



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del factor de crecimiento derivado del Endotelio
Vascular (VEGF) sobre los precursores neuronales del
epitelio olfatorio de humano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Gerardo Rodrigo Perera Murcia



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

Ciudad Universitaria, D.F., 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres que por ellos he llegado al final.

A la memoria de mi tía Fran, una excelente madre y persona.

A mi mejor amiga, compañera y amor Bety

A la Facultad de Ciencias, espero ser un digno exponente de sus conocimientos.

Agradecimientos

Agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme un lugar, desde la preparatoria hasta esta fecha, la cual me ha educado, formado y brindado los mejores momentos de mi vida.

Agradezco a mis padres que me han apoyado desde siempre y que no han dudado de mí ni un instante porque por ellos soy lo que soy ahora, una gran persona y a su vez me han brindado el apoyo que me ha permitido llegar a este punto. A mi papá por sus consejos y su gran sabiduría, porque el forjo al Biólogo que había en mí. A mi mamá porque ha caminado a mi lado todo este tiempo.

Al resto de mi familia que siempre ha estado con una sonrisa brindando un apoyo invaluable.

A Bety, mi compañera, gran amiga y mi gran amor, porque ha estado en todo este camino y que siempre me brinda su tiempo y al final tenía el tiempo para ser una pareja maravillosa, que me enseñó a pensar, a discutir, simplemente ha formado una gran parte de mí. Creo que sin ti no estaría en esta posición angular.

A Laura por brindarme grandes consejos y resolver mis dudas a lo largo de este trabajo, porque estuviste ahí apoyándome personalmente en todo momento.

Al Dr. Gerardo por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo que me permitió desarrollarme como estudiante y como profesional. A su vez a Leonardo que ha sido como un maestro para mí y por todo el tiempo brindado para explicarme y hacerme entender y Ariadna que se ha dado el tiempo de enseñarme las cosas.

Finalmente a mis amigos que estuvieron durante mi formación, que me alegraron los días, gracias a Paty, Laura, Gaby, Ángel, Carmen Fernando y Alberto.

Abreviaturas

AKT/PKB – Proteína cinasa B (Protein kinase B)

ANOVA – Análisis de varianza (Analysis of variance)

BMP - Proteínas morfogénicas óseas (Bone Morphogenetic Proteins)

BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain-derived neurotrophic factor)

BrdU - 5' Bromo 2' deoxyuridina

BSA - Albúmina sérica de bovino (Bovine serum albumin)

NPC – células precursoras neuronales (Neural precursor cells)

CNTF – Factor ciliar neurotrófico (Ciliary neurotrophic factor)

DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DCX - Doblecortina (Doublecortin)

DMSO - Dimetil sulfoxido (Dimethyl sulfoxide)

EGF – Factor de crecimiento epidermal (Epidermal growth factor)

FGF – Factor de crecimiento de fibroblasto (Fibroblast growth factor)

GAP-43 - Proteína asociada al crecimiento de peso molecular de 43-KDA (Growth Associated Protein 43)

GDF - Factor de crecimiento de diferenciación (Growth differentiation factor)

GFAP - Proteína ácida fibrilar de la glia (Glial fibrillary acidic protein)

GBC - Células basales globosas (Globose basal cells)

HB-EGF – Factor de crecimiento ligado a heparina (Heparin-binding EGF-like growth factor)

HBC - Células basales horizontales (Horizontal basal cells)

IGF – Factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor)

IN - Neuronas inmaduras (Immature neurons)

MN - Neuronas maduras (Mature neurons)

PI3K – Fosfoinositol 3-quinasa (Phosphoinositide 3-Kinase)

PLC – Fosfolipasa C (Phospholipase C)

LIF – Factor inhibidor de leucemia (Leukemia inhibitory factor)

MAPK – Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen activated protein kinase)

NCAM - Adhesión neuronal celular (Neural cell adhesion molecule)

OMP - Proteína de marcaje olfatorio (Olfactory marked protein)

PDGF – Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor)

PSN-CAM – Proteína polísialica de adhesión neuronal (Poliasilic neural adhesión protein)

PLGF - Factor de crecimiento de placenta (Placental growth factor).

RIPA - Buffer de radio inmunoprecipitación (Radio immunoprecipitation assay)

RTK - Receptor de tirosina quinasa (receptor Tyrosine Kinase)

SGZ - Zona subgranular (subgranular zone)

SVZ - Zona subventricular (subventricular zone)

TGF - Factor de crecimiento tumoral (Tumoral growth factor)

VEGF - Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (Vascular endotelial growth factor)

WST-1 - Water salt tetrasolium 1

Índice

1 Resumen.....	8
2 Neurogénesis en el cerebro adulto.....	9
2.1 Neurogénesis en el hipocampo adulto.....	10
2.2 Neurogénesis en la zona subventricular de los ventrículos laterales.....	11
3 Generación de nuevas neuronas en regiones externas al cerebro adulto.....	13
3.1 Epitelio olfatorio.....	13
3.2 Neurogénesis en el epitelio olfatorio.....	15
4 Nichos Neurogénicos.....	16
5 VEGF.....	19
5.1 Receptor de VEGF.....	20
5.2 Vía de señalización de VEGF.....	21
5.3 VEGF en el sistema nervioso central.....	23
6 Justificación.....	25
7 Hipótesis.....	25
8 Objetivo.....	25
8.1 Objetivos particulares.....	25
9 Metodología.....	26
9.1 Obtención y cultivo de precursores neuronales de epitelio olfatorio.....	26
9.2 Identificación de precursores neuronales.....	26
9.3 VEGFR2 en precursores neuronales de epitelio olfatorio.....	27
9.4 Condiciones experimentales para determinar el efecto del VEGF en células precursoras del epitelio olfatorio.....	27
9.5 Determinación de la viabilidad de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF.....	28
9.6 Evaluación de la proliferación de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF.....	29

9.7 Evaluación de la supervivencia de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF.....	30
9.8 Evaluación de la migración celular de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF.....	31
9.9 Vía de acción del VEGF en precursores neuronales de epitelio olfatorio....	32
9.10 Análisis de vinculina de los precursores neuronales por efecto de VEGF.	33
9.11 Análisis estadístico.....	35
10 Resultados.....	36
11 Discusión.....	45
12 Conclusiones.....	48
Bibliografía.....	49

1. Resumen

La Neurogénesis es el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células multipotenciales que se dividen y dan origen a células precursoras. Estas células entran en fase de diferenciación y se convierten en neuronas maduras (33). Recientemente se ha descrito una zona externa al sistema nervioso central, ubicado de manera dorsal y posterior a la mucosa nasal, en la cual existen precursores neuronales. Esta zona se denomina epitelio olfatorio (34). El epitelio olfatorio es el vínculo entre el nervio olfatorio y el ambiente, en él se encuentran las neuronas sensitivas que permiten distinguir los distintos olores (8).

El proceso neurogénico necesita un área con características primordiales que permiten el mantenimiento y desarrollo de distintas estirpes celulares. A esta área se le conoce como nicho neurogénico el cual está regulado por los factores liberados por las células en este ambiente, pueden actuar de manera autócrina y parácrina, y la interacción célula-célula de las distintas estirpes celulares (56). Dentro de los factores solubles está el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; por sus siglas en Ingles) (41).

El VEGF es una familia de proteínas que actúa mediante los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTKs; por sus siglas en Ingles) y que permiten la activación de distintas vías de señalización (6). Dentro de las acciones que tiene el VEGF en células del sistema nervioso destaca la proliferación de células precursoras neuronales de hipocampo y ventrículos laterales, el crecimiento axonal y la supervivencia de cultivos de la cervical superior, ganglio de la raíz dorsal de ratón. (24, 25, 26,46).

En este trabajo exploramos los efectos de la molécula de VEGF sobre precursores neuronales de epitelio olfatorio de humano, con el fin de determinar qué papel desempeña este factor en el nicho neurogénico de esta zona, que es externa al sistema nervioso central. Esto se realizó mediante los ensayos de viabilidad, proliferación, supervivencia y migración; de lo cual pudimos determinar que el VEGF es una proteína, que mediante la activación del receptor tipo 2 para VEGF (VEGFR2), es capaz de activar una vía de señalización a través de PI3K capaz de modificar las adhesiones focales de las células precursoras.

2. Neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis se define como el conjunto de eventos que dirigen la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto, a partir de células multipotentes en división que dan origen a neuronas funcionales (33). Dicho proceso ocurre de manera constitutiva en dos zonas del cerebro adulto: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Figura 1).

La zona subventricular de los ventrículos laterales cuenta con: células epidermales, células multipotentes y precursores neuronales. Esta zona tiene como objetivo proporcionar neuronas al bulbo olfatorio (Figura 1-A).

La zona subgranular del giro dentado del hipocampo cuenta con un nicho compuesto de: células multipotenciales, precursores neuronales, neuronas maduras y células gliales (Figura 1-B).

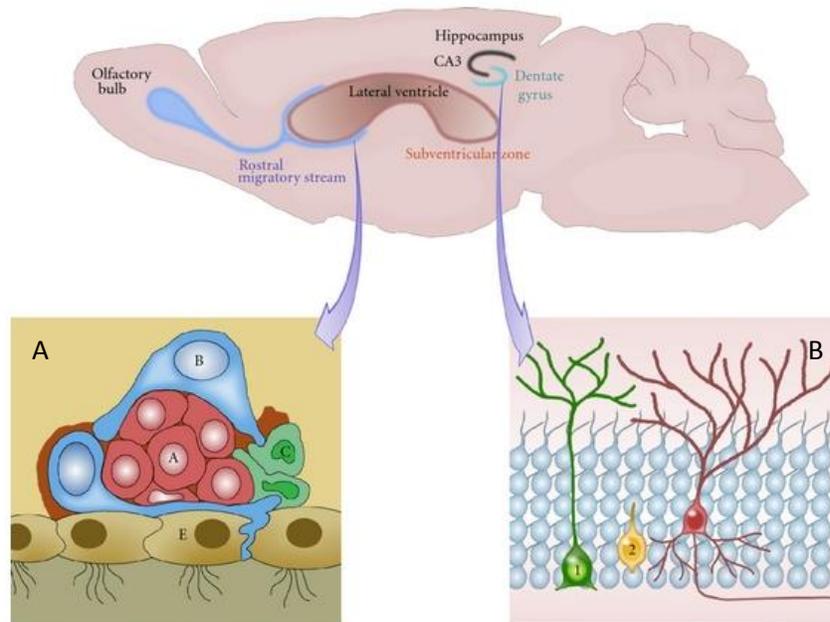


Figura 1. Zonas neurogénicas del cerebro adulto. La imagen ilustra las dos zonas neurogénicas conocidas: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. A) En la zona subventricular se observa las células multipotentes (B), los precursores neuronales (A y C) y la capa de células epidermales (E). B) En el giro dentado del hipocampo se observa las células multipotentes (1), seguidas de los precursores neuronales (2), las neuronas maduras (rojo) y las células gliales (azul) (Tomado de Drucker-Colin 2004).

2.1 Neurogénesis en el hipocampo adulto

La neurogénesis en el hipocampo se desarrolla en un lapso de tres a cuatro semanas (13, 49). Este proceso se divide en seis etapas. La primera etapa da inicio en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, donde una población de células multipotentes nombradas tipo 1, con características de glía radial y expresión de marcadores proteicos tales como: la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP; por sus siglas en Ingles), Sox2 y Nestina (29, 30), se dividen de manera asimétrica, es decir, que son capaces de auto renovarse y dan origen a un tipo celular denominado 2a.

La segunda etapa comprende al grupo de células tipo 2a, las cuales tienen una división rápida y expresan las proteínas polisialica de adhesión celular neuronal (PSN-CAM; por sus siglas en ingles) y nestina (19,29). Estas células llevan a cabo una división asimétrica que da origen a las células tipo 2b. Durante esta etapa donde el linaje celular se compromete a una estirpe neuronal (29).

La tercera etapa involucra a las células de tipo 2b, las cuales tienen como características principales la expresión de las proteínas: nestina, proteína polisialica de adhesión neuronal (PSN-CAM), NeuN y Doblecortina (DCX) (19,29). Durante esta etapa inician los primeros cambios morfológicos en las células, desarrollando procesos neuríticos cortos y paralelos a la zona granular del giro dentado. Finalmente estas células pueden dividirse nuevamente dando origen células del mismo tipo 2b y a células denominadas tipo 3.

La cuarta etapa describe a las células tipo 3, las cuales, expresan los marcadores PSN-CAM, NeuN y DCX (13, 19, 29), exhibiendo prolongaciones neuríticas hacia la zona granular del giro dentado y migran hacia la capa molecular del giro dentado (29). Estas células tiene la capacidad de autorenovarse y dar origen a neuronas inmaduras.

La quinta etapa está delimitada por la presencia de neuronas inmaduras, las cuales, expresan los marcadores DCX, Calretinina y NeuN y morfológicamente cuentan con procesos dendríticos bien definidos y la capacidad de realizar sinapsis (29). Estas células maduran y se convierten en neuronas.

Finalmente, la sexta etapa es cuando las neuronas maduras presentan arboles dendríticos mejor estructurados y están integrados en la zona granular. Además, durante esta etapa las neuronas de nueva generación expresan marcadores proteicos como NeuN y calbidina (19,29) (Figura 2).

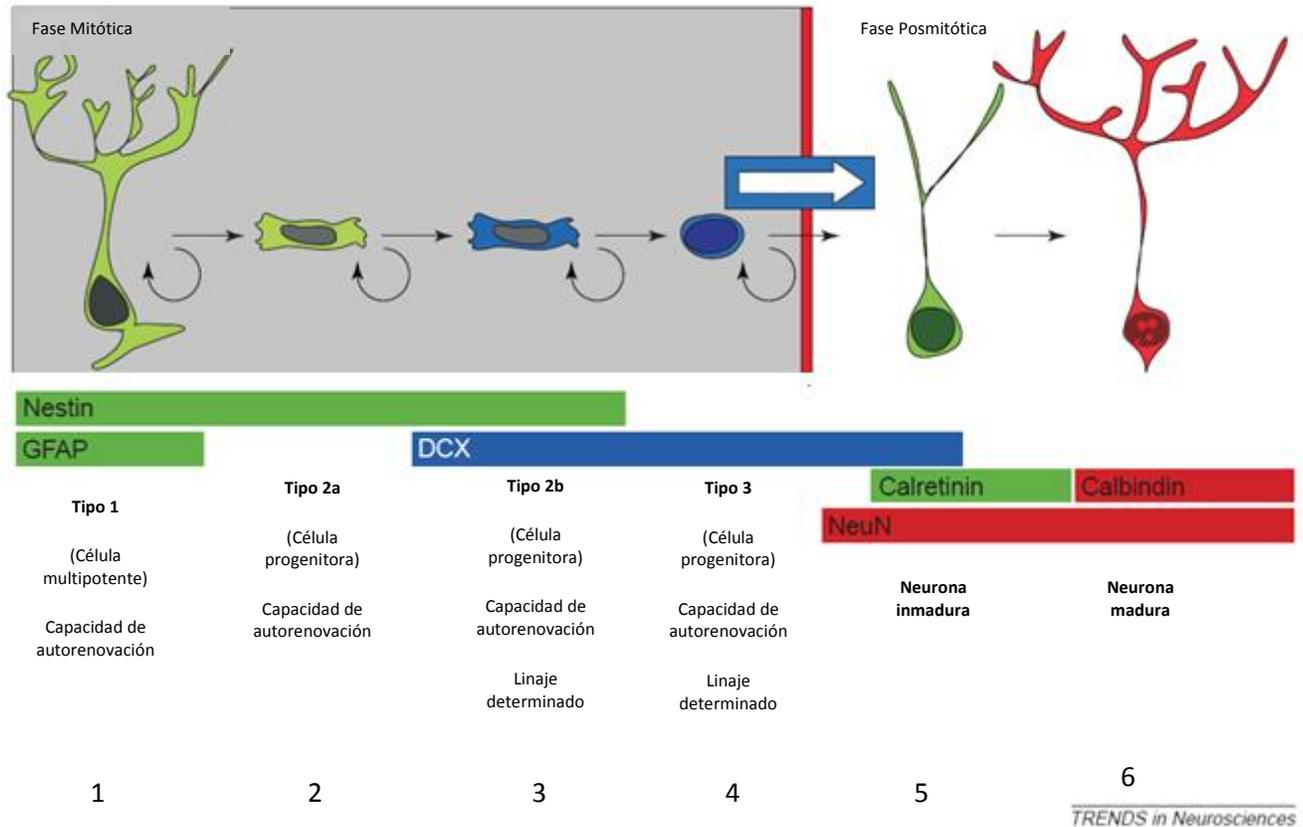


Figura 2. Proceso de neurogénesis del hipocampo adulto. Etapas del proceso neurogénico desde la célula multipotente (Etapa 1) hasta neurona madura (Etapa 6) así como los cambios en la expresión de marcadores proteínicos a lo largo de este proceso. (Tomado y modificado de Kempermann, 2004)

2.2 Neurogénesis en la zona subventricular de los ventrículos laterales

La segunda zona neurogénica del sistema nervioso central es la zona subventricular de los ventrículos laterales. Al igual que en el hipocampo el proceso neurogénico se divide en distintas fases. La primera fase, también conocida como fase de proliferación, incluye la división de las células multipotentes, estas células tienen como característica principal la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) y la capacidad de dividirse de manera asimétrica dando origen a las células de amplificación transitoria (21, 40) (Figura 3).

La segunda fase también conocida como etapa de especificación de linaje, recae sobre las células de amplificación transitoria, estas células expresan *Dlx2* y tienen una tasa de división mayor a las células multipotentes. Durante esta fase las células amplificadoras transitorias dan origen a los neuroblastos, que son células con linaje neuronal y que expresan los marcadores PSA-NCAM y *DCX* (21, 40) (Figura 3).

La tercera fase o fase de migración consiste en el desplazamiento de cadenas de neuroblastos, los cuales forman estructuras tubulares y tienen un soporte de células gliales, a través de la cadena rostral migratoria. Las estructuras gliales además de brindar rigidez y orden también favorecen el proceso de migración y diferenciación gracias a la liberación de factores al medio. Al llegar a la mitad del bulbo olfatorio las células migrantes tienen la posibilidad de migrar a la capa granular y periglomerular. Este proceso tiene una duración aproximada de dos semanas (10, 21, 40) (Figura 3).

La cuarta fase o fase de integración sináptica, es la fase en la cual los neuroblastos han llegado al bulbo olfatorio y se diferencian en neuronas maduras GABAérgicas y dopaminérgicas (10), que expresan los marcadores PSA-NCAM, DCX y NeuN. Dependiendo de la capa en la que se encuentren estas neuronas se denominarán neuronas periglomerulares o neuronas granulares. La integración sináptica puede durar dos semanas (Figura3).

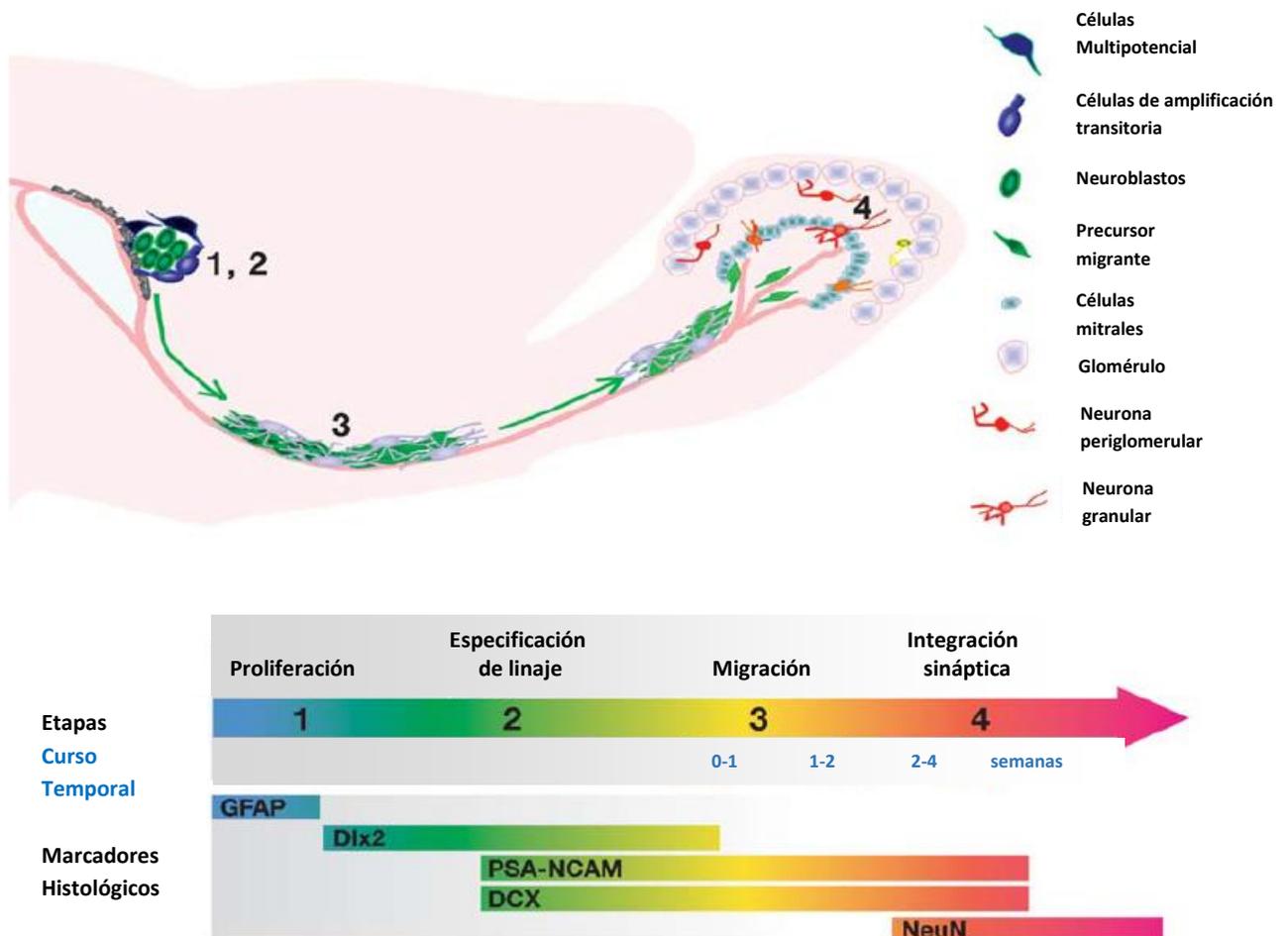


Figura 3. Proceso de neurogénesis de la zona subventricular de los ventrículos laterales hasta el bulbo olfatorio. Presentes las cuatro fases de la neurogénesis: proliferación, diferenciación migración e integración sináptica. A su vez se observan los marcadores proteicos característicos de estas fases como lo es GFAP, Dlx2, PSA-NCAM, DCX y NeuN, así como las células presentes en este evento. (Tomado de Guo-li Ming, 2005)

3. Generación de nuevas neuronas en regiones externas al cerebro adulto

Recientemente se ha descrito una zona externa al sistema nervioso central en la cual hay producción de nuevas neuronas. Esta zona se conoce como el epitelio olfatorio y está ubicado de manera dorsal y posterior de la cavidad nasal cubriendo el septum nasal y los huesos turbinados (Figura 4-A). El epitelio olfatorio es el vínculo del sistema olfatorio con el sistema nervioso, debido a su interacción con el nervio olfatorio, el cual se conecta con el bulbo olfatorio, y este a su vez al sistema nervioso central (34) (Figura 4-B).

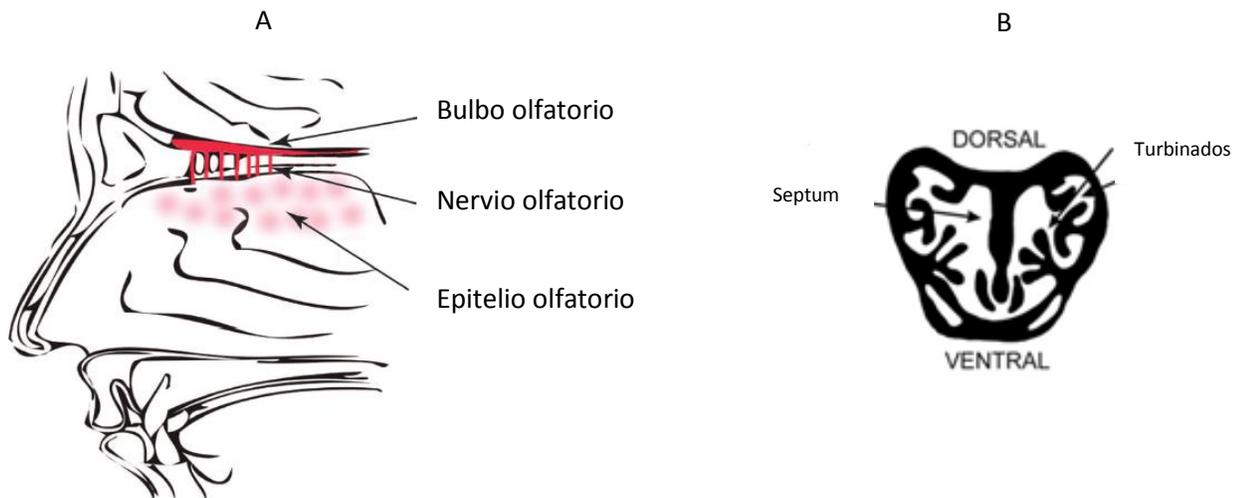


Figura 4. Sistema olfatorio A Diagrama de corte coronal de la cavidad nasal mostrando el septum y los huesos turbinados. B Diagrama de corte sagital del sistema olfatorio donde se muestra la zona del epitelio olfatorio y su unión, mediante el nervio olfatorio, con el bulbo olfatorio (Tomado de Bettina Malnic and Armelin-Correa 2010; Mackay-Sim, 2010).

3.1 Epitelio olfatorio

La mucosa olfatoria está dividida en la lámina propia, compuesta por las glándulas de Bowman y en la cual se encuentran los axones sensoriales que se comunican con el bulbo olfatorio, siendo esta la parte que conecta el lumen de la cavidad nasal y el sistema nervioso central. El epitelio olfatorio, que es la capa más superficial de la mucosa olfatoria, está conformado por los axones sensoriales olfatorios, las células basales (células multipotentes), las neuronas sensoriales y la glía especializada que rodean a las neuronas sensoriales. El epitelio cuenta con una amplia superficie de cilios que son las proyecciones dendríticas de las neuronas sensoriales (7,34). Los axones sensoriales son capaces de traspasar la lámina propia y llegar al nervio olfatorio donde se conectan con el bulbo olfatorio (Figura 5).

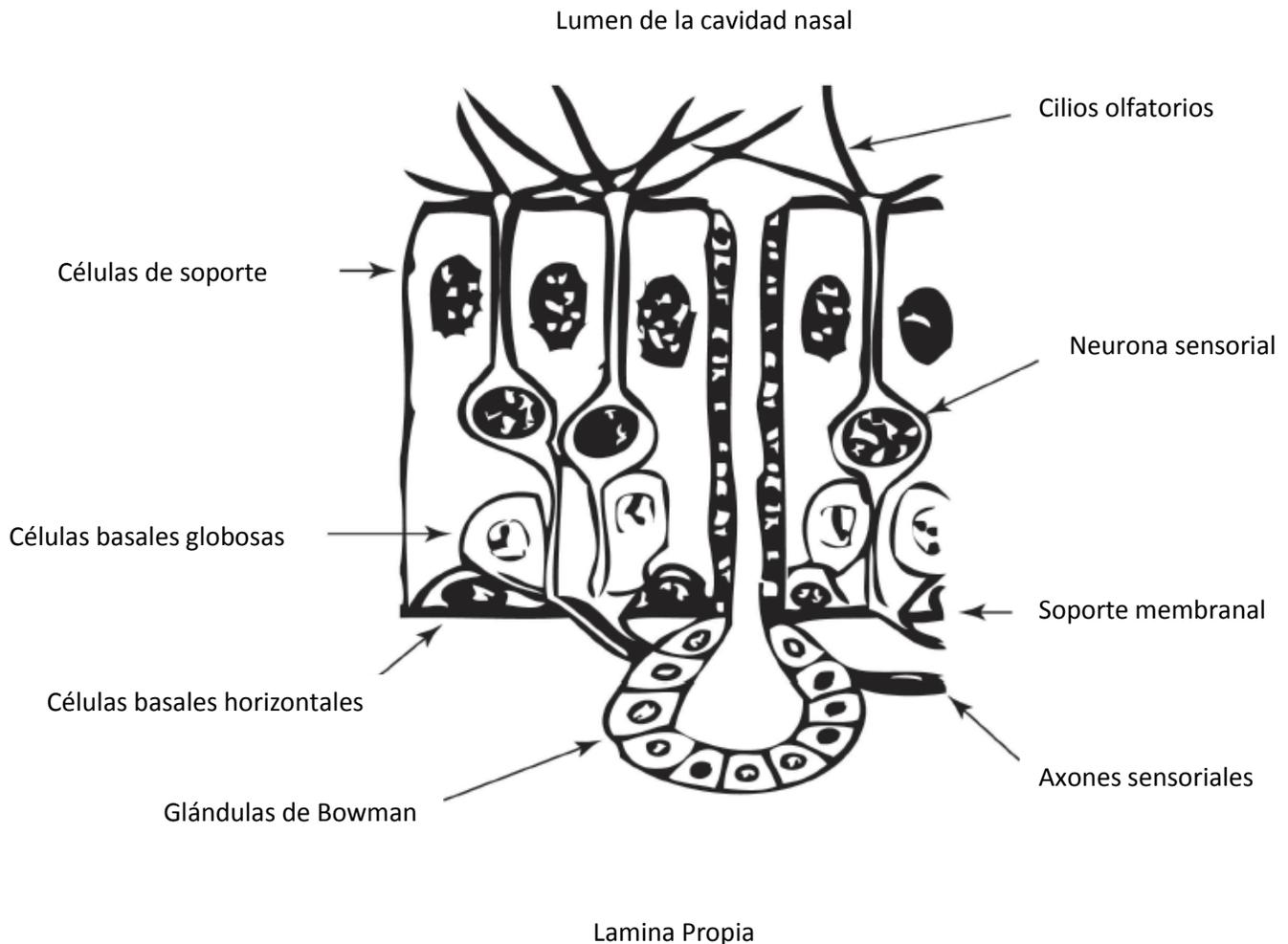


Figura 5. Mucosa olfatoria. El diagrama muestra la lámina propia en la cual están ubicados los axones sensoriales que comunican con el bulbo olfatorio y las glándulas de Bowman; a su vez cuentan con un conducto directo que comunica con el lumen de la cavidad nasal. La división con el epitelio está dada por la membrana basal y a partir de esta división se encuentran las células basales (horizontales y globosas) seguidas de las neuronas sensoriales y estas exponen los cilios a la cavidad nasal y son recubiertas por células gliales de soporte (Tomado de Mackay-Sim, 2010).

El sentido del olfato es un sistema que evolutivamente ha desempeñado diversas funciones a favor de la supervivencia de diferentes especies, tales como: encontrar alimento, interacciones sociales, comportamiento reproductivo y método de defensa.

Se sabe que la mucosa olfatoria es un área de contacto directo con el medio ambiente y que esto conlleva dos desventajas: I) La facilidad de muerte de neuronas sensoriales expuestas al ambiente. II) La facilidad de entrada de virus y bacterias al nervio olfatorio. Como resultado de un proceso de selección natural actualmente contamos con un sistema de renovación de neuronas sensoriales que nos garantiza la presencia del olfato. Fue en 1940 cuando Nagahara y colaboradores, observaron la capacidad mitótica en las células basales del epitelio olfatorio de ratones adultos. A partir de este momento se realizaron una gran cantidad de estudios que apoyaron el desarrollo de neuronas sensitivas en monos (54), ranas (58), peces (64), y humano

(42, 66), demostrando que el epitelio olfatorio es una zona con la capacidad de producir neuronas nuevas.

3.2 Neurogénesis en el epitelio olfatorio

La neurogénesis del epitelio olfatorio es un proceso cuyo objetivo es sustituir a las células que mueren de manera habitual, debido a la exposición directa con el ambiente. Para dar inicio al proceso neurogénico del epitelio olfatorio es necesario que sea estimulado principalmente por la muerte de neuronas sensoriales en el nervio olfatorio (20), esta pérdida incrementa la mitosis de las células multipotenciales llamadas células basales horizontales (HBC; por sus siglas en Inglés), estas células son capaces de dar origen a linajes endotelial, neural, mesodérmico y endodérmico (38, 43, 44, 45). Las HBC están ubicadas en la lámina basal y se dividen de manera paulatina y asimétrica permitiendo así autorenovarse y dar origen a células precursoras denominadas células globosas (GBC; por sus siglas en Inglés) (23).

Una vez que se han originado las células globosas, estas contarán con una división asimétrica y de menor duración, lo cual permitirá aumentar de manera exponencial el número de células en el epitelio. Una de las características principales de estas células es la expresión de la molécula de adhesión neuronal celular (NCAM; por sus siglas en Inglés) y también a partir de esta etapa se define el linaje celular, dando así la formación de los precursores neuronales (23).

Los precursores neuronales son las células que inician el proceso de migración hacia la parte superior del epitelio (7). Sus principales características es la expresión de la proteína NCAM, Nestina y los genes MasH1 y Ngn1 (7). Estas células se diferencian en neuronas olfativas sensoriales inmaduras las cuales expresan NCAM y la proteína asociada al crecimiento de peso molecular de 43-KDA (GAP-43; por sus siglas en Inglés) (31) (Figura 6). Estas neuronas comienzan a presentar los primeros cambios morfológicos como el desarrollo dendrítico y el desarrollo de cilios (36). Las neuronas son consideradas maduras a partir de la presencia de marcadores tales como NeuN y la proteína de marcaje olfatorio (OMP; por sus siglas en Inglés) (36). Estas células además de exponer sus dendritas en la membrana del epitelio, cuentan con un axón que formara una conexión con las células mitrales del bulbo olfatorio. Estos axones están soportados en células gliales conocidas como células olfatorias de resguardo (34) (Figura 6).

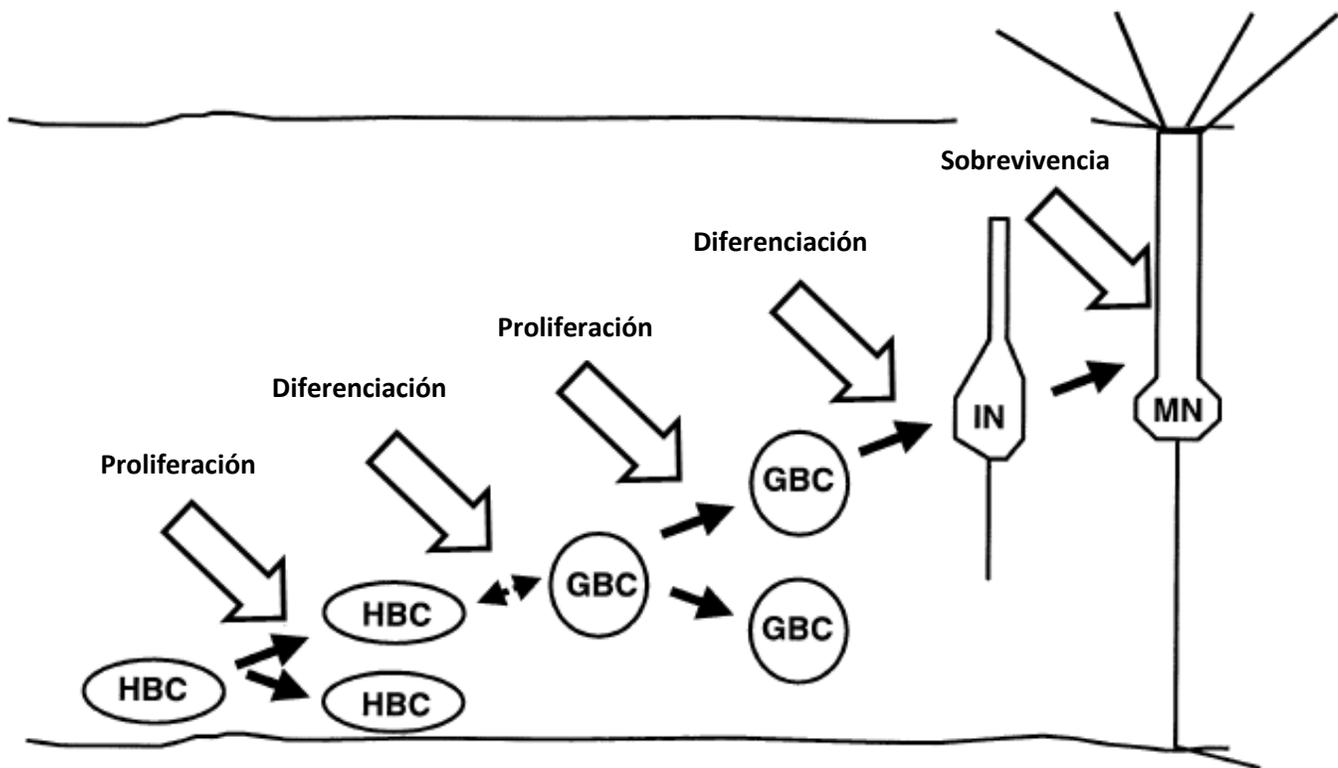


Figura 6. Neurogénesis de epitelio olfatorio. Las células basales horizontales (HBC) cuentan con una división asimétrica dando origen a HBC o a células basales globosas (GBC). Las GBC son células de amplificación rápida y que se diferencian en neuronas. El siguiente estadio es el de las neuronas inmaduras (IN), con los primeros cambios morfológicos como: la formación del axón y formación de prolongaciones dendríticas. Finalmente se convierten en neuronas maduras (MN) una vez que hayan alcanzado la capa basal y han desarrollado prolongaciones dendríticas que superan el epitelio (Tomado de Newman et al. 2002).

4. Nichos neurogénicos

Los procesos neurogénicos, previamente descritos, se da en zonas con características únicas que les confieren la capacidad de generar nuevas neuronas. Esto se debe a la presencia de un microambiente específico que está definido por la matriz extracelular, las señales autócrinas y parácrinas del medio, el contacto de células vecinas y factores que modifican a distancia dicho microambiente (34). La zona de interacción entre precursores neuronales y el microambiente que favorece la formación de nuevas neuronas se denomina nicho neurogénico (33).

Enfocándonos directamente en el grupo de factores que regulan la neurogénesis en el adulto podemos observar una amplia relación entre las distintas zonas neurogénicas (Tabla 1).

Zona neurogénica	Factores de crecimiento
Zona subventricular de los ventrículos laterales	BDNF, CNTF, HB-EGF, FGF2, EGF, TGF y VEGF
Giro dentado del hipocampo	BDNF, CNTF, HB-EGF, FGF2, EGF, IGF1, TGF y VEGF
Epitelio olfatorio	LIF, TGF β 2, IGF1, FGF2, 8, GDF11, PDGF, VEGF, BDNF, EGF, BMP2, 4 y 7

Tabla1. Factores de crecimiento presentes en las distintas zonas neurogénicas

Denotando de manera más detallada que función realiza cada factor, podemos vislumbrar una similitud ejercida entre las zonas. (Tabla 2), lo cual nos lleva a pensar que los requerimientos para la formación de neuronas es parecido.

Factor	SVZ	Hipocampo	Epitelio olfatorio	Referencias
BDNF	Aumento incorporación de BrdU	Proliferación de células en giro dentado	Sobrevivencia	27,71
CNTF	Proliferación de NPC	Proliferación de NPC	Ausente	11, 17
HB-EGF	Incremento en la neurogénesis	Incremento en la neurogénesis	Ausente	26
EGF	Reduce número de neuronas en bulbo olfatorio	Efecto sobre la proliferación de NPC	Proliferación en células basales horizontales	7, 32
FGF2 y 8	Aumenta número de neuronas en bulbo olfatorio	Efecto sobre supervivencia de NPC	Involucrado en etapas iniciales del proceso neurogénico	26,27, 42,43,62
IGF1	Ausente	Aumento en la neurogénesis	Diferenciación	1, 37, 47
TGF	Aumento en la tasa de neurogénesis	Aumento en la tasa de neurogénesis	Proliferación en células basales horizontales	18
VEGF	Migración	Proliferación	No se ha descrito	12, 24, 25
LIF	Ausente	Ausente	Sobrevivencia	9
TGFβ2	Ausente	Diferenciación	Diferenciación	37,47
GDF11	Ausente	Ausente	Diferenciación	51,57
PDGF	Ausente	Ausente	Sobrevivencia	57
BMP2,4 y 7	Inhibidor de proliferación	Ausente	Involucrado en etapas iniciales del proceso neurogénico	51

Tabla2. Principales factores de crecimiento ubicados en los nichos neurogénicos y su función.

De tal modo en estos nichos existe una gran interacción de factores de crecimiento. Sin embargo, con relación al factor derivado del endotelio vascular (VEGF; por sus siglas en inglés) no se ha descrito su función en el proceso neurogénico del epitelio olfatorio (65).

5. VEGF

El factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) es una familia de glicoproteínas de 40kDa, la cual incluye seis ligandos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento de placenta (PLGF) (48). Estos factores interactúan miembros de la superfamilia de receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTK's). Dentro de estos receptores existen tres capaces de interactuar con el VEGF: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Los VEGF- A, B y PLGF interactuaran con los VEGFR1, VEGF A y E interactuaran con VEGFR2, y VEGF C y D se unirán a VEGFR3.

Los estudios cristalográficos demuestran que el VEGF está compuesto por dos monómeros que se organizan de manera antiparalela formando un dímero, con el sitio de unión al receptor expuesto en los polos de cada dímero (Figura 7). El VEGF usualmente se encuentra presente en forma de homodímeros; empero, se han encontrado heterodímeros en los ligandos VEGF-A y PLGF (48).

La familia de VEGF cuenta con distintas isoformas, esto se debe al proceso de corte y empalme que modifica el número de aminoácidos de la proteína. Haciendo mención directamente sobre el VEGF-A se han encontrado las siguientes isoformas: VEGFA 121, 145, 165, 189 y 206. Estas isoformas delimitan la afinidad al receptor dependiendo de la zona en que se encuentren (65).

Se ha demostrado que los receptores de VEGF pueden ser regulados mediante la cantidad de VEGF; Esto implica una proceso de insensibilización por parte de los receptores que al detectar altos niveles del ligando son internalizados disminuyendo la acción del VEGF (65).

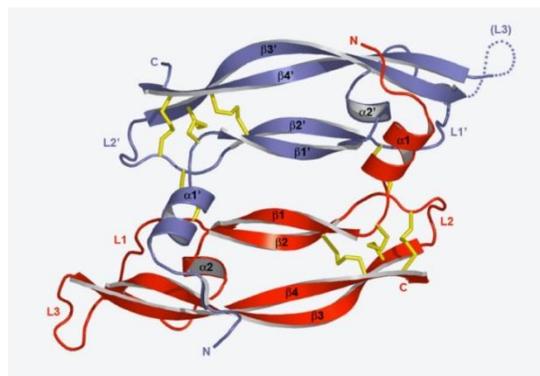


Figura 7. Estructura de dímero de VEGF. Se presenta cada monómero de un solo color y la unión entre dichas moléculas para la formación del homodímeros; Se observa que L3 es el sitio de unión al receptor (Tomado de Mensch und Gesundheit del 2009).

5.1 Receptor de VEGF

Los receptores para VEGF (VEGFR) son miembros de la superfamilia de receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTK's). Los cuales son dímeros conformados por un dominio extracelular de 750 aminoácidos acomodados en 7 inmunoglobulinas, una región transmembranal, un dominio de tirosina-cinasa interrumpido en el aminoácido 70 por un inserto de ácido cinasa y finalmente una cola C-terminal.

Cuando la molécula de VEGF se une con el receptor se produce un cambio conformacional que permite la transfosforilación de los residuos de tirosina, estos actúan como andamios que permiten la activación en cascada de vías de señalización. (3). Una de las características receptores de VEGF es la capacidad de formar heterodímeros entre los receptores 1-2 y 2-3 (Figura 8).

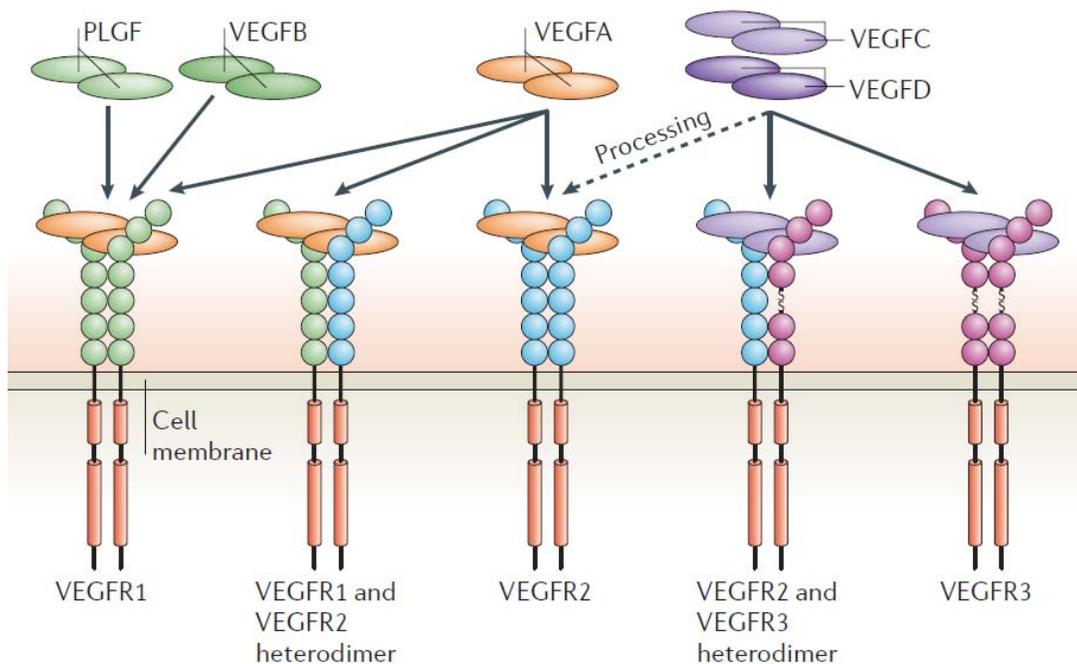


Figura 8. Receptores de VEGF y sus respectivos ligandos. Se observa la interacción de los ligandos con sus respectivos receptores, muestra la formación de heterodímeros de los receptores 1-2 y 2-3 (Tomado de Olsson, et al., 2006).

5.2 Vía de señalización de VEGF

La unión del VEGF con los sus respectivos receptores conlleva a la activación de diversas vías de señalización. Podemos señalar que existen cambios entre las vías que se activan por los receptores VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 (48, 65).

Para el VEGFR1 existe una activación directa para la formación de nuevos vasos sanguíneos; también permite la activación de fosfolipasa C γ (PLC γ ; por sus siglas en inglés) (Figura 9) (48, 65).

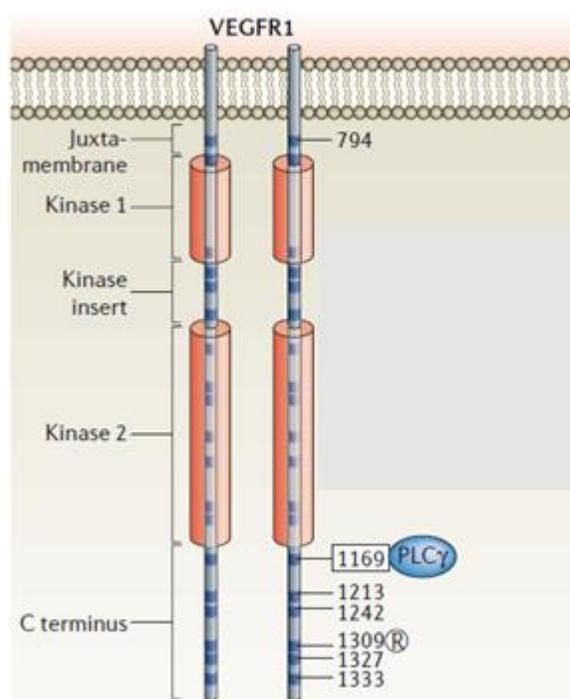


Figura 9. Cascadas activadas por el VEGFR1. El receptor 1 para la molécula de VEGF es capaz de activar la vía de señalización que involucra la PLC γ (Tomado y modificado de Olsson, et al. ,2006).

El VEGFR2 es el receptor que puede activar un mayor número de vías de señalización, entre estas vías se encuentra la ruta que involucra a PI3K-AKT, la cual es capaz de favorecer la supervivencia, la permeabilidad y la migración. El VEGFR2 también tiene una comunicación directa con la proteína cinasa de adhesiones focales (FAK; por sus siglas en inglés) y paxilinas, las cuales actúan directamente sobre la migración promoviendo los cambios y rearrreglos de filamentos de actina. Finalmente y no menos importante tenemos las vías de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK; por sus siglas en inglés) y de a

fosfolipasa C γ (PLC γ ; por sus siglas en inglés) las cuales pueden favorecer la proliferación (Figura 10) (48, 65).

Vía de señalización de VEGF

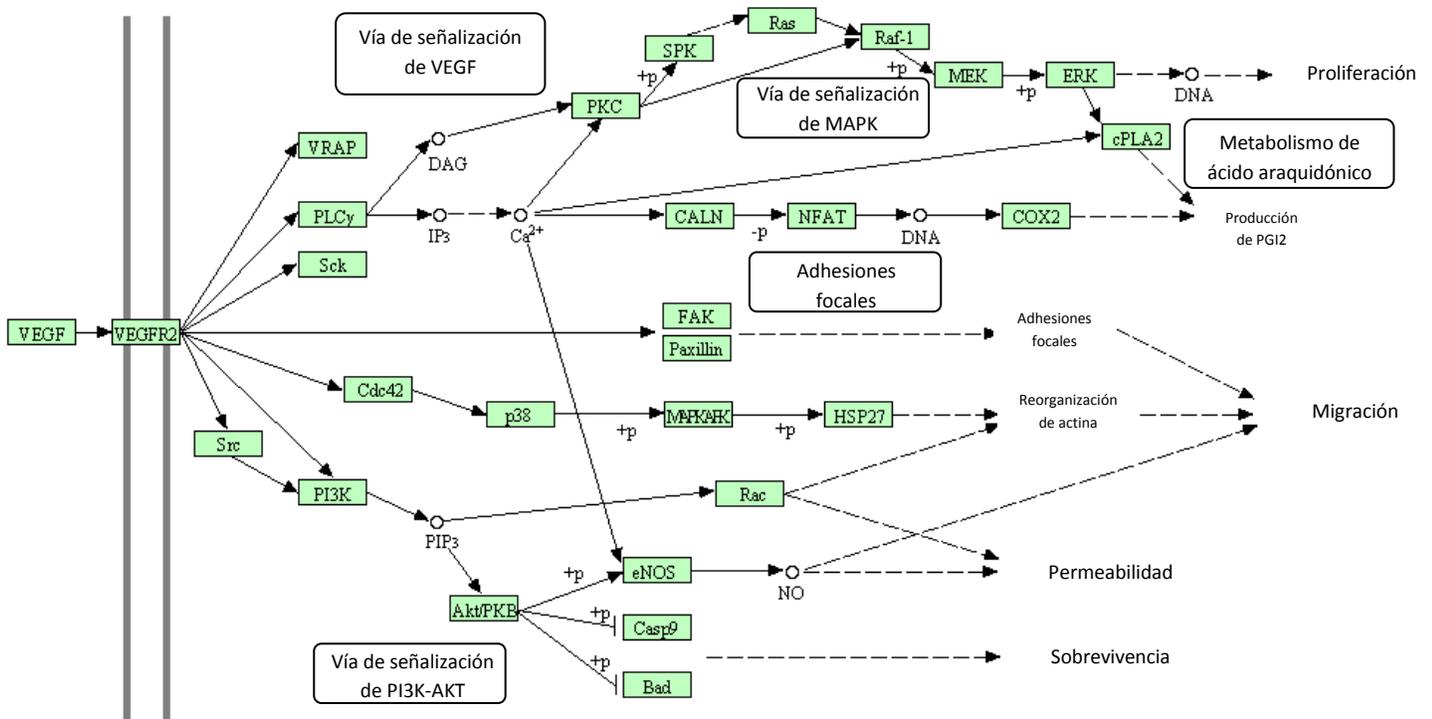


Figura 10. Vías de señalización activadas por VEGFR2. Receptor modulador de las vías de señalización tales como PI3K-AKT, MAPK y PKC (Tomado y modificado de Karehisa Laboratories, 2006).

Finalmente VEGFR3 está vinculado con la linfogénesis y la vasculogénesis y tiene la capacidad de activar PI3K/AKT y la vía de las MAPK (Figura 11).

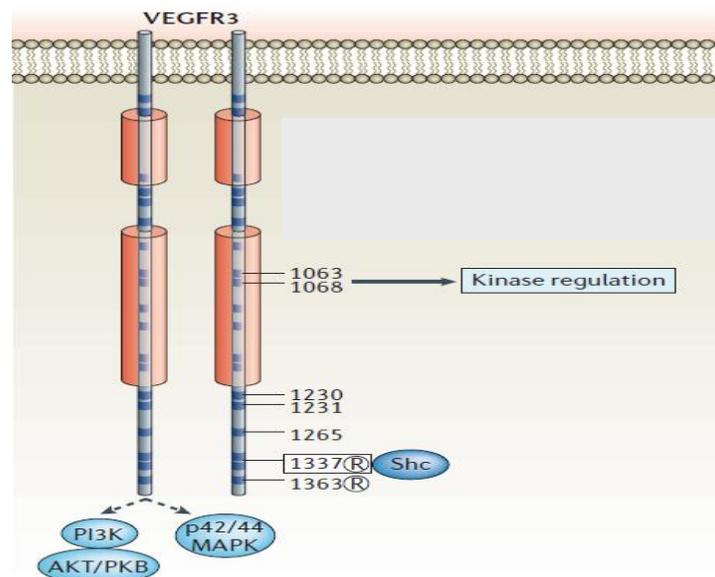


Figura 11. Receptor 3 de VEGF y las vías involucradas. Dentro de las vías que se pueden ver activadas por VEGFR3 se encuentra AKT y MAPK (Tomado de Olsson et al., 2006).

5.3 VEGF en el sistema nervioso central

En las primeras investigaciones realizadas a inicio de la década de los noventas se demostró que la familia de VEGF estaba directamente vinculada con la vasculogénesis y la angiogénesis (5,48). Sin embargo, estudios recientes se ha demostrado que el VEGF A, B y C presentan efectos positivos en el cerebro de los mamíferos, tales como: proliferación, migración, diferenciación y supervivencia tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta (65) (Tabla 3).

Tipo celular	Tipo VEGF	Efecto	Referencias
Neuronas	VEGF-A, VEGF -B	Maduración dendrítica Supervivencia Aumento de tamaño celular Crecimiento axonal Efecto neuroprotector	24, 25, 26,53
Oligodendrocitos	VEGF-A	Migración	5, 28
Precusores neuronales	VEGF-A, VEGF-B	Proliferación	61
Astrocitos	VEGF-A	Proliferación Aumento en la expresión de bFGF (basic fibroblast growth factor)	35

Tabla 3. Función de VEGF sobre células del sistema nervioso central.

Además del efecto directo que presenta el VEGF sobre células del sistema nervioso, es importante resaltar el aumento que tiene la expresión de VEGF en zonas neurogénicas. En este sentido, se ha reportado que las células multipotenciales con característica de glía radial presentan un aumento en la expresión de VEGF-A (41). A su vez otro estudio demuestra que hay un aumento en la expresión y liberación de VEGF por parte de precursores neuronales de hipocampo, de la zona subventricular y del bulbo olfatorio. Finalmente y haciendo énfasis a la parte del nicho neurogénico, las células endoteliales y gliales que componen las zonas neurogénicas favorecen la liberación de VEGF, FGF y BDNF (25,41, 71). Este último ha sido demostrado como un importante factor que trabaja en conjunto con VEGF (64)

6. Justificación

Investigaciones del factor derivado del endotelio vascular (VEGF) muestran que se encuentra presente en las zonas neurogénicas (41), y que es capaz de efectuar cambios en las células del sistema nervioso tales como migración de los precursores neuronales a lo largo de la cadena rostral migratoria (65), la proliferación y supervivencia de precursores neuronales de hipocampo (26,27, 46). Para llevar a cabo sus funciones el VEGF actúa a través de receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTKs) activando distintas vías de señalización. Si bien el VEGF actúa como un factor que regula diferentes etapas del proceso neurogénico en el hipocampo y en el sistema de la zona subventricular-bulbo olfatorio, la función de éste factor en la región neurogénica periférica del epitelio olfatorio no se conoce y sólo se ha sugerido un papel relevante en la generación de neuronas (23). Dado que el VEGF participa en la regulación del proceso neurogénico que se lleva a cabo a nivel central, en este trabajo se estudió el papel de éste factor sobre diferentes eventos involucrados en la generación de neuronas en el epitelio olfatorio.

7. Hipótesis

El VEGF modificara la proliferación, migración o supervivencia de los precursores neuronales del epitelio olfatorio para favorecer el proceso neurogénico.

8. Objetivo General

Evaluar el efecto del VEGF sobre la proliferación, supervivencia o migración de los precursores neuronales del epitelio olfatorio *in vitro*.

8.1 Objetivos particulares:

1. Identificar los progenitores neuronales de epitelio olfatorio *in vitro*.
2. Determinar la presencia del receptor tipo 2 de VEGF en los progenitores neuronales del epitelio olfatorio.
3. Determinar la viabilidad de las células precursoras expuestas a distintas concentraciones de VEGF.
4. Evaluar cambios en la proliferación, supervivencia y migración de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF.
5. Determinación del mecanismo de acción del VEGF.

9. Metodología

9.1 Obtención y cultivo de precursores neuronales de epitelio olfatorio

Los precursores neuronales del epitelio olfatorio se obtuvieron con base a lo reportado por Benítez King y colaboradores (2011). El cual consiste en un exfoliado de la región anterior de los turbinados mediales laterales mediante el uso de un cepillo especial de 2.4 cm de largo y 3 mm de diámetro. El exfoliado se coloca en DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4mM L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 IU/ml de penicilina. Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, entonces desprendieron con tripsina. Las células se cultivaron 37° C, en DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL), 4 mM l-glutamine, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 IU/ ml de penicilina.

9.2 Identificación de precursores neuronales

Para caracterizar los precursores neuronales se realizó una inmunofluorescencia con el marcador característico de progenitores neuronales, tubulina beta III y el marcador de proliferación Ki-67 (47).

Las células se sembraron en placa de cuatro pozos (1.5cm^2) a una densidad de 5,000 células por centímetro cuadrado, en medio con y sin suero fetal bovino (Figura 12), tomando en cuenta los trabajos de McCurdy et al. Del 2005 (47). Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se realizaron varios lavados seguidos de la permeabilización mediante Triton-X-100 al 0.1%. La fase de bloqueo se realizó utilizando albúmina sérica de bovino (BSA; por sus siglas en inglés) al 1% durante treinta minutos; luego se agregaron los anticuerpos anti-tubulina β III de ratón, en una concentración 1:2000 y anti-Ki-67 de rata, en una concentración 1:250 (Sigma) diluidos en BSA al 1% durante toda la noche, después se agregaron los anticuerpos secundarios floreceinados anti ratón y anti rata en una concentración 1:200 por 2 horas y finalmente se marcaron los núcleos con DAPI (Figura 12).

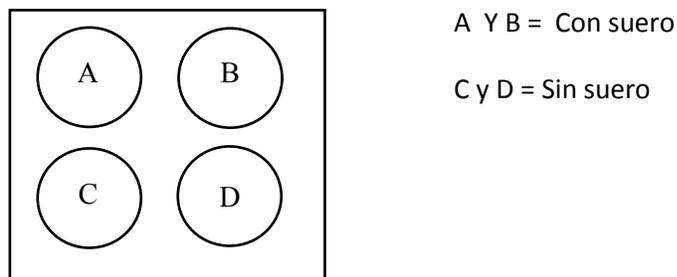


Figura 12. Sembrado en placa de cuatro pozos por duplicado.

9.3 VEGFR2 en precursores neuronales de epitelio olfatorio

Como se mencionó anteriormente se sabe que el VEGF actúa mediante receptores tipo RTK y que esta vía de acción con lleva a una cascada de señalización que tiene como resultado distintos efectos a nivel celular. Uno de los principales receptores descritos en precursores neuronales del sistema nervioso central es el receptor tipo 2 de VEGF (Flk-1) (64). Nosotros demostramos que dicho receptor se encuentra en los precursores neuronales de epitelio olfatorio mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Para esta inmunofluorescencia se sembraron precursores en una placa de cuatro pozos, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se realizaron varios lavados seguidos de la permeabilización mediante tritón-X-100 al 0.1%. La fase de bloqueo se hizo utilizando BSA al 1% durante treinta minutos seguido del anticuerpo anti-Flk-1 de rata diluido en BSA 1% durante toda la noche a las siguientes concentraciones: 0, 1:200, 1:250 y 1:500. Al día siguiente se agregó el anticuerpo secundario anti-rata fluoresceinado a una concentración 1:250 durante 2 horas; Seguido de tinción de núcleos mediante DAPI por cinco minutos. Finalmente la muestra se montó en PVA-DABCO en un cubre objetos y se observó en un microscopio de fluorescencia Nikon.

9.4 Condiciones experimentales para determinar el efecto del VEGF en células precursoras del epitelio olfatorio

Una vez demostrada la presencia del receptor procedimos a determinar las condiciones de experimentación:

- 1.- **Grupo control 1:** Células precursoras del epitelio olfatorio cultivadas en DMEM/F12 suplementado con suero fetal de bovino al 10%.
- 2.- **Grupo experimental 1:** Células precursoras del epitelio olfatorio cultivadas en DMEM/F12 suplementado con suero fetal de bovino al 10% más las diferentes concentraciones de VEGF.
- 3.- **Grupo control 2:** Células precursoras del epitelio olfatorio cultivadas en DMEM/F12 en ausencia de suero fetal bovino.
- 4.- **Grupo experimental 2:** Células precursoras del epitelio olfatorio cultivadas en DMEM/F12 más las diferentes concentraciones de VEGF en ausencia de suero fetal bovino.

9.5 Determinación de la viabilidad de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF

Con el fin de evaluar el efecto del VEGF (VEGF human Peptide México 110-20A) sobre la viabilidad de los precursores neuronales del epitelio olfatorio se utilizó con un estuche comercial que evalúa la actividad mitocondrial de las células (WST-1 Millipore #2210). Las células precursoras del epitelio olfatorio se sembraron en una concentración de 5,000 células por cm^2 y se incubaron con diferentes concentraciones de VEGF durante 48 horas; Las concentraciones que se utilizaron son las siguientes: 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml y 500 ng/ml (Figura 13).

Una hora antes de finalizar el tiempo de incubación con el VEGF, se adicionaron 10 μ l del reactivo WST-1. Una hora después se midió la absorbancia a una longitud de onda 480 nm en un lector para ELISA de BioTek.

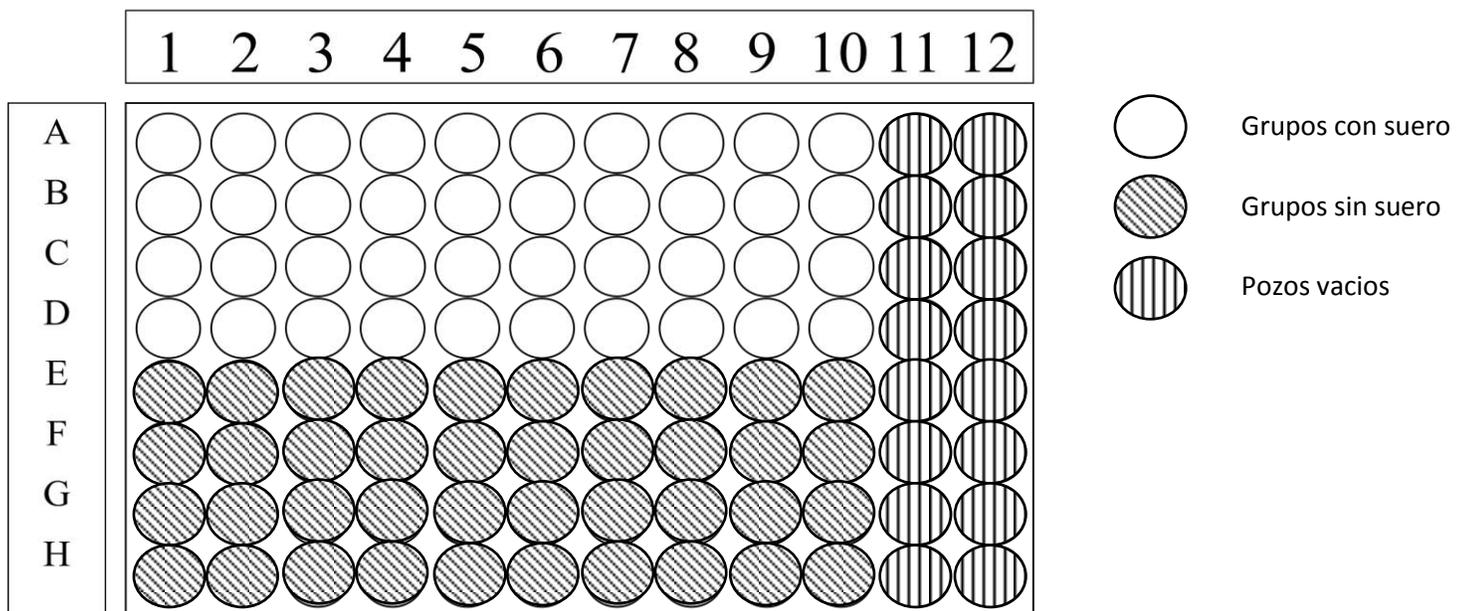


Figura 13. Diagrama de placa de 96 pozos para prueba de viabilidad mediante estuche comercial WST-1. Se presentan las concentraciones 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml y control positivo con suero y sin suero, acomodadas de las columnas del 1 a la 10 respectivamente. A su vez se presentan los grupos de condiciones con y sin suero.

9.6 Evaluación de la proliferación de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF

Otro punto importante que se evaluó fue el efecto del VEGF sobre la proliferación de los precursores razón por la cual se utilizó el estuche comercial 5' Bromo 2' deoxyuridin (BrdU) (Roche 444 611), el cual actúa marcando el DNA gracias a la inserción del análogo de timidina y que permite su detección. Para esto se evaluó el posible efecto de VEGF en un tratamiento crónico a 48 y 96 horas.

Para los tratamientos, tanto el de 48 horas como el de 96 horas, los precursores de epitelio olfatorio se sembraron en una densidad de $5,000\text{ cm}^2$ y se cultivaron a diferentes concentraciones de VEGF (0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml y 500 ng/ml) (Figura 14). Dos horas antes de finalizar el tiempo de incubación se agregaron $10\text{ }\mu\text{l}$ de BrdU. Transcurrido este tiempo se agregaron $200\text{ }\mu\text{l}$ de *precooledfixative* durante 30 minutos, seguido de $100\text{ }\mu\text{l}$ de nucleasas durante 30 minutos. El siguiente paso fue agregar $100\text{ }\mu\text{l}$ de anticuerpo anti-BrdU-POD durante 30 minutos. Por último se agregaron $100\text{ }\mu\text{l}$ de POD (substrato para peroxidasa) durante 15 minutos. Realizado lo anterior se midió la absorbancia a una $\lambda\text{ }420\text{nm}$ en un lector para ELISA de BioTek.

Cabe mencionar que el tratamiento evaluado a las 96 horas solo se realizó en la condición experimental sin suero, debido a que el suero mantendría constante la condición durante este tiempo.

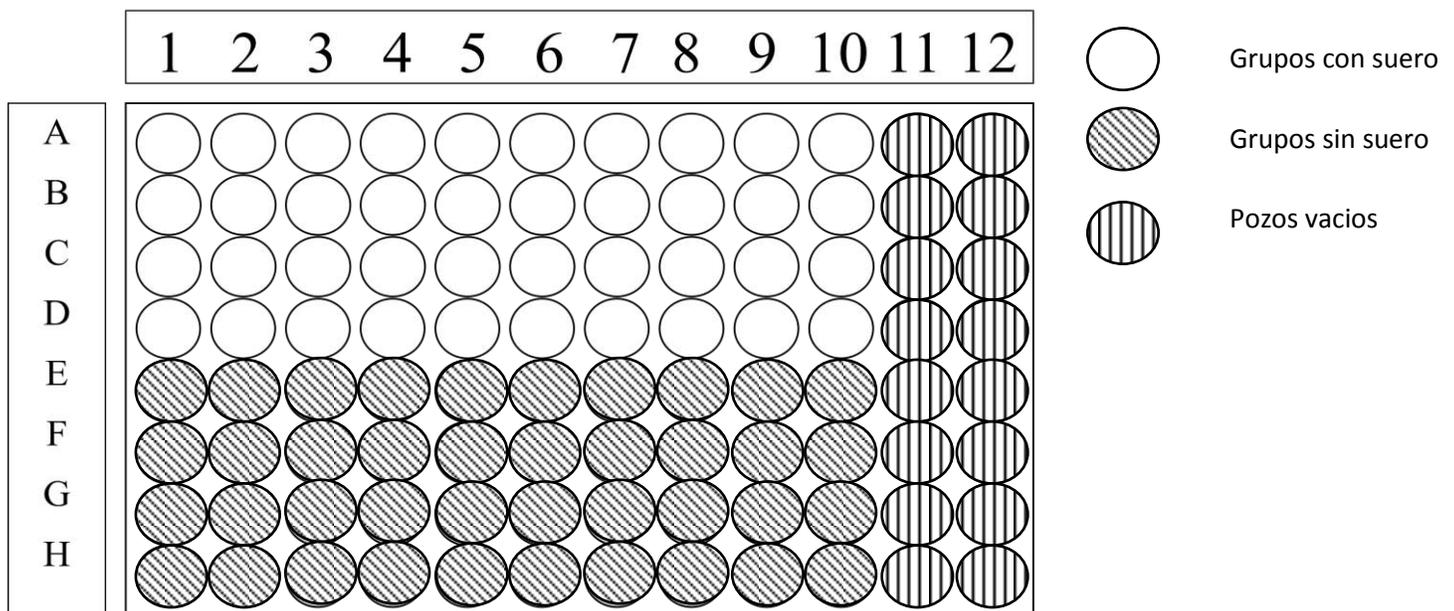


Figura 14. Diagrama de placa de 96 pozos para proliferación mediante técnica de BrdU. Se presentan las concentraciones 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml y control positivo con suero y sin suero, acomodadas de las columnas del 1 a la 10 respectivamente. A su vez se presentan los grupos de condiciones con y sin suero.

9.7 Evaluación de la indirecta de la supervivencia de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF

Con base a lo reportado el VEGF repercute a nivel de supervivencia razón por la cual también se evaluó este efecto sobre los precursores neuronales de epitelio olfatorio, para dicho análisis se volvió a utilizar el estuche comercial 5' Bromo 2' deoxiuridina (BrdU) (Roche- 444 611).

En este caso las células se sembraron a una densidad de 5, 000 cm^2 , posteriormente se cultivaron durante 96 horas a distintas concentraciones de VEGF (0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml y 500 ng/ml) (Figura 15), teniendo un cambio de medio con renovación de concentraciones de VEGF a las 48 horas. Para este experimento se realizó el marcaje de las células con BrdU al inicio del tratamiento. El marcaje se hizo durante las dos primeras horas y posteriormente el medio que contenía a la BrdU se sustituyó por medio sin BrdU. De tal modo que aquellas células que incorporaron al análogo de la timidina, fueron identificadas a las 94 del tratamiento contantes con VEGF. Para el análisis de incorporación de BrdU se realizó el mismo protocolo que se describió en el apartado anterior (Figura 15).

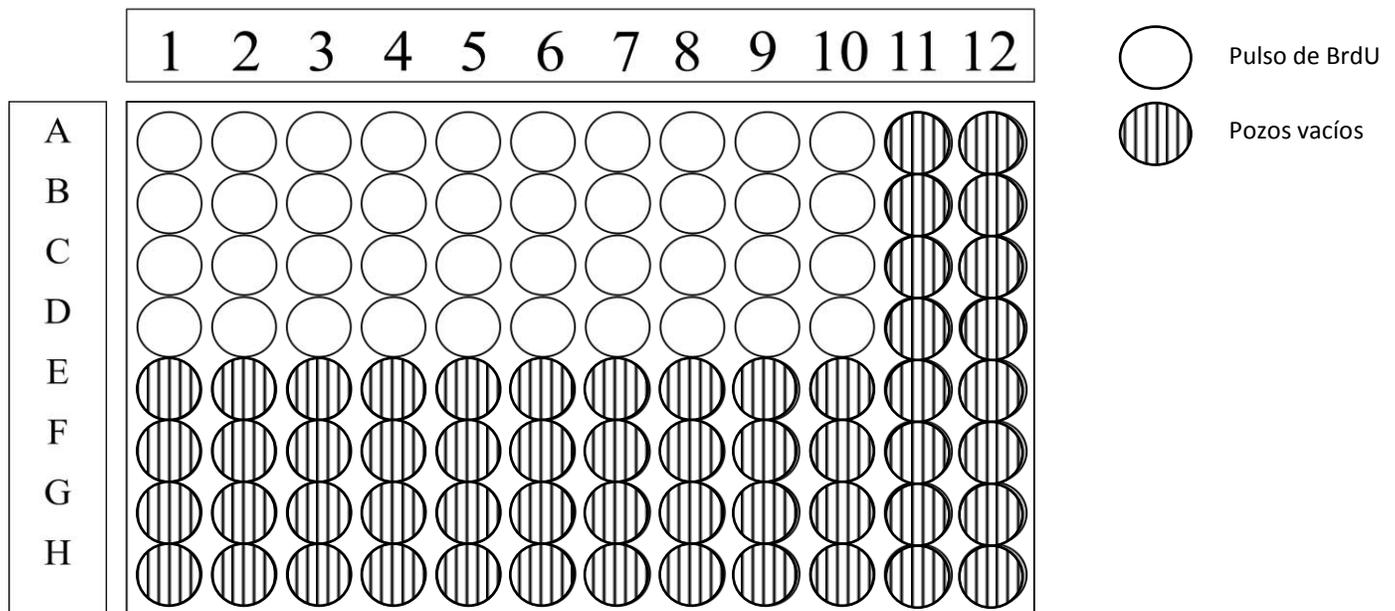


Figura 15. Diagrama de placa de 96 pozos para supervivencia mediante técnica de BrdU. Se presentan las concentraciones 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml acomodadas de las columnas del 1 a la 10 respectivamente..

9.8 Evaluación de la migración celular de los precursores neuronales expuestos a distintas concentraciones de VEGF

Otro punto a evaluar fue el efecto del VEGF a nivel de la migración de los precursores neuronales de epitelio olfatorio. Para poder evaluar dicho proceso se conto con el uso de insertos (Platypus), los cuales son estructuras de plástico que se acoplan a la palca de 96 pozos y nos permitieron cubrir un área de 3.1 mm^2 . Para poder ajustar un modelo de migración adecuado se realizo una curva temporal; Sembrando 7,500 células por pozo con los insertos previamente colocados se dejaron incubar por 96 horas. Pasado este tiempo los insertos fueron retirados y se realizo un cambio de medio y una vez que se retiraron los insertos se tomaron las fotos considerándolas como el tiempo cero. A partir de este momento se tomaron fotos cada 24 horas hasta tener cubierta el área indicada. Durante la toma de fotos se realizo un cambio de medio a las 48 horas del inicio del experimento. Se analizo el área mediante el programa ImageJ.

Para ajustar este modelo de migración de manera porcentual se instauró la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de migración} = \left(\frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área inicial}} \right) \times 100$$

Donde el área inicial corresponderá a los 3.1 mm^2 de los insertos utilizados, el área final corresponderá al área cuantificada, mediante ImageJ, del espacio abarcado por las células durante las 96 horas del experimento.

Teniendo como base nuestros resultados que demuestran que no hay cambios en la proliferación dependiendo de las concentraciones de VEGF. Podemos asegurar que el área ocupada por los precursores está dada por la migración y no por la división celular.

Teniendo ya establecido el modelo de migración procedimos a su aplicación con las concentraciones de VEGF (0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml y 500 ng/ml). Teniendo un cambio de medio con renovación de concentraciones de VEGF a las 48 horas (Figura 16).

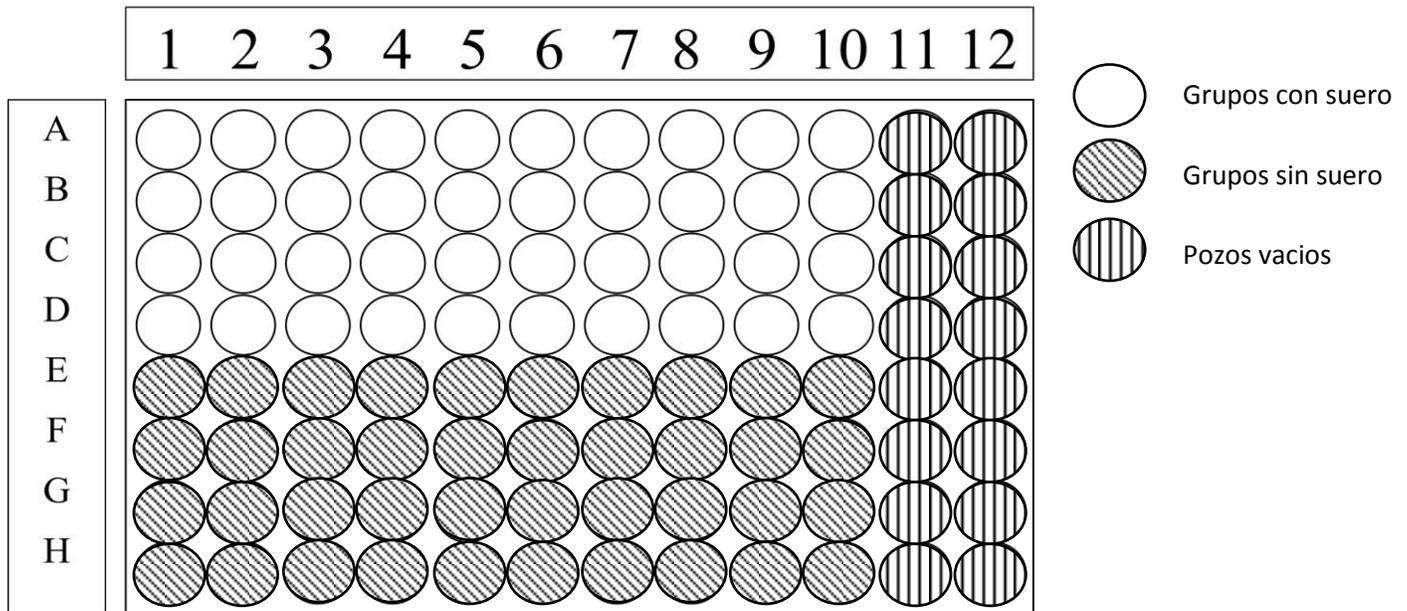


Figura 16. Diagrama de placa de 96 pozos para pruebas de migración. Se presentan las concentraciones 0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml y control positivo con suero y sin suero, acomodadas de las columnas del 1 a la 10 respectivamente. A su vez se presentan los grupos con y sin suero.

9.9 Vía de acción del VEGF en precursores neuronales de epitelio olfatorio

Ya teniendo delimitado el efecto que presenta el VEGF sobre los precursores neuronales de epitelio olfatorio y a su vez contando con las concentraciones efectivas (0.5 ng/ml y 5 ng/ml) y los tiempos donde se presentaron los mayores cambios a nivel de migración (48 horas) evaluamos algunas vías de señalización mediante las cuales el VEGF puede actuar. Para esto realizamos un bloqueo de los receptores de VEGF mediante el inhibidor DMH4 (Sigma # D8696) a la concentración de 0.5 μ M; A su vez realizamos un bloqueo con bisindoleilmaleimida a una concentración de 400nM para bloquear a la proteína cinasa C. El inhibidor LY 294002 a una concentración de 1.4 nM para bloquear PI3K. El inhibidor SB a 170 nM para bloquear MAPK 1/2 y Y8296 a 170 nM para bloquear a la proteína Rac. Cabe mencionar que como vehículo se utilizó el dimetil sulfóxido (DMSO) (Figura 17).

Las placas fueron sembradas a una concentración de 7,500 células por pozo en presencia de insertos de 3.1 mm^2 . Se tomaron los mismos criterios que en el apartado de migración para la toma de fotos.

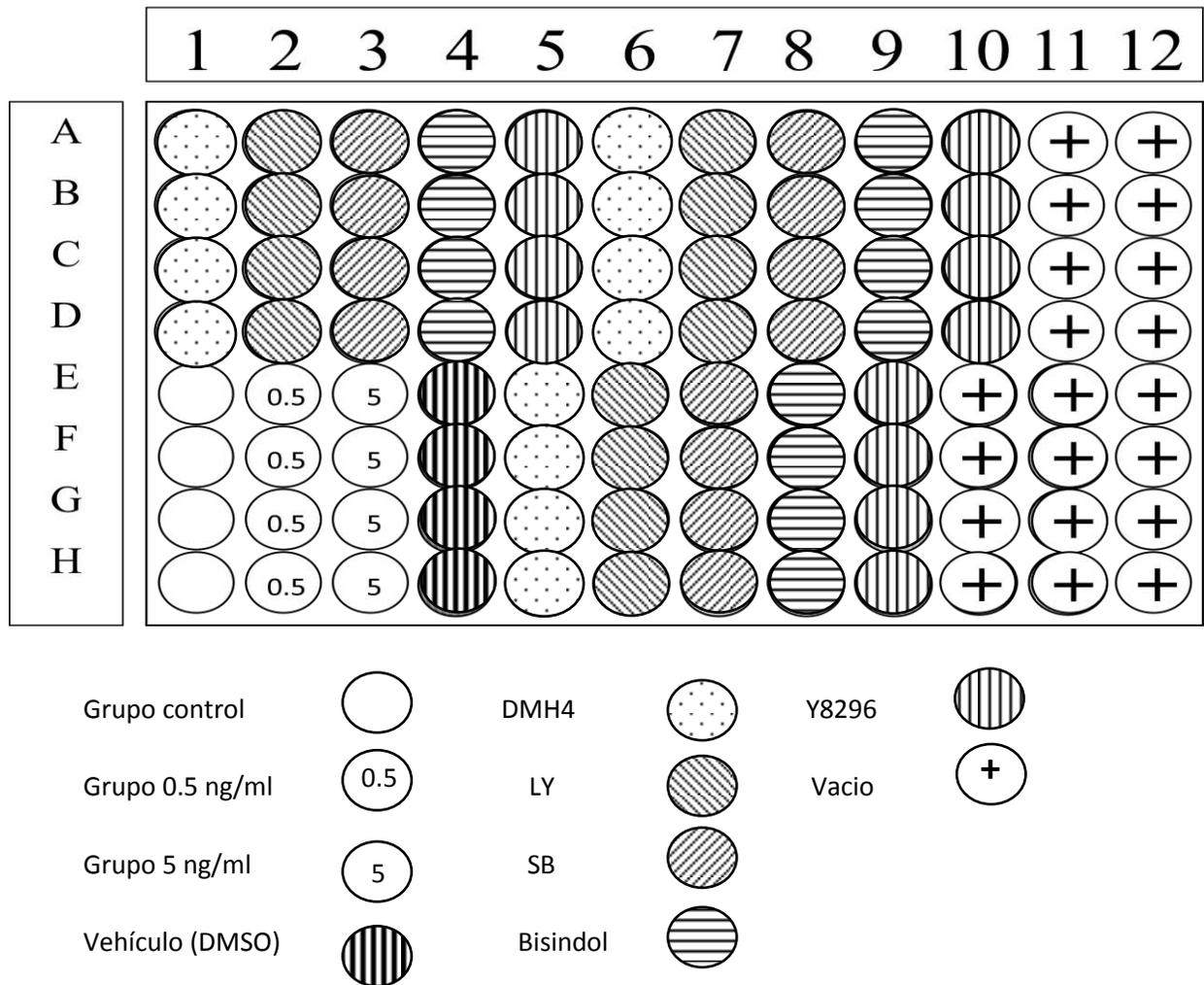


Figura 17. Placa de 96 pozos para inhibición de vías de señalización. Dicha placa se aplica para la condición sin suero y con suero. Los bloques de las filas A-D incluirán VEGF. De las columnas 1 a la 5 se agregara VEGF a 0.5 ng/ml y de las columnas 6-10 se agregara VEGF a 5 ng/ml

9.10 Análisis de vinculina de los precursores neuronales por efecto de VEGF

Teniendo ya delimitado las vías de señalización que rio abajo son capaces de modular el efecto del VEGF sobre la migración de las células y teniendo en cuenta que la vinculina es una proteína presente en los puntos focales y en las adhesiones focales. Decidimos evaluar los cambios que se presentan en esta proteína por inmunofluorescencia. Para ello sembramos en placa de 96 pozos células a una concentración de 7,500 y colocando los insertos con un área de de 3.1 mm².

Al inicio del experimento se agregaron las concentraciones de VEGF (0.5 ng/ml y 5 ng/ml) y de los inhibidores (DMH4, LY y Bisindol) por 48 horas, posteriormente fueron fijadas con formaldehído al 4% , se realizaron varios lavados seguidos de la permeabilización con tritón-X-100 al 0.1%. La fase de bloqueo se hizo utilizando BSA al 1% durante treinta minutos seguido del anticuerpo antivinculina de ratón (Santa Cruz) diluido en BSA al 1% toda la

noche a una concentración (1:200). Al día consecutivo se agregó el anticuerpo secundario fluoresceinado anti-ratón a una concentración 1:250 junto a faloidina rodaminada a una concentración de 40 ng/ml durante 2 horas; Seguido de tinción de núcleos mediante DAPI por cinco minutos. Finalmente se montó PVA-DABCO y se observó en microscopio de fluorescencia *Nikon* (Figura 18).

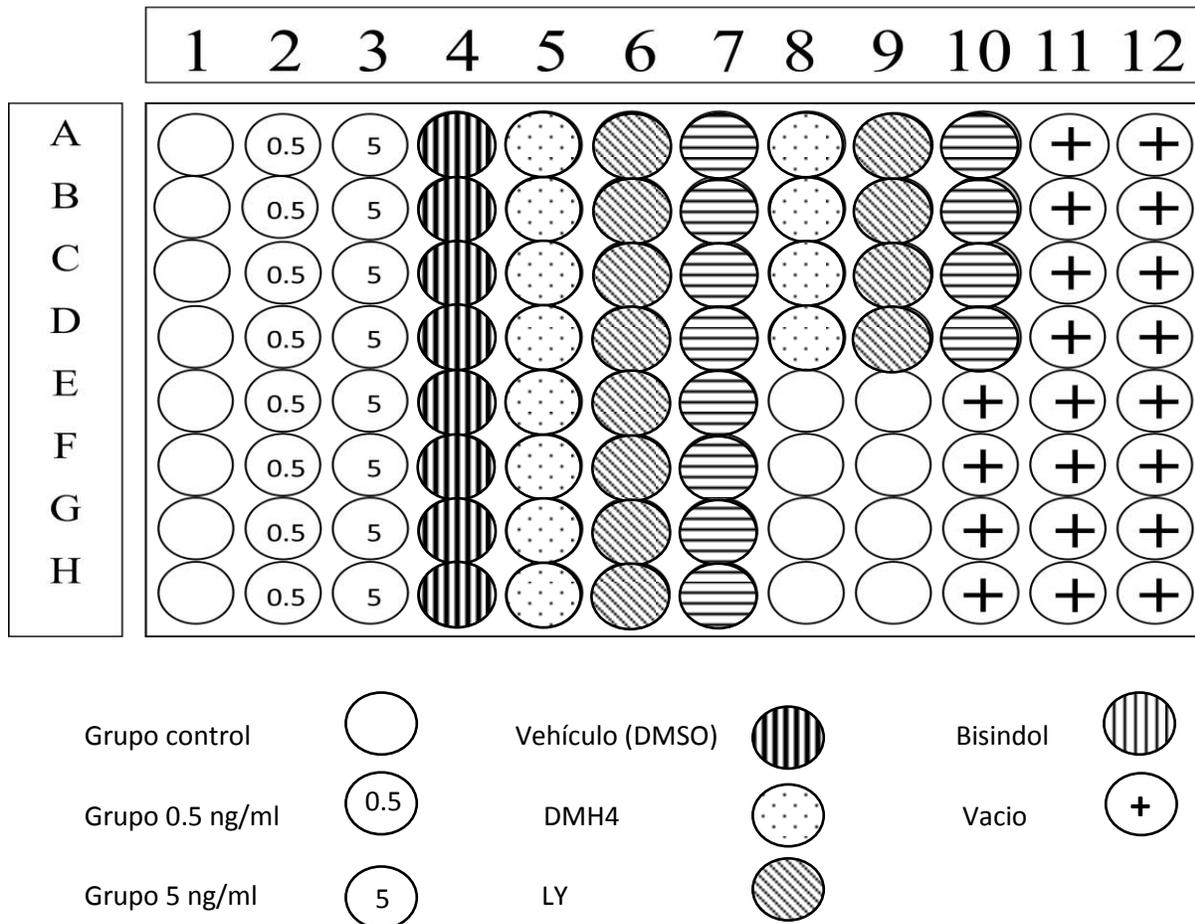


Figura 18. Placa de 96 pozos para inhibición de vías de señalización. Dicha placa se aplica para la condición sin suero y con suero. Los bloques de las filas A-D incluirán VEGF. De las columnas 1 a la 5 se agregara VEGF a 0.5 ng/ml y de las columnas 6-10 se agregara VEGF a 5 ng/ml. Para mayor facilidad de trabajo se sigue el patrón señalado en la imagen.

Para la cuantificación de vinculina se realizó tomando tres categorías: Vinculina total, focos de adhesión y puntos de adhesión. La primera categoría incluiría todo el marcaje positivo en la célula, los focos de adhesión incluiría a partículas con un tamaño mayor a 6 μm de largo. Finalmente los puntos de adhesión sería todo aquel marcaje menor a 6 μm . Esto se debe a que un tamaño aproximado a 6 μm compone un foco de adhesión el cual permitirá la capacidad de estar fijo en algún sustrato (51).

9.11 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por cuadruplicado y las gráficas presentadas son ensayos representativos. Todos los gráficos y análisis de datos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 5. Presentando los resultados de experimento representativo de cuatro experimentos en media \pm error estándar. Para establecer comparaciones entre grupos se realizaron ANOVA de una o dos vías seguidos de las pruebas, con post-hoc de Tukey o Bonferroni con un grado de significancia de $P \leq 0.05$.

10. Resultados

El primer objetivo, que se realizó fue una inmunofluorescencia para corroborar la expresión del marcador de células de linaje neuronal y no diferenciación mediante el marcador Beta tres tubulina y el marcador de proliferación de proliferación Ki-67 y el marcaje de núcleos con DAPI, para condiciones con suero y sin suero (Figura 19). Estos resultados nos muestran el linaje neuronal de las células cultivadas en presencia de suero así como en la ausencia del mismo, también se observa que las células presentan capacidad proliferativa, ya que siguen en fase S debido a la presencia del marcador Ki-67. Se observa una tendencia a aumentar el número de células en proliferación en el grupo en presencia de suero.

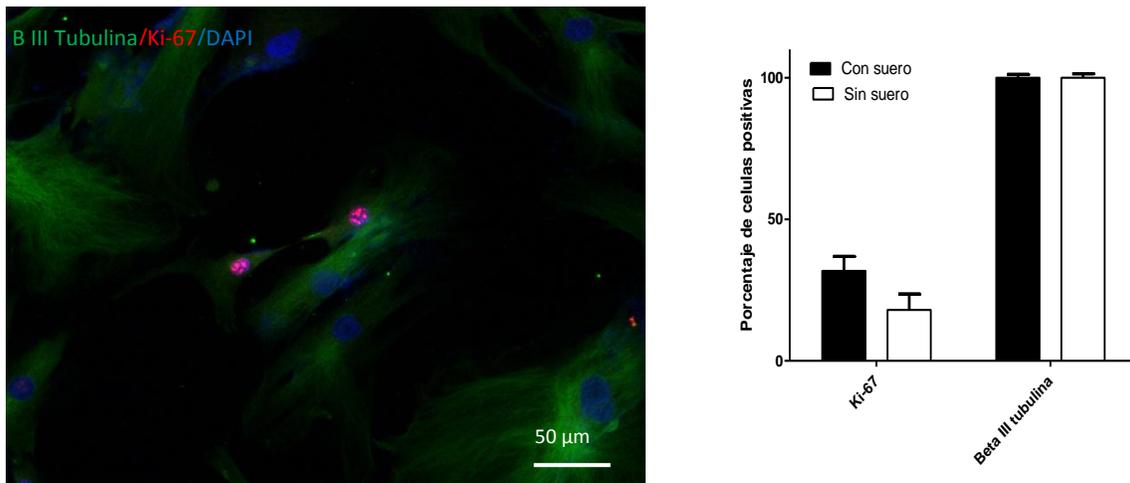


Figura 19. Caracterización de células precursoras de epitelio olfatorio. A Imagen de inmunofluorescencia de Ki-67 (rojo), Beta III tubulina (verde) y DAPI (azul). B Grafica de porcentaje Ki-67y Beta III tubulina en condiciones con y sin suero (media \pm EE).

Posteriormente se analizó la presencia del receptor tipo 2 de VEGF (VEGFR2) en las células precursoras del epitelio olfatorio. Es importante destacar que el VEGFR2 es el receptor de VEGF más común en células de sistema nervioso (65). El análisis por microscopia de fluorescencia nos permitió encontrar que el VEGFR2 está presente en las células precursoras del epitelio olfatorio (Figura 20).

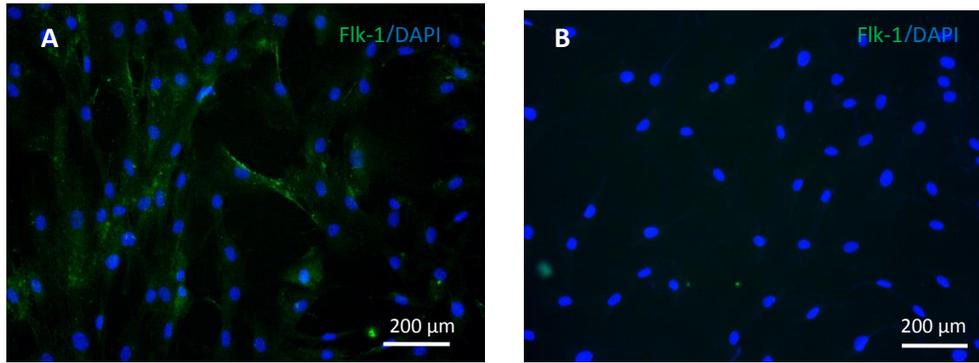


Figura 20. Receptor Flk-1 en células precursoras de epitelio olfatorio. A) células con marcador anti-Flk-1 (verde) y núcleos marcados con DAPI (azul); B) Control negativo el cual no se le adiciono el anticuerpo específico para VEGFR2 y solo el anticuerpo secundario (verde) y núcleos fueron marcados con DAPI (azul).

Nuestros primeros experimentos sobre los precursores mostraron la viabilidad las células al ser incubadas con las diferentes concentraciones de VEGF. Los resultados demostraron que en las dos condiciones (con suero o sin suero), o en presencia de VEGF no se presentaron cambios significativos en la viabilidad celular (Media \pm EE, 100% es la media del control, ANOVA y post-hoc de Tukey con un valor de $p \leq 0.05$) (Figura 21).

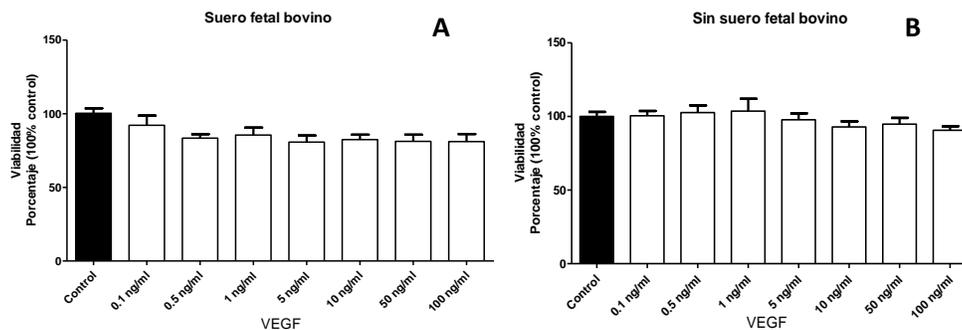


Figura 21. Ensayo de viabilidad para células precursoras de epitelio olfatorio bajo distintas concentraciones de VEGF. A) Experimento para la condición con suero donde no se observan cambios significativos entre los grupos (media \pm EE, 100% es la media del control) B) Experimentos para la condición sin suero sin cambios significativos entre los grupos (media \pm EE, 100% es la media del control). Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía Post-hoc Tukey $p (\leq 0.05)$.

Posteriormente procedimos a analizar si el VEGF es capaz de modificar la proliferación celular determinada mediante la incorporación de BrdU a las 48 horas posteriores de tratamiento. Encontramos que el VEGF no es capaz de modificar la proliferación celular de los precursores neuronales en presencia o en ausencia de suero (Media \pm EE, 100% es la media del control, ANOVA y post-hoc de Tukey con un valor de $p \leq 0.05$) (Figura 22 A y B).

Por otro lado, exploramos si existían células del epitelio olfatorio en proliferación después de haber sido cultivadas únicamente con VEGF durante 96 horas. Para esto, el marcaje con BrdU

se realizó al final del tratamiento. Los resultados indicaron que el tratamiento crónico con VEGF a las 96 horas tampoco modificó la proliferación celular aún y cuando el VEGF causa un ligero aumento con las concentraciones de 1 ng/ml y de 500 ng/ml (Figura 22-C).

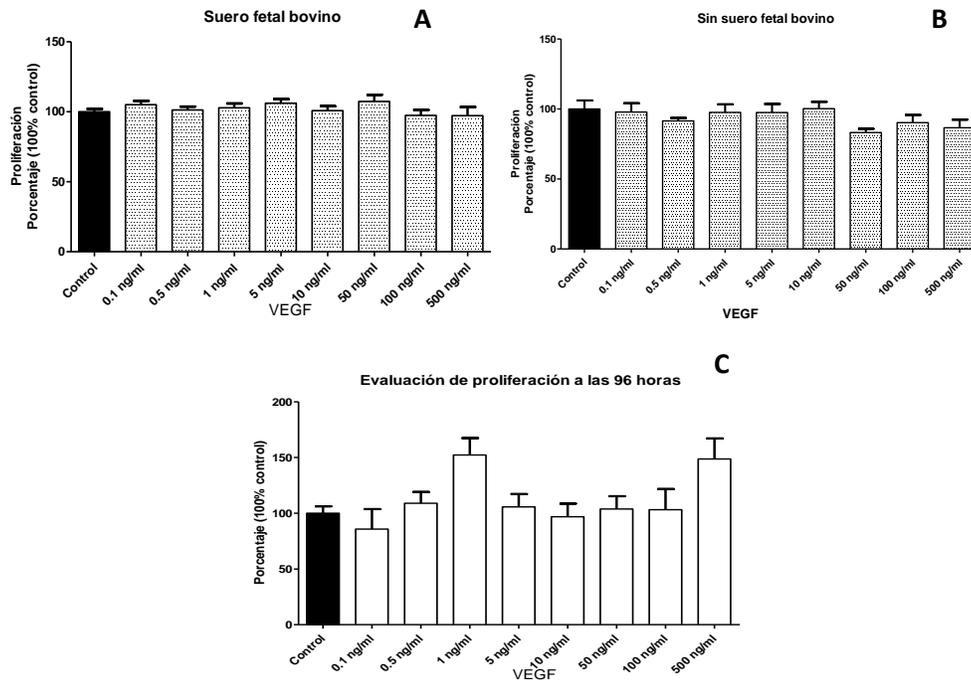


Figura 22. Ensayos de proliferación. A) Experimento para la condición con suero a 48 horas donde no se observan cambios significativos entre los grupos. B) Experimentos para la condición sin suero a 48 horas con tendencias a disminuir en las concentraciones más elevadas pero sin cambios significativos entre los grupos. C) Pulso de BrdU pasadas 96 horas en tratamientos con VEGF, no se observan cambios significativos

Una vez que encontramos que el VEGF no afecta la proliferación, ni la viabilidad de las células precursoras del epitelio olfatorio a las 48 horas de tratamiento, se procedió a estudiar la supervivencia de una población celular marcada con BrdU antes del inicio del tratamiento con VEGF tal y como lo describimos en los métodos. Los resultados obtenidos muestran una constante en el porcentaje de células marcadas al inicio de los tratamientos, es decir, que no es capaz de promover la supervivencia de los precursores neuronales que incorporaron la BrdU al inicio del experimento (Media \pm EE, 100% es la media del control, ANOVA y post-hoc de Tukey con un valor de $p \leq 0.05$) (Figura 23).

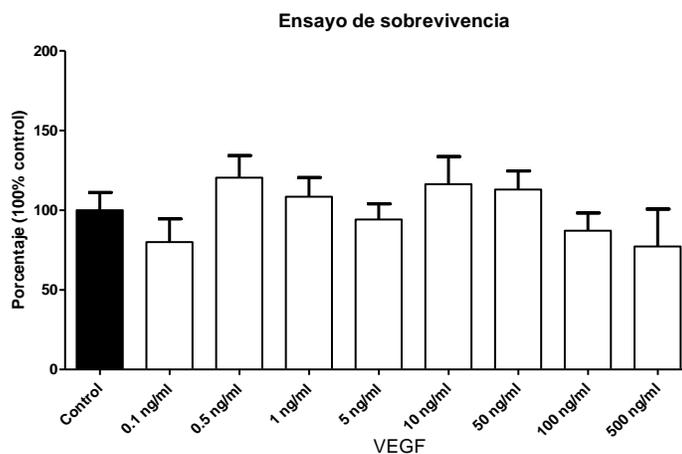


Figura 23. Ensayo de sobrevivencia para células precursoras de epitelio olfatorio bajo distintas concentraciones de VEGF. El BrdU se colocó al inicio de los tratamientos de 96 horas, muestra un comportamiento regular sin cambios significativos. Los datos se representan en media \pm EE, donde el 100% es la media del control, se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía Post-hoc Tukey $p (\leq 0.05)$.

Durante la neurogénesis del epitelio olfatorio se ha descrito la migración de las células precursoras, este evento de la neurogénesis es un proceso que conlleva cambios a nivel de citoesqueleto y la dinámica en la formación de las adhesiones focales (70,72). De manera consecutiva se realizaron experimentos para determinar si el VEGF es capaz de modificar la migración de los precursores neuronales del epitelio olfatorio. Con la finalidad de validar el ensayo de migración, se realizó un experimento previo para determinar el tiempo en el cual el área de migración estaría cubierta en su totalidad. Así mismo, corroborar que la aplicación de la fórmula descrita en la metodología nos permite determinar el porcentaje de área cubierta para los grupos experimentales. Para poder determinar la fase migratoria procedimos a la evaluación de área y tiempo de cubrimiento. Para esto utilizando insertos con un área 3.1 mm^2 y sembrando 7,500 células por pozo procedimos analizar en cuanto tiempo se cubría el área total de lo cual se obtuvo que en un plazo de 96 horas a partir de haber retirado los insertos se cubría el área total. También con el fin de poder normalizar los datos y expresarlos en porcentaje se desarrolló la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de migración} = \left(\frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área inicial}} \right) \times 100$$

Esta fórmula nos expresa en porcentaje la superficie que fue cubierta por las células teniendo que nuestro mayor porcentaje implicara la ausencia del espacio entre células de un pozo del área delimitada (Figura 24).



Figura 24. Ensayo de migración. Se presenta el área inicial en el tiempo cero y a las 96 horas se observa que el área está totalmente cubierta.

Con base a nuestros resultados que demuestran que no hay cambios en la proliferación dependiendo de las concentraciones de VEGF, podemos asegurar que los cambios en el área ocupada de los precursores, está dada por el proceso de migración y no por la división celular.

Habiendo corroborado nuestro modelo de migración procedimos a la aplicación de las distintas concentraciones de VEGF. Derivado de estos experimentos encontramos que el VEGF es capaz de modificar la velocidad con la que el área es cubierta. En la condición experimental con suero se presentan dos fenómenos: el primero, el cual se observa una tendencias en aumento de la migración por parte de las concentraciones de 0.1-1 ng/ml a las 24 y 48 horas, empero, esto no llega a ser significativo. El segundo fenómeno se da a partir de la concentración de 5 ng/ml, dentro de lo cual se observa una velocidad de migración menor teniendo así un menor porcentaje del área cubierta y se puede apreciar a partir de las 24 horas. Enfatizando que llega a haber diferencias significativas con las concentraciones 10 ng/ml y 50 ng/ml a las 72 horas (Figura 25-A).

En la condición experimental sin suero se demuestra que el VEGF en la concentración de 0.5 ng/ml es capaz de aumentar de manera significativa el proceso de migración a las 48 horas. Teniendo un aumento con respecto al control de su respectivo tiempo (Figura 25-B).

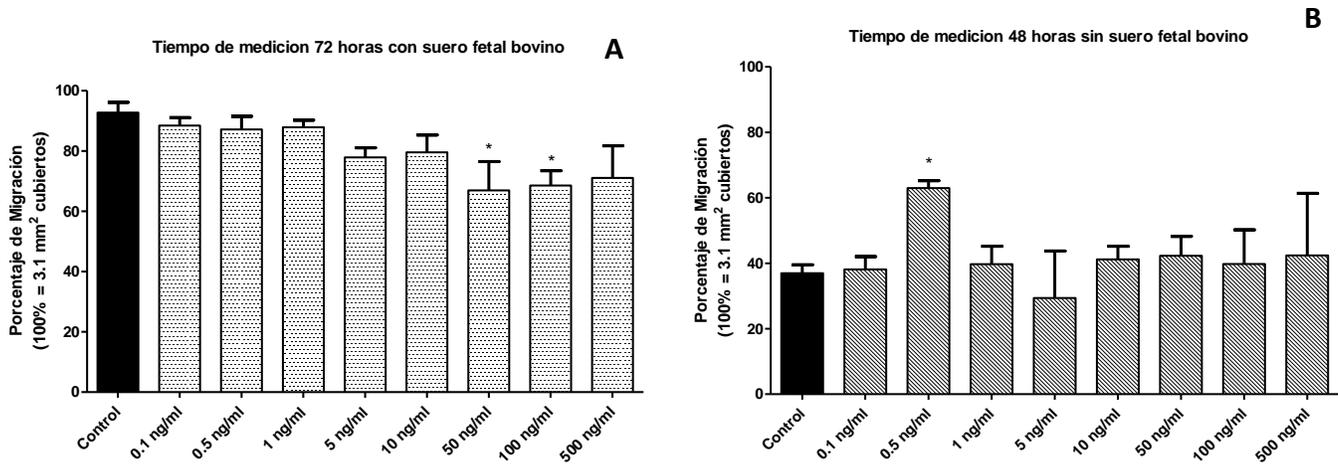


Figura 25. Efecto de VEGF sobre la migración de células precursoras de epitelio olfatorio. A) Experimento para la condición con suero B) Experimento para la condición sin suero A. Se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una post-hoc de Bonferroni. * $p \leq 0.05$. Se representan los resultados en media \pm EE, el 100% equivaldrá al área cubierta siendo esta de 3.1 mm².

Una vez delimitado el evento que es modificado por el VEGF decidimos explorar una de las posibles vías de acción del VEGF, como se demostró previamente, los precursores neuronales del epitelio olfatorio expresan el receptor VEGFR2, razón por la cual nosotros buscamos inhibir la vía de señalización río debajo de este receptor y así poder corroborar que la migración es alterada por el VEGF.

Nosotros observamos que al inhibir el receptor VEGF mediante DMH4 y a las proteínas implicadas en la vía de señalización río abajo (LY para la proteína PI3K, Bisindol para PKC, Y8296 para la proteína Rac y SB para la proteína MAPK 1/2) la migración se modifica para los inhibidores DMH4 y LY, llevándonos a decir que el VEGF modula la migración involucrando a su receptor y a la proteína PI3K. (Figura 26).

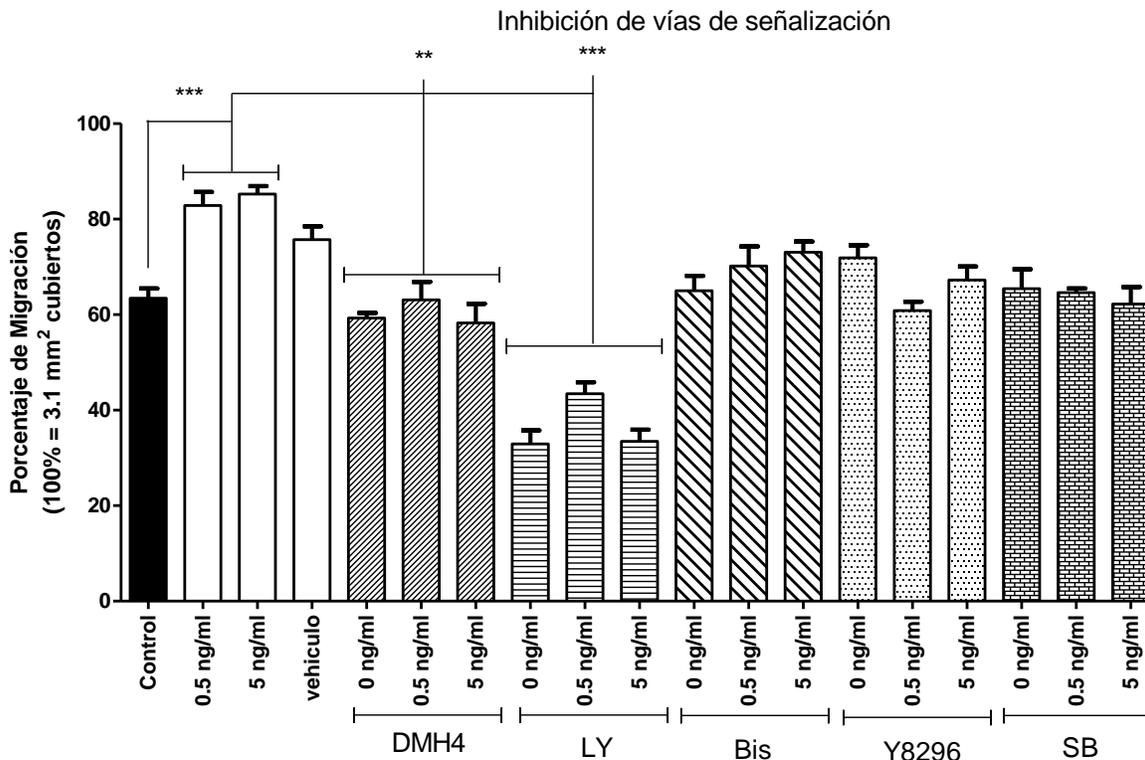


Figura 26. Migración bajo vías de señalización inhibidas. Se observa un aumento en el porcentaje de migración por arte de las concentraciones de VEGF; Al inhibir el receptor Flk-1(DMH4) y la PI3K (LY) se disminuye la migración llevándola al mismo nivel que el control. Finalmente el inhibidor de PKC (Bis), MAPK 1/2 (SB) y RAC (Y8296) no modificaron la migración causada por el VEGF. Los datos se presentan en (media \pm EE Media \pm EE, el 100% equivaldrá al área cubierta siendo esta de 3.1 mm²). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un post-hoc de Tukey al 95%, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

Para descartar que al ser inhibida la vía de PI3K provocara muerte celular se realizó una cuantificación en campos al azar con el fin de determinar el número de células presentes tanto en el grupo control como en el grupo con el inhibidor de PI3K- (1)

La migración celular es un proceso que depende de los arreglos de citoesqueleto, específicamente de los microfilamentos organizados como fibras de tensión, los cuales sostiene o se apoyan en proteínas que forman parte de los complejos de adhesión focal, los cuales son importantes para la adhesión a proteínas de matriz extracelular (16). Estos conglomerados están formados principalmente por integrinas, las cuales se unen el citoesqueleto de la célula contra la matriz extracelular, permitiendo que la célula responda a estímulos externos provenientes del sustrato en el que se encuentran y así poder migrar a través de él (52).

La movilidad celular está promovida por el decremento de tamaño de las adhesiones focales (51). En los trabajos de Youngjun Fan y colaboradores en el 2013 se demuestra que los focos de adhesión son capaces de desensamblarse con el fin de permitir la migración, entonces nosotros analizamos los cambios presentes en los focos de adhesión mediante el marcador de vinculina.

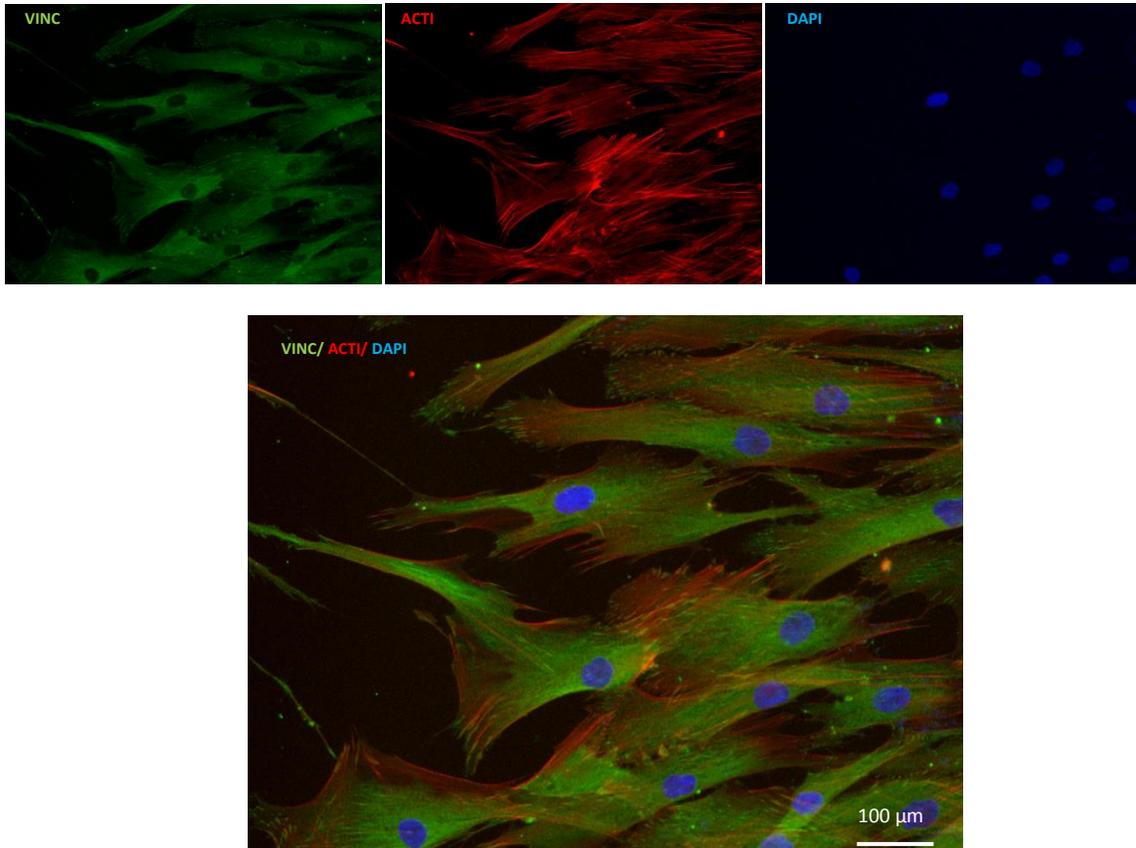


Figura 27. Inmunofluorescencia contra Vinculina y Actina. Se presenta una imagen representativa en un cultivo de precursores neuronales en condiciones sin suero donde la vinculina (verde) y la actina (rojo) colocalizan en las estructuras denominadas focos y puntos de adhesión.

A partir de la inmunofluorescencia realizada (Figura 27) identificamos las estructuras de vinculina, pudimos clasificar el marcaje dado por la vinculina de las siguientes maneras: Adhesiones focales y puntos de adhesión. Las adhesiones focales son la estructuras elongadas mayores a 6 micrómetros, mientras que los puntos de adhesión fueron considerados como aquellas estructuras redondas y pequeñas (Figura 28 A y B). Esta clasificación se tomó con base a Youngjun Fan y colaboradores en su trabajo publicado en el año 2013. Para el marcaje de adhesiones focales al cuantificar las prolongaciones mayores a 6 μm observamos un cambio radical dentro del cual se presenta un mayor número de adhesiones focales en los grupos con los inhibidores DMH4 y LY. Y su contra parte una disminución por parte de los grupos con VEGF (Figura 28-C). Por otra parte al analizar los puntos de adhesión, los cuales incluyen los puntos menores a 6 μm de longitud encontramos una mayor cantidad por parte de los grupos con VEGF y a su vez una disminución significativa por parte de los grupos con inhibidores contra el grupo de 5 ng/ml de VEGF (Figura 28-D).

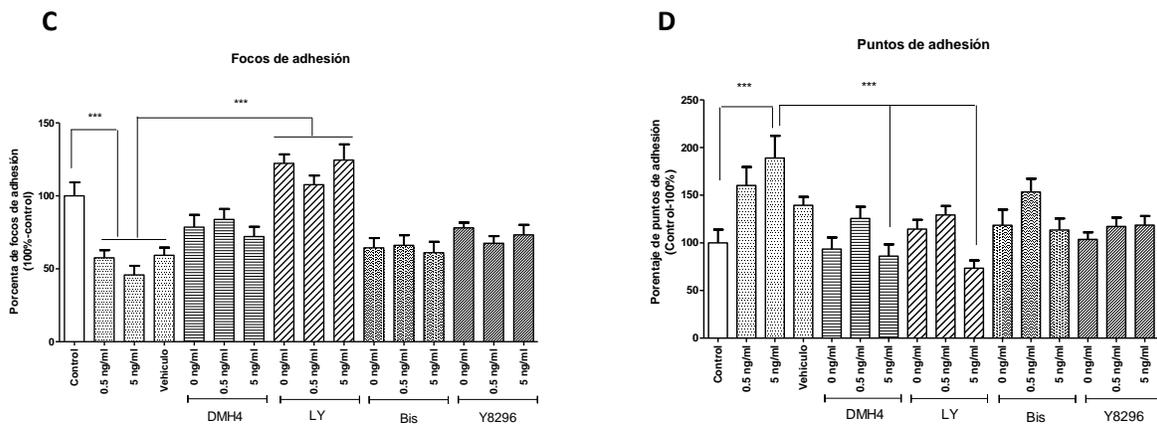
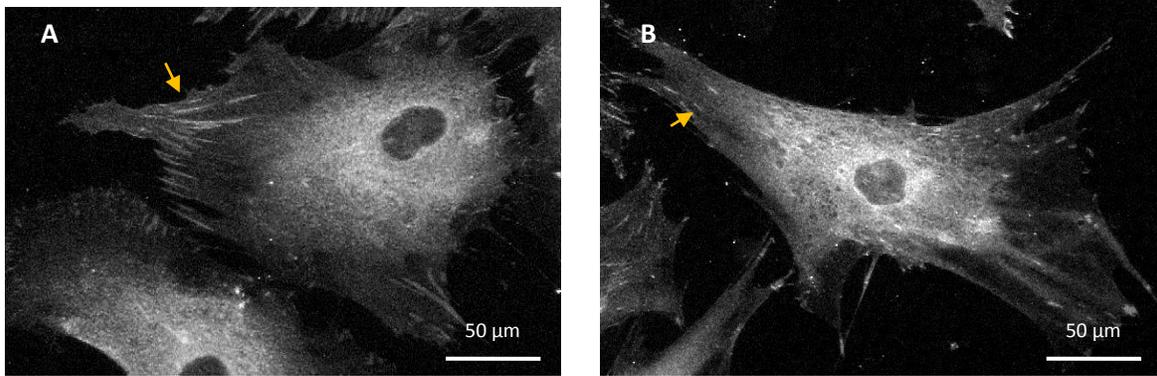


Fig. 28. Análisis de adhesiones focales y puntos de adhesión. A) Se presentan los focos de adhesión de vinculina señalados con la flecha amarilla con un tamaño mayor a las 6 μm . B) Puntos de vinculina señalados por la flecha. C) Adhesiones focales. Cuantificación de adhesiones focales ($\geq 6 \mu\text{m}$) como de puntos de adhesión se observa un aumento significativo por parte de los grupos con los inhibidores DMH4 y LY. Por otra parte se presenta una disminución de adhesiones por parte de los grupos con VEGF. D) Puntos de adhesión. Cuantificación tanto de puntos de adhesión ($\leq 6 \mu\text{m}$) se presenta un aumento significativo por parte de los grupos de VEGF. Por otra parte se presenta una disminución del efecto de VEGF para los inhibidores DMH4 y LY. Los datos se presentan en (media \pm EE). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de un post-hoc de Tukey al 95%. *** $p \leq 0.001$.

11. Discusión

En este trabajo se estudio el papel del VEGF sobre tres eventos del proceso neurogénico que se lleva a cabo en el epitelio olfatorio. Los resultados indican que el VEGF favorece la migración de las células precursoras del epitelio olfatorio humano, sin modificar los eventos de viabilidad, proliferación y supervivencia. El efecto del VEGF observado se lleva a cabo a través de la cascada VEGFR2-PI3K, lo cual fue evidenciado con el uso de inhibidores específicos.

Diversos estudios han propuesto que en el epitelio olfatorio existe un microambiente permisivo para que durante toda la vida se lleve a cabo la generación de neuronas olfatorias (44). Así mismo, diversos factores, tal como el VEGF, han sido propuestos como reguladores del proceso neurogénico (44). Sin embargo el efecto directo de ellos sobre la neurogénesis en el epitelio olfatorio no ha sido demostrado. En ese sentido, estudios recientes de nuestro grupo sugirieron que las células del epitelio olfatorio tienen la capacidad de producir y liberar al medio VEGF (48). Hecho que nos llevo a explorar el efecto de este factor en las células precursoras del epitelio olfatorio, las cuales expresan la proteína beta III tubulina. La expresión de esta proteína coincide con lo reportado previamente (31). Además estas células expresan el receptor de tirosina-cinasa que está vinculado con el VEGF, este hecho es inherente ya que se ha reportado que el receptor VEGFR” también llamado Flk-1 es el principal receptor efector en células de sistema nervioso central (65).

Newman y colaboradores han demostrado que el suero presenta una gran cantidad de factores que favorece un estado óptimo de los precursores neuronales de epitelio olfatorio, quienes a su vez han demostrado que el uso de factores específicos permite el potenciamiento de ciertas acciones por parte de las células en combinación con el suero (43). En este estudio, las células precursoras se cultivaron en presencia y/o en ausencia de suero como base para inducir un efecto sinérgico que permita la co-actividad de diversas moléculas. En nuestro trabajo también buscamos delimitar de manera especifica si el VEGF por si solo es capaz de tener un efecto sobre estas células del epitelio olfatorio. Para ello, utilizando VEGF en un amplio rango de concentración (0.1 ng/ml hasta 500 ng/ml) de acuerdo a lo previamente reportado (24, 25, 68).

En los ensayos con WST-1, el VEGF no causo efecto sobre la viabilidad celular, ni en presencia, ni en ausencia de suero. Aunado a lo anterior, el VEGF no afecto la proliferación, ni la supervivencia celular, ambos parámetros determinados por la incorporación de BrdU. Estos resultados contrastan con lo reportado por otros grupos quienes utilizando células precursoras de otras regiones neurogénicas (ZSV y ZSG) han mostrado efecto de este factor sobre la proliferación celular (57,68), lo cual nos reafirma que existen cambios que son dependientes de la estirpe celular así como de la ubicación del nicho neurogénico.

Otro evento relevante para la generación de neuronas es la migración celular (30). Estudios recientes de Kazuhide y colaboradores demostraron que precursores de oligodendrocitos *in vitro* presentaron cambios en migración celular al ser tratados con VEGF (65, 70). Además, se

ha reportado que el VEGF favorece la migración de neuroblastos sobre la cadena rostral migratoria de ratón (28). Los resultados de nuestro trabajo indican que en las células precursoras del epitelio olfatorio de humano, el VEGF favoreció la migración de las células precursoras del epitelio olfatorio con concentraciones (0.5 ng/ml y 5 ng/ml), a las 48 horas.

Además encontramos una disminución de la migración a partir de las concentraciones de 50 ng/ml en la condición con suero, hecho que podría ser explicado por una regulación dada por la concentración, eventos similares han sido descritos en relación a que a mayor cantidad de VEGF-A en el medio podría existir una disminución de los receptores para VEGF-A. (48), basándonos en la premisa de que el VEGF es capaz de modular la migración y al tener ausencia de dicho receptor la migración se vería disminuida.

Diversos estudios han reportado que el VEGF actúa a través de diferentes receptores y consecuentemente ejerce sus efectos activando diversas cascadas de señalización (48). En este trabajo, encontramos que la migración analizada a las 48 horas fue disminuida en las células que fueron incubadas en presencia del inhibidor para el receptor VEGFR2. Además, la migración causada por el VEGF se encontró disminuida cuando se utilizó el inhibidor específico para la proteína PI3K (46). Esta vía ha sido involucrada en el evento de migración celular (46), lo cual podría apoyar que en las células precursoras del epitelio olfatorio de humano, el VEGF está actuando a través de la cascada VEGFR2-PI3K para favorecer la migración celular

La movilidad celular es un proceso dinámico que requiere del ensamble o desensamble de unidades especializadas para la adhesión o para la movilidad (51). Estos complejos multiproteicos conocidos como focos de adhesión contienen una proteína llamada vinculina (28). De tal modo que con base en el marcaje de vinculina se puede determinar el estado del foco de adhesión. En nuestro estudio el VEGF-A disminuyó la presencia de focos de adhesión, favoreciendo la presencia de puntos de adhesión. Esto apoya el efecto del VEGF-A sobre la migración de las células precursoras del epitelio olfatorio de humano.

De tal modo que en conjunto pudimos apreciar que los focos de adhesión tienen un mayor longitud y mayor presencia en células que no migran, tal y como observamos en los grupos tratados con los inhibidores: DMH4, SB y LY. La contraparte se puede observar en los grupos con VEGF, los cuales mostraron una menor cantidad de adhesiones focales pero si un mayor número de puntos de adhesión. Basados en los trabajos de Youngjun Fan y colaboradores en el 2013 los cuales explican que los focos de adhesión se desensamblan y así favorecen la migración, nosotros pudimos determinar que el VEGF-A favorece la migración de las células precursoras del epitelio olfatorio a través de la cascada VEGFR2-PI3K., lo cual produce un menor número de adhesiones focales, pero con un aumento en los puntos de adhesión focal. Hay que mencionar que se desconoce qué mecanismos se encuentran debajo del PI3K (Figura 29).

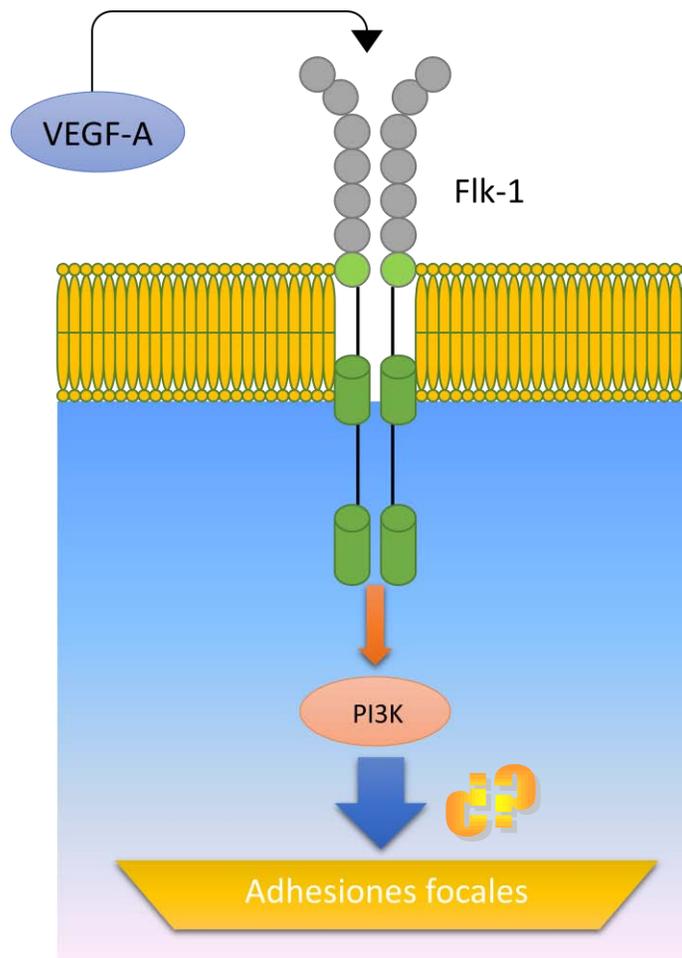


Figura 28. Posible mecanismo de acción a través del cual el VEGF favorece la migración de las células precursoras de humano. El esquema presenta la vía de acción del VEGF-A mediante la activación del receptor Flk-1 (VEGFR2) y este a su vez activa PI3K, el cual es capaz de modificar las adhesiones focales de las células precursoras neuronales de epitelio olfatorio de humano sin embargo aun falta dilucidar que moléculas se encuentran río abajo del PI3K .

Conclusión:

El presente trabajo nos permitió obtener las siguientes conclusiones con respecto a los precursores de epitelio olfatorio humano y el VEGF:

- Lo precursores neuronales cuentan con receptor de VEGF tipo 2.
- El VEGF no afecta la proliferación, la viabilidad celular y supervivencia.
- El VEGF es capaz de modificar la migración celular mediante el arreglo de adhesiones focales.
- La migración como efecto del VEGF está relacionada con los cambios en los complejos de vinculina. Denotando que las células expuestas a VEGF cuentan con mayor cantidad de puntos focales y menor cantidad de adhesiones lo que conlleva a tener una facilidad de movimiento al no estar adheridas al sustrato.
- La vía de acción del VEGF esta mediada por el receptor VEGF tipo 2, la cual a su vez activa PI3K una vía de señalización que desconocemos pero que modifica las adhesiones focales de las células precursoras.

Bibliografía

1. Aberg, M. A. *et al.* IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. Mol. Cell. Neurosci, 2003, p.p. 24, 23–40
2. Alfia A. Khaibullina, Jeffrey M. Rosenstein, Janette M. Krum, Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures, Developmental Brain Research, 2004, p.p 59– 68
3. Alberts *et al.* Biología molecular de la célula, Editorial Omega, 2004, p.p 400-450
4. Altman J, Das GD: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J Comp Neurol, 1996, p.p 337-89
5. Bellon A. *et al* VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. Neuron, 2010, p.p 205–219
6. Benítez-King G., A. Riquelmea, L. Ortiz-Lópezab, C. Berlangac, M.S. Rodríguez-Verdugod, F. Romod, E. Calixtoe, H. Solís-Chagoyána, M. Jimenez, L.M. Montañof, G. Ramírez-Rodríguezb, S. Morales-Mulíaa, A. Domínguez-Alonsoa, A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases, Journal of Neuroscience Methods. 2011 p.p 35– 45
7. Bettina Malnic and Lucia Armelin-Correa, Neurogenesis in the olfactory epithelium, Perspectives of Stem Cells, Springer Science, 2010
8. Buck L, Axel R A. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell, 1991, p.p 175-87.
9. Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. J Neurosci. 2004, p.p 5670-83.
10. Carleton A, Petreanu Lt, Lledo PM, Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. Nat Neuroscience 2003, p.p 507-18
11. Chojnacki, A., Shimazaki, T., Gregg, C., Weinmaster, G. & Weiss, S. Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural, J Neurosci. 2003, p.p 1730-41
12. Cao, L. *et al.* VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nature Genet. 2004 p.p 827–835
13. Dengke K Ma, Guo-li Ming and Hongjun Song, Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis, Current Opinion in Neurobiology 2005, p.p 514–520

14. Dongdong Li, Jeremy D. Marks, Paul T. Schumacker, Regina M. Young and James R. Brorson, Physiological hypoxia promotes survival of cultured cortical neurons, European Journal of Neuroscience, 2005, pp. 1319–1326.
15. Drucker-Colin, R; Hernandez-Cruz, A; Arias-Carrion, O; Verdugo-Diaz, L; Ferial-Velasco, A; Millan-Aldaco, D; Gutierrez, Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions J Neurosci. 2004, p.p 16-28.
16. Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R, et al. Focal adhesions: New angles on an old structure. Int Rev Cell Mol Biol. 2009, p.p 1–65.
17. Emsley, J. G. & Hagg, T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. Exp. Neurol. 2003, p.p 298–310.
18. Enwere, E. *et al.* Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. J. Neurosci. 2004, p.p 8354–8365
19. Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G: Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. Proc Natl Acad Sci. 2006 p.p 8233-8
20. Graziadei P.P.C. Cell dynamics in the olfactory mucosa. Tiss. Cell, 1973, p.p 113-13
21. Guo-li Ming and Hongjun Song Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System, Annual. Review Neuroscience. 2005, p.p 223–50
22. Jason G. Emsley, Bartley D. Mitchell, Gerd Kempermann, Jeffrey D. Macklis, Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006 p.p 1477-97
23. Holbrook E.H., Szumowski K.E., Schwob J.E. An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. J. Comp. Neurol., 363, 1995 p.p 129-146.
24. Jin, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. Proc. Natl Acad. Sci. 2002, p.p 11946–11950.
25. Jin, K. *et al.* Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. Aging Cell, 2003 p.p 175–183
26. Jin K *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. J Neurobiol. 2006 p.p 236–242

27. Katoh-Semba, R. *et al.* Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. FASEB J. 16, 2002, p.p 1328–1330.
28. Kazuhide Hayakawa, Loc-Duyen D. Pham, Angel T. Som, Brian J. Lee, Shuzhen Guo, Eng H. Lo, and Ken Arai J Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells Neurosci. 2011 p.p 10666–10670.
29. Kempermann G, H. Georg Kuhn & Fred H. Gage, More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment, Nature. 1997 p.p 493-495.
30. Kempermann G, Sebastian Jessberger, Barbara Steiner and Golo Kronenberg, Milestones of neuronal development in the adult hippocampus, Trends in Neurosciences. 2004 p.p 447-52.
31. Key B, Akesson RA. Olfactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). J Cell Biol. 1990 p.p 1729-43.
32. Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. & Gage, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J. Neurosci. 1997, p.p 5820–5829.
33. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS: Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci. 2006, p.p 179-93.
34. Mackay-Sim A, Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa, Archives Italiennes de Biologie, 2010, p.p 47-58
35. Mani N *et al.* Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. Exp Neurol. 2005 p.p 394–406
36. Margolis F.L., Roberts N., Ferriero D., Feldman J. Denervation in the primary olfactory pathway of mice: biochemical and morphological effects. Brain Res.,1974, p.p 469-483, 1974.
37. McCurdy R.D., Feron F., McGrath J.J., Mackay-Sim A. Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I. Eur. J. Neurosci, 2005 p.p 1581-1588.
38. McDonald C., Mackay-Sim A., Crane C., Murrell M. Could cells from your nose fix your heart? Transplantation of olfactory stem cells in a rat model of cardiac infarction. ScientificWorldJournal, 2010, p.p 422-433.
39. Mensch und Gesundheit Biologie Forschung mit Synchrotronlicht Untersuchungen zu Proteinstrukturen – die Grundbausteine des Lebens Verstehen, PSI, 2009.

40. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdgugo JM, Alvarez-Buylla Radial Glia give rise to adult neuronal stem cells in the subventricular zone Proc Natl Acad. Sci. 2004, p.p 17528-32.
41. Mosher Kira I, Andres Robert H, Takeshi Fukuhara, Gregor Bieri, Maiko Hasegawa-Moriyama, Yingbo He, Raphael Guzman & Tony Wyss-Coray Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity, Nature neuroscience 15, 2012, 1485-1487.
42. Murrell W., Bushell G.R., Livesey J., McGrath J., MacDonald K.P., Bates P.R., Mackay-Sim A. Neurogenesis in adult human. Neuroreport, 1996, p.p 1189-1194.
43. Murrell W., Feron F., Wetzig A., Cameron N., Splatt K., Bellette B., Bianco J., Perry C., Lee G., Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Dev. Dyn., 2005 p.p 496-515.
44. Murrell W., Wetzig A., Donnellan M., Feron F., Burne T., Meedeniya A., Kesby J., Bianco J., Perry C., Silburn P., Mackay-Sim A. Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. Stem Cells, 2008, p.p 2183-2192.
45. Murrell W., Sanford E., Anderberg L., Cavanagh B., Mackay-Sim A. Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model. Spine J, 2009 p.p 585-594.
46. Neil M. Fournier, Boyung Lee, Mounira Banasr, Maha Elsayed, Ronald S. Duman, Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/AKT dependent signaling, Neuropharmacology 63, 2012, p.p 642-652.
47. Newman M. Feron F. and Mackay-sim A, Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium, Neuroscience. 2000, pp. 343–350.
48. Olsson Anna-Karin, Dimberg Anna, Kreuger Johan and Claesson-Welsh Lena VEGF receptor signalling — in control of vascular function, Nature reviews, molecular cell biology, 2006, p.p 359-371.
49. Ramírez-Rodríguez Gerardo, Benítez-King Gloria, Kempermann Gerd, Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis, Salud Mental. 2007; p.p 12-19.
50. Ramírez-Rodríguez Gerardo, Laguna-Chimal José, Vega-Rivera Nelly M., Ortiz-López Leonardo, Méndez-Cuesta Luis, Estrada-Camarena Erika M., Harish Babu, Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos, Salud Mental. 2011; p.p 497-506
51. Rodriguez Fernandez JL, Geiger B, Salomon D, Ben-Ze'ev A. Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. J Cell Biol, 1993, p.p 1285–1294.

52. Romer LH, Birukov KG, Garcia JG Focal adhesions: Paradigm for a signaling nexus. *Circ Res*, 2006 p.p 606–616.
53. Rosenstein JM *et al.* Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci*, 2003, p.p 11036–11044
54. Schultz E. Regeneration of olfactory cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, p.p 41-43.
55. Schänzer Anne, Wachs Frank-Peter; Wilhelm1 Daniel, Till Acker, Christiana Cooper-Kuhn, Heike Beck, Jürgen Winkler, Ludwig Aigner, Karl H. Plate H. Georg Kuhn Direct Stimulation of Adult Neural Stem Cells in Vitro and Neurogenesis in Vivo by Vascular Endothelial Growth Factor, *Brain Pathol* 2004, p.p 237-248
56. Shen, Q. *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 2004, p.p 1338–1340.
57. Shou J, Murray RC, Rim PC, Calof AL. Opposing effects of bone morphogenetic proteins on neuron production and survival in the olfactory receptor neuron lineage. *Development*, 2000 p.p 5403-13.
58. Smith C.G. Regeneration of sensory epithelium and nerves in adult frogs. *Anat. Rec*, 1951, p.p 661-671.
59. Sondell Mariann, Lundborg Göran, and Kanje Martin, Vascular Endothelial Growth Factor Has Neurotrophic Activity and Stimulates Axonal Outgrowth, Enhancing Cell Survival and Schwann Cell Proliferation in the Peripheral Nervous System, *The Journal of Neuroscience*, 1999, p.p 5731–5740
60. Stéphane D. Girard, Arnaud Devéze, Emmanuel Nivet, Bruno Gepner, François S. Roman, François Féron. Isolating Nasal Olfactory Stem Cells from Rodents or Humans, *Journal of Visualized Experiments* 54, 2011.
61. Sun Y *et al.* Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol*, 2006, p.p 329–335.
62. Tome M., Lindsay S.L., Riddell J.S., Barnett S.C. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells*, 2009, p.p 2196-2208.
63. Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 2002 p.p 1030-4.
64. Westerman R. and Baumgarten R.V. Regeneration of olfactory paths in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Experientia*, 1964, p.p 519-520.

65. Wittko-Schneider, T. Schneider, Plate, Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2- two unequal brothers in mind, Cellular and Molecular Life Sciences vol 70, 2013, p.p 1705-1725.
66. Wolozin B., Sunderland T., Zheng B.B., Resau J., Dufy B., Barker J., Swerdlow R., Coon H. Continuous culture of neuronal cells from adult human olfactory epithelium. *J. Mol. Neurosci.*, 1992, p.p 137-146.
67. Xiaodong Zhang, Kathleen M. Klueber, Zhanfang Guo, Chengliang Lu, and Fred J. Roisen, Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium, Experimental Neurology 186, 2004 p.p 112– 123
68. Xiaodong Zhang, Kathleen M. Klueber, Zhanfang Guo, Jun Cai, Chengliang Lu, Welby I. Winstead, Mengsheng Qiu, Fred J. Roisen, Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors, Brain Research, 2006, p.p 109-119
69. Yonghua Zhu, Kunlin Jin, Xiao Ou Mao, and David A. Greenberg, Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression, FASEB J. 2003, p.p 186-193.
70. Yongjun Fan, Greger Abrahamsen, Richard Mills, Claudia C. Caldero' n, Jing Yang Tee, Lisette Leyton, Wayne Murrell, Justin Cooper-White, John J. McGrath, and Alan Mackay-Sim, Focal Adhesion Dynamics Are Altered in Schizophrenia, Biological Psychiatry, 2013, p.p 418-426.
71. Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S. J. & Luskin, M. B. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult OB. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998, p.p 234–245.