



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Lípidos como moléculas señal durante la
diferenciación de células madre**

Presentada por

Aneley N. Montaner

Licenciada en Biotecnología

Rosario, Argentina

2018

LÍPIDOS COMO MOLÉCULAS SEÑAL DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE

Aneley N. Montaner

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Lípidos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET) dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre febrero de 2013 y diciembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Claudia Banchio y la co-dirección del Dr. Javier Girardini.

Directora: Dra. Claudia Banchio.....

Co-Director: Dr. Javier Girardini.....

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:

AGRADECIMIENTOS

**“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”
Julio Cortázar**

Infinitas **GRACIAS** a todos los que me acompañaron y ayudaron a transitar este camino.

El desafío fue enorme, y la alegría de llegar, inmensa. Gracias a todos los que me ayudaron a formarme profesionalmente, y a crecer personalmente.

Porque me enseñaron a cuestionarme, a razonar, a discutir científicamente.

Porque coseché muchas amistades verdaderas, genuinas, que perdurarán más allá de esta Tesis. Porque al ser compartidas, las alegrías se multiplicaron, y las frustraciones se dividieron.

Porque fortalecí lazos con las amistades de siempre.

Porque me sentí acompañada por mi pareja en los momentos difíciles. Porque me tuvo paciencia y me transmitió paz y tranquilidad.

Porque me apoyé en mi familia cada vez que lo necesité y confiaron en mí. Porque lo siguen haciendo. Porque me brindaron su tiempo para escucharme y aconsejarme siempre. Porque me alentaron a seguir. Porque me enseñaron, entre tantas cosas, que la constancia y la perseverancia son cualidades indispensables para lograr cualquier objetivo. Este logro es también de ustedes.

Porque estoy rodeada de buena gente, con valores inconmensurables, que me hacen ser mejor persona cada día.

Porque sin ustedes, no hubiera sido posible.

GRACIAS

Parte de los resultados que se describen en el presente Trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- **Montaner, A;** da Silva Santana, T.; Schroeder, T.; Einiker-Lamas, M.; Girardini, J.; Costa, M. and Banchio, C. Specific phospholipids regulate the acquisition of neuronal and astroglial identities in post-mitotic cells. (2018) *Scientific Reports*, 8:460
- Paoletti, L.; Domizi, P.; Marcucci, H.; **Montaner, A.**; Krapf, D.; Salvador, G.; and Banchio, C. Lysophosphatidylcholine drives neuroblast cell fate. (2016) *Mol Neurobiol* 53, 6316-6331.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

▪ Perez, C.; **Montaner, A.** y Banchio, C. “Effect of phospholipids on neural stem cell proliferation and differentiation under oxidative stress” Reunión conjunta de sociedades de Biociencias, 13-17 de Noviembre de 2017, Buenos Aires, Argentina. Tipo de presentación: e-poster.

▪ Berca, C.; **Montaner, A.**; Rodriguez, J.; Banchio, C. y Robert, C. “Cryopreservation of embryonic neural stem cells (ENSCs) by slow cooling technique”. Reunión conjunta de sociedades de Biociencias, 13-17 de Noviembre de 2017, Buenos Aires, Argentina. Tipo de presentación: e-poster.

▪ **Montaner, A.**; Costa, M. y Banchio, C. “Neural stem cell differentiation induced by Lipids”. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 7-10 de Noviembre 2016, Córdoba, Argentina. Tipo de presentación: Comunicación oral

▪ Malizia F; **Montaner A.**; Elena C.; Banchio C. “Role of Phosphatidylcholine biosynthesis on neuronal differentiation”. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 7-10 de Noviembre 2016, Córdoba, Argentina. Tipo de presentación: Poster

▪ **Montaner, A.**; Girardini, J. y Banchio, C. “Diferenciación de células madre neuronales inducida por lípidos”. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC),

18-21 Noviembre 2015, Mar del Plata, Argentina. Tipo de presentación: Comunicación Oral

▪ Balaban, C.; **Montaner**, A.; Soldano, A.; Banchio, C. y Ceccarelli, E. “Redox Protein import to eucariotic cells by cell penetrating peptide TAT”. SAIB, Noviembre 2015, Mar del Plata, Argentina. Tipo de presentación: Póster

▪ **Montaner**, A.; Girardini, J. y Banchio, C. “Lipids as signals in stem cell differentiation”. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Noviembre de 2014, Rosario, Argentina. Tipo de presentación: Comunicación oral

▪ **Montaner**, A.; Girardini, J. y Banchio, C. “Fosfatidilcolina: Rol durante la diferenciación de células madre neuronales embrionarias.” Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 6-7 de Noviembre de 2013, Buenos Aires, Argentina. Tipo de presentación: Poster.

ESTADÍA EN EL EXTERIOR

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis han sido obtenidos durante la siguiente estadía en el exterior:

- Estadía en el laboratorio de neurobiología celular, en el Instituto do Cerebro, Universidade Federal Rio Grande do Norte, Natal, Brasil, durante el período Agosto-Octubre de 2014. Financiamiento: Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES) de Brasil.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
LENGUAJE ESPECIAL	12
RESUMEN	13
<i>1. Introducción</i>	15
1.1 Células madre	16
1.1.1 Clasificación	16
1.1.2 Células madre neurales	17
1.2 Formación de la corteza lateral	18
1.3 Especificación espacial	19
1.4 Progenitores corticales	21
1.4.1 Características del árbol filogenético de progenitores corticales	23
1.5 Cambio de neurogénesis a gliogénesis.....	26
1.6 Neuroesferas como modelo de estudio	27
1.6.1 Linaje y potencial neuronal	28
1.7 Vías de señalización involucradas en la diferenciación de NSCs.....	29
1.7.1 Vía de señalización MEK/ERK	29
1.7.1.1 Rol de MEK en la neurogénesis y gliogénesis	31
1.7.2 Vía de señalización PKA.....	32
1.7.2.1 Rol de PKA en la diferenciación neuronal.....	33
1.8 Lípidos en la señalización celular	33
1.8.1 Composición de la membrana de células eucariotas	33
1.8.2 Lípidos en la diferenciación neuronal	35
1.9 Daño cerebral y reparación	37
<i>2. Objetivos</i>	39
2.1 OBJETIVO GENERAL	40
2.2 OBJETIVO PARTICULAR	40
<i>3. Materiales y Métodos</i>	41
3.1 Animales	42
3.2 Condiciones y medios de cultivo	42

3.3 Aislamiento de NSCs y cultivo de neuroesferas.....	43
3.4 Disgregación de neuroesferas	43
3.5 Cultivo en condiciones de diferenciación.....	44
3.6 Cultivo Primario.....	44
3.7 Congelamiento de NSCs	44
3.8 Inmunofluorescencia	44
3.8.1 Triple Marcación	46
3.9 Preparación de extractos proteicos	47
3.10 Cuantificación de proteínas.....	47
3.11 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	47
3.12 Western Blot.....	48
3.13 Viabilidad celular mediante ensayo MTT	49
3.13.1 MTT en condiciones de diferenciación	49
3.13.2 MTT en condiciones de proliferación	50
3.14 Ensayo de diferenciación con inhibidores farmacológicos	50
3.15 Evaluación cualitativa de los niveles de ROS intracelular	50
3.16 Ensayo de citotoxicidad LDH	51
3.17 Ensayo de BrdU.....	51
3.18 Microscopía de lapso de tiempo.....	52
3.19 Preparación de liposomas	52
3.20 Marcación de liposomas.....	53
3.21 Extracción de lípidos	53
3.22 Cromatografía en capa delgada monodimensional	53
3.23 Cromatografía en capa delgada bidimensional	54
3.24 Análisis digital de imágenes	54
3.25 Análisis estadístico.....	54
4. Resultados.....	55
4.1 Optimización del cultivo NSCs	56
4.2 Estudio de la composición lipídica de NSCs.....	57
4.3 Efecto del agregado de fosfatidilcolina en la diferenciación de NSCs <i>in Vitro</i>	59
4.3.1 Análisis del destino de los liposomas de PC en cultivos de NSCs.....	62

4.3.2 Efecto de PC a diferentes tiempos	63
4.4 Efecto del agregado de fosfatidiletanolamina en la diferenciación de NSCs <i>in vitro</i>	64
4.5 Análisis de la proliferación celular	66
4.5.1 Análisis de la proliferación celular mediante microscopía de lapso de tiempo. 66	
4.5.1.1 Análisis del modo de división celular mediante microscopía de lapso de tiempo	68
4.5.2 Análisis de la proliferación mediante marcación con Bromodesoxiuridina	71
4.5.3 Estudio de los niveles proteicos del antígeno nuclear de proliferación celular por Western Blot	72
4.6 Análisis de la supervivencia.....	73
4.6.1 Análisis de la viabilidad mediante MTT.....	73
4.6.2 Análisis de la viabilidad mediante microscopía de lapso de tiempo.....	74
4.6.3 Análisis de la viabilidad mediante el estudio de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	75
4.7 Análisis de la aceleración de la diferenciación neuronal y astroglial	76
4.8 Estudio del cambio en la especificación celular luego del agregado de PC o PE... 78	
4.8.1 Análisis del destino celular mediante microscopía de lapso de tiempo.....	79
4.8.1.1 Análisis del destino de progenitores corticales	79
4.8.1.2 Análisis del destino de precursores corticales	79
4.8.2 Estudio de poblaciones post-mitóticas mediante inmunofluorescencia.....	80
4.9 Estudio de los mecanismos moleculares.....	83
4.9.1 Identificación de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal inducida por PC	83
4.9.1.1 Vía de señalización PKA/CREB	83
4.9.1.2 Vía de señalización MEK/ERK	86
4.9.2 Identificación de los mecanismos moleculares de NSCs involucrados en la diferenciación neuronal debido al efecto de PE	87
4.10 Estudio del efecto de PC y PE en la renovación de NSCs	90
4.11. Efecto de la suplementación de PC y PE en cultivos primarios.....	94
4.12 Estudio del daño celular por estrés oxidativo en NSCs	97
4.12.1 Efecto de la suplementación de peróxido de hidrógeno a cultivos de NSCs ...	97

4.12.2 Estudio de la diferenciación neuronal en condiciones de estrés oxidativo ...	100
<i>5. Discusión</i>	102
5.1 Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación mediada por lípidos	107
5.2 Daño neuronal y efecto de PC en la reparación.....	109
<i>6. Conclusiones</i>	110
<i>7. Bibliografía</i>	112

ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: Adenosina monofosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

ATP: Adenosina trifosfato

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

BSA: Albúmica sérica bovina

CP: Placa cortical

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta del AMPc

CT-1: Cardiotrofina-1

DAG: Diacilglicerol

DCF: 2',7'-diclorofluorescina fluorescente

DCFH: 2',7'-diclorofluorescina

DCFH-DA: 2',7'-diclorofluorescina diacetato

DDA: 2'3'dideoxiadenosina

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

E9: Desarrollo embrionario a los 9 días de gestación

E13-15: Desarrollo embrionario a los 13-15 días de gestación

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EM: Esfingomielina

ERK: Quinasa activada por señales extracelulares

F12: Mezcla de nutrientes

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GPL: Glicerofosfolípidos

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPE: Lisofosfatidiletanolamina

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos

MAP2K: MAPK quinasa

MAP3K: MAPK quinasa quinasa

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NE: Células neuroepiteliales

NSCs: Células madre neurales

PBS: Buffer salino de fosfatos

PC: Fosfatidilcolina

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

p-CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta del AMPc fosforilada

PDL: Poli-D-lisina

PE: Fosfatidiletanolamina

PEBP: Proteínas de unión a fosfatidiletanolamina

p-ERK: Quinasa activada por señales extracelulares fosforilada

PI: Fosfatidilinositol

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLA2: Fosfolipasa A2 citoplasmática

PMA: Forbol 12-miristato-13 acetato

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP: Pre-placa

PS: Fosfatidilserina

RG: Células gliales radiales

RKIP: Proteína inhibidora de Raf

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SP: Subplaca

SVZ: Zona subventricular

TLC: Cromatografía en capa delgada

VZ: zona ventricular

ZM: Zona marginal

LENGUAJE ESPECIAL

Buffer: Solución reguladora de pH

Western Blot: Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

RESUMEN

En este trabajo de Tesis se demuestra cómo ciertos lípidos son capaces de regular la diferenciación de células madre neurales (NSCs). Estas células, presentes en el cerebro adulto, tienen la capacidad de migrar y diferenciarse a neuronas luego de una lesión cerebral. Sin embargo, debido a que el proceso de regeneración neuronal no es completo, surge la necesidad de identificar moléculas que tengan la capacidad de aumentar el proceso de diferenciación en NSCs. Como modelo de estudio, se utilizaron NSCs embrionarias obtenidas de la corteza lateral de ratones de 13-15 días de gestación, amplificadas mediante el método de neuroesferas.

En primer lugar, se demostró que diferentes fosfolípidos inducen la diferenciación neuronal de manera selectiva: fosfatidilcolina (PC) promueve la diferenciación neuronal, mientras que fosfatidiletanolamina (PE) aumenta la población de astrocitos.

En base a estos resultados, se decidió estudiar de qué manera ambos fosfolípidos regulan el proceso de diferenciación. Se comprobó que la población de progenitores neuronales y astrogliales no se altera en presencia de PC o PE, es decir, no se promueve la proliferación celular de progenitores específicos. Además, tampoco se modifica el número de células viables, demostrando así que los fosfolípidos no ejercen efecto neuroprotector. Al mismo tiempo, se evidenció que el aumento en la diferenciación no ocurre por una aceleración del proceso de diferenciación neuronal o astrogliar. Mediante la utilización de microscopía de lapso de tiempo y del análisis por inmunofluorescencia de las poblaciones celulares presentes en el cultivo de NSCs, se demostró que tanto PC como PE actúan en la población de células post-mitóticas. Específicamente, PC promueve la diferenciación neuronal alterando el destino de células precursoras astrogliales e indiferenciadas. Por otro lado, PE induce la diferenciación astrogliar a expensas de una disminución en la población de células indiferenciadas.

Posteriormente, se estudiaron los mecanismos moleculares involucrados en cada caso, y se comprobó que PC activa la vía de señalización PKA/CREB, así como PE promueve la diferenciación astrogliar por un mecanismo dependiente de la activación de la vía de señalización MEK-ERK.

Desde el punto de vista terapéutico, es importante que los lípidos modifiquen la especificación de NSCs en ambientes reactivos de daño cerebral. Por este motivo, se estudió el efecto de PC en una condición de estrés oxidativo. Se utilizó el compuesto peróxido de hidrogeno para generar estrés oxidativo en cultivos de NSCs, y se demostró que PC promueve la diferenciación neuronal, aún en condiciones de daño cerebral.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de Tesis contribuyen al conocimiento de los mecanismos que regulan la diferenciación de NSCs y aportan herramientas para el desarrollo de nuevas estrategias para inducir la diferenciación neuronal de NSCs en condiciones de daño celular.

1. Introducción

1.1 Células madre

Durante la embriogénesis, un ovocito fecundado da lugar a un organismo multicelular cuyas células y tejidos han adoptado diferentes características para desempeñar funciones específicas en el organismo adulto. Incluso en la adultez, algunos tejidos mantienen un proceso de homeostasis, en el que cuando una célula muere (ya sea por muerte celular programada o por una lesión), es reemplazada por una nueva. La epidermis y el tejido hematopoyético son ejemplos de tejidos adultos que se encuentran e en constante recambio celular [1]. Esta habilidad del ovocito fecundado de generar diferentes tipos celulares, y de ciertos tejidos adultos de regenerarse, es resultado de la presencia de células madre.

Las células madre son un tipo celular capaz de dividirse asimétricamente. En dicha división celular, una de las células hijas mantiene las mismas características de la célula madre, mientras que la otra adquiere la capacidad de diferenciarse a un tipo celular específico. Por lo tanto, las células madre pueden definirse de acuerdo a tres características importantes: primero, por su habilidad de renovación, generando copias idénticas de sí mismas; segundo, por su potencial para generar las principales líneas celulares de un organismo; y tercero, por la habilidad para generar y/o regenerar tejidos [2].

1.1.1 Clasificación

Las células madre pueden clasificarse de acuerdo con su capacidad o potencial para diferenciarse en diferentes tipos celulares. Las células madre totipotentes pueden generar un organismo completo. Las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) pero no pueden formar un organismo completo debido a que no son capaces de generar tejido extraembrionario (cordón umbilical, trofoblastos y estructuras asociadas). Las células madre multipotentes, en cambio, solo pueden generar un rango limitado de tipos celulares. Finalmente, las células madre unipotentes, también llamadas células progenitoras, son células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en solo un tipo de células [3].

Además, las células madre pueden clasificarse dependiendo de la etapa del desarrollo: células madre embrionarias si se encuentran en el embrión, o células madre adultas si se encuentran en nichos específicos en el organismo adulto [4].

1.1.2 Células madre neurales

Las NSCs son células madre multipotentes que tienen la capacidad de generar los tres tipos principales de células del sistema nervioso central (SNC): neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [5].

Durante la embriogénesis, el SNC se desarrolla a partir de células neuroepiteliales (NE) presentes en el tubo neural. En etapas tempranas del desarrollo, las células NE se dividen simétricamente generando nuevas células. Entre los 9 y 10 días del desarrollo embrionario, las células NE sufren una transformación hacia células gliales radiales (RG). Dicha transformación involucra cambios tanto en la expresión génica, como en las características citológicas. Sin embargo, ambos tipos celulares poseen polaridad ápico-basal, que provee una arquitectura radial estable a lo largo de todo el desarrollo embrionario: la membrana apical está en contacto con el ventrículo, mientras que la membrana basal está en contacto con la lámina basal, las meninges, y los vasos sanguíneos. Las células RG se dividen asimétricamente: una de las células hijas adquiere fenotipo neuronal, mientras que la otra es una célula progenitora. Dicha división asimétrica puede ser directa, o indirecta, a través de progenitores intermediarios [5], [6].

El proceso de neurogénesis ocurre entre la etapa E13-E18. Luego, las células RG comienzan a generar células de la glía: astrocitos y oligodendrocitos. Los astrocitos tienen su máximo de formación en el período neonatal, mientras que los oligodendrocitos se diferencian en el período postnatal [7]. En el cerebro de mamíferos adultos, las NSCs permanecen en regiones específicas: la zona subventricular (SVZ) de las paredes de los ventrículos laterales y la capa subgranular del giro dentado del hipocampo. En la Figura 1 se observa un esquema del proceso del desarrollo embrionario de NSCs.

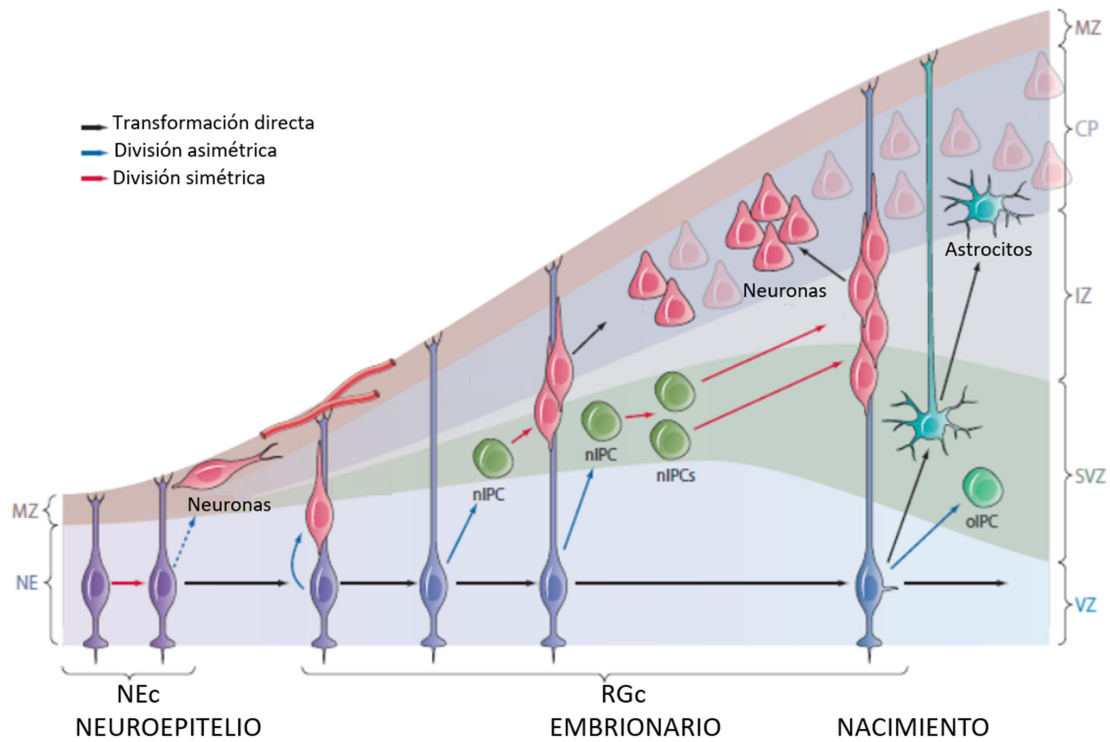


Figura 1. Neurogénesis en el desarrollo neuronal. NEc: células neuroepiteliales, RGc: células de la glía radial; NE: Neuroepitelio; VZ: zona ventricular; SVZ: zona subventricular; MZ: zona marginal; IZ: zona intermedia; CP: placa cortical; nIPC: progenitores corticales neuronales; oIPC: progenitores corticales de oligodendroctios. Adaptado de [5].

1.2 Formación de la corteza lateral

La corticogénesis ocurre de forma secuencial a partir de los progenitores que se encuentran en la zona ventricular (ZV) y subventricular (SZV). Se ha demostrado que, en la corteza cerebral, las células de la pre-placa (PP) son las primeras en generarse. La pre-placa se divide luego en la zona marginal (ZM) y en la subplaca (SP), entre las cuales se forma la placa cortical (CP). La placa CP contiene las neuronas corticales que siguen un patrón de formación desde dentro hacia fuera: las neuronas que forman las capas más profundas (capas V y VI) son las primeras en formarse, seguidas por las neuronas destinadas a las capas más superficiales (capas IV, III y II), excepto por las células de la capa I (neuronas Cajal-Retzius), que son las primeras en formarse y se encuentran en la capa más externa [8], [9] (Figura 2).

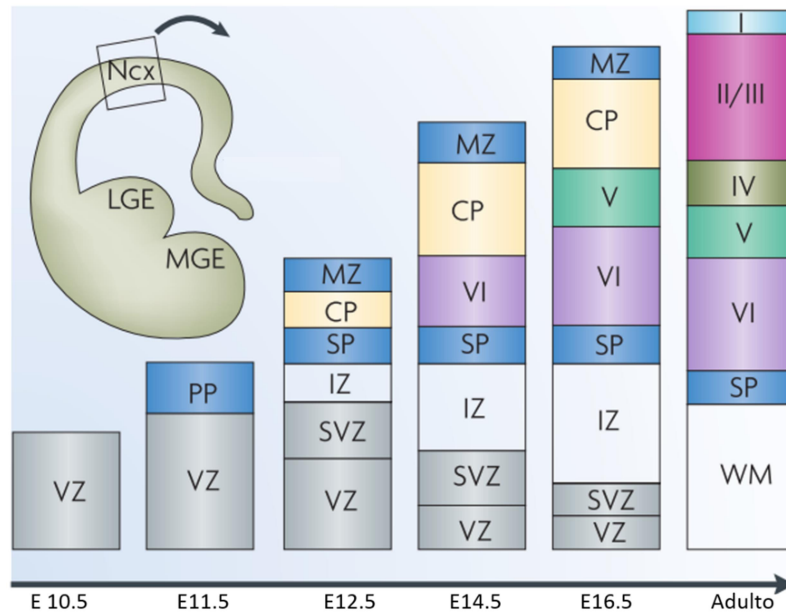


Figura 2. Histogénesis de corteza lateral. Desarrollo de la corteza lateral perteneciente a ratones. Ncx: Corteza lateral; LGE: eminencia ganglionar lateral; MGE: eminencia ganglionar media; VZ: zona ventricular; PP: pre-placa; SVZ: zona subventricular; IZ: zona intermedia; SP: subplaca; CP: placa cortical; MZ: zona marginal; WM: materia blanca; I, II, III, IV, V y VI: capas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Adaptado de [10].

El patrón de formación fue demostrado a partir de roedores en fase gestacional a los cuales se les inyectó Timidina- H^3 para marcar células que están en división mitótica. Experimentalmente, las hembras preñadas fueron inyectadas con Timidina- H^3 a los 11, 13 y 15 días de desarrollo y los cerebros fueron luego analizados en la fase adulta [11]. Dependiendo la edad en la que la Timidina- H^3 fue inyectada se observaron en diferentes capas de la corteza.

Utilizando video-microscopía de lapso de tiempo, se comprobó *in vitro* que la formación de diferentes tipos de neuronas sigue una secuencia temporal. Se evidenció que si se cultivaban progenitores corticales E10 durante cinco días *in vitro*, luego se tripsinizaban y se subclonaban, los progenitores resultantes ya no eran capaces de formar células neuronales el tipo Cajal-Retzius, confirmando dicho patrón temporal [12].

1.3 Especificación espacial

Las células NSCs presentan una especificación regional tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto. Es decir, NSCs en diferentes subregiones

generan diferentes tipos de neuronas, las cuales a su vez difieren, según se trate del cerebro embrionario o adulto. Por ejemplo, NSCs de la corteza se diferencian a neuronas piramidales durante el desarrollo, mientras que en la adultez se diferencian a interneuronas del bulbo olfatorio [5], [13] (Figura 3).

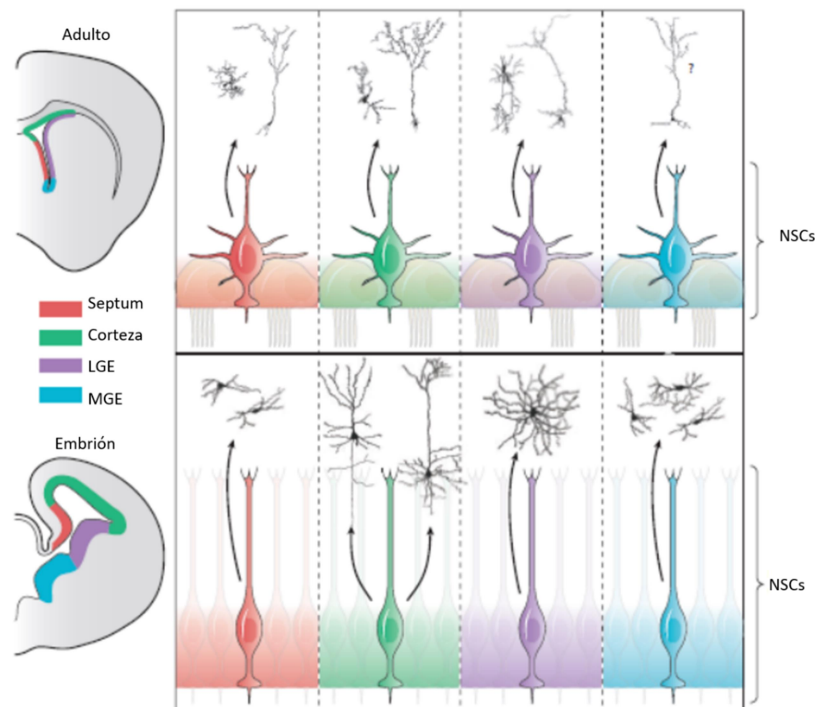


Figura 3. Especificación espacial de NSCs en el cerebro embrionario y adulto. LGE: eminencia ganglionar lateral; MGE: eminencia ganglionar media. En el desarrollo embrionario, las células NCS de las zonas del septum y de la MGE generan mayoritariamente interneuronas, mientras que las de la zona LGE se diferencian en neuronas del tipo espinosas, y las de la corteza en neuronas piramidales. En cambio, en el cerebro adulto, las células NSCs de la corteza se diferencian mayoritariamente a interneuronas que migran hacia el bulbo olfatorio, así como también las de las zonas del septum y LGE. Adaptado de [5].

La expresión de diferentes factores de transcripción es lo que define los diferentes subdominios y los tipos de neuronas producidas. Por ejemplo, en la corteza lateral (telencéfalo dorsal) del cerebro en desarrollo la expresión de Pax6 determina la generación de neuronas glutamatérgicas. En el telencéfalo ventral se producen mayoritariamente interneuronas: en la eminencia ganglionar media se producen interneuronas GABAérgicas debido a la expresión de Olig2, mientras que en la eminencia ganglionar lateral se producen las interneuronas que migran al bulbo olfatorio debido a la expresión del factor de transcripción Gsh2 (Figura 4) [14].

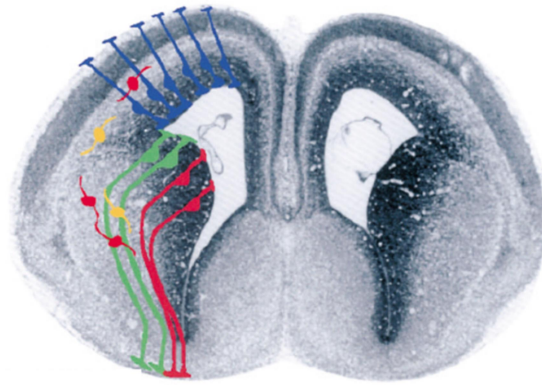


Figura 4. Especificación de células de la glía radial que generan diferente progenie. Imagen del telencéfalo de ratón donde se evidencia la especificación espacial de células de la glía radial. Azul: expresión de PAX6; verde: expresión de Gsh2; rojo: expresión de Olig2; amarillo: interneuronas GABAérgicas. Adaptado de [14].

1.4 Progenitores corticales

Hacia fines de la década del 90, dos teorías proponían explicar el momento en que las células madre adquirirían potencial neurogénico o gliogénico (Figura 5). En el modelo en fase, el progenitor bipotente (S) da origen a progenitores neuronales (N), que son progenitores restringidos a la generación de neuronas, y a progenitores gliales (G), que originan células de la glía. En este caso, la generación de progenitores neuronales y gliales sigue una secuencia temporal. En cambio, en el modelo al azar, el progenitor bipotente origina progenitores neuronales y gliales al azar a lo largo del tiempo, y a partir de señales ambientales dichos progenitores generan neuronas y células de la glía.

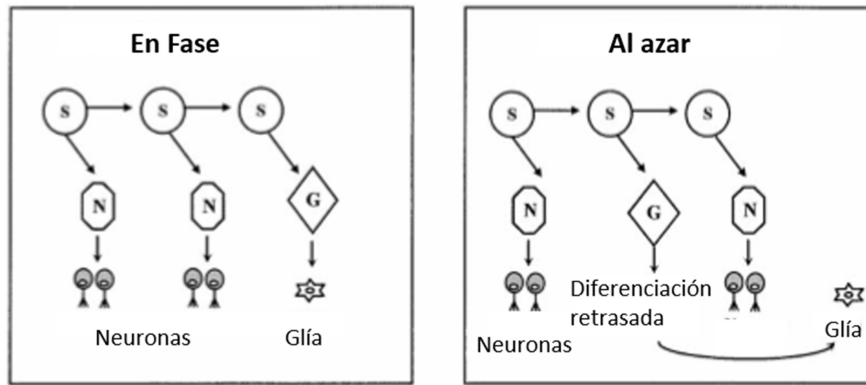


Figura 5. Modelos de diferenciación de NSCs hacia el linaje neuronal. S: NSCs, N: progenitores corticales neuronales; G: progenitores corticales gliales. Adaptado de [15].

Con el desarrollo de la video-microscopía de lapso de tiempo fue posible visualizar en tiempo real progenitores en edades precoces y tardías del desarrollo. En el año 2000, Qian y colaboradores observaron, mediante la construcción de árboles filogenéticos, que las células neuronales y gliales son generadas secuencialmente, corroborando así la teoría en fase [15]. Es decir, un mismo progenitor puede generar neuronas y células de la glía de manera secuencial, debido a un cambio en la especificación a lo largo del tiempo.

A través de estudios *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de retrovirus, se demostró que en el cerebro de roedores existen progenitores corticales restringidos al linaje neuronal, y progenitores corticales bipotentes. Estos progenitores bipotentes siguen un patrón temporal en fase, generando primero progenitores neuronales, y luego progenitores gliales hacia el final del período gestacional (Figura 6) [16]. En el gráfico A y B de la Figura 6 se observan los tipos de clones y la media del número de células por clon cuando se infecta en E13. En este momento del desarrollo, existen solo progenitores neuronales y mixtos (entendiéndose por mixtos progenitores bipotentes, capaces de formar neuronas y luego células de la glía). En cambio, en los gráficos C y D de la Figura 6 se observan los tipos de clones y la media del número de células por clon cuando se infecta en E16. En dicho período del desarrollo, los clones del tipo glial y el número de células gliales por clon aumentan de manera considerable, demostrando así que los progenitores gliales en el telencéfalo dorsal surgen en algún

momento entre E13 y E16. De esta forma, fue descartada la existencia de un progenitor glial restringido al inicio de la corticogénesis.

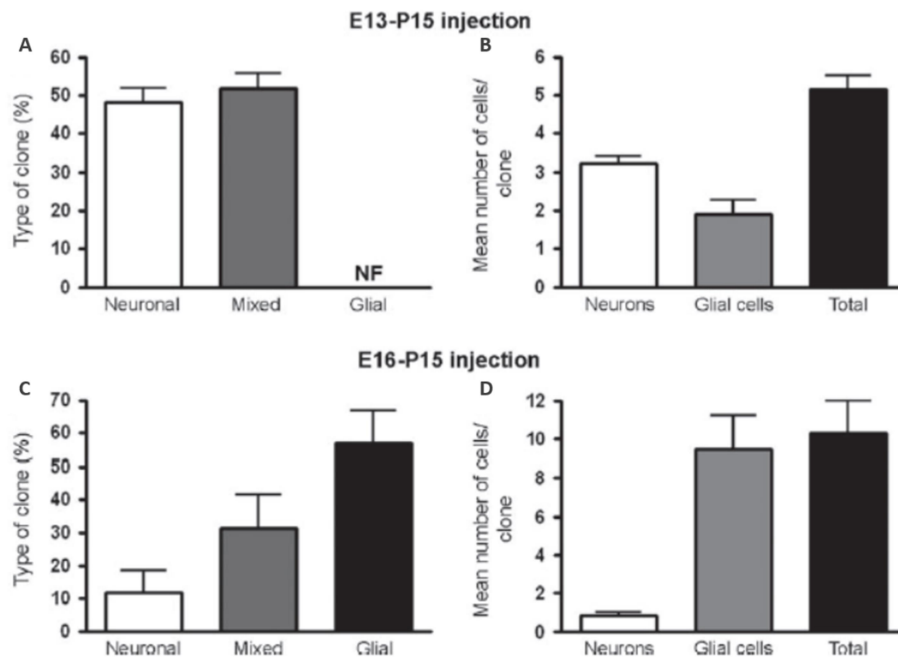


Figura 6. Análisis de progenitores corticales en diferentes estadios del desarrollo. Los gráficos muestran los tipos de células generadas por progenitores corticales en diferentes edades *in vivo* a través de la infección con retrovirus. A) y C) Los gráficos muestran el tipo de clon que se genera. Blanco: progenitores neuronales; gris: progenitores bipotentes; negro: progenitores gliales. B) y D) Los gráficos muestran el promedio del número de células por clon. Blanco: neuronas; gris: células gliales; negro: células totales. Adaptado de [16].

1.4.1 Características del árbol filogenético de progenitores corticales

Se ha demostrado que existen diferentes poblaciones de progenitores en cultivos primarios de embriones de ratón de 10-11 días de gestación (E10-E11). Siguiendo el comportamiento de cada progenitor de manera individual mediante video-microscopía de lapso de tiempo seguida de un ensayo de inmunofluorescencia con marcadores neuronales, se pudo demostrar que en dichos cultivos se encuentran: progenitores neuronales (Figura 7 A), y progenitores bipotentes, que generan primero progenitores neuronales, y posteriormente progenitores con características gliales (Figura 7 B) [15]. Posteriormente, se obtuvieron los mismos tipos de árboles filogenéticos al realizar análisis similares *in vitro*, utilizando embriones de ratón de 12 días de gestación, y marcadores neuronales y gliales (Figura 8) [17].

Cabe destacar que se define como **PRECURSOR** a células indiferenciadas que se diferencian a lo largo del tiempo sin división celular. Por el contrario, los **PROGENITORES** son células que deben dividirse para alcanzar su destino final. Pueden sufrir sólo una división (progenitores terminales), o más de una [18].

Los progenitores neuronales se caracterizan por dividirse pocas veces antes de generar neuronas maduras, por presentar una división asimétrica, y por no poseer mucha movilidad. Por el contrario, los progenitores gliales se caracterizan por sufrir varias divisiones simétricas antes de generar células gliales diferenciadas, por poseer una mayor velocidad de división y por ser más móviles. Los progenitores bipotentes son capaces de dividirse y generar progenitores neuronales y gliales, y finalmente, neuronas y células de la glía [15].

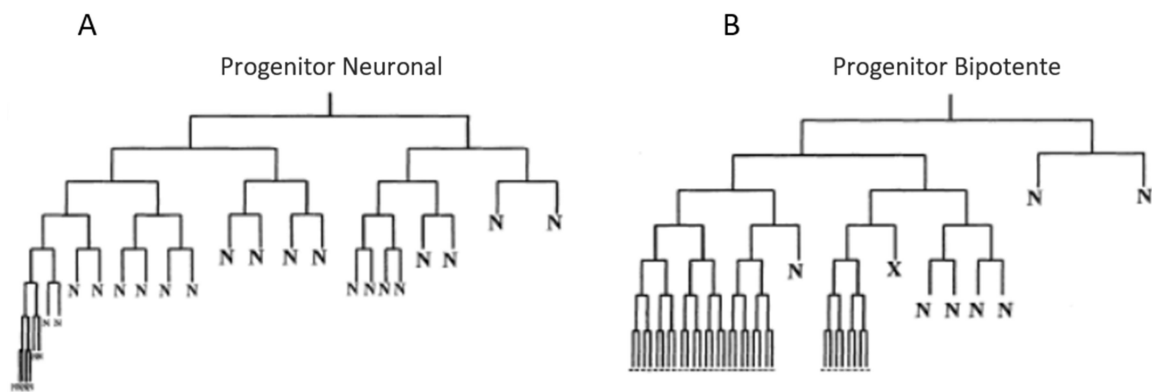


Figura 7. Árboles filogenéticos de cultivos E10-E11. Se cultivaron NSCs provenientes de la corteza lateral de embriones de ratón de 10-11 días de gestación. Se monitoreó el desarrollo de cada célula individual utilizando la técnica microscopía de lapso de tiempo por un período de siete días. Posteriormente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con marcadores neuronales. N: Neuronas, X: células que sufrieron apoptosis; con un signo (-) se representan las células que no poseen marca neuronal. Adaptado de [15].

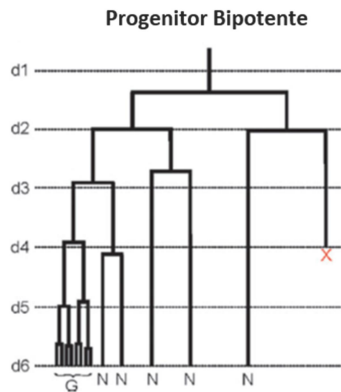


Figura 8. Árbol filogenético de cultivos E12. Se cultivaron NSCs provenientes de la corteza lateral de embriones de ratón de 12 días de gestación. Se monitoreó cada célula de manera individual utilizando la técnica microscopía de lapso de tiempo por un período de siete días. Posteriormente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con marcadores neuronales y gliales. N: Neuronas, X: células que sufrieron apoptosis; G: células de la glía, d: días en cultivo. Adaptado de [17].

En la Figura 9 se observa de manera esquemática mediante un árbol filogenético cómo, durante el desarrollo, las NSCs se dividen y alteran sus características produciendo distintos tipos de células progenitoras. En etapas tempranas se producen neuronas. Luego, se produce una división asimétrica específica dando como resultado el final de la neurogénesis y el comienzo de la gliogénesis [15].

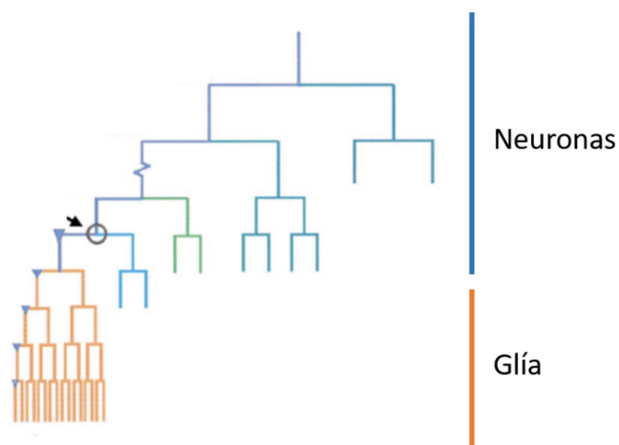


Figura 9. Esquema de árbol filogenético de cultivos E10-11. El esquema muestra el comportamiento típico de NSCs extraídas de la corteza de ratones de 10-11 días de gestación. Se observa un progenitor bipotente que primero genera progenitores neuronales, y por consiguiente, neuronas. Luego, se produce un cambio en la especificación y se generan progenitores gliales, que producirán células de la glía. La flecha indica el momento de cambio de especificación celular. Adaptado de [15].

1.5 Cambio de neurogénesis a gliogénesis

El cambio en la especificación de progenitores corticales, es decir, la transición entre la neurogénesis y la gliogénesis, se encuentra influenciado tanto por señales intrínsecas como así también por el ambiente. Se ha demostrado que cuando se colocan progenitores corticales de embriones de ratones E15, sobre rodajas de corteza cerebral de embriones de ratones E18, las mismas se diferencian a neuronas. Por otro lado, cuando los progenitores se colocan sobre rodajas de corteza cerebral de ratones de quince días (P15), se generan astrocitos [19]. **Estos resultados fueron los primeros en sugerir que el potencial neurogénico y gliogénico de los progenitores corticales es influenciado por el ambiente.**

En este sentido, diversas señales ambientales contribuyen con el cambio de especificación en progenitores corticales. En el proceso de neurogénesis, las neuronas recientemente diferenciadas liberan citoquinas, mayoritariamente cardiotrofina-1 (CT-1), la cual es necesaria para la adquisición de características gliales (Figura 10). Se ha descrito que la supresión de la liberación de CT-1 en progenitores corticales bloquea completamente la astrogénesis *in vitro*; y que ratones *CT-1^{-/-}* poseen una disminución del 70% en la astrogénesis cortical [20]. Es decir, la falta de CT-1 bloquea la transición desde el potencial neurogénico al gliogénico. Específicamente, CT-1 se une a los co-receptores *gp130* y *LIFR β* y activa la vía de señalización JAK-STAT: las quinasas JAK fosforilan y activan a los factores de transcripción STAT3, los cuales son capaces de formar complejos con factores SMADs (activados por receptores BMP) y con el coactivador p300 que, posteriormente, se une y activa genes gliogénicos, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) [21]. Al mismo tiempo, la activación de la vía Notch, y por consiguiente de su efector, el factor de transcripción RBP-Jk, contribuye a la activación de la transcripción de GFAP (cuando la vía JAK-STAT está activa) [22]. La acción coordinada de estas vías contribuye a la activación de genes gliogénicos.

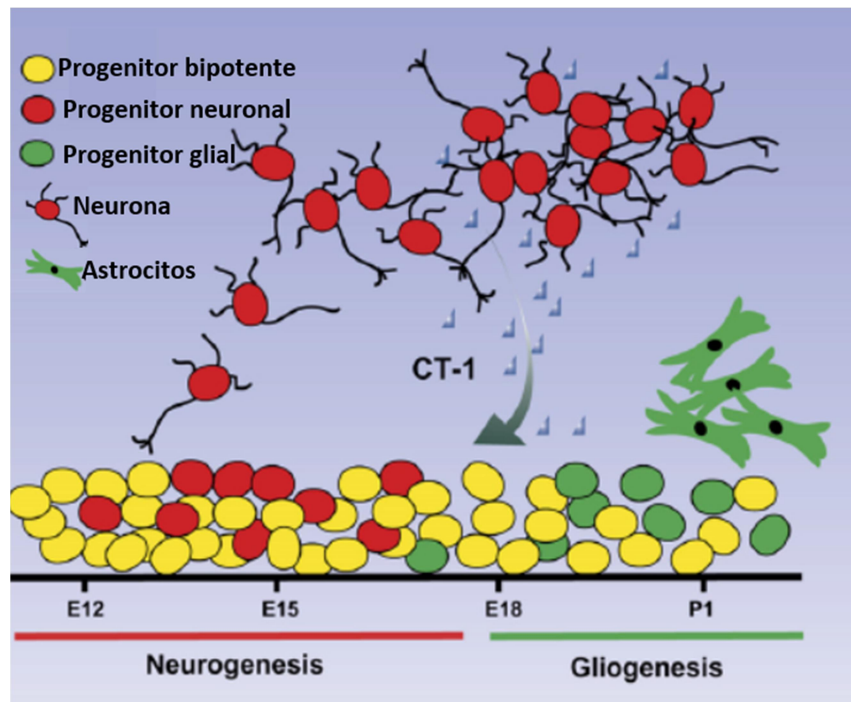


Figura 10. Cambio en la especificación de progenitores en el desarrollo cortical. Durante el desarrollo, las neuronas recién generadas liberan citoquinas (CT-1), produciendo un cambio en la especificación de los progenitores bipotentes hacia el linaje glial. Adaptado de [7].

1.6 Neuroesferas como modelo de estudio

El cultivo *in vitro* de NSCs provee un modelo único para el estudio de las propiedades moleculares y celulares del desarrollo, la plasticidad, la multipotencia y la regeneración neuronal. Se ha descrito un protocolo para el aislamiento y expansión de NSCs conservando su capacidad proliferativa y de diferenciación [23], [24]. En este modelo, las células proliferan formando esferas, denominadas neuroesferas. Luego de aproximadamente 7 días en cultivo en medio de proliferación, las neuroesferas poseen un diámetro de aproximadamente 150 μm y contienen en promedio 10.000 células. Cuando se remueve el medio de proliferación y se cultivan en presencia de un sustrato que permita la adherencia celular, las NSCs pueden diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Sin embargo, existen algunas limitaciones referidas al cultivo de neuroesferas. En primer lugar, es muy sensible al método de cultivo utilizado: variaciones en la densidad celular [25], la concentración de los factores que se suplementan [26], [27], la frecuencia con la que se realiza cada pasaje y el número de pasajes producen una alteración en el comportamiento y las propiedades de NSCs [28]. En segundo lugar, el

cultivo de neuroesferas impide evaluar el comportamiento de cada célula de manera individual. Por último, las neuroesferas están constituidas por una población heterogénea de células: es posible evidenciar NSCs tempranas en el desarrollo, como así también progenitores corticales [29]. Por lo tanto, el modelo de neuroesfera debe ser interpretado como el estudio de poblaciones mixtas de precursores corticales en diferentes etapas de especificación.

1.6.1 Linaje y potencial neuronal

Existe una diferencia entre el LINAJE y el POTENCIAL de NSCs. Cuando las células son cultivadas *in vitro* en condiciones que promuevan su proliferación mediante el método de neuroesferas, pueden generar los tres tipos celulares principales del SNC (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). El linaje corresponde al comportamiento de una célula *in vivo*, mientras que potencial se refiere al que adquiere cuando está expuesta a diferentes ambientes *in vitro*. *In vivo* y en cultivos primarios, la mayoría de NSCs generan solo un tipo de progenie que varía según la etapa gestacional del desarrollo embrionario; sin embargo, *in vitro*, cuando las células se suplementan con factores de crecimiento, poseen multipotencia (Figura 11) [30].

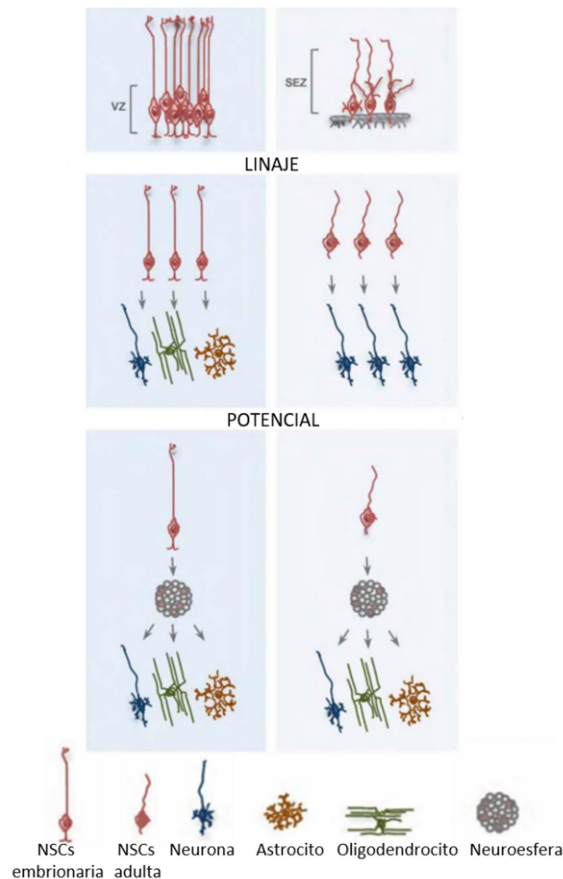


Figura 11. Diferencia entre linaje y potencial. En el esquema se muestra la progenie de células NSCs *in vivo*, o cultivadas *in vitro*. VZ: zona ventricular; SEZ: zona subependimal. Adaptado de [30].

1.7 Vías de señalización involucradas en la diferenciación de NSCs

1.7.1 Vía de señalización MEK/ERK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son serin-treonin quinasas que componen una cascada de señalización que está formada por al menos tres componentes: una MAPK quinasa quinasa (MAP3K), una MAPK quinasa (MAP2K), y una MAPK. Las MAP3Ks fosforilan y activan a MAP2Ks, las cuales actúan, a su vez, sobre las MAPKs; estas últimas una vez activadas, fosforilan varias proteínas sustratos incluyendo factores de transcripción [31]. Dentro de la familia de las MAPKs se encuentra ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), la cual es activada por numerosas señales extracelulares y estímulos internos.

La vía de señalización RAF/MEK/ERK es una de las cascadas más estudiadas debido a su amplia función en diferentes procesos celulares, como proliferación y diferenciación celular [32]. La vía de señalización se inicia generalmente por la activación de Ras (proteína con actividad GTPasa), la cual recluta y activa a la quinasa Raf a la membrana. Una vez activa, Raf fosforila a la quinasa MEK. Posteriormente, MEK activa es capaz de fosforilar a ERK1 y ERK2. Se ha demostrado que, luego de su activación, ERK es capaz de fosforilar una gran variedad de sustratos (Figura 12). Algunos de sus sustratos se localizan en el citoplasma celular, mientras que otros son fosforilados por ERK en el núcleo [33]. Entre dichos sustratos, se encuentran los factores de transcripción Elk1, c-fos y c-jun, entre otros [34]–[36].

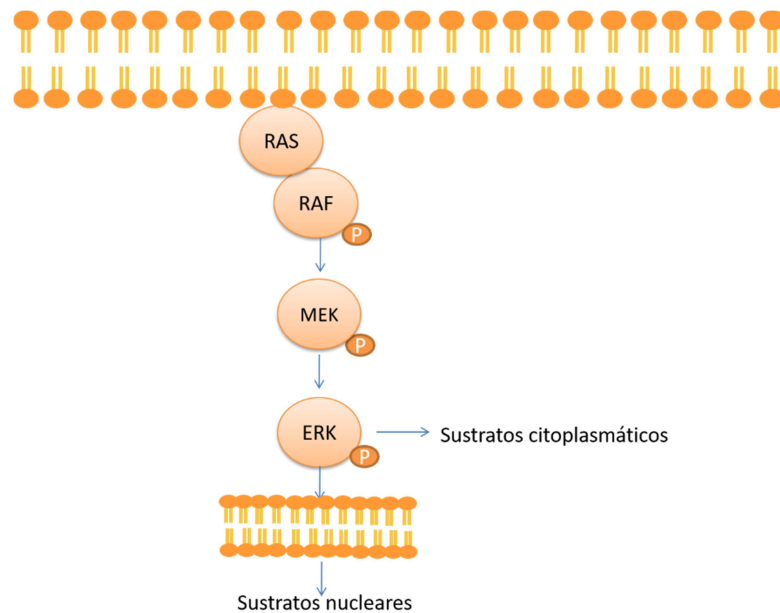


Figura 12. Representación esquemática de la vía de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK.

Una manera alternativa de activar Raf es mediante su disociación de la proteína inhibidora de Raf (RKIP), la cual pertenece a la familia de proteínas de unión a fosfatidiletanolamina (PEBP). RKIP se expresa en la mayoría de los tejidos en varias etapas del desarrollo, aunque de manera abundante en el cerebro. Posee un sitio de unión conservado en mamíferos, que puede unir ligandos como PE y locostatina *in vitro*. Además, RKIP puede modular cascadas de señalización por interacciones directas o indirectas con otras proteínas. Específicamente, la interacción de RKIP con Raf-1

puede ser regulada por fosforilación dependiendo del contexto celular. Se ha demostrado que la proteína quinasa C (PKC) fosforila a RKIP en la serina-153, disminuyendo de esta manera la interacción de RKIP a Raf-1 y activando la vía MEK/ERK y procesos celulares tales como crecimiento y diferenciación [37], [38].

1.7.1.1 Rol de MEK en la neurogénesis y gliogénesis

Existen varias evidencias que relacionan la diferenciación neuronal con la vía de señalización MEK/ERK. Experimentos realizados en el laboratorio demostraron que el fosfolípido PC o Lisofosfatidilcolina (LPC; generada a partir de la degradación de PC por acción de la fosfolipasa A2 citoplasmática) es capaz de inducir la diferenciación neuronal en la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a por un mecanismo dependiente de la activación de la vía MEK/ERK. Específicamente, se demostró que LPC induce la diferenciación neuronal mediante la activación de la proteína Ras, seguida de la activación de Raf/MEK/ERK. Más aún, la participación de Ras en la diferenciación neuronal de células Neuro-2a fue confirmada en células que expresaban Ras activa de manera constitutiva, donde se observó que la activación de Ras fue suficiente para promover la diferenciación neuronal y la activación de ERK [39]. Adicionalmente, se ha demostrado que en la línea de células madre de origen murino D3, el ácido retinoico induce la diferenciación neuronal mediante la activación de la vía MEK/ERK [40].

Sin embargo, también se ha demostrado que la activación de MEK es necesaria para que se inicie el proceso de gliogénesis. En progenitores radiales deficientes en MEK1 y MEK2 no ocurre la transición hacia el modo gliogénico, manifestándose en la ausencia de progenitores astrogiales y progenitores de oligodendrocitos. Asimismo, se observó que en ratones en los cuales MEK1/2 se encontraba deletado, la corteza cerebral estaba prácticamente desprovista de astrocitos, presentando también neurodegeneración [41]. Más aún, se ha reportado que alteraciones en la vía Ras/ERK llevan a desórdenes en el desarrollo cortical [42]. La enfermedad neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es causada por mutaciones en el gen NF1, el cual codifica para una proteína activadora de la GTPasa-Ras, denominada neurofibromina. Dicha proteína promueve la conversión de la forma activa Ras-GTP a la forma inactiva Ras-GDP, es decir, es un regulador negativo de la vía Ras/ERK. Se demostró que la inactivación de

Nf1 promueve la activación de ERK en progenitores corticales, desencadenando un incremento en la gliogénesis a expensas de la neurogénesis [42].

1.7.2 Vía de señalización PKA

La proteína quinasa A (PKA) es una holoenzima dependiente de AMP cíclico (AMPC). Está involucrada en numerosos procesos celulares, tales como la regulación de otras proteínas quinasas, la concentración de calcio intracelular y la activación de factores de transcripción, que poseen sitios conservados para su fosforilación: la proteína de unión a elementos de respuesta del AMPC (CREB), el modulador de elementos de respuesta del AMPC (CREM) y ATF-1 [43], [44]. En su estado inactivo, PKA es un tetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras (PKA-R), y dos subunidades catalíticas (PKA-C). La activación ocurre por la unión de dos moléculas de AMPC a cada subunidad de PKA-R. La unión de AMPC promueve un cambio conformacional en PKA, llevando a la separación de las subunidades PKA-R y PKA-C. Las subunidades de PKA-R se mantienen como dímero con cuatro moléculas de AMPC unidas, mientras que PKA-C permanece como dos monómeros individuales. Cada subunidad PKA-C une ATP, permitiendo la fosforilación de residuos de serina o treonina de diferentes proteínas efectoras [43]. Específicamente, PKA fosforila al factor de transcripción CREB en el residuo de Serina-133, activándolo. Dicha fosforilación es transiente; luego de tres o cuatro horas, CREB es desfosforilado por la acción de diferentes fosfatasas [44], [45].

El AMPC se forma a partir de adenosina trifosfato (ATP) por la acción de la enzima Adenilato Ciclasa (AC); su hidrólisis hacia adenosina monofosfato (AMP) ocurre a través de fosfodiesterasas. La activación de la señalización de AMPC involucra la unión de ligandos extracelulares a receptores acoplados a la proteína G (GPCR), que permite que proteínas G regulen una de las varias isoformas existentes de ACs. En mamíferos, existen diez isoformas diferentes de ACs, nueve de ellas corresponden a proteínas de membrana que poseen una conservada homología de secuencia; mientras que una de las isoformas de ACs es citoplasmática [46]. Todas las ACs de membrana se expresan en el cerebro; por ejemplo, las isoformas AC1 y AC2 se encuentran involucradas en procesos como aprendizaje y memoria [47].

1.7.2.1 Rol de PKA en la diferenciación neuronal

Numerosos estudios demuestran que la vía de señalización de PKA se encuentra involucrada en la diferenciación neuronal. Se ha descrito que el compuesto sinaptamida promueve la diferenciación neuronal de NSCs embrionarias de rata en un proceso dependiente de la activación de PKA [48], [49]. Además, se ha demostrado que CREB está activo en etapas tempranas del desarrollo neuronal, regulando procesos como supervivencia y crecimiento neuronal. Por ejemplo, la inhibición de CREB debido a la sobreexpresión de una mutante dominante negativa (A-CREB) produce una disminución en el número y longitud de dendritas [50].

La enzima fosfodiesterasa 7 (PDE7) es responsable de la hidrólisis del compuesto adenosina monofosfato cíclico (AMPC) en varios tejidos, incluyendo el cerebro, en donde los niveles de PDE7 son abundantes [51], [52]. Se ha demostrado que la inhibición de PDE7 lleva a un aumento en la proliferación de progenitores y a un incremento de la neurogénesis en el cerebro de ratas adultas, en un proceso dependiente de la activación de CREB [53]. Asimismo, se comprobó que aumentando los niveles de AMPC utilizando inhibidores de fosfodiesterasas, se promueve la maduración de neuronas en cultivos de NSCs embrionarias de rata [54].

1.8 Lípidos en la señalización celular

1.8.1 Composición de la membrana de células eucariotas

Los lípidos mayoritarios de las membranas biológicas se clasifican en glicerofosfolípidos (GPL), esfingolípidos y esteroides [55]. Estos lípidos cumplen diversas funciones, entre las cuales se destacan su rol en la formación de estructuras, como las membranas biológicas; de reserva energética, debido a su estado relativamente reducido; y de señalización, participando en la transducción de señales en muchos procesos biológicos [55].

Los GPL mayoritarios en membranas eucariotas son: PC, PE, fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). La porción hidrofóbica es una molécula de diacilglicerol (DAG), que posee cadenas de ácidos grasos de longitud variable, mientras que la porción hidrofílica corresponde a diferentes grupos polares. El GPL más abundante en

membranas biológicas es PC (más del 50% del total de los GPL), seguido de PE (Figura 13). Los esfingolípidos constituyen otra clase de lípidos estructurales, siendo los mayoritarios la molécula de esfingomielina (SM), y los glicosfingolípidos, los cuales contienen monosacáridos, disacáridos u oligosacáridos. Los lípidos no polares mayoritarios de las membranas celulares eucariotas son los esteroides (colesterol en mamíferos y ergosterol en levaduras) [55], [56].

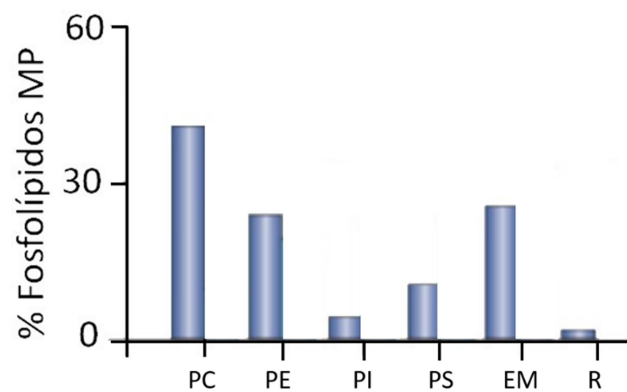


Figura 13. Composición de fosfolípidos de la membrana plasmática. La composición lipídica se expresa como porcentaje de la cantidad total de fosfolípidos. MP: membrana plasmática; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; EM: esfingomielina; R: lípidos remanentes. Adaptado de [55].

La composición de lípidos de las membranas eucariotas varía de manera significativa entre diferentes especies [57], [58], entre diferentes tipos celulares [59], [60], y entre las diferentes organelas [55], [61]. Asimismo, la membrana plasmática posee asimetría respecto a los GPL que la componen. La cara externa de la membrana plasmática está formada mayoritariamente por PC y SM, mientras que la cara interna (citósólica) posee PE como GPL principal (Figura 14) [62]. Además, la geometría de la molécula de PC es diferente a la de PE: la molécula de PC es cilíndrica, mientras que la de PE es cónica (debido al tamaño pequeño de la cabeza polar) [55]. Esta diferencia geométrica produce diferentes variaciones en la forma de la membrana plasmática: PC produce una curvatura chata, mientras que PE genera una curvatura negativa en la membrana plasmática [56] (Figura 15).

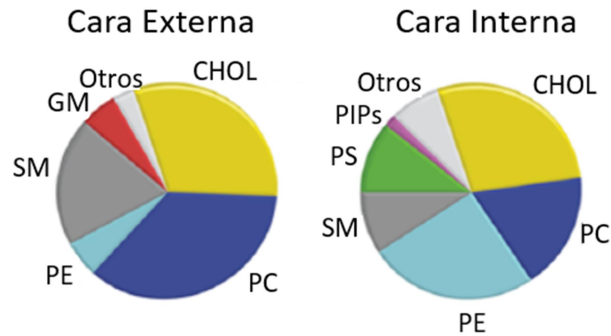


Figura 14. Composición lipídica de la cara externa e interna de la membrana plasmática. Adaptado de [62].

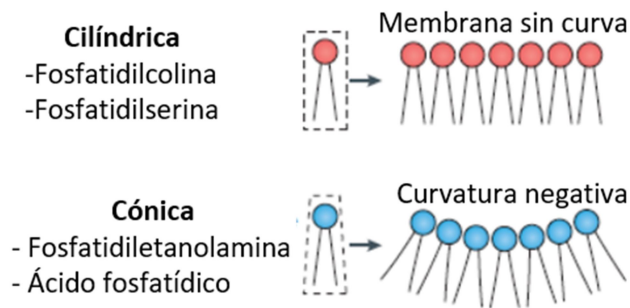


Figura 15. Especies lipídicas y curvatura de membrana. La composición de los fosfolípidos altera la curvatura de la membrana plasmática. Adaptado de [56].

1.8.2 Lípidos en la diferenciación neuronal

Los lípidos bioactivos constituyen un grupo de lípidos involucrados en la señalización celular. Pueden actuar mediante interacción directa con proteínas de unión específicas (receptores lipídicos), con proteínas quinasas o fosfatasa, o con otras proteínas de señalización celular [63], [64].

Se ha demostrado un rol específico de PC en la señalización celular, dirigiendo la diferenciación neuronal [39], [65], [66]. En el laboratorio se ha estudiado el rol de PC en la diferenciación neuronal de la línea celular Neuro-2a. En primer lugar, se demostró que la sobreexpresión de las enzimas colina quinasa (CK) y CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT), ambas involucradas en la biosíntesis de PC, promueve la diferenciación neuronal en ausencia del inductor ácido retinoico [66]. Luego, se demostró que la suplementación exógena de PC, sus precursores (colina, fosfocolina,

CDP-colina, DAG, ácido fosfatídico) y uno de sus productos de degradación (LPC), inducen la diferenciación neuronal en la línea celular Neuro-2a. Específicamente, la LPC activa la proteína Ras, seguida de la activación de Raf/MEK/ERK, por un mecanismo independiente de calcio intracelular, induciendo la diferenciación a neuronas funcionales. En cambio, PC induce la diferenciación neuronal por un mecanismo dependiente de la liberación de calcio proveniente del retículo endoplasmático (Figura 16) [39].

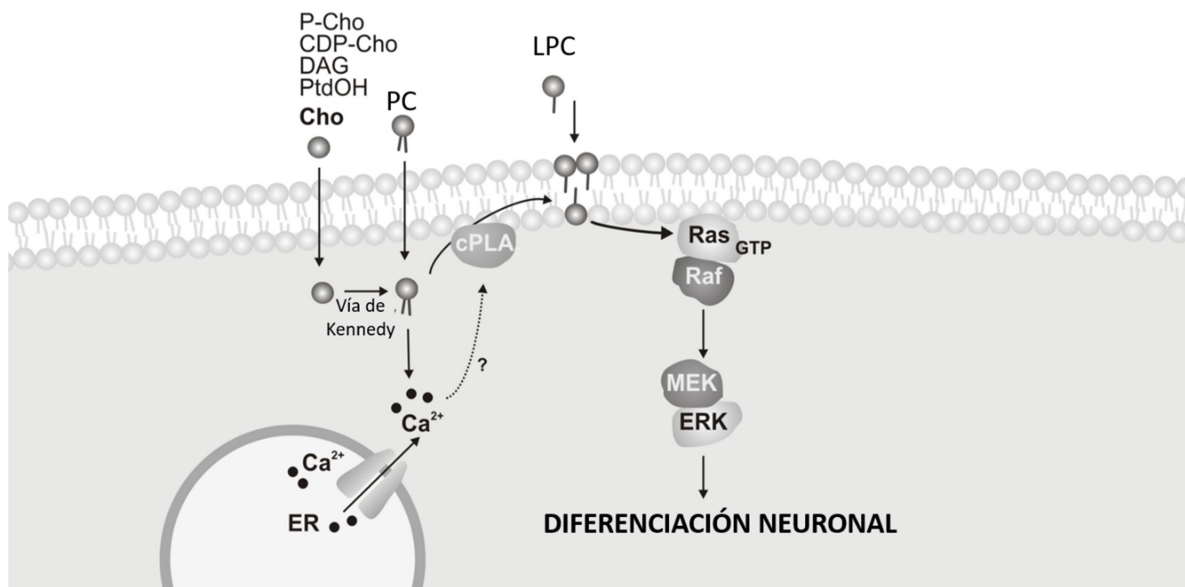


Figura 16. Modelo representativo de la diferenciación neuronal en la línea celular Neuro-2a. Las moléculas precursoras de PC entran a la célula y son convertidas a PC mediante la vía de Kennedy. Además, la PC exógena o recién sintetizada es hidrolizada por fosfolipasa A2 citoplasmática generando LPC. La suplementación exógena de LPC (o la LPC generada por la degradación de PC) activa a la proteína Ras, activando la vía Raf/MEK/ERK, induciendo la diferenciación neuronal. P-Cho: fosfolípida; CDP-Cho: CDP-colina; DAG: diacilglicerol; PtdOH: ácido fosfatídico; ER: retículo endoplasmático; cPLA: fosfolipasa A2 citoplasmática. Adaptado de [39].

En lo referido a células madre, numerosos estudios muestran que la señalización iniciada por lípidos específicos desencadena diferentes procesos celulares, tales como proliferación y diferenciación. Se ha reportado que el ácido docohexanoico (DHA) promueve la neurogénesis de NSCs embrionarias provenientes de la corteza de cerebros de rata [67], [68]. Confirmando estos resultados, algunos años más tarde, se demostró que el compuesto N-docohexanoetanolamina (denominado sinaptamida), el

cual es un metabolito del DHA, promueve la diferenciación neuronal de NSCs embrionarias de rata [48].

Otro ejemplo de fosfolípidos involucrados en la señalización de células madre es el ácido lisofosfatídico (LPA), un fosfolípido que actúa como molécula señal a través de diferentes subtipos de receptores de proteínas-G [69]. Específicamente, el receptor LPA1 se encuentra involucrado en la proliferación, migración y supervivencia de progenitores neuronales durante el desarrollo [70]. De hecho, su delección reduce la neurogénesis adulta en el hipocampo [71]. Recientemente, se ha reportado que LPA1 se expresa en una población específica de progenitores neuronales del giro dentado del hipocampo, regulando la proliferación y la neurogénesis [72].

1.9 Daño cerebral y reparación

El daño en el SNC puede ser originado por enfermedades congénitas (como defectos en el tubo neural), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington, entre otras), traumas, o accidentes cerebrovasculares (ACV).

Al producirse una lesión traumática o isquémica en el cerebro, las células NSCs que se encuentran en regiones específicas en el cerebro adulto tienen la capacidad de proliferar y migrar hacia el sitio de lesión [73]–[75]. Sin embargo, el potencial para regenerar el tejido dañado es limitado [76]. Esto se debe a que el ambiente en la zona del daño impide que el proceso de neurogénesis ocurra completamente. Las respuestas celulares y moleculares que se producen luego de un daño cerebral incluyen: apoptosis, necrosis, inflamación, activación de células de la glía, aumento de radicales libres, acumulación de productos tóxicos, formación de la cicatriz glial, entre otros [77]. Luego del daño, las neuronas y los oligodendrocitos son los primeros en morir por apoptosis o necrosis, mientras que los astrocitos y las células de la microglía se activan y proliferan. Particularmente, las células de la microglía son las primeras en activarse, liberando especies reactivas del oxígeno (ROS), productos inflamatorios, y promoviendo la infiltración de macrófagos a través de la barrera hematoencefálica. Las células de la microglía y los macrófagos infiltrados generan un sistema de defensa, pero simultáneamente, liberan productos inflamatorios, activando de esta manera a

los astrocitos. Los astrocitos reactivos se caracterizan por expresar de manera elevada determinados genes (como GFAP y Nestina), por presentar hipertrofia, y una morfología polarizada. Al mismo tiempo, pasan de un estado post-mitótico a un estado proliferativo [78], [79]. En estas condiciones se forma la cicatriz glial, la cual se compone principalmente de astrocitos, progenitores NG2 (progenitores de oligodendrocitos) y matriz extracelular. La función de la cicatriz glial es reestablecer la integridad física y química en la región del daño del SNC. Sin embargo, también produce moléculas inhibitorias que previenen la migración de NSCs e impiden la regeneración axonal [80]. Como consecuencia, la formación de la cicatriz glial posee aspectos beneficiosos (limitar la zona del daño, reparar la barrera hematoencefálica, y proteger el tejido sano), pero también afecta negativamente la regeneración neuronal.

En este contexto, es importante estudiar en profundidad los mecanismos moleculares que gobiernan la diferenciación de NSCs para establecer terapias de reparación que controlen la formación de la cicatriz y favorezcan la neurogénesis.

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el rol de lípidos como moléculas de señalización capaces de regular la diferenciación de células madre.

2.2 OBJETIVO PARTICULAR

Analizar el efecto de fosfolípidos y lípidos bioactivos relacionados en la diferenciación neuronal a partir de NSCs embrionarias.

3. Materiales y Métodos

3.1 Animales

En este trabajo de Tesis se utilizaron embriones de ratones de 13-15 días de gestación de la cepa C57BL/6. Los animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y se sacrificaron bajo la supervisión del Comité de Cuidado y Uso de animales. Todos los procedimientos se realizaron bajo la aprobación de la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR (Res. N° 6060/89).

3.2 Condiciones y medios de cultivo

Para los experimentos de proliferación celular se utilizó el medio de cultivo DMEM/F12 (Medio Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12; ThermoFisher) suplementado con B-27 (Gibco™), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10 ng/μl; Sigma) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF, 10 ng/μl; Sigma).

Para los experimentos de diferenciación celular se utilizó el medio de cultivo DMEM/F12 (Medio Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12; ThermoFisher) suplementado con B-27 (Gibco™).

Para la ruptura y el pasaje de las neuroesferas se utilizaron los siguientes medios de cultivo y soluciones:

- Medio de cultivo DMEM/F12 (Medio Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12; ThermoFisher) suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10%; Internegocios)
- Buffer Salino de fosfatos (PBS 1X): NaCl (8,7 g/l), Na₂HPO₄ (61,7 g/l), NaH₂PO₄·2H₂O (10,14 g/l), pH: 7,4.
- Solución de tripsina/EDTA (en PBS 1X): Tripsina (0.05% P/V), EDTA (1,25 mM).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos penicilina (100 unidades/μl) y estreptomina (100 μg/μl). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

3.3 Aislamiento de NSCs y cultivo de neuroesferas

Las células madre neuronales embrionarias (NSCs) se obtuvieron a partir de cerebros de embriones de ratón de 13-15 (E13-15) días de gestación [24]. Inicialmente, se extrajeron los embriones a partir de un corte en el abdomen del ratón. Luego, cada embrión se separó del saco embrionario. Bajo la lupa, se apartó el cerebro del cráneo y se aisló la corteza lateral de cada hemisferio del cerebro. Para esto, primero se separaron los hemisferios del cerebelo y se retiraron las meninges. Luego, de cada hemisferio, se descartó la eminencia ganglionar y se conservó la corteza. Una vez obtenida la corteza, se procedió a aislar la región lateral de la misma y se mantuvo en PBS 1X frío hasta su posterior manipulación. Las cortezas laterales se disgregaron químicamente con solución de tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C; posteriormente, se adicionó DMEM/F12 suplementado con SFB 10% y se disgregó el tejido mecánicamente con micropipetas de 1000 µl y luego de 200 µl. El tejido disgregado se centrifugó a continuación a 1000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, se disgregó mecánicamente y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo DMEM/F12 y se determinó la concentración celular mediante la utilización de una cámara de Neubauer. Finalmente, se sembraron 250.000 células en frascos de cultivo de 25 cm³ (CellStar) en medio de proliferación.

Luego de aproximadamente tres días de cultivo, se comenzaron a formar las neuroesferas correspondientes al pasaje 1. A los siete días de cultivo, las neuroesferas se disgregaron para su posterior pasaje o utilización. Se realizaron hasta dos pasajes por cada aislamiento de NSCs.

3.4 Disgregación de neuroesferas

La suspensión de neuroesferas se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de solución de tripsina/EDTA y se mantuvo durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionó DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, se disgregó mecánicamente con micropipetas de 1000 µl y luego de 200 µl, y se centrifugó a 1000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo

DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, se disgregó mecánicamente y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo DMEM/F12 y se determinó la concentración celular empleando una cámara de Neubauer.

3.5 Cultivo en condiciones de diferenciación

Las neuroesferas disgregadas se cuantificaron y sembraron en placas de 24 o 96 pocillos conteniendo 500 μ l o 200 μ l de medio de cultivo de diferenciación, respectivamente. Previamente, las placas (con o sin cubreobjetos, según correspondiera) se trataron con poli-D-lisina (PDL 0.02 mg/ml; Sigma). Para ello, se incubó durante 2 horas a 37 °C, se lavó una vez con PBS 1X y se dejó secar en el flujo laminar.

Nota: A diferencia de las neuroesferas, las NSCs en condiciones de diferenciación crecen adheridas a la placa de cultivo.

3.6 Cultivo Primario

Las células NSCs se aislaron como se indica en la sección 3.3, con la salvedad que luego de cuantificarse, se sembraron 500.000 células en placas de 24 pocillos tratadas con PDL (0.02mg/ml) en condiciones de diferenciación.

3.7 Congelamiento de NSCs

Para el congelamiento, se resuspendieron 2×10^6 NSCs disgregadas en 1mL de solución de congelamiento, compuesta por: 800 μ l de medio DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, 100 μ l de SFB y 100 μ l de DMSO (Sigma). Posteriormente, se incubó 2 horas a -20 °C, y luego a -80 °C hasta el momento de su uso.

3.8 Inmunofluorescencia

Se sembraron 250.000 NSCs en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos previamente tratados con PDL (0.02 mg/ml). Luego de 1, 3 ó 7 días en cultivo en

condiciones de diferenciación, las células se fijaron con paraformaldehído-sucrosa 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con tritón X-100 0.2% durante 6 minutos. Se procedió a lavar tres veces con PBS 1X, y se realizó un paso de bloqueo por una hora con BSA 5% en PBS 1X. A continuación, se agregó el anticuerpo primario según correspondiera y se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario, se agregó el anticuerpo secundario que correspondiese y se incubó durante una hora en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron tres pasos consecutivos de lavados con PBS 1X, y luego se incubó por 5 minutos con solución Hoechst para visualizar los núcleos. Finalmente, las células se lavaron con PBX 1X se montaron con solución de montar (Tris 10 mM pH 7.6, glicerol - 87%- 57.5% V/V, fenilendiamina 0.1 P/V en PBS 1X). Se tomaron 20 fotos al azar de cada condición con el microscopio Nikon Eclipse 800, y se analizaron con el programa Nikon EZ-C1 3.70 Free viewer. En la tabla 1 se resumen los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Origen	Dilución
anti- β -III Tubulina (Sigma)	conejo	1/1000
anti- GFAP (Dako)	conejo	1/1000
anti- MAP2	ratón	1/100
anti- Nestina (Abcam)	gallina	1/1000
anti- Olig-2	conejo	1/200
Alexa Fluor 488 anti-conejo (ThermoFisher)	cabra	1/1000
Alexa Fluor 488 anti-gallina (ThermoFisher)	cabra	1/100
Alexa Fluor 633 anti-conejo (ThermoFisher)	cabra	1/100
Cy3 anti-ratón (Millipore)	cabra	1/80
Cy3 anti-conejo (ThermoFisher)	cabra	1/1000

Tabla 1. Condiciones de los distintos anticuerpos utilizados. Todos los anticuerpos se prepararon en solución BSA 1% en PBS 1X.

3.8.1 Triple Marcación

En el caso particular de la triple tinción, las células NSCs se incubaron en primer lugar con el anticuerpo anti-Nestina durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se eliminó dicho anticuerpo, se agregaron los anticuerpos anti-MAP2 y anti-GFAP y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego, las células se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 633 anti-conejo por una hora a temperatura ambiente (cámara húmeda en oscuridad). Transcurrido ese tiempo, se agregaron los anticuerpos secundarios Cy3 anti-ratón y Alexa Fluor 488 anti-gallina por un período de tres horas. Finalmente, las células se montaron con solución ProLong DAPI (Life technologies). Se utilizó el microscopio confocal LSM 880 (Zeiss). Para el análisis, se utilizó el programa Zen (Carl Zeiss).

3.9 Preparación de extractos proteicos

Se levantaron 250.000 NSCs sembradas en placas de 24 pocillos recubiertas con PDL (0.02 mg/ml) con buffer de lisis hipotónico (Tris pH 8 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 10 mM, Nonidet P-40 1%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 20 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) 1/100). Se utilizaron seis pocillos para cada condición a evaluar y se agregó 10 μl de buffer de lisis hipotónico por pocillo. Luego, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm para eliminar restos celulares. El sobrenadante conteniendo los extractos proteicos se almacenó a -70°C para su uso posterior.

3.10 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit comercial "Pierce™ BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific). Se utilizó BSA como patrón proteico para realizar una curva de calibración. En placas de 96 pocillos, volúmenes apropiados de muestra proteica o BSA se llevaron a 25 μl de volumen final con el buffer de lisis hipotónico. A esta mezcla se le agregó 200 μl de la mezcla A + B (50 partes de A, 1 parte de B) y se incubó durante 30 minutos a 37°C . Posteriormente, se midió absorbancia a 562 nm en lector de microplaca Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). Se graficaron los valores de absorbancia respecto a los μg de BSA para determinar la concentración de cada muestra.

3.11 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida

Las muestras proteicas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Antes de la siembra, las muestras se desnaturizaron por calor (95°C) durante 5 min en solución de siembra 1X (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10 % (P/V), azul de bromofenol 0,1% (P/V)) junto con β -mercaptoetanol 10%. Se utilizó una concentración de acrilamida:bisacrilamida 29:1 de 10% (P/V) y 5% (P/V) para los geles de separación (composición del buffer de separación: Tris 1.5M, SDS 0.4%, pH: 8.8) y concentración (composición del buffer de concentración: Tris 0.5M, SDS 0.4% pH 6.8), respectivamente. Se sembraron 10 μg de proteínas. La corrida electroforética se llevó

a cabo en buffer de corrida 1X (Tris-HCl 25mM pH 8,4, Glicina 192 mM, SDS 1% (P/V)) a una intensidad de corriente constante de 30 mA.

3.12 Western Blot

Se siguió la técnica descrita por Towbin y col. [81]. Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa fueron colocados en el cassette de transferencia. La electrotransferencia se realizó en buffer de transferencia 1X (Tris-Base 25mM, glicina 192 mM, metanol 10% (V/V)) a 4°C durante 1.5 horas, a intensidad de corriente constante de 280 mA. La correcta transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se determinó por tinción con el colorante Rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon con leche descremada 5% en TBS 1X en presencia de Tween-20 0.1% (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 137.8 mM) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron cuatro veces durante 10 minutos con TBS 1X en presencia de Tween-20 0.1%. Luego, los distintos anticuerpos se diluyeron a sus correspondientes concentraciones de uso en TBS 1X en presencia de Tween-20 0.1% (Tabla 2) y se incubaron con las membranas durante toda la noche en agitación a 4°C. Se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno con leche descremada 5% en TBS en presencia de Tween-20 0.1%. Posteriormente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (HPR) (dilución 1/10000 en leche descremada 5% en TBS en presencia de Tween-20 0.1%) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Las membranas se lavaron dos veces durante 10 minutos con leche 5% en TBS 1X en presencia de Tween-20 0.1% y luego se realizaron dos lavados adicionales de 10 minutos cada uno con TBS 1X. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el equipo para quimioluminiscencia “ECL Prime Western Blotting Detection Reagent” (Amersham) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se realizó la exposición de las membranas en placas radiográficas de baja (Kodak) o alta sensibilidad (Amersham) según la intensidad de la señal quimioluminiscente.

Como control de carga proteica de cada muestra, se utilizaron anticuerpos específicos para γ -Tubulina o GAPDH. En caso de ser necesario, una vez finalizado el Western Blot contra la proteína de interés, la membrana se rehidrató 5 minutos en

H₂O y luego se incubó 5 minutos en NaOH 0.2 N, para desnaturalizar los anticuerpos primarios y secundarios retenidos en la membrana. Luego, las membranas se lavaron 5 minutos en H₂O y se procedió a realizar nuevamente el bloqueo en leche descremada 5% en TBS en presencia de Tween-20 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los siguientes pasos se realizaron de la misma forma a lo explicado anteriormente.

Anticuerpo primario	Dilución
anti- β -III Tubulina (Sigma)	1/6000
anti- GFAP (Santa cruz)	1/600
anti- p-ERK (Cell Signaling)	1/500
anti- ERK (Cell Signaling)	1/500
anti- p-CREB (Santa Cruz)	1/1000
anti- PCNA (Sigma)	1/15000
anti- γ -Tubulina (Sigma)	1/5000
anti- GAPDH (Santa Cruz)	1/1000

Tabla 2. Diluciones de los distintos anticuerpos utilizados.

3.13 Viabilidad celular mediante ensayo MTT

El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del compuesto de color amarillo Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) en un compuesto color púrpura (formazán) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa [82].

3.13.1 MTT en condiciones de diferenciación

Para realizar el ensayo MTT, se sembraron 75.000 NSCs en placas de 96 pocillos tratadas previamente con PDL (0.02 mg/ml) en condiciones de diferenciación y se cultivaron por un período de 24 o 72 horas, según correspondiera. Los compuestos a analizar se adicionaron al cultivo celular luego de 0.5 horas de haberse sembrado las células. Una vez finalizado el período de incubación, se removió el sobrenadante y se agregó la solución de MTT (compuesta por 10 μ l de MTT y 90 μ l de medio DMEM/F12

suplementado con B-27 por cada pocillo). Se incubó durante 4 horas a 37 °C de temperatura y 5% de CO₂. A continuación, se descartó el sobrenadante, se adicionaron 100 µl de DMSO y se resuspendieron los cristales de formazán. Finalmente, se midió absorbancia a 562 nm en lector de microplaca Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek).

3.13.2 MTT en condiciones de proliferación

Para realizar el ensayo de MTT en neuroesferas, se sembraron 5.000 NSCs (provenientes del primer pasaje) en placas de 24 pocillos en 500 µl de medio de proliferación celular y se cultivaron por un período de 96 horas. Luego, se adicionaron directamente al medio de cultivo 50 µl de MTT y se incubó durante 4 horas a 37 °C de temperatura y 5% de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió el pellet en 100 µl de DMSO. Se transfirió el producto de resuspensión a una placa de 96 pocillos y se midió absorbancia a 562 nm en lector de microplaca Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek).

3.14 Ensayo de diferenciación con inhibidores farmacológicos

Se sembraron 250.000 NSCs en condiciones de diferenciación en placas de 24 pocillos previamente tratadas con PDL (0.02 mg/ml) y se agregaron los inhibidores que correspondieran. Luego de 0.5 horas, se renovó el medio de manera de eliminar el inhibidor farmacológico del medio de cultivo. Posteriormente, se suplementó (en caso de ser necesario) con el lípido en estudio y se incubó durante 24 o 72 horas, según correspondiera. Para cada inhibidor farmacológico utilizado, se realizaron previamente pruebas de viabilidad celular por MTT para determinar la concentración de inhibidor que no resultara citotóxico en el período de tiempo de estudio.

3.15 Evaluación cualitativa de los niveles de ROS intracelular

Para evidenciar indirectamente la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelulares, se realizaron experimentos utilizando la sonda DCFH-DA. Se sembraron 250.000 NSCs en condiciones de diferenciación en placas de 24 pocillos

previamente tratadas con PDL (0.02 mg/ml). Luego de 2 horas, se suplementó con H₂O₂ 50 μM durante un período de 30 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1 X y se incubó con la sonda DCFH-DA 80 μM en oscuridad por 30 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se observó fluorescencia empleando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 800 (λe=480 nm).

3.16 Ensayo de citotoxicidad LDH

Para evaluar la citotoxicidad por el método de medición basado en la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), se sembraron 50.000 NSCs en placas de 96 pocillos previamente tratadas con PDL (0.02 mg/ml); 2 horas después, se agregó el lípido en estudio. Luego de 3 días de incubación, se tomaron 50 μl del sobrenadante de cada condición y se agregaron 200μl del kit LDH-P UV kit (laboratorio Weiner). La reacción se incubó 30 segundos y se midió la absorbancia a 340 nm (BioTek) cada 30 segundos durante 3 minutos. Posteriormente, con el valor de la pendiente de la curva obtenida (expresado en ΔAbs/min), se calculó el valor de LDH (U/l) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{LDH (U/l)} = (\Delta\text{Abs/min} \times F_{\text{dil}} \times 10^6) / 6.22 \times 10^3$$

Donde, F_{dil}= factor de dilución (en este caso, 200/50)

$$\epsilon_{\text{NADH}}^{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.17 Ensayo de BrdU

El ensayo por marcación con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) es utilizado para evaluar proliferación celular [83]. Para realizar el análisis, se sembraron 250.000 NSCs en condiciones de diferenciación en placas de 24 pocillos con cubreobjetos tratados con PDL (0.02 mg/ml); dos horas después se agregó BrdU 10μM (Sigma). Luego de tres días, se realizó un ensayo de inmunocitoquímica acoplado a microscopía de fluorescencia, como se describió en la sección 3.8. Se utilizó el anticuerpo primario anti-BrdU (Sigma, dilución 1:3) y el anticuerpo secundario Cy3 anti-mouse (Millipore, dilución 1:80).

3.18 Microscopía de lapso de tiempo

Se utilizó la técnica microscopía de lapso de tiempo para determinar el modo de división celular, el número de células en activa división y la supervivencia celular [84]. Se sembraron 250.000 NSCs en placas de 24 pocillos recubiertas con PDL (0.02 mg/ml) y se incubaron en condiciones de temperatura y presión de CO₂ controladas. Se utilizó el microscopio Cell Observer (Zeiss), software AxioVision v4.8 acoplado a un sistema de incubación: Incubator XL S1 con unidad de calentamiento XL S (Zeiss); TempModule S1 (Zeiss); CO₂ Module S1 (Zeiss); Heating insert PS y CO₂ cover (Pecon). Los cultivos se analizaron mediante el registro fotográfico realizado continuamente a intervalos de tiempo determinados (10 minutos) durante 3 días. El análisis detallado se realizó utilizando el programa Tim's Tracking Tool-TTT [85], el cual permite seguir cada célula de manera individual.

Se cuantificó la supervivencia cada 12 horas. Se dividió el número de células viables a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas por el número total de células generadas a tiempo cero. El fenotipo celular se determinó, tanto de células post-mitóticas como de células hijas, mediante la técnica de inmunofluorescencia realizada inmediatamente después de haber finalizado el período de incubación. Se utilizó el anticuerpo anti-MAP2 para evidenciar neuronas, y anti-GFAP para marcar astrocitos. Se utilizaron Alexa Fluor 488 anti-rabbit, o Cy3 anti-mouse como anticuerpos secundarios.

Todos los experimentos de microscopía de lapso de tiempo se realizaron en el Instituto do Cerebro, Natal, en colaboración con el Dr. Marcos Costa.

3.19 Preparación de liposomas

Los liposomas de PC (Sigma) y PE (Sigma) se prepararon según lo descrito por Esko y col. [86]. El lípido de interés se resuspendió en cloroformo, se fraccionó en distintas alícuotas y conservó a -20°C. En el momento de ser utilizado, se secó una alícuota completamente con corriente de N₂ (g) y luego se resuspendió en 1 ml de PBS 1X durante 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente, se sonicó durante 1 minuto con una amplitud de 0.2-0.4% (sonicador GEX-600, Sonics & Materials) y se esterilizó por filtración con filtros estériles de 0.22 µm de diámetro (Sartorius).

3.20 Marcación de liposomas

Los liposomas de PC se marcaron con Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher). Se preparó una solución conteniendo PC 5.5 μM y Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution 0.5% (P/V) en PBS 1X y se agregó a NSCs en condiciones de diferenciación. Se incubó durante 1 minuto a 37 °C y se observó inmediatamente en el microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM 880.

3.21 Extracción de lípidos

Se sembraron 250.000 NSCs en condiciones de diferenciación en placas de 24 pocillos (6 pocillos por condición) tratadas previamente con PDL (0.02 mg/ml) por un período de 3 días. Luego, se trataron con tripsina/EDTA y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. En el caso de las neuroesferas, se sembraron 250.000 células en frascos de cultivo de 25 cm^3 (CellStar) en medio de proliferación por un periodo de 7 días; posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos.

Los lípidos se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Bligh and Dyer [87], con algunas modificaciones. El pellet celular se resuspendió en 600 μl de H_2O , se agregaron 3 ml de la mezcla 2:1 metanol:cloroformo, se agitó en vortex, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a -20°C . Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, y al sobrenadante se le agregó 1 ml de agua destilada y 1 ml de cloroformo. Luego de agitar en vortex y centrifugar, se descartó la fase acuosa, y a la fase orgánica se le agregó un volumen de KCl 2M y se centrifugó nuevamente. Se volvió a agregar KCl 2M a la fase orgánica y se centrifugó. Finalmente, se agregó un volumen de H_2O a la fase orgánica, se centrifugó, se eliminó la fase acuosa, y la fase orgánica se secó con N_2 gaseoso.

3.22 Cromatografía en capa delgada monodimensional

Se extrajeron los lípidos tal como se describió en 3.21. Cada muestra se resuspendió en 40 μl de cloroformo y se sembró la mitad del volumen en placa de sílica gel previamente activada por calor. Paralelamente, se sembraron los estándares correspondientes. Se realizó la cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando la

mezcla de solventes cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:25:8:4). Finalmente, los lípidos se revelaron con cobre-fosfórico [88] .

3.23 Cromatografía en capa delgada bidimensional

Para el caso de la TLC bidimensional, los lípidos se separaron en la primera dimensión utilizando la mezcla de solventes cloroformo: metanol: agua (75:25:2.5), e inmediatamente después, se realizó la separación en la segunda dimensión con la mezcla de solventes cloroformo: metanol: ácido acético: agua (80:9:12:2). Finalmente, se reveló con cobre-fosfórico [88].

3.24 Análisis digital de imágenes

Las imágenes correspondientes a la técnica de inmunofluorescencia se analizaron con el programa Nikon EZ-C1 3.70 Free Viewer. En el caso de una triple marcación, se utilizó el programa Zen (Carl Zeiss). Las imágenes correspondientes a membranas de Western Blot se digitalizaron empleando el programa Adobe Photoshop 6.0. Para los análisis de densitometría de bandas se utilizó el programa Adobe Photoshop 6.0. Los gráficos de barras se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.01. Todas las figuras del presente trabajo de Tesis se realizaron con el programa CorelDRAW X3.

3.25 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.01. Para determinar si los datos se distribuían normalmente, se utilizó el test de Shapiro – Wilk, y se evaluó si los valores de los coeficientes de Skewness y Kurtosis se ubicaban dentro del rango de -2 a 2. Cuando los datos se distribuían normalmente, se realizaron pruebas estadísticas paramétricas. De lo contrario, se realizaron ensayos no paramétricos. Se realizaron estudios de t-student o ANOVA monofactorial, con sus correspondientes test paramétricos o no, según correspondiera.

4. *Resultados*

4.1 Optimización del cultivo NSCs

En el presente trabajo de Tesis se utilizó el cultivo de NSCs embrionarias de origen murino como modelo de estudio. El primer objetivo fue optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* de NSCs. Las células se extrajeron de la zona de la corteza lateral de embriones de ratón de 13-15 días de gestación y se cultivaron mediante el método de neuroesferas (Materiales y Métodos). Para comprobar que el cultivo de neuroesferas se encuentre enriquecido en células madre, luego de 7 días en cultivo, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el marcador específico de células madre/progenitores neurales Nestina [89], [90]. En la Figura 17 se puede observar que el cultivo de neuroesferas expresa en su mayoría la proteína de citoesqueleto Nestina confirmando de esta manera que las neuroesferas están formadas por NSCs.

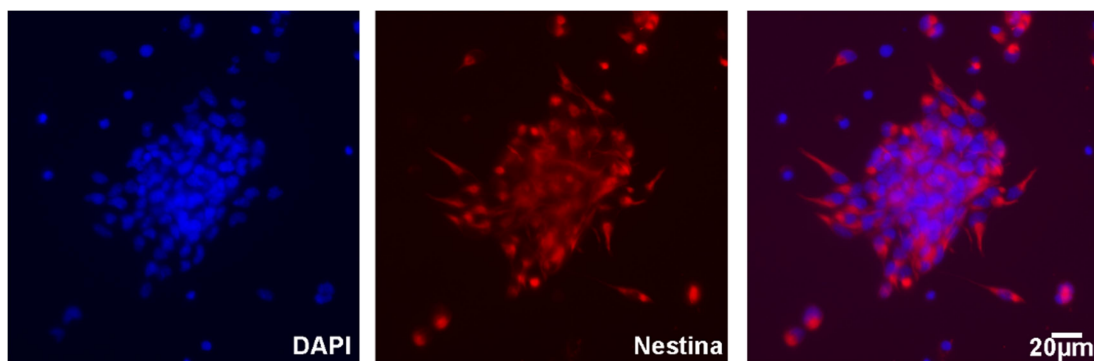


Figura 17. Análisis por ensayos de inmunofluorescencia del cultivo de neuroesferas. Ensayo de inmunocitoquímica acoplada a microscopía de fluorescencia de NSCs crecidas en condiciones de proliferación mediante el método de neuroesferas. Fotos tomadas con el microscopio Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. Rojo: Nestina (células madre neuronales/progenitores neuronales); azul: DAPI (núcleos).

Una vez obtenidos los cultivos enriquecidos en NSCs, se procedió a estudiar el cultivo en condiciones de diferenciación. Para ello, se cultivaron NSCs en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos tratados previamente con poli-D-lisina (PDL, 0.02 mg/ml), la cual permite la adherencia celular. Para establecer las condiciones óptimas de diferenciación, se cultivaron distintas densidades celulares. El número más adecuado para el análisis cuantitativo resultó ser 250.000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 3 días en condiciones de temperatura y atmósfera controlada. En estas condiciones, se evaluó el proceso de diferenciación identificando

a cada tipo celular por ensayos de inmunocitoquímica acoplada a microscopía de fluorescencia. Se analizó el marcador de neuronas jóvenes β -III Tubulina para evidenciar neuronas, GFAP para astrocitos y Olig2 para oligodendrocitos. Se pudo observar que, en condiciones basales de diferenciación, las células NSCs se diferencian a neuronas, astrocitos, y oligodendrocitos (Figura 18).

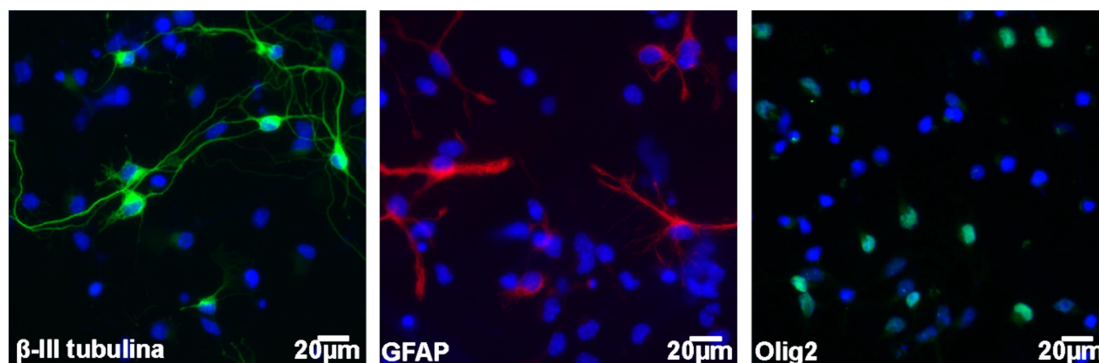


Figura 18. Análisis de la diferenciación de NSCs. Inmunofluorescencia de NSCs crecidas en condiciones de diferenciación. Fotos tomadas con el microscopio Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. β -III Tubulina (neuronas), GFAP (astrocitos), Olig2 (oligodendrocitos), Hoechst (núcleos).

4.2 Estudio de la composición lipídica de NSCs

Diversos cambios morfológicos ocurren a nivel celular durante el proceso de diferenciación neuronal, como la generación del árbol dendrítico, del axón, y la formación de vaina de mielina. A pesar del auge de la última década en investigación sobre células madre, poco se sabe acerca de la composición lipídica de membranas de células en diferentes etapas de diferenciación. Debido a ello, resultó interesante realizar una caracterización general de la composición lipídica, y evaluar la relación de los fosfolípidos principales en este tipo celular.

Para ello, en primer lugar, se extrajeron los lípidos a partir de cultivos de NSCs crecidas en condiciones de proliferación mediante la técnica “Bligh & Dyer” [66], [87] (Materiales y Métodos). El análisis se realizó por cromatografía en capa delgada (TLC) bidimensional para identificar cualitativamente los principales fosfolípidos de NSCs. Los principales fosfolípidos identificados correspondieron a PC (Figura 19-3) y PE (Figura 19-1); se evidenciaron también, en menor proporción, PS y EM (Figura 19-4 y 19-5, respectivamente). De acuerdo a la distribución lipídica de este tipo de TLC

bidimensional [88], podrían también encontrarse los fosfolípidos PI (Figura 19-6) y glucolípidos (GS, Figura 19-2).

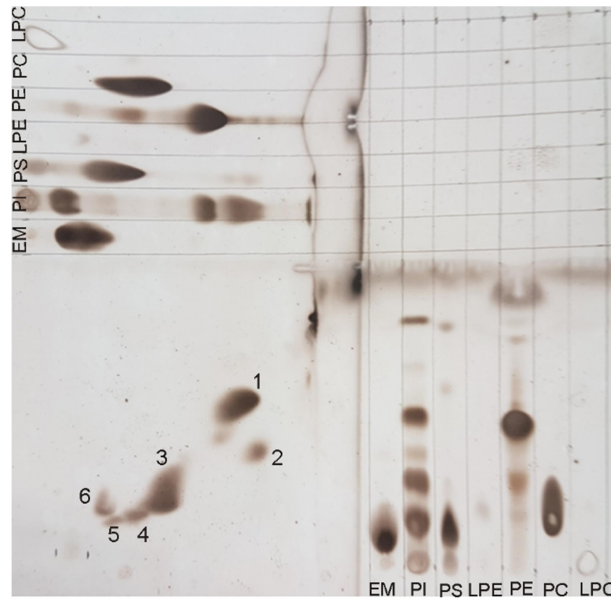


Figura 19. Imagen representativa de TLC bidimensional de NSCs en condiciones de diferenciación. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación por un período de tres días. Se realizó la extracción lipídica mediante Bligh & Dyer [66], [87]. La primera separación (1º dimensión) se realizó utilizando la mezcla de solventes cloroformo: metanol: agua (75:25:2.5). Luego, se realizó la segunda corrida (2º dimensión) utilizando la mezcla de solventes cloroformo: metanol: ácido acético: agua (80:9:12:2). Estándares utilizados: EM (50 µg), PI (40 µg), PS (50 µg), LPE (lisofosfatidiletanolamina), PE (40 µg), PC (40 µg) y LPC (50 µg).

Posteriormente, se decidió estudiar la relación de PC/PE en extractos totales de NSCs crecidas tanto en condiciones de proliferación, como así también en condiciones de diferenciación. En este caso, se realizó una TLC monodimensional (Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 20, la relación entre ambos fosfolípidos es la misma en las dos condiciones analizadas.

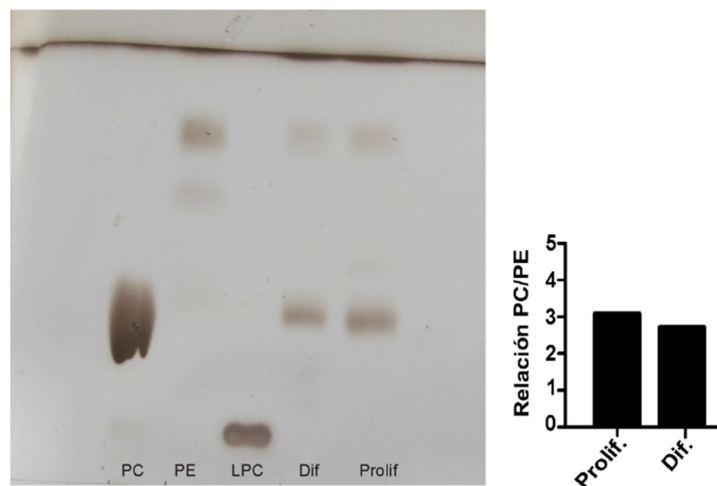


Figura 20. Imagen representativa de TLC monodimensional de lípidos extraídos de cultivos de NSCs. Se cultivaron NSCs en condiciones de proliferación y diferenciación, por un período de tres días. Se realizó la extracción lipídica mediante Bligh & Dyer [66], [87]. La TLC se resolvió utilizando la mezcla de solventes cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:25:8:4) Estándares utilizados: PE (40 μ g), PC (50 μ g) y LPC (40 μ g). Dif: diferenciación; Prolif: proliferación Se realizó la densitometría para evaluar la relación de los niveles de PC y PE en cada condición.

4.3 Efecto del agregado de fosfatidilcolina en la diferenciación de NSCs *in*

Vitro

Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio demuestran que la suplementación de liposomas de PC al medio de cultivo promueve la neuritogénesis en líneas celulares de neuroblastoma, sugiriendo así que el proceso de diferenciación puede ser modulado por moléculas lipídicas que actúan como señales externas [39].

Con el fin de analizar el rol de PC en los mecanismos de diferenciación neuronal de NSCs, se comenzó estudiando el efecto de la suplementación de PC al medio de cultivo en condiciones de diferenciación. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación, se trataron con liposomas de PC (50 μ M), y se cultivaron por un período de 3 días. Luego de ese tiempo, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia utilizando el marcador neuronal β -III Tubulina. Para el análisis cuantitativo, se tomaron 20 fotos de campos al azar con el microscopio Nikon Eclipse 800. Como se puede observar en la Figura 21 A y 21 B, el tratamiento con PC produce un aumento significativo en el número de células β -III tubulina positivas respecto al control.

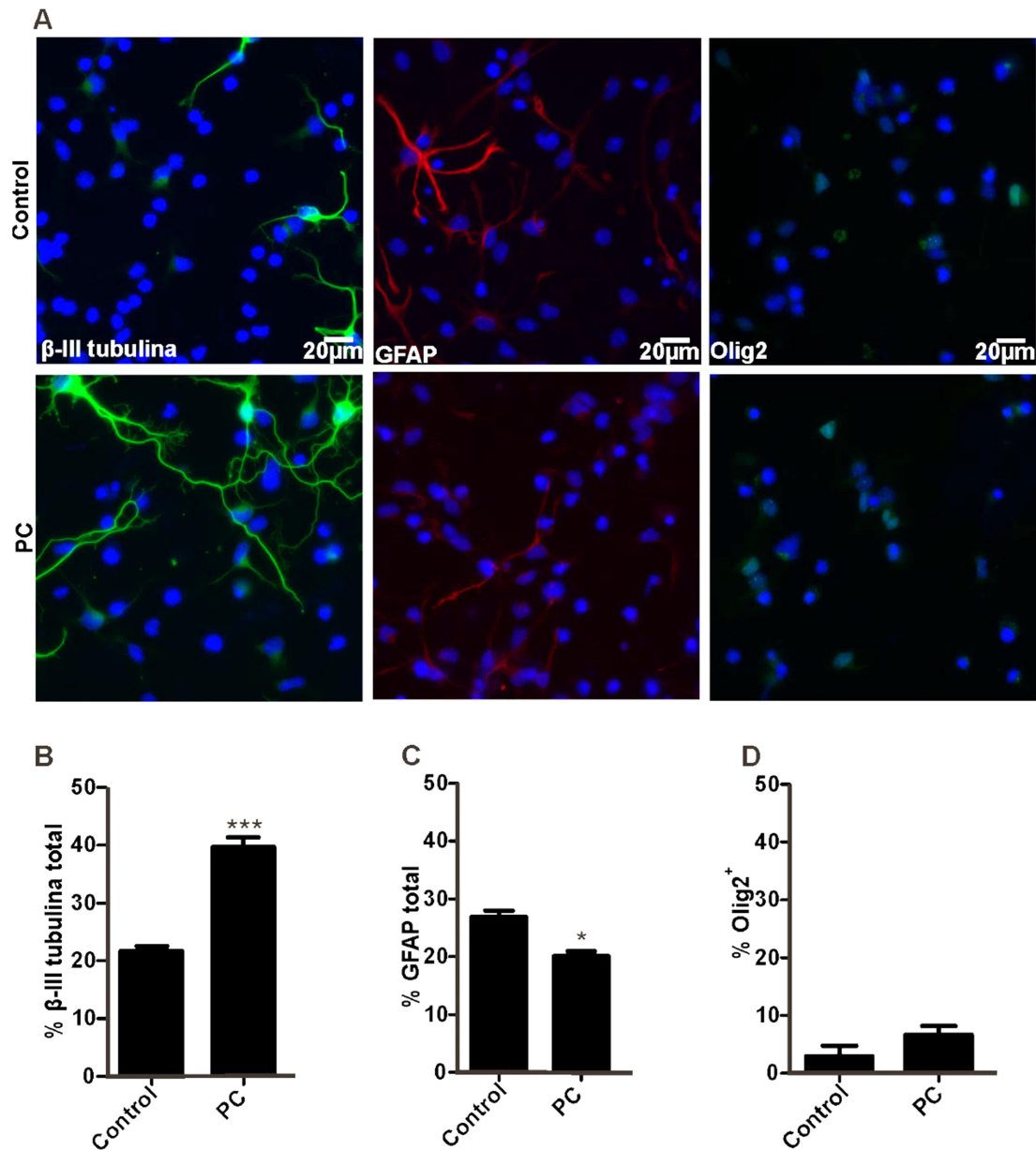


Figura 21. Efecto del agregado de PC en la diferenciación de cultivos de NSCs. A) Imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia con el marcador neuronal (β -III Tubulina), astrogial (GFAP) y de oligodendrocitos (Olig2) en condiciones de diferenciación durante un período de 3 días de incubación, tanto en la condición control como luego del agregado de PC 50 μ M. Se tomaron 20 fotos al azar de cada condición con el microscopio Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. **B)** Cuantificación de células β -III Tubulina positivas. **C)** Cuantificación de células GFAP positivas. **D)** Cuantificación de células Olig2 positivas. Las gráficas corresponden a un promedio de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el test paramétrico de Student para la comparación de dos muestras. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Para confirmar estos resultados, se realizaron ensayos de Western Blot utilizando el anticuerpo anti- β -III Tubulina (Figura 22).

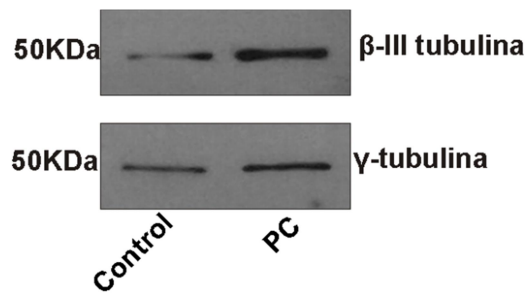


Figura 22. Efecto del agregado de PC en la diferenciación neuronal de NSCs mediante Western Blot. Se sembraron 10 μg de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles del marcador neuronal (β -III Tubulina) respecto al control de carga (γ -Tubulina).

Para estudiar si el agregado de PC afectaba también a las poblaciones de astrocitos u oligodendrocitos, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente, analizando la población de astrocitos mediante marcación con GFAP, o de oligodendrocitos por marcación con Olig2. Se observó que el tratamiento con liposomas de PC induce una disminución en el número de células GFAP positivas (Figura 21 A y 21 C), sin afectar la población de oligodendrocitos (Figura 21 A y 21 D).

Se ha demostrado que los ácidos grasos pueden actuar como moléculas de señalización [67], [91], [92]. Debido a que la PC utilizada es extraída de huevo y por lo tanto es una mezcla de especies de PC esterificadas a diferentes ácidos grasos (Tabla 3), se decidió estudiar el efecto del fosfolípido di-oleil-PC (DOPC) y de esfingomiélin en la diferenciación neuronal en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación. Para esto, se realizaron ensayos de diferenciación de la misma manera a lo explicado anteriormente. En la Figura 23 se observa que en todos los casos el número de células β -III-Tubulina positivas aumenta respecto al control, concluyendo así que el efecto inductor de PC es independiente de la composición de ácidos grasos.

Ácido graso	Contribución
Ácido Palmítico	33%
Ácido Esteárico	13%
Ácido Oleico	31%
Ácido Linoleico	15%
Otros	8%

Tabla 3. Porcentajes aproximados de ácidos grasos presentes en el fosfolípido PC proveniente de huevo (Sigma). Adaptado de la hoja de especificación de PC (P3556, Sigma).

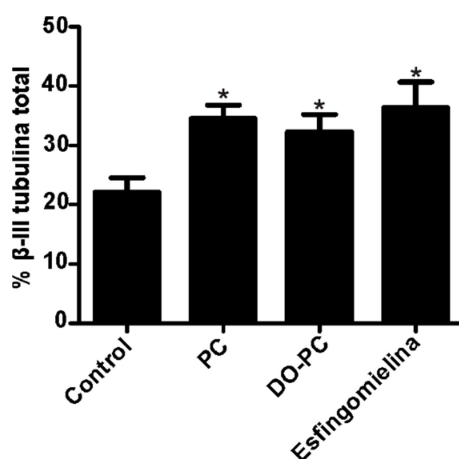


Figura 23. Efecto del agregado de PC con diferente composición de ácidos grasos. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación suplementadas con PC (P3556, Sigma) 50 μ M, Di-oleil-PC (DO-PC) 50 μ M y esfingomielina 50 μ M por un período de tres días. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina. Se tomaron 20 fotos al azar de cada condición con el microscopio Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. El análisis estadístico se realizó utilizando un test de ANOVA, seguido de un test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$

4.3.1 Análisis del destino de los liposomas de PC en cultivos de NSCs

Con el objetivo de evaluar el destino de los liposomas en el cultivo celular, se realizó una marcación de los mismos con el compuesto lipofílico fluorescente Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution (Materiales y Métodos). Los liposomas marcados se incubaron durante un minuto con las células a 37 °C. Inmediatamente después, se realizó la observación microscópica utilizando el microscopio confocal Zeiss. Como control, las células se incubaron con la misma dilución de Vybrant™ Dil Cell-Labeling

Solution en PBS 1X en ausencia de liposomas. En la Figura 24 se observa que luego de la incubación con liposomas, las células adquieren fluorescencia roja; sin embargo, en la condición control no se observa fluorescencia. Esto permite concluir que el efecto observado depende de los liposomas y no del compuesto lipofílico fluorescente libre que podría intercalarse en la membrana, sugiriendo de esta manera que los liposomas de PC se incorporan a las membranas celulares.

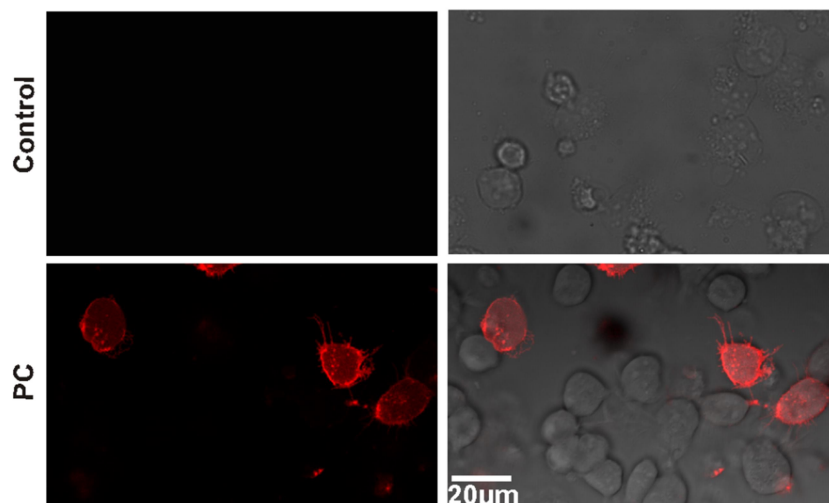


Figura 24. Marcación de liposomas de PC. Se incorporaron los liposomas de PC marcados al cultivo de NSCs en condiciones de diferenciación. Como control, se incorporaron liposomas de PC sin marcar al cultivo de NSCs. Se tomaron fotografías con el microscopio Zeiss LSM 880. Rojo (Vybrant™ Dil Cell-Labeling Solution).

4.3.2 Efecto de PC a diferentes tiempos

Para determinar si el efecto de PC sobre la diferenciación neuronal depende de la presencia continua de los liposomas en el medio de cultivo, es decir de un estímulo persistente o continuo, se evaluó su efecto retirando dicho fosfolípido del medio de cultivo a diferentes tiempos (Figura 25 A, C y E). Se observó que ya a las 24 horas en cultivo, PC estimula la diferenciación neuronal incrementando el número de células β -III Tubulina positivas (Figura 25 A y B). Además, se evidenciaron efectos similares luego de un pulso corto de una hora con PC (Figura 25 C y D), sugiriendo que el tratamiento con el lípido en estudio lleva a cambios con efectos a largo plazo en la especificación celular. Sin embargo, la suplementación con liposomas de PC luego de 24 horas en cultivo en condiciones de diferenciación no promueve la neurogénesis (Figura 25 E y

F), sugiriendo que el efecto inductor de PC sobre la diferenciación neuronal ocurre en las primeras etapas del proceso y que existe una ventana de tiempo donde las células NSCs pueden responder al fosfolípido.

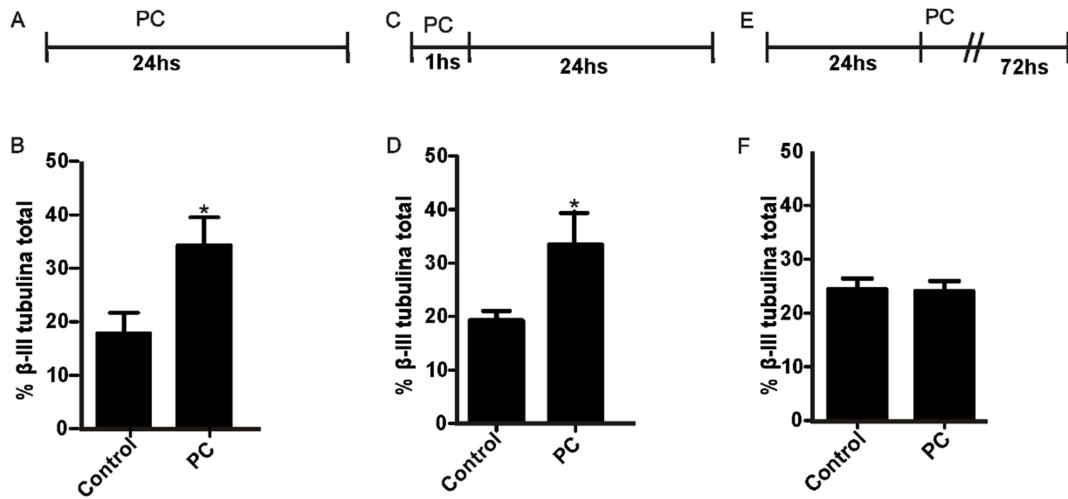


Figura 25. Análisis del efecto de PC a diferentes tiempos. A, C y E) Esquemas de los protocolos utilizados. B, D y F) Se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β-III Tubulina y se cuantificó el número de células β-III Tubulina positivas. Se tomaron 20 fotos al azar de cada condición, utilizando el microscopio Nikon Eclipse 800, con un aumento 40X. Se utilizó el test estadístico paramétrico de Student. *p<0.05

4.4 Efecto del agregado de fosfatidiletanolamina en la diferenciación de NSCs *in vitro*

Como se mencionó en la Introducción, el fosfolípido PE es el segundo más abundante en membranas biológicas [55], por lo que resultó interesante evaluar su efecto en la diferenciación de NSCs. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia luego de 3 días de cultivo en condiciones de diferenciación para evaluar el porcentaje de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En la Figura 26 se observa que, luego del agregado de liposomas de PE, se produce un aumento en el número de células GFAP positivas, mientras que el número de neuronas y oligodendrocitos presentes en el cultivo no se afecta. Mediante ensayos de Western Blot utilizando el anticuerpo anti-GFAP, se corroboró el efecto inductor de PE en la diferenciación astrogliar (Figura 27), como así también la especificidad del anticuerpo.

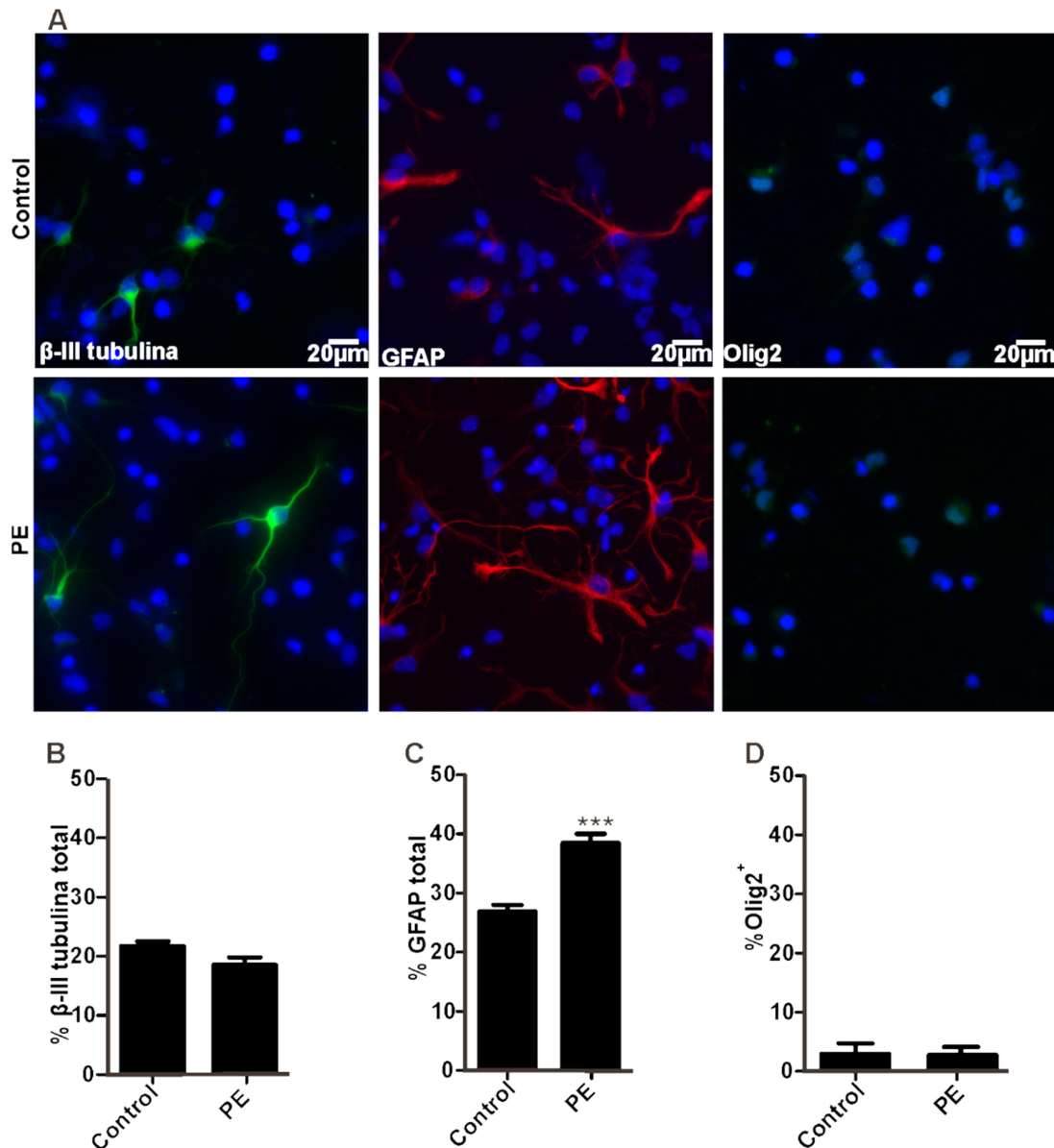


Figura 26. Efecto del agregado de PE a cultivos de NSCs. A) Imágenes representativas de los ensayos de inmunofluorescencia con el marcador neuronal (β -III tubulina), astrogial (GFAP) y de oligodendrocitos (Olig2) en condiciones basales y luego del agregado de PE 50 μ M en condiciones de diferenciación a los 3 días de incubación. Se tomaron 20 fotos al azar de cada condición con el microscopio Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. **B)** Cuantificación de células β -III Tubulina positivas. **C)** Cuantificación de células GFAP positivas. **D)** Cuantificación de células Olig2 positivas. La gráfica corresponde a un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test paramétrico de Student. *** $p < 0.001$

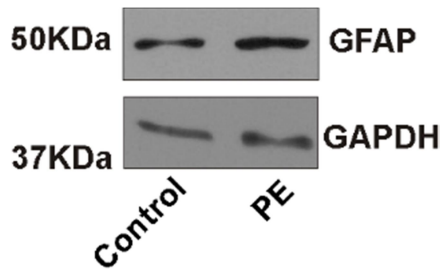


Figura 27. Efecto del agregado de PE en la diferenciación astrogial de NSCs mediante Western Blot. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles del marcador neuronal (GFAP) respecto al control de carga (GAPDH).

4.5 Análisis de la proliferación celular

En el cultivo de neuroesferas existen diferentes poblaciones de células que tienen la capacidad de proliferar, como los progenitores neuronales y los progenitores astrogiales. Una hipótesis para explicar el efecto de los lípidos en la diferenciación neuronal o astrogial, es que los mismos promuevan la proliferación celular de progenies específicas [93]–[95]. Es decir, PC podría promover la proliferación de progenitores corticales neuronales, por lo que al final del período en estudio habría más neuronas respecto al control. De la misma manera, PE podría inducir la proliferación de progenitores astrogiales que se diferencien generando más astrocitos en el cultivo. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron diferentes análisis de la proliferación celular, descritos a continuación.

4.5.1 Análisis de la proliferación celular mediante microscopía de lapso de tiempo

La diferenciación neuronal procede *in vitro* a través de un programa celular autónomo de progresión de linaje incluyendo ciclos de divisiones celulares simétricas y asimétricas. Está ampliamente citado en la literatura el estudio de la proliferación celular de cultivos primarios de embriones de ratón en diferentes períodos gestacionales [15], [17], [96]. Sin embargo, nada se sabe respecto al fenómeno de división celular de NSCs previamente amplificadas mediante el cultivo de neuroesferas y cultivadas en condiciones de diferenciación. Por este motivo, se estudió en primer lugar el comportamiento de este tipo de cultivo. Una técnica interesante para evaluar proliferación celular es la microscopía de lapso de tiempo [97], [98]. Gracias a una

colaboración con el Dr. Costa en el Instituto del Cerebro, Natal, Brasil, se evaluó división celular mediante esta técnica.

La estrategia consistió en observar cada célula de manera individual para determinar si la misma entraba en el ciclo de división celular. Para esto, se sembraron 250.000 NSCs e incubaron en condiciones de diferenciación a temperatura y presión de CO₂ controladas. Las células se monitorearon de la siguiente manera: se tomaron fotos cada diez minutos durante tres días en la misma posición de la placa, compilando un video al final del período en estudio. Se tomaron fotografías en al menos cuatro posiciones diferentes. El análisis detallado se realizó utilizando el programa Tim's Tracking Tool-TTT [85]. Se cuantificó el número de células que se dividían, y se observó que solo el 10% de la población en cultivo corresponde a células en activa división celular, llamadas células progenitoras. El 90% restante son células precursoras, es decir, células que no se dividen al menos en el período de tiempo analizado. Por lo tanto, en un cultivo de NSCs en condiciones de diferenciación existe un 10% de células progenitoras que se dividen en el transcurso de los tres días de cultivo (Figura 28, condición control).

Luego de caracterizar el proceso en condiciones basales, se evaluó si la suplementación exógena de PC o PE podría alterar la población de células progenitoras, es decir, las células en división. Para esto, las células se cultivaron en presencia de liposomas de PC o PE, de la misma manera a lo descrito anteriormente. Los resultados obtenidos mostraron que el número de células en activa división celular no varía cuando los cultivos se suplementan con los lípidos (Figura 28).

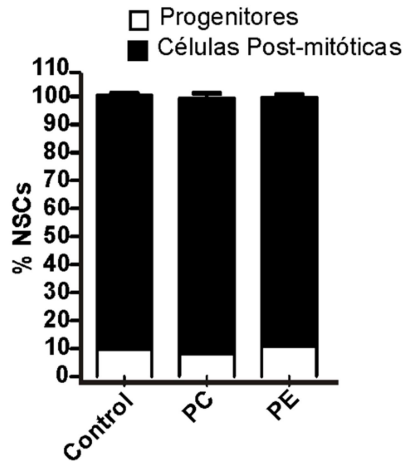


Figura 28. Estudio de la proliferación celular en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación mediante microscopía de lapso de tiempo. Se sembraron 250.000 NSCs en placas de 24 pocillos y se agregó PC 50 μ M o PE 50 μ M, según correspondiera. Las células se monitorearon durante tres días, tomando fotografías cada 10 minutos. Se cuantificó el número de células en activa división celular en cada condición. Se analizaron los videos correspondientes de fotografías tomadas en 4 posiciones diferentes del microscopio para cada condición.

4.5.1.1 Análisis del modo de división celular mediante microscopía de lapso de tiempo

Con el objetivo de evaluar si los lípidos podrían influir en el modo de división celular, se estudió la forma de progresión del linaje mediante microscopía de lapso de tiempo. Para llevar a cabo dicho análisis, primero se caracterizó la progresión del linaje en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación. Se siguió cada célula de manera individual, se observó si ocurría o no la división mitótica, y posteriormente se evaluó el destino de cada célula hija al final del período de estudio mediante la realización de un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal MAP2 o el marcador glial GFAP. En la Figura 29 se observa un ejemplo del proceso realizado.

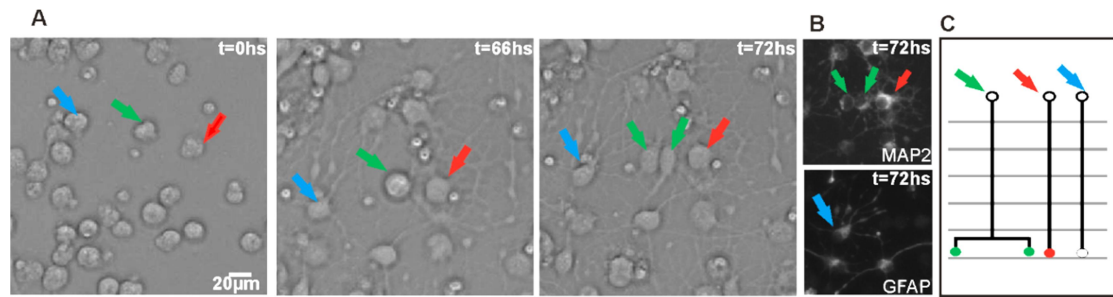


Figura 29. Estudio del modo de división celular. Se cultivaron NSCs y se evaluó mediante microscopía de lapso de tiempo el momento en que cada célula se dividía y el fenotipo final de la progenie. **A)** NSCs a diferentes tiempos en cultivo. La flecha verde señala una célula en activa división celular y las células hijas al final del periodo de estudio con fenotipo neuronal. La flecha azul señala una célula precursora que se diferencia a astrocito. La flecha roja señala una célula precursora que se diferencia a neurona. **B)** Inmunofluorescencia con el marcador neuronal MAP2 y el marcador glial GFAP realizada al final del período de estudio. **C)** Esquema del modo de división celular.

Se determinaron, además, las diferentes formas de progresión del linaje en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación (Figura 30): progenitores terminales neuronales (A), progenitores que generan una célula con fenotipo neuronal y otra indiferenciada en el periodo de tiempo analizado (B), progenitores terminales neuronales con apoptosis en una de las células de la progenie (C), progenitores terminales indiferenciados en el periodo de estudio (D), progenitores indiferenciados con apoptosis en una de las células de la progenie (E), o progenitores terminales con apoptosis en ambas células de la progenie (F). Asimismo, se pudo demostrar que, del total de la población de progenitores, el 30% se divide en las primeras 24 horas de cultivo, otro 30% de los progenitores en las segundas 24 horas de cultivo, y finalmente el 40% restante en las últimas 24 horas de cultivo (Figura 31).

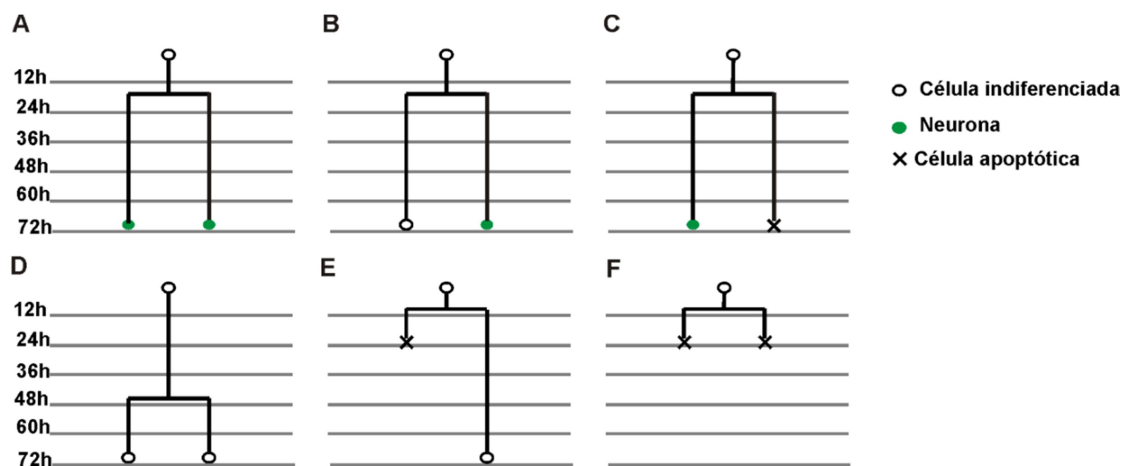


Figura 30. Modo de división celular. Análisis por microscopía de lapso de tiempo del modo de división celular de NSCs en condiciones de diferenciación. **A)** Progenitores terminales neuronales. **B)** Progenitores que generan una neurona y una célula indiferenciada. **C)** Progenitores terminales neuronales con apoptosis en una de las células. **D)** Progenitores terminales indiferenciados. **E)** Progenitores indiferenciados con apoptosis en una de las células. **F)** Progenitores terminales con apoptosis en ambas células.

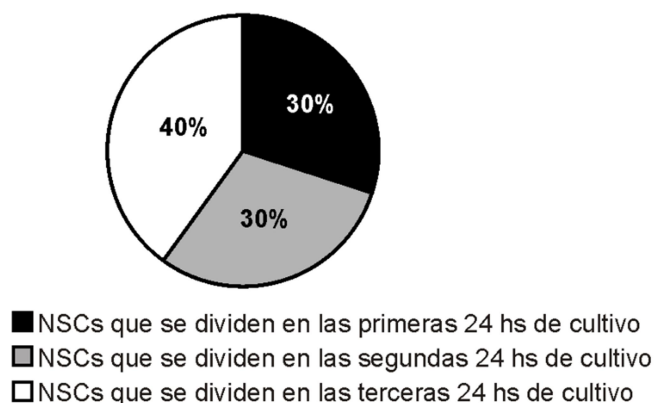


Figura 31. Tiempo de división de NSCs en condiciones de diferenciación. Se cuantificó mediante microscopía de lapso de tiempo el número de células que se dividían en las primeras 24 horas de cultivo, entre las 24 y 48 horas en cultivo, y entre las 48 y las 72 horas en cultivo.

Posteriormente, se procedió a analizar el modo de división celular en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación suplementados con PC o PE. Como se muestra en la Figura 32, los lípidos no alteran el modo de división celular.

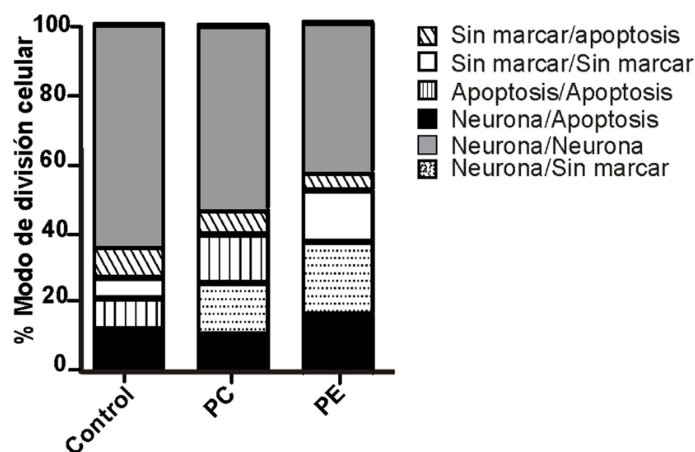


Figura 32. Análisis del modo de división celular luego del agregado de PC y PE. Se analizó mediante microscopía de lapso de tiempo el modo de división celular de NSCs en condiciones basales de diferenciación, luego de la suplementación de PC 50 μ M o PE 50 μ M.

4.5.2 Análisis de la proliferación mediante marcación con Bromodesoxiuridina

Otra técnica que permite evaluar proliferación celular es el ensayo de incorporación de Bromodesoxiduridina (BrdU) [83]. El fundamento de esta técnica reside en que, si las células se encuentran en fase S de ciclo celular, al momento de replicar el ADN pueden incorporar el análogo de Timidina. Posteriormente, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BrdU pueden detectarse las células que han incorporado dicho análogo.

Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación en placas de 24 pocillos con cubreobjetos tratados con poli-D-lisina y se agregó BrdU (10 μ M). Luego de tres días, se realizó la técnica de inmunocitoquímica acoplada a microscopía de fluorescencia (Materiales y Métodos). Se observó que el número de células BrdU positivas no se altera luego del tratamiento con los lípidos de interés (Figura 33) indicando que los lípidos no afectan la proliferación celular.

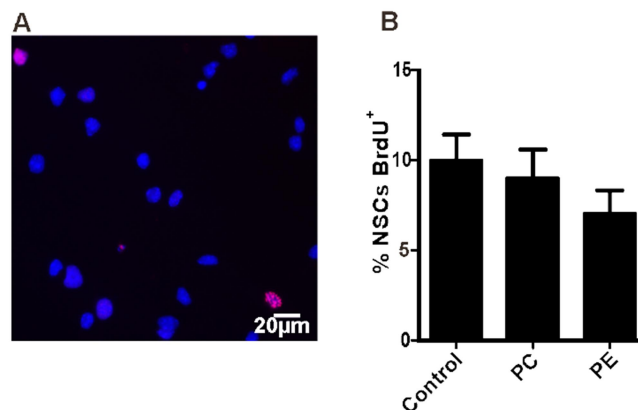


Figura 33. Análisis de la proliferación celular mediante marcación con BrdU. **A)** Imagen representativa del ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-BrdU. Rojo: células que han incorporado BrdU. Azul: Hoechst. La microscopía se llevó a cabo utilizando el microscopio Nikon Eclipse 800, con un aumento 40X. **B)** Cuantificación de células BrdU positivas en condiciones basales, y luego del agregado de PC 50 μM o PE 50 μM. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Nikon EZ-C1 3.7 Free Viewer. Para el análisis cuantitativo se tomaron 20 fotos de campos al azar. La gráfica corresponde a un promedio de tres experimentos independientes.

4.5.3 Estudio de los niveles proteicos del antígeno nuclear de proliferación celular por Western Blot

Para confirmar los resultados obtenidos mediante microscopía de lapso de tiempo y marcación con BrdU, se decidió evaluar los niveles de expresión de la proteína de proliferación celular (PCNA) mediante ensayos de Western Blot. PCNA es una proteína nuclear, que se sintetiza mayoritariamente durante la fase S del ciclo celular, y es necesaria para la replicación del ADN, ya que actúa como cofactor de la ADN polimerasa [99]–[101].

Para llevar a cabo el análisis, se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación, se suplementaron los lípidos en estudio y se incubaron por un período de tres días. Posteriormente, las células se procesaron y se prepararon los extractos proteicos (Materiales y Métodos). Finalmente, se determinaron los niveles de PCNA por Western Blot. No se detectaron variaciones en los niveles proteicos de PCNA en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 34).

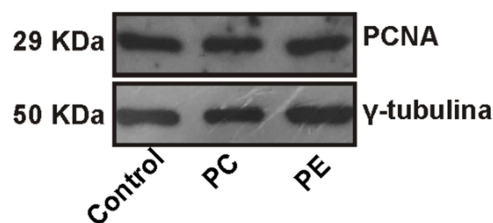


Figura 34. Análisis de la proliferación celular mediante ensayos de Western Blot. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles de PCNA respecto al control de carga (γ -Tubulina).

4.6 Análisis de la supervivencia

Debido a que ciertos lípidos pueden ejercer un efecto neuroprotector [102]–[104], una hipótesis posible para explicar el aumento en la diferenciación neuronal o astrogliar inducida por los lípidos, es que éstos puedan promover específicamente la supervivencia de neuronas o astrocitos. Se abordaron diferentes técnicas para estudiar la viabilidad en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación.

4.6.1 Análisis de la viabilidad mediante MTT

Una forma de analizar viabilidad celular es el ensayo colorimétrico de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio), que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Este ensayo está basado en la reducción metabólica del MTT por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial para producir la sal insoluble formazán, que se evidencia a través de un cambio en su coloración. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido [82].

Para realizar este análisis, las células se cultivaron en condiciones de diferenciación por un período de 3 días en presencia o ausencia de PC o PE (Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos (Figura 35) mostraron que ninguno de los lípidos en estudio modifica significativamente la viabilidad de cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación.

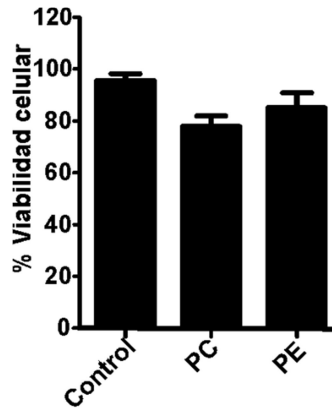


Figura 35. Análisis de la viabilidad mediante MTT. Porcentaje de viabilidad celular de NSCs a los tres días en cultivo en condiciones de diferenciación luego el agregado de PC 50 μ M o PE 50 μ M. La gráfica representa un promedio de tres experimentos independientes.

4.6.2 Análisis de la viabilidad mediante microscopía de lapso de tiempo

La microscopía de lapso de tiempo permite también analizar el número de células viables a distintos tiempos [50]. La estrategia consistió en contar el número de células viables en cada condición al inicio de la incubación ($t=0$), a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. En la Figura 36 se muestra una posición fija del microscopio con imágenes a los distintos tiempos de incubación ensayados.

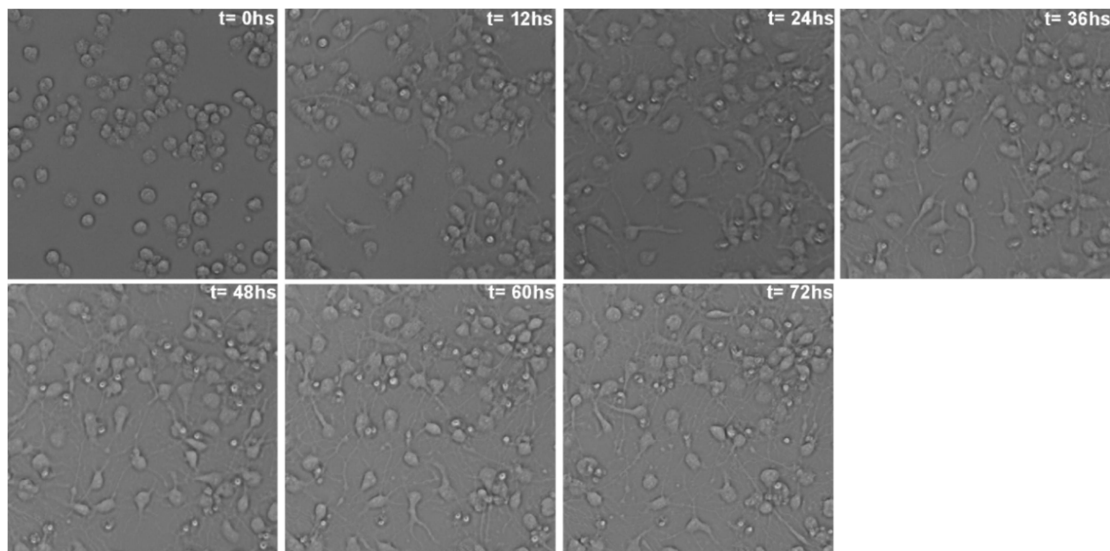


Figura 36. Imágenes representativas de cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación a diferentes tiempos. Fotografías tomadas mediante microscopía de lapso de tiempo en una misma posición del microscopio.

A los tiempos indicados se cuantificó el número de células viables en la condición control, y luego del agregado de PC o PE. Los resultados se resumen en el

gráfico de la Figura 37, donde se observa que el número de células viables no se modificó por el agregado de los lípidos en estudio.

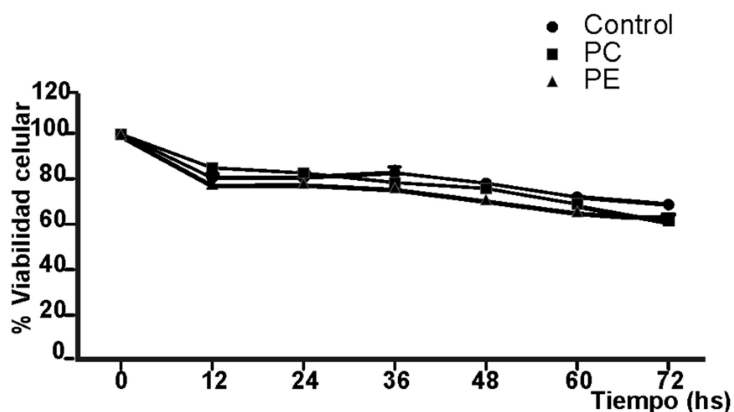


Figura 37. Viabilidad celular mediante microscopía de lapso de tiempo. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación durante tres días en presencia de PC 50 μ M o PE 50 μ M. Se analizó mediante morfología la viabilidad celular a diferentes tiempos (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas). Se analizaron cuatro posiciones diferentes del microscopio para cada condición.

4.6.3 Análisis de la viabilidad mediante el estudio de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

La medida de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es un ensayo de citotoxicidad muy utilizado. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de células vivas y se libera al medio de cultivo al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que se han visto afectadas por un agente tóxico. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas [105], [106].

Es posible analizar el efecto neuroprotector mediante la técnica LDH. En este sentido, el número de células lisadas se reducirá si los lípidos ejercen un efecto protector sobre las células, lo cual se verá reflejado en los niveles de LDH presentes en el sobrenadante. Se realizó la técnica de LDH (Materiales y Métodos) y se observó que los niveles de LDH no se modifican en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 38), por lo que se concluyó que ni PC ni PE producen un efecto neuroprotector en el cultivo de NSCs en condiciones de diferenciación.

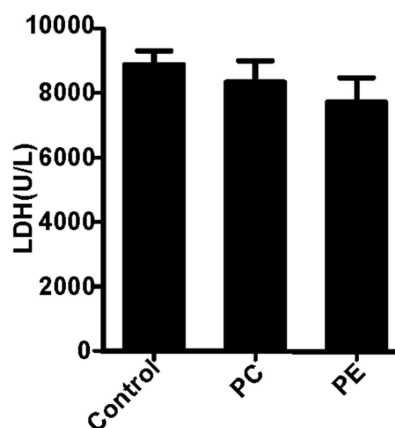


Figura 38. Análisis de la citotoxicidad mediante LDH. Se sembraron 50.000 NSCs en placas de 96 pocillos previamente tratadas con PDL y se suplementó con PC 50 μ M o PE 50 μ M. Luego de tres días de incubación, se analizaron los niveles de LDH en el sobrenadante. La gráfica corresponde a un promedio de tres experimentos independientes.

4.7 Análisis de la aceleración de la diferenciación neuronal y astroglial

Otra hipótesis para explicar el aumento en la población de neuronas y astrocitos, promovidos por PC y PE, respectivamente, es que los lípidos puedan acelerar el proceso de diferenciación. De ser así, al aumentar el tiempo en cultivo, la condición control alcanzaría los valores obtenidos con PC o PE. Para abordar esta hipótesis, se realizaron ensayos de diferenciación a distintos tiempos y se analizó el fenotipo mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para poder realizar un análisis más detallado, se realizó una doble marcación con Nestina. De esta forma, se puede discriminar entre la población de precursores que adquirieron fenotipo neuronal (células que expresan Nestina y β -III Tubulina), de neuronas jóvenes (células que solo expresan β -III Tubulina). En el caso de la población de astrocitos, la doble marcación con Nestina permite discriminar entre las poblaciones de precursores astrogliales (células que expresan Nestina y GFAP), y la de astrocitos (células que sólo expresan GFAP).

En lo referente a la diferenciación neuronal, los resultados obtenidos mostraron que, luego de 24 horas en cultivo, la mayoría de las células con fenotipo neuronal expresan Nestina, es decir, corresponden a la población de precursores neuronales. Se pudo demostrar, además, que en presencia de liposomas de PC ya a las 24 horas de cultivo dicha población celular aumenta significativamente respecto al control (Figura 39 A). Conforme aumenta el tiempo en cultivo, se incrementa la

población de células que sólo expresan β -III Tubulina (neuronas jóvenes). Asimismo, se comprobó que PC, además de promover la diferenciación neuronal de precursores neuronales en los tres tiempos analizados, aumenta el número de células que solo expresan β -III Tubulina, es decir, de neuronas jóvenes. Adicionalmente, se pudo evidenciar que, a los siete días en cultivo, los valores alcanzados en la condición control son menores a los obtenidos luego de tratamiento con PC (Figura 39 A). Estos resultados sugieren que el aumento en el número de células β -III Tubulina positivas causado por PC no es debido a una aceleración del proceso de diferenciación.

Por el contrario, al estudiar la diferenciación astrogial inducida por liposomas de PE, se observó que, luego de un día en cultivo, el porcentaje de células que expresan GFAP es del 10% en ambos casos, y prácticamente todas las células que expresan GFAP también expresan Nestina. Sin embargo, a los tres días, los cultivos tratados con PE muestran un aumento significativo en el número de células GFAP/Nestina positivas, respecto a la condición control. Luego de 7 días en cultivo, la población de células GFAP/Nestina positivas tratadas con PE se mantiene superior a la condición control, sugiriendo así que PE no promueve la aceleración del proceso de diferenciación astrogial, al menos en el período de tiempo analizado. No obstante, en el cultivo de células suplementadas con PE, aproximadamente el 10% de la población GFAP positiva pierde la expresión de Nestina entre el día 3 y 7. En contraste, en la condición control, la población celular que solo expresa GFAP se mantiene constante entre ambos períodos de tiempo (Figura 39 B).

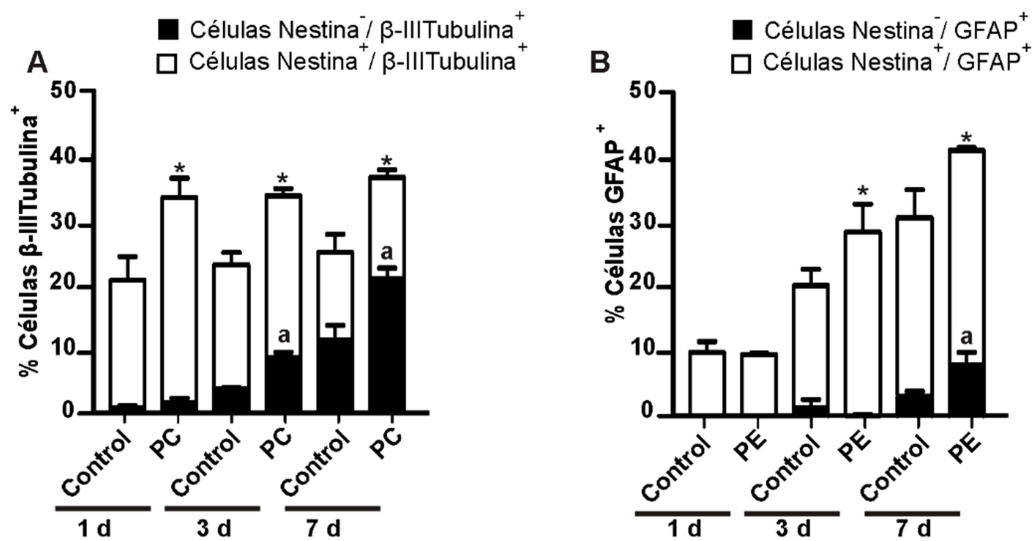


Figura 39. Análisis de la aceleración del proceso de diferenciación neuronal y astroglial. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación durante 1, 3 o 7 días. Posteriormente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. **A)** Porcentaje de diferenciación neuronal en condición basal y luego del agregado de PC 50 μ M a diferentes tiempos. Se utilizaron los marcadores β -III Tubulina y Nestina. **B)** Porcentaje de diferenciación astroglial en condición basal y luego del agregado de PE 50 μ M a los distintos días en cultivo (1, 3 y 7 días). Se utilizaron los marcadores GFAP y Nestina. Las gráficas corresponden un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se realizó el test no paramétrico Mann Whitney para la comparación de dos muestras: se analizó cada condición tratada respecto a su control para cada tiempo en estudio ^a, * $p < 0.05$.

4.8 Estudio del cambio en la especificación celular luego del agregado de PC o

PE

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis muestran que el aumento en la diferenciación neuronal o astroglial, promovidos por PC o PE, respectivamente, no es debido a un aumento en la proliferación celular, como así tampoco a un aumento en el número de células totales viables. Asimismo, los lípidos tampoco aceleran el proceso de diferenciación. Con el objetivo de identificar el mecanismo mediante el cual PC y PE modifican la diferenciación celular, se hipotetizó que los lípidos podrían modificar el destino celular de manera selectiva, promoviendo de esta forma la diferenciación celular.

4.8.1 Análisis del destino celular mediante microscopía de lapso de tiempo

Como se mencionó anteriormente, según la actividad mitótica, las células NSCs se pueden clasificar en dos poblaciones (progenitores y precursores). Para determinar específicamente cuál es la población afectada por los lípidos, se realizó un análisis por microscopía de lapso de tiempo. La estrategia consistió en seguir cada célula de manera independiente, observar si se trataba de una célula progenitora o precursora, y finalmente evaluar su fenotipo mediante inmunofluorescencia al final del período de estudio. En el caso de la población de progenitores, se evaluó el fenotipo de las células hijas.

4.8.1.1 Análisis del destino de progenitores corticales

En primer lugar, se analizó la población de células progenitoras y se observó que, del total de esta población, aproximadamente un 65 % se diferencia en neuronas, un 15 % sufre apoptosis, y un 10 % permanece indiferenciada en el periodo de tiempo analizado (Figura 40 A, B y C). Interesantemente, no se detectaron células hijas con fenotipo astrogliar. Cuando se suplementó el medio con los lípidos, no se observaron cambios significativos respecto de la condición basal (Figura 40 A, B y C), es decir, ni PC ni PE modifican el destino de células progenitoras. De esta manera, el efecto inductor en la diferenciación neuronal o astrogliar promovido por PC o PE, respectivamente, es independiente de cambios en el comportamiento de células progenitoras.

4.8.1.2 Análisis del destino de precursores corticales

Al analizar la población de células precursoras, se evidenció que PC induce un aumento del número de células MAP2 positivas (Figura 40 D). Al mismo tiempo, provoca una disminución tanto del número de células GFAP positivas (Figura 40 G), como así también de la población indiferenciada (células negativas para MAP2 y GFAP, Figura 40 F). Por otro lado, PE promueve un aumento en el número de células GFAP positivas (Figura 40 G), disminuyendo la población de células indiferenciada (Figura 40 F), pero sin alterar la población neuronal (Figura 40 D). Estos resultados sugieren que los lípidos en estudio regulan el destino de células post-mitóticas.

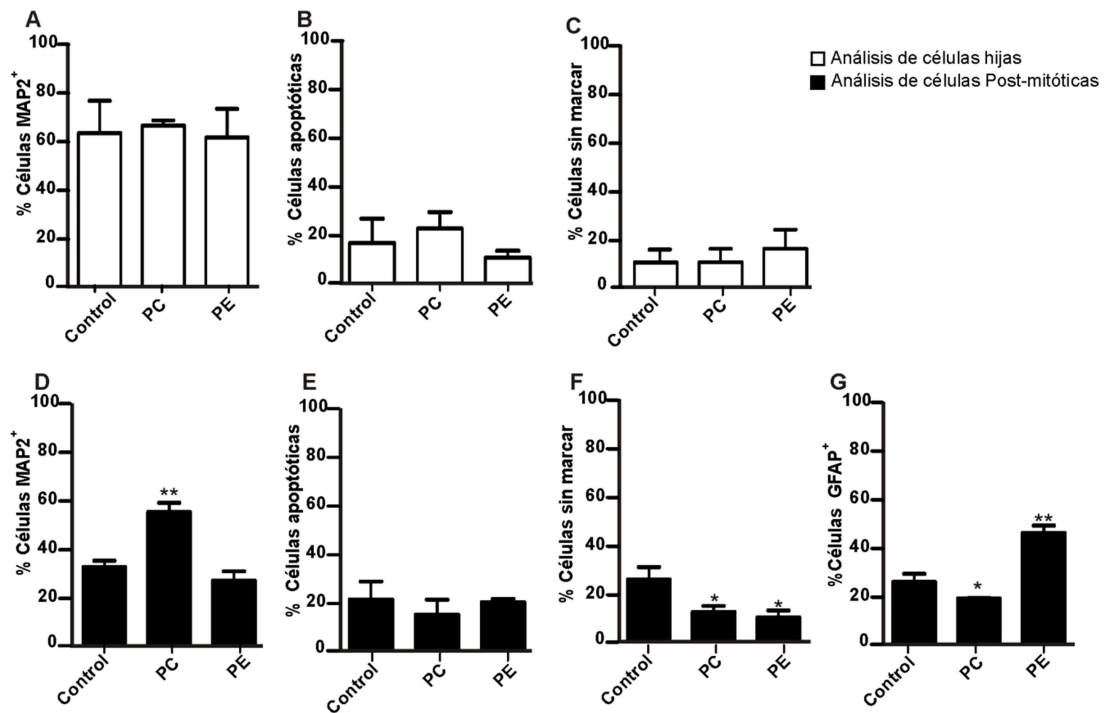


Figura 40. Análisis del fenotipo de precursores y progenitores. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación, se suplementaron con PC 50 μ M o PE 50 μ M, y se siguieron mediante microscopía de lapso de tiempo por un período de tres días. Posteriormente, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal MAP2, y el marcador astrogliar GFAP. **A)** Porcentaje de células hijas que expresan MAP2. **B)** Porcentaje de células hijas que sufren apoptosis. **C)** Porcentaje de células hijas que no poseen marca neuronal ni astrogliar. **D)** Porcentaje de células precursoras que expresan MAP2. **E)** Porcentaje de células precursoras que sufren apoptosis. **F)** Porcentaje de célula precursoras que no poseen marca neuronal ni astrogliar. **G)** Porcentaje de células precursoras que expresan GFAP. Se estudiaron tres posiciones diferentes del microscopio en cada condición. El análisis estadístico se realizó utilizando el test paramétrico de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.8.2 Estudio de poblaciones post-mitóticas mediante inmunofluorescencia

En base a todos los resultados obtenidos, se decidió evaluar si PC y PE actúan en las fases iniciales de la diferenciación de las células post-mitóticas, alterando la especificación celular. Para abordar esta hipótesis, se recurrió a un ensayo de triple marcación con los marcadores MAP2, GFAP y Nestina y análisis por microscopia confocal, de manera de poder estudiar simultáneamente las poblaciones celulares presentes en el cultivo (Tabla 4). En la Figura 41 se observan imágenes representativas de las poblaciones detectadas con este ensayo.

Población celular	Marcadores utilizados
Precursos indiferenciados	Nestina ⁺ / MAP2 ⁻ /GFAP ⁻
Precursos neuronales	Nestina ⁺ / MAP2 ⁺ /GFAP ⁻
Precursos astrogiales	Nestina ⁺ / MAP2 ⁻ /GFAP ⁺

Tabla 4. Marcadores utilizados para detectar diferentes poblaciones celulares.

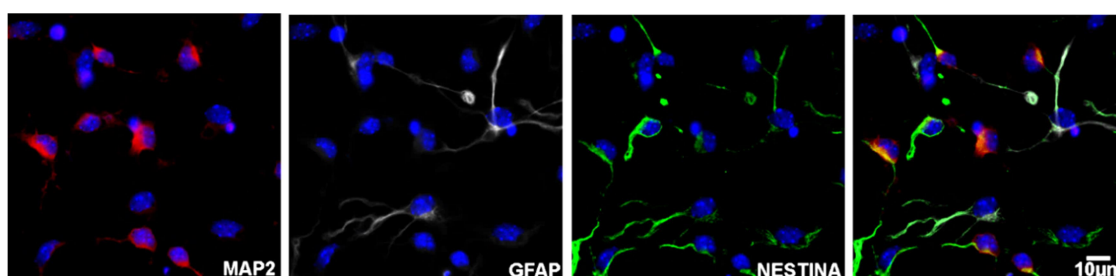


Figura 41. Inmunofluorescencia utilizando tres marcadores simultáneamente. Se sembraron NCSs en condiciones de diferenciación, se cultivaron durante tres días y se realizó la inmunofluorescencia. Rojo: MAP2; blanco: GFAP; verde: Nestina; azul: DAPI. Imágenes tomadas con el microscopio confocal de fluorescencia LSM 880 (Zeiss), con un aumento 63 X.

Los resultados demostraron que cuando el cultivo se suplementa con PC, se produce un aumento en la población de células precursoras neuronales (Figura 42 A y B). Interesantemente, se observó que, al mismo tiempo que la población de precursos neuronales aumenta, disminuye la población de precursos astrogiales (Figura 42 A y C) y la población de células indiferenciadas (Figura 42 A y D). Estos resultados sugieren que la diferenciación neuronal inducida por PC ocurre a expensas de la diferenciación astrogial, es decir que PC induce un cambio en el destino de células astrogiales hacia el linaje neuronal, y promueve la diferenciación de la población de precursos indiferenciados hacia el linaje neuronal.

En el caso de PE se observó un aumento en el porcentaje de precursos astrogiales (Figura 42 A y C), producido a expensas de la disminución de la población de precursos indiferenciados (Figura 42 A y D). En este caso PE no modifica la población de precursos neuronales (Figura 42 A y B). Es decir, PE podría inducir la diferenciación de la población de precursos indiferenciados hacia el linaje astrogial.

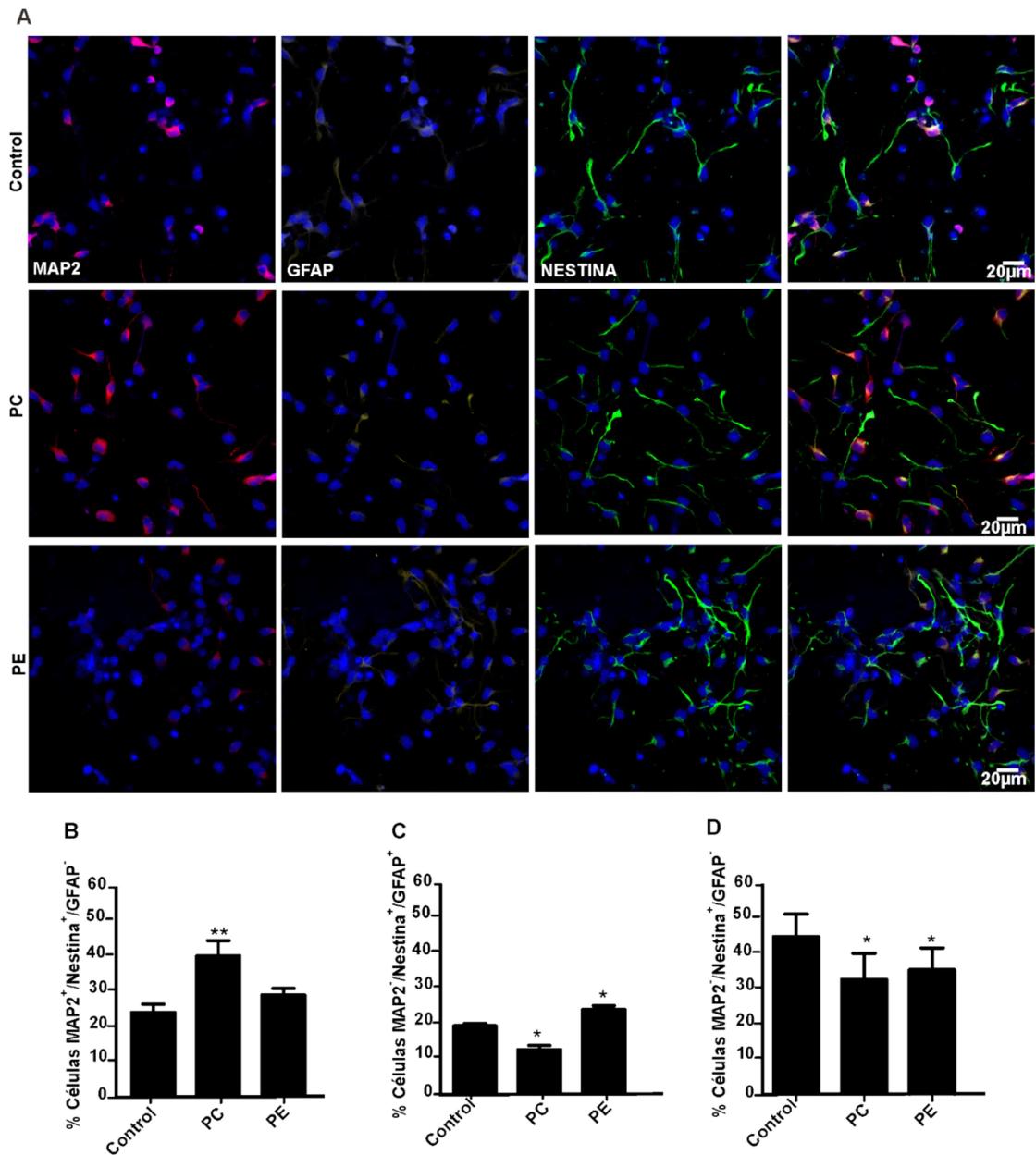


Figura 42. Inmunofluorescencia utilizando tres marcadores en simultáneo de NSCs tratadas con los lípidos en estudio. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación en presencia de PC 50 μ M o PE 50 μ M por un período de tres días. **A)** Imágenes representativas tomadas con el microscopio confocal de fluorescencia LSM 880 (Zeiss). Se utilizaron los siguientes marcadores: MAP2 (rojo), GFAP (naranja) y Nestina (verde). Los núcleos se evidenciaron mediante la tinción con DAPI (azul). **B)** Porcentaje de precursores neuronales (Nestina⁺/MAP2⁺/GFAP⁻). **C)** Porcentaje de precursores astrogiales (Nestina⁺/MAP2⁻/GFAP⁺). **D)** Porcentaje de precursores indiferenciados (Nestina⁺/MAP2⁻/GFAP⁻). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, seguido de un test de Tukey para comparaciones múltiples. *p<0.05, **p<0.01

4.9 Estudio de los mecanismos moleculares

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento acerca de cómo los lípidos en estudio promueven la diferenciación neuronal o astrogial, se propuso estudiar cuales son los mecanismos moleculares implicados en ambos procesos.

4.9.1 Identificación de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal inducida por PC

4.9.1.1 Vía de señalización PKA/CREB

Como se ha mencionado en la Introducción, se encuentra ampliamente citado en la literatura que la vía de señalización cAMP/PKA/CREB está involucrada en el proceso de diferenciación neuronal [49], [50], [54]. Para analizar si dicha vía estaba implicada en la diferenciación neuronal inducida por PC, se realizaron ensayos de diferenciación suplementando a las células en cultivo con dos inhibidores farmacológicos de PKA: H89 y KT5720 [107]. Ambos inhibidores bloquean la actividad de PKA mediante la inhibición competitiva con el sitio de unión de adenosina trifosfato (ATP) presente en la subunidad catalítica de PKA. Al no permitirse la unión de ATP, la subunidad catalítica de PKA no es capaz de fosforilar a las proteínas blanco. Debido a que se han identificado inhibiciones inespecíficas [108], se han utilizado ambos inhibidores para poder realizar un estudio más fehaciente.

La estrategia consistió en sembrar NSCs en condiciones de diferenciación, agregar los inhibidores en estudio, y 30 minutos después, suplementar el medio con liposomas de PC (50 μ M). Luego de 24 horas en cultivo, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina. Se observó que ambos inhibidores bloquean la diferenciación neuronal promovida por PC, sin afectar la diferenciación basal (Figura 43).

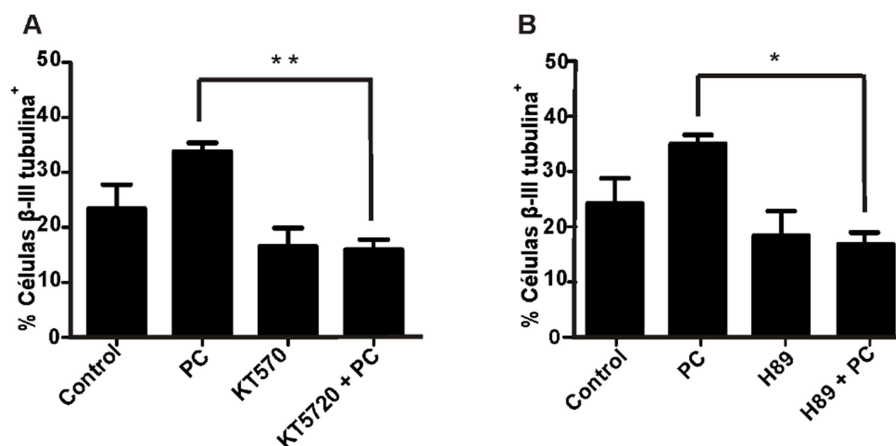


Figura 43. Efecto de la inhibición farmacológica de PKA en la diferenciación neuronal. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación y se suplementaron con los inhibidores KT5720 10 μ M (A), o H89 10 μ M (B), en presencia o ausencia de PC 50 μ M, según correspondiera. Luego de 24 horas, se realizó la técnica de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina. Las gráficas corresponden a un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA, seguido del test Bonferroni para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

La proteína de unión a elementos de respuesta del AMPc (CREB) requiere de su fosforilación para ser activada. Una vez activa, CREB es capaz de unirse y activar la expresión de genes relacionados con la neurogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que CREB está implicado en la regulación de la diferenciación de células progenitoras del hipocampo [109], [110], como así también en la migración de progenitores de la zona sub-ventricular (SVZ) hacia el bulbo olfatorio [111]. Para analizar si el efecto de PC dependía de la activación del factor de transcripción CREB, se evaluaron los niveles de p-CREB luego de una hora de cultivo, tanto en condiciones basales como así también luego del agregado de PC. Se evidenció, mediante Western Blot, un aumento en los niveles de p-CREB luego del agregado de PC (Figura 44), sugiriendo así que el proceso es dependiente la activación de CREB.

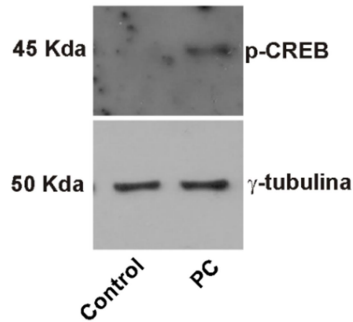


Figura 44. Análisis de los niveles de p-CREB mediante Western Blot. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles de p-CREB respecto al control de carga (γ -Tubulina) luego de una hora de tratamiento con PC 50 μ M en condiciones de diferenciación.

El siguiente objetivo fue evaluar el mecanismo mediante el cual PC es capaz de activar la vía de señalización PKA/CREB. Como se describió en la Introducción, la activación de PKA requiere de AMPc [112]–[114], y los niveles intracelulares de AMPc dependen de la actividad de la enzima Adenilato Ciclasa (AC) [115]. Para estudiar la participación de la enzima AC en la vía, se utilizó el inhibidor farmacológico 2'3'dideoxiadenosina (DDA) [116]. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación, se incubaron en presencia de DDA (200 μ M) durante 30 minutos, seguido del agregado de liposomas de PC. Luego de 24 horas, las células se fijaron y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β -III Tubulina. Como se muestra en la Figura 45, la inhibición farmacológica de AC bloqueó la diferenciación neuronal inducida por PC, sin alterar los niveles basales.

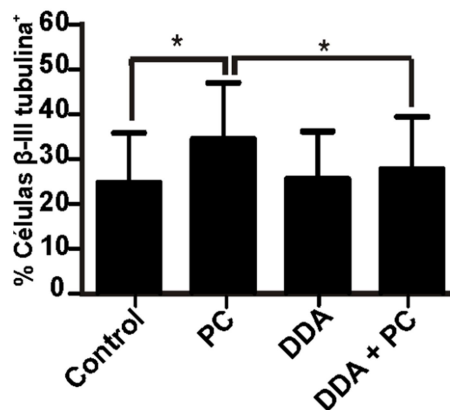


Figura 45. Efecto de la inhibición farmacológica de AC. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina luego de 24 horas en cultivo en presencia de DDA 200 μ M y/o PC 50 μ M, según correspondiera. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA, seguido del test Tukey para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$

4.9.1.2 Vía de señalización MEK/ERK

Debido a que se ha demostrado que la vía de señalización MEK/ERK se encuentra involucrada en la diferenciación neuronal de células de neuroblastoma Neuro-2a [39], como así también en la línea celular de células madre de origen murino [40], se evaluó si la inhibición de dicha vía afectaba la diferenciación neuronal dependiente de PC en cultivos de NSCs, utilizando el inhibidor farmacológico específico de MEK, UO126 [117]. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación y se incubaron en presencia de UO126 (20 μ M) durante 30 minutos, seguido del agregado de liposomas de PC. Luego de 24 horas de incubación, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador β -III Tubulina. Se observó que UO126 no afecta la diferenciación neuronal, es decir, no altera el número de células β -III Tubulina positivas en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 46). Confirmando estos resultados, se demostró (mediante ensayos de Western Blot), que el tratamiento con PC no promueve la activación de la quinasa ERK (Figura 48). Ambos resultados permiten descartar la participación de la vía MEK/ERK en la diferenciación neuronal de NSCs promovida por PC.

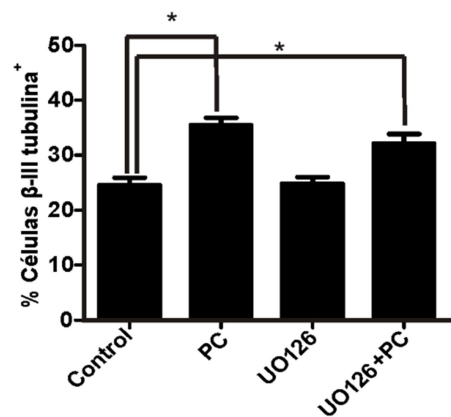


Figura 46. Efecto de la inhibición farmacológica de MEK en la diferenciación neuronal. Se realizó un experimento de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina luego de 24 horas en cultivo en presencia de UO126 20 μ M y/o PC 50 μ M, según correspondiera. La gráfica representa un promedio de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA, seguido del test Tukey para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$

4.9.2 Identificación de los mecanismos moleculares de NSCs involucrados en la diferenciación neuronal debido al efecto de PE

Para estudiar el mecanismo molecular mediante el cual PE es capaz de inducir la diferenciación astrogial, se comenzó con el estudio de la vía MEK/ERK debido a los datos de la bibliografía que muestran que dicha vía está involucrada en el proceso de diferenciación astrogial [41], [118].

En primer lugar, se realizaron experimentos de diferenciación con el inhibidor farmacológico de MEK, UO126. Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación y se incubaron en presencia de UO126 (20 μ M) durante 30 minutos, seguido del agregado de liposomas de PC. Luego de tres días en cultivo, las células se fijaron y se analizó el porcentaje de astrocitos mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFAP. Como se muestra en la Figura 47, la diferenciación basal no se afecta por el inhibidor UO126, sugiriendo así que dicho proceso es independiente de la vía MEK-ERK. Sin embargo, la inhibición farmacológica de MEK impide el aumento en la diferenciación hacia astrocitos inducida por PE sugiriendo la participación de la vía MEK-ERK.

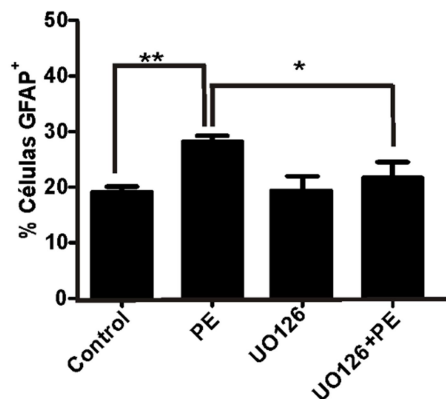


Figura 47. Efecto de la inhibición farmacológica de MEK en la diferenciación astrogial. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación y se suplementaron con el inhibidor farmacológico UO126 20 μ M, en presencia o ausencia de PE 50 μ M, según correspondiera. Luego de 72 horas, se realizó la técnica de inmunofluorescencia con el marcador astrogial GFAP. Las gráficas corresponden a un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido del test Dunns para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Para confirmar la activación dependiente de PE de la vía MEK/ERK, se realizaron ensayos de Western Blot con el objetivo de evaluar los niveles de p-ERK. Se detectó un

aumento en los niveles de p-ERK luego de 5 minutos del agregado de PE comparado con la condición control (Figura 48).

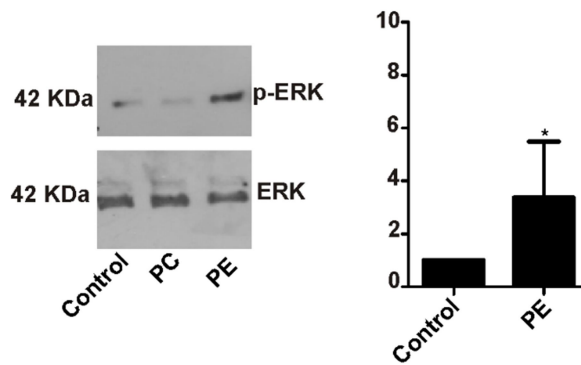


Figura 48. Análisis de los niveles de p-ERK en NSCs. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles de p-ERK luego de cinco minutos de tratamiento con PC 50 μ M o PE 50 μ M. Se realizó una densitometría para evaluar las veces de inducción de la relación p-ERK/ERK respecto al control. La gráfica corresponde a un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney. * $p < 0.05$

Se sabe que la activación de la vía MEK/ERK depende de Raf. Una vez activa, Raf fosforila a la quinasa MEK, la cual fosforila y activa a ERK [119]. Para ahondar en la vía de señalización Raf/MEK/ERK, se decidió evaluar el rol de Raf en la diferenciación astrogliar promovida por PE. Se utilizó el inhibidor farmacológico BAY-43-9006 [120], y se realizó un experimento de diferenciación como se detalla con el inhibidor UO126. Como se puede observar en la Figura 49, BAY-43-9006 fue capaz de abolir el efecto inductor promovido por PE, sin alterar la diferenciación basal.

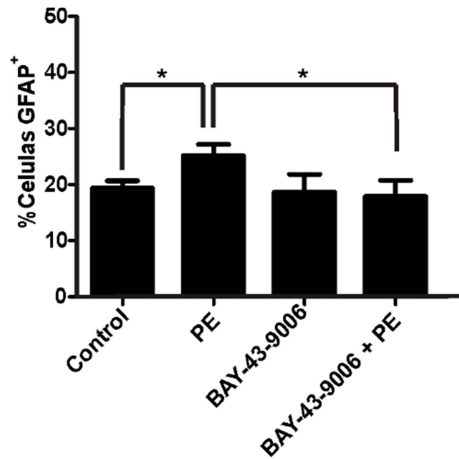


Figura 49. Efecto de la inhibición farmacológica de Raf en la diferenciación astrogial. Se realizó una inmunofluorescencia con el marcador astrogial GFAP luego de 72 horas en cultivo en presencia de BAY-43-9006 3.5 μ M y/o PE 50 μ M, según correspondiera. La gráfica representa un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA, seguido del test Bonferroni para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$

Una manera de explicar de qué forma se activa la vía Raf/MEK/ERK es evaluando el rol de receptores de PE. Como se ha mencionado en la Introducción, la proteína RKIP pertenece a la familia de proteínas de unión a PE (PEBP) y es capaz de unir e inactivar a las quinasas MEK y Raf. En primer lugar, se evaluaron los niveles de expresión de RKIP luego de tres días de cultivo en condiciones de diferenciación mediante Western Blot, y se observó que dicha proteína se expresa tanto en la condición control como luego del agregado de PE, y que los niveles de expresión son similares en ambas condiciones (Figura 50).

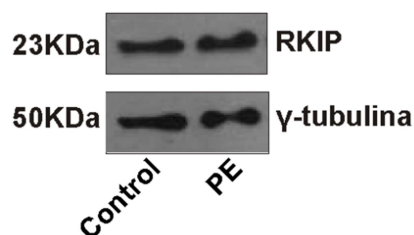


Figura 50. Análisis de los niveles de RKIP. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles RKIP respecto al control de carga (γ -tubulina).

Se ha demostrado, además, que la fosforilación de RKIP mediada por PKC induce cambios conformacionales que provocan la disociación y consecuente activación de las quinasas Raf y MEK [121]. Por lo tanto, una manera indirecta de estudiar el rol de RKIP en la diferenciación astrogial es mediante la activación de PKC.

La hipótesis reside en que, al estar PKC activa, RKIP sería fosforilada lo que conduciría a la disociación y consecuente activación de Raf y MEK, conduciendo de esta manera a la diferenciación astrogial, aún en ausencia de PE. Para abordar esta hipótesis, se incubaron las células con el activador de PKC, denominado forbol 12-miristato-13 acetato (PMA) [122]. Luego de tres días de incubación, se realizaron ensayos de diferenciación seguidos de inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 51, no se observaron alteraciones en la magnitud de la diferenciación astrogial en ninguna de las condiciones analizadas. Este resultado permite descartar la participación de PKC en el proceso de diferenciación astrogial, pero no descarta completamente la participación de RKIP en el proceso inducido por PE.

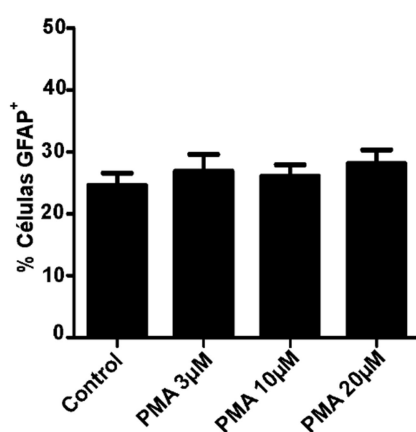


Figura 51. Efecto de la activación de PKC en la diferenciación astrogial. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación y se suplementó con diferentes concentraciones del compuesto PMA. Luego de 72 horas, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con el marcador astrogial GFAP.

4.10 Estudio del efecto de PC y PE en la renovación de NSCs

Como se ha descrito en la Introducción, las células madre pueden definirse de acuerdo a tres características importantes: su habilidad de renovación, su potencial para generar las principales líneas celulares de un organismo, y la habilidad para regenerar tejidos [2].

Los resultados obtenidos hasta el momento mostraron que los lípidos en estudio son capaces de promover la diferenciación neuronal y astrogial en cultivos de NSCs en condiciones de diferenciación. Con el fin de estudiar el efecto de ambos lípidos en la capacidad de renovación celular de NSCs, se utilizó el modelo de

neuroesferas. El objetivo fue evaluar si ambos lípidos alteraban la proliferación celular en dichas condiciones de cultivo.

Para analizar el efecto de liposomas de PC y PE en la proliferación de NSCs crecidas en forma de neuroesferas, se realizaron ensayos de MTT según se describe en Materiales y Métodos. Se observó que, luego de 96 horas en cultivo, los lípidos no modifican el número total de células viables respecto al control en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 52).

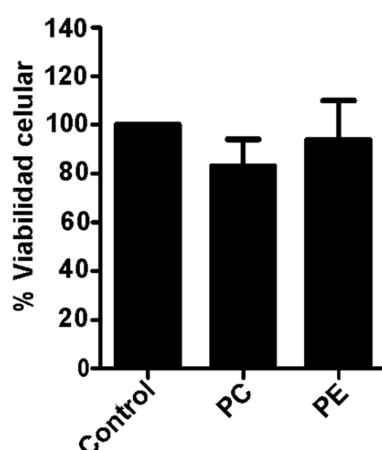


Figura 52. MTT en condiciones de proliferación. Porcentaje de viabilidad celular de NSCs luego de 96 horas en cultivo, en condición basal y luego el agregado de PC 50 μ M o PE 50 μ M. La gráfica representa un promedio de tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que la ausencia de cambios observados en los ensayos de MTT puede deberse a que haya porcentajes similares de muerte celular y proliferación, manteniendo de esta manera constante la población de células viables, se realizaron medidas de los niveles de PCNA como indicador de proliferación celular. Se sembraron 5.000 células en condiciones de proliferación en placas de 24 pocillos. Los cultivos se suplementaron con liposomas de PC o PE, según correspondiera, y luego de 96 horas, se prepararon extractos proteicos totales, según se describe en Materiales y Métodos. Los extractos se analizaron por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-PCNA. Como se observa en la Figura 53, los niveles de PCNA no se modifican con la condición de cultivo, indicando que los lípidos no afectan la proliferación celular.

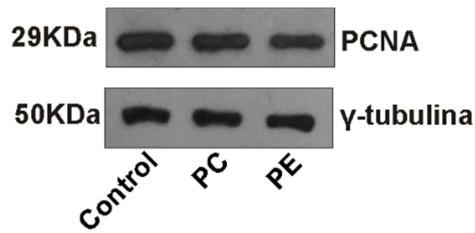


Figura 53. Análisis de la proliferación celular en el cultivo de neuroesferas mediante ensayos de Western Blot. Se sembraron 10 μ g de proteínas totales en cada condición y se evaluaron los niveles de PCNA respecto al control de carga (γ -tubulina).

Debido a que la proliferación de las neuroesferas se refleja en el diámetro de las mismas, se analizó dicho parámetro como un indicador adicional de proliferación celular. Se sembraron 5.000 células en condiciones de proliferación, y se suplementaron con liposomas de PC o PE, según correspondiera. Luego de 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, se tomaron fotografías de 20 campos al azar (Figura 54 A). Utilizando el programa Image J se midieron los diámetros de cada neuroesfera en cada condición. Como se observa en las fotografías y en la gráfica resultante de la cuantificación, el diámetro de las neuroesferas no se modifica significativamente por el tratamiento con los lípidos (Figura 54).

Los resultados en conjunto sugieren que PC y PE no modifican la capacidad de renovación de NSCs.

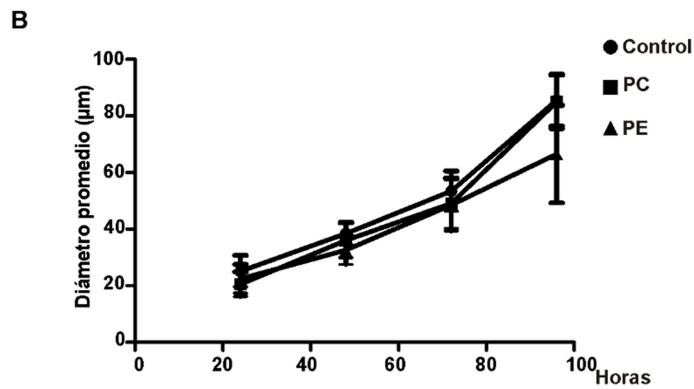
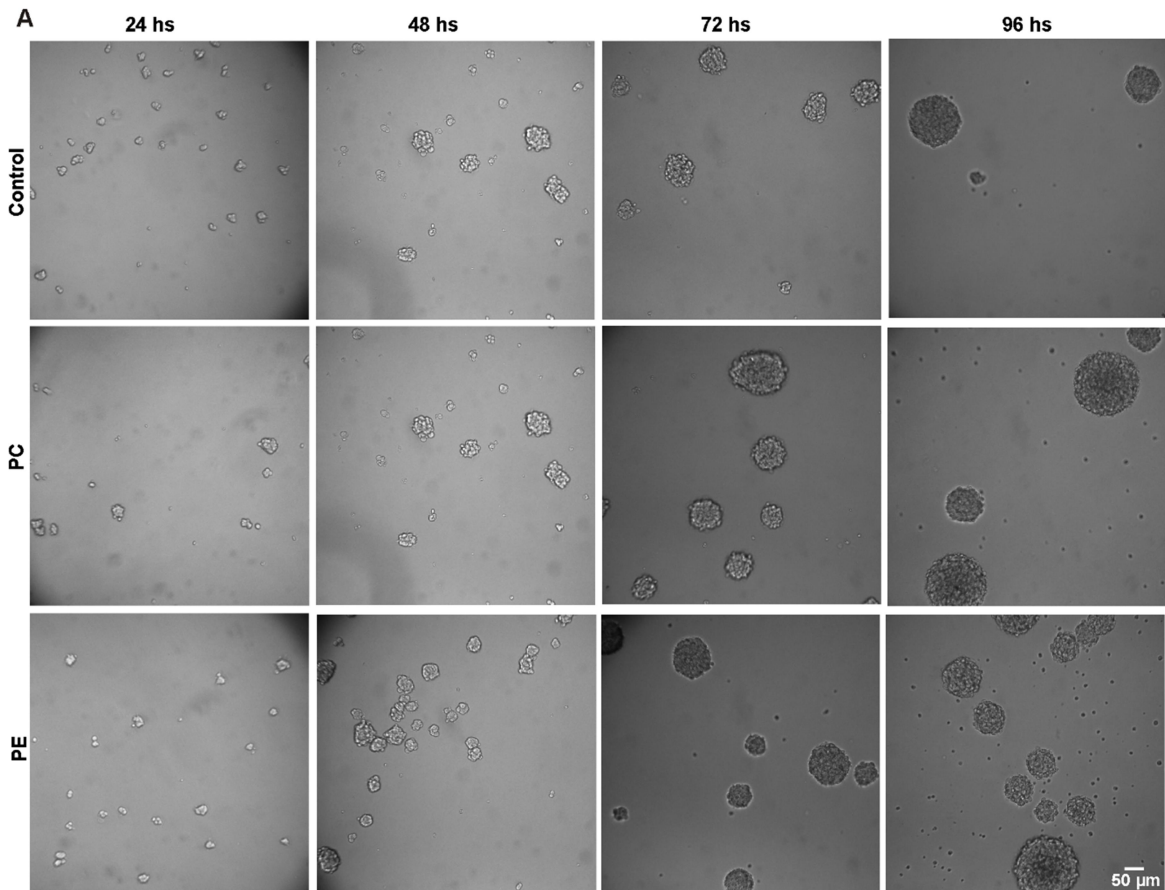


Figura 54. Evaluación del diámetro de neuroesferas. Se sembraron 5.000 células en condiciones de proliferación y se suplementaron con PC 50 μ M o PE 50 μ M, según correspondiera. **A)** Se tomaron fotografías cada 24 horas y se midió el diámetro de las neuroesferas utilizando el programa Image J. **B)** La gráfica muestra el promedio del diámetro de la neuroesfera en cada condición, y representa un promedio de tres experimentos independientes.

4.11. Efecto de la suplementación de PC y PE en cultivos primarios

El cultivo de neuroesferas se caracteriza por poseer una población heterogénea de NSCs [28], [123]. Sin embargo, es posible obtener una población homogénea mediante el cultivo primario. A pesar de que el número de células que se obtiene es menor (ya que no se realiza una amplificación previa), tiene la ventaja de estar enriquecido en una sola población celular. Debido a que la neurogénesis precede a la gliogénesis en el desarrollo embrionario, al utilizar como modelo de estudio NSCs extraídas de la corteza lateral de embriones de ratones de 13 días de gestación (E13), el cultivo primario resultante está compuesto mayoritariamente por progenitores y precursores corticales neuronales [8], [15].

Para realizar un estudio más detallado del efecto de PC y PE en la diferenciación neuronal, y astrogial, respectivamente, se realizaron diferentes estudios utilizando el cultivo primario de E13.

Para caracterizar este cultivo, y corroborar que esté enriquecido en precursores corticales, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia a diferentes tiempos (Figura 55). Se observó que, entre 1 y 5 horas de cultivo, el 85% de la población expresa el marcador Nestina, es decir, la mayor parte de la población posee características de células madre o células precursoras (Figura 55 B), mientras que aproximadamente el 50% co-expresa β -III Tubulina y Nestina, es decir son precursores corticales neuronales (Figura 55 C). En otras palabras, del 85% de células precursoras, el 50% corresponde a precursores corticales neuronales, mientras que el 35% corresponde a células precursoras indiferenciadas. Sin embargo, a las 24 horas de cultivo, el porcentaje de precursores corticales neuronales aumenta a un 90% (Figura 55 A y C).

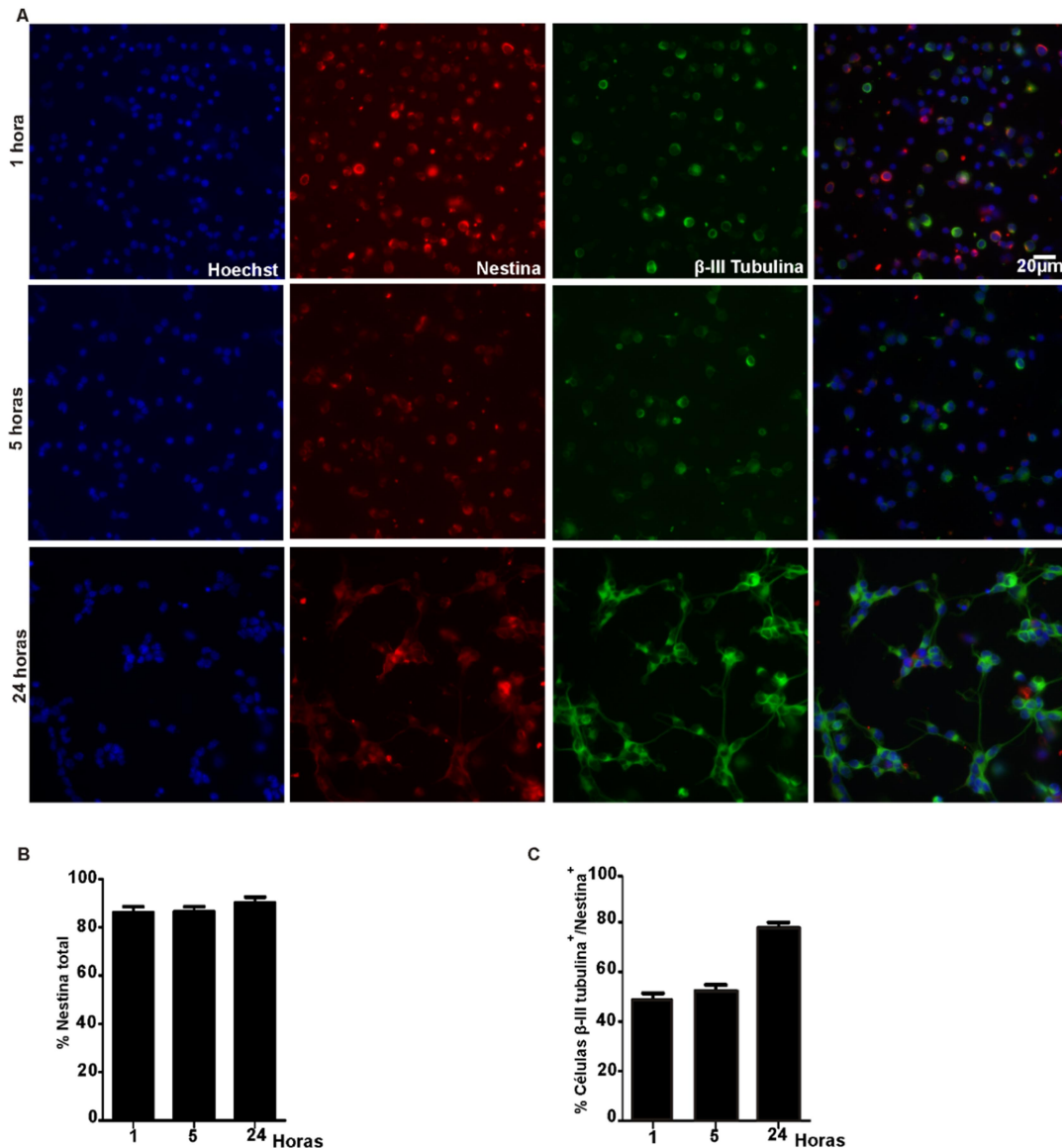


Figura 55. Inmunofluorescencia de cultivos E13 a diferentes tiempos. Se sembraron NSCs provenientes de la corteza lateral de cerebros de embriones de ratones de 13 días de gestación. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia luego de 1, 5 y 24 horas en cultivo. **A)** Imágenes representativas de las fotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 800 con un aumento 40X. Azul: Hoechst. Rojo: Nestina. Verde: β-III Tubulina. **B)** Porcentaje de células que expresan el marcador Nestina a diferentes tiempos. **C)** Porcentaje de células que co-expresan los marcadores β-III Tubulina y Nestina. La gráfica corresponde a un promedio de dos experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar si PC promueve la diferenciación en este tipo de cultivo, se realizaron experimentos de diferenciación suplementando el medio con liposomas de PC (50 μM), y realizando un ensayo de inmunofluorescencia luego de 1, 5 y 24 horas de cultivo. Los resultados muestran que luego de 5 horas en presencia de liposomas de PC, el número de precursores neuronales aumenta significativamente

respecto a la condición control (Figura 56). Sin embargo, luego de 24 horas en cultivo, la condición control alcanza los valores obtenidos con PC. Estos resultados sugieren que, en este tipo de cultivo, la diferenciación neuronal inducida por PC podría deberse a una aceleración del proceso de diferenciación de precursores corticales neuronales.

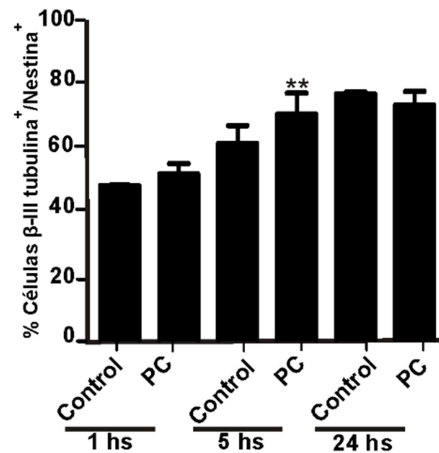


Figura 56. Inmunofluorescencia de cultivos E13 a diferentes tiempos luego de la suplementación con PC. Se cultivaron NSCs provenientes de cultivos E13 en condiciones de diferenciación, se suplementaron con PC 50 μ M, y se incubaron durante 1, 5 o 24 horas. Posteriormente, se realizó la técnica de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β -III Tubulina, y el marcador de células madre Nestina. Las gráficas corresponden a un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test paramétrico apareado de Student. ** $p < 0.01$

Asimismo, se estudió el efecto de la suplementación exógena de PE al cultivo primario de E13. En este caso, la estrategia consistió en suplementar con liposomas de PE (50 μ M) y evaluar los niveles de GFAP luego de tres y cinco días. Sin embargo, no se obtuvieron células GFAP positivas en ninguna de las condiciones analizadas (resultados no mostrados). Estos resultados confirman los obtenidos por PE en el modelo de neuroesferas, corroborando de esta forma que PE no es capaz de modificar el destino de precursores neuronales.

4.12 Estudio del daño celular por estrés oxidativo en NSCs

Luego de una lesión en el tejido nervioso, en la región cercana al daño, se produce un microambiente reactivo compuesto por moléculas inflamatorias y por productos tóxicos como radicales libres, entre otros [77]. Particularmente, la liberación de radicales libres puede ocurrir también en condiciones de estrés oxidativo, el cual se produce como consecuencia del desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), y la capacidad del organismo de detoxificarlas.

El ambiente del tejido nervioso lesionado es el principal condicionante y limitante de la regeneración neuronal [124]–[126]. Debido a que las células madre neurales tienen la capacidad de proliferar y migrar hacia la región del daño generando nuevo tejido neuronal para reparar de esta forma la lesión, resultó interesante evaluar el efecto de PC en condiciones que mimeticen el daño. Para evaluar si la diferenciación neuronal promovida por PC era efectiva aún en un microambiente reactivo, se realizaron experimentos en condiciones que simulen una lesión del sistema nervioso central, como el estrés oxidativo producido por la suplementación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

4.12.1 Efecto de la suplementación de peróxido de hidrógeno a cultivos de NSCs

En primer lugar, se estableció el tiempo y la concentración del H_2O_2 a ensayar, de manera de identificar la condición que genere un daño de leve a moderado en el cultivo de NSCs. Para ello, se sembraron las células en condiciones de diferenciación y se suplementaron con diferentes concentraciones de H_2O_2 . Transcurridos 30 minutos, el medio conteniendo H_2O_2 se renovó, y se incubó durante 24 horas con medio fresco. Finalmente, se realizó el ensayo de MTT. En base a los resultados obtenidos (Figura 57), se decidió utilizar para los experimentos posteriores una concentración de H_2O_2 de 50 μ M.

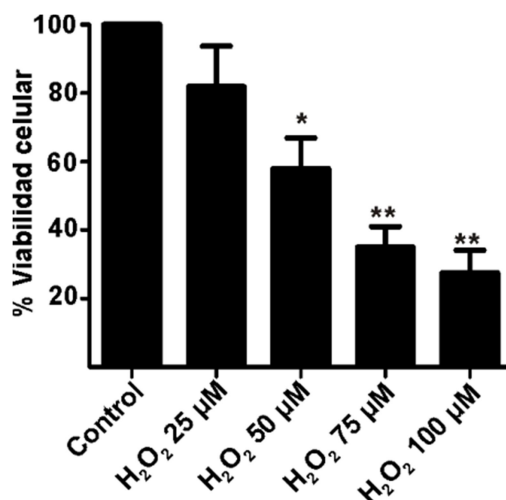


Figura 57. MTT en condiciones de estrés oxidativo. Porcentaje de viabilidad celular de NSCs. Las células se incubaron durante 30 minutos con diferentes concentraciones de H₂O₂. Posteriormente, se renovó el medio y se incubó por un período de 24 horas. La gráfica representa un promedio de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA, seguido del test Tukey para comparaciones múltiples. *p<0.05, **p<0.01

Con el fin de confirmar que el H₂O₂ (50 μM) genera estrés oxidativo, se realizaron experimentos para evidenciar la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para esto, se utilizó la sonda 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). Luego de atravesar la membrana plasmática, DCFH-DA es deacetilada por esterasas celulares generando el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCFH), el cual es luego oxidado por ROS induciendo la fluorescencia de 2',7'-diclorofluorescina fluorescente (DCF, λ excitación = 498 nm; λ emisión = 522 nm) [106], [127] (Figura 58).

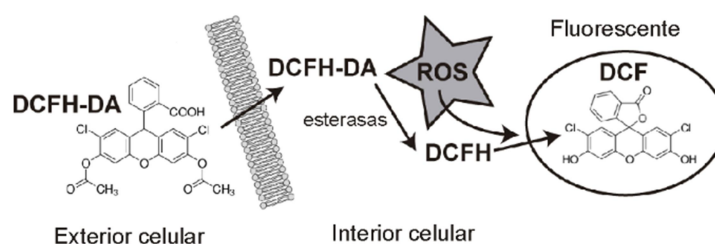


Figura 58. Esquema del mecanismo de la sonda DCFH-DA. Adaptado de [106]

Se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación y se incubaron durante 30 minutos con H₂O₂ (50 μM). Posteriormente, se removió el medio, y se agregó la sonda DCFH-DA al cultivo por un período extra de 30 minutos (Materiales y Métodos). Finalmente se realizó un análisis microscópico de fluorescencia. Como se observa en la

Figura 59, en la condición de daño se detecta fluorescencia verde debido a la generación de radicales ROS, indicando que el H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$) genera estrés oxidativo.

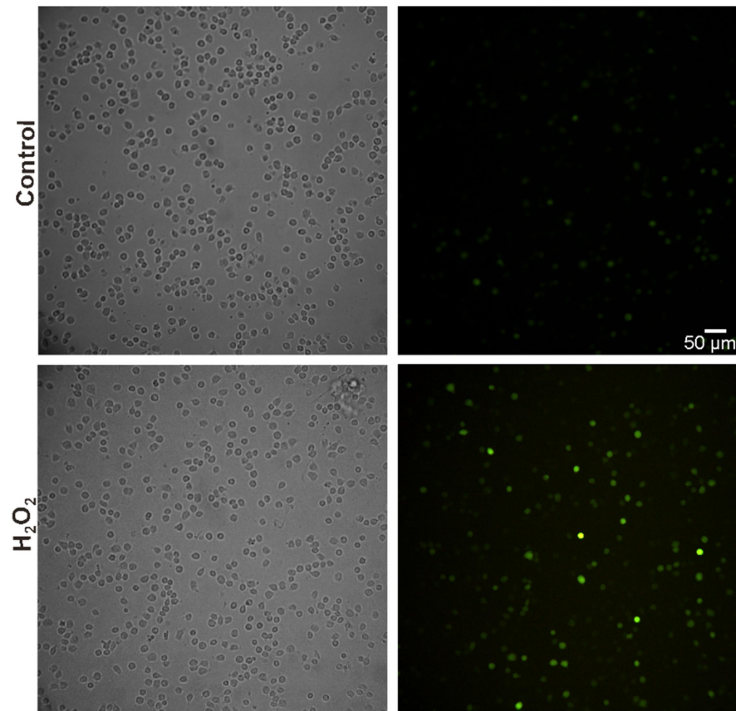


Figura 59. Imágenes de NSCs incubadas con DCFH-DA. Imágenes representativas de NSCs incubadas en presencia de la sonda DCFH-DA $80 \mu\text{M}$, en condiciones basales, y luego del agregado de H_2O_2 $50 \mu\text{M}$. Izquierda: campo claro. Derecha: fluorescencia (λ_e : 480).

Debido a que el H_2O_2 podría peroxidar a los liposomas de PC en el medio de cultivo, y de esta manera disminuir su concentración efectiva (y por lo tanto, su capacidad oxidante) en el interior celular, se realizaron ensayos de MTT en presencia de H_2O_2 y PC en diferentes condiciones. En la Figura 60 A se observa un esquema de los protocolos utilizados. Como se observa en la Figura 60 B, el agregado de liposomas de PC no modifica la viabilidad de las células sujetas al estrés.

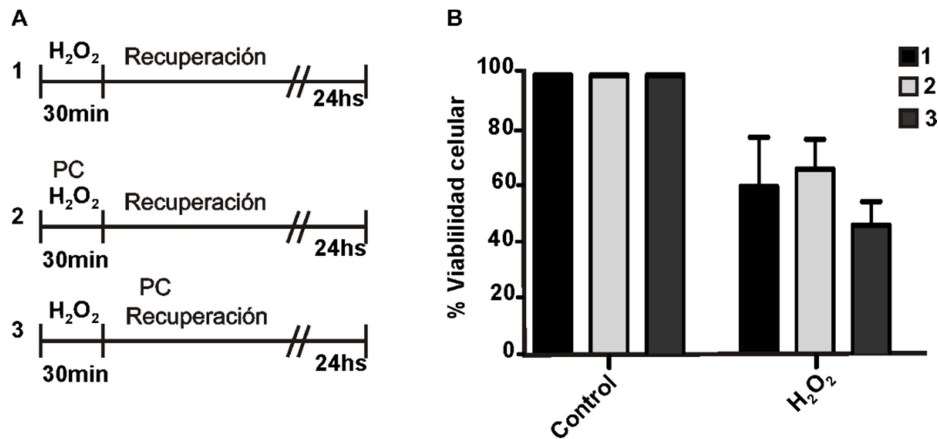


Figura 60. Efecto de PC en la viabilidad celular en condiciones de estrés oxidativo. A) Esquemas donde se detallan los tres protocolos utilizados. En 1, se adiciona H₂O₂ 50 μM durante 30 minutos, luego se renueva el medio en ausencia de H₂O₂ y se deja durante 24 horas en condiciones de diferenciación. En 2, se suplementa simultáneamente con PC 50 μM y H₂O₂ 50 μM, se incuba durante 30 minutos, y posteriormente se renueva el medio y se incuba por un período de 24 horas en condiciones de diferenciación. En 3, primero se suplementa con H₂O₂ 50 μM, luego de una incubación de 30 minutos, se renueva el medio y se adiciona PC 50 μM y finalmente se incuba durante 24 horas. **B)** MTT de NSCs en presencia o no de H₂O₂ 50 μM, en las condiciones detalladas en A. La gráfica representa un promedio de dos experimentos independientes.

4.12.2 Estudio de la diferenciación neuronal en condiciones de estrés oxidativo

Finalmente, se evaluó la capacidad de diferenciación neuronal de las células en condiciones de estrés oxidativo. Para ello, se sembraron NSCs en condiciones de diferenciación, se incubaron con H₂O₂ (50 μM) durante 30 minutos, se renovó el medio y se agregó medio fresco suplementado, o no, con liposomas de PC (50 μM). Luego de 24 horas, se analizó la identidad de las células por inmunofluorescencia. Se observó que las células se diferencian en condiciones de daño oxidativo sin mostrar diferencias con la condición control. Además, se demostró que PC induce la diferenciación neuronal, aún en condiciones de estrés oxidativo (Figura 61).

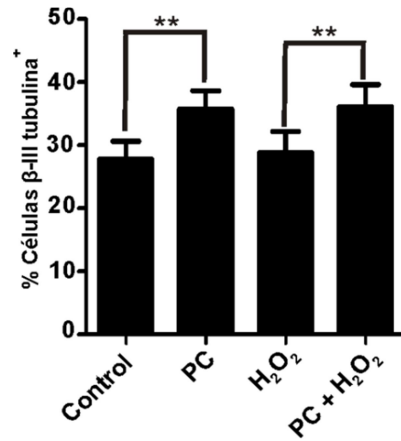


Figura 61. Efecto de PC en la diferenciación neuronal en condiciones de estrés oxidativo. Se cultivaron NSCs en condiciones de diferenciación y se suplementaron con H₂O₂ 50 μM. Luego de 30 minutos, se renovó el medio, se suplementó con PC 50 μM, y se incubó durante 24 horas. Se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con el marcador neuronal β-III Tubulina. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA, seguido del test Tukey para comparaciones múltiples **p<0.01

5. Discusión

Las NSCs son células madre multipotentes con la capacidad de generar todos los tipos celulares presentes en el tejido nervioso. En la corteza cerebral de ratones en desarrollo embrionario (E12-E18), el proceso de neurogénesis ocurre entre los días 12 y 18, mientras que la gliogénesis ocurre a partir del día 16 (E16) [7]. Con el desarrollo de la video-microscopía de lapso de tiempo, fue posible observar en tiempo real células progenitoras en edades tempranas y tardías del desarrollo y demostrar que las células neuronales y gliales son generadas secuencialmente. Es decir, un mismo progenitor puede originar neuronas y células de la glía de manera secuencial, produciéndose un cambio en la especificación a lo largo del tiempo [15], [17]. Este cambio en la especificación de los progenitores corticales puede ser influenciado por señales intrínsecas y por el ambiente [19], [128].

La habilidad de las NSCs de generar nuevas células diferenciadas y de regenerar tejidos las convierte en una herramienta prometedora para las terapias de regeneración. Sin embargo, la capacidad regenerativa es limitada. Esto se debe, en parte, a la formación de la cicatriz glial en el sitio de lesión, la cual restringe la zona del daño y evita que se expanda, pero también afecta negativamente la regeneración neuronal al evitar la migración de NSCs, su diferenciación e integración a la red neuronal [77].

En este contexto, resulta importante identificar señales que puedan actuar como inductoras de dicho proceso, y buscar estrategias que permitan reprogramar a los astrocitos de la cicatriz glial hacia la generación de neuronas funcionales.

El mecanismo de reprogramación neuronal hacia el linaje astrogial ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de genes neuronales, como *Neurog-2* o *Ascl1* en cultivos de astrocitos promueve la transdiferenciación hacia neuronas. Específicamente, se han expresado los genes *Neurog-2* o *Ascl1* en cultivos de astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratones en fase post-natal y se ha observado la diferenciación *in vitro* hacia el linaje neuronal: neuronas glutamatérgicas cuando se infecta con vectores que dirigen la expresión de *Neurog-2*, y neuronas GABAérgicas cuando se sobreexpresa *Ascl1* [129]–[131]. Más aún, recientemente se han estudiado las dinámicas de la adquisición del fenotipo neuronal en la reprogramación de astrocitos a nivel transcripcional [132], [133].

Con respecto a la identificación de diferentes moléculas que permitan promover el proceso de diferenciación de NSCs, los lípidos bioactivos son moléculas que juegan un rol clave. Los fosfolípidos desempeñan un rol estructural en las membranas biológicas. Por ejemplo, se requieren para hacer frente a la demanda aumentada para la biosíntesis de nuevas membranas durante la diferenciación neuronal. Sin embargo, también participan en el proceso de diferenciación neuronal. En el laboratorio se demostró que la suplementación exógena de PC y LPC promueve la diferenciación neuronal en la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a, determinando así que el proceso de diferenciación neuronal puede ser modulado por moléculas lipídicas que actúan como señales externas [39].

Sobre la base de lo expuesto, resultó interesante estudiar el efecto de lípidos bioactivos en la diferenciación neuronal de NSCs.

En este trabajo de Tesis, se demostró que los lípidos PC y PE tienen la capacidad de regular la diferenciación de NSCs. PC promueve la diferenciación neuronal (Figura 21), mientras que PE induce la diferenciación de NSCs hacia el linaje astrogial (Figura 26). En base a estos resultados, se propuso identificar el mecanismo por el cual dichos lípidos promueven selectivamente la diferenciación de NSCs.

En primer lugar, se evaluó si el efecto se debía a un aumento en la proliferación celular de progenitores neuronales o astrogiales, según el caso. Mediante el empleo de diferentes metodologías (Figuras 28, 33 y 34), se concluyó que ninguno de los lípidos altera el grado de proliferación celular.

Debido a que el balance entre la proliferación y la diferenciación de NSCs es esencial para mantener una homeostasis en los tejidos, se decidió evaluar si los lípidos en estudio podrían alterar la capacidad de renovación celular en condiciones que favorezcan la proliferación, es decir en cultivos de neuroesferas. Para ello, se realizaron diferentes análisis de proliferación luego de la suplementación con liposomas de PC o PE (Figuras 52, 53 y 54) y se demostró que ninguno de los lípidos en estudio tiene la capacidad de alterar la renovación celular de NSCs.

Los lípidos pueden ejercer un efecto neuroprotector en ciertas condiciones. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga disminuyen la degeneración neuronal en ratas expuestas a daño cerebral al atenuar la degeneración dendrítica y axonal de neuronas colinérgicas [102]. Por este motivo, se analizó si en

los cultivos de NSCs, PC o PE promovían selectivamente la viabilidad celular de neuronas y astrocitos, respectivamente. Para esto, se llevaron a cabo ensayos de MTT (Figura 35), medida de la actividad lactato deshidrogenasa (Figura 38), y de cuantificación de células viables por microscopía de lapso de tiempo (Figura 37). En todos los casos los resultados indicaron que los lípidos no actúan como agentes protectores promoviendo selectivamente la supervivencia de neuronas o astrocitos.

Otra posible explicación es que PC y PE acelerasen el proceso de diferenciación neuronal. Los experimentos demostraron que luego de un día de tratamiento con liposomas de PC se incrementa el porcentaje de células especificadas hacia el linaje neuronal, y que este efecto se mantiene a los 3 y a los 7 días de cultivo (Figura 39 A). Estos resultados indican que el aumento debido a la suplementación con PC no se debe a una aceleración del proceso de diferenciación, sino a que un mayor número de precursores adquiere fenotipo neuronal. Además, se observó que tanto en la condición control como luego del agregado de PC, se produce un aumento en el número de células β -III Tubulina⁺/ Nestina⁻ conforme aumenta el tiempo; sin embargo, el porcentaje de neuronas maduras es mayor en la condición tratada con PC respecto al control en todos los tiempos analizados. Este resultado sugiere que PC no modifica el proceso de maduración neuronal.

Por otro lado, al analizar el proceso de diferenciación astrogial, se demostró que los cultivos tratados con liposomas de PE están enriquecidos en astrocitos luego de 3 y 7 días de incubación. Esto indica que el fosfolípido no acelera el proceso de diferenciación sino que tiene un efecto directo en la especificación de células post-mitóticas (Figura 39 B). Debido a que en el desarrollo embrionario la gliogénesis ocurre en etapas posteriores a la neurogénesis, es decir, en etapas tardías del desarrollo [15], la expresión de genes astrogiales como GFAP ocurrirá en etapas avanzadas del cultivo *in vitro*; es por este motivo que el número de precursores astrogiales luego de un día de cultivo es muy bajo, y no permite evidenciar diferencias entre las condiciones analizadas.

Al analizar la población de astrocitos maduros, se observó que el porcentaje de células que solo expresan GFAP se mantiene constante en la condición control, mientras que aumenta luego del tratamiento con PE entre los 3 y 7 días en cultivo.

Esto sugiere que la suplementación exógena de PE produce además una aceleración del proceso de maduración de dicha población celular.

El destino de las NSCs hacia diferentes linajes está regulado por muchas señales en el microambiente tisular local [7]. Después de examinar de forma más detallada el papel de los fosfolípidos en la especificación de NSCs, se demostró que PC y PE cambian la especificación sólo de la población de células neuronales post-mitóticas (Figura 40). En particular, PC cambia el destino tanto de células especificadas hacia el linaje astrogial como así también de células no especificadas hacia el linaje neuronal (Figura 42). Curiosamente, el efecto de PC en la especificación neuronal se observa incluso después de una breve exposición (1 hora) de este lípido en el primer día de cultivo (Figura 25 C y D). Sin embargo, el tratamiento con PC 24 horas después de sembrar las células no afecta la diferenciación neuronal (Figura 25 E y F), lo que indica que las células post-mitóticas poseen un estrecho margen de tiempo de plasticidad. PE, en cambio, modifica la población de células no especificadas en células astrogiales sin afectar la población de células neuronales post-mitóticas (Figura 42).

La demostración de que una población de células post-mitóticas puede convertirse en astrocitos o neuronas sin alterar la proliferación o la muerte celular, proporciona evidencia directa de que las señales específicas generadas por los fosfolípidos pueden modular las primeras etapas de la diferenciación, regulando la especificación de células que no se dividen. Estas observaciones indican que los destinos de las células neuronales y astrogiales no se determinan de manera irreversible en la etapa de células progenitoras, y que el destino final de las células post-mitóticas aún podría estar influido por señales extrínsecas.

El motivo por el cual sólo una población específica responde a los lípidos puede deberse a que, al igual que en la reprogramación celular, este proceso esté directamente influenciado por el contexto celular o por diferentes estados fisiológicos y/o metabólicos de ambas poblaciones celulares [134], [135].

En resumen, se pudo demostrar que PC promueve la diferenciación neuronal a expensas de un cambio en la especificación de células precursoras astrogiales y conduciendo a células precursores indiferenciadas hacia el linaje neuronal. Alternativamente, PE promueve la diferenciación astrogial disminuyendo la población de células indiferenciadas, es decir especificando progenitores indiferenciados hacia el

linaje astrogial. Estos resultados demuestran por primera vez que la especificación celular sería un proceso reversible que no está limitado solo a células en activa división mitótica, sino que puede ser modificado en células post-mitóticas indiferenciadas.

Al analizar el modelo de cultivo primario E13 [98], se confirmó que el mismo está compuesto por aproximadamente un 50% de células determinadas al linaje neuronal en las primeras horas de cultivo, y que dicha población alcanza el 80% luego de 24 horas (Figura 55). Al suplementar con PC, se observó que la población de precursores neuronales aumenta significativamente a las 5 horas en cultivo y que alcanza los valores del control luego de 24 horas (Figura 56). Considerando que este tipo de cultivo está compuesto por células ya especificadas hacia el linaje neuronal, el efecto de PC podría deberse a una aceleración del proceso de especificación de células indeterminadas (células que solo expresan Nestina) y no a un cambio de destino.

En concordancia con los resultados obtenidos en el modelo de neuroesferas que muestran que PE promueve la diferenciación astrogial sin modificar la población de precursores neuronales, en cultivos primarios E13 no se detectaron células con fenotipo astrogial luego del agregado de PE. Es decir, estos resultados permiten reforzar la hipótesis que PE no modifica el destino de precursores que ya están determinados a la diferenciación neuronal.

5.1 Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación mediada por lípidos

En lo que se refiere a los mecanismos moleculares mediante los cuales los lípidos en estudio promueven la diferenciación de manera selectiva, en este trabajo de Tesis se demostró que PC activa la vía de señalización PKA/CREB (Figuras 43 y 44). Debido a que la activación de PKA es dependiente de los niveles de AMPc, se evaluó la participación de la enzima AC, y se observó que el efecto de PC en la diferenciación neuronal es dependiente de la misma (Figura 45). La pregunta que queda responder es de qué manera se activa esta vía de señalización. Debido a que algunas de las isoformas de la AC dependen de la concentración de calcio intracelular [136] (ya sea de manera directa o indirecta, por ejemplo mediante la unión a calmodulina o a la proteína quinasa activada por calmodulina), una hipótesis posible es que PC aumente

los niveles de calcio intracelulares. En este sentido, se ha demostrado en el laboratorio que en la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a, PC promueve la liberación de calcio proveniente del retículo endoplasmático, induciendo la diferenciación neuronal [39]. Además, se observó que en NSCs de rata obtenidas en desarrollo embrionario E14.5, la inducción de los niveles intracelulares de AMPc (mediante la inhibición de la actividad fosfodiesterasa) provoca incrementos en la entrada de calcio al interior celular a través de canales de calcio tipo-L, y promueve la fosforilación de CREB y la inducción de la diferenciación de neuronas funcionales [54].

Respecto al mecanismo molecular mediante el cual PE promueve la diferenciación hacia el linaje astrogial, se demostró que la vía Raf/MEK/ERK tiene un rol clave. En este sentido, existen controversias en la bibliografía respecto a los procesos de diferenciación inducidos al activarse Raf/MEK/ERK. En algunos modelos se demostró su participación en la diferenciación neuronal [21], [39], [40]: por ejemplo, en la línea de células madre de origen murino, se demostró que la suplementación con ácido retinoico aumenta los niveles de p-ERK, promoviendo la diferenciación neuronal, y que el tratamiento con el inhibidor UO126 previene este fenómeno [40]. Sin embargo, otros datos bibliográficos señalan que Raf/MEK/ERK promueve la diferenciación astrogial [41], [118]. En este trabajo de Tesis, mediante la cuantificación de los niveles de p-ERK (Figura 48) y utilizando inhibidores específicos de MEK y Raf (Figuras 47 y 49) se demostró que PE activa la diferenciación de NSCs hacia el linaje astrogial, por un mecanismo dependiente de la activación de Raf/MEK/ERK. Además, se descartó su participación en la diferenciación neuronal (Figura 46). La pregunta que resta responder es cómo PE activa la vía Raf/MEK/ERK. Para ello se han propuesto dos hipótesis; por un lado, PE podría activar la proteína Ras (intercambio GDP/GTP), tal como fue demostrado para LPC en la línea celular Neuro-2a [39]. Alternativamente, PE podría activar Raf mediante su unión a RKIP. Los resultados presentados en este trabajo muestran que los niveles de RKIP no se modifican con la suplementación de PE (Figura 50); sin embargo, este resultado no descarta la posibilidad de que PE se una a RKIP y provoque cambios conformacionales y su disociación de Raf. Futuros experimentos permitirán descifrar el mecanismo involucrado.

5.2 Daño neuronal y efecto de PC en la reparación

Las enfermedades neurodegenerativas crónicas y las injurias traumáticas del SNC comparten similares respuestas celulares y moleculares en el microambiente local que previenen la regeneración neuronal [77]. Desde el punto de vista terapéutico, la fortaleza del efecto de los lípidos en alterar la especificación de células precursoras post-mitóticas y, por ende, el destino de éstas, reside en que dicho fenómeno sea efectivo aún en los ambientes reactivos de daño cerebral (hipoxia, estrés oxidativo o reactividad celular). En este sentido, se analizó la capacidad de PC de promover la diferenciación neuronal de células precursoras en condiciones que mimeticen el daño celular. Los experimentos realizados en condiciones de estrés oxidativo demuestran que PC promueve la diferenciación neuronal (Figura 61). Estos resultados permiten sentar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan alterar el balance de la producción de neuronas/astrocitos en la zona de la cicatriz glial y de esta manera favorecer la reparación del tejido dañado.

Queda por responder, sin embargo, cuál es la fuente fisiológica de estos lípidos señal. En este contexto, se sabe que para mantener la plasticidad y homeostasis en el cerebro, es indispensable la comunicación celular entre neuronas y células de la glía [137]. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido fosfatídico producido en los astrocitos es necesario para la formación del árbol dendrítico neuronal [138]. Se ha descrito que tanto las neuronas como las células de la glía liberan exosomas [137]. Los exosomas son vesículas extracelulares pequeñas (50-100 nm) que derivan del sistema de endosomas, y constituyen un modo de comunicación celular que involucra la transferencia horizontal de biomoléculas. Están compuestos por una bicapa lipídica que contiene a proteínas y ácidos nucleicos [139]. Se ha demostrado que este tipo de vesículas median la comunicación entre neuronas, entre células de la glía, y entre neuronas y células de la glía [140]–[142]. De este modo, los lípidos presentes en los exosomas podrían regular la diferenciación de NSCs.

6. *Conclusiones*

- Se caracterizó el cultivo de células madre embrionarias provenientes de la corteza lateral de embriones de ratón de 13-15 días de gestación tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación. Se demostró que en el cultivo de NSCs incubadas en condiciones de diferenciación existen dos poblaciones de células: células progenitoras que se dividen activamente, y células precursoras o post-mitóticas.
- Se demostró que diferentes fosfolípidos suplementados como liposomas al medio de cultivo promueven la diferenciación de NSCs en las condiciones analizadas: PC induce la diferenciación de NSCs hacia el linaje neuronal, mientras que PE promueve la diferenciación hacia el linaje astrogliar.
- Se determinó que el aumento en la diferenciación neuronal o astrogliar debido al agregado exógeno de PC o PE, respectivamente, no se debe a un aumento en la proliferación de NSCs o a una aceleración en el proceso de diferenciación. Además, dicho aumento no altera el número total de células viables.
- Se demostró por primera vez que el destino de una célula madre puede ser modificado en etapas post-mitóticas en las condiciones ensayadas. PC promovería la diferenciación neuronal cambiando el destino de precursores astrogliar hacia el linaje neuronal e induciendo la diferenciación neuronal de precursores indiferenciados. En cambio, PE induciría la diferenciación astrogliar de células post-mitóticas indiferenciadas, sin alterar la población neuronal.
- Se estudiaron los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de diferenciación promovido por ambos lípidos. La diferenciación neuronal promovida por PC tendría lugar a través de la vía de señalización PKA/CREB, mientras que PE induciría la diferenciación astrogliar mediante la activación de la vía Raf/MEK/ERK
- Se estableció un modelo de daño por estrés oxidativo en cultivos de NSCs mediante el agregado de peróxido de hidrógeno.
- Se estudió el efecto del peróxido de hidrógeno en la diferenciación neuronal. Los resultados mostraron que PC podría inducir la diferenciación neuronal en cultivos de NSCs en condiciones de daño por estrés oxidativo.

7. Bibliografía

- [1] Y. Hsu and E. Fuchs, "A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 103–114, **2012**.
- [2] E. Fuchs and J. a Segre, "Stem cells: a new lease on life.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 143–155, **2000**.
- [3] A. M. Wobus and K. R. Boheler, "Embryonic Stem Cells : Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy," *In Vitro*, vol. 85, no. 2, pp. 635–678, **2005**.
- [4] L. A. Fortier, "Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications," *Vet. Surg.*, vol. 34, no. 5, pp. 415–423, **2005**.
- [5] A. Kriegstein and A. Alvarez-buylla, "The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells," *Annu. Rev. Neurosci.*, pp. 149–184, **2011**.
- [6] P. Malatesta *et al.*, "Neuronal or Glial ProgenyRegional Differences in Radial Glia Fate," *Neuron*, vol. 37, no. 5, pp. 751–764, **2003**.
- [7] F. D. Miller and A. S. Gauthier, "Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex," *Neuron*, vol. 54, no. 3, pp. 357–369, **2007**.
- [8] S. A. Bayer and J. Altman, "Neocortical development," *New York Raven Press*, **1991**.
- [9] N. Germain, E. Banda, and L. Grabel, "Embryonic stem cell neurogenesis and neural specification," *J. Cell. Biochem.*, vol. 111, no. 3, pp. 535–542, **2010**.
- [10] B. J. Molyneaux, P. Arlotta, J. R. L. Menezes, and J. D. Macklis, "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 6, pp. 427–37, **2007**.
- [11] J. B. Angevine and R. L. Sidman, "Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse," *Nature*, vol. 192, no. 4804, pp. 766–768, **1961**.
- [12] Q. Shen, Y. Wang, J. T. Dimos, and C. A. Fasano, "The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells," *Nature*,

- vol. 9, no. 6, pp. 743–751, **2006**.
- [13] U. Pfisterer and K. Khodosevich, “Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms,” *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 3, pp. e2643-14, **2017**.
- [14] A. R. Kriegstein and M. Gotz, “Radial glia diversity: A matter of cell fate,” *Glia*, vol. 43, no. 1, pp. 37–43, **2003**.
- [15] X. Qian *et al.*, “Timing of CNS Cell Generation,” *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 69–80, **2000**.
- [16] M. R. Costa, O. Bucholz, T. Schroeder, and M. Götz, “Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex,” *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. SUPPL. 1, pp. 135–143, **2009**.
- [17] M. R. Costa, O. Bucholz, T. Schroeder, and M. Gotz, “Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex,” *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. SUPPL. 1, pp. 135–143, **2009**.
- [18] L. Dimou and M. Götz, “Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain.,” *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 3, pp. 709–737, **2014**.
- [19] T. Morrow, M. R. Song, and a Ghosh, “Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors.,” *Development*, vol. 128, no. 18, pp. 3585–3594, **2001**.
- [20] F. D. Barnabe -Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, “Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1,” *Neuron*, vol. 48, pp. 253–265, **2005**.
- [21] F. D. Miller and A. S. Gauthier, “Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex,” *Neuron*, vol. 54, no. 3, pp. 357–369, **2007**.
- [22] Y. E. Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G., and Sun, “Notch signaling promotes astrogliogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation,” *J. Neurosci.*, vol. 69, pp. 848–860, **2002**.

- [23] S. a Louis and B. a Reynolds, "Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 290, no. 1, pp. 265–280, **2005**.
- [24] R. L. Rietze and B. A. Reynolds, "Neural Stem Cell Isolation and Characterization," *Methods Enzymol.*, vol. 419, no. 6, pp. 3–23, **2006**.
- [25] V. Tropepe, M. Sibilica, B. G. Ciruna, J. Rossant, E. F. Wagner, and D. Van Der Kooy, "Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon," *Dev. Biol.*, vol. 208, no. 1, pp. 166–188, **1999**.
- [26] D. K. Irvin, A. Dhaka, C. Hicks, G. Weinmaster, and H. I. Kornblum, "Extrinsic and intrinsic factors governing cell fate in cortical progenitor cultures," *Dev. Neurosci.*, vol. 25, no. 2–4, pp. 162–172, **2003**.
- [27] M. A. Caldwell *et al.*, "Growth factors regulate the survival and fate of the cells derived from human neurospheres," vol. 19, 475–479, **2001**.
- [28] J. B. Jensen and M. Parmar, "Strengths and limitations of the neurosphere culture system" *Mol Neurobiol.*, vol. 34, no. 3, pp. 153–161, **2006**.
- [29] P. Barraud, L. Thompson, D. Kirik, A. Björklund, and M. Parmar, "Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 22, no. 7, pp. 1555–1569, **2005**.
- [30] M. Götz, S. Sirko, J. Beckers, and M. Irmeler, "Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis," *Glia*, vol. 63, no. 8, pp. 1452–1468, **2015**.
- [31] C. A. Hazzalin and L. C. Mahadevan, "MAPK-Regulated transcription: A continuously variable gene switch?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 30–40, **2002**.
- [32] Y. D. Shaul and R. Seger, "The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 8, pp. 1213–1226, **2007**.
- [33] S. Yoon and R. Seger, "The extracellular signal-regulated kinase: Multiple

- substrates regulate diverse cellular functions,” *Growth Factors*, vol. 24, no. 1, pp. 21–44, **2006**.
- [34] B. Jacques, “Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter,” *Nature*, vol. 358, pp. 414–417, **1992**.
- [35] L. O. Murphy, S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar, and J. Blenis, “Molecular, interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 8, pp. 556–564, **2002**.
- [36] S. Morton, R. J. Davis, A. McLaren, and P. Cohen, “A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 15, pp. 3876–3886, **2003**.
- [37] K. C. Corbit, N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall, and M. R. Rosner, “Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 15, pp. 13061–13068, **2003**.
- [38] F. Al-Mulla, M. S. Bitar, Z. Taqi, and K. C. Yeung, “RKIP: Much more than Raf Kinase inhibitory protein,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 228, no. 8, pp. 1688–1702, **2013**.
- [39] L. Paoletti *et al.*, “Lysophosphatidylcholine Drives Neuroblast Cell Fate,” *Molecular Neurobiology*, Humana Press Inc., **2015**.
- [40] Z. Li, M. H. Theus, and L. Wei, “Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells,” *Dev. Growth Differ.*, vol. 48, no. 8, pp. 513–523, **2006**.
- [41] X. Li *et al.*, “MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain,” *Neuron*, vol. 75, no. 6, pp. 1035–1050, **2012**.
- [42] Y. Wang *et al.*, “ERK inhibition rescues defects in fate specification of Nf1-deficient neural progenitors and brain abnormalities,” *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 816–830, **2012**.
- [43] K. Tasken, “Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein

- Kinase A," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 1, pp. 137–167, **2004**.
- [44] W. A. Sands and T. M. Palmer, "Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation," *Cell. Signal.*, vol. 20, no. 3, pp. 460–466, **2008**.
- [45] B. E. Wadzinski *et al.*, "Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 2822–34, **1993**.
- [46] T. B. Patel, Z. Du, S. Pierre, L. Cartin, and K. Scholich, "Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function," *Gene*, vol. 269, no. 1–2, pp. 13–25, **2001**.
- [47] Z. Xia, C. D. Refsdal, K. M. Merchant, D. M. Dorsa, and D. R. Storm, "Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain: Expression in areas associated with learning and memory," *Neuron*, vol. 6, no. 3, pp. 431–443, **1991**.
- [48] M. A. Rashid, M. Katakura, G. Kharebava, K. Kevala, and H. Y. Kim, "N-docosahexaenoylethanolamine is a potent neurogenic factor for neural stem cell differentiation," *J. Neurochem.*, vol. 125, no. 6, pp. 869–884, **2013**.
- [49] M. A. Rashid and H. Y. Kim, "N-Docosahexaenoylethanolamine ameliorates ethanol-induced impairment of neural stem cell neurogenic differentiation" *Neuropharmacology*, vol. 102, pp. 174–185, **2016**.
- [50] B. S. Landeira *et al.*, "Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development," *Cereb. Cortex*, pp. 1–11, **2016**.
- [51] P. Wang, P. Wu, R. W. Egan, and M. M. Billah, "Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 276, no. 3, pp. 1271–1277, **2000**.
- [52] X. Miró, S. Pérez-Torres, J. M. Palacios, P. Puigdomènech, and G. Mengod, "Differential Distribution of cAMP-Specific Phosphodiesterase 7A mRNA in Rat Brain and Peripheral Organs," *Synapse*, vol. 214, pp. 201–214, **2001**.

- [53] J. A. Morales-Garcia *et al.*, “Phosphodiesterase7 Inhibition Activates Adult Neurogenesis in Hippocampus and Subventricular Zone In Vitro and In Vivo,” *Stem Cells*, vol. 35, no. 2, pp. 458–472, **2017**.
- [54] G. Lepski, C. E. Jannes, G. Nikkhah, and J. Bischofberger, “cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. September, p. 155, **2013**.
- [55] G. Van Meer, G., Voelker, D., and Feigenson, “Membrane lipids: where they are and how they behave,” *Mol. cell Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, **2009**.
- [56] T. Harayama and H. Riezman, “Understanding the diversity of membrane lipid composition,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2018**.
- [57] J. T. Hannich, K. Umebayashi, and H. Riezman, “Distribution and function of Sterols and Sphingolipids,” pp. 1–14, **2011**.
- [58] A. Yamashita *et al.*, “Acytransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 18–81, **2014**.
- [59] T. Harayama *et al.*, “Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo,” *Cell Metab.*, vol. 20, no. 2, pp. 295–305, **2014**.
- [60] J. L. Sampaio *et al.*, “Membrane lipidome of an epithelial cell line,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 5, pp. 1903–1907, **2011**.
- [61] B. Antonny, S. Vanni, H. Shindou, and T. Ferreira, “From zero to six double bonds: Phospholipid unsaturation and organelle function,” *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 7, pp. 427–436, **2015**.
- [62] S. K. Saka, A. Honigmann, C. Eggeling, S. W. Hell, T. Lang, and S. O. Rizzoli, “Lipid Organization of the Plasma Membrane,” *Nat. Commun.*, vol. 5, pp. 1–14, **2014**.
- [63] E. Bieberich and G. Wang, “Bioactive Lipids in Stem Cell Differentiation,” *Embryonic Stem Cells - Differ. Pluripotent Altern.*, vol. 3, **2011**.

- [64] E. Bieberich, "it's a lipid's world: Bioactive lipid metabolism and signaling in neural stem cell differentiation," *Neurochem. Res.*, vol. 37, no. 6, pp. 1208–1229, **2013**.
- [65] L. Paoletti, C. Elena, P. Domizi, and C. Banchio, "Role of Phosphatidylcholine during Neuronal differentiation," *IUBMB Life*, vol. 63, no. 9, pp. 714–720, **2011**.
- [66] H. Marcucci, L. Paoletti, S. Jackowski, and C. Banchio, "Phosphatidylcholine biosynthesis during neuronal differentiation and its role in cell fate determination," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25382–25393, **2010**.
- [67] D. Ma *et al.*, "DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene," *Brain Res.*, vol. 1330, pp. 1–8, **2010**.
- [68] E. Kawakita, M. Hashimoto, and O. Shido, "Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo," *Neuroscience*, vol. 139, no. 3, pp. 991–997, **2006**.
- [69] J. W. Choi *et al.*, "LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, no. 1, pp. 157–186, **2010**.
- [70] G. Estivill-Torrús *et al.*, "Absence of LPA1 Signaling Results in Defective Cortical Development," *Cereb. Cortex*, vol. 18, no. 4, pp. 938–950, **2008**.
- [71] E. Matas-Rico *et al.*, "Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 39, no. 3, pp. 342–55, **2008**.
- [72] T. L. Walker *et al.*, "Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 6, no. 4, pp. 552–565, **2016**.
- [73] A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, and O. Lindvall, "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke," *Nat. Med.*, vol. 8, p. 963, **2002**.
- [74] Y. Li, S. P. Yu, O. Mohamad, T. Genetta, and L. Wei, "Sublethal Transient Global Ischemia Stimulates Migration of Neuroblasts and Neurogenesis in Mice,"

Transl. Stroke Res., vol. 1, no. 3, pp. 184–196, **2010**.

- [75] E. J. Benner *et al.*, “Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4,” *Nature*, vol. 497, no. 7449, pp. 369–373, **2013**.
- [76] N. Picard-Riera, B. Nait-Oumesmar, and A. Baron-Van Evercooren, “Endogenous Adult Neural Stem Cells: Limits and Potential to Repair the Injured Central Nervous System,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 223–231, **2004**.
- [77] L. Xiao, C. Saiki, and R. Ide, “Stem cell therapy for central nerve system injuries: Glial cells hold the key,” *Neural Regen. Res.*, vol. 9, no. 13, pp. 1253–1260, **2014**.
- [78] L. Dimou and M. Gotz, “Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain,” *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 3, pp. 709–737, **2014**.
- [79] P. Ludwig, F. Thankam, A. Patil, A. Chamczuk, and D. Agrawal, “Brain injury and neural stem cells,” *Neural Regen. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 7–18, **2018**.
- [80] J. Silver and J. H. Miller, “Regeneration beyond the glial scar,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 2, pp. 146–156, **2004**.
- [81] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, **1979**.
- [82] T. Mosmann, “Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, **1983**.
- [83] Y. Sun, S. K. Goderie, and S. Temple, “Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells,” *Neuron*, vol. 45, no. 6, pp. 873–886, **2005**.
- [84] M. R. Costa *et al.*, “Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro,” *Development*, vol. 138, no. 6, pp. 1057–1068, **2011**.
- [85] O. Hilsenbeck *et al.*, “Software tools for single-cell tracking and quantification of

- cellular and molecular properties," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 7, pp. 703–706, **2016**.
- [86] J. D. Esko, M. Nishijima, and C. R. Raetz, "Animal cells dependent on exogenous phosphatidylcholine for membrane biogenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 6, pp. 1698–702, **1982**.
- [87] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, **1959**.
- [88] W. W. Christie and X. Han, "Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis (3th edition). Edited by William W. Christie and Xianlin Han," *Oily Press*, **2003**.
- [89] U. Lendahl, L. B. Zimmerman, and R. D. McKay, "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.," *Cell*, vol. 60, no. 4, pp. 585–595, **1990**.
- [90] D. Park *et al.*, "Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells," *Stem Cells*, vol. 28, no. 12, pp. 2162–2171, **2010**.
- [91] F. Darios and B. Davletov, "Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3," *Nature*, vol. 440, no. 7085, pp. 813–817, **2006**.
- [92] M. Knobloch, "The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation," *Brain Plast.*, vol. 3, pp. 1–11, **2017**.
- [93] N. D. Ridgway, "The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 48, no. 1, pp. 20–38, **2013**.
- [94] J. X. Kang, J.-B. Wan, and C. He, "Concise Review: Regulation of Stem Cell Proliferation and Differentiation by Essential Fatty Acids and Their Metabolites," *Stem Cells*, vol. 32, no. 5, pp. 1092–1098, **2014**.
- [95] T.-C. Hang, D. A. Lauffenburger, L. G. Griffith, and D. B. Stolz, "Lipids promote survival, proliferation, and maintenance of differentiation of rat liver sinusoidal endothelial cells in vitro," *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 302, no. 3, pp.

G375–G388, **2012**.

- [96] S. Temple, “The development of neural stem cells.,” *Nature*, vol. 414, no. November, pp. 112–117, **2001**.
- [97] F. Ortega, M. R. Costa, T. Simon-Ebert, T. Schroeder, M. Gotz, and B. Berninger, “Using an adherent cell culture of the mouse subependymal zone to study the behavior of adult neural stem cells on a single-cell level,” *Nat Protoc*, vol. 6, no. 12, pp. 1847–1859, **2011**.
- [98] M. R. Costa, G. Wen, A. Lepier, T. Schroeder, and M. Götz, “Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex.,” *Development*, vol. 135, no. 1, pp. 11–22, **2008**.
- [99] G. Prelich *et al.*, “Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein.,” *Nature*, vol. 326, no. 6112, pp. 517–520, **1987**.
- [100] G. L. Moldovan, B. Pfander, and S. Jentsch, “PCNA, the Maestro of the Replication Fork,” *Cell*, vol. 129, no. 4, pp. 665–679, **2007**.
- [101] F. Wan *et al.*, “Proliferation and glia-directed differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of the lateral ventricle and the migratory pathway to the lesions after cortical devascularization of adult rats,” *Biomed Res. Int.*, **2016**.
- [102] E. Högyes, C. Nyakas, A. Kiliaan, T. Farkas, B. Penke, and P. G. M. Luiten, “Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats,” *Neuroscience*, vol. 119, no. 4, pp. 999–1012, **2003**.
- [103] I. F. Ugidos, D. Pérez-Rodríguez, and A. Fernández-López, “A role for lipids as agents to alleviate stroke damage: the neuroprotective effect of 2-hydroxy arachidonic acid,” *Neural Regeneration Research*, vol. 12, no. 8. India, pp. 1273–1275, **2017**.
- [104] N. G. Bazan, “Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection,” *Mol Neurobiol*, vol. 32, no. 1, pp. 89–103, **2005**.

- [105] et al Legrand, C., "Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker," *J. Biotechnol.*, vol. 25, pp. 231–243, **1992**.
- [106] C. L. Balaban, C. Banchio, and E. A. Ceccarelli, "TAT-mediated transduction of bacterial redox proteins generates a cytoprotective effect on neuronal cells," *PLoS One*, vol. 12, no. 9, pp. 1–20, **2017**.
- [107] M. R. Arana *et al.*, "Coordinated induction of GST and MRP2 by cAMP in Caco-2 cells: Role of protein kinase A signaling pathway and toxicological relevance," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 287, no. 2, pp. 178–190, **2015**.
- [108] A. J. Murray, "Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems.," *Sci. Signal.*, vol. 1, no. 22, p. re4, **2008**.
- [109] T. Fujioka, "Activation of cAMP Signaling Facilitates the Morphological Maturation of Newborn Neurons in Adult Hippocampus," *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 319–328, **2004**.
- [110] S. Nakagawa *et al.*, "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 9, pp. 3673–3682, **2002**.
- [111] C. Giachino, "cAMP Response Element-Binding Protein Regulates Differentiation and Survival of Newborn Neurons in the Olfactory Bulb," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 44, pp. 10105–10118, **2005**.
- [112] E. P. Brandon, R. L. Idzerda, and G. S. McKnight, "PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: Making the connection," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 397–403, **1997**.
- [113] C. Kim, N. H. Xuong, and S. S. Taylor, "Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1 α) subunits of PKA," *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5710, pp. 690–696, **2005**.
- [114] C. Kim, C. Y. Cheng, S. A. Saldanha, and S. S. Taylor, "PKA-I Holoenzyme Structure Reveals a Mechanism for cAMP-Dependent Activation," *Cell*, vol. 130, no. 6, pp.

1032–1043, **2007**.

- [115] J. Hanoune, N. Defer, and O. L. E. Of, “Regulation and Role of Adenylyl Cyclase Isoforms,” *Recherche*, vol. 41, pp. 145–74, **2001**.
- [116] S. S. M. Villanueva *et al.*, “Induction of Intestinal Multidrug Resistance-Associated Protein 2 by Glucagon-Like Peptide 2 in the Rat,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 335, no. 2, pp. 332–341, **2010**.
- [117] N. Farrokhnia, A. Ericsson, A. Terént, and F. Lennmyr, “MEK-inhibitor U0126 in hyperglycaemic focal ischaemic brain injury in the rat,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 38, no. 9, pp. 679–685, **2008**.
- [118] I. Fujimoto, K. Hasegawa, K. Fujiwara, M. Yamada, and K. Yoshikawa, “Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor cells,” *Cell. Signal.*, vol. 28, no. 2, pp. 94–107, **2016**.
- [119] L. Li, G. D. Zhao, Z. Shi, L. L. Qi, L. Y. Zhou, and Z. X. Fu, “The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review),” *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 5, pp. 3045–3050, **2016**.
- [120] D. J. Panka, W. Wang, M. B. Atkins, and J. W. Mier, “The raf inhibitor BAY 43-9006 (sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 1611–1619, **2006**.
- [121] D. Vandamme, A. Herrero, F. Al-Mulla, and W. Kolch, “Regulation of the MAPK pathway by raf kinase inhibitory protein,” *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 19, no. 6, pp. 405–15, **2014**.
- [122] J. Kuchtey and C. Fewtrell, “Protein kinase C activator PMA reduces the Ca^{2±} response to antigen stimulation of adherent RBL-2H3 mucosal mast cells by inhibiting depletion of intracellular Ca^{2±} stores,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 181, no. 1, pp. 113–123, **1999**.
- [123] M. A. Hack, M. Sugimori, C. Lundberg, M. Nakafuku, and M. Gotz, “Regionalization and fate specification in neurospheres: The role of Olig2 and Pax6,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 25, no. 4, pp. 664–678, **2004**.

- [124] T. Veenith, S. S. Goon, and R. M. Burnstein, "Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management," *World J. Emerg. Surg.*, vol. 4, no. 1, p. 7, **2009**.
- [125] O. N. Hausmann, "Post-traumatic inflammation following spinal cord injury," *Spinal Cord*, vol. 41, no. 7, pp. 369–378, **2003**.
- [126] H. H. Park *et al.*, "Neural stem cells injured by oxidative stress can be rejuvenated by GV1001, a novel peptide, through scavenging free radicals and enhancing survival signals," *Neurotoxicology*, vol. 55, pp. 131–141, **2016**.
- [127] A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. F. C. Lima, "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 65, no. 2–3, pp. 45–80, **2005**.
- [128] A. R. Desai and S. K. McConnell, "Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development," *Development*, vol. 127, no. 13, pp. 2863–2872, **2000**.
- [129] B. Berninger *et al.*, "Functional Properties of Neurons Derived from," *In Vitro*, vol. 27, no. 32, pp. 8654–8664, **2007**.
- [130] C. Heinrich *et al.*, "Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex," *Nat. Protoc.*, vol. 6, pp. 214–228, **2011**.
- [131] C. Heinrich *et al.*, "Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons," *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 5, **2010**.
- [132] S. Gascón *et al.*, "Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 396–409, **2016**.
- [133] G. Masserdotti *et al.*, "Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes," *Cell Stem Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 74–88, **2015**.
- [134] S. Gascón, G. Masserdotti, G. L. Russo, and M. Götz, "Direct Neuronal Reprogramming: Achievements, Hurdles, and New Roads to Success," *Cell Stem*

Cell, vol. 21, no. 1, pp. 18–34, **2017**.

- [135] A. D. Panopoulos *et al.*, “The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming,” *Cell Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 168–177, **2012**.
- [136] M. L. Halls and D. M. F. Cooper, “Regulation by Ca²-Signaling Pathways of Adenylyl Cyclases,” *s Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2011**.
- [137] C. Frühbeis, D. Fröhlich, and E. M. Krämer-Albers, “Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication,” *Front. Physiol.*, vol. 3 APR, no. April, pp. 1–7, **2012**.
- [138] Y. B. Zhu *et al.*, “Astrocyte-derived phosphatidic acid promotes dendritic branching,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June 2015, pp. 1–13, **2016**.
- [139] J. Kowal, M. Tkach, and C. Théry, “Biogenesis and secretion of exosomes,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 116–125, **2014**.
- [140] L. F. Bätz *et al.*, “Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. January, pp. 1–28, **2016**.
- [141] C. Korkut *et al.*, “Regulation of Postsynaptic Retrograde Signaling by Presynaptic Exosome Release,” *Neuron*, vol. 77, no. 6, pp. 1039–1046, **2013**.
- [142] D. Fitzner *et al.*, “Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis,” *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 3, pp. 447–458, **2011**.