta), en azul tinción nuclear con DAPI (n=4).

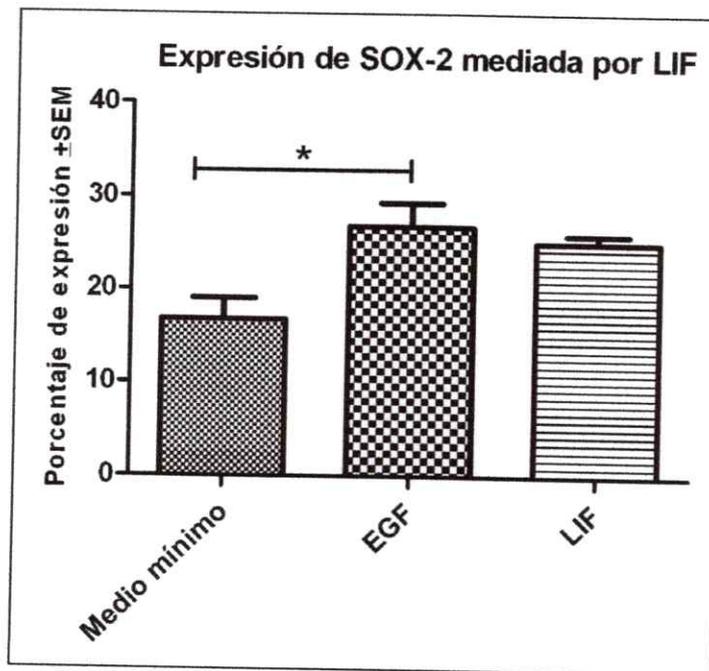


Figura 10. Expresión de SOX-2. Cuantificación de inmunofluorescencias. Medio mínimo; EGF (25 ng/mL); LIF (20 ng/mL) por 24 horas (n=4). * $p > 0,05$ Test de Anova seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

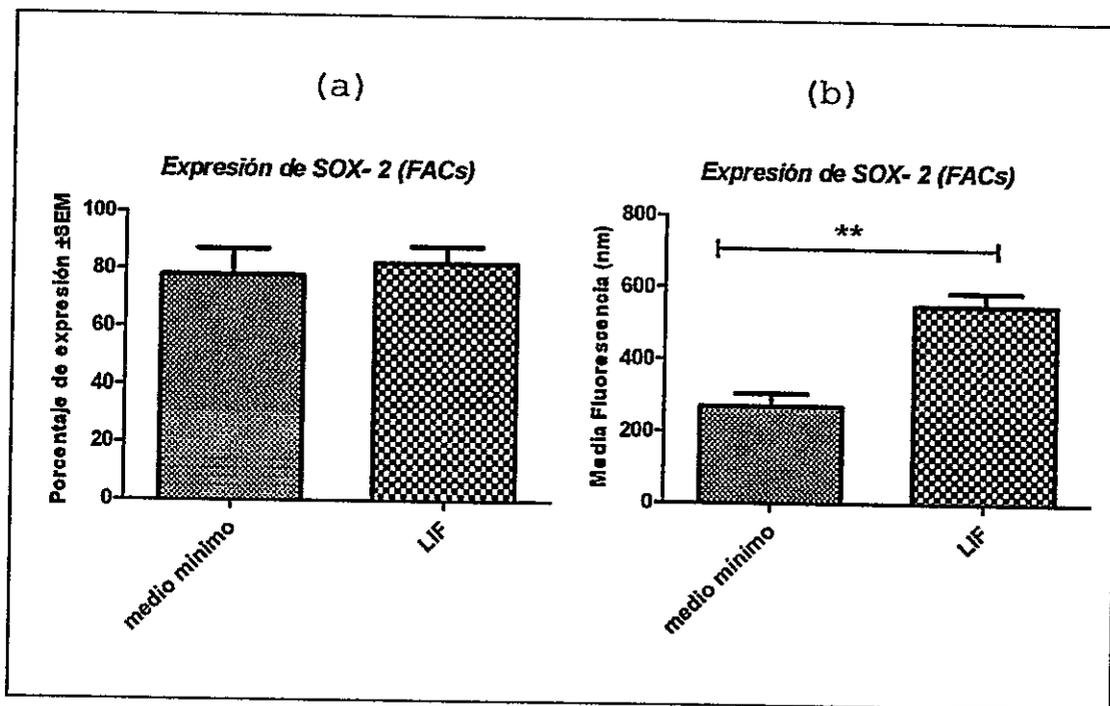


Figura 11. Análisis FACs de SOX-2. (a) Gráfico de porcentaje de expresión de células Vs tratamiento. (b) Gráfico de Intesidad de Fluorescencia Vs tratamiento. Medio mínimo; LIF (20 ng/mL) por 24 horas) (n =3). ** $p > 0,005$ Test de Anova (no paramétrico).

En resultados obtenidos en cultivos primarios de precursores neuronales, LIF induce un aumento de la expresión de iNOS de aproximadamente 70%, comparado con las células que se mantuvieron en medio mínimo (López 2010, datos no publicados). Para realizar este experimento en neuroesferas fue necesario determinar si estas células expresan el receptor de LIF (LIFR), y si el tratamiento con LIF induce la expresión de iNOS, al igual que ocurre en los cultivos primarios. Como controles negativo y positivo, las células fueron crecidas en medio mínimo y con EGF (25 ng/mL) por 24 horas respectivamente. Por inmunofluorescencia se observó una expresión basal de LIFR en los tratamientos con medio mínimo y con EGF, la que aumentó en las células crecidas en presencia de LIF (figura 12). Lo anterior sugiere que estas células son capaces de responder a esta citoquina, pues además se observó una importante marca para iNOS en las células tratadas con LIF (figura 13), comparadas con las células crecidas en medio mínimo y en EGF (25 ng/mL). En la figura 14 se muestra la expresión de LIFR e iNOS con un tratamiento con LIF por 24 horas. Se observa que las células derivadas de neuroesferas coexpresan ambas proteínas.

La expresión de iNOS y LIFR fue estudiada además por RT-PCR, utilizando partidores específicos para estas proteínas, como control positivo se ocupó mRNA de epitelio olfatorio y como control de carga partidores para la proteína de expresión constitutiva YWHAZ.

Los resultados de RT-PCR muestran una mayor inducción del mensajero de iNOS y de LIFR en las células tratadas con LIF, comparado con los tratamientos controles, medio mínimo y EGF (25 ng/mL) (n = 5) (Figura 15).

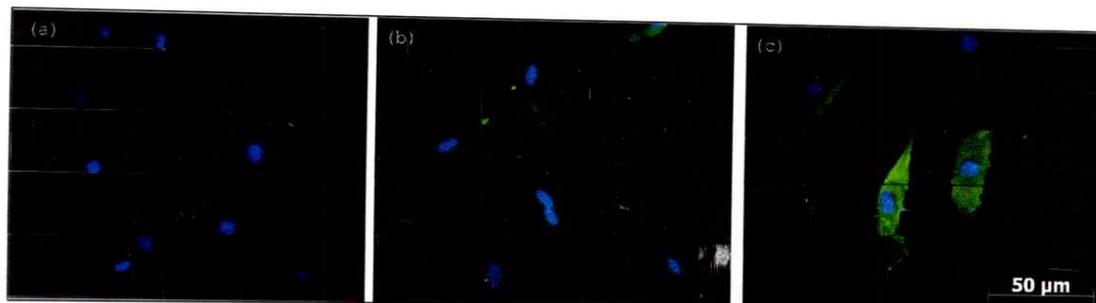


Figura 12. Expresión de LIFR en presencia de LIF por 24 horas. (a) Medio mínimo; (b) EGF (25 ng/mL); (c) LIF (20 ng/mL) por 24 horas. Inmunofluorescencia anti-LIFR (verde), azul tinción nuclear con DAPI.

La cuantificación de los resultados de PCR se muestran en la figura 16 para LIFR y figura 17 para iNOS; ambos fueron normalizados con respecto al control positivo (extracto de epitelio olfatorio) y mostraron que para LIFR la expresión fue de $28,9 \pm 9,6\%$ en medio mínimo, de $27,9 \pm 7,4\%$ en EGF y de $59,4 \pm 14,5\%$ en las células tratadas con LIF. La expresión de iNOS en medio mínimo fue de $58,3 \pm 7,9\%$ en EGF fue $68,9 \pm 8,8\%$ y en medio con LIF aumentó a $100,3 \pm 5,5\%$.

Los resultados obtenidos por FACs se muestran en la figura 18, en ellos se observa la cantidad de células que expresan iNOS vs tratamiento (Figura 18 (a)), también se graficó la intensidad de fluorescencia vs tratamiento (medio mínimo y LIF (20 ng/mL) (Figura 18 (b)). En las células crecidas en medio mínimo, iNOS se expresó en el $79,1 \pm 0,12\%$ de las células, la que aumentó a $82,8 \pm 4,51\%$ con el tratamiento con LIF. Cuando se analizó la intensidad de la fluorescencia en ambos tratamientos, se observó que la fluorescencia con el tratamiento con LIF es 14 veces mayor que la obtenida en el tratamiento con medio mínimo (***) $p > 0,005$). Todos estos datos apuntan a que LIF efectivamente induce la expresión de iNOS en las células derivadas de neuroesferas

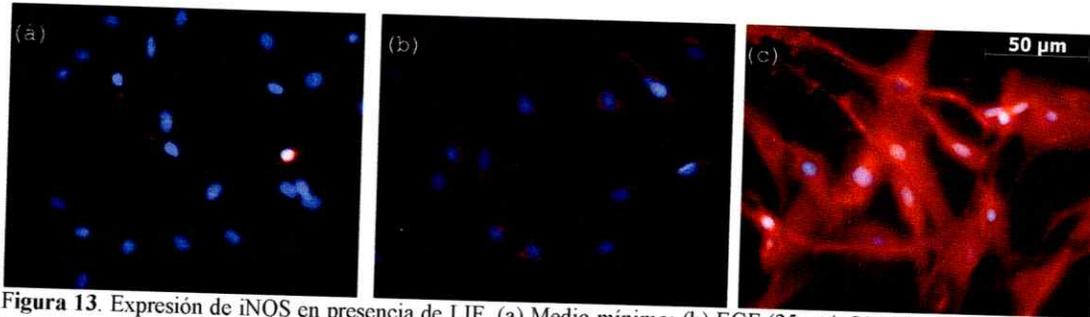


Figura 13. Expresión de iNOS en presencia de LIF. (a) Medio mínimo; (b) EGF (25 ng/mL); (c) LIF (20 ng/mL) por 24 horas. Inmunofluorescencia de anti-iNOS (rojo), en azul tinción nuclear con DAPI.

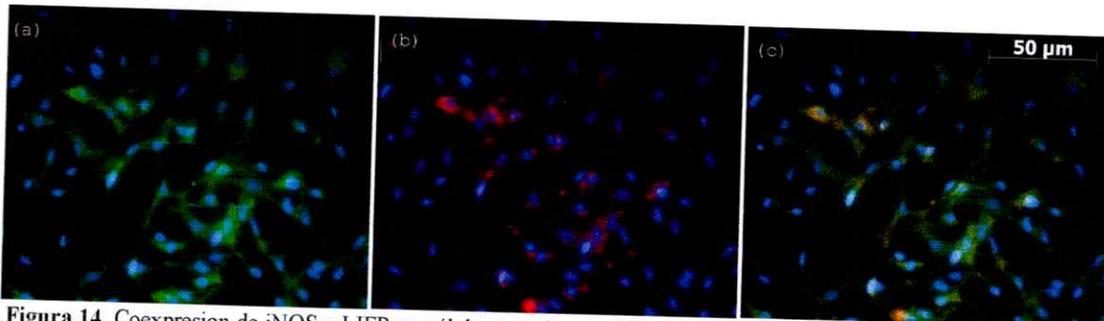


Figura 14. Coexpresión de iNOS y LIFR en células tratadas con LIF. (a) Expresión de LIFR; (b) expresión de iNOS; (c) coexpresión LIFR e iNOS por 24 horas. Inmunofluorescencia de anti- LIFR (verde) e anti-iNOS (rojo), en azul tinción nuclear con DAPI.

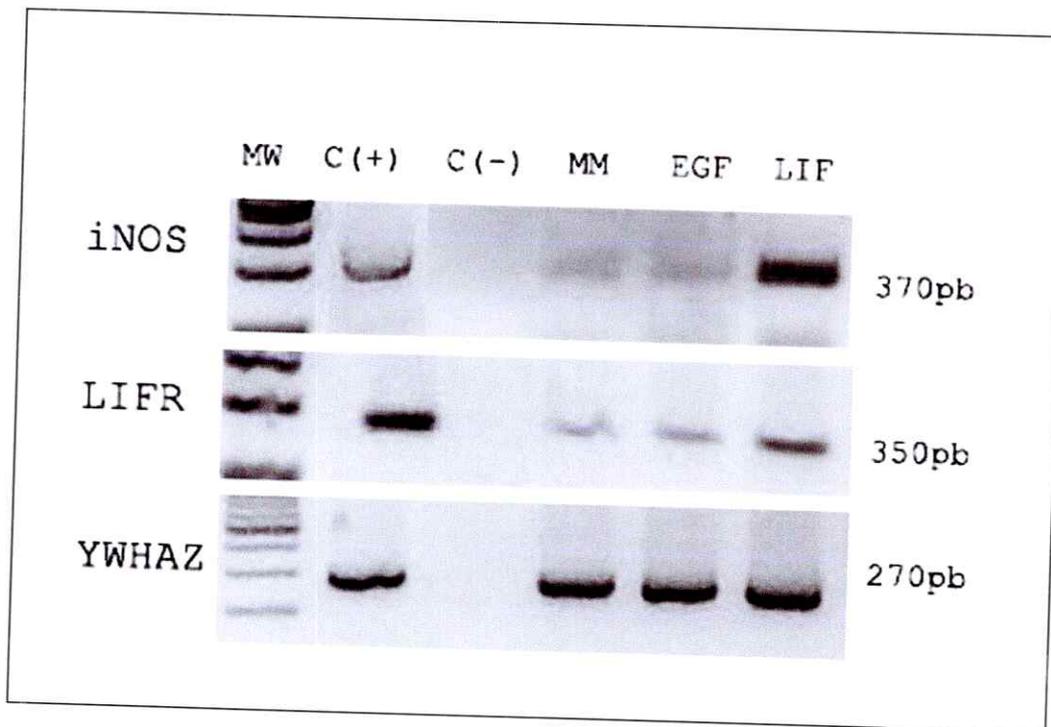


Figura 15. Expresión del mRNA de *iNOS* y *LIFR* por RT-PCR en Células derivadas de Neuroesferas. (MM) medio mínimo; EGF (25 ng/mL); LIF (20 ng/mL) por 24 horas. C (+) control positivo; extracción de RNA de epitelio olfatorio; C (-) control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

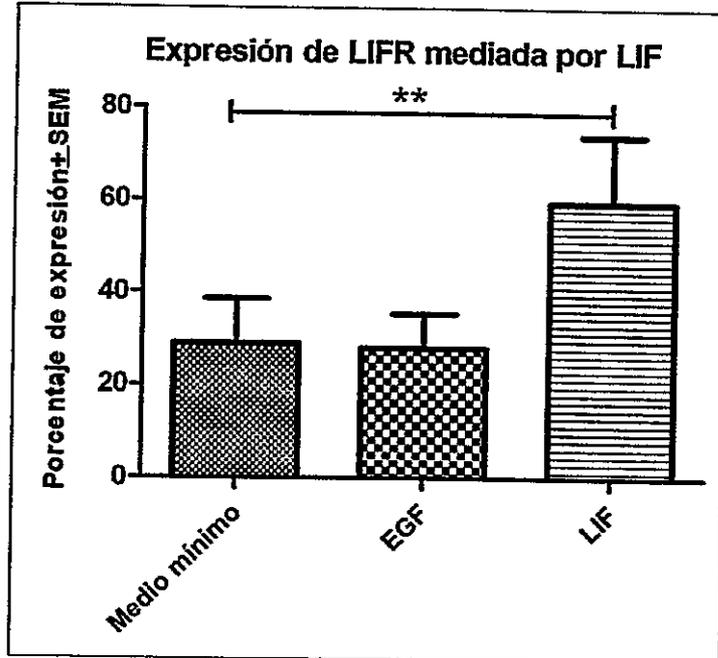


Figura 16. Expresión del mRNA de *LIFR* inducida por LIF. Cuantificación de los resultados de RT-PCR. Medio mínimo; EGF (25 ng/mL); LIF (20 ng/mL) por 24 horas (n=5) **p>0,005 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

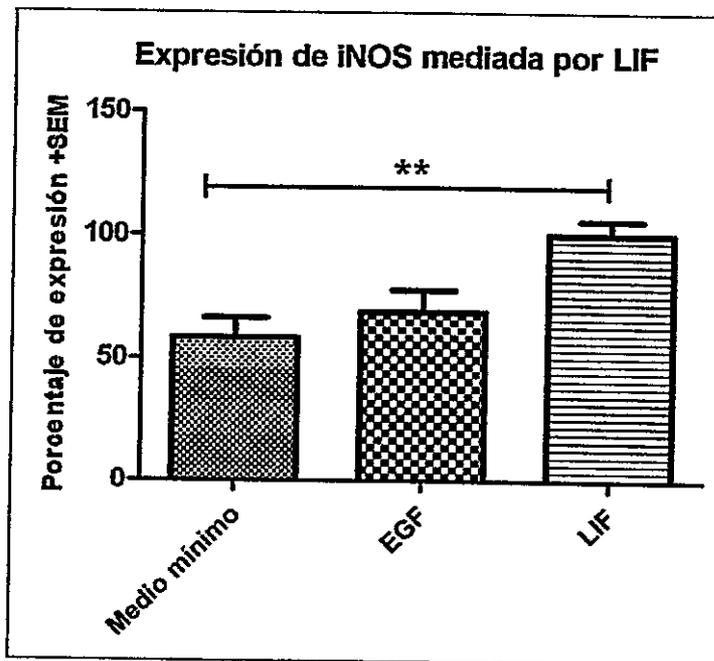


Figura 17. Expresión de *iNOS* mediada por LIF. Cuantificación de los resultados de RT-PCR. Medio mínimo; EGF (25 ng/mL); LIF (20 ng/mL) por 24 horas (n=5) ** p>0,005 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

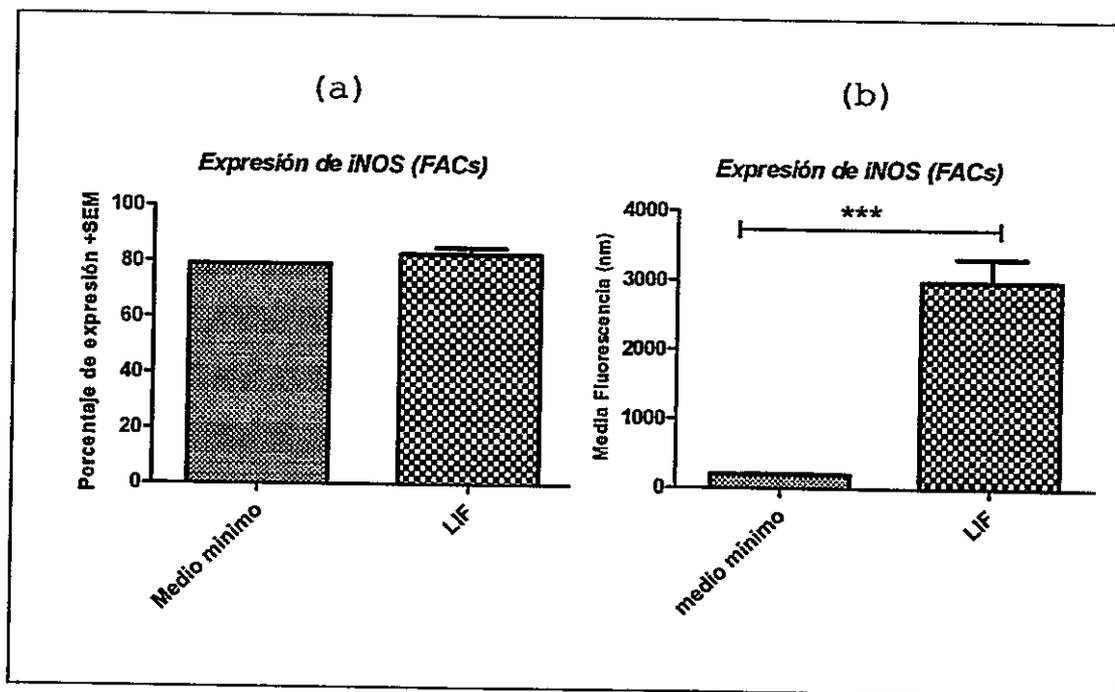


Figura 18. Expresión de iNOS mediada por LIF. Análisis de Citometría de Flujo. (a) Grafico de % de expresión de células Vs tratamiento. (b) Grafico de Intesidad de Fluorescencia Vs tratamiento. Medio mínimo; LIF (20 ng/mL) por 24 horas (n = 3). *** $p > 0,0005$ Test de ANOVA (no paramétrico).

6.4.-Expresión Temporal de iNOS mediada por LIF

Para determinar el curso temporal de la expresión de iNOS inducida por LIF las células se incubaron con LIF por 0, 6, 12 y 24 horas y la expresión de iNOS fue evaluada por inmunofluorescencia y RT-PCR.

El resultado obtenido por RT-PCR muestra la expresión basal del mensajero de iNOS al tiempo 0, la que aumenta a las 6 horas, con un máximo a las 12 horas de tratamiento y que decae a las 24 horas (n=3) (Figura 19), como control positivo se utilizó extracción de RNA de epitelio olfatorio (parámetro utilizado para normalizar). La cuantificación de los resultados mostró que el porcentaje de expresión de iNOS en el tiempo 0 fue de $52,83 \pm 11,76\%$; a las 6 horas aumentó a $62,32 \pm 12,99\%$ y a las 12 y 24 horas fue de $89,54 \pm 4,18\%$ y $73,41 \pm 10,68\%$ respectivamente (Figura 20).

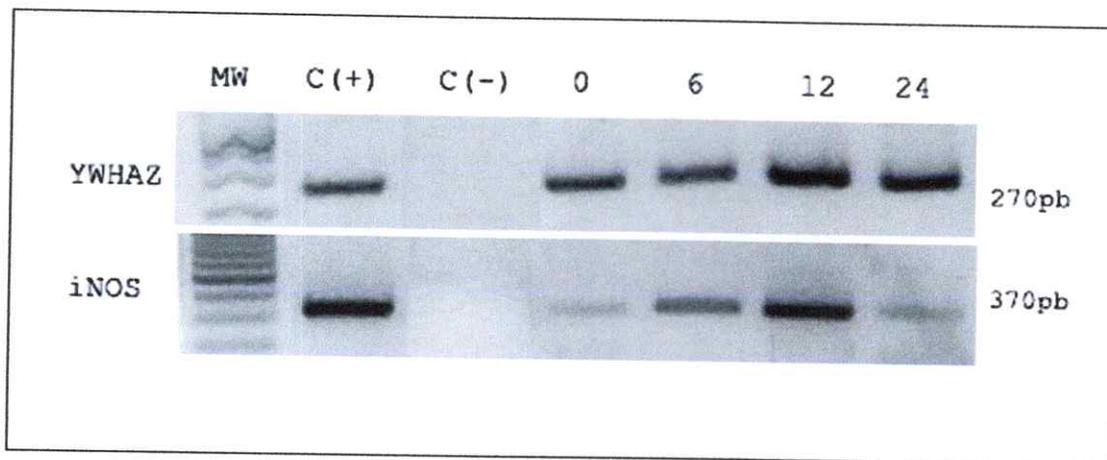


Figura 19. Curso temporal de la expresión del mRNA de *iNOS* a 0, 6, 12 y 24 horas de tratamiento con LIF (20 ng/mL) (n=3) C (+) control positivo; extracción de RNA de epitelio olfatorio; C (-) control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

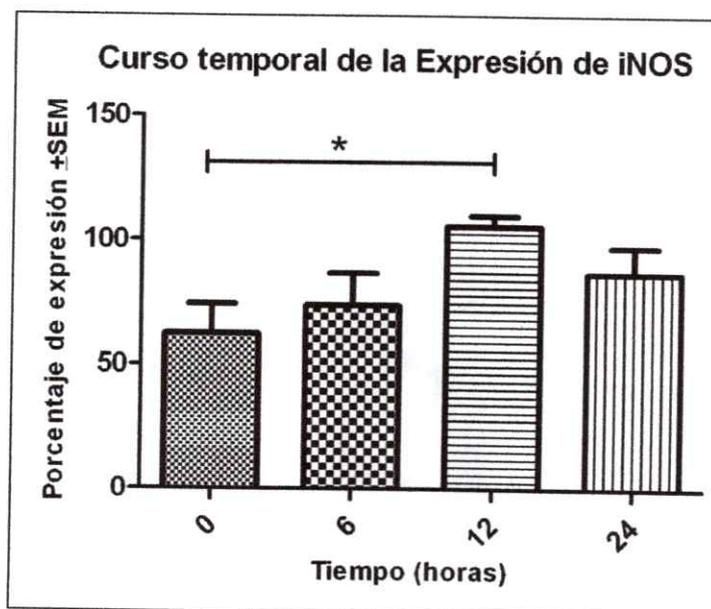


Figura.20. Expresión temporal del mRNA de *iNOS* Cuantificación de RT-PCR a 0, 6 12 y 24 horas de tratamiento con LIF (20 ng/mL). * $p > 0,05$ Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia muestran resultados similares a los obtenidos con el mRNA, es decir, la expresión basal de *iNOS* aumenta fuertemente a las 12 horas de tratamiento, la que se mantiene a las 24 horas (n=3) (Figura 21). Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de *iNOS* por LIF ocurre en un tiempo relativamente corto, por lo que está vía podría ser un candidato para activar la maquinaria de renovación celular del epitelio olfatorio. Se determinó que los experimentos posteriores

se realizarían a las 24 horas de tratamiento, para asegurar que la vía LIF-LIFR-iNOS se encuentre completamente activada.

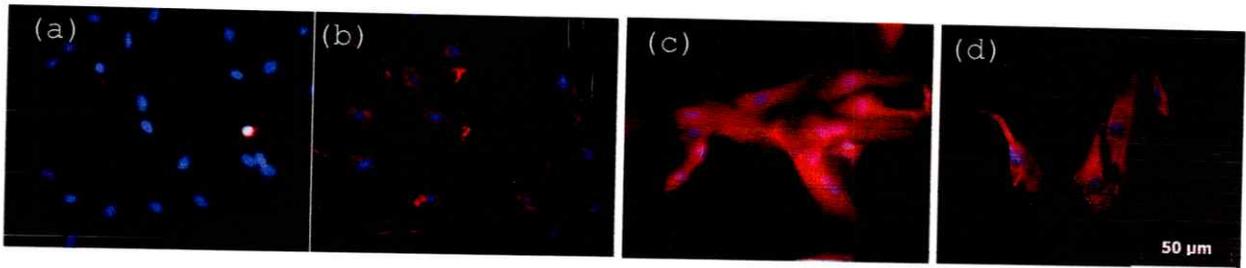


Figura 21. Expresión temporal de iNOS a 0, 6, 12 y 24 horas de tratamiento con LIF (20 ng/mL) (n=3). Inmunofluorescencia de anti- iNOS (rojo), en azul tinción nuclear con DAPI.

6.5.- Análisis de la expresión de iNOS bloqueando la vía LIF-LIFR-iNOS.

Se estudió el efecto del bloqueo del receptor de LIF sobre la expresión de iNOS, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente e inactiva al receptor de LIF. Las células se incubaron en medio mínimo y con el anticuerpo bloqueador anti-LIFR (40 ng/mL) 6 horas antes del tratamiento con LIF (20 ng/mL). Como control se utilizaron células tratadas con medio mínimo y con LIF (20 ng/mL) en ausencia del anticuerpo bloqueador.

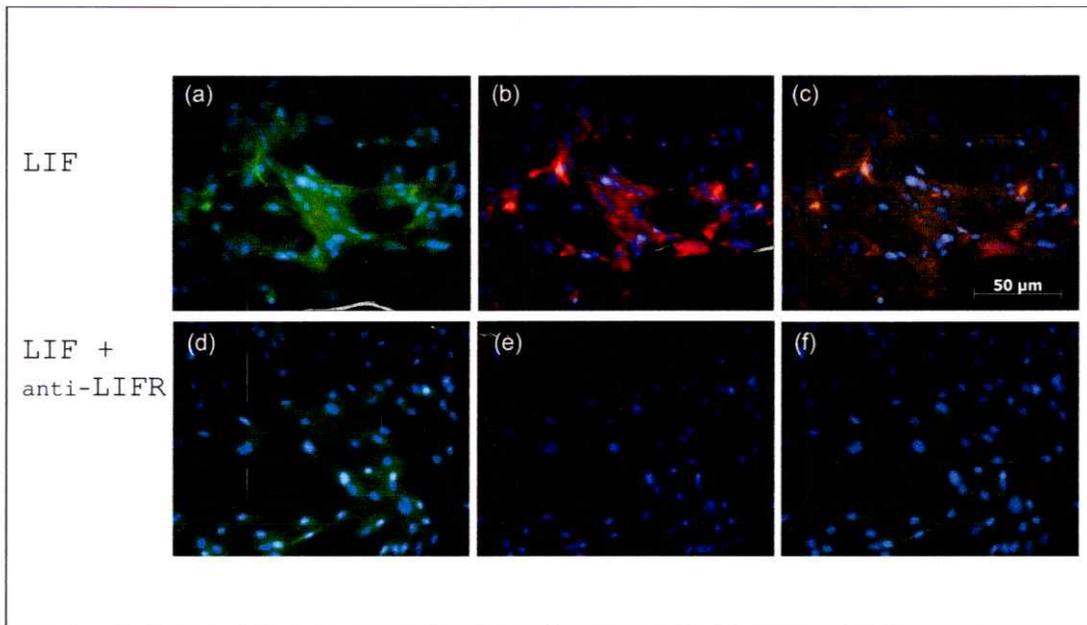


Figura 22. Efecto del anticuerpo bloqueador de LIFR sobre la expresión de iNOS. Control positivo: LIF (20 ng/mL) por 24 horas (a,b,c) (n=3); LIF +anti LIFR (d,e,f); sobreposición (c,f). Inmunofluorescencia anti- LIFR (verde), anti-iNOS (rojo); en azul tinción nuclear con DAPI.

Los resultados mostraron que el bloqueo del receptor de LIF, inhibe la expresión de iNOS inducida por LIF (figura 22), además se observó que LIFR e iNOS colocalizan en estas células (figura 22 (C)), lo que no se observa cuando se bloquea LIFR (figura 22 (f)) (n = 3). Este resultado apoya la hipótesis que la inducción de la expresión de iNOS es mediada por LIF.

6.5.- Efecto de LIF sobre la Proliferación de Células derivadas de Neuroesferas

Para evaluar si LIF induce la proliferación de las células derivadas de neuroesferas, se ocuparon dos estrategias. Primero se evaluó la proliferación por conteo celular, para lo cual las células se crecieron en medio mínimo, en EGF (25 ng/mL) o en LIF (20 ng/mL) y se realizó el conteo a las 0, 12, 20, 24, 31, 48 y 72 horas de cultivo (n=5). Los resultados se muestran en la figura 23, donde se observa que a las 72 horas de tratamiento hay 1,6 veces más células con el tratamiento con EGF y 1,8 veces más células con el tratamiento con LIF con respecto a las células crecidas en medio mínimo.

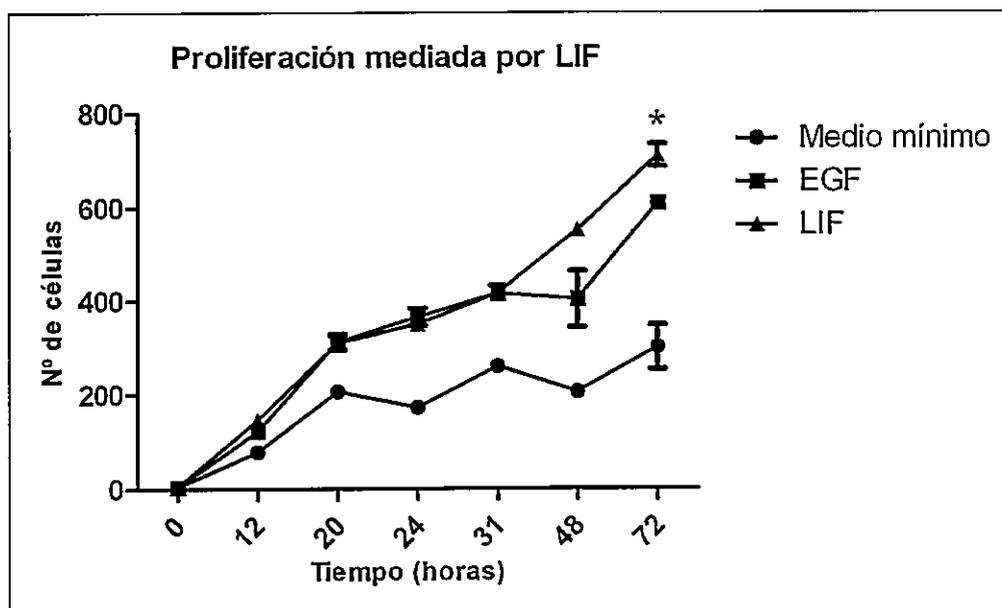


Figura 23. Curva temporal de la proliferación inducida por LIF a 20 (ng/mL) a 0, 12, 20, 24, 31, 48 y 72 horas de tratamiento. * $p > 0,05$ Test ANOVA.

La segunda estrategia fue utilizar el nucleótido BrdU, el cual se incorpora en el DNA durante la replicación. Los tratamientos utilizados fueron medio mínimo; EGF (25 ng/mL) o LIF (20 ng/mL) por 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en figura 24, en esta

vemos que LIF aumenta el número de células que incorporan BrdU comparado con los tratamientos controles (medio mínimo y EGF).

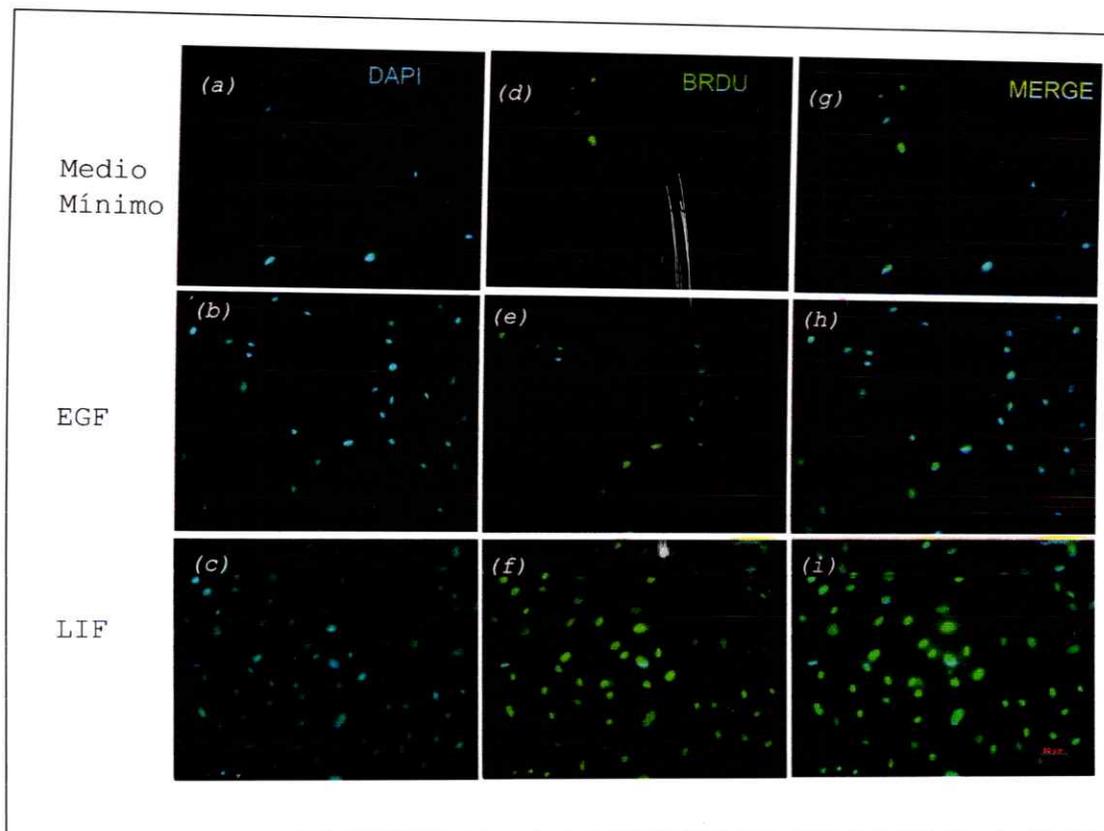


Figura 24. Efecto de LIF sobre la Proliferación de las Células derivadas de Neuroesferas. Células crecidas en medio mínimo (a, d, g), EGF (25 ng/mL) (b, e, h) y LIF (20 ng/mL) (c, f, i). Inmunofluorescencia con anti-BrdDU (verde) en azul tinción nuclear con DAPI.

El efecto del bloqueo de la posible vía LIF-iNOS sobre la proliferación celular fue evaluado utilizando el anticuerpo bloqueador del LIFR, el bloqueador de la iNOS, L-NIL y el dador de NO, SNAP para rescatar el bloqueo de la vía con NO exógeno. Los resultados se presentan en la figura 25 y muestran que tanto el bloqueo del receptor de LIF como la inhibición de la enzima iNOS provocan la disminución en las células BrdU positivas, mientras que un dador de NO las incrementa.

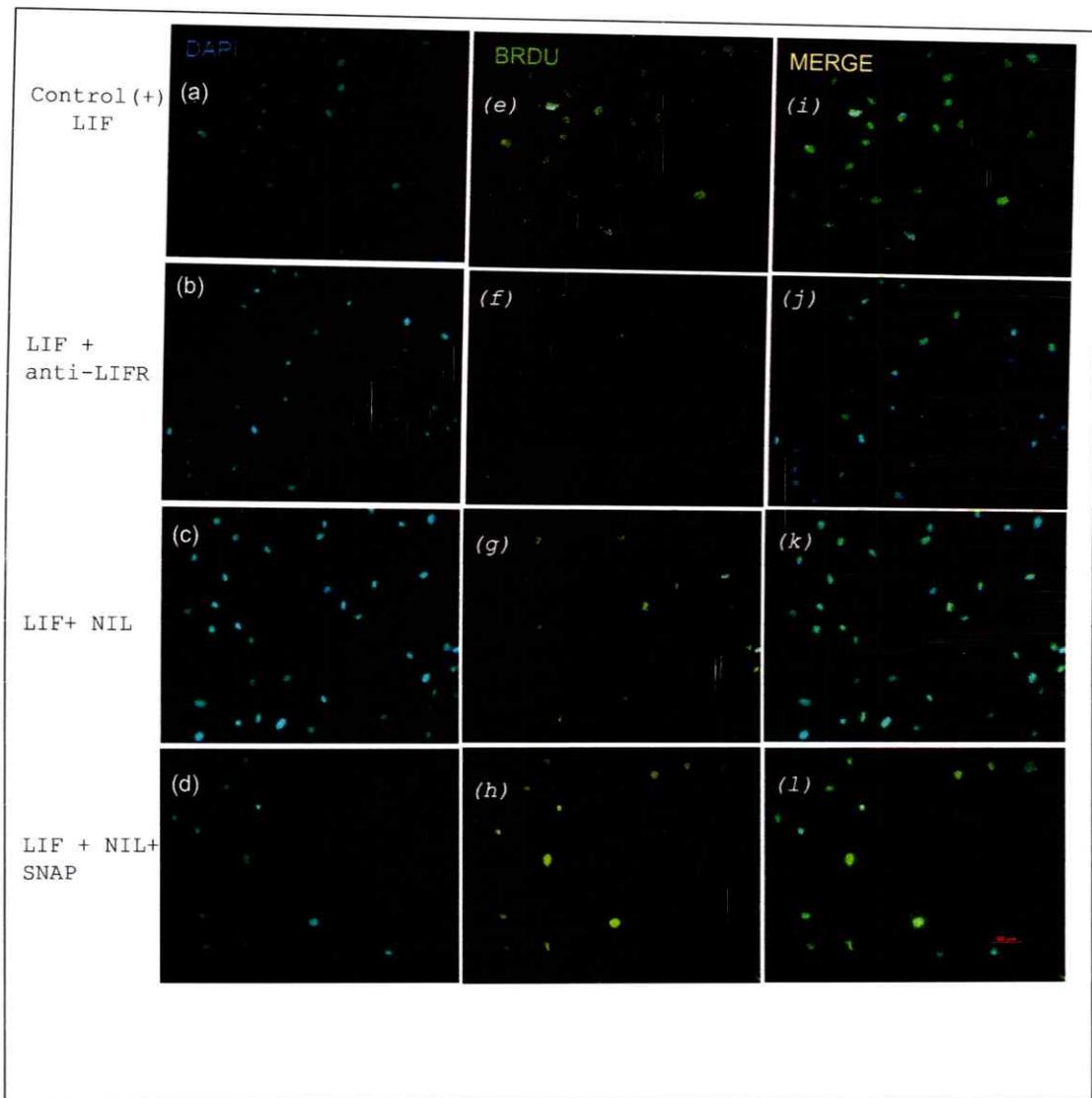


Figura 25. Efecto de la alteración de la vía LIF-iNOS-NO sobre la Proliferación de las Células derivadas de Neuroesferas. Inmunofluorescencia anti- BRDU (verde) (e, f, g, h), en azul tinción nuclear con DAPI.(a, b, c, d); (i, j, k, l) sobreposición.

Los resultados obtenidos fueron cuantificados como la razón entre los núcleos positivos para BrdU y los núcleos totales ($n= 8$). Los porcentajes de proliferación obtenidos se muestran en la tabla 6. En las células tratadas con LIF la proliferación celular aumenta con respecto a las células crecidas en medio mínimo; el bloqueo del LIFR utilizando el anticuerpo bloqueador y la inhibición de la iNOS con L-NIL reduce el porcentaje de células en proliferación, efecto que se revierte cuando se trata con un dador de NO (SNAP) (Figura 26). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de esta tesis, mostrando que LIF

induce la proliferación mediante la inducción de iNOS, siendo esta citoquina un iniciador de la neurogénesis en el epitelio olfatorio.

Tratamiento	MM	EGF	LIF	LIF + anti LIF	LIF + NIL	LIF + NIL + SNAP
Núcleos totales	1034	1294	1898	359	1287	228
Núcleos BRDU	430	630	1139	71	517	120
% proliferación	40,9 ± 3	54,1 ± 3,1 *	66,8 ± 3,2 **	23 ± 3,3	43 ± 4,5	51,5 ± 6,4 *

Tabla 6. Porcentaje de proliferación inducido por LIF. Razón entre los núcleos totales y los núcleos positivos BrdU ± SEM. * p>0,05; ** p> 0,005 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

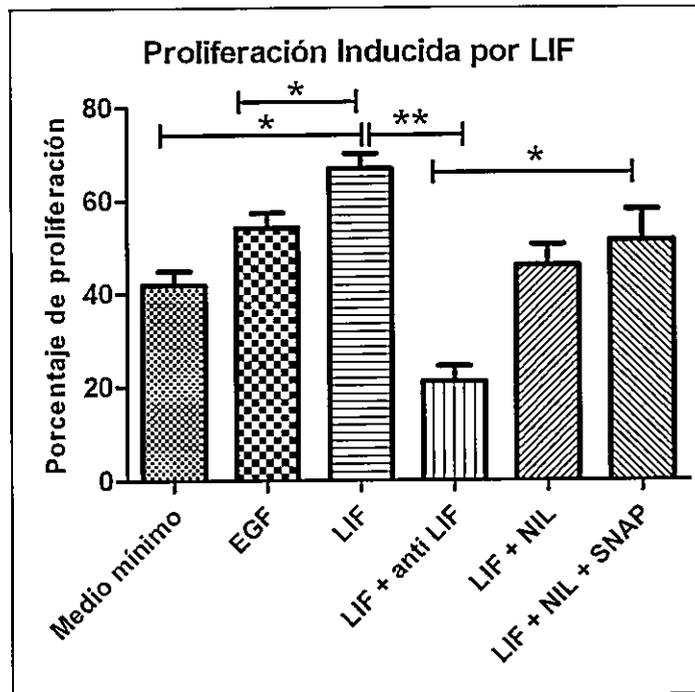


Figura 26. Proliferación en las células tratadas con LIF y con inhibidores de la vía LIF-iNOS-NO. Cuantificación de la inmunofluorescencia de BrdU. * p>0,05; ** p> 0,005 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

6.6.- Efecto de LIF sobre la Diferenciación de las Células derivadas de Neuroesferas

Para evaluar si LIF afecta la diferenciación de las células derivadas de neuroesferas, se estudió la expresión de los marcadores de diferenciación neuronal (Tub-β3) y glial (GFAP) por RT-PCR e inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos por RT-PCR (Figura 27) mostraron que en estas células se expresa el mensajero de Tub-β3 y GFAP, esta expresión aumenta cuando las células son incubadas con LIF. La cuantificación de estos resultados se muestra en la tabla 7 y en la figura 28.

<i>Diferenciación inducida por LIF</i> (% Expresión ± SEM)			
	<i>MM</i>	<i>EGF</i>	<i>LIF</i>
<i>TUB-B3</i>	69,2 ± 10,5	58,7 ± 7,1	99,0 ± 14,2
<i>GFAP</i>	56,5 ± 7,1	52,4 ± 9,6	74,8 ± 11

Tabla 7. Expresión de los mRNA de los marcadores de diferenciación neuronales (*TUB-B3*) y glial (*GFAP*) Cuantificación de RT-PCR de células crecidas en medio mínimo (MM); EGF (25 ng/mL); LIF (20 ng/mL) por 24 horas (n = 7). * p > 0,05 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

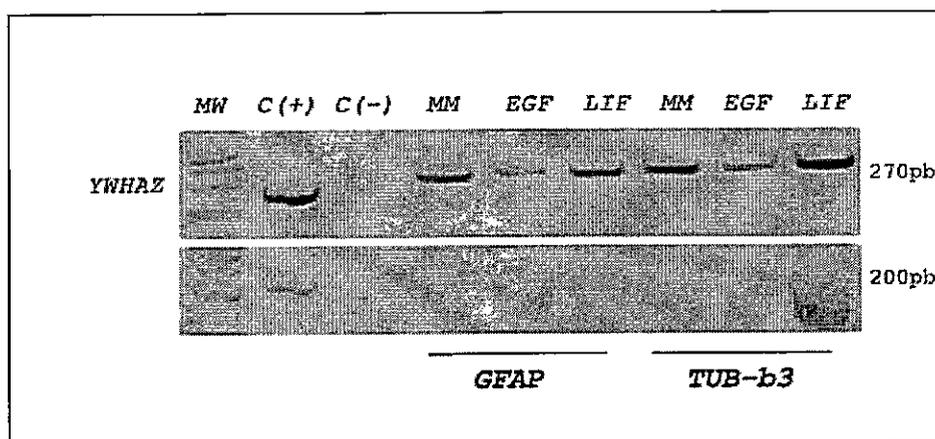


Figura 27. Expresión de los mRNA de *TUB-β3* y *GFAP* por RT-PCR. C(+) control positivo; extracción de RNA de epitelio olfatorio; C(-) control negativo. (MM) medio mínimo; EGF; LIF (n = 7). Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Lo anterior sugiere que LIF tiene un papel en la diferenciación de estas células y que en presencia de esta citoquina las células expresan principalmente marcadores neuronales y en menor cantidad marcadores gliales.

Para determinar si las células coexpresan ambos marcadores o son dos poblaciones diferentes de células, se estudio la expresión de estos por una doble inmunofluorescencia. El porcentaje de células que expresan ambos marcadores se determinó por conteo de las células que presentaban marca positiva para TUB- β 3 y GFAP. Se observó que GFAP y TUB- β 3 colocalizan en el $59,1 \pm 1,4$ % de las células tratadas con LIF. Además la TUB- β 3 se expresa en las células crecidas en los tres tratamientos realizados (MM; EGF; LIF), observándose una mayor expresión en las células tratadas con LIF (Figura 29 (a) ;(d) ;(g)). La marca para GFAP fue menor que para TUB- β 3 en los tres tratamientos realizados (Figura 29 (b); (e) ;(h)), siendo nuevamente mayor en las células tratadas con LIF (Figura 30 (h)) (n = 4). Por lo tanto las células derivadas de neuroesferas del epitelio olfatorio expresan a la vez marcadores de diferenciación glial y neuronal.

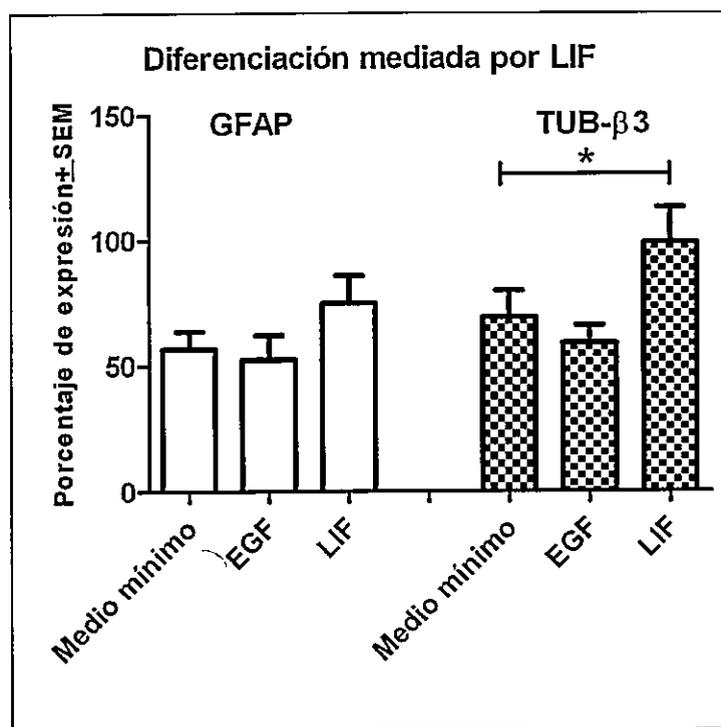


Figura 28. Cuantificación de la expresión de los mRNA de TUB- β 3 y GFAP en medio mínimo ; EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) (n = 7). * p>0,05 Test de ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett.

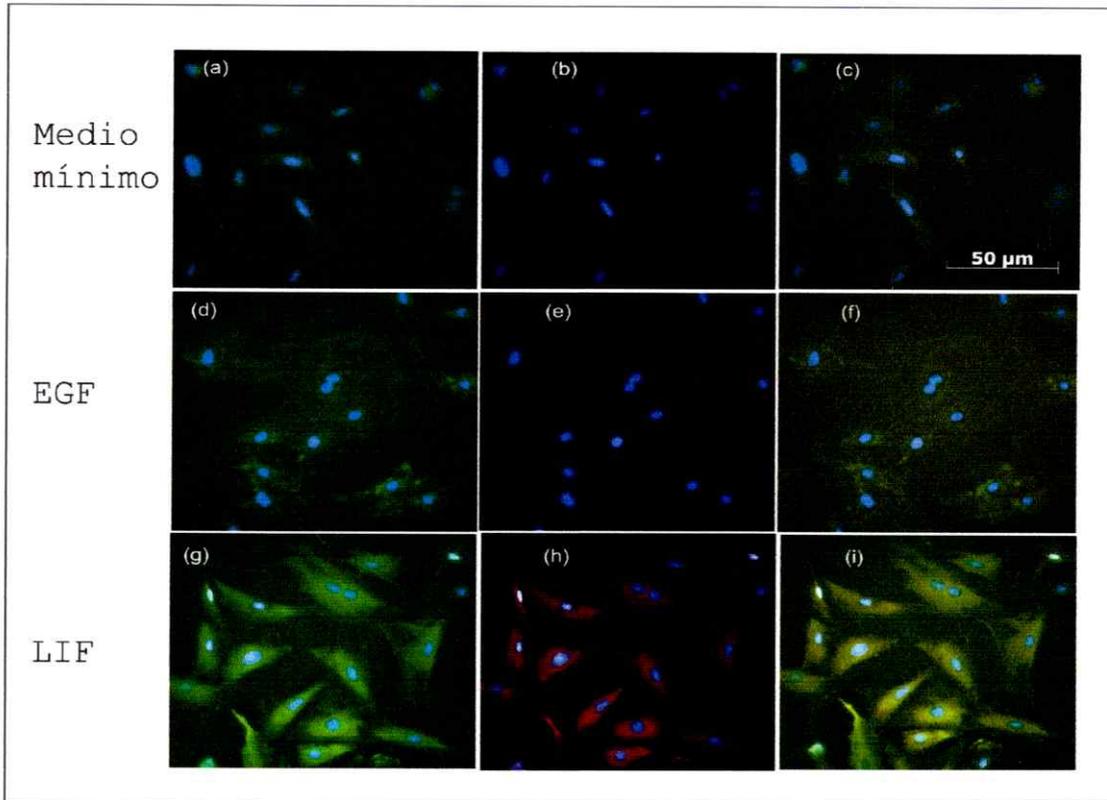


Figura 29. Efecto de LIF sobre la Diferenciación de las Células derivadas de Neuroesferas. Inmunofluorescencia de TUB- β 3 (verde) (a, d y g) y GFAP (rojo) (b, e y h); en azul tinción nuclear con sobreposición (c, f e i); (c; f; i) sobreposición.

Este experimento fue analizado también por citometría de flujo. Se observó que la cantidad de células que expresaron ambos marcadores después de 72 horas de tratamiento no presentaron cambios en ninguna de las tres condiciones (medio mínimo; EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) para GFAP (Figura 30(a)) y para TUB- β 3 (Figura 30(b)).

El análisis de la intensidad de fluorescencia obtenida para los dos marcadores indica que la intensidad de la fluorescencia es 5,5 veces mayor para TUB- β 3 sobre GFAP cuando las células se crecieron en medio mínimo, esta diferencia varió levemente en las células crecidas en EGF (4,4 veces mas de TUB- β 3 sobre GFAP) y aumentó a 11, 7 veces en las células tratadas con LIF, (Figura 31). Estos resultados fueron concordantes con lo obtenido por RT-PCR, lo que sugiere que las células que responden a LIF tienen como destino principal diferenciarse a neuronas olfatorias.

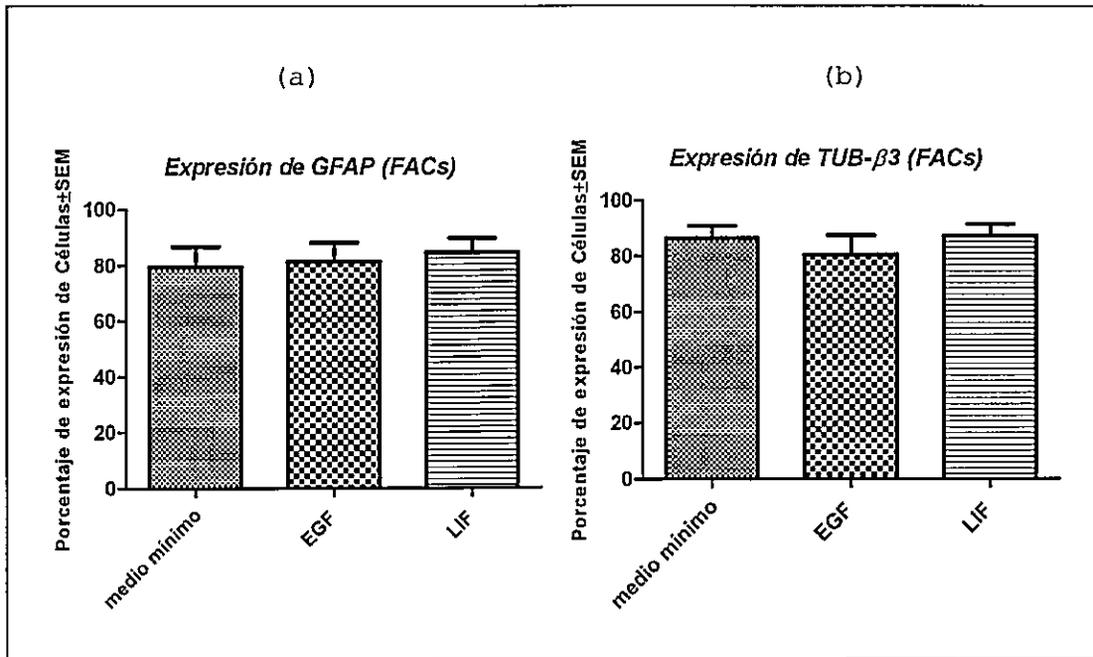


Figura 30. Porcentaje de Expresión de Marcadores de Diferenciación en Células derivadas de Neuroesferas en (a) expresión de GFAP; (b) TUB-B3. Tratamientos: medio mínimo; EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) por 72 horas. Cuantificación de los resultados obtenidos por Citometría de Flujo (n=3).

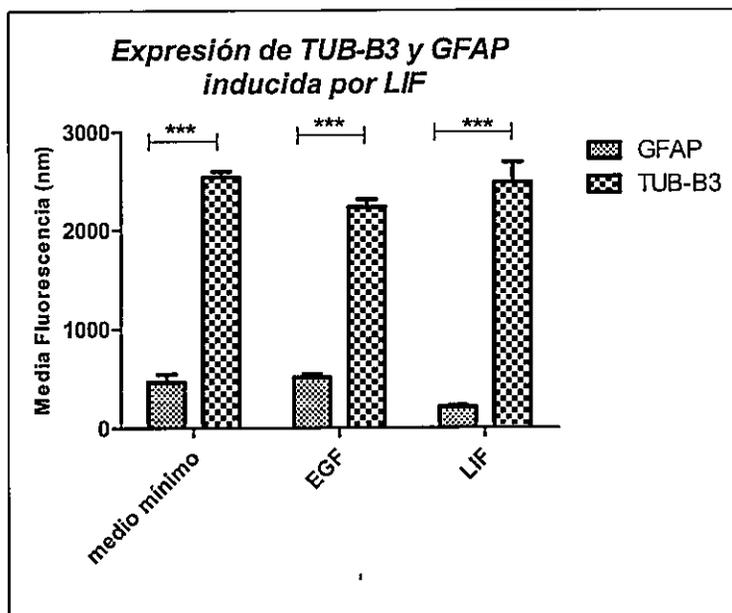


Figura 31. Expresión de Marcadores de Diferenciación GFAP y TUB-β3 en Células derivadas de Neuroesferas. Medio mínimo; EGF (25 ng/mL) y LIF (20 ng/mL) por 72 horas. Cuantificación de los resultados obtenidos por Citometría de Flujo (n=3). *** $p > 0,0005$. Test de ANOVA (no paramétrico).

7.- *Discusión*

En esta tesis se aisló y seleccionó una línea de células derivadas de neuroesferas, para lo cual fue necesario seleccionar y lograr crecer de forma estable y mantenida los precursores neuronales que se encuentran en las capas basales del epitelio mediante el ensayo de neuroesferas. Las células derivadas de neuroesferas presentan varias ventajas por sobre los cultivos primarios de precursores neuronales, como la capacidad de autorenovación, lo que permite generar una línea celular natural homogénea, capaz de producir una gran cantidad de células que sobreviven a repetidos pasajes. En cambio, en los cultivos primarios de precursores neuronales se obtienen muy pocas células (~40.000 células por cultivo); además en los cultivos primarios se obtienen distintos tipos celulares (Feron y cols., 1999) cuya sobrevivencia es limitada (~5 días), lo que dificulta su manipulación experimental. Otra ventaja de las neuroesferas es que no presentan ninguna intervención genómica, como la línea celular OLF-442 derivada de precursores neuronales a los cuales se les insertó el proto-oncogen *n-myc* para generar la inmortalidad (MacDonald, 1996). Esta inserción puede generar cambios en el genotipo celular, lo que podría derivar en resultados controversiales que no necesariamente representan lo que ocurre en el sistema estudiado. Por estos motivos, en esta tesis se optó por el ensayo de neuroesferas, pues a pesar de que se necesita un largo tiempo de cultivo, las células obtenidas presentan una muy buena aproximación del comportamiento de las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio. (Murrel y cols., 2005).

Una vez que se obtuvieron las células, se estudió el carácter multipotencial de estas mediante el análisis de la expresión del marcador de precursores neuronales SOX-2 (Chen y cols., 2007; Li y cols., 2001). La expresión de este marcador no varió con el tratamiento con LIF, lo que sugiere que el LIF no tiene un papel esencial en la diferenciación de estas células y que su papel sería promover la proliferación celular, efecto que está de acuerdo con lo reportado para esta citoquina en otros sistemas (Li y cols., 2007).

La vía por la cual LIF actúa en estas células no había sido descrita anteriormente; sin embargo, estaba descrito que el NO estimula la proliferación celular en el sistema nervioso (Olivier y cols., 2010; Sulz y cols., 2009), por lo que para validar la hipótesis de esta tesis fue necesario determinar si las células derivadas de neuroesferas expresaban tanto el receptor de LIF (LIFR) como la iNOS.

La expresión del receptor de LIF (LIFR) y de iNOS fue determinada por RT-PCR e inmunodetección. Los resultados muestran que las células expresan tanto el mensajero, como la proteína del receptor de LIF cuya expresión aumentó con el tratamiento con LIF. Esto muestra que en las células derivadas de neuroesferas, LIF induce la expresión de iNOS y que estas células responden a LIF aumentando la expresión de su receptor, lo que representaría una forma de amplificación de la respuesta a esta citoquina.

LIF activa la vía JAK/ STAT, en la cual el receptor de LIF fosforila a JAK, la que a su vez activa mediante fosforilación a la proteína STAT-3 (figura 3) que se transloca directamente al núcleo induciendo la expresión de diferentes genes blancos, como podría ser la iNOS (Chan y Fiscus, 2004). Consecuentemente con esto, determinamos que la iNOS se expresa basalmente en estas células, y que esta expresión se ve altamente aumentada cuando las células fueron tratadas con LIF e inhibida cuando se bloqueó el LIFR. De esta manera, un aumento en la expresión del receptor sería congruente con este masivo y rápido aumento de iNOS, teniendo en cuenta que este mecanismo debe responder rápidamente ante un daño tisular.

También se determinó que el tiempo de acción de LIF es relativamente corto; a las 12 horas de tratamiento se produce un aumento de la expresión del mensajero de iNOS, que decae a las 24 horas. Esto nos indica la rápida acción de LIF, dando indicios de que esta citoquina sería uno de los primeros factores que actúa ante un daño del epitelio olfatorio, activando la proliferación de los precursores neuronales con el fin de reemplazar las ORNs dañadas.

Que la acción de LIF sea mediada por esta vía es significativo, debido a que se ha descrito ampliamente en la literatura que el NO es un factor que promueve proliferación (Moreno-López y cols., 2000; Packer y cols., 2003, Sulz y cols., 2009). La rápida acción de NO presenta ventajas en su mecanismo de acción sobre otras vías de inducción proteína-proteínas como la vía de inducción de EGF (Ciardiello 1998).

El NO es un radical libre que actúa sobre diferentes proteínas produciendo S-nitrosilación. Se han reportado un gran número de proteínas que presentan grupos de cisteínas susceptibles a modificación por NO (Keynes y Garthwaite, 2004), lo que permitiría una activación de múltiples proteínas blanco, masificando la respuesta como por ejemplo

proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular como son p38 y p21 (Cuadrado y Nebreda, 2010; Mester y cols., 2008). Además el óxido nítrico, es un gas, que difunde rápidamente intra y extracelularmente, sin necesitar de la activación de proteínas suplementarias; sin embargo, una exposición prolongada puede producir daño celular y tisular por oxidación (Gui y cols., 2007). Los resultados obtenidos muestran que la inducción de iNOS y por ende la producción de óxido nítrico, ocurre rápida y transitoriamente, lo que es consistente con lo descrito en la literatura donde se ha mostrado que la producción de NO sería masiva, pero por un corto tiempo lo que evitaría un daño tisular por estrés oxidativo (Keynes, 2004).

En relación a este último punto, se ha descrito que en el sistema nervioso la isoforma neural y endotelial de la NOS producen leves y localizados aumentos de la concentración intracelular de NO, la iNOS en cambio produce un aumento de NO masivo principalmente frente un daño celular (Sulz y cols., 2009; Corsani y cols., 2008). Lo anterior es concordante con los resultados obtenidos en esta tesis. Este mecanismo también se ha descrito en el sistema inmune. Frente a un daño tisular masivo, se desencadena un proceso inflamatorio, y las células dañadas pueden liberar citoquinas que activan la proliferación celular y modulan la reparación del tejido dañado (Rock y cols., 2010).

Los experimentos realizados muestran que el LIF actúa sobre las células derivadas de neuroesferas aumentando la proliferación; la que disminuye drásticamente cuando se bloquea el LIFR indicando que el LIF interactúa específicamente con su receptor, iniciando una cascada de transducción que deriva finalmente en la inducción de la expresión de iNOS. Sin embargo, cuando se bloquea la iNOS la disminución de la proliferación celular es menor que la observada cuando se bloquea LIFR. Este efecto podría deberse a que el LIF induciría otros factores además de la iNOS, que pudieran actuar sobre la proliferación celular, como por ejemplo otras citoquinas.

En presencia de NO exógeno se pudo revertir la disminución de la proliferación inducida por el bloqueo del LIFR y de la iNOS, lo que apoya fuertemente la hipótesis que la vía de acción de LIF en la proliferación celular sería a través del incremento de los niveles de NO.

También se investigó si el LIF tenía un efecto sobre la diferenciación celular, ya que hay reportes de que en cultivos de neuroesferas generadas a partir de NSCs aisladas de embrión de ratón, el LIF induce la diferenciación hacia astrocitos (Pitman y cols., 2004). Lo

anterior sugiere que esta citoquina también podría tener un papel en dirigir la neurogénesis hacia un tipo celular determinado, que en el epitelio olfatorio sería la generación de nuevas neuronas olfatorias. Para estudiar esta posibilidad, se evaluó la diferenciación celular por la expresión de marcadores neuronales (TUB- β 3) y gliales (GFAP). Los resultados obtenidos muestran que ambos marcadores colocalizan en los precursores neurales, se expresan basalmente y que la expresión de ambos aumenta cuando las células son tratadas con LIF, siendo mucho mayor en el caso de los marcadores neuronales. Esto podría indicar que las células estudiadas presentan un fenotipo mixto (entre células glial y neuronal) previo a la diferenciación hacia un tipo celular determinado, este fenómeno ha sido descrito en otros tipos celulares como Hepatocitos (Gascon y cols., 2010). Estos experimentos fueron realizados por 24 horas, lo que es un tiempo relativamente corto para producir una diferenciación a un fenotipo celular determinado. En experimentos realizados durante 3 días en presencia de LIF se encontró que las células expresan mayormente TUB- β 3 (no mostrado), lo que sería congruente con la función atribuida al LIF de promover la proliferación de precursores neuronales, que posteriormente se diferencian a neuronas olfatorias maduras.

Estos resultados no muestran que el LIF induzca la diferenciación de las células a neuronas, por lo que en el epitelio olfatorio habrían otros factores que promoverían la diferenciación de los precursores neuronales, como podrían ser IGF-1 y BDNF (Klein y cols., 2010; Yi y cols., 2010). Los resultados confirman nuestra hipótesis, apoyando la participación del LIF en el proceso de proliferación de los precursores neuronales, y que para lograr una diferenciación efectiva, se necesitaría de tratamientos combinados con otros factores que induzcan la diferenciación celular.

Se ha descrito la participación de LIF promoviendo no sólo la mitosis y la diferenciación celular sino también estimulando la supervivencia celular en sistemas tan diversos como tejido adiposo, tejido pancreático, células troncales embrionarias y sistema inmune (Chen y cols., 2009; Gurda y cols., 2010; He y cols., 2006; Najjar y cols., 2009).

LIF ha sido implicado en la neurogénesis promoviendo la proliferación de precursores neuronales de células embrionarias y de animales adultos (Bauer y cols., 2003). Sin embargo, el mecanismo por el cual actúa LIF en el epitelio olfatorio no había sido descrito

previamente. En esta tesis hemos encontrado evidencias contundentes que LIF actúa mediante la inducción de la iNOS y que es a través de esta vía que se produciría un aumento de la proliferación de los precursores neuronales de forma rápida. En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis, demuestran que LIF, mediante la inducción de iNOS, activa la proliferación e influye en la diferenciación en células derivadas de neuroesferas de epitelio olfatorio.

Los resultados obtenidos muestran un tipo de mecanismo implicado en la regeneración de tejido nervioso dañado, identificando específicamente algunos de los factores que están involucrados. Esto podría ser de gran importancia clínica, ya que estos factores podrían ser utilizados en el futuro para terapias celulares destinadas a la renovación neuronal de diferentes enfermedades neurodegenerativas que afectan a la población humana.

8.- Referencias.

Altman J. y Das G. (1965). Autorradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.

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

Buddensiek J., Dressel A., Kowalski M., Runge U., Schroeder H., Hermann A., Kirsch M., Storch A. y Sabolek, M. (2010). Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC Neurosci* 11, 48.

Ciardello F. y Tortora G. (1998). Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 4, 821-828.

Corsani L., Bizzoco E., Pedata F., Gianfriddo M., Fausone-Pellegrini M. y Vannucchi M. (2008). Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion. *Exp Neurol* 211, 433-440.

Cuadrado A. y Nebreda A. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.

Chan G. y Fiscus R. (2004). Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. *Exp Gerontol* 39, 387-94.

Chen F., Hou M., Ye F., Lv W. y Xie X. (2009). Ovarian cancer cells induce peripheral mature dendritic cells to differentiate into macrophagelike cells in vitro. *Int J Gynecol Cancer* 19, 1487-1493.

Chen S., Choo A., Nai-Dy W., Heng-Phon T. y Oh S. (2007). Knockdown of Oct-4 or Sox-2 attenuates neurogenesis of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16, 413-420.

Deleyrolle L. y Reynolds B. (2009). Isolation, expansion, and differentiation of adult Mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol* 549, 91-101.

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

Getchell T., Shah D., Partin J., Subhedar N. y Getchell M. (2002). Leukemia inhibitory factor mRNA expression is upregulated in macrophages and olfactory receptor neurons after target ablation. *J Neurosci Res* 67, 246-254.

Gould E., Tanapat P., McEwen B., Flugge G. y Fuchs E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci* 95, 3168-3171.

Graziadei P. (1973). Cell dynamics in the olfactory mucosa. *Tissue Cell* 5, 113-131.

Graziadei P., Levine R. y Monti Graziadei G. (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 4, 713-727.

Gascon E., Gaillard S., Malapert P., Liu Y., Rodat-Despoix L., Samokhvalov I., Delmas P., Helmbacher F., Maina F. y Moqrich A. (2010). Hepatocyte growth factor-Met signaling is required for Runx1 extinction and peptidergic differentiation in primary nociceptive neurons. *J Neurosci* 30, 12414-12423.

Gui J., Song Y., Han N. y Sheu F. (2007). Characterization of transcriptional regulation of neurogranin by nitric oxide and the role of neurogranin in SNP-induced cell death: implication of neurogranin in an increased neuronal susceptibility to oxidative stress. *Int J Biol Sci* 3, 212-224.

Gurda G., Crozier S., Ji B., Ernst S., Logsdon C., Rothermel B. y Williams, J. (2010) Regulator of Calcineurin 1 Controls Growth Plasticity of Adult Pancreas. *Gastroenterology* 139, 609-19.

Hatta T., Moriyama K., Nakashima K., Taga T. y 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.

He Z., Li J., Zhen C., Feng L. y Ding X. (2006). Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. *Acta Pharmacol Sin* 27, 80-90.

Hermanson O., Jepsen K. y Rosenfeld M. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934-939.

Iwai N. y Zhou Z. (2008). Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 26, 1298-1306.

Keynes R. y Garthwaite J. (2004). Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med* 4, 179-191.

Kim E., Simpson P., Park D., Liu B., Ronnett G. y Moon C. (2005). Leukemia inhibitory factor is a proliferative factor for olfactory sensory neurons. *Neuroreport* 16, 25-28. Erratum in: *Neuroreport* 16, 311.

Kinoshita M., Shinoda Y., Sakai K., Hashikawa T., Watanabe M., Machida T., Hirabayashi Y. y Furuya S. (2009). Selective upregulation of 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) expression in adult subventricular zone neurogenic niche. *Neuro Sci Lett* 453, 21-26.

Kleinert H., Schwarz P. y Forstermann U. (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384, 1343-1364.

Klein A., Williamson R., Santini M., Clemmensen C., Ettrup A., Rios M., Knudsen G., Aznar S. (2010). Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol* 7, 1-7.

Komitova M., Zhao L., Gido G., Johansson B., y Eriksson P. (2005). Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. *Eur J Neurosci* 21, 2397-2405.

Li M., Price D. y Smith A. (2001). Lineage selection and isolation of neural precursors from embryonic stem cells. *Symp Soc Exp Biol* 53, 29-42.

Li F., Liu Y., Chen D., Lin X., Li J., Wang J., Peng Y., Wang S. y Wang Y. (2007). Leukemia inhibitory factor-expressing human embryonic lung fibroblasts as feeder cells for human embryonic germ cells. *Cells Tissues Organs* 186, 221-228.

Li H., Liu H., Corrales C., Risner J., Forrester J., Holt J., Heller, S. y Edge, A. (2009). Differentiation of neurons from neural precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 10, 122.

MacDonald K., Mackay-Sim A., Bushell G. y Bartlett P. (1996). Olfactory neuronal cell lines generated by retroviral insertion of the n-myc oncogene display different developmental phenotypes. *J Neurosci Res* 45, 237-47.

Mester J. y Redeuilh G. (2008). Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 872-885.

Moreno-López B., Noval J., González-Bonet L. y Estrada C. (2000). Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res* 869, 244-250.

Moon C., Yoo J., Matarazzo V., Sung Y., Kim E. y Ronnett G. (2002). Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci* 99, 9015-9020.

Moulton D. (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. y Mackay-Sim A. (2005). Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 233, 496-515.

Najar M., Raicevic G., Id Boufker H., Fayyad Kazan H., Debruyne C., Meuleman N., Bron D., Toungouz M. y Lagneaux L. (2009). Adipose tissue and Wharton's Jelly derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A* 16, 3537-46.

Olivier P., Loron G., Fontaine R., Pansiot J., Dalous J., Thi H., Charriaut-Marlangue C., Thomas J., Mercier J., Gressens P. y Baud O. (2010). Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 828-837.

Packer M., Stasiv Y., Benraiss A., Chmielnicki E., Grinberg A., Westphal H., Goldman S. y Enikolopov G. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 100, 9566-9571.

Palma V., Lim D., Dahmane N., Sánchez P., Brionne T., Herzberg C., Gitton Y., Carleton A., Álvarez-Buylla A. y Ruiz i Altaba A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335-344.

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

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

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

Rock K., Latz E., Ontiveros F. y Kono H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28, 321-42.

Ruiz i Altaba A., Palma V. y Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3, 24-33.

Satoh M. y Yoshida T. (1997). Promotion of neurogenesis in mouse olfactory neuronal progenitor cells by leukemia inhibitory factor in vitro. *Neurosci Lett* 225, 165-168.

Shimazaki T., Shingo T. y Weiss S. (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21, 7642-7653.

Sievers J., Pehlemann F., Gude S., Hartmann D. y Berry, M. (1994). The development of the radial glial scaffold of the cerebellar cortex from GFAP-positive cells in the external granular layer. *J Neurocytol* 23, 97-115.

Sulz L. y Bacigalupo J. (2006). Role of nitric oxide during neurogenesis in the olfactory epithelium. *Biol Res* 39, 589-599.

Sulz L., Astorga G., Bellette B., Iturriaga R., Mackay-Sim A. y Bacigalupo J. (2009). Nitric oxide regulates neurogenesis in adult olfactory epithelium in vitro. *Nitric Oxide* 20, 238-252.

Takaki E., Fujimoto M., Sugahara K., Nakahari T., Yonemura S., Tanaka Y., Hayashida N., Inouye S., Takemoto T., Yamashita H. y Nakai, A. (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem* 281, 4931-4937.

Taupin J., Miossec V., Pitard V., Blanchard F., Daburon S., Rahe S., Jacques Y., Godard A. y Moreau J. (1999). Binding of leukemia inhibitory factor (LIF) to mutants of its low affinity receptor, gp190, reveals a LIF binding site outside and interactions between the two cytokine binding domains. *J Biol Chem* 274, 14482-14489.

Yi J., Barnes A., Hand R., Polleux F. y Ehlers M. (2010). TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell* 142, 144-157.