

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROESFERA A CÉLULAS CON FENOTIPO DE ALDAINOGLÍA

Ernesto Doncel-Pérez^{1,2}, Sara Caballero-Chacón^{1,3} and Manuel Nieto-Sampedro^{1,2*}

¹ Departamento de Plasticidad Neural, Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, y ²Unidad de Neurología Experimental, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, 45071 Toledo, España

³Dirección actual: Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, 04510 Coyoacán, México D.F, México.

***Correspondencia:** Manuel Nieto-Sampedro
Instituto Cajal
37, Doctor Arce Av.
Madrid 28002, Spain
Phone: (341) 585 4720
FAX: (341) 585 4754
e-mail: mns@cajal.csic.es

Financiación: Este trabajo fué financiado en parte por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (ayuda SAF-04016) y la Comunidad de Madrid (ayuda 08.1/ 0035/2001). E. Doncel-Pérez. está contratado por el SESCAM (Servicio de Salud de la Comunidad de Castilla-La Mancha).

RESUMEN

Existen células gliales en regiones del sistema nervioso central (SNC) adulto, aparentemente sin relación entre sí - bulbo olfatorio, hipotálamo, hipófisis, y glándula pineal, que comparten con las células de Schwann (SC) la capacidad de sobrevivir y proliferar en cultivo, de promover el crecimiento de neuritas y de envolverlas. Las células típicas de estos sitios del SNC - glía envolvente del bulbo olfatorio (GEBO), tanicitos, pituicitos y células intersticiales pineales - pueden ser identificadas en cultivo por su expresión concomitante de GFAP periférica, vimentina, proteína p75 receptora de NGF y receptor de estrógeno tipo α , mostrando una mezcla de propiedades similares tanto a SCs como a astrocitos. Estas células constituyen un grupo único de células de macroglía central estructural y funcionalmente homólogas, con origen filogenético común, que hemos llamado glía promotora del crecimiento o *aldainoglia* (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro 1999; Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro, 2000). Los trasplantes de aldainoglia tienen un potencial clínico considerable para tratar lesiones del SNC, pero su uso para la reparación de lesiones requiere la solución de dos problemas: i) la producción de células en la cantidad y homogeneidad necesarias para su uso clínico, y ii) asegurar la compatibilidad inmunológica de donador y receptor del trasplante.

Queremos informar aquí que células de neurosfera, generadas a partir de diversas regiones del SNC de rata o humano adultos, pueden ser diferenciadas en cultivo a células similares a aldainoglia (por plaqueo sobre un substrato adherente en medio condicionado por GEBO, suplementado con EGF y bFGF). Las células así diferenciadas presentan una composición de RNA mensajero, inmunofenotipo y propiedades funcionales similares a aldainoglia, pero no expresan niveles detectables del complejo de histocompatibilidad tipo MHC II. El análisis diferencial con microarrays del mRNA expresado por aldainoglia vs. neurosféricas confirmó un incremento elevado del mRNA para GFAP periférica y ausencia de cambio en la expresión de nestina. Expresión elevada de GFAP y niveles constantes de nestina, sugieren que las células gliales diferenciadas desde neurosféricas pueden ser precursores de neuronas y de otros tipos de macroglía.

Palabras clave: Neuregulina / GFAP/ Vimentina/ Nestina / receptor de NGF p75 / Regeneración/ Microarrays

Abreviaturas:

bFGF, basic fibroblast growth factor; **bFGF**, basic fibroblast growth factor; **E15**, embryonic day 15; **EGF**, epidermal growth factor; **MHC**, major histocompatibility complex; **NB27**, neurobasal medium supplemented with B27; **Nes**, nestin gene; **OECs**, olfactory ensheathing cells; **PLL**, Poly-L-lysine; **SNC**, sistema nervioso central.

INTRODUCCIÓN

Células troncales neurales multipotentes pueden ser aisladas de varias regiones del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, en distintos estadios de su desarrollo (Gage 2000; Le Belle and Svendsen 2002) y pueden hacerse proliferar en cultivo, como neuroesferas en suspensión. Las células de estas neuroesferas son capaces de diferenciarse *in vitro* a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, cuando reciben las señales apropiadas (Reynolds and Weiss 1992). Si las células de neuroesferas de roedor son transplantadas, se diferencian predominantemente a glía (Ader et al. 2000; Carpenter et al. 1997; Espinosa-Jeffrey et al. 2002), mientras que células de neuroesferas derivadas de cerebro humano también se diferencian a neuronas en proporción significativa (Brustle et al. 1998; Englund et al. 2002a; Englund et al. 2002b; Fricker et al. 1999; Rosser et al. 2000). Dado el gran potencial clínico de estas células, no es de extrañar el enorme interés que despierta la definición de las señales moleculares que regulan su destino final (Edlund and Jessell 1999).

Existen células gliales en varias regiones del sistema nervioso central (SNC) adulto sin relación aparente entre si- bulbo olfatorio, hipotálamo, hipófisis, y glándula pineal, que comparten con las células de Schwann (SC) la capacidad de sobrevivir y proliferar en cultivo, de promover el crecimiento de neuritas y de envolverlas. Las células típicas de estos sitios del SNC— glía envolvente del bulbo olfatorio (GEBO), tanicitos hipotalámicos, pituicitos de la hipófisis y células intersticiales pineales - pueden ser identificadas en cultivo por su expresión concomitante de GFAP periférica, vimentina, proteína p75 receptora de NGF y receptor de estrógeno tipo α , mostrando una mezcla de propiedades similares tanto a SCs como a astrocitos. Estas células constituyen un grupo único de células de macroglía central estructural y funcionalmente homólogas, con origen filogenético común, que hemos llamado glia promotora del crecimiento o *aldainoglia* (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro 1999; Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro, 2000), cuyo trasplante tiene un potencial considerable en el tratamiento de lesiones del SNC

(Ramón-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994); Navarro et al. 1999); (Ramón-Cueto et al., 2000); (Bradbury 2002); (Li et al. 2003) Dobkin and Havton 2004; Warner et al. 2005). Una observación frecuente en los experimentos de trasplante de células troncales, es la permanencia de la mayoría de las células transplantadas en un estado incompletamente diferenciado. Solamente una pequeña fracción de ellas adquieren características gliales o neuronales definidas (Englund et al. 2002a; Englund et al. 2002b).

Además de ese problema, el uso de trasplantes para la reparación de lesiones, necesita la solución de otras dos cuestiones esenciales: i) la producción de la cantidad requerida de células de aldainoglia, y ii) asegurar su compatibilidad inmunológica con el receptor del trasplante. Queremos informar aquí los resultados encontrados en nuestro laboratorio en respuesta a estos problemas. En breve, células derivadas de neuroesferas de meséncefalo, plaqueadas sobre una superficie adherente y cultivadas en medio condicionado por GEBO, adquieren fenotipo de aldainoglia, atendiendo a su expresión de RNA mensajero y sus marcadores inmunológicos. Estas células similares a la aldainoglia, derivadas *in vitro* de neuroesferas, no expresaron niveles detectables de antígenos de trasplante tipo II, atajando así el segundo problema.

Diferenciación de células de neuroesfera a células con fenotipo de aldainoglia

Las neuroesferas de meséncefalo de rata, cultivadas en medio NB27, proliferan rápidamente. Las células disociadas de esas neuroesferas presentan morfología elipsoidal, pero cuando son plaqueadas sobre un substrato adherente emiten procesos y se diferencian a progenitores neurales. El destino final de estos progenitores depende, tanto del substrato al que se adhieren, como de las señales presentes en el medio en el que se encuentran. Cuando las células elipsoidales son plaqueadas sobre un substrato poco adherente (plástico para cultivo de bacterias, tratado con poli-lisina, PLL), las células se unen al substrato, emitiendo algunos procesos escasos y delicados (Fig. 1e, 1f). Si se substituye una fracción

substantial de NB27 (50 a 75 %) por medio condicionado por GEBO, las células se adhieren y, tras unas 18h en ese medio, se aplanan asumiendo una forma similar a la de la aldainoglia (Fig. 1c, 1d). En esas condiciones, la diferenciación morfológica de las células no tratadas fué totalmente reversible: si las células se lavan y se incuban en medio NB27 durante 18 h o menos, recuperan una morfología sferoide, agrupandose en agregados parecidos a neuroesferas (Fig. 1). La exposición a medio condicionado por GEBO, además de favorecer la adhesión al substrato de las células, su aplanamiento y la emisión de procesos, indujo la expresión de los inmunomarcadores característicos de la aldainoglia (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro 2000), como se indica a continuación.

Procesos biológicos afectados por el cultivo de neuroesferas en medio condicionado por GEBO

Los genes expresados por las células de neuroesfera cells tras su cultivo en medio condicionado por GEBO, durante 18 y 48 horas, fueron enviados al programa del NIH, DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), para el diagnóstico de los procesos biológicos afectados. Al menos 69 genes, implicados en diversas funciones celulares, fueron inducidos más de 2 veces en las células tratadas con medio condicionado por GEBO. (Fig 2). El gen *Gfap* fué uno de los inducidos más fuertemente, de 4.5 a 4.7 veces, respectivamente, a las 18 y 48 horas de exposición al medio condicionado (Tabla 1), indicando que las células de neuroesfera adheridas a PLL, desarrollaron un claro fenotipo glial. La inducción de GFAP en las células de neuroesfera adheridas, junto con la ausencia de cambios en la expresión de nestina, sugieren la aparición de un precursor neural de naturaleza glial (Merkle et al. 2004). En un trabajo previo planteamos la hipótesis de que la aldainoglia fuese un precursor de los distintos fenotipos neurales en el SNC (Gudiño-Cabrera y Nieto Sampedro, 1999, 2000). Estos

hechos e hipótesis, tomados en conjunto, nos indujeron a examinar si las células diferenciadas a partir de neuroesferas, en medio condicionado por GEBO, presentaban similitudes moleculares y funcionales con la aldainoglia. Cuando se compararon los genes expresados por neuroesferas mantenidas en medio NB27 y por las mismas neuroesferas adheridas a PLL y expuestas a medio condicionado por GEBO (Tabla 1), la observación que más nos llamó la atención fué que las propiedades biológicas más afectadas por los genes sobreexpresados o reprimidos concernían al fenotipo celular (GFAP, proteína S100, tubulina β 3, nestina), a las propiedades inmunológicas y al crecimiento de neurites (Tables 1 and 2; Fig.2).

Neuroesferas incubadas en medio condicionado por GEBO expresan marcadores de aldainoglia

El fenotipo de aldainoglia fué caracterizado por su expresión concomitante de unos pocos inmunomarcadores específicos, a saber, GFAP periférica, receptor de estrógeno tipo α y receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75 (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro 1999; 2000). La exposición de neuroesferas adheridas al substrato mediante PLL, a medio condicionado por GEBO, indujo la aparición de esos inmunomarcadores en las células tratadas que experimentaron un cambio morfológico. La inmunotinción para GFAP periférica co-localizó con la de receptor de estrógeno tipo α y la de receptor de NGF de baja afinidad (Figs. 3 and 4). El débil incremento en la expresión del gen *Esr1*, observada desde 18 a 48 horas (Table 1), se correlacionó con la aparición de inmunotinción para proteína receptora de estrógeno tipo α (Fig.3). Similarmente, el descenso en la expresión de inmunoreactividad para el receptor de neurotrofinas p75 durante su cultivo, se correlacionó con la pérdida específica de RNA mensajero para la proteína p75 (Tabla 1; Fig 4).

Las proteínas S100: inmunoreactividad y expresión génica

Las proteínas S100, capaces de unir calcio, son marcadores consensuados de glía (Heizmann 1999). Las células disociadas de neuroesferas, adheridas al sustrato mediante PLL, expresaron inmunoreactividad para proteínas S100 tras 48 horas de exposición a medio condicionado por GEBO (Fig 5), pero no a tiempos de exposición más cortos (18h, datos no mostrados). La disminución en la expresión del RNA mensajero para S100a6 (calciclina, Tabla 1) indicó un ligero descenso en la transcripción de *S100a6* a tiempos de incubación más largos mientras que el mensajero para *S100a3* mostró un pequeño aumento a tiempos de incubación más cortos, comparado con el transcrito de *S100b*. La isoforma de proteína S100b es común en células gliales (Donato 1999; Heizmann 1999). Su expresión tras 48 horas de cultivo fue consistente con el aumento observado en el mensajero específico del gen *S100b* (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión génica en aldainoglia derivada de neuroesferas

Gene Bank	Descripción	Símbolo gen	18 hours	48 hours
NM_017009	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	4.5	4.7
NM_012488	Alpha-2-macroglobulina	A2m	4.1	4.9
NM_012967	Intercellular adhesion molecule 1	Icam1	3.9	3.6
NM_022266	Connective tissue growth factor	Ctgf	3.1	3.6
BI285494	IFN induced transmembr.protein 3-like	Ifitm3l	3.0	3.4
NM_134390	Tolerancia transplante	TORID	1.4	2.3
NM_031327	Cysteine rich protein 6l	Cyr6l	1.3	2.2
AF140232	Calcium binding protein A6 (calciclina)	S100a6	1.1	0.6
NM_053681.1	Calcium binding protein A3	S100a3	0.7	1.2
NM_013191	Calcium-binding protein, beta (neural)	S100b	-0.6	0.6
AI598730	Similar a p75, low affinity NGFR precursor	LOC246143	0.7	-0.2
NM_139254	Tubulina β III	Tub β 3	0.3	0.3
NM_012689	Receptor estrógeno tipo α	Esr1	-0.1	0.07
NM_012987	Nestina	Nes	-0.1	0.2

Valores de expresión génica en aldainoglia, relativos a neuroesferas de la misma edad no expuestas a medio condicionado por glía envolvente del bulbo olfativo (GEBO). NGFR precursor, precursor del receptor del factor de crecimiento nervioso.

La familia de proteínas S100 median la transducción de señales asociadas a Ca^{2+} . La distribución sub-celular de los miembros de la familia cambia en respuesta a estímulos extracelulares. Así, los miembros de S100 implicados en inflamación y cura de heridas (Eckert et al. 2004) se encontraron ligeramente sobreexpresados en aldainoglia respecto a las neuroesferas (Tabla 1). Otras proteínas S100 derivadas de la expresión de los genes *S100a3* (Camby et al. 2000) y *S100a6* (calciclina; Donato 1999) están implicadas en proliferación celular benigna y regulación de la progresión del ciclo celular. El producto de la expresión del gen *S100b*, una proteína tipo “EF-hand” capaz de unir Ca^{2+} , está relacionada más directamente con la diferenciación neural (Sorci et al. 1998).

La proteína S100 β se une a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la subunidad del filamento intermedio tipo III específico de las células astrogliales. Al unirse a los sitios de fosforilación de GFAP, la proteína S100 β bloquea el acceso a ella de las proteínas quinasas inhibiendo así el ensamblaje de los monómeros de GFAP en filamentos gliales. Además, S100 β estimula la disociación de los filamentos gliales, dependiente de dosis y regulada por Ca^{2+} (Frizzo et al. 2004), explicando así la normalización de los astrocitos reactivos que sigue al trasplante de GEBO en lesiones de la médula espinal (Verdú et al., 2001). La expresión de los genes que codifican los monómeros de S-100 β y GFAP, está coordinada por la concentración intracelular de cAMP (Ziegler et al. 1998), sugiriendo la forma en la que la proteína S-100 β puede regular el ensamblaje y distribución intracelular de los filamentos gliales. El aumento con el tiempo en la expresión del gen *S100b* comparado con los genes *S100a3* and *S100a6* (Tabla 1), junto con la inmunodetección de proteína *S100b* (Fig 5), apuntan a la aldainoglia como el primer paso en la diferenciación de las células troncales neurales hacia su destino final, al menos en cultivo.

GFAP y nestina: expresión génica e inmunoreactividad

Las células de neuroesfera plaqueadas sobre un sustrato adhesivo en medio condicionado por GEBO, mostraron un aumento en la inmunoreactividad para GFAP comparado con células control. Las inmunotinciones para nestina y GFAP co-localizaron pero, en contraste con GFAP, la expresión de nestina no mostró ninguna elevación con respecto a células no incubadas en medio condicionado (Fig 6). La expresión del RNA mensajero del gen de nestina no fue afectada por la incubación en medio condicionado por GEBO (Table 1), mientras que el RNA mensajero para GFAP aumentó casi 5-veces, apoyando la observación del aumento de inmunoreactividad. El débil cambio en la expresión de *Nes* correlacionó con la abundancia, constantemente alta, de su transcripto específico, que no se vio afectada por la incubación en medio condicionado por GEBO (Tabla 1).

Los anticuerpos monoclonales y policlonales anti-GFAP mostraron claras diferencias de inmunoreactividad (Fig 4, 6). La ausencia de reacción de la proteína de los filamentos intermedios con el monoclonal anti-GFAP (Figs 3, 4) y su clara reacción con el anticuerpo policlonal (Fig 6), indicaron la presencia simultánea de estados de maduración de la proteína diferentes. El fuerte incremento en la expresión de mRNA para *Gfap* y la abundancia constante del transcripto de *Nes* a las 18 y 48 horas de cultivo, correlacionaron positivamente con la abundancia de sus correspondientes productos proteicos. La colocalización de ambas proteínas, nestina y GFAP, indicó un cambio en el citoesqueleto hacia un fenotipo de precursor con propiedades idénticas a la aldainoglia (Fig. 6, Table 1).

La presencia de inmunoreactividad para GFAP en células del SNC distintas de los astrocitos, detectada utilizando un anticuerpo policlonal de conejo contra GFAP, sin embargo no pudo ser confirmada utilizando un anticuerpo monoclonal. La expresión alta del gen *Gfap* en células similares a aldainoglia, fue inducida por exposición de las neuroesferas a medio condicionado por GEBO durante 18 y 48 horas (Tabla 1) y la abundancia de transcriptos de *Gfap* no concordaba con la ausencia de inmunotinción con el anticuerpo monoclonal en las

neuroesferas no tratadas (Mab; Fig. 3), aunque los anticuerpos policlonales detectaban claramente la presencia de GFAP tanto en las células tratadas como en las no tratadas (Fig. 6).

Dos tipos de mRNA han sido descritos para GFAP, que codifican proteínas de peso molecular casi idéntico, pero con una diferencia estructural importante (Feinstein et al. 1992): la GFAP de la glía periférica (GFAP- β) carece de una secuencia de 18 aminoácidos amino terminales, presente en GFAP de astrocitos (GFAP- α). El anticuerpo monoclonal anti-GFAP (B2.2), fué preparado contra un péptido que contenía ese fragmento de 18 aminoácidos (Lee VM-Y 1984) y reaccionó con astrocitos, pero no con células de Schwann (Feinstein et al. 1992). Nuestros resultados indican que el anticuerpo monoclonal utilizado no detectó el producto de *Gfap* en células similares a aldainoglia, derivadas de neuroesferas incubadas en medio condicionado por GEBO.

Tubulina β III

La subunidad de los microtúbulos tubulina β III es específica de neuronas y es ampliamente utilizada como marcador neuronal. La baja señal para tubulina β III observada en neuroesferas, aumentó ligeramente en las células resultantes de su plaqueo sobre PLL, tras 18 horas de incubación en medio condicionado por GEBO. Esa baja expresión del gen se mantuvo a tiempos de exposición más largos (48h) a medio condicionado por GEBO. El receptor de estrógeno tipo α , $\square\square$ marcador de aldainoglia, colocalizó con tubulina β III en las células de neuroesfera incubadas en medio condicionado por GEBO. Esa colocalización del marcador de aldainoglia con el marcador de neuronas tubulina β III, indicó un papel general de precursor neural para esta población glial (Table 1, Fig 7).

Expresión de antígenos de histocompatibilidad

La expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad, genes clases I y II, (MHC I y II) fué examinada utilizando análisis de DNA con microarrays e inmunocitoquímica. No se observó expresión de mRNA específico de los MHC en la aldainoglia derivada de neuroesferas, ni tras 18 horas, ni tras 48 horas de incubación de las neuroesferas en medio condicionado por GEBO (Table 2). Aunque en the caso del MHC clase I, los loci Aw2 and S3 son redundantes, no se detectó en ningún caso un cambio significativo en la expresión génica. El aumento en la expresión de AF029241, correspondiente al gen RT1-S3, no fué incluido como un cambio expresión porque la fluorescencia basal casi no fué detectable. Otros genes MHC examinados, de las clases Ia o Ib, no fueron afectados por la incubación con medio condicionado por GEBO.

Table 2. Genes de MHC expresados en aldainoglia derivada de neuroesferas tras 18 y 48 horas de diferenciación

mRNA asociado a	símbolo del gen	Gene Bank	Description	18h	48h
MHC Class I	Hlals	Y13972	MHC class I-like sequence	0,2	- 0,1
	RT1-A	M64795	RT1-region, class I (A)	0,3	- 0,3
	RT1-A3	AJ005023	RT1 class I, A3	0,7	- 1,2
	RT1-Aw2	AJ249701	RT1 class Ib, locus Aw2	0,6	1
		L40362		0,7	- 1,3
		U50449		0,3	0,3
		M24024		0,3	0,6
		M10094		- 0,3	- 0,3
		AJ243338		0,6	- 0,2
		RT1- CE12	M24026	RT1 class I, CE12 MHC RT44 protein	0,5
	RT1-M3	NM_022921	RT1 class Ib, locus M3	0,7	0,3
	RT1-M4	AF024712	MHC class Ib M4 pseudogene	0,5	0,2
	RT1-N3	L23128	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N3)	0,7	0,3
	RT1-S3	AF029241	RT1 class Ib, locus S3	2,2	1,9
AJ243974			- 0,5	0,7	
AJ243973			0,1	- 0,1	
MHC clase II	Mhc2ta	NM_053529	MHC class II transactivator	- 1,1	- 0,6
	RT1-Da, RT1-Db1	Y00480	RT1 class II	0,2	- 0,3

MHC, antígeno mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility antigen). Las células de neuroesfera en cultivo fueron diferenciadas a células con morfología similar a la aldainoglia, por exposición a medio condicionado por glia envolvente del bulbo olfativo (GEBO), por los periodos de tiempo indicados. El análisis con microarrays fué utilizado para examinar la expresión de genes respecto a los expresados por las células de neuroesferas.

Los dos mRNAs específicos para los MHC clase II detectados en aldainoglia, no mostraron diferencias de expresión con respecto a las células control (Tabla 2). La inmunofluorescencia de los antígenos MHC-I and MHC-II, revelada con los monoclonales MRC OX-18 (Metzger et al. 2002) and MRC OX-6 (Gessl et al. 1995), respectivamente, fué similar al fondo (datos nomostrados). La baja expresión de MHC en aldainoglia, observados como mRNA o como proteína, se correlacionó con una expresión alta del transcripto TORID (tolerance-related and induced; Tabla 1).

La aldainoglia no expresa antígenos de transplante MHC clases I y II

El gen MHC de los mamíferos está dividido en tres regiones, correspondientes a las clases I, II y III. La región clase I codifica moléculas clásicas I (clase Ia) y no clásicas I (clase Ib). Las proteínas de la clase Ia están implicadas en la presentación de antígeno a los linfocitos T, CD8 positivos, mientras que la función de los genes clase Ib no es conocida.. La region clase II codifica moléculas de la class II, implicadas en la presentación de antígeno a los linfocitos T, CD4. Los genes de la clases I y II están incluidos entre genes estructurales bien conservados, algunos de ellos esenciales para las respuestas inmunes adaptativas (procesado de antígeno y mecanismos de transporte de péptidos). La region clase III contiene genes implicados en la inmunidad innata, como los componentes del complemento y las citoquinas (Hurt et al. 2004). Como ha sido observado previamente (Hori et al. 2003; Li et al. 2004), no pudimos detectar ni mRNA específico para MHC clases I and II (Table 2), ni sus proteínas correspondientes. Los genes MHC III no habían sido anotados cuando realizamos nuestros análisis con microarrays. La baja antigenicidad tanto de las neuroesferas como de la aldainoglia derivada de ellas en cultivo (baja expresión of MHC junto con expresión alta de TORID; Tabla 1), sugieren que o las neuroesferas cultivadas o la aldainoglia derivada de ellas podrían ser transplantadas en el SNC sin inmunosupresión.

Promoción del crecimiento de neuritas por aldainoglia derivada de neuroesferas

Las funciones de los tipos macrogliales, como tanicitos, pituicitos y GEBO, implican la promoción del crecimiento de axones y su envoltura rápida y reversible. Estas propiedades similares a las de las células de Schwann sugieren su agrupamiento en una clase funcional que hemos llamado aldainoglia (Nieto-Sampedro 2002). La notable capacidad para promover el crecimiento de neuritas de la aldainoglia derivada de neuroesferas, se puso de manifiesto cuando estas células fueron co-cultivadas con neuronas de ganglio raquídeo de rata (Fig. 8). La promoción del crecimiento y de la asociación entre neuritas, para formar fascículos más largos y gruesos que los observados en los ganglios control (ver Fig 8). La fasciculación de las neuritas podría explicarse por la sobreexpresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (Tabla 1). Las células de neuroesfera tratadas con medio condicionado por GEBO promovieron con efectividad el crecimiento de las neuronas ganglionares, lo que junto con la expresión de marcadores inmunológicos descrita, justifican llamar aldainoglia a las células derivadas de neuroesfera.

Factor de crecimiento glial y transición desde neuroesferas a aldainoglia.

Neuroesferas plaqueadas sobre un substrato adhesivo y expuestas a los factores solubles presentes en el medio condicionado por GEBO, se diferenciaron a células similares a aldainoglia. La cuestión es cuales son los factores de crecimiento que regulan la diferenciación de neuroesferas a aldainoglia. Por el momento, el candidato más plausible parece ser un factor de crecimiento de la familia de la neuregulina, NRG-1, actuando a través de su receptor específico, una tirosina quinasa (Burden and Yarden 1997; Carraway and Burden 1995).

Conclusión: la aldainoglia es un precursor celular

Neuronas, astrocitos y oligodendrocitos pueden ser producidos en cultivo a partir de neuroesferas estimuladas con los factores de crecimiento adecuados (Merkle et al. 2004; Vicario-Abejón et al. 2003). La expresión de niveles constantes de *nestina*, el aumento de GFAP periférica y la presencia de otros marcadores gliales *in vitro*, apoyan la hipótesis de que un precursor de naturaleza glial es un paso intermedio en la diferenciación desde neuroesferas a los diversos tipos celulares neurales (Merkle et al. 2004).

Un precursor común de neuronas and astrocitos que expresa *nestina* and GFAP, ha sido encontrado en mamíferos postnatales y adultos (Wei et al. 2002). Neuroesferas embrionarias se diferenciaron a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos tras 10 días en cultivo (Fujiwara et al. 2004), y hemos mostrado aquí que células similares a aldainoglia pueden ser generadas a partir de neuroesferas embrionarias en un periodo de tiempo más corto (48 horas) por tratamiento con medio condicionado por GEBO. La presencia de aldainoglia en el SNC adulto (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro 2000) abre la posibilidad de generar los diversos fenotipos neurales *in situ*, mediante la estimulación adecuada de la población de aldainoglia residente. La localización *in situ* de estas células precursoras neurales puede llevarse a cabo con los marcadores descritos aquí.

REFERENCES

- Alexander CL, Fitzgerald UF, Barnett SC (2002) Identification of growth factors that promote long-term proliferation of olfactory ensheathing cells and modulate their antigenic phenotype. *Glia* 37: 349-364.
- Andrews MR, Stelzner DJ (2002) Studies of OEC-mediated regeneration after partial spinal injury in adult rat: a progress report. *Soc Neurosci Abstr* 133.3.
- Au E, Roskams AJ (2002) Culturing olfactory ensheathing glia from the mouse olfactory epithelium. *Methods Mol Biol* 198: 49-54.
- Au E, Roskams AJ (2003) Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41: 224-236.
- Barnett SC, Alexander CL, Iwashita Y, Gilson JM, Crowther J, Clark L, Dunn LT, Papanastassiou V, Kennedy PG, Franklin RJ (2000) Identification of a human olfactory

- ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. *Brain* 123 (Pt 8): 1581-1588.
- Barnett SC, Hutchins AM, Noble M (1993) Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev Biol* 155: 337-350.
- Barnett SC, Roskams AJ (2002) Olfactory ensheathing cells. Isolation and culture from the rat olfactory bulb. *Methods Mol Biol* 198: 41-48.
- Bernal G, Vawter M, Nistor G, Gorjian A, Mendoza C, Espinosa J, McIntyre C, Keirstead H (2002) Transplantation of human olfactory ensheathing cells in the injured adult rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 204.16.
- Bradbury, E. J., Moon, L.D.F., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W. and McMahon, S.B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636-640.
- Burden S. and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18: 847-855.
- Camby I, Lefranc F, Titeca G, Neuci S, Fastrez M, Dedecken L, Schafer BW, Brotchi J, Heizmann CW, Pochet R, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. (2000). Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:76-90.
- Cantó-Nogués C, Pita-Thomas W, Martín-López E, Valle-Argós B and Nieto-Sampedro M (2006) A soluble factor produced by astrocytes causes bone marrow stromal cells to differentiate *in vitro* to neural stem cells. *Submitted*.
- Carraway, K.L., 3rd and Burden, S.J. (1995). Neuregulins and their receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5:606-612.
- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X and Chopp M (2001) Therapeutic benefits of intracerebral transplantation of bone-marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol.Sci.* 189: 49-57.
- Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH and Anderson AJ (2005) Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 14069-14074.
- Devon R, Doucette R (1992) Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 589: 175-179.
- Dobkin BH, Havton LA. 2004. Basic advances and new avenues in therapy of spinal cord injury. *Annu Rev Med* 55:255-282.
- Donato R. (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450(3):191-231.
- Doncel-Pérez E and Nieto-Sampedro M (2006) Neurosphere cells differentiate to aldynoglia phenotype in the presence of olfactory ensheathing cell conditioned medium. *Submitted*
- Doucette J.R.1984. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec* 210: 385-391.

- Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. (2004). S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol* 123(1):23-33.
- Englund U, Bjorklund A, Wictorin K. 2002a. Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 134(1-2):123-141.
- Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, Bjorklund A, Wictorin K. 2002b. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol* 173:1-21.
- Feinstein DL, Weinmaster GA, Milner RJ. (1992). Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J Neurosci Res* 32:1-14.
- Féron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart, Geraghty T and Mackay-Sim A (2006) Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain*, in press.
- Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, and Pearse DD (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci*. 25: 1169-1178.
- Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Goncalves CA. 2004. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* 29:735-740.
- Fujiwara Y, Tanaka N, Ishida O, Fujimoto Y, Murakami T, Kajihara H, Yasunaga Y, Ochi M. 2004. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 366: 287-291.
- Gessl A, Krugluger, W., Langer, K., Baumgartner, I., Spittler, A., Grabner, G., Forster, O. and Boltz-Nitulescu, G. (1995). Expression of MHC class II antigens on rat bone marrow cells and macrophages, and their modulation during culture with murine GM-CSF or M-CSF. *Immunobiology* 192:185-197.
- Graziadei GA, Graziadei PP (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8: 197-213.
- Gudiño-Cabrera, G. and Nieto-Sampedro, M. (1999) Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. *J. Neurobiol.* 40: 458-470.
- Gudiño-Cabrera, G. and Nieto-Sampedro, M. (2000) Schwann-like growth-promoting macroglia in adult rat brain. *Glia* 30:49-63.
- Harding J, Graziadei PP, Monti Graziadei GA, Margolis FL (1977) Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res* 132: 11-28.
- Heizmann CW. (1999). Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res* 24(9):1097-1100.
- Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. 2003. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells* 21:405-416.

- Hurt P, Walter L, Sudbrak R, Klages S, Muller I, Shiina T, Inoko H, Lehrach H, Gunther E, Reinhardt R, Himmelbauer H. 2004. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Res* 14:631-639.
- Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD (2000) Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Research* 854: 70-78.
- Kato T, Honmou O, Uede T, Hashi K. and Kocsis JD (2000) Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia* 30: 209-218.
- Lakatos, A., Smith, P.M., Barnett S.C. and Franklin, RJ (2003) Meningeal cells enhance limited CNS remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. *Brain* 126: 598-609.
- Lee VM-Y PH-I, Shalaefer WW. (1984). Monoclonal antibodies to gel-excised glial filament protein and their activities with other intermediate filament proteins. *J. Neurochem.* 42: 25-32.
- Lewis LM, Au E, Flynn E, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (2003) Transplantation of GFP-positive mouse olfactory mucosa-derived ensheathing cells into the rat spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstr.* 34.16.
- Li Y, Decherchi P, Raisman G (2003) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci.* 23: 727-731.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277: 2000-2002.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1998) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J. Neurosci.* 18: 10514-10524.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J, Bhatia M. 2004. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 22(4):448-456.
- Lu J, Feron F, Ho SM, Mackay-Sim A. and Waite, P.M. (2001) Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* 889: 344-357.
- Lu J, Feron F, Mackay-Sim, A. and Waite, P.M. (2002) Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 125: 14-21.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-17532.
- Metzger R, Parasta A, Joppich I, Till H. (2002). Organ-specific maturation of the major histocompatibility antigens in rats. *Pediatr Surg Int* 18: 640-647.
- Nash H.H., Borke R.C. and Anders, J.J. (2001) New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34: 81-87.
- Nash, H.H., Borke, R.C. and Anders, J.J. (2002) Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci* 22: 7111-7120.

- Navarro X, Valero A, Gudiño G, Fores J, Rodriguez FJ, Verdu E, Pascual R, Cuadras, J. and Nieto-Sampedro, M (1999) Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Neurol* 45: 207-215.
- Nieto-Sampedro M. 2002. CNS Schwann-like glia and functional restoration of damaged spinal cord. *Prog Brain Res* 136:303-318.
- Pascual JI, Gudiño-Cabrera G, Insausti R, Nieto-Sampedro M (2002) Spinal implants of olfactory ensheathing cells promote axon regeneration and bladder activity after bilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J Urol* 167: 1522-1526.
- Pixley SK (1992) The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* 5: 269-284.
- Plant GW, Christensen CL, Oudega M, Bunge MB (2003) Delayed transplantation of olfactory ensheathing glia promotes sparing/regeneration of supraspinal axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* 20: 1-16.
- Plant GW, Currier PF, Cuervo EP, Bates ML, Pressman Y, Bunge MB, Wood PM (2002a) Purified Adult Ensheathing Glia Fail to Myelinate Axons under Culture Conditions that Enable Schwann Cells to Form Myelin. *J Neurosci* 22: 6083-6091.
- Plant GW, Levison DB, Ruitenberg MJ, Harvey AR, Verhaagen J (2002b) Transplantation of adenoviral-NT3 transduced olfactory ensheathing glia induces axonal growth of corticospinal tract axons after a cervical lesion of the spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 334.7.
- Polentes, J., Stamegna, J.C, Nieto-Sampedro, M. and Gauthier, P. (2004) Phrenic rehabilitation and diaphragm recovery after cervical injury and transplantation of olfactory ensheathing cells. *Neurobiol.Dis.* 16: 638-653
- Raisman G (2001) Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury? *Nat Rev Neurosci* 2: 369-375.
- Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25: 425-435.
- Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1992) Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47: 213-220.
- Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1994) Regeneration into the spinal-cord of transected dorsal-root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Experimental Neurol.* 127: 232-244.
- Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18: 3803-3815.
- Riddell JS, Enriquez-Denton M, Toft A, Barnett SC (2002) Do pure olfactory ensheathing cell grafts promote functional regeneration of afferent fibres following dorsal root lesions? *Soc Neurosci Abstr* 635.2.
- Shen H, Tang Y, Wu Y, Chen Y, Cheng Z (2002) Influences of olfactory ensheathing cells transplantation on axonal regeneration in spinal cord of adult rats. *Chin J Traumatol* 5: 136-141.
- Smale KA, Doucette R, Kawaja MD (1996) Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Exp Neurol* 137: 225-233.

- Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R. (1998) Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta* 1448:277-289.
- Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB (2002) Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* 22: 6670-6681.
- Taylor JS, Muñetón-Gómez VC, Eguía-Recuero R, Nieto-Sampedro M (2001) Transplants of olfactory bulb ensheathing cells promote functional repair of multiple dorsal rhizotomy. *Prog Brain Res* 132: 641-654.
- Utzschneider DA, Archer DR, Kocsis JD, Waxman SG, Duncan ID (1994) Transplantation of glial-cells enhances action-potential conduction of amyelinated spinal-cord axons in the myelin- deficient rat. *Proc .Nat.Acad.Sci. US* 91: 53-57.
- Verdú,E., García-Álías, G., Forés, J., Gudiño-Cabrera, G., Nieto-Sampedro, M., and Navarro, X. (2001) Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *NeuroReport*, 12: 2303-2309.
- Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernandez-Moreno C, de Pablo F. (2003). Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23: 895-906.
- Warner EA, Deyoung DZ, Hoang TX, Franchini BT, Westerlund U, Havton LA. 2005. Differential distribution of growth associated protein (GAP-43) in the motor nuclei of the adult rat conus medullaris. *Exp Brain Res* 161(4):527-531.
- Wei, L.C., Shi, M., Chen, L.W., Cao, R., Zhang, P., Chan, Y.S.(2002). Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 9-17.
- Yan, H., Bunge, M.B., Wood, P.M., Plant, G.W. (2001a) Mitogenic response of adult rat olfactory ensheathing glia to four growth factors. *Glia* 33: 334-342.
- Yan, H., Nie, X. and Kocsis, J.D. (2001b) Hepatocyte growth factor is a mitogen for olfactory ensheathing cells. *J Neurosci Res* 66: 698-704.
- Yan, H. and Rivkees, S.A. (2002) Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res* 69: 597-606.
- Ziegler, D.R., Innocente, C.E., Leal, R.B., Rodnight, R. and Gonçalves, C.A. (1998). The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* 23:1259-1263.